

論文内容の要旨

論文提出者氏名 西 真宏

論文題目

Systems network genomic analysis reveals cardioprotective effect of MURC/Cavin-4 deletion against ischemia/reperfusion injury.

論文内容の要旨

虚血性心疾患は高い死亡率と罹患率により世界の主要死因である。カテーテルや血栓溶解療法による再灌流療法の進歩によりその予後は改善しているが、再灌流障害が心筋梗塞や心機能低下、心不全を悪化させることが知られている。そのため心臓虚血再灌流障害を克服することは、虚血性心疾患の治療戦略において重要な課題である。筋特異的タンパク MURC (muscle-restricted coiled-coil protein)/Cavin-4 (caveolae-associated protein 4) はカベオラ構成タンパク Cavin ファミリーに属している。MURC/Cavin-4 が Rho-ROCK 経路を介して心筋繊維形成を促進し、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激による ERK 活性を介して心筋肥大を起こすことが分かっている。家族性拡張型心筋症患者において MURC/Cavin-4 遺伝子変異がみられることも報告されている。しかし、心臓虚血再灌流障害における MURC/Cavin-4 の役割は不明である。

まず MURC/Cavin-4 欠損および野生型 10 週齢 C57/BL6 マウス心臓のマイクロアレイ解析を行ったところ、ヒートマップおよび主成分分析では両群の遺伝子発現に顕著な差を認めた。引き続き PC-corr アルゴリズムを用いて、主成分分析により求めた各遺伝子のもつ因子負荷量をもとにそれぞれの遺伝子間の相関係数を計算しノードの大きさと色調の濃淡とエッジの幅で重みをつけ (閾値 0.6) ネットワークを構築し Cytoscape で可視化した。エンリッチメント解析では虚血や活性酸素種 (ROS) への反応経路、平滑筋分化に関する経路、心臓収縮力制御に関する経路が上位に見られた。

マイクロアレイ解析で虚血や ROS への反応経路に MURC/Cavin-4 欠損が関与していることが分かったため、心臓虚血再灌流障害における MURC/Cavin-4 の機能を解明するためにマウス冠動脈左前下行枝を 1 時間結紮後に 24 時間再灌流し心臓虚血再灌流モデルを構築した。心臓超音波検査では MURC/Cavin-4 欠損マウスは野生型と比較して左室収縮能の低下が抑制されていた。また MURC/Cavin-4 欠損マウスでは非梗塞虚血部位に占める梗塞サイズの縮小を認め、血清トロポニン I 値は低値を示した。

続いて ROS の定量評価を行うため虚血再灌流後のマウス心臓で DHE (dihydroethidium) 染色を行ったところ、MURC/Cavin-4 欠損マウスでは野生型と比較して ROS 産生が抑制されていた。新生児ラット心筋細胞を単離培養し、1%低酸素-再酸素化刺激を加えたところ small

interfering RNA (siRNA) により MURC/Cavin-4 をノックダウンした細胞群ではコントロール群と比較し ROS 産生量が有意に減少していた。マイクロアレイ解析で ROS 関連遺伝子である EGR1 (early growth response protein 1) と DDIT4 (DNA-damage inducible transcript 4) の発現量の変動が見られたため、虚血再灌流後の心臓におけるそれらの発現量を qPCR およびウエスタンブロット法で確認したところ MURC/Cavin-4 欠損マウスは野生型マウスと比較して両遺伝子ともに発現の上昇が抑制されていた。

さらなる新規経路と遺伝子を探索するためにタンパク間相互ネットワーク解析を行なった。マイクロアレイ解析で得られた 91 遺伝子を STRING データベースにインプットし、隣接する 261 個のタンパクを抽出してエンリッチメント解析を行った。アポトーシス制御、虚血および ROS への反応、心臓収縮力制御に関わる 46 タンパクからバイクラスタリングを行いネットワークを再構築したところ EGR1 と DDIT4 に加えて抗アポトーシスタンパク BCL2 (B-cell lymphoma 2) が MURC/Cavin-4 欠損に関わる新たな分子として浮上した。qPCR とウエスタンブロット法で虚血再灌流後マウス心臓の BCL2 発現が MURC/Cavin-4 欠損で有意に上昇していることを確認した。さらに上流にある抗アポトーシス経路の主要な転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) の活性は MURC/Cavin-4 欠損群で有意に上昇しており、アポトーシス実行タンパク Caspase3 活性は MURC/Cavin-4 欠損群で有意に上昇が抑制されていた。

STAT3 関連アポトーシス経路の関与を明らかにするために、新生児ラット心筋細胞に過酸化水素刺激を加え、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling) 染色により細胞死の評価を行ったところ、siRNA により MURC/Cavin-4 をノックダウンした細胞群ではコントロール群と比較し細胞死が有意に減少し、一方でアデノウイルスにより MURC/Cavin-4 を過剰発現した細胞群ではコントロールと比較し細胞死が増加していた。STAT3 抑制剤 WP1066 を添加した心筋細胞では MURC/Cavin-4 ノックダウンによる細胞死減少効果が消失した。また WP1066 を腹腔内投与したマウスでは、虚血再灌流障害に対する MURC/Cavin-4 欠損による心保護効果が消失した。

システムズネットワークゲノム解析による予測と実証実験により得られたこれらの結果より MURC/Cavin-4 欠損は ROS により誘導される心筋細胞死の抑制や STAT3 を介した抗アポトーシス経路を通して心臓虚血再灌流障害を抑制することが明らかとなった。MURC/Cavin-4 は心臓虚血再灌流障害の新たな治療標的となる可能性がある。