

1 心疾患における titin, CaMKII δ および ZASP/Cypher mRNA の
2 選択的スプライシングの調節

3 焦 爽

4 新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻

5 器官制御医学大講座循環器学

6 (指導 : 南野 徹教授)

7 Regulation of alternative splicing of titin, CaMKII δ and
8 ZASP/Cypher mRNAs in heart disease

9 Shuang Jiao

10 Department of Cardiovascular Biology and Medicine,

11 Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

12 (Director: Prof. Tohru Minamino)

13 別刷請求先 : 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

14 新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

15 Reprint requests to : Shuang JIAO

16 Department of Cardiovascular Biology and Medicine,

17 Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

18 1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,

19 Niigata 951-8510, Japan.

20 Running title: 心疾患における選択的スプライシング

21

22 キーワード: 心筋炎; 心筋症; 心肥大; 選択的スプライシング; 低酸素;

23

24

Abstract

(Objectives) Alternative splicing alters protein structure, localization and function and increases biological diversity in response to physiological and pathological stress conditions. We investigated how alternative splicing of titin, CaMKII δ and ZASP/Cypher genes changes in hearts under pathological stress conditions. (Methods) The alternative splicing of titin, CaMKII δ and ZASP/Cypher genes, in response to acute inflammation, pressure overload and hypoxia, was analyzed by quantitative RT-PCR in the hearts of experimental autoimmune myocarditis rats and myocarditis patients, monocrotaline pulmonary hypertension rats and in cardiomyocytes cultured under hypoxic conditions. (Results) Large N2BA-titin, cytoplasmic CaMKII δ and PGM1-binding ZASP/Cypher isoforms significantly increased in rat hearts with myocarditis and hypertrophy compared with normal hearts. Large N2BA-titin and cytoplasmic CaMKII δ isoforms also significantly increased in myocarditis patient hearts compared with those with DCM. In cardiomyocytes under hypoxic conditions, PGM1-binding ZASP/Cypher isoforms significantly increased, but large N2BA-titin and cytoplasmic CaMKII δ isoforms decreased, compared with cells under normoxic conditions. (Conclusions) The alternative splicing of titin, CaMKII δ and ZASP/Cypher genes was markedly modulated in hearts under pathological stress conditions and may be involved in adaptations to pathological changes.

22

23

24

緒言

選択的スプライシングは、一つの遺伝子から機能、構造、局在の異なる様々な蛋白、アイソフォームを作ることができるが、全ての遺伝子の約 86%は選択的スプライシングを受けると考えられている¹⁾。心臓において発現する様々な心筋蛋白のアイソフォーム変換は、生後発育の過程で観察され^{2,4)}、心臓の発育の上で機能の適応上、重要な役割を演ずると考えられている^{3,4)}。またアイソフォーム変換は心疾患においても観察されているが¹⁾、その詳細については DNA マイクロアレイによつて調べられる網羅的遺伝子発現の検討に比べてあまり研究は進んでいないのが現状である¹⁾。

心筋細胞に発現する titin は非常にたくさんのアイソフォームが存在するが、大まかに分けると大きな N2BA-titin とそれより小さい N2B-titin の 2 種類のアイソフォームに分類することができる⁵⁾。大きな N2BA-titin アイソフォームは、小さな N2B-titin アイソフォームに比べて、より伸展性が高いと考えられている³⁾。同様に心筋細胞に発現する CaMKII δ アイソフォームも、核局在のシグナルを持つエクソン 14 を含む核局在型 CaMKII δ アイソフォーム (CaMKII δ B) とエクソン 14 を含まない細胞質局在型 CaMKII δ アイソフォームに分類できる^{4,6)}。さらに、細胞質局在型 CaMKII δ アイソフォームは、エクソン 15 と 16 を含む T 管局在型アイソフォーム (CaMKII δ A) とそれらのエクソンを含まないびまん性細胞質局在型 CaMKII δ アイソフォーム (CaMKII δ C) に分けることができる⁴⁾。SERCA の調節因子であるホスホランバンをリン酸化する細胞質局在型の CaMKII δ アイソフォームは¹⁾、興奮収縮連関を増強するようである⁴⁾。一方、核局在型 CaMKII δ アイソフォーム (CaMKII δ B) は、熱ショック蛋白質のリン酸化を介する細胞死誘導刺激などによる心筋細胞のアポトーシスを強力に抑制することが知られている⁷⁾。Z 帯を構成する ZASP/Cypher アイソフォームは、phosphoglucomutase 1 (PGM1) と結合できるエクソン 4 を含む型 (Cypher inc-ex4) とそれを含まない PGM1 と結合できない型 (Cypher exc-ex4) の 2 つに分けることができる。PGM1 は、グルコース-1-リン酸か

1 ら解糖系に入るグルコース-6-リン酸への変換を触媒する。糖代謝系は、ストレス下
2 での心臓では必須の燃料であるので、PGM1 を Z 帯に補充する PGM1 結合型
3 ZASP/Cypher は、ストレス下の心臓ではダメージを緩和できるかもしれない⁸⁾。

4 本研究は、様々な病的ストレス状態下における心臓中の titin、CaMKII δ
5 および Cypher/ZASP の選択的スプライシングアイソフォーム変化を調べることであ
6 る。急性炎症および圧負荷状況下でのアイソフォーム変化を検討するために、我々
7 は実験的自己免疫性心筋炎⁹⁾ (EAM) とモノクロタリン (MCT) 肺高血圧右室肥大ラ
8 ットモデル¹⁰⁾を用いた。また、ヒト心筋炎の生検および剖検標本を用いての解析も
9 行った。さらに、低酸素下での反応を見るために、新生児ラット培養心筋細胞を低
10 酸素下で培養し、それらを検討した。この研究によって、我々は様々な心臓病で
11 titin、CaMKII δ および Cypher/ZASP で選択的スプライシングアイソフォーム変換
12 が生じていること、これらの変化は臨床的に有用なマーカーになる可能性があるこ
13 とを見いだした。

14

方法

15 動物モデル

16 雄の Lewis ラットをチャールズリバー (厚木、神奈川) から購入し、新潟
17 大学脳研究所動物実験施設で 8 週齢になるまで維持し、動物モデルを作成した。す
18 べての動物実験は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認下で行われた。

19

20 EAM ラットモデル

21 心筋ミオシンは、以前報告したようにブタの心室筋から精製した⁹⁾。ラッ
22 ト (n = 23) はイソフルラン吸入にて麻酔をし、EAM を作成するため第 0 日目に各々
23 のラットに結核死菌 H37RA (Difco, Detroit, MI, USA) 10 mg/mL を含む完全フロイ
24 ントアジュvantとブタ心筋ミオシン同量を含む 0.2 mL を免疫した。EAM ラットは、
25 第 0 日 (n = 3) 、9 日 (n = 3) 、12 日 (n = 3) 、15 日 (n = 3) 、18 日 (n = 4) 、
26

1 30 日 (n= 3) 、 60 日 (n = 4) に以下のようにして解剖した。つまり、すべてのラ
2 ットは過剰のイソフルラン吸入によって安楽死させ、死亡はチャンバーから動物を
3 取り出した時の無呼吸と心臓からの脱血で確認した。各々の EAM ラットから病理組
4 織標本として心臓の横断切片を採取し、遺伝子発現実験には左室から小片を採取し
5 て実験に用いた。

6

7 MCT 肺高血圧右室肥大ラットモデル

8 MCT を注射することによって肺高血圧を発症させ、右室肥大ラットモデル
9 を以下の様に作成した。ラット (n = 9) はイソフルラン吸入によって麻酔し、MCT
10 (60 mg/kg; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を皮下に 1 回注射した。ラット
11 は、MCT 注射後 4 週 (n = 4) 、 5 週 (n = 3) 、 6 週 (n = 2) に解剖し、検討した。
12 コントロールラットは生理食塩水を同様に皮下注射して作成した (4 週, n = 2; 5
13 週, n = 2; 6 週, n = 2) 。すべてのラットは EAM ラットと同じように安楽死させ、
14 各々のラットに対して、病理組織標本として心臓の横断切片を採取し、遺伝子発現
15 実験には右心室の 3 カ所、左心室の 3 カ所から小片を採取して実験に用いた。

16

17 新生児ラット心筋細胞培養

18 安楽死させた各々の新生児ラットの心臓から心房を除いた後に、心室を細
19 かく切り刻み DMEM 溶液で洗った。心筋細胞の分離は、0.0075%コラゲナーゼタイプ
20 II (Invitrogen Life Technologies, 東京) を含む 0.25%トリプシン EDTA 溶液
21 (Invitrogen) を用いて、37°Cでの 10 分間の細胞分離を数回行った。赤血球を RBC
22 Lysis Solution (BioLegend, San Diego, CA) を用いて溶血させ、心筋細胞を DMEM
23 溶液で洗った後に培養プレートに撒いた。一晩心筋細胞をおいて、10%胎児ウシ血清、
24 2 mM L-グルタミン、100 U/ML ペニシリンと 100 mg/ML ストレプトマイシンを含む
25 DMEM 溶液で維持培養した。2 日間の培養の後、心筋細胞を 1%の低酸素下で 6 時間培
26 養し (低酸素, n = 4; 正常酸素, n = 4) 、 2 日後に細胞を採取して検討した。

1
2 心不全症例の心標本
3 心筋生検あるいは剖検の病理所見、臨床所見、画像所見、遺伝子解析結果
4 から心不全症例 (n = 34) を心筋炎 (n = 9) と拡張型心筋症 (DCM) (n = 25) に分
5 類した。心筋炎は、病理所見から診断した。各々の心筋生検標本は 2 つに分割し、
6 一方を病理組織標本に、もう一方を遺伝子発現解析のための標本に使用した。剖検
7 は、死後 12 時間以内に採取し、遺伝子発現解析のための標本は、直ちに Trizol
8 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中でホモジエネートするか、-80°C に保存して凍
9 結標本のまま直ちに Trizol 中でホモジエネートして RNA を抽出した。
10
11 臨床研究における倫理および患者の同意
12 新潟大学医学部倫理委員会の承認の下、全ての患者から同意の上、研究を
13 行った。
14
15 RNA の抽出とリアルタイム RT-PCR
16 総 RNA は Trizol を用いて心標本、心筋培養細胞から抽出した。cDNA は 0.5
17 - 5 μg の総 RNA からランダムプライマーと Moloney murine leukemia virus 逆転
18 写酵素を用いて合成された。リアルタイム RT-PCR のスタンダードのためのプラスミ
19 ドを作成するために、titin、CaMKII δ と Cypher/ZASP のアイソフォームは表 1 に
20 示すプライマーを用いて PCR を行い、それらの PCR 産物を pGEM リコンビナントプラ
21 スミドに直接挿入し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞を形質転換して MagExtractor
22 plasmid kit (Toyobo, 大阪) を用いてプラスミドを精製した。各々の mRNA の絶対
23 コピー数は、ライトサイクラーと同じプライマーと SYBR Premix Ex Taq II (Takara,
24 大津) を用いて定量的 RT-PCR によって測定された。ライトサイクラーは 95°C、10
25 分間の初期変性の後、95°C、10 秒間、62°C、10 秒間、72°C、10 秒間の 3 ステップ
26 を 45 サイクル行った。mRNA の絶対コピー数はスタンダードカーブを用いたライト

1 サイクラーのソフトウェアを用いて計算され、各々のアイソフォーム mRNA のコピー数
2 の比もそれによって計算された。

3

4 組織病理所見

5 組織病理観察のための標本は、10% ホルマリンにて室温で固定され、次い
6 でアルコール系列によって脱水を行い、パラフィン包埋された。4 μm の切片をキ
7 シレンで脱パラフィンを行い、アルコール系列で脱水した。切片はヘマトキシリソ・
8 エオジンあるいはアザン・マロリー染色を行った。

9

10 統計解析

11 統計解析は、対応のない t -検定あるいは一元配置分散分析と Bonferroni
12 の多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ を有意差とし、データは平均 \pm 標準誤差で示
13 した。

14

15 結果

16 EAM とヒト心筋炎

17 第 9 日目の EAM ラットの心臓では、正常の心臓と比べて組織病理所見の変
18 化は観察されなかった（図 1A）。第 12 日目の EAM の心臓には、炎症細胞の浸潤が
19 見られ（図 1B）、特に第 15 日目（図 1C）と 18 日目（図 1D）の EAM の心臓には多
20 くの炎症細胞が浸潤していた。titin N2BA/titin N2B mRNA 比、CaMKII δ A/CaMKII δ B
21 mRNA 比、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 比
22 は、第 12 日目の EAM の心臓で有意に増加しており（Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4
23 mRNA $P < 0.01$; titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B;
24 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA $P < 0.001$ ）、第 15 日目に減少し、第 18 日目に元のレ
25 ベルに戻った（図 2A, 2B, 2C, 2D）。ヒト心筋炎の組織病理所見を図 1E に示すが
26 多くの炎症細胞が浸潤する典型的な所見が見られ、DCM の病理所見では図 1F のよう

1 に中等度の線維化があるもののほとんど炎症細胞浸潤は見られなかつた。心筋組織
2 中の titin N2BA/titin N2B mRNA と CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は DCM 群に比較
3 して心筋炎群で有意に高かつた（図 3A, 3B ; P < 0.001）。しかしながら、Cypher
4 inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は、心筋炎群と DCM 群とで有意な差はなかつた
5 (図3C)。CaMKII δ A mRNA は多くの心筋組織中では検出できず、CaMKII δ A/CaMKII δ B
6 mRNA 比を求めるることはできなかつた。

7

8 MCT 肺高血圧右室肥大ラットモデル

9 MCT 肺高血圧ラットの右室は 4 週後から肥大と拡張がみられ、その後右室
10 の肥大と拡張は進行していった（図 4B, 4D, 4H）。一方、MCT 肺高血圧ラットの左
11 室の肥大（図 4F, 4J）は、コントロールラット（図 4E, 4I）と比較しても見られな
12 かつた。titin N2BA/titin N2B mRNA、CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA、
13 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は、コン
14 トロールラットの右室の心筋組織中と比べて有意に高値だった（図 5A, 5B, 5C,
15 5D）；（4 週後, P < 0.05 [titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA]
16 P < 0.001 [CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA, Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA]；5
17 週後, P < 0.01 [CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA] P < 0.001 [titin N2BA/titin N2B mRNA,
18 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA, Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA]；6 週後, P <
19 0.001 [titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B, CaMKII δ C/CaMKII δ B
20 mRNA, Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA]）。6 週後 MCT 肺高血圧ラットの左
21 室で titin N2BA/titin N2B mRNA 比はコントロールラットに比べて有意に高く（図
22 5A; P < 0.05）、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は 4 週後と 6 週後 MCT 肺高血圧ラ
23 ットの左室でコントロールラットに比べて有意に高かつた（図 5C; P < 0.05, P <
24 0.01）。

25

26 低酸素下の培養心筋細胞

titin N2BA/titin N2B mRNA と CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA の比は、正常酸素下培養に比べて低酸素下培養の心筋細胞で有意に低下していた（図 6A, 6B; P < 0.001, P < 0.01）。しかしながら、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は有意な差はない（図 6C）、対照的に、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は、正常酸素下の培養心筋細胞に比し、低酸素下培養心筋細胞で有意に高値であった（図 6D; P < 0.01）。

考察

選択的スプライシングは蛋白の構造、局在、機能に変化を与え、生理的あるいは病的ストレス状況での生物学的な多様性を増加させる。我々は、心筋炎、右室肥大、低酸素の病的な状況下で、心筋細胞は titin、CaMKII δ 、ZASP/Cypher 遺伝子の選択的スプライシングによって適応しているのではないかと仮説を立て、以下のような推測で考察してみた。

心筋炎における選択的スプライシングアイソフォーム

titin N2BA/titin N2B mRNA 、 CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 、 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 、 Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は EAM の発症初期にだけ上昇していた。以前我々が、ナトリウム利尿ペプチド、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、エンドセリン、細胞外基質の mRNA を調べた時には、これらの mRNA の上昇は発症初期から 28 日後まで高かった¹¹⁾。今回我々が調べたアイソフォーム比の変化は、それに比べて発症初期だけの一過性の上昇であった。その理由はまだ不明ではあるが、我々は以下の様に推測している。

EAM の発症初期には心筋細胞は進行性に傷害をうけ、各々の生き残った心筋細胞の機械的ストレスは急速に大きくなると推測される。我々の以前の研究では、左室拡張末期圧は、第 7 日から第 14 日に大きく上昇する¹²⁾。そのような状況下では、

生き残った心筋細胞は大きくなり、興奮収縮連関を高める必要があるであろう。我々は、以前心エコーで EAM を調べた時には、第 10 日から 15 日目までに左室拡張末期径は急激に大きくなっていた（第 10 日、5.5mm；第 15 日、6.5mm）¹³。EAM の発症初期に、titin N2B の発現よりも伸展性の高い titin N2BA の発現が増強すること、興奮収縮連関を高める細胞質局在の CaMKII δ A と C の発現が増強することは、このような病的ストレスの状況下では利にかなっているかもしれない。さらに、糖代謝経路は心臓のストレス下でのエネルギー产生には重要であり、Z 帯で PGM1 と結合できるエクソン 4 を持つ Cypher の発現増強は、エネルギー需要の亢進した状況では利にかなっているかもしれない。我々の以前の検討では、第 7 日から 14 日の左室拡張末期圧の上昇よりも第 14 日以降の左室拡張末期圧の上昇のほうが小さかった¹²。そして、第 10 日から 15 日の左室拡張末期径の増加よりも第 15 日以降の左室拡張末期径の増加（第 21 日、6.6mm；第 30 日、6.7mm；第 42 日、6.3mm）のほうが小さかった¹³。EAM の慢性期の生き残った心筋細胞は急性期よりは安定しており、あまり大きなストレスを受けておらず、アイソフォームのこれらの変化は徐々に戻り、元のレベルまで回復するのかもしれない。

我々の臨床研究は、DCM 群に比べて心筋炎群で titin N2BA と CaMKII δ C の発現が増強していた。心筋炎での生き残った心筋細胞は DCM に比べてより進行性のストレスを受けているのかもしれない、そのようなアイソフォーム変化は利にかなっているのかもしれない。一方、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は、心筋炎群と DCM 群で差は見られなかった。DCM 群の多くの患者は、心筋への不均一な¹²³I-BMIPP の摂取、つまり心筋脂質代謝の部分的な欠損を示すと報告されている¹⁴。それ故、DCM 患者においては、正常の心臓と比べて Cypher アイソフォームの比が異なっているのかもしれない。今回の EAM での心臓でみられたこれらのアイソフォームの時間経過については、ヒトにおいては心筋炎の臨床症例が少ないので調べることはできなかった。心筋炎の心臓におけるアイソフォームの時間経過による変化は、心筋炎の臨床経過を予測する上で有用な情報を与えてくれる可能性がある。ヒト心

1 筋炎の時間経過におけるアイソフォーム変化については、今後の研究が必要と思わ
2 れる。

3

4 MCT 肺高血圧右室肥大ラットにおける選択的スプライシングアイソフォーム
5 titin N2BA/titin N2B mRNA 、 CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 、
6 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA、 Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA の比は、MCT 肺
7 高血圧右室肥大ラットの右室で上昇しており、これは EAM の発症初期の心臓と同様
8 な変化であった。MCT 肺高血圧右室肥大ラットの右室圧や右室重量は 4 週以降増加
9 し続けるとされ^{15,16)}、アイソフォームの変化も 4 週以降ずっと続いたのかもしれない
10 い。MCT 肺高血圧右室肥大ラットの右室の心筋細胞では、進行性の機械的なストレ
11 スを受けており、大量のエネルギーが必要とされることが予測される。それは EAM
12 の発症初期と同様であり、そのような状況下では利にかなっているのかもしれない。
13 MCT 肺高血圧右室肥大ラットの左室では心筋細胞の肥大は見られなかつたが、titin
14 N2BA/titin N2B mRNA と CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は少しではあったが有意に
15 増加していた。右室の拡大によって左室が影響され、心室中隔を介した右室からの
16 圧排による左室の機能低下があるのかもしれない¹⁷⁾。今回の左室に見られたアイソ
17 フォームの軽度な変化はそれによるものかもしれない。

18

19 低酸素下での心筋細胞の選択的スプライシングアイソフォーム
20 Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 比は、低酸素下での心筋細胞で増加
21 していた。この変化は、EAM の発症初期および MCT 肺高血圧右室肥大ラットの右室
22 での変化と同様であった。一方、titin N2BA/titin N2B mRNA、CaMKII δ A/CaMKII δ B
23 mRNA、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は、EAM の発症初期や MCT 肺高血圧右室肥大
24 ラットの右室と異なって増加しておらず、むしろ少し低下していた。生体外で低酸
25 素下培養された心筋細胞は、生体内での EAM や MCT 肺高血圧右室肥大ラットの心筋
26 細胞とは異なり伸展されてはおらず、適応反応としての titin の構造、CaMKII δ の

1 局在の変化は起こらないのかもしれない。大きな titin は、広範囲に及ぶ冠動脈疾
2 患をもつ移植心で増加することが示され¹⁸⁾、また、虚血再還流傷害の後に細胞質局
3 在の CaMKII δ が増加するといわれている¹⁹⁾。生体内における冠動脈疾患の心臓にお
4 ける心筋細胞は、進行性のストレスをうけると想定される。しかしながら、我々が
5 今回検討した生体外の培養心筋細胞の検討では、心筋細胞の伸展はなく、生体内で
6 おこなった以前の検討とは異なる可能性がある。核局在型 CaMKII δ B は、興奮収縮
7 連関を増強する細胞質局在型 CaMKII δ と異なって、心筋細胞のアポトーシスを強力
8 に抑制するようである。それ故、生体外で伸展のない低酸素下培養心筋細胞では、
9 アポトーシスを抑制するという意味において、利にかなっているのかもしれない。

10

11 心蛋白の選択的スプライシングアイソフォームの将来への臨床応用

12 現在のところ、心疾患における選択的スプライシングアイソフォームの臨
13 床応用については不明である。一つの可能性としては、心筋生検標本の診断への応
14 用である。今回調べた心蛋白の選択的スプライシングアイソフォームは、心筋細胞
15 だけに発現すると考えられ、たとえ心筋生検標本中の心筋細胞の割合が異なってい
16 ようとも、アイソフォームの比は理論的に再現性があると考えられる。それ故、心
17 筋生検中のアイソフォームの比は、心疾患のステージや重症度を予見できる可能性
18 があると思われる。しかしながら、titin や CaMKII δ の発現は、様々な病的条件下
19 で変わる可能性があり、注意深い解釈が必要となるであろう。もう一つの臨床応用
20 としては、画像診断への応用である。放射性同位体で標識したアンチセンスオリゴ
21 ヌクレオチドの使用によって、これから mRNA の画像診断は益々進展する可能性が
22 あり^{20,21)}、各々のアイソフォームを特異的に検出が可能になれば臨床上有用となる
23 かもしれない。可能性のある 3 番目の応用としては、心疾患の治療への応用である。
24 アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、選択的スプライシングを調節するこ
25 とがこれらの臨床応用として考えられている¹¹⁾。それには、さらなる研究が必要
26 とされるが、様々な心疾患における心蛋白のアイソフォーム変化を十分理解する必

1 要があろう。

2

3 結論

4 本研究によって、急性炎症、重症な圧負荷、低酸素の状況下で、心蛋白 titin、
5 CaMKII δ、ZASP/Cypher の選択的スプライシングアイソフォームは大きく変化する
6 ことが見いだされた。心蛋白の選択的スプライシングは、病的ストレス下での適応
7 において重要な役割を演じているのかもしれない。

8

9 研究の限界

10 前述したように、本研究はいくつかの限界がある。ヒト心筋炎の検討では、
11 症例数が限られていたために、心筋炎の臨床経過におけるアイソフォームの変化は
12 検討できなかった。また正常ヒト心臓でのアイソフォームを検討しなかつたので、
13 DCM の心臓でのアイソフォーム変化の特徴は不明であった。さらに、限られた疾患
14 での mRNA の検討であり、蛋白の検討は行われてはいない。さらなる研究が、様々な
15 疾患で、蛋白も含めて行われる必要があると思われる。

16

17 利益相反の開示

18 本研究による利益相反はない。

19

20 謝辞

21 本研究は、文部科学省基盤研究費 (no. 16K09420) の支援によって行われた。また、
22 本研究の試料を提供してくださった新潟県立新発田病院の吉田 剛先生、田辺恭彦
23 先生、研究の指導をしてくださった塙 晴雄先生、南野 徹先生に深謝する。

24

1 図の説明

2

3 図 1

4 EAM ラット心臓および心筋炎、DCM 患者の心臓の組織所見。

5 EAM ラットの第 9 日目 (A) 、第 12 日目 (B) 、第 15 日目 (C) 、第 18 日目 (D) の

6 左室。心筋炎患者 (E) と DCM 患者 (F) から的心筋生検の組織所見。ヘマトキシリ

7 ン・エオジン染色。

8

9 図 2

10 EAM ラット左室中の titin、CaMKII δ 、Cypher アイソフォーム mRNA の発現比。

11 titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A) 、 CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 比 (B) 、

12 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (C) 、 Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 比 (D) 。

13 リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回ずつ測定した。 *P < 0.05, **P < 0.01,

14 ***P < 0.001 vs. 第 0 日。

15

16 図 3

17 心筋炎、DCM 患者の心筋生検、心臓剖検標本中の titin、CaMKII δ 、Cypher アイソ

18 フォーム mRNA の発現比。

19 titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A) 、 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (B) 、 Cypher

20 inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA (C) 。リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回

21 ずつ測定した。 ***P < 0.001 vs. 心筋炎。

22

23 図 4

24 MCT 肺高血圧右室肥大ラットとコントロールラットの心臓の肉眼および組織所見。

25 ヘマトキシリン・エオジン染色 (A - F) アザン・マロリー染色 (G - J) 。5 週、注

26 射した 5 週後； 6 週、注射した 6 週後。

1

2 図 5

3 MCT 肺高血圧右室肥大ラットの心室中の titin、CaMKII δ、Cypher アイソフォーム
4 mRNA の発現比。

5 titin N2BA mRNA/titin N2B mRNA 比 (A) 、CaMKII δ A mRNA/CaMKII δ B mRNA 比 (B) 、
6 CaMKII δ C mRNA/CaMKII δ B mRNA 比 (C) 、Cypher inc-ex4 mRNA/Cypher exc-ex4 mRNA
7 比 (D) 。リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回ずつ測定した。4 週、注射
8 した 4 週後；5 週、注射した 5 週後；6 週、注射した 6 週後；コントロールは 4 週、
9 5 週、6 週のすべてのラットの発現比を示す。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001
10 (コントロールラットの右室 vs. MCT 肺高血圧右室肥大ラットの右室)。†P < 0.05,
11 ††P < 0.01 (コントロールラットの左室 vs. MCT 肺高血圧右室肥大ラットの左
12 室)。

13

14 図 6

15 正常酸素下、低酸素下での新生児ラット培養心筋細胞中の titin、CaMKII δ、Cypher
16 アイソフォーム mRNA の発現比。

17 titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A) 、CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 比 (B) 、
18 CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (C) 、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 比 (D) 。
19 リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回ずつ測定した。**P < 0.01, ***P < 0.001
20 vs. 正常酸素下培養心筋細胞。

21

引用文献

- 2 1) Lara-Pezzi E, Gomez-Salinero J, Gatto A and Garcia-Pavia P: The
3 alternative heart: Impact of alternative splicing in heart disease. *J Cardiovasc*
4 *Transl Res* 6: 945-955, 2013.

5 2) Jin JP and Lin JJ: Rapid purification of mammalian cardiac troponin t and its
6 isoform switching in rat hearts during development. *J Biol Chem* 263:
7 7309-7315, 1988.

8 3) Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S and Granzier H: Developmental control
9 of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal
10 myocardium. *Circ Res* 94: 505-513, 2004.

11 4) Xu X, Yang D, Ding JH, Wang W, Chu PH, Dalton ND, Wang HY,
12 Bermingham JR, Jr., Ye Z, Liu F, Rosenfeld MG, Manley JL, Ross J, Jr.,
13 Chen J, Xiao RP, Cheng H and Fu XD: Asf/sf2-regulated camkiidelta
14 alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in
15 cardiac muscle. *Cell* 120: 59-72, 2005.

16 5) Linke WA: Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated
17 proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction.
18 *Cardiovasc Res* 77: 637-648, 2008.

19 6) Linke WA and Bucker S: King of hearts: A splicing factor rules cardiac
20 proteins. *Nat Med* 18: 660-661, 2012.

21 7) Peng W, Zhang Y, Zheng M, Cheng H, Zhu W, Cao CM and Xiao RP:
22 Cardioprotection by camkii-deltab is mediated by phosphorylation of heat
23 shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70.
24 *Circ Res* 106: 102-110, 2010.

25 8) Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M,
26 Towbin JA, Chikamori T, Yamashina A and Kimura A: Impaired binding of
27 zasp/cypher with phosphoglucomutase 1 is associated with dilated
28 cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 83: 80-88, 2009.

29 9) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A
30 novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by
31 immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57:
32 250-262, 1990.

33 10) Chesney CF and Allen JR: Animal model: Pulmonary hypertension, cor
34 pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline-intoxicated
35 nonhuman primates. *The American journal of pathology* 70: 489-492, 1973.

36 11) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito
37 M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S,
38 Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat

- 1 experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci (Lond)* 103: 623-632, 2002.
- 2 12) Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi
3 T and Imai S: Expression of inducible nitric oxide synthase in rat
4 experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in
5 cardiac hemodynamics. *Circ Res* 80: 11-20, 1997.
- 6 13) 劉 慧, 小玉 誠, 太刀川 仁, 相澤 義房: 実験的自己免疫性心筋炎の自然経
7 過と心エコー所見の変化. *新潟医学会雑誌* 116: 35-40, 2002.
- 8 14) Yazaki Y, Isobe M, Takahashi W, Kitabayashi H, Nishiyama O, Sekiguchi M
9 and Takemura T: Assessment of myocardial fatty acid metabolic
10 abnormalities in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy using 123i
11 bmipp spect: Correlation with clinicopathological findings and clinical course.
12 *Heart* 81: 153-159, 1999.
- 13 15) Correia-Pinto J, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque R, Jr., Lourenco
14 AP, Melo-Rocha G, Vasques-Novoa F, Gillebert TC and Leite-Moreira AF:
15 Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic
16 dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Basic Res
17 Cardiol* 104: 535-545, 2009.
- 18 16) Daicho T, Yagi T, Abe Y, Ohara M, Marunouchi T, Takeo S and Tanonaka K:
19 Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the
20 development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary
21 hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 111: 33-43, 2009.
- 22 17) Querejeta Roca G, Campbell P, Claggett B, Vazir A, Quinn D, Solomon SD
23 and Shah AM: Impact of lowering pulmonary vascular resistance on right and
24 left ventricular deformation in pulmonary arterial hypertension. *Eur J Heart
25 Fail* 17: 63-73, 2015.
- 26 18) Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ
27 and Linke WA: Titin isoform switch in ischemic human heart disease.
28 *Circulation* 106: 1333-1341, 2002.
- 29 19) Weinreuter M, Kreusser MM, Beckendorf J, Schreiter FC, Leuschner F,
30 Lehmann LH, Hofmann KP, Rostosky JS, Diemert N, Xu C, Volz HC,
31 Jungmann A, Nickel A, Sticht C, Gretz N, Maack C, Schneider MD, Grone HJ,
32 Muller OJ, Katus HA and Backs J: Cam kinase ii mediates maladaptive
33 post-infarct remodeling and pro-inflammatory chemoattractant signaling but
34 not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med* 6:
35 1231-1245, 2014.
- 36 20) Bai J, Yokoyama K, Kinuya S, Shiba K, Matsushita R, Nomura M, Michigishi
37 T and Tonami N: In vitro detection of mdr1 mrna in murine leukemia cells with
38 111in-labeled oligonucleotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31: 1523-1529,
39 2004.

1 21) Liu M, Wang RF, Yan P, Zhang CL and Cui YG: Molecular imaging and
2 pharmacokinetics of (^{99m}) tc-htert antisense oligonucleotide as a potential
3 tumor imaging probe. J Labelled Comp Radiopharm 57: 97-101, 2014.

4

表1
プライマーリスト

	センスプライマー	エクソン	アンチセンスプライマー	エクソン
ラット titin N2B	5'-ttcaaagctggcagagagattat-3'	50	5'-cttcttcgggtctttcta-3'	220
ラット titin N2BA	5'-agectacaccgctaaaagtgccta-3'	218-219	5'-cttcttcgggtctttcta-3'	220
ラット ZASP/Cypher including エクソン 4	5'-gactcaataatgcccctcaactatc-3'	1	5'-ctgttgtcggtccagaga-3'	4
ラット ZASP/Cypher excluding エクソン 4	5'-gactcaataatgcccctcaactatc-3'	1	5'-gttggctggagaattggctac-3'	5-6
ラット CaMKIIδA	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-acagtagttggggtccag-3'	15-16
ラット CaMKIIδB	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-gtctcagttgactccatcatc-3'	14-17
ラット CaMKIIδC	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-ctcagttgactccttacccc-3'	13-17
ヒト titin N2B	5'-caaattcaccttgagatccaa-3'	50	5'-cttccttcgggttcaggttac-3'	220
ヒト titin N2BA	5'-tcaggatgtgactctgaaagaag-3'	107	5'-atcaaaggacactcacactaaa-3'	108
ヒト ZASP/Cypher including エクソン 4	5'-gactcaacatgcctcaactatc-3'	1	5'-ctgcggcgtcggtccagagc-3'	4
ヒト ZASP/Cypher excluding エクソン 4	5'-gactcaacatgcctcaactatc-3'	1	5'-gttggctggagatgtgactac-3'	5-6
ヒト CaMKIIδB	5'-caaggaatttctcagcagcc-3'	12-13	5'-gtctcagttgactccatcatc-3'	14-17
ヒト CaMKIIδC	5'-caaggaatttctcagcagcc-3'	12-13	5'-ctcagttgactccttacccc-3'	13-17

図1

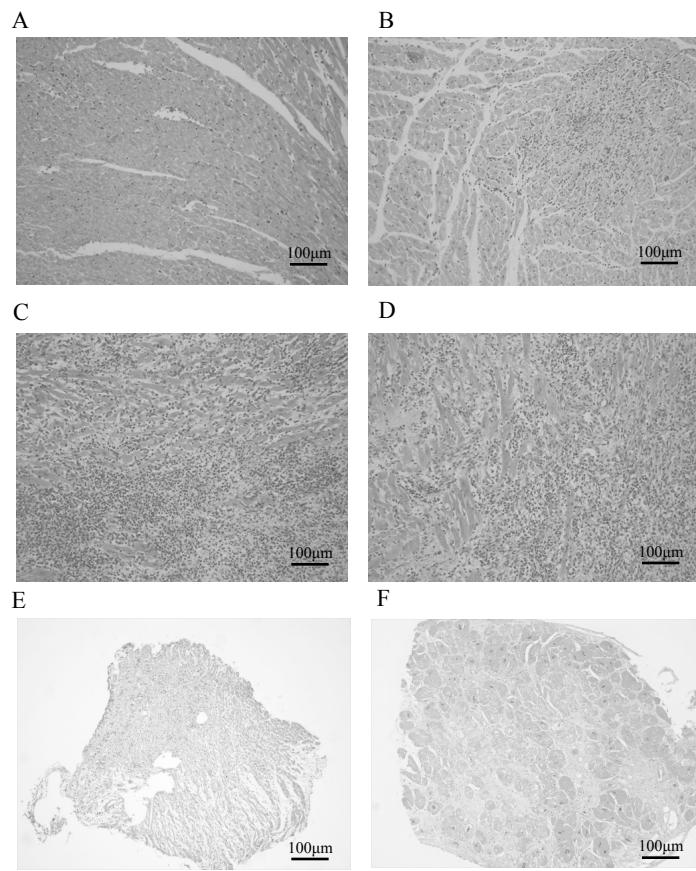


図2

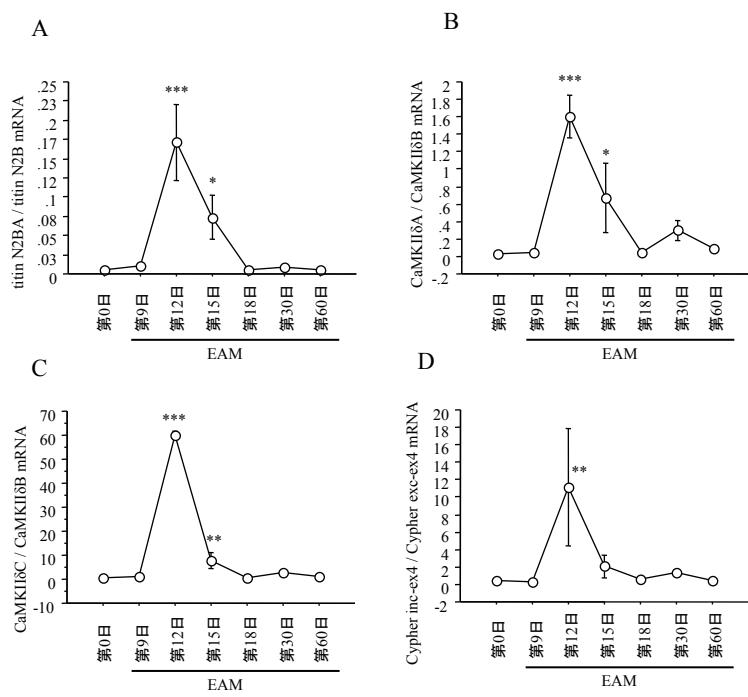


図3

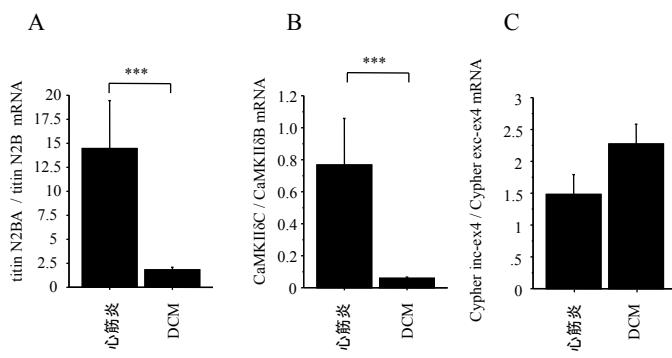


図4

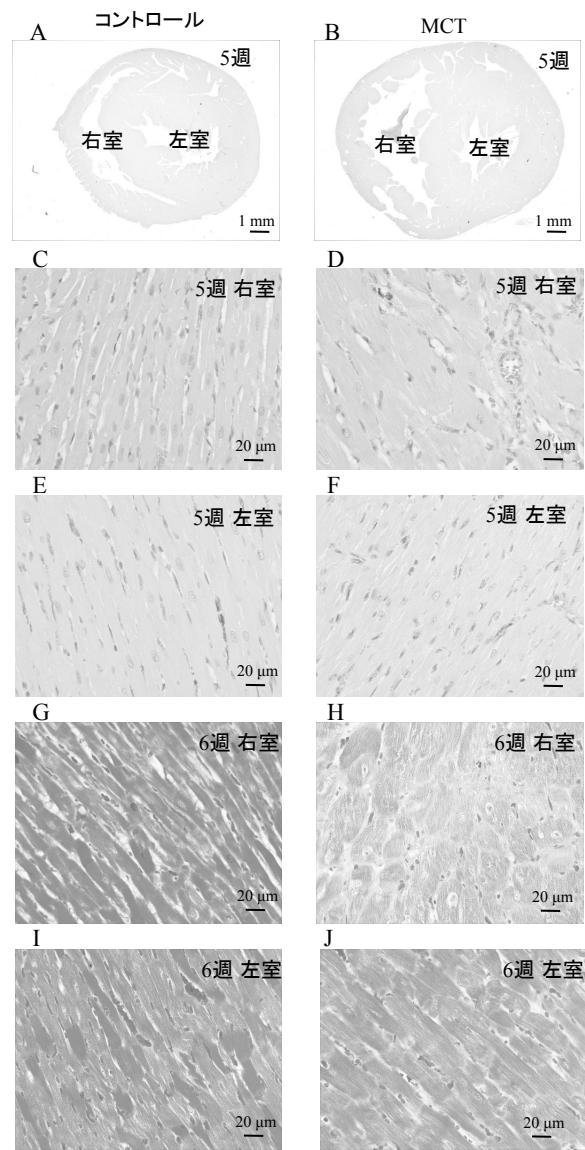


図5

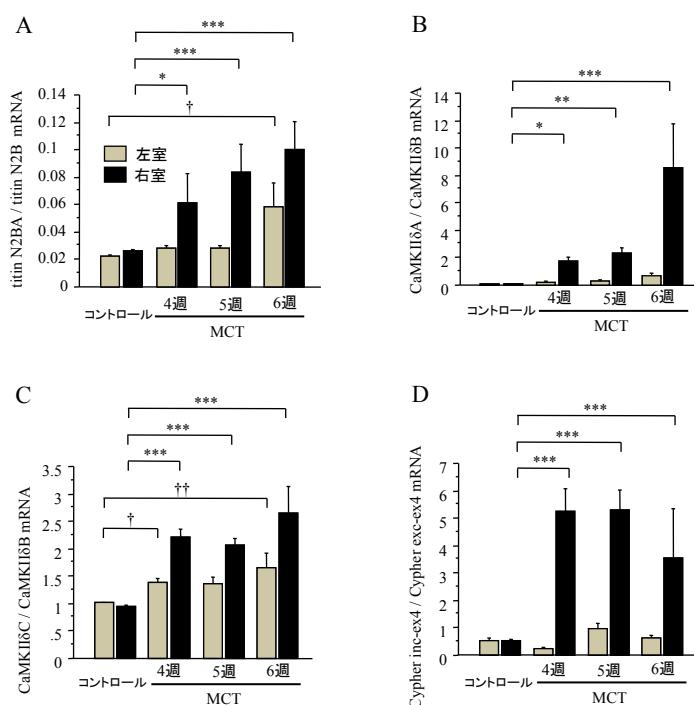


図6

