

肥大型心筋症における遺伝子変異とその機能的意義の検討

《研究の概要》

肥大型心筋症は心室筋の肥厚を特徴とする難治性の心筋疾患である。最近の遺伝子解析により、少なくともその一部は遺伝子変異が原因であることが明らかになってきたが、肥大型心筋症の約4割近くの患者の原因は不明のままであり、新たな疾患遺伝子検索およびその病態の解明が極めて重要かつ緊急性を要する。どの遺伝子にどのような変異を有するかで、ある程度の臨床経過あるいは臨床予後の推定が可能となりつつある。また、家族性肥大型心筋症において同定された変異心筋ミオシンの機能はタンパク (in vitro motility assay) から個体 (トランスジェニック動物) にいたる様々なレベルで検討されてきた。ただし多くの場合遺伝子レベルの所見と個体・もしくは臓器といったマクロのレベルでの異常の相関が示されているに留まり、タンパクの異常が機能の低下をもたらすメカニズムについては明らかでなく、疾患のメカニズムにさらに検討を加えることが必要とされている。本研究では、肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索および変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討を行い、肥大型心筋症の成因解明、治療、予防への一助とすることを目的とした。

肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索の結果、トロポニン T 遺伝子変異の種類により、不整脈、閉塞性・非閉塞性肥大、拡張相 HCM などの有無とその程度や、突然死の頻度が異なる一方、同一家系内においても異なる臨床像を示す症例が認められた。また、ミトコンドリア遺伝子多型変異 (T16189C) と心肥大との間に深い関連性が認められた。

V540A 変異 SERCA2a は、in vitro の実験の結果、細胞増殖能が軽度亢進し、アポトーシスが亢進する可能性が示された。一方、V540A 変異 SERCA2a トランスジェニックマウスの実験の結果、V540A 変異 SERCA2a の心室筋への誘導によって、軽度の心機能低下をきたすことが示されたことにより、試験管内での実験でも、生体の心機能においても、変異 SERCA2a が機能異常を生じる可能性が示された。

拡張型心筋症の動物モデルである心筋症ハムスター (T0-2 strain) について収縮能および拡張能を多面的に検討した結果、等尺性張力、外部仕事など負荷の下での機能が大きく低下していた。弛緩時の張力-長さ関係の変化は拡張期の細胞内カルシウム濃度の上昇との関係が示唆された。また、微小管細胞骨格の増加が認められ細胞長軸方向の剪断剛性の上昇をもたらしていた。このような特性はこれまで検討されたことがなく今回初めて明らかになった。また、拡張型心筋症 (Bio-T02) ハムスターにおける等尺性収縮張力および ATPase 活性の Ca^{2+} 感受性の増大に TnI の脱リン酸化が関与していることを強く示唆し、TnI の脱リン酸化は、拡張型心筋症に見られる心機能低下に抗する役割を演じていると考えられた。一方、細胞内へのタンパク導入の基礎実験としておこなった GFP 発現では等尺性張力の低下が認められ GFP が必ずしも理想的なレポーターではない可能性が示唆された。

ミオシン 1 分子の Optical trap 実験によって、ミオシンの SH1 ヘリックスに変異をもつとその弾性係数が減少することがわかった。また、コンバータードメインに変異のあるミオシンでは熱安定性が低下し、変異型では著しい熱凝集性が観察された。

本研究により、肥大型心筋症は従来、サルコメア病とも呼ばれ、今まで殆どが心筋筋原線維構成蛋白について研究されてきた肥大型心筋症の原因解明における新たな突破口になると考えられる。今後さらに、心筋症における心機能異常の発生機序を解明することにより、心筋症の重症度評価、予後評価、長期経過観察に有益な情報を提供することができる可能性を拓き、疾患発症の分子機序に対する理解が一層深まり、新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究者氏名及び所属機関

氏名	所属機関名	分担研究テーマ
松岡瑠美子	東京女子医科大学医学部 循環器小児科 講師	疾患遺伝子の解析および表現型との検討
三枝木泰丈	鶴見大学歯学部生理学教室 助教授	肥大型心筋症における生理機能の解明
杉浦 清了	東京大学大学院 新領域創成科学研究科教授	肥大型心筋症において同定された変異 心筋ミオシンの機能的意義の再検討
茶圓 茂	日本大学文理学部 応用物理学科教授	心筋ミオシン分子のエネルギー変換過程 についての検討
南沢 享	横浜市立大学医学部 生理学第一講座 講師	変異 SERCA2a 遺伝子による心筋筋 小胞体カルシウム uptake への影響の検討

研究報告

I 研究目的

肥大型心筋症は心室筋の肥厚を特徴とする難治性の心筋疾患である。最近の遺伝子解析により、少なくともその一部は遺伝子変異が原因であることが明らかになってきたが、肥大型心筋症の約4割近くの患者の原因は不明のままであり、新たな疾患遺伝子検索およびその病態の解明が極めて重要かつ緊急性を要する。どの遺伝子にどのような変異を有するかで、ある程度の臨床経過あるいは臨床予後の推定が可能となりつつある。また、家族性肥大型心筋症において同定された変異心筋ミオシンの機能はタンパク (*in vitro motility assay*) から個体 (トランスジェニック動物) にいたる様々なレベルで検討されてきた。ただし多くの場合、遺伝子レベルの所見と個体・もしくは臓器といったマクロのレベルでの異常の相関が示されているに留まり、タンパクの異常が機能の低下をもたらすメカニズムについては明らかでなく、疾患のメカニズムにさらに検討を加えることが、必要とされている。

本研究では、

- ① 肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索
- ② 変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討

について研究事業を行い、肥大型心筋症の成因解明、治療、予防への一助とすることを目的とした。

II 研究計画および材料と方法

本研究では、肥大型心筋症の疾患遺伝子の検索法の確立および検索、変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討を行った。

①肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索

肥大型心筋症患者において、末梢血リンパ球より細胞株を樹立し、末梢血および細胞株より直接抽出した DNA を用いて心筋症患者のトロポニン T 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、SERCA2a 遺伝子、phospholamban 遺伝子、および新たな候補疾患遺伝子である免疫反応を抑制するたんぱく質である *PD-1* に関して、遺伝子解析を行い、表現型との関連性を検討した。本研究では、ヒト由来試料を用いてその遺伝子解析を行うため、提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護に十分配慮する

ため、提供者よりインフォームドコンセントを得た後に採血を行い、リンパ球細胞株の作成およびゲノム DNA を抽出し解析を行った。

② 変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討

1) 変異 SERCA2a 遺伝子による心筋筋小胞体カルシウム uptake への影響の検討

(1) 変異 SERCA2a 遺伝子を組み込んだ発現ベクターの作成

ヒト SERCA2a cDNA 全長を cloning し、さらに遺伝子組換え技術を用いて、われわれが既に肥大型心筋症患者に認めたのと同じの 1 塩基置換のあるヒト SERCA2a cDNA を作成した。cloning したヒト SERCA2a と組換え SERCA2a mutant cDNA の全塩基配列を、シーケンス解析によって、目的の cDNA に間違いがないことを確認した。上記の変異 SERCA2a 遺伝子と野生型 SERCA2a 遺伝子 cDNA をアデノウィルスベクターおよび哺乳動物発現ベクター (pCDNA3.1+) に組み入れたベクターを作成した。また、マウス・ラットとヒトでは SERCA2a cDNA の一部に相違があるため、ラット新生仔心筋細胞にヒト SERCA2a を発現させようとした場合、有効に SERCA2a 遺伝子が発現しない可能性が想定された。そこで、RT-PCR 法を用いて、マウス SERCA2a cDNA 全長を cloning した。同様に、肥大型心筋症患者に認めたのと同じの 1 塩基置換のあるマウス SERCA2a cDNA も作成した。

(2) 変異 SERCA2a 遺伝子による細胞増殖、アポトーシスへの影響

上記 (1) で作成した発現ベクターを用いて、COS7 培養細胞に遺伝子導入を行い、thymidine 取り込み実験によって、細胞増殖能に及ぼす影響を調べた。さらに、ELISA 法による Roche Cell Detection Kit を使用して、変異 SERCA2a (V540A) によるアポトーシスの誘導を調べた。

(3) 変異 SERCA2a 遺伝子心筋特異的発現トランスジェニックマウスの作成

マウス変異 SERCA2a 遺伝子を心筋特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作成するために、マウスアルファ型心筋ミオシン重鎖遺伝子のプロモーター下流に同遺伝子を配置したコンストラクトを作成した。これを精製して受精卵への注入し、4 系統のトランスジェニックマウスが作成できた。そのうちの 1 系統を重点的に解析した。

(4) 変異 SERCA2a 遺伝子心筋特異的発現トランスジェニックマウスの心機能解析

心エコー、心臓カテーテル検査によって、変異 SERCA2a 遺伝子心筋特異的発現トランスジェニックマウスの心機能解析を行った。

2) 肥大型心筋症において同定された変異心筋ミオシンの機能的意義の再検討

(1) 単一心筋細胞の機能測定

方法:我々は既にカーボンファイバーを用いた単一心筋細胞の張力-長さ測定系を開発しているが本研究ではこれをさらに改良することによって心筋細胞が生体内でうける様々な負荷条件のもとでの挙動を観察、評価できるようにした。また弛緩時の機械的特性については従来の長軸方向の張力-長さ関係に加え、長軸および短軸方向の剪断剛性、さらに短軸方向の押込固さについても測定できるようにした。

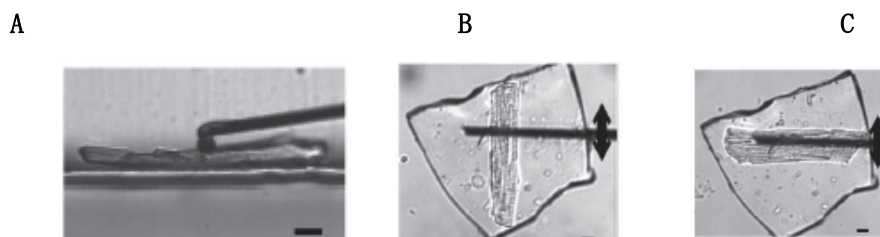


図 1 細胞の機械特性の測定 A: 短軸押込 B: 長軸剪断 C: 短軸剪断

材料：拡張型心筋症のモデル動物である心筋症ハムスター (T0-2 strain) について健常ハムスター (F1B strain) を対照として比較した。また心不全、心肥大などの病態において増加すると報告されている心筋細胞内の微小管の量が機械特性に与える影響を検討するためラット単一心筋細胞において薬理的に微小管の重合状態を変化させた。微小管を脱重合するためにコルヒチン (Col1)、重合を促進するためにパクリタキセル (Pac) を単離心筋の入った溶液に加えインキュベートした。

(2) 外来遺伝子が単離心筋細胞の機能に与える影響に関する検討

方法および材料：単離心筋細胞へのタンパクの遺伝子導入実験の基礎データとしてアデノウイルスベクターを用いた Green Fluorescent Protein (GFP) 発現が心筋細胞の収縮機能に与える影響を検討した。ラット単離心筋細胞を用い未処置の細胞および GFP 遺伝子を含まないアデノウイルスのみを感染させた細胞と比較した。感染後 24 時間で前述の単一心筋細胞機能測定系を用い収縮能を評価した。なお静止状態 (無収縮) においた培養心筋細胞は脱分化することが知られているため細胞に刺激を与え周期的に収縮させながら培養した。

3) 肥大型心筋症における生理機能の解明

心筋症における心機能低下の誘発機序を解明するため、新たに製作した、発生張力と ATPase 活性を同時に計測できる装置を用いて、10~16 週齢の正常 (Bio-F1B) および拡張型心筋症 (Bio-T02) ハムスターより得られた (1) 心室 trabeculae の等尺性収縮張力と ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度依存性を調べると共に、(2) 心室の myosin isoform の組成を PPI-PAGE により、また myosin light chain のリン酸化レベルを 2D-PAGE により解析した。また、心室 trabeculae の等尺性収縮張力—ATPase 活性— Ca^{2+} 濃度を解析した後、その標本を Pro-Q Diamond と SYPRO Ruby で二重染色し、myosin light chain (MLC), Troponin I (TnI), Troponin T (TnT), myosin-binding protein C (MBP-C) のリン酸化レベルを定量的に解析した。

4) 心筋ミオシン分子のエネルギー変換過程についての検討

R689H 変異体遺伝子を野生型遺伝子に PCR 法によって変異を導入し、その組み換え遺伝子を挿入したシャトルベクターを電気穿孔法により細胞性粘菌に導入し、アクチンプロモーターの制御下で組み換えタンパクを発現させる。そしてその ATPase 活性、In vitro motility assay (これは蛍光顕微鏡のスライドグラスにミオシンを吸着させ、その上に蛍光標識されたアクチンフィラメントと ATP を流し、ミオシン上をアクチンが滑る様子を蛍光顕微鏡で観察するアッセイのことである。), Optical trap 実験 (これはミオシン 1 分子の発生する力、スティフネス、アクチンフィラメントとの結合、解離の速度が調べられる実験)、熱変性実験を行った。

III 研究成果

① 肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索

肥大型心筋症患者において、末梢血リンパ球より細胞株を樹立し、末梢血および細胞株より直接抽出した DNA を用いて心筋症患者の心筋トロポニン T 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、SERCA2a 遺伝子、phospholamban 遺伝子、および新たな候補疾患遺伝子である免疫反応を抑制するたんぱく質である *PD-1* 遺伝子について、遺伝子解析を行い、表現型との関連性を検討した結果、心筋トロポニン T 遺伝子については、対象の家族性 HCM 53 症例のうち 4 例 (7.8%) で、心筋トロポニン T 遺伝子の突然変異を認めた。突然変異を認めた 4 例のうち 3 例は既に報告された変異であり、1 例は新たな変異であった。また、心筋肥大の程度との関連が報告されている、イントロン 3 の 5 塩基対欠失/欠失多型を、53 症例中 24 症例

(45.3%)で認めた。心筋トロポニンT遺伝子の新たな突然変異を認めた1例は、このイントロン3の5塩基対欠失/欠失多型も伴い、比較的高度な心肥大と若年での突然死を認めた。また、ミトコンドリア遺伝子多型変異(T16189C)を認め、心肥大との間に深い関連性が認められた。一方、SERCA2a遺伝子、phospholamban遺伝子、*PD-1*遺伝子に関しては、変異が認められなかったもしくは、数種類の多型変異を認めた。これらの多型変異が肥大型心筋症患者と健常人における頻度が異なるかどうかの比較検討を行ったが、有意な差は認められなかった。

② 変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討

1) 変異SERCA2a遺伝子による心筋筋小胞体カルシウム uptake への影響の検討

変異SERCA2a(V540A)を発現したCOS7培養細胞は、野生型SERCA2aに比べ、有意にアポトーシスを生じていた(図2)。SERCA2a(V540A)を発現したCOS7培養細胞は、野生型SERCA2aに比べ、軽度であるが、有意に細胞増殖能が亢進していた(図3)。V540A変異SERCA2aトランスジェニックマウスでは、mRNA、タンパクレベルで約1.7倍にSERCA2aが過剰発現することを確認した。V540A変異SERCA2aトランスジェニックマウス(TG)では、非トランスジェニックマウス(NTG)と比べて、軽度の左心室-体重比の増加を認めた(TG 3.86 ± 0.10 mg/g vs NTG 3.57 ± 0.09 mg/g, $p < 0.05$, $n=9$)。V540A変異SERCA2aトランスジェニックマウス(TG)では、非トランスジェニックマウス(NTG)と比べて、心臓収縮能の指標である

図2

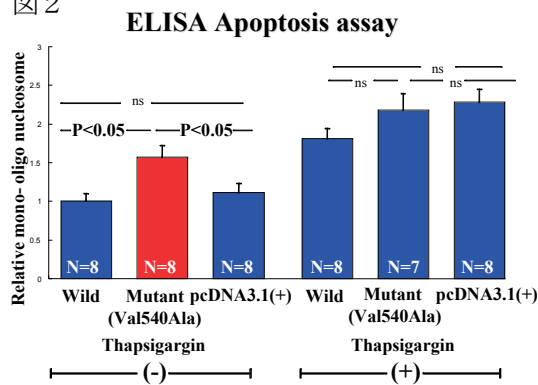
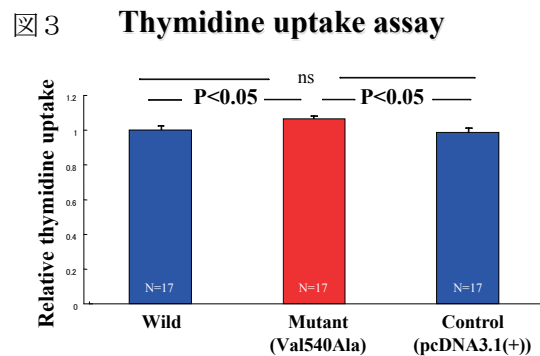


図3



dP/dTmaximumが有意に低下していた(TG 7551 ± 333 mg/g vs NTG 9012 ± 544 , $p < 0.05$, $n=9$)。

2) 肥大型心筋症において同定された変異心筋ミオシンの機能的意義の再検討

(1) 心筋症ハムスターの心筋細胞の機能

図4に示す通りカーボンファイバーを用いた単一心筋細胞張力-長さ測定系により心筋細胞の収縮機能を広い範囲の負荷条件で測定することができた。図4に示すように心筋症ハムスター(CMP)より単離した心筋細胞は等尺性張力、短縮距離、外部仕事の全てが健常ハムスター(CTRL)より明らかに低下していた。

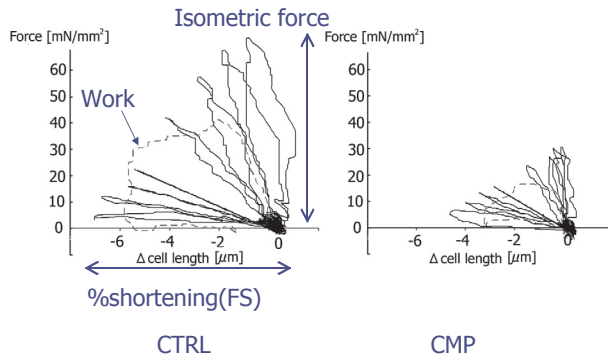


図4 単一細胞の収縮期張力-長さ関係

さらに拡張期の張力-長さ関係も左に変位しており細胞レベルで拡張機能不全を確認した (図5)。

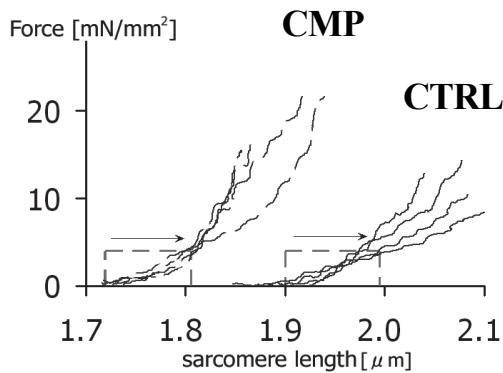


図5 拡張期張力-長さ関係

この変位は BDM 処理によって正常化したため拡張期の細胞内カルシウム濃度上昇によるクロスブリッジ形成によるものと考えられた。実際 Indo-1 による測定では CMP 群で拡張期のカルシウム濃度上昇と収縮期のピーク低下が見られ、これが機能不全の一つの原因と考えられた。拡張期の特性についてはさらに多面的に検討した。心筋症ハムスターにおいても図6に示す通り微小管が増加しているが細胞の物性で変化が認められたのは剪断剛性のみであった。またこの剛性の上昇はコルヒチンによる微小管の脱重合によって正常化した。薬理的に微小管の重合状態を変化させたラット心筋細胞においても同様の結果を得た。

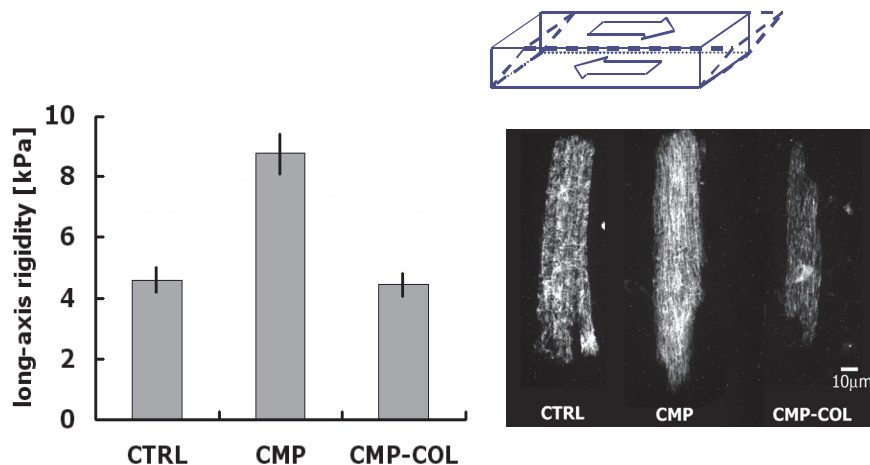


図6 コントロール(CYRL), 心筋症(CMP), 心筋症のコルヒチン処理 (CMP+COL) における微小管の量の変化 (右) とそれによる剪断剛性の変化

(2) 外来遺伝子が単離心筋細胞の機能に与える影響に関する検討

MOI 1000 までの広い範囲で感染細胞の生存率に差はみられなかった。短縮率、最大短縮速度は 24 時間後には未感染、アデノウイルス、アデノ GFP すべてで低下していたが群間に差はみられなかった。ところが等長性張力は未感染群、アデノウイルス感染群では 24 時間後にも明らかな変化が認められなかったのに対し GFP 群のみで有意に低下していた (図 7)。

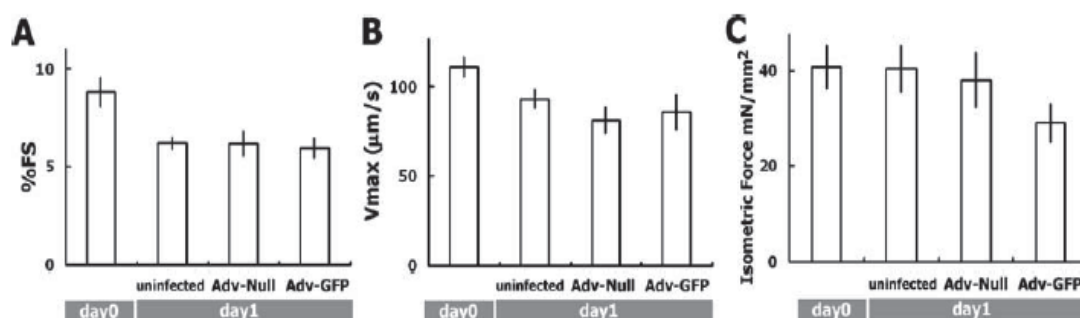


図7 収縮性の変化 A: 短縮率、B: 最大短縮速度、C: 等長性張力 各パネルにおいて左から単離直後、未感染群、アデノウイルス群、アデノ GFP 群を示す。

3) 肥大型心筋症における生理機能の解明

(1) myosin isoform は左右心室ともに、Bio-F1B ではほとんど V_1 ($\alpha\alpha$) タイプであったが、Bio-T02 では V_1 タイプから V_3 ($\beta\beta$) タイプに移行 ($V_1=50\%$, $V_2=30\%$, $V_3=20\%$) すること、(2) MLC のリン酸化レベルは、MLC1, MLC2 共に Bio-F1B に比べて Bio-T02 の方が低いこと、(3) 等尺性収縮張力および ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度感受性は、Bio-F1B に比べて Bio-T02 が高いこと、(4) 二重染色法でも、TnT を除いて、MLC, TnI, MBP-C のリン酸化レベルが Bio-T02 では、Bio-F1B に比べて著しく低いことが判明した。

4) 心筋ミオシン分子のエネルギー変換過程についての検討

ミオシン単独の ATPase 活性は変異型で $0.11 S^{-1}$ 、野生型はその 1.8 倍の $0.20 S^{-1}$ であった。また、アクチン活性 ATPase 活性の V_{max} は変異型 $1.02 S^{-1}$ 、野生型 $1.12 S^{-1}$ と変わらず、一方 Kactin は変異型が $30 \cdot M$ 、野生型は $55 \cdot M$ と変異型のほうがアクチンに対する親和性が高いことを示した。

変異型ミオシン上のアクチン滑り速度は $0.4 \cdot m/s$ 、一方、野生型ミオシン上のアクチン滑り速度は $1.9 \cdot m/s$ となり、変異型ミオシンは約 20% にその滑り速度を減少させた。

Optical trap 実験からはミオシン 1 分子がアクチンを滑るステップサイズが測定できるが、その大きさは変異型、野生型どちらも約 3nm で変わらなかった。ところが、同時にミオシン、アクチンとの結合の強さ、スティフネスが測定できるが、その値は有意に変異型のほうが小さかった。また、変異型と野生型のミオシンを混ぜた in vitro motility assay 実験からもスティフネスの寄与が測定できるが、その実験からも変異型のミオシンはその弾性係数が小さいことを示唆した。

熱変性実験からは野生型は 0.02 min^{-1} 、変異型は 0.12 min^{-1} 、のように変異型のほうが熱変性しやすいことがわかった。

IV 考察

① 肥大型心筋症の疾患遺伝子、疾患候補遺伝子の検索

トロポニン T 遺伝子変異の種類により、不整脈、閉塞性・非閉塞性肥大、拡張相 HCM などの有無とその程度や、突然死の頻度が異なる一方、同一家系内においても異なる臨床像を示す症例が認められる。トロポニン T 遺伝子変異を有する 4 家系全てで、小児期における肥大型心筋症の発症と突然死を認めた。また、ミトコンドリア遺伝子多型変異 (T16189C) と心肥大との間に深い関連性が認められた。SERCA2a 遺伝子、phospholamban 遺伝子、*PD-1* 遺伝子に関しては、変異が認められなかったもしくは、数種類の多型変異を認めた。これらの多型変異が肥大型心筋症患者と健常人における頻度が異なるかどうかの比較検討を行ったが、有意な差は認められなかった。

② 変異蛋白、心筋細胞を用いた病態解析および機能解析の検討

1) 変異 SERCA2a 遺伝子による心筋筋小胞体カルシウム uptake への影響の検討

本研究において、V540A 変異 SERCA2a は、*in vitro* の実験において、細胞増殖能が軽度亢進し、アポトーシスが亢進する可能性が示された。このアポトーシス亢進は、thapsigargin を投与し、SERCA2a 機能を一律に低下させたときに、差が認められなくなることから、V540A 変異 SERCA2a によって、SERCA2a 機能に異常があるために生じているものと推察された。一方、V540A 変異 SERCA2a トランスジェニックマウスの実験からは、V540A 変異 SERCA2a の心室筋へお誘導によって、軽度の心機能低下をきたすことが示された。変異 SERCA2a トランスジェニックマウス的心室筋では、心房性利尿ペプチドの有意な増加が認められること、心重量の増加があることから、心筋負荷により、心肥大をきたしていることが示された。この原因については、さらに詳細に検討する必要があるが、変異 SERCA2a によって、筋小胞体へのカルシウム再取り込みが低下し、その結果心機能が低下していることが推察された。*in vitro* で認めた細胞増殖能の亢進やアポトーシスの増加による影響については、今回の研究期間中に明らかにすることが出来なかったため、今後検討すべき重要な課題と考えた。今までの報告では、SERCA2a 機能調節に重要な役割を担っている Phospholamban の遺伝子異常によって心筋症が生じることは報告されているが、SERCA2a 自体の異常によって心筋症が生じるという報告はない。本研究によって、試験管内での実験でも、生体の心機能においても、変異 SERCA2a が機能異常を生じる可能性が示された。今後は機能障害をきたす原因の、さらに詳細な分子機序を解明してゆくべきである。

2) 肥大型心筋症において同定された変異心筋ミオシンの機能的意義の再検討

拡張型心筋症の動物モデルである心筋症ハムスター (T0-2 strain) について収縮能および拡張能を多面的に検討した。収縮能低下は臓器レベル等で既に報告されているが単一心筋での詳細な検討は初めてである。特に等尺性張力、外部仕事など負荷の下での機能が大きく低下していたことは本モデルの原因遺伝子が細胞骨格 (δ サルコグリカン) であることに由来していると考えられる。弛緩時の張力-長さ関係の変化は拡張期の細胞内カルシウム濃度の上昇との関係が示唆された。また心筋症ハムスターでは微小管細胞骨格の増加が認められ細胞長軸方向の剪断剛性の上昇をもたらしていた。このような特性はこれまで検討されたことがなく今回初めて明らかになったものであるが心筋細胞が心臓の壁の中では複雑な変形を受け特に壁が捻れを起こす際には剪断変形を受けていることを考えれば心臓の収縮・弛緩調節に重要な役割を果たしていると考えられる。このように心筋症ハムスターの細胞内では様々な構成タンパクの変化が生じておりそれらは多様な形で細胞の機能に結びついていることが明らかになった。一方

細胞内へのタンパク導入の基礎実験としておこなった GFP 発現では等尺性張力の低下が認められ GFP が必ずしも理想的なレポーターではない可能性が示唆された。さらに両方の実験の結果からは心筋細胞の機能異常は負荷の下で顕在化することが示されこのような実験系の有用性が明らかになったと考える。今後は他の動物モデルでの測定およびタンパク発現実験と組み合わせ機能タンパクの異常と心筋細胞の機能異常との関係を検討していく予定である。

3) 肥大型心筋症における生理機能の解明

Bio-T02 における等尺性収縮張力および ATPase 活性の Ca^{2+} 感受性の増大に TnI の脱リン酸化が関与していることを強く示唆する。そして、この Bio-T02 に見られる myosin isoform の V1 から V3 への移行、MLC や MBP-C の脱リン酸化がいずれも等尺性収縮張力の Ca^{2+} 感受性を低下させると言うこれまでの報告を考えると、TnI の脱リン酸化は、拡張型心筋症に見られる心機能低下に抗する役割を演じていると考えられる。

4) 心筋ミオシン分子のエネルギー変換過程についての検討

ミオシン 1 分子の Optical trap 実験によって、ミオシンの SH1 ヘリックスに変異をもつとその弾性係数が減少することがわかった。この結果は SH1 ヘリックスがミオシン ATPase の微小変化をレバーアームの動きに変換するコンバーターのフレキシビリティに参与していることを示唆している。最近、ケーラーたちは、コンバータードメインに変異のある家族性心筋症の筋繊維を調べたところ、同じようにその弾性係数が減少していることを報告している。また、コンバータードメインに変異のあるミオシンでは熱安定性が低下している。さらに熱凝集性を調べたところ、変異型では著しい熱凝集性が観察された。以上のことから、これらの変異ミオシンの性質が難聴をもたらし、また、家族性心筋症の病気をもたらすことが示唆された。

本研究により、肥大型心筋症は従来、サルコメア病とも呼ばれ、今まで殆どが心筋筋原線維構成蛋白について研究されてきた肥大型心筋症の原因解明における新たな突破口になると考えられる。今後さらに、心筋症における心機能異常の発生機序を解明することにより、心筋症の重症度評価、予後評価、長期経過観察に有益な情報を提供することができる可能性を拓き、疾患発症の分子機序に対する理解が一層深まり、新たな治療法の開発につながることを期待される。

V 研究成果の発表

A. 論文・著書

1. Momiyama Y, Furutani M, Suzuki Y, Ohmori R, Imamura S, Mokubo A, Asahina T, Murata C, Kato K, Anazawa S, Hosokawa K, Atsumi Y, Matsuoka K, Kimura M, Kasanuki H, Ohsuzu F, Matsuoka R. A mitochondrial DNA variant associated with left ventricular hypertrophy in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 312:858-864, 2003.
2. Yasuda S, Sugiura S, Yamashita H, Nishimura S, Saeki Y, Momomura S, Katoh K, Nagai R and Sugi H. Unloaded shortening increases the peak of Ca^{2+} transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes. *Am J Physiol* 285(2):H470-H475, 2003.
3. Harada T, Nakajima T, Kobayakawa N, Sugiura S, Nagai R. Slowly developing heart failure associated with hormonal disorder. *J Cardiol* 42:95-98, 2003.
4. Yamashita H, Sugiura S, Fujita H, Yasuda S, Nagai R, Saeki Y, Sunagawa K, Sugi H. Myosin light chain isoforms modify force-generating ability of cardiac myosin by changing the kinetics of actin-myosin interaction. *Cardiovasc Res* 60(3):580-508, 2003.

5. Watanabe H, Sugiura S, Hisada T. Finite element analysis on the relationship between left ventricular pump function and fiber structure within the wall. *JSME International Journal Series C* 46:1330–1339, 2003.
6. Saeki Y, Kobayashi T, Yasuda S, Nishimura S, Sugiura S, Yamashita H, Sugi H. Role of Ca^{2+} in determining the rate of tension development and relaxation in rat skinned myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36:371–380, 2004.
7. Nishimura S, Yasuda S, Katoh M, Yamada KP, Yamashita H, Saeki Y, Sunagawa K, Nagai R, Hisada T, Sugiura S. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded and physiologically loaded conditions. *Am J Physiol* 287:H196–202, 2004.
8. Kato M, Matsumoto A, Nakajima T, Hirose K, Iwasawa K, Takenaka K, Yamashita H, Sugiura S, Hirata Y, Nagai R. Amlodipine Increases Nitric Oxide Production in Exhaled Air during Exercise in Patients with Essential Hypertension. *Am J Hyperten* 17:729–33, 2004
9. Watanabe H, Sugiura S, Hisada T. Multi-physics simulation of left ventricular filling dynamics using fluid-structure interaction finite element method. *Biophys J* 87:2074–2085, 2004.
10. Okada J, Sugiura S, Nishimura S, Hisada T. 3D simulation of calcium waves and contraction in cardiomyocytes using the finite element method. *Am J Physiol* 288:C510–C522, 2004.
11. Watanabe H, Sugano T, Sugiura S, Hisada T. Finite element analysis of ventricular wall motion and intra-ventricular blood flow in heart with myocardial infarction. *JSME International Journal Series C* 47:1019–1026, 2004.
12. Sugiura S, Yasuda S, Yamashita H, Kato K, Saeki Y, Kaneko H, Suda Y, Nagai R, Sugi H. Measurement of force developed by a single cardiac myocyte using novel carbon fibers. In Sugi H ed. *Molecular and cellular aspects of muscle contraction*. Plenum Press, New York 381–387, 2004.
13. Yamashita H, Sugiura S, Fujita H, Yasuda S, Nagai R, Saeki Y, Sugi H. Myosin heavy chain isoforms modulate motor function of cardiac myosin by changing crossbridge kinetics. *Pathophysiology of cardiovascular disease* Eds. Dahilla NS, Rupp H, Angel A, Pierce GN Kluwer Academic Publishers Boston 2004:35–49
14. 茶園 茂. 重水中アクトミオシン滑り運動. *日本大学文理学部自然科学研究所紀要* 39, 325–329, 2004.
15. 茶園 茂. 筋肉の構造. *Geriatric Med* 42, 863–868, 2004.
16. Kobayashi T, Saeki Y, Chaen S, Shirakawa I, Sugi H. Effect of deuterium oxide On contraction characteristics and ATPase activity in glycerinated single rabbit skeletal muscle fibers. *B. B. A.* 1659, 46–51, 2004.
17. Saeki Y, Kobayashi T, Yasuda S, Nishimura S, Sugiura S, Yamashita H, & Sugi H. Role of Ca^{2+} in determining the rate of tension development and relaxation in rat skinned myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36: 371–380, 2004.
18. Nishimura S, Yamashita H, Katoh M, Yamada K. P., Sunagawa K, Saeki Y, Ohnuki Y, Nagai R, Sugiura S. Contractile dysfunction of cardiomyopathic hamster myocytes is pronounced under high load

- conditions. *J Mol Cell Cardiol* 39: 231-239, 2005.
19. Yoshida M, Minamisawa S, Shimura M, Komazaki S, Kume H, Zhang M, Matsumura K, Nishi M, Saito M, Saeki Y, Ishikawa Y, Yanagisawa T & Takeshima H. Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcocalumenin-deficient mice. *J Biol Chem* 280: 3500-3506, 2005.
 20. Nishimura S, Yamashita H, Katoh M, Yamada KP, Sunagawa K, Saeki Y, Ohnuki Y, Nagai R & Sugiura S. Contractile dysfunction of cardiomyopathic hamster myocytes is pronounced under high load conditions. *J Mol Cell Cardiol* 39: 231-239, 2005.
 21. Arai C, Ohnuki Y, Umeki D & Saeki Y. Effects of bite-opening and cyclosporine A on the mRNA levels of myosin heavy chain and the muscle mass in rat masseter. *Jpn J Physiol* 55: 173-179, 2005.
 22. Nishimura S, Nagai S, Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Okada J-I, Hisada T, Nagai R, Sugiura S. Microtubules modulate the stiffness of cardiomyocytes against shear stress. *Circ Res* 98:81-87, 2006.
 23. 岩井草介、茶園 茂 ミオシンのATP依存的構造変化に含まれる拡散的な過程 日本大学文理学部自然科学研究所紀要 41, 263-268, 2006.
 24. Nishimura S, Saeki Y, Nagai R & Sugiura S. Microtubules modulate the stiffness of cardiomyocytes against shear stress. *Circ Res* 98: 81-87, 2006.
 25. Nishimura S, Nagai S, Sata M, Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Nagai R & Sugiura S. Expression of green fluorescent protein impairs the force-generating ability of isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 286: 59-65, 2006.
 26. Nishimura S, Nagai S, Sata M, Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Nagai R, Sugiura S. Expression of green fluorescent protein impairs the force-generating ability of isolated rat ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* (2006) in press
 27. Matsuoka R. Study of the vertebral MHC multigene family during heart development. *J Mus Res cell Motil* (in press)
 28. Akiyama N, Ohnuki Y, Kunioka Y, Saeki Y & Yamada T. Transverse stiffness of myofibrils of skeletal and cardiac muscles studied by atomic force microscopy. *J Physiol Sci* (in press)
 29. Arai C, Ohnuki Y, Umeki D, Hirashita A & Saeki Y. Effects of clenbuterol and cyclosporin A on the myosin heavy chain mRNA level and muscle mass in rat masseter. *J Physiol Sci* (in press)
 30. Shiono E, Nakanishi T, Shimizu T, Akimoto K, Furutani M, Imamura S, Kasanuki H, Matsuoka R. The same mutation in the cardiac troponin T gene show various prognoses in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. (in preparation)

B. 学会発表

1. Chen CH, Nakada K, Murakami H, Kuno S, Tawata M, Matsuoka R, Hayashi JI. Determination of normal ranges of mitochondrial respiratory activities by mtDNA transfer from normal subjects to mtDNA-less HeLa cells. 第26回日本分子生物学会, 2003.
2. 新井正一、陳 柱石、樺山幸彦、古谷道子、林 純一、松岡瑠美子. 突然死多発家系におけるミト

- コンドリア DNA 変異とミトコンドリア機能低下. 第 1 2 回関東小児心筋疾患研究会、2003.
3. Momiyama Y, Furutani M, Suzuki Y, Imamura S, Hosokawa K, Atsumi Y, Matsuoka K, Kimura M, Kasanuki H, Ohsuzu F, Matsuoka R. A common mitochondrial DNA variant associated with left ventricular hypertrophy in type 2 diabetes mellitus. American College of Cardiology 52nd Annual Scientific Session, 2003.
 4. 縦山幸彦、古谷道子、鈴木吉彦、木村満、大鈴文孝、松岡瑠美子. 2 型糖尿病例の左室肥大におけるミトコンドリア遺伝子異常の関与. 第 51 回日本心臓病学会, 2003.
 5. Saeki Y, Arai C, Ohnuki Y, Umeki D, Hirashita A & Yanagisawa K. Effects of clenbuterol and cyclosporin on contractile and Ca²⁺-handling mRNAs. 83rd General Session & Exhibition of the IADR, Baltimore, 3.9-12, 2005.
 6. Arai C, Saeki Y, Umeki D, Ohnuki Y, Yanagisawa K & Hirashita A. Rat masseter muscle plasticity analyzed at mRNA levels. 83rd General Session & Exhibition of the IADR, Baltimore, 3.9-12, 2005.
 7. Ohnuki Y, Saeki Y, Arai C, Umeki D, Hirashita A & Yanagisawa K. Effect of clenbuterol and cyclosporinA on rat masseter muscle. 83rd General Session & Exhibition of the IADR, Baltimore, 3.9-12, 2005.
 8. Shimura M, Minamisawa S, Ishikawa T, Uchino K, Saeki Y, Kimura K, Ishikawa Y & Umemura S. Sarcalumenin deficiency induced cardiac dysfunction in mice. 第 69 回日本循環器学会, パシフィコ横浜, 3.19-21, 2005.
 9. Saeki Y, Ohnuki Y, Yanagisawa K, Nishimura S, Yamashita H, Katoh M & Sugiura S. Contractile protein isoforms and functional characteristics of dilated cardiomyopathy of Syrian hamsters (Bio T0-2 strain). The 35th International Congress of Physiological Sciences, San Diego, 3.31-4.5, 2005.
 10. Nishimura S, Yamashita H, Katoh M, Saeki Y, Ohnuki Y, Yanagisawa K & Sugiura S. Myocardial contractile dysfunction of dilated cardiomyopathic hamster is pronounced under loaded conditions. The 35th International Congress of Physiological Sciences, San Diego, 3.31-4.5, 2005.
 11. Akiyama N, Ohnuki Y, Kunioka Y, Saeki Y & Yamada T. Transverse stiffness of sarcomeres of striated muscle and their molecular architecture: comparison between skeletal and heart myofibrils. The 35th International Congress of Physiological Sciences, San Diego, 3.31-4.5, 2005.
 12. Shimura M, Minamisawa S, Takeshima H, Saeki Y, Ishikawa Y & Uemura N. Sarcalumenin ablation induced cardiac dysfunction in mice. The 35th International Congress of Physiological Sciences, San Diego, 3.31-4.5, 2005.
 13. 大貫芳樹、三枝木泰丈、柳沢慧二. 拡張型心筋症ハムスター(Bio T0-2)心室筋における収縮タンパク質のアイソフォームと濃度の解析、第 82 回日本生理学会、仙台国際センター、5.18-20, 2005. Jpn. J. Physiol. 55(Suppl.): S95, 2005.
 14. 秋山直生、大貫芳樹、国岡由紀、三枝木泰丈、山田武範. 原子間力顕微鏡及び SDS-PAGE による心筋と骨格筋のサルコメア分子構築の研究、第 82 回日本生理学会、仙台国際センター、5.18-20, 2005.

- Jpn. J. Physiol. 55(Suppl.): S115, 2005.
15. 南沢 享, 毛利 真弥, 志村 美英, 白 云哲, 石川 義弘. SERCA2a 遺伝子異常による心機能異常. 第9回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、キコロ”ホテルピアノ”、8.26-28, 2005.
 16. 大貫芳樹、三枝木泰丈、新井千博、梅木大輔、柳沢慧二. 咬合挙上によるラット咬筋筋線維タイプの変化に対する Cyclosporin A の作用、第47回歯科基礎医学会大会、仙台国際センター、9.28-30, 2005.
 17. 新井千博、三枝木泰丈、大貫芳樹、梅木大輔、柳沢慧二、平下斐雄. 咬合挙上および Cyclosporin A 投与が筋重量、ラット咬筋筋線維タイプに及ぼす影響、第47回歯科基礎医学会大会、仙台国際センター、9.28-30, 2005.
 18. 梅木大輔、三枝木泰丈、大貫芳樹、新井千博、柳沢慧二、平下斐雄. 咬合挙上がラット顎二腹筋の筋重量およびミオシン重鎖 mRNA に及ぼす影響、第47回歯科基礎医学会大会、仙台国際センター、9.28-30, 2005.
 19. 岩井草介、須藤和夫、茶園 茂 ミオシンの ATP 依存的な構造変化に含まれる拡散的過程 第43回日本生物物理学会 札幌 11.23, 2005.
 20. 花元大輔、岩井草介、須藤和夫、茶園 茂 SH1 ヘリックスに変異を導入したミオシンの運動機能解析 第43回日本生物物理学会 札幌 11.23, 2005.
 21. Shiono E, Nakanishi T, Shimizu T, Akimoto K, Furutani M, Imamura S, Kasanuki H, Matsuoka R. The same mutation in the cardiac troponin T gene show various prognoses in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. The 70th Anniversary Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Nagoya 3.36, 2006.
 22. 大貫芳樹、秋山直生、山田武範、三枝木泰丈. 拡張型心筋症ハムスター (BioT0-2) 心筋における収縮タンパク質リン酸化と機能特性の解析. 第83回日本生理学会大会、群馬県民会館・前橋症候会議所、3.28-30, 2006. J. Physiol. Sci. 56(Suppl.): S125, 2006.
 23. Bai Y, Minamisawa S, Mouri M, Ishikawa Y. Abnormal cardiac function is associated with a mutation of the SERCA2a gene. The 83th Annual Meeting of the Japanese Physiological Society, Maebashi, 3.28-30, 2006.