

Long-Tsc22d3 が心不全発症・進展における役割

国立循環器病研究センター 臨床研究開発部

櫃本 竜郎

1. 諸言

日本では毎年心疾患による死亡人数は総死亡数の四分の一を占めており、心不全による入院者数が 2012 年から 2016 年まで 22% も増加した¹⁾。また、心疾患の中でも、心不全による死亡数が年々増加しており、依然として高いアンメットメディカルニーズが存在している。近年、心不全発症関連遺伝子を標的した遺伝子治療が注目され、治験レベルにまで到達しつつある²⁾。したがって、心不全原因遺伝子の特定、およびメカニズムの解明は新たな心不全治療法の開発に極めて重要である。われわれは以前の研究により、心不全マウスにおいて、Long (L) -Tsc22d3 の発現が減少したことを確認できた。L-Tsc22d3 はその N 末端配列と異なる short (S) -Tsc22d3 とともに glucocorticoid (GC) により誘導される³⁾。S-Tsc22d3 が GC に関わる抗炎症作用を持つと報告されているが、L-Tsc22d3 の機能についてまだ詳しく検討されていない。そこで本研究では、心不全時に発現が減少した新規遺伝子 L-Tsc22d3 に着目し、Adeno-associated virus (AAV) 9 を用いた心筋特異的蛋白発現システムを用いて⁴⁾、L-Tsc22d3 が心不全発症への関与を検討した。

2. 方法

Human L-Tsc22d3 遺伝子または mouse L-Tsc22d3 に対する shRNA を AAV9 に組み込んだ後、マウス静脈に投与し、L-Tsc22d3 遺伝子強制発現及びノックダウンマウスモデルを作成した。L-Tsc22d3 遺伝子強制発現およびノックダウンはそれぞれ、in vivo イメージングと Western blot 法で確認した。また、L-Tsc22d3 遺伝子強制発現マウスに大動脈狭窄術 (transverse aortic constriction : TAC) を実施し、L-Tsc22d3 の強制発現が圧負荷性による心不全の発症・進展に与える影響を検討した。さらに、L-Tsc22d3 遺伝子改変心不全マウス心臓サンプルを用いて、Real-time PCR 法・Western blot 法を用いて、心肥大、心不全相関因子の発現や活性化を検討した。最後に遺伝子改変マウス心臓サンプルを用いて、次世代シーケンス (next generation sequencing : NGS) 解析による RNA シーケンスをし、L-Tsc22d3 遺伝子改変心不全マウス心臓において、発現が変化した遺伝子を見出し、新しい心不全関連遺伝子を同定することを試みた。

3.結果

3.1 L-Tsc22d3 遺伝子強制発現及びノックダウンマウスモデルの樹立

Human L-Tsc22d3 遺伝子または mouse L-Tsc22d3 に対する shRNA を AAV9 に組み込んだ後、Luciferase に組み込まれた AAV9 と一緒に 1×10^{12} vg/mouse を生後 1 週間野生型マウスの経静脈から投与した。AAV9 投与 1 週間または 4 週間後に in vivo イメージングにより Luciferase の心筋特異的発現を確認できた。また、AAV9 を投与したマウス心臓サンプルにおいて、Western blot で L-Tsc22d3 の強制発現またはノックダウンを確認できた (図 1)。

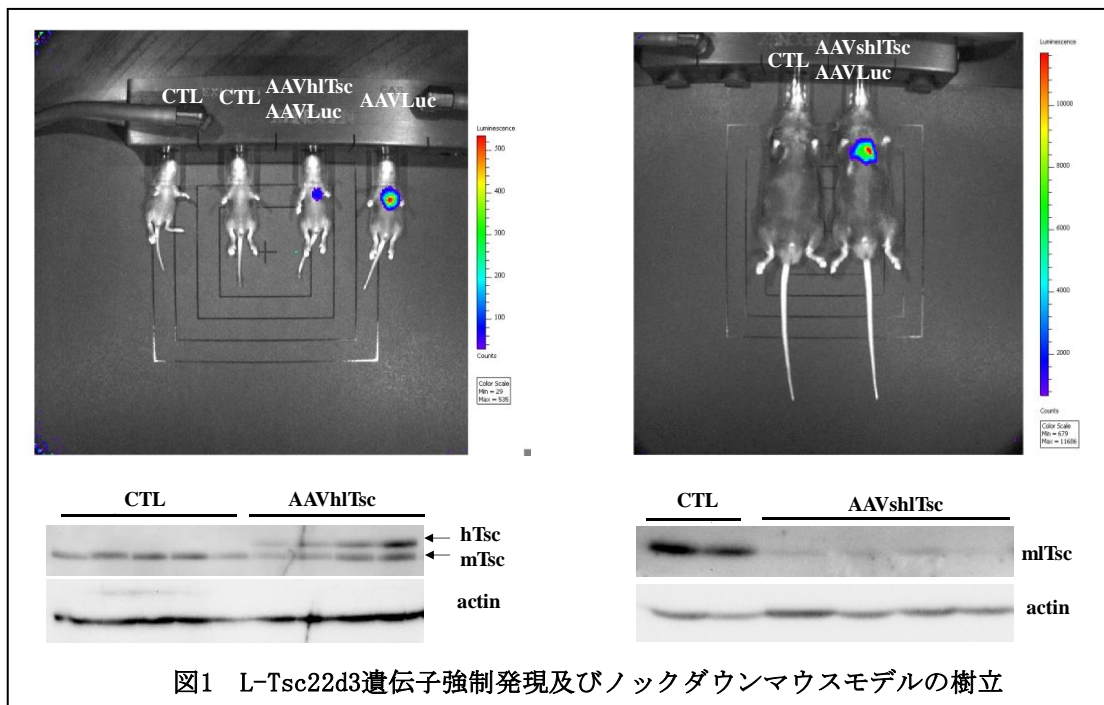
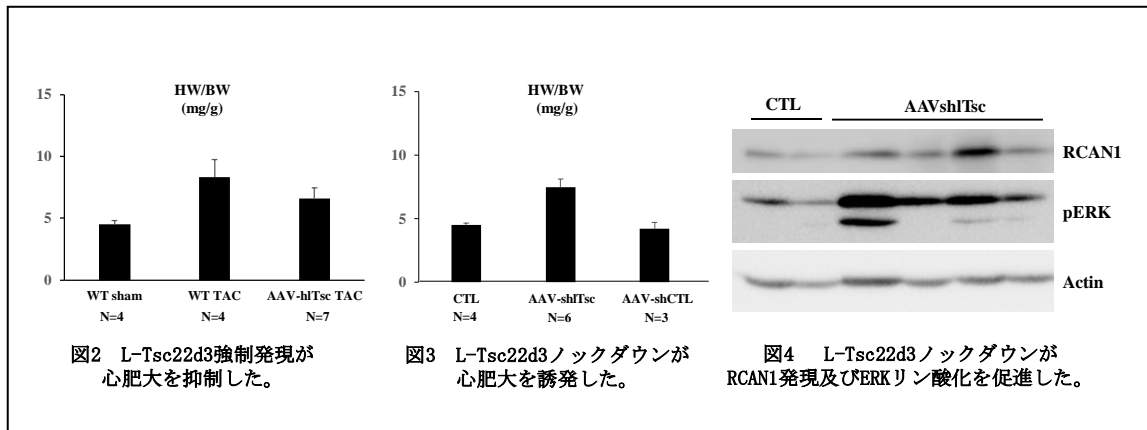


図1 L-Tsc22d3遺伝子強制発現及びノックダウンマウスモデルの樹立

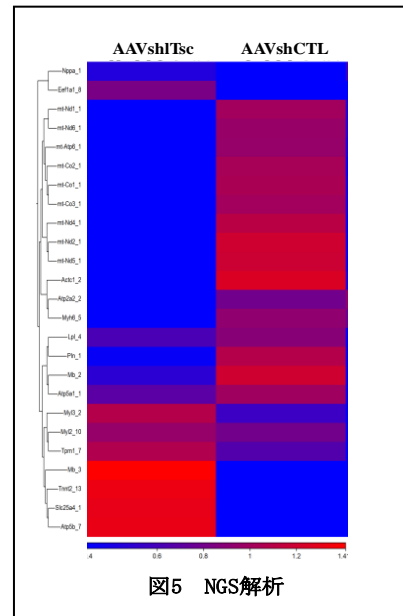
3.2 L-Tsc22d3 が心不全発症に対する影響

L-Tsc22d3 強制発現マウスに TAC を実施し、心肥大心不全モデルを作成した。その結果、野生型マウスと比較し、L-Tsc22d3 強制発現マウスにおいて、心肥大(心重体重比、HW/BW)が抑制され、心不全が軽減された (図 2)。一方、L-Tsc22d3 に対する shRNA が投与された L-Tsc22d3 ノックダウンマウスではコントロール shRNA を投与したマウスと比べて、心肥大心不全が発症した (図 3)。また、L-Tsc22d3 ノックダウンによる肥大心において、心肥大に関わる RCAN1 発現や ERK リン酸化の増加が認められた (図 4)。



3.3 L-Tsc22d3 遺伝子改変マウス心臓において、次世代シーケンス (NGS) による心不全関連遺伝子の網羅的研究

図3のように、L-Tsc22d3 に対する shRNA の投与による L-Tsc22d3 ノックダウンマウスでは心肥大心不全が発症したため、L-Tsc22d3 ノックダウンした後、心不全発症に伴い、発現が変化した遺伝子と特定した。NGS を用いた RNA シーケンス (RNA-seq) を実施した結果、コントロールマウスと比較し、L-Tsc22d3 ノックダウンした後、既存の心不全マーカーである ANP 発現の増加と SERCA2 発現の減少を確認できた。また、今まで心不全発症との関連が報告されていない Eef1a1 や Bnip3、Prkaa、Prkab などの発現変化もみられた (図5)。



4. 考察

本研究では、心不全時に発現が低下した L-Tsc22d3 に着目し、L-Tsc22d3 の強制発現やノックダウンにより、心肥大心不全発症に対する影響を検討した。L-Tsc22d3 は GC によって誘導されると報告されていたが、その生理機能について、不明な点が多く、心不全発症への関与も検討されていない。われわれは以前の研究により、マウス不全心において、L-Tsc22d3 の発現が低下したことを見出した。また、L-Tsc22d3 のタンパク構造が転写因子と証明されているため、心不全時に L-Tsc22d3 の発現低下が他の遺伝子発現に影響を与え、心不全発症に関与すると思われる。AAV9 に L-Tsc22d3 の強制発現が TAC による心肥大心不全を抑制し、L-Tsc22d3 のノックダウンが心肥大心不全を引き起こしたことから、L-Tsc22d3 が心機能保護に働いていることが示唆された。また、L-Tsc22d3 がノックダウンされた肥大心において、RCAN1 発現 ERK リン酸化が増加したことから、L-Tsc22d3 発現低下による心肥大心不全発症にこれらのシグナル伝達が関与したことが確認された。さらに、L-Tsc22d3 が

ノックダウンされた肥大心において、Eef1a1 や Bnip3、Prkaa、Prkab などの発現変化が見られたため、これらの分子が心不全発症に関与していると推測できる。

心不全発症について、さまざまなメカニズムが検証され、多様な治療法が開発されたにもかかわらず、いまだに心不全を完全に克服できていない。そのため、心不全治療には新しい治療法が開発が急務となっている。近年、循環器病領域も遺伝子治療が幅広く議論され、臨床応用もチャレンジされている²⁾。したがって、心不全発症に関わる遺伝子の同定が新しい心不全治療法開発にターゲットを提供できる。本研究において、L-Tsc22d3 強制発現が TAC による心不全を抑制したため、遺伝子治療による L-Tsc22d3 の補充が心不全治療に応用できると考えられる。また、L-Tsc22d3 発現低下による心不全サンプルを用いた次世代シーケンスによって発現が変化した新規遺伝子を見出したため、L-Tsc22d3 に加え、新たな心不全発症関連遺伝子を同定できた。

5.結語

本研究により、L-Tsc22d3 が心肥大心不全発症に保護的な役割を果たしていることが証明された。L-Tsc22d3 の心筋特異的強制発現が心肥大心不全発症を抑制したことから、L-Tsc22d3 による遺伝子治療は新たな治療法として期待できる。また、L-Tsc22d3 発現低下による発現の変化があった Eef1a1 や Bnip3、Prkaa、Prkab など新規遺伝子が心不全発症における役割解明もこれからの課題となり、新たな心不全治療のターゲットを提供できると考えられる。

6.文献

- 1) Komuro I, Kaneko H, Morita H, Isobe M, Nakayama H, Minematsu K, et al. Nationwide Actions Against Heart Failure Pandemic in Japan - What Should We Do From Academia? *Circ J*. 2019;83:1819-1821.
- 2) Gabisonia K, Recchia F. Gene Therapy for Heart Failure: New Perspectives. *Curr Heart Fail Rep*. 2018;15:340-349.
- 3) Bruscoli S, Donato V, Velardi E, Sante MD, Migliorati G, Donato R, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *Donato*
- 4) Fu HY, Sanada S, Matsuzaki T, Liao Y, Okuda K, Yamato M, et al. Chemical Endoplasmic Reticulum Chaperone Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction. *Circ Res*. 2016;118:798-809

7.成果発表

なし