

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15995

研究課題名(和文)新規ミトコンドリア関連分子USMG5が拡張型心筋症の発症進展に与える機序の解明

研究課題名(英文)Heart Failure Phenotypes Induced by Knockdown of USMG5 in Zebrafish: A New Insight Into Mechanism of Dilated Cardiomyopathy

研究代表者

永田 庸二(Nagata, Yoji)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：50632478

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):ゼブラフィッシュを用いた研究において、ミトコンドリア関連因子であるUSMG5(Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5)の遺伝子発現を阻害することにより、心不全が誘導された。マウス心筋細胞を用いたUSMG5阻害実験では、網羅的遺伝子発現解析においてアポトーシスに関連する遺伝子などの発現に影響を与えていた。さらに、細胞内でのシグナル伝達を検討したところ、JNKリン酸化に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞内でエネルギーを産生する小器官であり、その異常により様々な疾患の原因となることが知られている。循環器疾患では、心不全状態にある心筋細胞においてミトコンドリア機能異常が認められており、今回我々は、ミトコンドリアに存在するUSMG5(Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5)因子と心不全を呈する拡張型心筋症の関わりについて検討した。動物モデルで検討した結果、USMG5異常は、拡張型心筋症を誘発することが認められた。この結果から拡張型心筋症に対する新規治療の標的としてUSMG5が期待される。

研究成果の概要(英文):Heart failure was induced by inhibiting gene expression of z-usmg5 (Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5) in zebrafish which was a mitochondrial factor. Inhibition of USMG5 gene expression affected the expression of genes in conjunction with the apoptosis in the comprehensive gene analysis using a neonatal mouse cardiomyocyte. Furthermore, it demonstrated that USMG5 have relation to JNK phosphorylation in a pathway analysis.

研究分野：循環器内科

キーワード：拡張型心筋症 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は種々の病態による心筋障害のため心臓のポンプ機能が低下し、全身の主要臓器の酸素需用量に見合うだけの血液量を拍出できない状態である。NYHA III 度以上の重症心不全患者の 3 年生存率は 50%を下回り、その生命予後は極めて不良である。さらに人口の高齢化に伴い、種々の循環器疾患の終末像である心不全患者は今後 10 年で爆発的に増加すると予測されている。国民の生活の質、医療費の高騰抑制など様々な点で、複雑な心不全進展の病態解明や、標準化される新規治療法の確立は、医学的ニーズが高い。恒常的に活動し続ける心臓は生体中で最も高いエネルギー代謝を必要とする臓器である。したがって、エネルギー代謝の中心的な役割を果たす細胞小器官であるミトコンドリアは、他臓器の細胞と比較して心筋細胞において最も高密度に存在することが知られている。近年ミトコンドリアの機能障害により心筋細胞の障害が惹起されることが明らかとなり、ミトコンドリア機能障害は慢性心不全の発症進展に深く関連する要因として注目されている(Long Q, et al. Am J Cardiovasc Dis 2015. 5: 19-32)。

USMG5 はミトコンドリア呼吸鎖の最終ステップである ATP synthase の構成分子であり(図 1)、ATP 産生能に影響を与える分子である(Ohsakaya S, et al. J Biol Chem 2011; 286: 20292- 6)。更に申請者らの研究グループは、ヒト拡張型心筋症の不全心筋を用いたトランスクリプトーム解析において、不全心筋において USMG5 の発現が有意に上昇していることを発見した(未発表データ)。以上の背景に基づき、申請者らは USMG5 が拡張型心筋症の発症進展に大きな影響を与える分子として注目し、分子生物学的機序の解明に挑戦する。

### 2. 研究の目的

Upregulated During Skeletal Muscle Growth 5 (USMG5)は、ミトコンドリア呼吸鎖の最終ステップである ATP synthase の構成分子であるが、その機能は未だ不明な点が多い。本研究では、この USMG5 が ATP 産生に果たす役割を、ATP 動態解析を用いて解明すると共に、当該分子が拡張型心筋症の発症進展に果たすメカニズムを明らかにする。

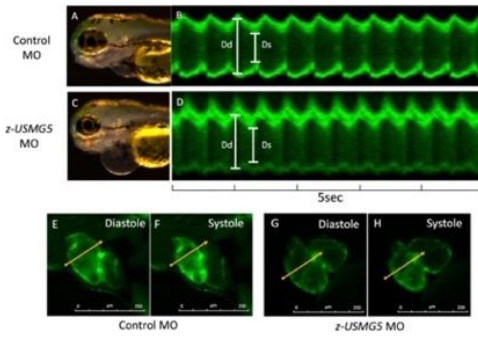
### 3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュを用いて、USMG5 ノックダウンモデルを作成する 心筋細胞特異的に緑色蛍光タンパク(GFP)を発現するよう遺伝子操作されたゼブラフィッシュを用いて、USMG5 ノックダウンモデルを作成する。実体顕微鏡を用いてゼブラフィッシュ胚にモルフォリノオリゴをマイクロインジェクションし、USMG5 の mRNA 発現を選択的に抑制する。蛍光顕微鏡を用いて孵化 72 時間後のゼブラフィッシュ幼生の心拍数、心室収縮期/拡張末期径、心室収縮率、心房径、心嚢面積を計測し、USMG5 ノックダウンモデルで拡張型心筋症の表現型が惹起されるか評価する。拡張型心筋症の表現型が得られた場合は、モルフォリノオリゴによる off-target 効果の可能性を除外する目的で、USMG5 mRNA のコインジェクションにより表現型が改善することを確認する。

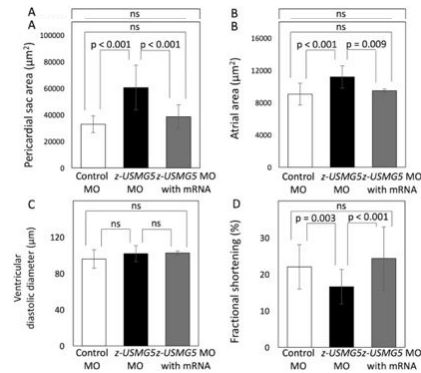
(2) ゼブラフィッシュ USMG5 ノックダウンモデルを用いて、マイクロアレイによる心不全関連分子発現の網羅的解析を行う。また、生後 1 日齢マウス心臓より分離培養して得られた胎児マウス心筋細胞を用いて、SiRNA を用いて USMG5 ノックダウン心筋細胞を作成する。ゼブラフィッシュで得られたマイクロアレイによる心不全関連分子の網羅的な発現解析結果を参照し、胎児マウス心筋細胞における線維化、炎症、肥大、酸化ストレスなどの心不全関連分子やアポトーシス関連分子を抽出する。特に関連性強い因子に関して quantitative PCR および Western blot を用いて発現の定量解析を行う。USMG5 ノックダウンによるミトコンドリアの ATP 産生能障害により、細胞内活性酸素種(ROS)の蓄積および細胞内 Ca 濃度の上昇が生じると考えられる。更に下流の細胞傷害性パスウェイである MAPK カスケードおよび Apoptosis カスケードを賦活化し、心筋細胞障害が生じると予測されるため、これらの因子に関して Western blot を用いてその詳細解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュを用いてモルフォリノオリゴによる USMG5 ノックダウンによる表現型を確認した(図 1)。USMG5 ノックダウンにより心室径に有意な変化を認めなかったが、心嚢水増加、心房径拡大、FS(%)低下が認められた(図 2)。また、これらの変化は USMG5 mRNA をコインジェクションすることで、その表現型の改善が認められた。



(図1) ゼブラフィッシュ心臓蛍光画像



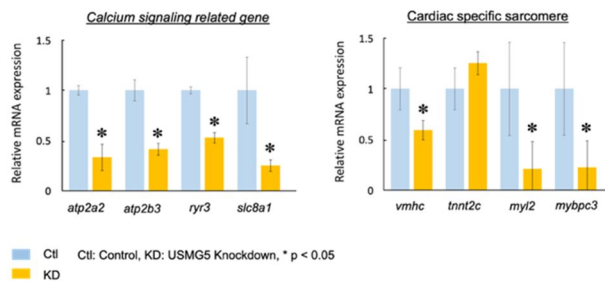
(図2) 心機能評価

(2) USMG5 ノックダウンしたゼブラフィッシュを用いた網羅的遺伝子発現解析では、カルシウム調節因子や筋収縮に関連した因子などの遺伝子発現が低下しているのに対し、アポトーシスや MAP キナーゼに関連する因子の遺伝子発現が上昇していた (図3)。

Significantly activated pathways in downregulated genes	
Dr_Calcium_Regulation_in_the_Cardiac_Cell_WP1365_71502	<0.0001
Dr_Monoamine_GPCRs_WP1389_81184	0.0005
Dr_G_Protein_Signaling_Pathways_WP1371_71520	0.0007
Dr_Striated_Muscle_Contraction_WP1316_68687	0.01
Dr_Biogenic_Amine_Synthesis_WP154_77401	0.02
Significantly activated pathways in upregulated genes	
Dr_Nodal_Signaling_Pathway_WP341_71978	0.004
Dr_FGF_signaling_pathway_WP152_84645	0.006
Dr_ERK1_-ERK2_MAPK_cascade_WP402_71500	0.008
Dr_TGF_Beta_Signaling_Pathway_WP1370_68675	0.01
Dr_Apoptosis_WP1351_71509	0.02
Dr_Toll-like_receptor_signaling_pathway_WP1384_77485	0.02
Dr_Adipogenesis_WP1331_85024	0.04

(図3) USMG5 ノックアウトしたゼブラフィッシュを用いた網羅的遺伝子発現解析

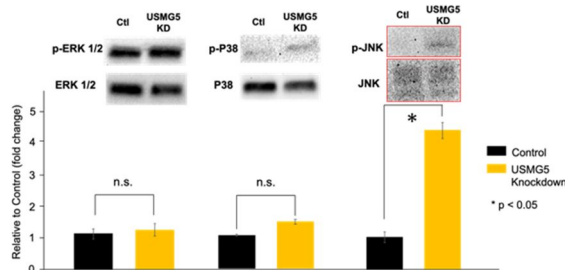
さらに、qPCR 法を用いてカルシウムシグナル関連因子と筋収縮因子について検討し、USMG5 ノックダウンゼブラフィッシュでは、atp2a2 や atp2b3、rhr3、vmhc、myl2、mybpc3 などの因子がその発現が低下していた (図4)。



(図4) カルシウムシグナルおよび心筋サルコメア因子の遺伝子発現

ERK、P38、JNK のリン酸化を検討し、胎児マウス心筋細胞を用いて USMG5 をノックダウンすることにより、ERK と P38 のリン酸化は、コントロールと比較して優位な変化は認められないものの、JNK のリン酸化は優位に上昇していた (図5)。

(図5) ERK、p38、JNK のリン酸化に与える USMG5 の影響



これらの結果から、USMG5 は拡張型心筋症に関与している因子であり、USMG5 をノックダウンすることで、カルシウムシグナルや筋収縮に関与する因子が影響を受けることが示唆された。そのシグナル伝達の下流として JNK カスケードが重要な因子として考えられた。

これらのことより、JNK カスケードの抑制は、心不全 増悪に対する新たな治療標的になることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagata Y, Yamagishi M, Konno T, Nakanishi C, Asano Y, Ito S, Nakajima Y, Seguchi O, Fujino N, Kawashiri MA, Takashima S, Kitakaze M, Hayashi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Heart Failure Phenotypes Induced by Knockdown of DAPIT in Zebrafish: A New Insight into Mechanism of Dilated Cardiomyopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-17572-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi K, Asano Y, Beerens M, Kurata Y, Kobayashi I, Furusho H, Onoue K, Chiang DY, Kiviniemi TO, Buys E, Sips P, Burch ML, Zhao Y, Kelly AE, Namura M, Kita Y, Tsuchiya T, Kaku B, Oe K, Takeda Y, T, Inoue M, Fujita T, Kato T, Sakamoto Y, Nagata, Cui S, Saito Y, MacRaeCA, Takashima S, Kawashiri MA, Takamura M. et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of functional studies on exome sequence variant interpretation in early-onset cardiac conduction system diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvaa010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Y, Hayashi K, Fujino N, Konno T, Tada H, Nakanishi C, Hodatsu A, Tsuda T, Nagata Y, Teramoto R, Yoshida S, Nomura A, Kawashiri MA, Yamagishi M.	4. 巻 34(1)
2. 論文標題 Functional analysis of KCNH2 gene mutations of type 2 long QT syndrome in larval zebrafish using microscopy and electrocardiography.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 159-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-018-1231-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoji Nagata
2. 発表標題 DCM Phenotypes Induced by Knockdown of DAPIT in Zebrafish: A New Insight from Mitochondriopathy
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoji Nagata
2. 発表標題 DAPIT Knockdown Induces Dilated Cardiomyopathy Phenotypes in Zebrafish
3. 学会等名 AHA2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今野 哲雄  (Konno Tetsuo)		