

心臓が大きく強くなるしくみの研究

「形とはたらき」領域 阪本 英二

要 旨

心臓は、心筋細胞と呼ばれる特殊な横紋筋細胞が、直接あるいは細胞外基質を介して無数に結合したものである。本研究では、心筋細胞内部にある筋原線維（収縮の基本装置）と筋形質膜（筋細胞の細胞膜）との架橋の分子基盤に、はじめて解明の糸口を与えることができた。それと同時に、いくつかの遺伝子異常症の原因遺伝子の同定も試みた。

1. 研究のねらい

心臓が血液ポンプとして有効に機能するためには、全体が同期して収縮しなければならない。このための装置として、洞結節で発生する電氣的興奮を心臓全体に速やかに伝え、その協調的収縮を誘起する刺激伝導系の存在が知られている。

それでは、個々の心筋細胞の筋形質膜表面に伝わった電氣的興奮は、細胞深部に無数に存在する筋原線維にどの様にして伝えられ、また筋原線維で発生する張力はどの様にして筋形質膜に伝えられるのであろうか。

本さきがけ研究では、重症な心臓病である心筋症のモデル動物（心筋症ハムスター）の原因遺伝子と発症機構の解明を通じ、心筋形質膜と筋原線維との電氣的あるいは機械的相互作用を支える分子的基盤の解明を目指した。また、心臓が様々なストレスに対抗する適応機構や、いくつかの興味深い遺伝子異常症の原因遺伝子の解明も試みた。

2. 研究方法と成果

2-1 心臓の協調的収縮の基盤となる心筋細胞内の分子機構

心筋症ハムスターには、大変面白いことに、プロトタイプである肥大型の BIO14.6（以下 B と略す）と、そこから分離された重症な拡張型の TO-2（以下 T と略す）がある（図 1）。このことは、1）心筋症になる共通の原因遺伝子と、2）心筋症が重症化する修飾遺伝子、の存在を強く示唆した。

B、T 両型の心筋症ハムスターに共通の遺伝子異常は、 δ -sarcoglycan 遺伝子のプロモーターを含むゲノム領域に欠失であり、その結果、dystrophin-associated proteins (DAPs)

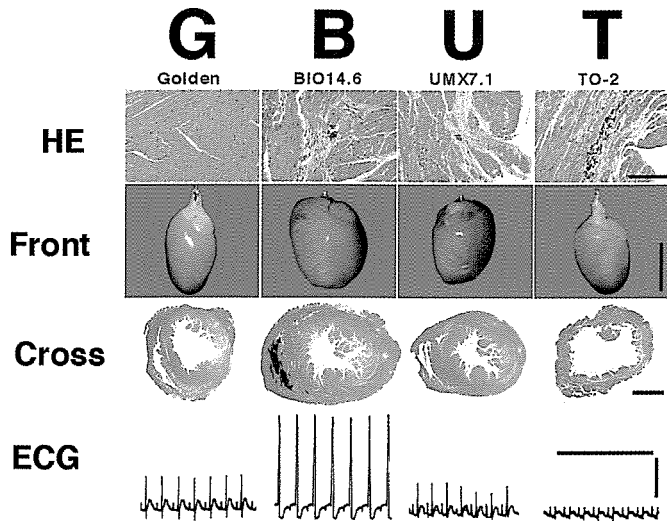


図1 心筋症ハムスターの特徴
 拡張型のTでは、心筋が薄く、心電図の電圧も低い。
 UMX7.1は別系統の心筋症ハムスター。詳しくは、
 A. Sakamoto, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
 1997, 94 (13873-13878) を参照。

の崩壊から心筋壊死に至ることは先に証明した。Dystrophinは、Duchenne型筋ジストロフィー症の原因遺伝子がコードする膜タンパク質であり、そこにはsarcoglycans (α -、 β -、 γ -、 δ -SG)、dystroglycans (α -、 β -DG)、dystrobrevinなど複数のDAPsが結合して巨大なタンパク質複合体が形成される。本研究では、拡張型心筋症ハムスターに存在する第二の心筋症遺伝子の解明を目指した。

2-1-1 拡張型心筋症ハムスターの病態

心筋細胞は圧負荷や低酸素負荷に対し、細胞分裂はせず、その容積を増やすという特徴がある(代償性心肥大)。したがって、拡張型心筋症ハムスターではこの代償機構にも遺伝的異常が存在するのではないかとまず考えた。ところが予想に反し、心肥大関連遺伝子の発現量はBよりTの方が亢進していた。一方、TUNELおよびDNAのladderingいずれにおいてもBとTで差はなく、また線維化や炎症細胞の浸潤はTで著しかったことから、TではB以上に心筋のnecrosisが起きていることが判明した。また、超音波画像診断により、Tでは単に心室壁が薄いのみでなく、心室の動きが空間的に無秩序であることも見出した(図2)。

透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて心筋細胞の超微細構造を検討したところ、Tの左心室筋には、1)筋原線維の横紋に相当するZ線が極めて脆い、2)T管がほとんど存在しない、3)Z線の間隔が不均一な所がある、という3つの形態異常を見出した(図3)。Z線とは筋原線維(主にmyosinとactinから構成される)内の基本収縮単位(サルコメア)の仕切であり、T管とは筋形質膜がZ線に向

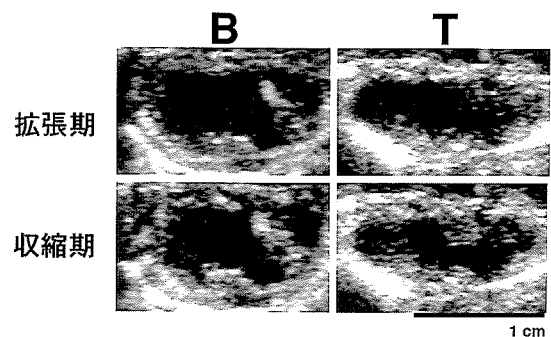


図2 ハムスター心臓の超音波画像
 Bの左心室は同心円状に収縮するが、Tでは単に肉薄であるだけでなく、壁運動が空間的に不均一である。

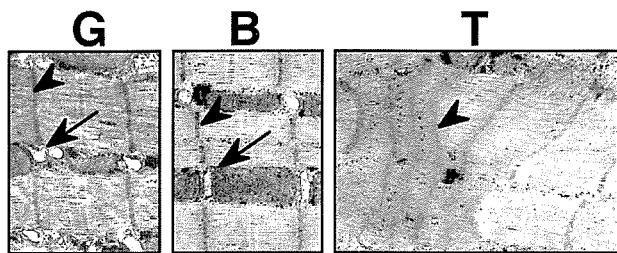


図3 ハムスター左心室筋の TEM
TではZ線 (arrowhead) が脆く、その間隔が不均一なところがある。また、T管 (arrow) がほとんど見当たらない。

する何らかのタンパク質が欠失していることが示唆された。生後6週の左心室筋から筋原線維を抽出し、さらに myosin と actin を段階的に除去し、Z線の構成タンパク質を濃縮した標品を調製し、既知のZ線構成タンパク質である α -actinin と desmin の存否を immunoblot で追跡した。 α -actinin と desmin は、生後6週 of T の whole homogenate、筋原線維画分、myosin 除去の筋原線維画分において G と等量検出されたが、actin 除去の筋原線維画分では共に激減していた。Z線と結合するタンパク質である actin の除去は、Z線を人為的に不安定化させることを意味するので、それで α -actinin と desmin が激減することは、T のZ線が構造的に脆いことを示唆し、TEM の所見と一致する。心筋は死ぬまで収縮を続け、それによる機械的ストレスは加齢と共に蓄積する。そこで次に、G、B、T の左心室 whole homogenate における α -actinin と desmin の加齢による変化を追跡した (図4)。T でのみ加齢と共に desmin は徐々に減少し、45 週令ではほぼ完全に消失していた。一方、 α -actinin に変化はなく、T における desmin の進行性の消失は、この分子に特異的なものであることが分かった。

そこで、G と T の desmin の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した。G の desmin の open reading frame は 1,407 塩基で、469 残基のアミノ酸からなる分子量 53,445 の polypeptide をコードし、アミノ末端の head 部分、中央の二つの coil 部分、そしてカルボキシル末端の tail 部分からなることが予測された。T では、coil-1 内に存在

かって陥入した膜構造で、膜表面に伝わった電気的興奮はそこを伝わり深部の筋原線維に瞬時に伝搬される (図8)。

2-1-2 拡張型心筋症ハムスターの修飾遺伝子の同定

T の心筋ではZ線が細く、部分的に切断されていることは、T ではZ線を構成

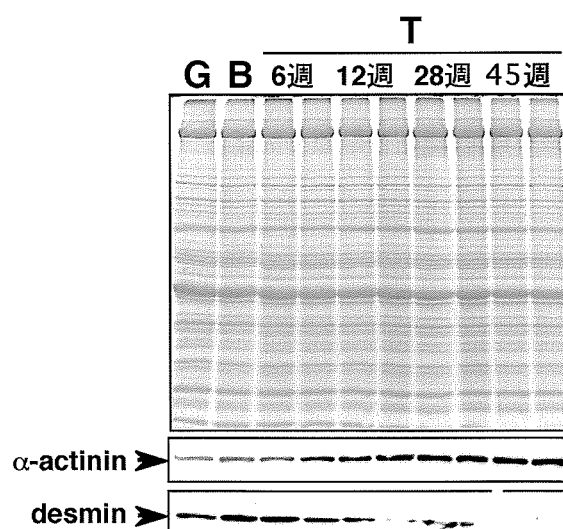


図4 左心室筋のZ線タンパク質
上段は G、B、T の左心室筋 whole homogenate の SDS-PAGE。下段は、その immunoblot。T では加齢と共に、desmin のみ特異的に消失する。

し、既知の全ての種で保存される191番目のalanineをthreonineに変えるpoint mutation (G571A)が存在した(図5)。全ての心筋症ハムスターでこの塩基異常があった

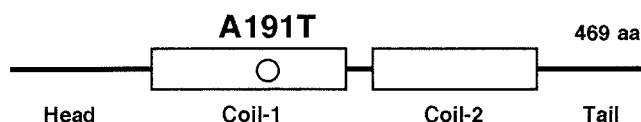


図5 拡張型心筋症の第2原因遺伝子
Desminはintermediate filamentであるが、そのCoil-1内にmissense mutationがあった。

のはTのみであり、拡張型心筋症ハムスターTにおける第二の遺伝子異常は、Z線を構成するdesmin遺伝子のmissense mutationであると考えられた。

2-1-3 心筋の筋形質膜と筋原線維の架橋構造

さて、TのTEMの残り2つの異常、すなわち、2) T管がほとんど存在せず、3) Z線の間隔は部分的に不均一、はdesminのmissense mutationで説明できるであろうか。

T管に異常があれば、筋原線維への電気的興奮の伝搬は不均一になり、結果としてその心筋細胞ひいては心臓全体の収縮も空間的に不均一になりうることは容易に理解できる。

ところで私は、心筋症ハムスターのDAPsの解析の過程で、dystrobrevinはTにおいてのみ加齢と共に特異的に消失することを見出していた(図6)。

この現象はTにおけるdesminの消失と酷似し、desminとdystrobrevinとの特異的な結合を示唆した。また、ハムス

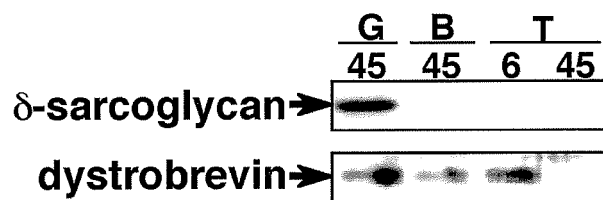


図6 Tにおけるdystrobrevinの欠失
 δ -SGはB、Tで共に欠失するが、dystrobrevinは高齢のTでのみ欠失する。

ターの心臓から単離した心筋細胞におけるDAPsの細胞内局在を免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。筋形質膜に存在するとこれまで考えられていたdystrophinとdystrobrevinなどのDAPsは、Gでは筋形質膜のみでなくT管にも局在すること、そして

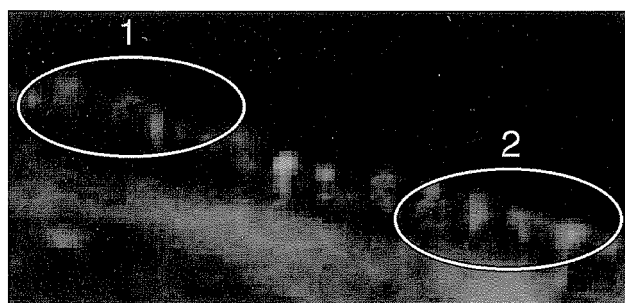


図7 Tの左室単離心筋細胞のDAPs
領域2ではT管に対応する縞状の染色があるが、領域1ではほとんど認められない。

45週令のTでは、これら双方におけるdystrophinとdystrobrevinの染色が激減することを見出した(図7)。

正常ではdesminとdystrobrevinはそれぞれ近接するZ線とT管に存在し、Tではdesminの脱落がdystrobrevinの二次的脱落を引き起こすことから、Z線とT管とはdesminとdystrobrevinを

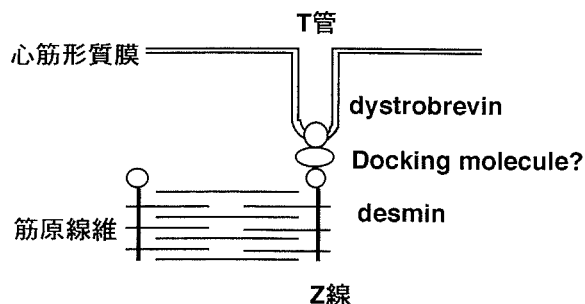


図8 心筋形質膜と筋原線維との架橋モデル
dystrobrevin と desmin を介した架橋構造は、筋形質膜の電氣的興奮を筋原線維に伝播させる一方、筋原線維の張力を筋形質膜に伝達させる。

介して結合しているものと推測される(図8)。T管とZ線を接点とする心筋の筋形質膜と筋原線維との物理的架橋は、筋形質膜表面に伝わった電氣的興奮を深部の筋原線維に伝え心筋全体の同期的収縮を可能にするのみでなく、無数の筋原線維で発生する張力を筋形質膜に瞬時に伝えることをも可能にするはずである。すなわちT管とZ線は、電気を力に変換するという心筋細胞の本質的機能に必須の構造

と言える。現在、desmin と dystrobrevin との架橋に関与する分子の探索と、 δ -SG は正常で desmin のみ異常である新しい疾患モデル動物の確立を目指している。

2-2 心筋のリモデリング

2-2-1 創薬のターゲット遺伝子の探索

心臓は、連続的収縮や高血圧などによる外因的ストレス、あるいは心筋症のような内因的ストレスに曝されると、様々な遺伝子の発現が変動する(心筋リモデリング)。こうした遺伝子の中には、例えば広範な生理活性を有する endothelin-1 や、interleukin-6 など知られている。これまでに differential display 法により、G に対して B あるいは T で特異な発現をする遺伝子を 156 個単離した。また、心肥大のシグナルが活性化されると GFP (Green fluorescence Protein) が発現する心筋細胞株を樹立し、96 穴のマイクロタイタープレートで測定できるハイスループットなアッセイ系を構築した(図9)。今後、両者を組み合わせて、心不全の治療に有用あるいは、広範な生理活性を有するなど、創薬のターゲットとなりうる遺伝子の探索を目指したい。

2-2-2 ヒトのバイオプシーサンプルを用いた系統的な遺伝子発現の解析法

ヒトの心不全患者では、その状態をモニターするために心臓カテーテルが施行される。その際、1mg 程度の心筋サンプルを摘出することが多いが、これまでは主に病理組織学的検討にしか用いられなかった。本さきがけ研究では、こうした微量の心筋バイオプシーサンプルを用い、様々なリモデリング遺伝子の発現を定量可能にするシステムを構築した。

組織から RNA を抽出する場合、通常はまず乳鉢などの中で組織をパウダー状にする。しかしこの方法では、微量なサンプルはどこかへ消えしまうという問題点があった。そこで、

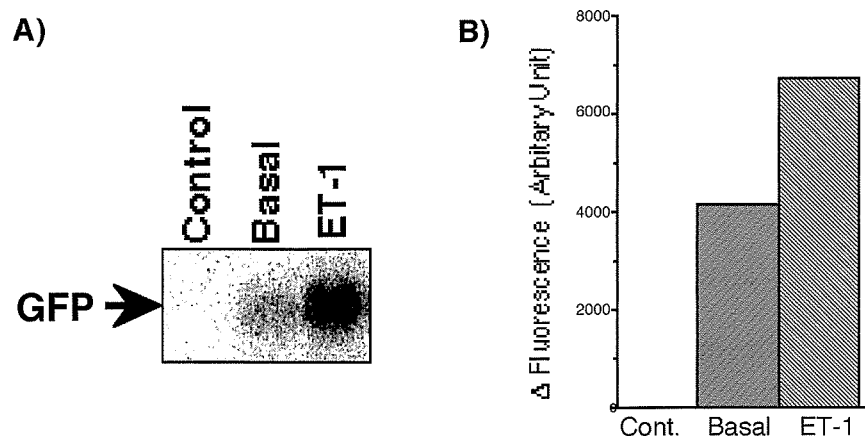


図9 心肥大シグナルの活性化で緑色に光る心筋細胞株
 A) GFP の transcript は Basal 発現もあるが、prepro ET-1 のトランスフェクションで有意に増加。
 B) 蛍光強度も prepro ET-1 のトランスフェクションで有意に上昇。

エッペンドルフチューブ内でサンプルをパウダーにし、RNA を 100%回収した後に cDNA の合成を可能にした。標的遺伝子の発現量の解析には、ABI7700 Sequence Detection System を用いた。この方法では、1 個のバイオプシーサンプルで最低 200 の遺伝子の発現解析が可能である。

2-3 様々な遺伝子異常症

2-3-1 加齢と共に眼が黒くなるアルビノ

心筋症ハムスターは B も T もアルビノ、すなわち、皮膚は白く、眼は赤い。面白いことに、この赤眼は加齢と共に黒眼へと変貌する (図10)。こうした現象は、心不全が進行して肺での血液ガス交換が悪くなると、動脈血が徐々に黒ずむためだと一般に考えられていた。しかし、本さきがけ研究で、色素合成の律速酵素である tyrosinase 遺伝子に点突然変異 (T785C、Leu262Pro) があり、それによる酵素の比活性の低下が原因であることを解明した。アルビノ患者の大きな問題点として視覚機能異常がある。心筋症ハムスターでは視覚機能に異常があることを網膜電位図で既に確認しているが、これが加齢と共に改善されるか否かはとても興味深い。うまくいけば、一般のアルビノ患者に対して、網膜色素上皮に適切な方法でメラニン色素を補充させることで、視覚機能の改善が期待できる。



図10 異型な眼皮膚白子症
 B と T の眼は加齢と共に黒くなる。網膜への漸増的な色素沈着がその原因である。

2-3-2 遺伝子のスプライス異常

心筋症ハムスター B の眼球には妙なスプライス異常を起こす遺伝子が存在することを、アルビノ遺伝子の解明の過程でたまたま見出した。こ

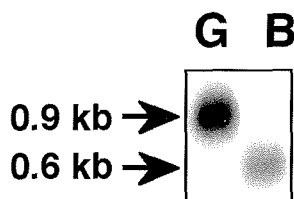


図11 遺伝子のスプライスの先走り
Bの眼球には、第3イントロンの4塩基の欠失のために、第4エクソンが第1エクソンとスプライスする遺伝子があった。

の遺伝子は6つのエクソンからなるが、Bでは第3イントロン内で、第4エクソンの5'上流311塩基から4塩基の欠失があり、そのために第4エクソンが第3、第2エクソンを飛ばして第1エクソンとスプライスすることが分かった(図11)。複数のエクソンからなる遺伝子は、若いエクソンから順番にスプライスされるが、その分子機構には未解決の問題が多い。恐らく、この欠失部分を含んだイントロン領域には、スプライシングの暴走を抑制する何らかの制御タンパク質が結合するのではないかと推測される。

2-3-3 変異抑制遺伝子?

そもそも心筋症ハムスターという名前は、その死因が心筋症・心不全であることに由来する。しかし、以上述べたように、この動物は実に様々な遺伝子異常を合併する。加齢と共に眼が黒くなるアルビノはBとTに共通、スプライス異常はBに特異的、そして拡張型心筋症はTに特異的である。これは単なる偶然なのであろうか。これまでに、p53やXP(xeroderma pigmentosum)のような、癌抑制遺伝子や塩基の除去修復遺伝子の存在が知られている。ひょっとしたら、何らかの変異抑制(修復)遺伝子が、心筋症ハムスターに共通の遺伝子欠失領域にコードされている可能性があると考え、その全塩基配列を決定した。欠失は30,167塩基あり、実際そこにはいくつかのエクソンあるいは遺伝子が存在することがコンピューターの解析で予測された。

2-3-4 高血圧ハムスター

心臓負荷の最大の原因は高血圧である。高血圧の遺伝性モデル動物としては、自然発症高血圧ラット(Spontaneous Hypertensive Rat; SHR)が有名だが、これには10以上の遺伝子異常の関与が推定され、決定的な高血圧遺伝子の同定には至っていない。私は、心筋症ハムスター研究の過程で、単一遺伝子異常で高血圧を発症するハムスター(Spontaneous Hypertensive Hamster; SHH)の存在を知り、その系統維持を独自に開始した。

良く知られた昇圧機構にはrenin-angiotensin系とendothelin系があるが、そのいずれ

を遮断しても SHH の血圧は有意に低下した (図12)。単一遺伝子異常であるにもかかわらず、独立した2つ以上の昇圧系が発症に関与することから、SHH の原因遺伝子は、何らかの血圧調節機構の中枢で機能するものと推測される。

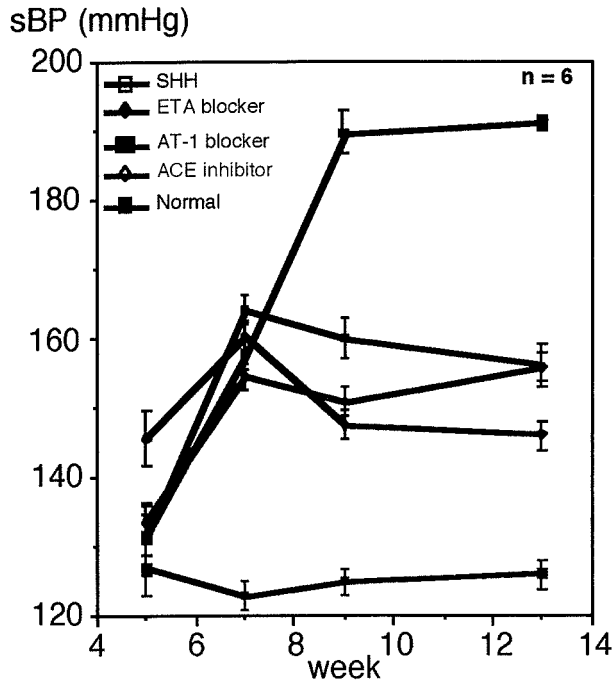


図12 高血圧ハムスター (SHH)
SHH は生後 5 週頃から血圧が上がり始める。Renin-angiotensin 系 (AT-1 blocker、ACE inhibitor) あるいは endothelin 系 (ETA blocker) の阻害剤、いずれもが降圧作用を有するが、単剤投与では正常レベルにはならない。

3. 今後の展望

3-1 遺伝性心筋症に対する新しい治療法の開発

心臓においては desmin は neonate から adult にかけて発現するが、構造的には相同で embryo で発現する遺伝子として vimentin がある。desmin の遺伝子異常による心筋症に、何らかの方法で内因性の vimentin を再活性化できれば、筋形質膜と筋原線維と架橋の崩壊を防止し、心筋症の発症を阻止できることが期待できる。こうした相同遺伝子の再活性化という概念は、遺伝子治療でも再生医療でもない、全く新しい治療戦略を生み出すはずである。

3-2 心筋リモデリングを誘発する内因性生理活性物質の同定と創薬への応用

今回開発したスクリーニングシステムを用い、創薬のターゲットとなりうる遺伝子を単離する。また、バイオブシーサンプルを用いた遺伝子発現システムと組み合わせ、心不全あるいは心筋症のテイラーメイド医療を実現させる。

3-3 様々な遺伝子異常症

スプライス制御タンパク質、変異抑制遺伝子、高血圧遺伝子など、本さきがけ研究で手掛

かりをつかんだ全ての遺伝子を同定する。

4. 発表リスト

(1) 論文

1. K. Ono, H. Masumiya, A. Sakamoto, G. Christe, T. Shijuku, H. Tanaka, K. Shigenobu and Y. Ozaki. "Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit SA node cells." *J. Physiol.* (in press)
2. T. Kawada, A. Sakamoto, M. Nakazawa, M. Urabe, F. Masuda, C. Hemmi, Y. Wang, W.S. Shin, Y. Nakatsuru, H. Sato, K. Ozawa, T. Toyo-oka. "Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy.", *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, **284** (431-435).
3. T. Shibasaki, K. Moroi, M. Nishiyama, J. Zhou, A. Sakamoto, T. Masaki, K. Ito, T. Haga, S. Kimura. "Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. " *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999, **47** (569-577).
4. T. Kawada, Y. Nakatsuru, A. Sakamoto, T. Koizumi, W.S. Shin, Y. Okai-Matsuo, J. Suzuki, Y. Uehara, M. Nakazawa, H. Sato, T. Ishikawa, T. Toyo-oka. "Strain- and age-dependent loss of sarcoglycan complex in cardiomyopathic hamster hearts and its re-expression by delta-sarcoglycan gene transfer in vivo." *FEBS Lett.* 1999, **458** (405-408).
5. A. Sakamoto, M. Abe, T. Masaki. "Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster." *FEBS Lett.* 1999, **447**, 124-128.
6. T. Kawada, W.S. Shin, Y. Nakatsuru, T. Koizumi, A. Sakamoto, T. Nakajima, Y. Okai-Matsuo, M. Nakazawa, H. Sato, T. Ishikawa, and T. Toyo-oka. "Precise identification of gene products in hearts after in vivo gene transfection, using Sendai virus-coated proteoliposomes. " *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, **259** (408-413).
7. J. Li, D. Dressman, Y.P. Tsao, A. Sakamoto, E.P. Hoffman, X. Xiao. "rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy." *Gene Ther.* 1999, **6** (74-82).

(2) 総・解説 (英文2、和文6)

1. T. Kawada, Y. Nakatsuru, A. Sakamoto, T. Koizumi, W.S. Shin, M. Nakazawa, J. Suzuki, T. Nakajima, Y. Uehara, T. Takato, H. Sato, T. Ishikawa, T. Toyo-oka. "In Vivo Gene Supplement for the Therapy of Cardiomyopathy" *Heart Failure Frontiers in Cardiology* 2000, (199-208).
2. T. Masaki, H. Ninomiya, A. Sakamoto, Y. Okamoto. "Structural basis of the function of endothelin receptor." *Mol. Cell Biochem.* 1999 **190** (153-156).

(3) 口頭発表 (海外1, 国内招待1, 国内一般8)

1. 招待講演

阪本英二、阿部誠、眞崎知性 「心筋症の分子生物学」第25回日本医学会総会

(4) 特 許

1. 阪本英二 「眼皮膚白子症 1B の原因遺伝子とその応用」
公開特許公報 特開 2001-112483