

頻脈誘発性心筋症における心筋タンパク質群の恒常性維持分子メカニズムの解明

伯井秀行

大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

【研究の背景】

拡張型心筋症は、左心室の拡張と収縮機能の低下を臨床的特徴とし、治療抵抗性の重症心不全を引き起こす心筋疾患である。国内において心臓移植の主因を占める指定難病であるが、未だ発症原因の多くが解明されていない。これまでに我々は、若年期に心臓移植を必要とした拡張型心筋症の症例に対して全エクソーム解析を用いた網羅的ゲノム解析を行い、新規の疾患原因遺伝子である BAG co-chaperone5 (BAG5)を同定した^{1, 2)}。BAG5 は、分子シャペロンである heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70)に対してヌクレオチド交換因子として作用し、分子シャペロンによる基質タンパク質のフォールディング活性を上昇させるコシャペロンとしての分子機能が知られており³⁾、今回同定した BAG5 遺伝子変異は、コシャペロン活性を消失させる機能喪失型変異であることを示した。さらに BAG5 遺伝子変異による重症心不全の発症に関わる分子機序として、心筋細胞内の生理的なカルシウムハンドリングに重要な役割を果たす Junctional Membrane Complex (JMC) タンパク質群に対する恒常性維持機構の障害と、それに伴った興奮収縮連関の異常を明らかにした。

【目 的】

さらに申請者らは種々の心筋症群の全エクソーム解析において、BAG5 遺伝子のホモ接合型機能喪失変異を有する拡張型心筋症の患者群に加えて、ヘテロ接合型機能喪失変異を有する頻脈誘発性心筋症の患者群を新たに同定した。これら先行研究の知見から、頻脈誘発性心筋症の病態においてもまた、コシャペロンである BAG5 の機能喪失によって引き起こされる JMC タンパク質群に対するタンパク質恒常性維持機構の障害という発症メカニズムが存在する可能性があると考えられた。そこで本研究では、頻脈誘発性心筋症における BAG5 による心筋タンパク質恒常性維持機構の活性調整に関わる分子メカニズムを解明することを目的とした。

【方 法】

まず頻脈誘発性心筋症の細胞モデルを確立するため、新生仔ラット単離培養心筋細胞に対して持続的電気刺激ペーシングシステムである C-Pace EM Culture Stimulation System を用いて種々の条件で頻脈刺激を行った後に培養心筋細胞から RNA を抽出し、ペーシング有無における遺伝子発現の変化について定量 PCR を用いて経時的に検討した。次に、生体内における頻脈刺激による BAG5 遺伝子の発現変化を観察するため、ビーグル犬の右室心尖部にペースメーカーを挿入し、頻拍ペーシング後に採取した左心室組織における遺伝子プロファイルを経時的(ペーシング開始直後、1 週間後、4 週間後、および 6 週間後)に評価した。

【結 果】

新生仔ラット単離培養心筋細胞に対する C-Pace EM Culture Stimulation System を用いた電気刺激ペーシングの条件について、持続期間・刺激頻度・パルス幅や細胞培地などを詳細に検討し最適化を行ったところ、ウシ胎児血清 (10%) を含む細胞培地を用いて培養し、ペーシング出力 8 V・パルス幅 8 msec・刺激頻度 3 Hz の条件での電気刺激を 4 時間継続した培

養心筋細胞において、有意にBAG5遺伝子の発現が上昇することを確認した。また本ペーシング条件下において、NPPB遺伝子の発現上昇も同様に認めた。さらに、最長 6 週間の頻拍ペーシングを行ったビーグル犬の左心室組織において、ペーシング 1 週間後に BAG5 遺伝子発現が一過性に上昇したが、NPPB 遺伝子の有意な発現上昇が観察されたペーシング 4 週間後と 6 週間後には、BAG5 遺伝子の発現がペーシング開始直後と同程度の発現量に戻る事が観察された。

【考 察】

本研究では *in vitro* (培養心筋細胞) および *in vivo* (ビーグル犬の左心室組織) における頻脈刺激に対する BAG5 遺伝子の発現変化を評価した。興味深いことに、ビーグル犬心臓組織を用いた検討において頻拍ペーシング開始 1 週間後に BAG5 遺伝子の発現が一過性に上昇したが、この発現変化は NPPB 遺伝子の発現上昇(ペーシング開始 4 週間後)に先行して観察された。また、頻拍ペーシングを行ったビーグル犬の心機能について右室カテーテル・心エコーを用いた過去の検討では、頻拍ペーシング開始 4 週間以降に心不全が顕在化しており^{4,5)}、今回観察された NPPB 遺伝子の発現変化とタイムコースが一致する。これらの知見から、頻脈誘発性心筋症の発症プロセスにおいて、心不全の顕在化に先行して BAG5 遺伝子の発現が上昇し疾患発症に対して何らかの保護的な役割を果たしている可能性が示唆された。また今回、培養心筋細胞においても電気刺激ペーシングによって NPPB 遺伝子の発現上昇が認められたが、この発現変化が果たして頻脈刺激による不全心の進展を観察しているのか、それとも新生仔ラット単離培養心筋細胞の成熟化としての遺伝子発現プロファイルの変化を単に見ているだけなのかという点については明らかではなく、今後 RNA-seq や ATAC-seq などを用いた詳細な分子メカニズムの検討が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で得られた知見を用いてさらなる研究を進めることで頻脈誘発性心筋症における恒常性維持分子メカニズムの理解、さらには心不全に対する新たな治療ターゲットの開発につながることが期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Hakui H, Kioka H, Miyashita Y, Nishimura S, Matsuoka K, Kato H, et al. Loss-of-function mutations in the co-chaperone protein BAG5 cause dilated cardiomyopathy requiring heart transplantation. *Science Translational Medicine*. 2022; 14(628): eabf3274.
- 2) Hakui H, Kioka H, Sera F, Nakamoto K, Ozu K, Kuramoto Y, et al. Refractory Ventricular Arrhythmias in a Patient With Dilated Cardiomyopathy Caused by a Nonsense Mutation in BAG5. *Circulation Journal*. 2022; 86(12): 2043.
- 3) Arakawa A, Handa N, Ohsawa N, Shida M, Kigawa T, Hayashi F, et al. The C-terminal BAG domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 nucleotide-binding domain for ADP-ATP exchange. *Structure*. 2010; 18: 309-319.
- 4) Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, et al. Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Circulation*. 2009; 119: 2568-2577.
- 5) Asanuma H, Chung H, Ito S, Min KD, Ihara M, Takahama H, et al. AST-120, an Adsorbent of Uremic Toxins, Improves the Pathophysiology of Heart Failure in Conscious Dogs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2019; 33: 277-286.