

機械的刺激による心臓線維化制御機構の解明

所属： 獨協医科大学 先端医科学研究センター

助成対象者：小尾正太郎

概要

線維化を病態とする心臓拡張不全の予後は収縮不全と同様に悪く、生命予後を改善する治療法も十分ではない。予備的研究でタイトジャンクションである CLDN1 が伸展張力の低下を感知して線維化を誘導することを認めた。そこで本研究では、線維芽細胞において CLDN1 が伸展張力を感知して応答する機序を検討した。まず CLDN1 の活性化を検討したところ、CLDN1 は伸展張力を感知すると CLDN1 のリン酸化レベルが変化することが分かった。次に新たな伸展張力応答機構を検討したところ、線維芽細胞は伸展張力を感知してリソソームの機能を制御していることが分かった。さらには、CLDN1 結合蛋白を検討すると、CLDN1 がリソソームの機能を制御する TMEM9 と結合することを確認した。

abstract

Cardiac diastolic dysfunction, the main pathological condition is fibrosis, is bad prognosis as well as contractile dysfunction and we do not have a good enough therapy for improving its life prognosis. We showed that claudin-1 (CLDN1) consisting of tight junction senses lower cyclic stretch and induces fibrosis. In this study the mechanism of sensing and responding cyclic stretch through CLDN1 in fibroblast cells was analyzed. First, when the phosphorylation levels of CLDN1 were studied it showed various changes in response to cyclic stretch. Next, when new mechanism of responding cyclic stretch was investigated fibroblast cells sense cyclic stretch and regulate the lysosome function.

Furthermore, when the binding protein of CLDN1 was studied CLDN1 binds with TMEM9 regulating lysosome.

研究内容

背景

心疾患による死亡数は年間約 23 万人で年々増加しており、そのうち心不全が約 10 万人と原因疾患のうちで一番多い（令和 4 年人口動態統計）。心不全は、心筋細胞を主体とする左室収縮力が低下した収縮不全と、線維芽細胞を主体とした線維化を病態とする拡張不全に分類される。拡張不全は、収縮不全と同等程度の頻度で発症し、心収縮能が保持されているにもかかわらず、その予後は収縮不全と同等に不良であることが近年報告されている。従来 of 心不全研究は収縮不全を対象とし、様々な治療薬が開発されてきたが、現時点では心不全は増加し、予後が不良の心不全患者がいまだに多いのが現状である。このような経緯から拡張不全の研究および治療薬の開発が、今、求められている。

心臓における線維化は、線維芽細胞とその分化形態である筋線維芽細胞が化学的刺激（ホルモン、サイトカイン、神経間伝達物質）や機械的刺激（血流に起因するずり応力や血圧に基づく伸展張力）に応答して産生する細胞外基質の過剰な蓄積に起因し、心不全、不整脈、心筋症などを誘発する。予備的研究で、ヒト心臓由来の筋線維芽細胞に定量的な伸展張力を負荷すると、線維化のマーカー蛋白の発現が減少し、増殖能と遊走能といった細胞活性が低下した。また、外科手術患者由来の左心耳を用いて伸展張力に応答する遺伝子と線維化のマーカーである *Col1A1* 遺伝子との相関を検討すると、タイトジャンクションを形成する *CLDN1* が心臓の線維化と強く相関していた。さらには *CLDN1* のノックダウン実験より、*CLDN1* が伸展張力の低下を感知して線維芽細胞を分化させることが分かった。

目的

線維芽細胞において *CLDN1* が伸展張力を感知して応答する機序を解明する。

方法、結果および今後の方針

① *CLDN1* が伸展張力を感知して *CLDN1* のリン酸化に及ぼす効果の検討

心臓拡張不全においてリン酸化異常を認めることが報告されている（Schechter MA, 2014, Schiattarella GG, 2019）。また、腎不全の原因として *CLDN* の遺伝子変異、特にリ

ン酸化異常が多数報告されている (Ahmad W, 2011, Shiomi R, 2015)。以上の知見より CLDN1 のリン酸化異常が心臓拡張不全 (線維化) を誘導するという仮説を立てた。

そこで、伸展張力負荷装置を用いて心臓由来の培養筋線維芽細胞に定量的な伸展張力を負荷した後に蛋白を精製し、Phos-tag を用いてウェスタンブロッティングをし、リン酸化 CLDN1 を分離した。その結果、伸展張力によりリン酸化レベルが異なるリン酸化部位を同定した。一方、マウス心臓拡張不全 (線維化) モデル由来の心臓を用いてリン酸化 CLDN1 を分離すると、拡張不全によりリン酸化レベルが異なるリン酸化部位を同定した。以上の結果より、CLDN1 が伸展張力を感知すると、CLDN1 のリン酸化レベルが変化して線維化を制御していることが分かった。 今後は、伸展張力特異的および拡張不全特異的 CLDN1 リン酸化部位を質量分析計を用いて同定していく。

② 新たな伸展張力応答機構の解明

siRNA を用いて培養筋線維芽細胞の CLDN1 をノックダウンして遺伝子の網羅的発現変化を RNA シークエンスで検討したところ、27628 遺伝子のうち 7660 遺伝子が有意に 2 倍以上発現変化した。GSEA (gene set enrichment analysis) によるアノテーションではリソソームのシグナルが関与していた。そこでリソソームのマーカーである Lamp2 とマスター因子 (転写因子) である TFEB の蛋白発現レベルをウェスタンブロッティングで検討すると、伸展張力によりいずれも発現が有意に低下した。また、TFEB の転写活性に関してルシフェラーゼアッセイで検討したところ、伸展張力により TFEB の転写活性は減少した。さらには、リソソーム量を Lyso Tracker を用いて、リソソームの機能としてリソソーム内の pH を pH Lys Red を用いて免疫染色で検討すると、伸展張力によりリソソーム内の pH (pH Lys Red/ Lyso Tracker) は低下していた。同時にリソソームの量と質 (pH) をそれぞれ Lyso Prime Deep Red および pH Lys Green を用いてフローサイトメトリーで定量すると、リソソームの量と質ともに伸展張力で低下していた。以上の結果より、筋線維芽細胞は伸展張力を感知してリソソームの機能を制御していることが新たに分かった。 このリソソーム制御機能として CLDN1 の関与が予想された。今後は、CLDN1 がリソソームを制御しているかどうか、ノックダウン実験で検討していく。

③ CLDN1 結合蛋白の同定

先行研究で TMEM9 に結合する蛋白を質量分析計で網羅的に検討したところ CLDN1 が同定されている (Luck K, 2020)。ここで TMEM9 はリソソームでプロレニンレセプターである ATP6AP2 に結合すると、ATP6AP2 を活性化させて細胞質内からリソソーム内に水

素イオンを輸送させる。そこで、まず GST 融合 CLDN1 蛋白を作成し、CBB 染色及びウェスタンブロッティングで CLDN1 蛋白を確認した。また TMEM9 を HEK293T 細胞に過剰発現させてウェスタンブロッティングで TMEM9 蛋白の発現を確認した。次に、プルダウンアッセイを用いて GST 融合 CLDN1 蛋白と TMEM9 蛋白の結合を検討すると、両蛋白の結合を確認した。以上の結果より、CLDN1 がリソソームの機能を制御する TMEM9 と結合することを新たに確認した。 今後は、CLDN1 が TMEM9 を介してリソソームの機能を制御しているのかどうか、CLDN1 のノックダウン実験で検討していく。また、TMEM9 のリソソーム機能がどのように線維化制御に関連するのかも TMEM9 のノックダウン実験で検討する。

引用文献

1. Schechter MA, Hsieh MK, Njoroge LW, Thompson JW, Soderblom EJ, Feger BJ, Troupes CD, Hershberger KA, Ilkayeva OR, Nagel WL, Landinez GP, Shah KM, Burns VA, Santacruz L, Hirschey MD, Foster MW, Milano CA, Moseley MA, Piacentino V 3rd, Bowles DE. Phosphoproteomic profiling of human myocardial tissues distinguishes ischemic from non-ischemic end stage heart failure. *PLoS One* **9(8)**: e104157, 2014.
2. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* **568(7752)**: 351-356, 2019.
3. Ahmad W, Shabbiri K, Ijaz B, Asad S, Sarwar MT, Gull S, Kausar H, Fouzia K, Shahid I, and Hassan S. Claudin-1 required for HCV virus entry has high potential for phosphorylation and O-glycosylation. *Virology* **8**: 229, 2011.
4. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, and Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci. Rep* **5**, 13262, 2015
5. Luck K et al. A reference map of the human binary protein interactome. *Nature* **580(7803)**: 402-408, 2020.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

なし

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

なし

[その他]

なし

今後順次発表していく予定。