

# 核酸認識機構を介した心筋細胞老化と心不全発症機序の解明

自治医科大学分子病態治療研究センター

講師 東邦 康智

(共同研究者)

徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学

教授 佐田 政隆

自治医科大学分子病態治療研究センター

教授 松村 貴由

北里大学医学部小児科学

准教授 平田 陽一郎

## はじめに

心不全はあらゆる心疾患に伴う心臓の構造的機能的変化(心リモデリング)の終末像であり、血液を送り出すポンプ機能が低下した状態である。心不全は死亡率が高く、認知機能や活動度の低下につながるため、その発症機序の解明と新規治療法の開発が急務である。

心不全は加齢関連疾患の一つである。加齢関連疾患の病態には細胞老化が寄与する。「老化細胞」は「不可逆的に細胞周期が停止した老化関連分泌形質(SASP)因子を分泌する生細胞」であり、細胞老化の原因はDNA損傷とされる。SASP因子は炎症性サイトカイン等で構成され、新たな心筋細胞老化(老化の伝播)や心不全を引き起こすが、その詳細な機序は不明である。

炎症シグナルは心リモデリングを引き起こす。我々は病的ストレスが心臓で炎症を引き起こす機序と心リモデリングにおける炎症シグナルの役割を解明した<sup>(1-3)</sup>。心負荷は炎症性転写因子NF- $\kappa$ Bを活性化する。その結果産生される炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ は代償性心肥大に必須であるが、持続的な炎症シグナル活性化は心不全を引き起こす。興味深いことに、心筋細胞での酸化ストレス産生やミトコンドリアDNA障害には炎症シグナルが必要であることを発見した。しかし、炎症シグナルが代償性心肥大から心不全への移行を引き起こす機序は不明である。

我々は、ゲノム・スケールのCRISPR表現型スクリーニングにより、その抑制が心筋細胞保護的に作用する因子としてDDX41を同定した。DDX41はmRNAスプライシングやrRNAプロセッシングによる翻訳効率の変化及びR-loop構造の解除に寄与するRNAヘリカーゼである。R-loop構造はDNA:RNAハイブリッドと非鋳型一本鎖DNAで構成され、その形成部位はDNA損傷を受けやすい。また、DDX41は二重鎖DNAのセンサーでもあり、その下流のDNAセンサーであるSTINGを介してウィルス由来DNAやミトコンドリアDNAを感知して炎症を惹起する<sup>(4)</sup>。

本研究の目的は、DDX41と核酸との双方向性相互作用を「核酸認識機構」と位置づけ、核酸認識機構を介した心筋細胞老化促進と老化伝播のメカニズムを解明することである。

DDX41による心筋細胞老化促進機構とDDX41の機能制御機構を解明し、それに付随する間質細胞の変化とその媒体因子を明らかにする。そして、臓器障害性老化細胞または炎症シグナルに特異的な心不全治療を開発する。

## 結 果

### ① 不全心におけるDDX41の発現の検討

心不全の病態生理におけるDDX41の役割を明らかにするため、まず不全心におけるDDX41の発現の検討を行った。その検討には、ヒト小児及びマウスの不全心組織検体を用いた定量的PCR、及び成人のヒト不全心における遺伝子発現データベース (GSE116250) の解析を行った。また、マウス圧負荷不全心を用いて、たんぱく質発現の検討を行った。

ヒト小児及び成人の不全心ともに、コントロール群と比較してDdx41 mRNAの発現が増加していた。マウス圧負荷心不全モデルでは、圧負荷後の代償性心肥大期にはDdx41 mRNAの有意な発現上昇は認めなかったが、心不全期には発現が増加していた(図1)。

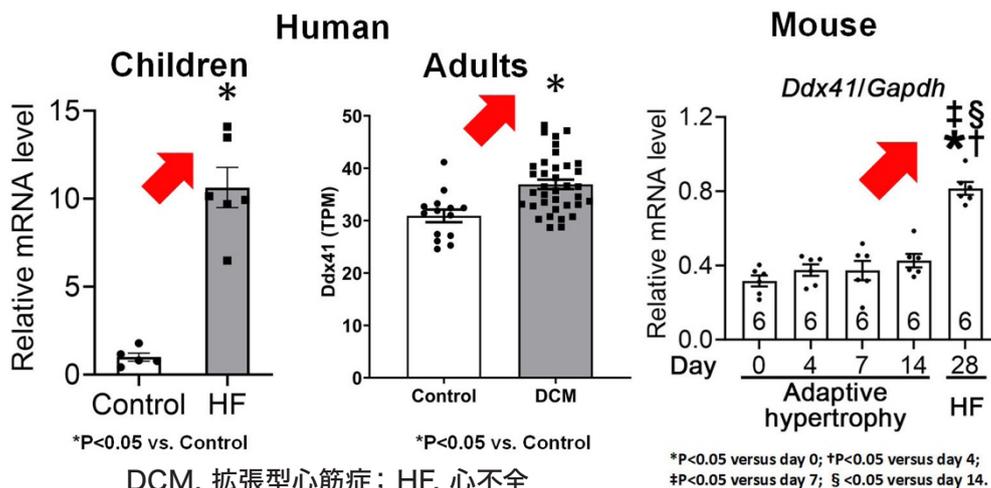


図1 ヒト及びマウス不全心におけるDDX41 mRNAの発現

マウス心組織におけるDDX41蛋白質発現の検討では、可溶性核分画及び細胞質分画ともにDDX41の発現が増加していた(図2)。なお、核移行シグナルはDDX41のfull-length isoformのN末端側に存在しているが、実際、同isoformは可溶性核分画においてのみ検出された。

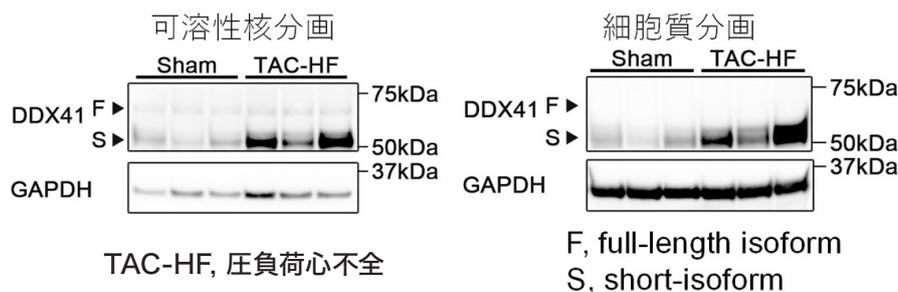


図2 不全心におけるDDX41蛋白質発現

以上より、不全心においてDDX41発現がmRNA及び蛋白質の両方のレベルで増加していることが明らかとなった。

## ② 心臓におけるDDX41の機能解析

DDX41の心臓における機能を明らかにするため、心筋細胞特異的DDX41過剰発現(TG)マウスを作成し、その心臓表現型を野生型(WT)マウスと比較した。TGマウスに圧負荷を加えると、その後の死亡率が増加した。心エコーによる評価では、収縮能と心拡大が悪化しており、DDX41の過剰発現により心リモデリングが増悪することが明らかとなった(図3)。

マウスの心臓組織検体を用いたトランスクリプトーム解析では、DDX41の過剰発現により、心筋収縮関連遺伝子の発現が低下し、炎症関連遺伝子の発現が増加していることが分かった(図4)。



図3 心筋細胞特異的DDX41過剰発現マウスの表現型

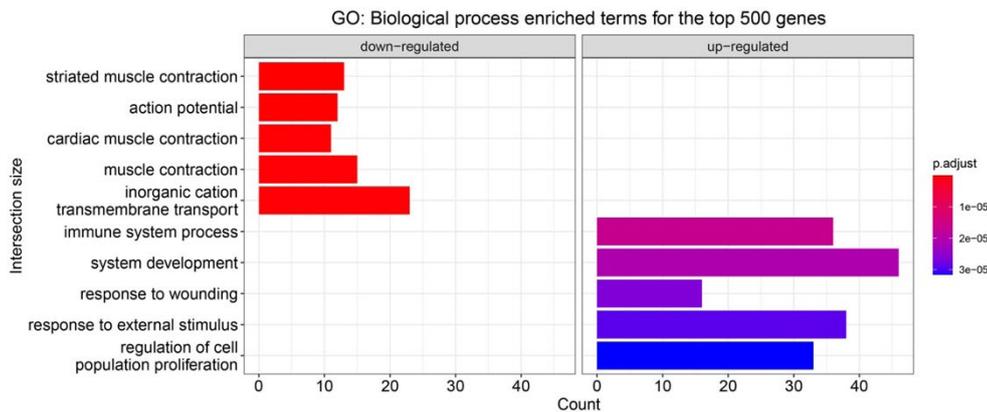


図4 マウス不全心のトランスクリプトーム解析

心不全の病態には、ミトコンドリア機能障害とDNA損傷が寄与する。ラット新生仔由来心筋細胞を用いた検討により、DDX41の過剰発現によりミトコンドリア膜電位が障害され、DDX41の発現抑制により改善することが分かった(図5A)。さらに、DDX41の発現抑制によりドキシソルビシン負荷によるDNA損傷が軽減されることが明らかとなった(図5B)。

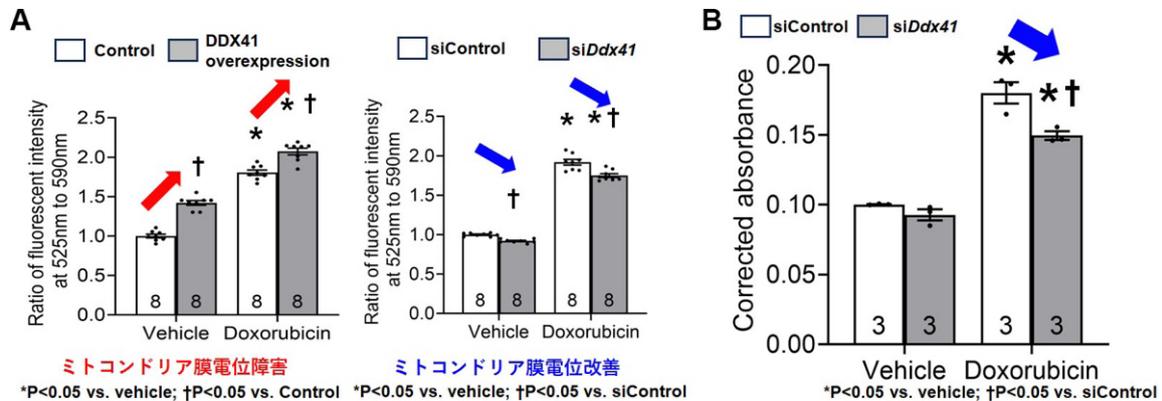


図5 DDX41とミトコンドリア機能及びDNA損傷の解析

以上より、DDX41は炎症シグナルの活性化とミトコンドリア機能障害及びDNA損傷の促進により心筋細胞老化を引き起こして、心不全を悪化させることが示唆される。

### ③ DDX41による遺伝子発現への影響の検討

DDX41はRNA代謝やスプライシングに寄与して、遺伝子発現を変化させる。心筋細胞におけるDDX41を介した遺伝子発現変化を明らかにするため、DDX41を過剰発現したラット新生仔由来心筋細胞におけるトランスクリプトーム解析(RNA-seq)及び結合標的RNA解析(RIP-seq)を行った(図6)。その結果、DDX41は代謝や炎症関連遺伝子のRNAに結合して発現を増加させることが分かった。

また、RNAスプライシングの検討により、DDX41が心筋細胞収縮に重要な役割を果たすBin1遺伝子のスプライシングに寄与することを明らかにした。

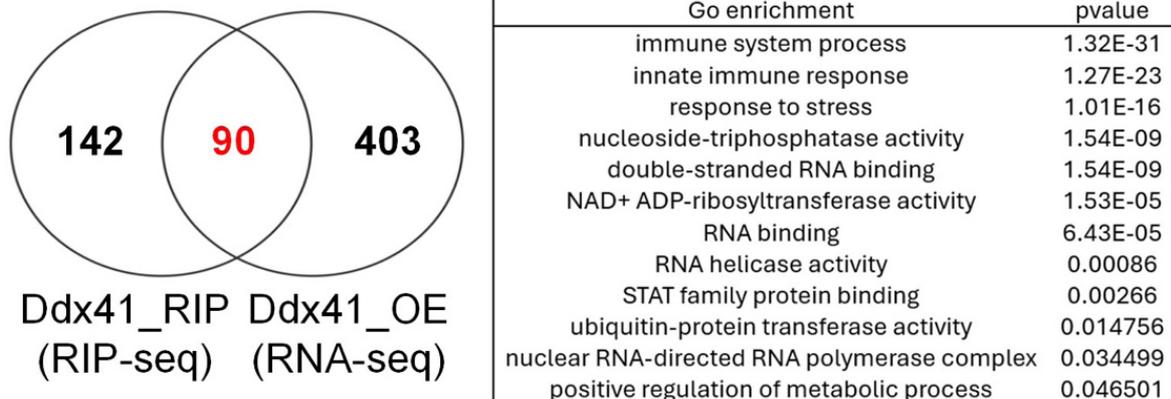


図6 DDX41によるRNA代謝への影響

以上より、DDX41は心筋細胞におけるRNA代謝を変容させて、心筋細胞の代謝と収縮能や炎症シグナル活性を変化させることを明らかにした。

#### ④ DDX41の結合蛋白質の検討

DDX41の機能修飾機構及びRNA代謝を介さない機能の評価のため、結合標的蛋白質の解析を行った。DDX41を過剰発現させたラット新生仔由来心筋細胞を用いた質量分析により、DDX41がスプライソソーム、プロテアソーム分解やエネルギー代謝に関連する蛋白質との結合に加えて、エクソソーム関連蛋白質とも結合することを明らかにした(図7)。

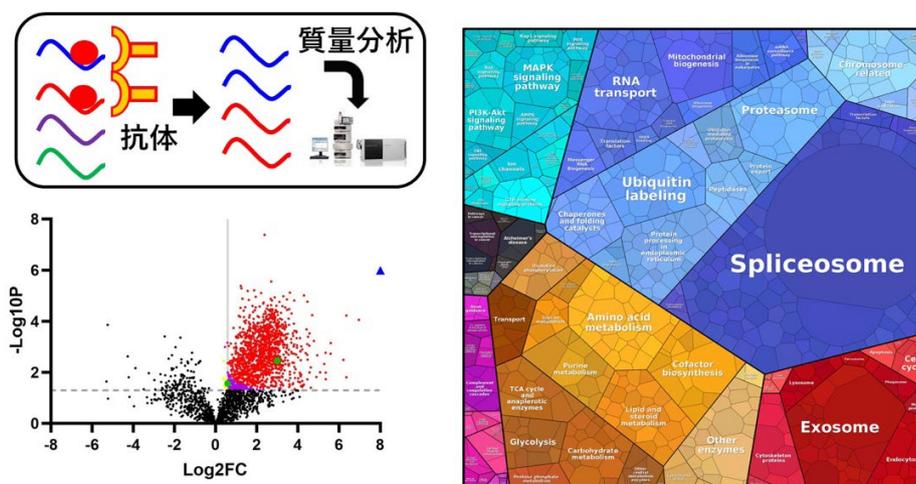


図7 DDX41の結合標的蛋白質の解析

以上より、DDX41の機能発現におけるRNA、たんぱく質及びエネルギーの代謝に関連する蛋白質との相互作用の重要性が示唆される。また、DDX41はエクソソームを介した心筋細胞老化の伝播にも寄与する可能性があることが分かった。

#### 考 察

本研究では、DDX41がRNA代謝及び蛋白質相互作用を介して、心筋細胞の炎症シグナルや代謝を変容させ、DNA損傷及びミトコンドリア機能障害を引き起こすことを明らかにした。その結果、心筋細胞老化及びそれに付随する収縮能障害が生じ、心不全に至ると考えられる。

以上の機序において、①DDX41による炎症シグナル変容がDNA損傷とミトコンドリア機能障害を引き起こす機序、②DDX41が心不全期に発現増加する機序、③DDX41のR-loop形成における役割、④DDX41とエクソソーム分泌との関係、が不明である。①については、我々はその機序に寄与する炎症関連転写調節因子を同定し、DDX41がRNA代謝を介して同因子の発現を調節することを明らかにした(論文投稿中)。②、③及び④につい

ては、実験系を確立して、オミックス解析による解明を現在進めている。それらの結果を統合することで、核酸認識機構を介した心筋細胞老化とその伝播メカニズムを、セントラルドグマ全体のシステム変容の中に位置づけることができると考える。

## 要 約

心不全は加齢関連疾患の一つであり、その機序に心筋細胞老化とその伝播が寄与する。細胞老化はDNA損傷と炎症性サイトカイン等を中心とする老化関連分泌形質 (SASP) 因子の分泌を特徴とするが、心筋細胞老化の機序は不明である。我々はその鍵因子としてDDX41を同定した。DDX41はRNAやDNA等の核酸を認識する分子である。我々はDDX41がヒトやマウスの不全心で発現が増加しており、マウス心筋細胞での過剰発現により圧負荷心不全が悪化することを明らかにした。また、DDX41の過剰発現はミトコンドリア機能障害とDNA損傷を助長し、その抑制はそれらの障害を改善することを見出した。さらに、DDX41は様々なmRNAと結合しそのRNA代謝を変容させることで、心筋細胞の炎症シグナルや代謝を変化させることを明らかにした。興味深いことに、DDX41はエクソソーム関連蛋白質とも結合することを見出した。DDX41と老化伝播機構との関連が示唆される。

## 文 献

1. Yasutomi Higashikuni, Wenhao Liu, Genri Numata, Kimie Tanaka, Daiju Fukuda, Yu Tanaka, Yoichiro Hirata, Teruhiko Imamura, Eiki Takimoto, Issei Komuro, Masataka Sata : NLRP3 Inflammasome Activation Through Heart-Brain Interaction Initiates Cardiac Inflammation and Hypertrophy During Pressure Overload, *Circulation*, 147 : 338-355, 2023。
2. Shun Nakamura , Genri Numata, Toshihiro Yamaguchi, Hiroyuki Tokiwa, Yasutomi Higashikuni, Seitaro Nomura, Tetsuo Sasano, Eiki Takimoto, Issei Komuro : Endoplasmic reticulum stress-activated nuclear factor-kappa B signaling pathway induces the upregulation of cardiomyocyte dopamine D1 receptor in heart failure, *Biochem Biophys Res Commun*, 637 : 247-253, 2022。
3. Yasutomi Higashikuni, Kimie Tanaka, Megumi Kato, Osamu Nureki, Yasunobu Hirata, Ryozo Nagai, Issei Komuro, Masataka Sata : Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 $\beta$  upregulation via nuclear factor  $\kappa$ B activation, *J Am Heart Assoc*, 2 : e000267, 2013。
4. Phuong Tran Pham, Daiju Fukuda, Sachiko Nishimoto, Joo-Ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Yutaka Takahashi, Tomohito Sato, Kimie Tanaka, Kumiko Suto, Yutaka Kawabata, Koji Yamaguchi, Shusuke Yagi, Kenya Kusunose, Hirotsugu Yamada, Takeshi Soeki, Tetsuzo Wakatsuki, Kenji Shimada, Yasuhisa Kanematsu, Yasushi Takagi, Michio Shimabukuro, Mitsutoshi Setou, Glen N Barber, Masataka Sata : STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and

- chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases, *Eur Heart J*, 42 : 4336-4348, 2021。
5. Yasutomi Higashikuni, Colin Platt, Margaret H Hastings, William C W Chen, Justin R B Guerra, Takeshi Tokuyama, Fuad Gandhi Torizal, Wenhao Liu, Takumi Obana, Abraham L Bayer, Hannah Whipple, Alexandra Kuznetsov, Ashish Yeri, Cole Turissini, Robert R Kitchen, Kota Shibayama, Takayoshi Matsumura, Norihiko Takeda, Hideki Uosaki, Aarti H Asnani, Timothy K Lu, Anthony Rosenzweig : Mitigation of Doxorubicin Cardiotoxicity With Synergistic miRNA Combinations Identified Using Combinatorial Genetics en masse (CombiGEM), *JACC CardioOncology*, 7 : 396-410, 2025。