

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 焦 爽
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第747号
学位授与の日付 平成29年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 心疾患における titin, CaMKII δ および ZASP/Cypher mRNA の選択的スプライシングの調節.

論文審査委員 主査 教授 土田 正則
副査 准教授 名村 理
副査 教授 南野 徹

博士論文の要旨

[背景]

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。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、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。

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。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。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。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。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 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。

[目的]

様々な病的ストレス状態下における心臓中の titin, CaMKII δ 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る。

[方法]

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、申請者は実験的自己免疫性

心筋炎 (EAM) とモノクロタリン (MCT) 肺高血圧右室肥大ラットモデルを用いた。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酸素下で培養し、それらを検討した。

[結果]

EAM とヒト心筋炎

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化は観察されなかった。第12日目のEAMの心臓には、炎症細胞の浸潤が見られ、特に第15日目と18日目のEAMの心臓には多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 mRNA比、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA比、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA比は、第12日目のEAMの心臓で有意に増加しており、第15日目に減少し、第18日目に元のレベルに戻った。ヒト心筋炎の組織病理所見では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った。心筋組織中のtitin N2BA/titin N2B mRNAとCaMKII δ C/CaMKII δ B mRNAの比はDCM群に比較して心筋炎群で有意に高かった。しかしながら、Cypher 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った。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 mRNA比を求めることはできなかった。

MCT 肺高血圧右室肥大ラットモデル

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、その後右室の肥大と拡張は進行していった。一方、MCT 肺高血圧ラットの左室の肥大は、コントロールラットと比較しても見られなかった。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、コン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。6週後MCT 肺高血圧ラットの左室で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、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNAの比は4週後と6週後MCT 肺高血圧ラットの左室でコントロールラットに比べて有意に高かった。

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。しかしながら、CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNAの比は有意な差はなく、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。

[考察]

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。EAMの発症初期には心筋細胞は進行性に傷害を受け、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。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産生には重要であり、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。

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れる。

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、MCT 肺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な変化であった。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ったが、titin 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圧排による左室の機能低下があるのかもしれない。

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用である。もう一つの臨床応用としては、画像診断への応用である。それには、さらなる研究が必要とされるが、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要があるだろう。

[結論]

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、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において重要な役割を演じているのかもしれない。

審査結果の要旨

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のアイソフォームを作ることができる。しかし、その詳細については DNA マイクロアレイによっ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。

実験的自己免疫性心筋炎モデルとモノクローリン肺高血圧右室肥大ラットモデルの心臓、ヒトの心筋炎と拡張型心筋症の生検剖検標本、および低酸素下培養心筋細胞を用いて、titin、CaMKII δ および Cypher の選択的スプライシングアイソフォーム変換について、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

機械的なストレスがかかると考えられる急性期心筋炎の心室およびモノクローリン肺高血圧モデルの肥大した右室では、titin N2BA/titin N2B、CaMKII δ A/CaMKII δ B、CaMKII δ C/CaMKII δ B、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 の比が上昇していた。一方、低酸素下培養心筋細胞では、Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 の比は上昇していたが、titin N2BA/titin N2B、CaMKII δ A/CaMKII δ B、CaMKII δ C/CaMKII δ B の比の上昇は見られず、むしろ titin N2BA/titin N2B、CaMKII δ A/CaMKII δ B の比は低下していた。これらの変化を推測すると、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において重要な役割を演じている可能性が考えられた。

この論文は、心筋炎、肥大心、低酸素などの病的状況下における titin、CaMKII δ および Cypher の選択的スプライシングアイソフォーム変換をはじめて検討した論文であり、スプライシングアイソフォーム変換が様々な心疾患において変化する事を示した点で価値のある論文である。