

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460105

研究課題名(和文)ミトコンドリア保護による筋原線維性ミオパシーの新規治療法の開発

研究課題名(英文)New therapeutic approach of myofibrillar myopathy by mitochondrial protection

研究代表者

三部 篤 (Sanbe, Atsushi)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30425706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：BCL-2関連athanogene(BAG)3は、アポトーシス抑制因子であるBCL-2と結合する特徴を有し、細胞保護作用を示すことが知られている。我々は、筋原線維性ミオパシー(MFM)モデルマウスを用いて、心筋でのBAG3の変化を検討した。その結果、MFMマウス心筋では、BAG3量が顕著に増加していた。この意味を検討する目的で、心筋細胞を用いて、BAG3をノックダウンしたときの変化を検討した。その結果、BAG3をノックダウンすると心筋細胞ではアポトーシスと思われる細胞死が増加した。すなわち、BAG3は、MFMでの心筋細胞障害を抑制する代償機構として心筋細胞で増加すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is hypothesized that BCL-2 associated athanogene (BAG) 3 can play an important role in cytoprotective effect of BCL-2, antiapoptotic factor, by direct protein-protein interaction. We examined changes in BAG3 level in myocardium in myofibrillar myopathy (MFM) mouse model. In MFM mouse heart, marked increase in BAG3 level was detected. In order to analyze the role of BAG3 in cardiomyocytes, knockdown approach using si-RNA targeting to BAG3 was performed. The knockdown of BAG3 enhanced apoptotic cell death in cardiomyocytes. These results suggest that BAG3 may play a protective role in cardiomyocytes.

研究分野：薬理学

キーワード：心筋症 熱ショックタンパク質 ストレス アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

低分子ストレスタンパク質 (heat shock protein: HSP) ファミリーは、熱ショックにより誘導されるストレスタンパク質の内、分子量が比較的小さいタンパク質群(分子量 15-30 kDa)が属し、生物界に普遍的に存在している。低分子 HSP は分子内に約 80 アミノ酸残基からなる α -クリスタリンドメインを有し、その多くがタンパク変性を防ぐシャペロン様活性を有することが知られている。幾つかの低分子 HSP において、そのアミノ酸変異、特に α -クリスタリンドメイン内の点変異は、筋原線維性ミオパシー(Myofibrillar myopathy: MFM)などの神経筋疾患、白内障などの眼疾患、遺伝性末梢性運動性ニューロパシー (Distal hereditary motor neuropathy: HMN) およびシャルコー・マリー・トゥース病 (Charcot-Marie-Tooth disease: CMT 病) などの神経変性疾患の原因であることが知られている。これらの病態を詳細に解析する目的で、遺伝子改変マウスが作製され、病態解析および治療法の開発が試みられている。

低分子 HSP の一つである α -B クリスタリン (CryAB、別名 HSPB5) は、水晶体の構成成分として見いだされたが、心筋細胞にも非常に多く存在する。また骨格筋、神経等でもその遺伝子発現は認められる。そのため、比較的普遍的に生体内に存在し、ストレスタンパク質として機能していると考えられている。CryAB 関連 MFM は CryAB の 120 番目アルギニン→グリシン点変異 (Arg120Gly) などにより発症する。この疾患は、細胞内に筋細胞における中間フィラメント構成成分であるデスミンおよび CryAB を含む不溶性凝集体を形成する特徴を持ち、CryAB Arg120Gly タンパクを心臓特異的に過剰発現しているトランスジェニック (TG) マウスでその病態が再現される。CryAB Arg120Gly TG マウス心筋では、不溶性凝集体の蓄積に伴ってミトコンドリア障害、ミトコンドリアのチトクローム C の細胞質への遊離、カスパーゼ 3 の活性化およびアポトーシスと思われる TUNEL 陽性心筋細胞死が起こってくる。すなわち、CryAB 関連 MFM 病態の進行にはミトコンドリア障害とアポトーシスが深く関わっていることが示唆される。

2. 研究の目的

我々は、ミトコンドリアの ATP 感受性カリウムチャネル開口作用を持つニコランジルを CryAB Arg120Gly TG マウスに投与すると、ミトコンドリア保護効果を示し、その時の CryAB 関連 MFM 病態が軽減することを明らかにしている。さらに、ニコランジルの MFM 心筋保護効果は、MFM 病態がすでに発症し、心機能が低下した状態から薬物投与を開始しても認められた。そのため、ニコランジルの MFM 治療薬としての臨床応用が期待できると考えられる。このニコランジルの

効果をさらに詳細に検討するため、新生児ラット心筋細胞にアデノウイルスベクターを用いて、CryAB Arg120Gly を過剰発現させた MFM in vitro モデルを作製した。この心筋細胞では、TG マウスと同様に、細胞内に不溶性凝集体が蓄積し、アポトーシスによる心筋細胞死が起こる。この In vitro MFM モデルに、ニコランジルあるいはニコランジルと同じくミトコンドリアの ATP 感受性カリウムチャネル開口作用を持つジアゾキシドを作用させると、細胞保護効果を示した。さらにミトコンドリアの ATP 感受性カリウムチャネル阻害薬である 5-ヒドロキシデカン酸ナトリウム(5-HD)を処置することにより、ニコランジルやジアゾキシドの細胞保護効果は消失した。すなわち、ニコランジルやジアゾキシドの心筋保護効果は、ミトコンドリアの ATP 感受性カリウムチャネルの開口が関わっていることが考えられる。また、病態の進行と共に細胞内のミトコンドリアにおけるアポトーシス抑制因子 BCL-2 が低下し、その一方でアポトーシス誘導因子 BAX が増大する。そのため、不溶性凝集体によるミトコンドリアの BCL-2 の低下、BAX の増大は心筋細胞にアポトーシスと考えられる細胞死を誘発させると考えられる。さらに、ニコランジルやジアゾキシドは、BCL-2 の低下および BAX の増大を抑止し、MFM に有効であることを証明している。しかし、BCL-2、BAX の調節機構に対するニコランジルの作用機序は不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリア保護薬の MFM 病態における抗アポトーシス作用の作用機序、特にアポトーシス抑制因子 BCL-2 およびアポトーシス誘導因子 BAX の増減に関する詳細な分子機構を解析することにより、MFM の新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、CryAB Arg120Gly を心筋特異的に過剰発現させた TG マウスおよび新生児ラット心筋細胞にアデノウイルスベクターを用いて CryAB Arg120Gly 遺伝子を過剰発現させた CryAB 関連 MFM in vitro モデルを用い、これらの変異タンパク質によるミトコンドリア障害およびアポトーシスの発生に対するミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネル開口作用の関与および BCL-2、BAX の変化を検討した。また、それぞれの遺伝子特異的に作製された siRNA を用いて、ターゲット遺伝子をノックダウンさせたときの表現型も解析した。具体的には、心筋細胞は、SD 系新生児 (生後 1-3 日齢) ラットの心臓を単離し、トリプシン、コラゲナーゼ処理後に 0.1%ゼラチンでコートしてあるプレート上に接着させ、心筋細胞を培養した。心筋細胞培養液は 10%牛胎児血清を含む D-MEM を用いた。培養 24 時間後に、血清を含まない D-MEM に培養液を置換後、CryAB、CryAB Arg120Gly、BAG3、BCL2、BAX および BCLx1 などの遺伝子を含むアデノウイルス

スペクター(10 M.O.I)を加え、4日間培養を行った。また、上述の遺伝子(CryAB, BAG3, BCL2, BAX, BCLx1など)特異的な配列で作製した si-RNA を用いて、それぞれの遺伝子のノックダウンを行った。その後、細胞生存率は MTT 法およびアポトーシスの検出は TUNEL 法、annexinV 法にて検討し、細胞内不溶性凝集体量はフィルター法を用いて定量した。

4. 研究成果

新生児ラット心筋細胞に MFM の原因となる CryAB Arg120Gly を発現させると、ミトコンドリアの BCL2 関連 athanogene 3 (BAG3)タンパク質レベルが上昇した。この結果は、CryAB R120G を心筋特異的に過剰発現しているトランスジェニック(TG)マウスの心筋でも認められた。また、ニコランジルの処置で、BAG3 タンパク質量は、さらに増加した。この心筋 BAG3 の増大の生理的意義を検討するために、BAG3 を特異的に阻害する siRNA を作製し、BAG3 をノックダウンした心筋細胞における CryAB R120G 過剰発現の影響を検討した。その結果、BAG3 を選択的にノックダウンしたラット新生児心筋細胞では、CryAB R120G 誘発アポトーシスが増大した。すなわち、BAG3 は心筋保護作用を有し、CryAB R120G による心筋障害に対する代償機構で増大している可能性が考えられる。さらに BAG3 をノックダウンしたときにはアポトーシス抑制因子である BCL-2 のミトコンドリア含量が減少していた。BAG3 は BCL-2 と直接結合することが知られているため、BAG3 が BCL-2 の調節因子としてアポトーシスの発生に深く関わっている可能性がある。また、ニコランジルなどの ATP 感受性カリウムチャネル開口薬が BAG3 の作用を介して心筋保護作用を示している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) Tezuka Y., Herai N., Inomata Y., Kagami K., Yamauchi J., Nishigori H. and Sanbe A. Upregulation of Inorganic pyrophosphatase 1 in hypothyroid embryonic chick cerebellum. *Life Sciences* 128: 94-100, 2015
- 2) Sanbe A. Cell death in neuromuscular disease. *Foreword. Biol. Pharm. Bull.* 38: 1093, 2015

[学会発表](計 15 件)

- 1) Inomata Y., Tamada S., Hino C., Takahashi S., Higashio R., Tezuka Y., Sanbe A. Down-regulation of Bcl-2 associated

athanogene (BAG) 3 in hypothyroid embryonic chick cerebellum. 第 89 回日本薬理学会年会 1P-2、横浜、2016

- 2) 手塚優、猪俣結衣、高橋慎太郎、西郡秀夫、三部篤 発生期における甲状腺ホルモン低下状態が小脳神経に神経に与える影響 第 136 回日本薬学会年会 29AB-am262、横浜、2016 年
- 3) 日野千鶴、猪俣結衣、青柳利紀、東尾里英子、手塚優、三部篤、心臓の飢餓誘導性オートファジーに対するヒストン脱アセチル化酵素 6 の関与 第 54 回日本薬学会東北支部大会、PD-1、岩手、2015 年
- 4) 三部篤、松下 尚子、猪俣 結衣、手塚 優、弘瀬 雅教 「心臓疾患におけるヒストン脱アセチル化酵素 6 の役割」 第 1 回 J-ISCP 学術集会 国際心血管薬物療学会日本部会 医学・薬学ジョイントシンポジウム(1)―心不全の分子病態と薬物治療― 京都、2015
- 5) 猪俣結衣、日野千鶴、高橋慎太郎、東尾里英子、手塚優、三部篤 神経系における BCL2 関連 athanogene 3 の機能的役割」 第 658 回岩手医学会例会、2015 年
- 6) 猪俣結衣、日野千鶴、手塚優、東尾里英子、青柳利紀、三部篤 大学院生シンポジウム GS01 循環器疾患に関する新規病態病態制御メカニズムメカニズム-心血管疾患をターゲットとした薬学基礎研究の現状と治療への展望- 「神経筋疾患における BCL2 関連 athanogene 3 の機能的役割」 GS 0 1-3 ,第 135 回日本薬学会年会 神戸, 2015
- 7) 青柳利紀、宮城翠、手塚優、三部篤 心筋細胞ならびに線維芽細胞を用いた低酸素/再酸素化障害における Tubastatin A の影響 第 135 回日本薬学会年会、神戸、2015 年
- 8) Aoyagi T., Baba M., Kaneshiro S., Tezuka Y., Sanbe A. Attenuation of cataractogenesis by treatment with geranylgeranylacetone in a selenite-induced cataract rat model and involvement of mTOR signaling. P1-98 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋、2015
- 9) Inomata Y., Hino C., Tezuka Y., Higashio R., Aoyagi T., Sanbe A. Altered autophagy in transgenic mice with cardiac specific expression of active histone deacetylase 6. O3I-4-1 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋、2015
- 10) Sanbe A. Histone deacetylase (HDAC) 6 in cardiac disease. Symposium 1S07 Cardiac Disease-Regenerative Medicine and Drug Development (シンポジウム)第 87 回日本生化学会年会 京都 , 2014
- 11) Sanbe A. Protein Folding Disease and ATP-sensitive Potassium Channels. S2E-23 Overview of ATP-sensitive K⁺ Channel as a Promising Target for Therapeutic Strategy. *J. Pharmacol. Sci.* 124

- (Suppl I) 46P, S2E-23-1 (シンポジウム) 第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014
- 12) 三部 篤 S14 心疾患と炎症応答 「ストレスタンパク質と心疾患」(シンポジウム) 第 134 回日本薬理学会年会 熊本, 2014
- 13) Tezuka Y., Herai N., Inomata Y., Kagami K., Yamauchi J., Nishigori H. and Sanbe A. Proapoptotic effect of inorganic pyrophosphatase 1 in hypothyroid embryonic chick cerebellum J. Pharmacol. Sci. 124 (Suppl I) 179P, P2-2-3 第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014
- 14) Inomata Y., Tezuka Y., Herai N., Kagami K., Nishigori H. and Sanbe A. Gene expression patterns of BCL2-related proteins in hypothyroid embryonic chick cerebellum J. Pharmacol. Sci. 124 (Suppl I) 144P, P1-2-4 第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014
- 15) Aoyagi T., Yamatoya Y., Natsusaka K., Tezuka Y., Sanbe A. Cardioprotective effect of nicorandil, a mitochondrial potassium channel opener, via modification of mitochondrial permeability transition pore in myofibrillar myopathy. J. Pharmacol. Sci. 124 (Suppl I) 134P, O3H-2-3 第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=4

6 . 研究組織

(1)研究代表者
三部 篤(SANBE ATSUSHI)
岩手医科大学薬学部・教授
研究者番号: 30425706

(2)研究分担者
なし ()

(3)連携研究者
なし