

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

焦 爽

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
器官制御医学大講座循環器学
(指導：南野 徹教授)

Regulation of Alternative Splicing of Titin, CaMKII δ and ZASP/ Cypher mRNAs in Heart Disease

Shuang JIAO

*Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Tohru MINAMINO)*

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.

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

Reprint requests to: Shuang JIAO
Department of Cardiovascular Biology and Medicine,
Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

焦 爽

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パ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⁸⁾。

本研究は、様々な病的ストレス状態における心臓中の 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。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。この研究によって、我々は様々な心臓病で 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とを見いだした。

方 法

動物モデル

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。

EAM ラットモデル

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

フロイントアジュバント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、第0日 (n = 3), 9日 (n = 3), 12日 (n = 3), 15日 (n = 3), 18日 (n = 4), 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て実験に用いた。

MCT 肺高血圧右室肥大ラットモデル

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を以下のように作成した。ラット (n = 9) はイソフルラン吸入によって麻酔し、MCT (60 mg/kg; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を皮下に1回注射した。ラットは、MCT注射後4週 (n = 4), 5週 (n = 3), 6週 (n = 2) に解剖し、検討した。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、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。

新生児ラット心筋細胞培養

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II (Invitrogen Life Technologies, 東京) を含む0.25%トリプシンEDTA溶液 (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 Lysis Solution (BioLegend, San Diego, CA) を用いて溶血させ、心筋細胞をDMEM溶液で洗った後に培養プレートに撒いた。一晩心筋細胞において、10%胎児ウシ血清、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

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。

心不全症例の心標本

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、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 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中でホモジェネートするか、-80°Cに保存して凍結標本のまま直ちにTrizol 中でホモジェネートしてRNAを抽出した。

臨床研究における倫理および患者の同意

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、研究を行った。

RNAの抽出とリアルタイムRT-PCR

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0.5-5 μ gの総RNAからランダムプライマーとMoloney murine leukemia virus 逆転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 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, 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

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'-cttctcttcgggtctcttttta-3'	220
ラット titin N2BA	5'-agcctacaccgctaaaagtgccca-3'	218-219	5'-cttctcttcgggtctcttttta-3'	220
ラット ZASP/Cypher including エクソン 4	5'-gacttcaatatgccctcactatc-3'	1	5'-ctgctgtcgtgccagaga-3'	4
ラット ZASP/Cypher excluding エクソン 4	5'-gacttcaatatgccctcactatc-3'	1	5'-gttggctggagaattggctac-3'	5-6
ラット CaMKII δ A	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-acagtagtttgggctccag-3'	15-16
ラット CaMKII δ B	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-gctctcagttgactccatc-3'	14-17
ラット CaMKII δ C	5'-cgagaaattttcagcagcc-3'	12-13	5'-ctcagttgactctttaccc-3'	13-17
ヒト titin N2B	5'-caaattcactgtgagatccaa-3'	50	5'-cttctctcttgggtcaggttac-3'	220
ヒト titin N2BA	5'-ttcaggatgtgactctgaaagaag-3'	107	5'-atcaaaggacactcacaactcaaa-3'	108
ヒト ZASP/Cypher including エクソン 4	5'-gacttcaacatgccctcactatc-3'	1	5'-ctgccgtctgtgccagc-3'	4
ヒト ZASP/Cypher excluding エクソン 4	5'-gacttcaacatgccctcactatc-3'	1	5'-gttggctggagagttgactac-3'	5-6
ヒト CaMKII δ B	5'-caaggaatttctcagcagcc-3'	12-13	5'-gctctcagttgactccatc-3'	14-17
ヒト CaMKII δ C	5'-caaggaatttctcagcagcc-3'	12-13	5'-ctcagttgactctttaccc-3'	13-17

ステップを 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 のコピー数の比もそれによって計算された。

組織病理所見

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 μ m の切片をキ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ン・エオジンあるいはアザン・マロリー染色を行った。

統計解析

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 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±標準誤差で示した。

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 (図 1A)。第 12 日目の EAM の心臓には、炎症

細胞の浸潤が見られ (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 (Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA P < 0.01; titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B; 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 (図 3A, 3B ; P < 0.001)。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 (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 mRNA 比を求めることはできなかった。

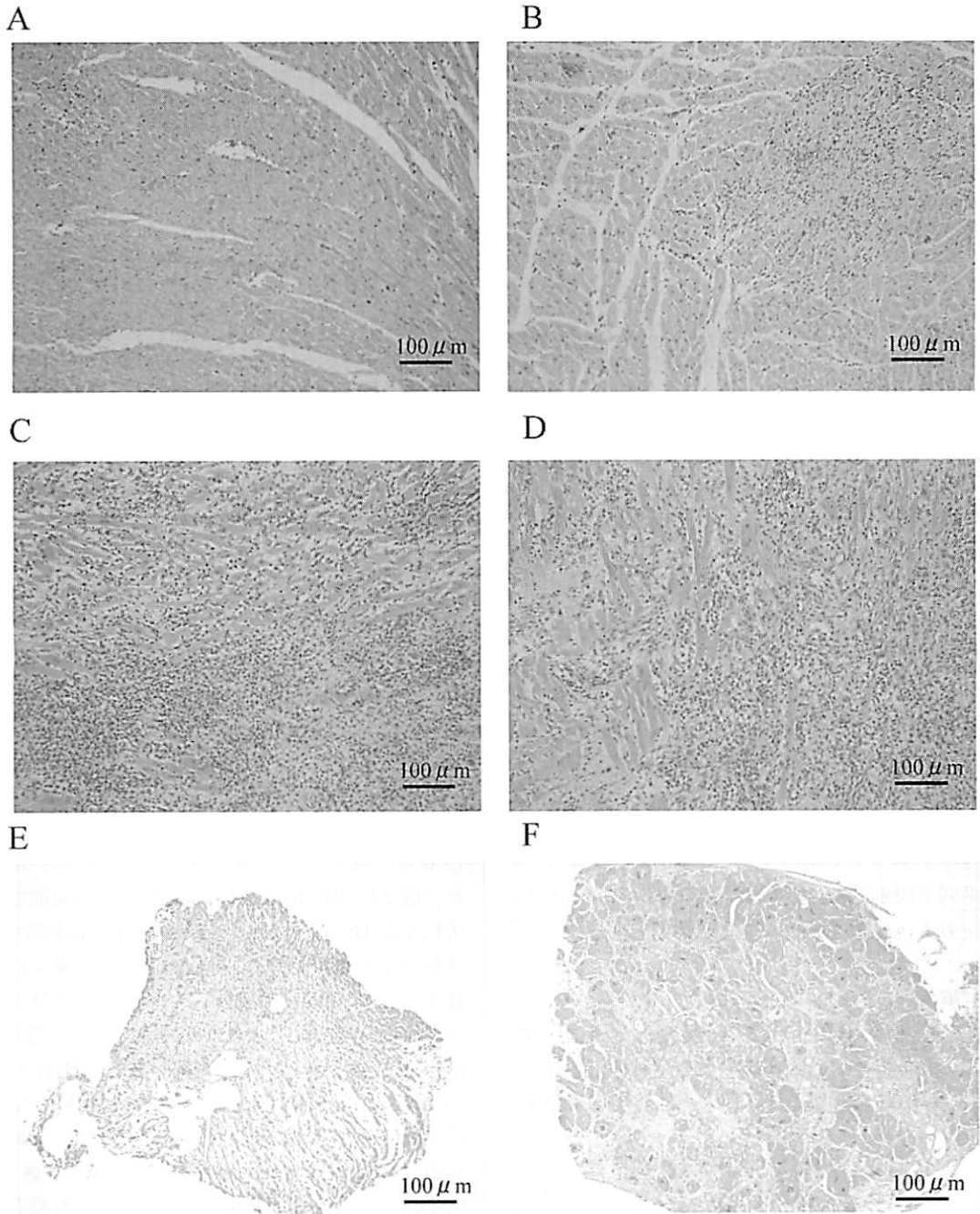


図1 EAMラット心臓および心筋炎、DCM患者の心臓の組織所見
EAMラットの第9日目(A)、第12日目(B)、第15日目(C)、第18日目(D)の左室、心筋炎患者(E)
とDCM患者(F)からの心筋生検の組織所見、ヘマトキシリン・エオジン染色。

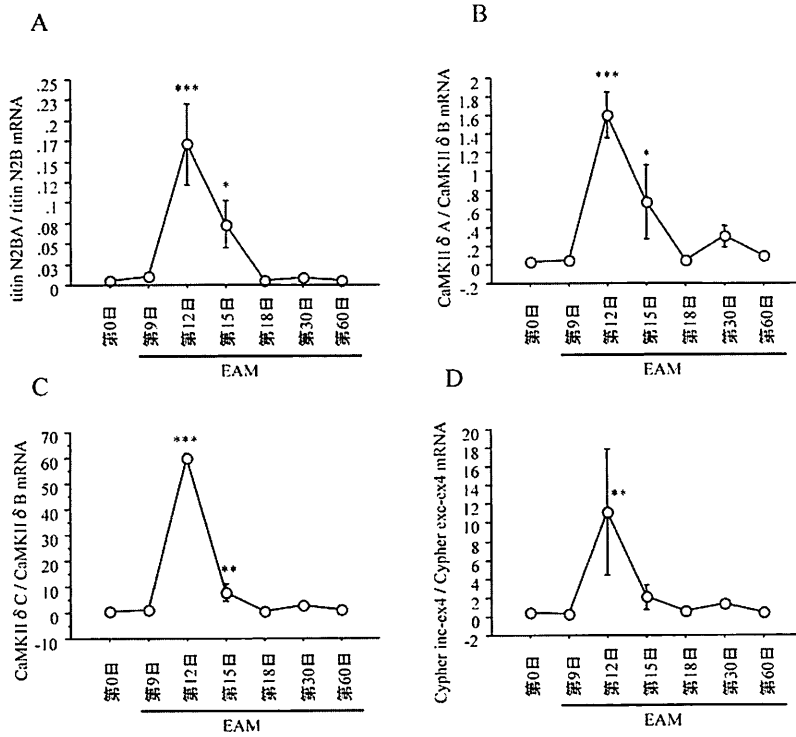


図2 EAMラット左室中の titin, CaMKII δ , Cypher アイソフォーム mRNA の発現比 titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A), CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 比 (B), CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (C), Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 比 (D)。リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回ずつ測定した。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. 第 0 日。

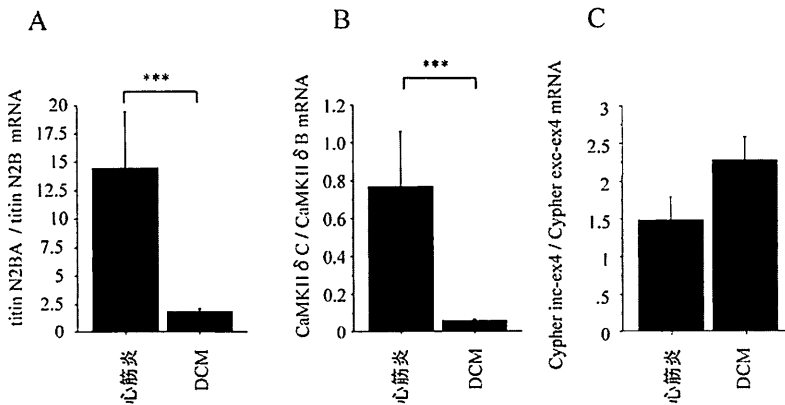


図3 心筋炎, DCM 患者の心筋生検, 心臓剖検標本中の titin, CaMKII δ , Cypher アイソフォーム mRNA の発現比 titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A), CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (B), Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA (C)。リアルタイム RT-PCR は各々の mRNA 量を 2 回ずつ測定した。*** P < 0.001 vs. 心筋炎。

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(図4B, 4D, 4H). 一方, MCT 肺高血

圧ラットの左室の肥大(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かった. titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA, CaMKII δ C/CaMKII δ B

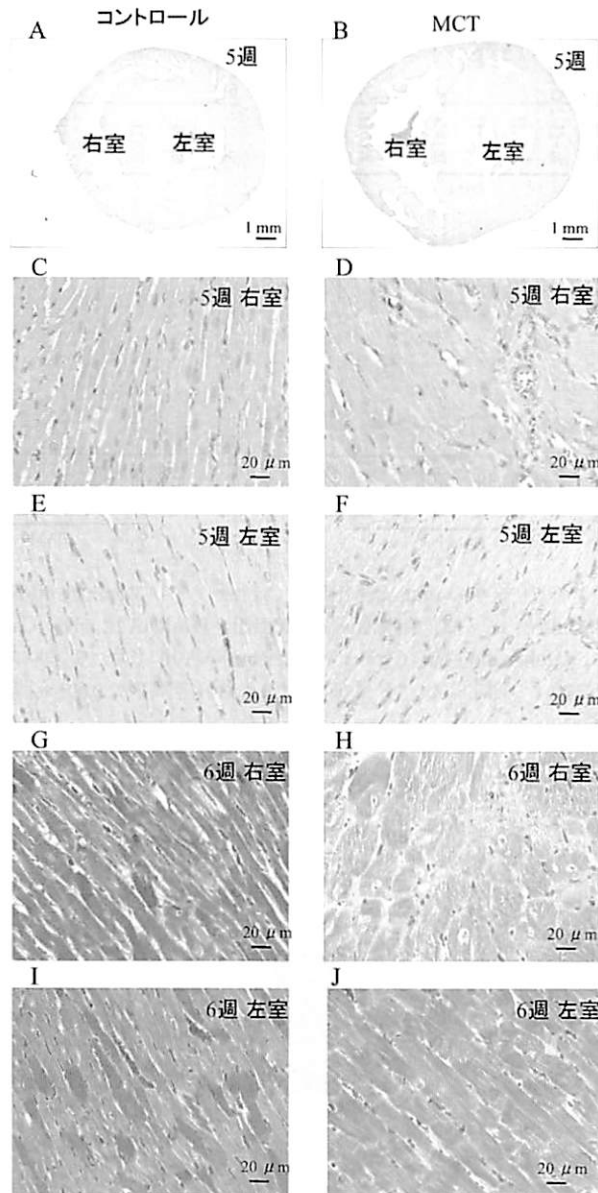


図4 MCT 肺高血圧右室肥大ラットとコントロールラットの心臓の肉眼および組織所見

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, 注射した5週後; 6週, 注射した6週後.

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 (図 5A, 5B, 5C, 5D) ; (4 週後, $P < 0.05$ [titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA] $P < 0.001$ [CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA, Cypher inc - ex4/Cypher exc - ex4 mRNA]; 5 週後, $P < 0.01$ [CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA] $P < 0.001$ [titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ C/

CaMKII δ B mRNA, Cypher inc - ex4/Cypher exc - ex4 mRNA]; 6 週後, $P < 0.001$ [titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B, CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA, Cypher inc - ex4/Cypher exc - ex4 mRNA]). 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 (図 5A; $P < 0.05$), CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA の比は 4 週後と 6 週後 MCT 肺高血圧ラットの左

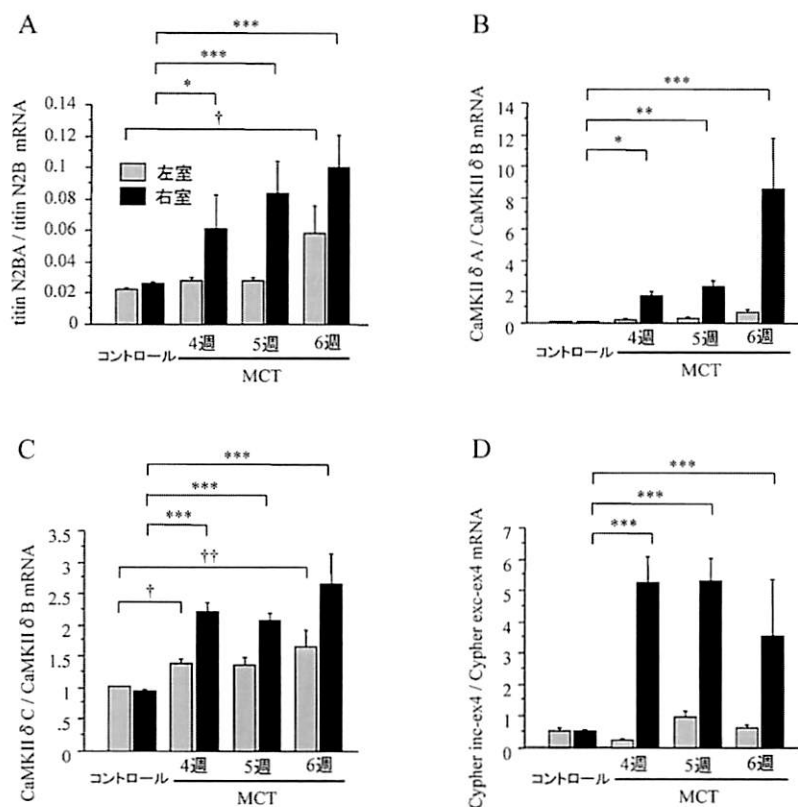


図 5 MCT 肺高血圧右室肥大ラットの心室中の titin, CaMKII δ , Cypher アイソフォーム mRNA の発現比

titin N2BA mRNA/titin N2B mRNA 比 (A), CaMKII δ A mRNA/CaMKII δ B mRNA 比 (B), CaMKII δ C mRNA/CaMKII δ B mRNA 比 (C), Cypher inc - ex4 mRNA/Cypher exc - ex4 mRNA 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, 5 週, 6 週のすべてのラットの発現比を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (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)。† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ (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室)。

室でコントロールラットに比べて有意に高かった (図5C; $P < 0.05$, $P < 0.01$).

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く (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

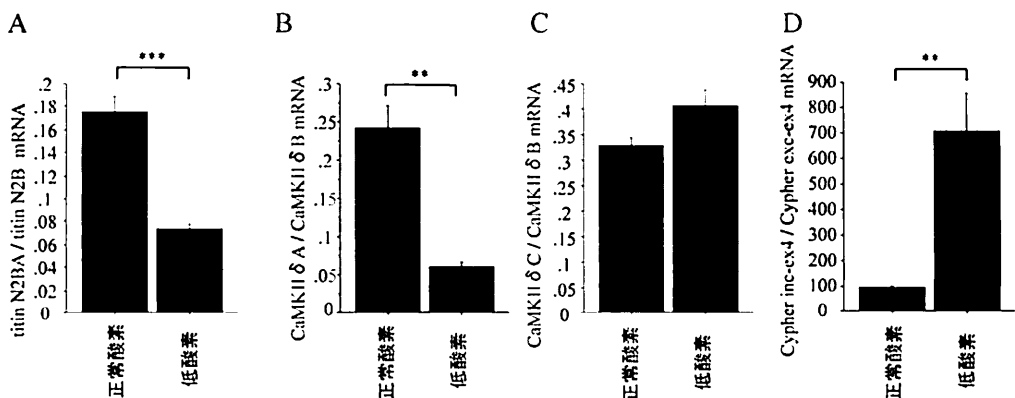


図6 正常酸素下, 低酸素下での新生児ラット培養心筋細胞中の titin, CaMKII δ , Cypher アイソフォーム mRNA の発現比

titin N2BA/titin N2B mRNA 比 (A), CaMKII δ A/CaMKII δ B mRNA 比 (B), CaMKII δ C/CaMKII δ B mRNA 比 (C), Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA 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.

* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. 正常酸素下培養心筋細胞.

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。我々の以前の検討では、第7日から14日の左室拡張末期径の上昇よりも第14日以降の左室拡張末期径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¹²⁵I-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

例が少ないため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。

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

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右室圧や右室重量は4週以降増加し続けるとされ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。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。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¹⁷⁾。今回の左室に見られたアイソフォームの軽度な変化はそれによるものかもしれない。

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

Cypher inc-ex4/Cypher exc-ex4 mRNA比は、低酸素下での心筋細胞で増加していた。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での変化と同様であった。一方、titin N2BA/titin N2B mRNA, CaMKII δ A/CaMKII δ B 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細胞とは異なり伸展されてはならず、適応反応としてのtitinの構造、CaMKII δ の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、アポトーシスを抑制するという意味において、利になっているのかもしれない。

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

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。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ようと、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ヌクレオチドの使用によって、これからのmRNAの画像診断は益々進展する可能性があり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。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とがこれからの臨床応用として考えられている¹⁾。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。

研究の限界

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、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ったため、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、様々な疾患で、蛋白も含めて行われる必要があると思われる。

利益相反の開示

本研究による利益相反はない。

謝 辞

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、本研究の試料を提供して下さった新潟県立新発田病院の吉田 剛先生、田辺恭

彦先生, 研究の指導をしてくださった堀 晴雄先生, 南野 徹先生に深謝する。

引用文献

- 1) Lara - Pezzi E, Gomez - Salinero J, Gatto A and Garcia - Pavia P: The alternative heart: Impact of alternative splicing in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res* 6: 945 - 955, 2013.
- 2) Jin JP and Lin JJ: Rapid purification of mammalian cardiac troponin t and its isoform switching in rat hearts during development. *J Biol Chem* 263: 7309 - 7315, 1988.
- 3) Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S and Granzier H: Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* 94: 505 - 513, 2004.
- 4) Xu X, Yang D, Ding JH, Wang W, Chu PH, Dalton ND, Wang HY, Bermingham JR Jr, Ye Z, Liu F, Rosenfeld MG, Manley JL, Ross J Jr, Chen J, Xiao RP, Cheng H and Fu XD: Asf/sf2 - regulated camkii δ alternative splicing temporally reprograms excitation - contraction coupling in cardiac muscle. *Cell* 120: 59 - 72, 2005.
- 5) Linke WA: Sense and stretchability: The role of titin and titin - associated proteins in myocardial stress - sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res* 77: 637 - 648, 2008.
- 6) Linke WA and Bucker S: King of hearts: A splicing factor rules cardiac proteins. *Nat Med* 18: 660 - 661, 2012.
- 7) Peng W, Zhang Y, Zheng M, Cheng H, Zhu W, Cao CM and Xiao RP: Cardioprotection by camkii - δ is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70. *Circ Res* 106: 102 - 110, 2010.
- 8) Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M, Towbin JA, Chikamori T, Yamashina A and Kimura A: Impaired binding of zasp/cypher with phosphoglucosylase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 83: 80 - 88, 2009.
- 9) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 250 - 262, 1990.
- 10) Chesney CF and Allen JR: Animal model: Pulmonary hypertension, cor pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline - intoxicated nonhuman primates. *The American journal of pathology* 70: 489 - 492, 1973.
- 11) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci (Lond)* 103: 623 - 632, 2002.
- 12) Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T and Imai S: Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ Res* 80: 11 - 20, 1997.
- 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過と心エコー所見の変化. *新潟医学会雑誌* 116: 35 - 40, 2002.
- 14) Yazaki Y, Isobe M, Takahashi W, Kitabayashi H, Nishiyama O, Sekiguchi M and Takemura T: Assessment of myocardial fatty acid metabolic abnormalities in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy using 123i bmipp spect: Correlation with clinicopathological findings and clinical course. *Heart* 81: 153 - 159, 1999.
- 15) Correia - Pinto J, Henriques - Coelho T, Roncon - Albuquerque RJr, Lourenco AP, Melo - Rocha G, Vasques - Novoa F, Gillebert TC and Leite - Moreira AF: Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline - induced pulmonary hypertension. *Basic Res Cardiol* 104: 535 - 545, 2009.
- 16) Daicho T, Yagi T, Abe Y, Ohara M, Marunouchi T, Takeo S and Tanonaka K: Possible involvement of mitochondrial energy - producing ability in the development of right ventricular failure in

- monocrotaline - induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 111: 33 - 43, 2009.
- 17) Querejeta Roca G, Campbell P, Claggett B, Vazir A, Quinn D, Solomon SD and Shah AM: Impact of lowering pulmonary vascular resistance on right and left ventricular deformation in pulmonary arterial hypertension. *Eur J Heart Fail* 17: 63 - 73, 2015.
- 18) Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ and Linke WA: Titin iso - form switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106: 1333 - 1341, 2002.
- 19) Weinreuter M, Kreusser MM, Beckendorf J, Schreiter FC, Leuschner F, Lehmann LH, Hofmann KP, Rostovsky JS, Diemert N, Xu C, Volz HC, Jungmann A, Nickel A, Sticht C, Gretz N, Maack C, Schneider MD, Grone HJ, Muller OJ, Katus HA and Backs J: Cam kinase ii mediates maladaptive post - infarct remodeling and pro - inflammatory chemoattractant signaling but not acute myocardial ischemia/reperfusion injury. *EMBO Mol Med* 6: 1231 - 1245, 2014.
- 20) Bai J, Yokoyama K, Kinuya S, Shiba K, Matsushita R, Nomura M, Michigishi T and Tonami N: In vitro detection of *mdr1* mRNA in murine leukemia cells with ¹¹¹In - labeled oligonucleotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31: 1523 - 1529, 2004.
- 21) Liu M, Wang RF, Yan P, Zhang CL and Cui YG: Molecular imaging and pharmacokinetics of (^{99m}Tc - htert antisense oligonucleotide as a potential tumor imaging probe. *J Labelled Comp Radiopharm* 57: 97 - 101, 2014.

(平成28年12月22日受付)
