

# 心不全の新規標的分子探索と FITM1 および FITM2 の機能検証

2019年 1月

西濱 夏海

# 心不全の新規標的分子探索と FITM1 および FITM2 の機能検証

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士(農学)学位論文

西濱 夏海

## 略語

ACTB:  $\beta$ -actin

aRNA: amplified RNA

BiP (HSPA5/GPR78): heat shock protein family A (Hsp70) member 5

BW: body weight 体重

CCDC47: coiled-coil domain containing 47

CCDC51: coiled-coil domain containing 51

CCDC90b: coiled-coil domain containing 90B

CE-TOFMS: capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry

CHOP (DDIT3): DNA damage inducible transcript 3

COA3: cytochrome c oxidase assembly factor 3

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EF: Ejection fraction 駆出率

Ero1-L $\alpha$ : endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha

ER: endoplasmic reticulum, 小胞体

FITM1: Fat storage-inducing transmembrane protein 1

FITM2: Fat storage-inducing transmembrane protein 2

HF: heart failure, 心不全

IRE1a (ERN1): endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1

IVT: *in vitro* transcription

KO: knockout, ノックアウト

LD: lipid droplet, 脂肪滴

LVDd: left ventricular end-diastolic diameter (dimension)、左室拡張終(末)期径

LVDs: left ventricular end-systolic diameter (dimension)、左室収縮終(末)期径

MI: myocardial infarction

MINOS1: mitochondrial inner membrane organizing system 1

MMgT1/Mmgt1: membrane magnesium transporter 1

MO: morpholino

MYC: myelocytomatosis oncogene

PDI: protein disulfide isomerase

PBS: phosphate-buffered saline

PERK: PRKR-like endoplasmic reticulum kinase

Ppia: peptidylprolyl isomerase A

PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

RyR2: Ryanodine Receptor 2, リアノジン受容体 2

SERCA2a: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a,

心筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a

Sham マウス: 偽手術マウス

SLC12A4: solute carrier family 12 member 4

SLC25A35: solute carrier family 25 member 35

SR: sarcoplasmic reticulum, 筋小胞体

TAC: transverse aortic constriction

Tbp: TATA-box binding protein

TIMM21: translocase of inner mitochondrial membrane 21

Tmem38A: transmembrane protein 38A

Tmem38B: transmembrane protein 38B

Tmem242: transmembrane protein 242

UPR: unfolded protein response, 小胞体ストレス応答

WT: wild type、野生型

# 目次

第1章 序論	1
第2章 心不全の新規標的分子探索	
1. イントロダクション	3
2. 材料と方法	5
3. 結果と考察	11
4. 小括	15
第3章 Fat storage-inducing transmembrane protein の <i>in vitro</i> 機能解析	
1. イントロダクション	23
2. 材料と方法	24
3. 結果と考察	28
4. 小括	31
第4章 Fat storage-inducing transmembrane protein の心臓における機能解析	
1. イントロダクション	39
2. 材料と方法	40
3. 結果と考察	42
4. 小括	46
第5章 総括と総合考察	61
謝辞	64
引用文献	65

# 第 1 章

## 序論

心疾患は、日本における死亡者総数の 15.1%を占める疾患であり、世界 10 大死因として認知されている[1]。さらに、その患者数は社会の高齢化に伴い増大を続けており、将来的に世界のヘルスケアシステムに対し影響を与えることが予想されている[2-4]。心不全とは、心臓のポンプ機能が低下し、組織に十分な血液を送達することができない状態を指す。これまで心不全治療薬として、 $\beta$  遮断薬、アンジオテンシン転換酵素阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテンシン受容体・ネプライシン阻害薬、 $I_f$  チャンネル阻害薬が上市されてきた。これらの治療薬は患者の生存期間の延長、死亡率改善に効果を示しているが、5 年生存率は依然として 50%以下と低値である[5-7]。また、現在の治療薬は、主として心不全の症状を改善する薬剤であり、疾患メカニズムを標的とする薬剤は未だ上市されていない。このことから、新規作用に基づく心不全治療薬のニーズは高く、新規創薬標的の探索が必要である。

心臓は、平滑筋細胞、ペースメーカー細胞、内皮細胞、心外膜細胞、心臓線維芽細胞、心筋細胞の 6 種の異なる細胞により構成されている[8]。このうち、心筋細胞の機能不全が心不全を引き起こすことが知られており、特に、細胞内小器官である Sarcoplasmic Reticulum (SR、筋小胞体)の機能低下が主たる原因の 1 つと考えられている。SR は心筋細胞において、カルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )の貯蔵を担っており、 $Ca^{2+}$ の細胞質への放出・SR 内への流入を通じ、筋フィラメントの収縮・弛緩を制御している[9, 10]。病態時の心筋細胞では、SR の  $Ca^{2+}$ ハンドリングが障害され、収縮不全、拡張不全が観察される[11-13]。したがって、SR を標的とすることにより、収縮期ならびに拡張期の心機能を改善できる可能性が考えられる。

他方、近年、Endoplasmic Reticulum(ER、小胞体)が心不全の病態に関与することが報告された[14, 15]。ER は様々な細胞において、膜タンパク質および分泌タンパク質の合成、タンパク質フォールディング、脂肪合成、 $Ca^{2+}$ ホメオスタシスの制御を担う器官である[16-19]。ER

の機能が損なわれると、正常な高次構造へとフォールディングされなかったタンパク質が細胞内に蓄積する。細胞内では、この異常タンパク質の蓄積による細胞機能障害に対し、小胞体ストレス応答(ER ストレス応答/Unfolded Protein Response (UPR))と呼ばれる反応が起こる。しかし、異常タンパク質の蓄積が継続した場合、細胞死が誘導される。心肥大、心不全、心筋梗塞の動物モデルおよびヒト患者では、UPR 関連遺伝子の発現が上昇していることから、ER ストレス・UPR 関連パスウェイの制御が病態を改善する可能性が示唆されている [14, 15, 20-26]。

そこで本研究では、心不全における SR および ER に焦点をあて、オミックス解析、動物モデルを活用することにより、新規創薬標的の探索および標的分子の機能解析を行った。第 2 章において、圧負荷心不全モデル(Transverse Aortic Constriction[TAC]モデル)マウスの心臓、sham マウスの心臓 SR/ER に発現している検出可能なタンパク質をプロテオミクス手法で網羅的に同定し、文献情報、圧負荷心不全/心筋梗塞心不全モデル(Myocardial Infarction [MI]モデル)マウスの心臓を用いたマイクロアレイ解析情報、組織における遺伝子発現、ゼブラフィッシュを用いたスクリーニング結果を加味し、*Fat storage-inducing transmembrane protein 1 (Fitm1)*と *Fat storage-inducing transmembrane protein 2 (Fitm2)*を解析候補として選定した。引き続き、第 3 章において、マウス組織およびヒト心臓器官における遺伝子発現解析、組換えタンパク質を用いたトリグリセライド(Triglyceride, TG)との結合試験、*FITM1/FITM2* の一過性過剰発現細胞における小胞体ストレスマーカータンパク質量の変動、メタボローム解析を実施し、本分子の *in vitro* における機能を評価した。なお、第 2 章および第 3 章は、論文[27]で公表した研究内容を中心に構成した。また、第 4 章にて、*Fitm1* 遺伝子ノックアウト(KO)マウス、*Fitm2* 遺伝子 KO マウスの作製と解析を実施し、生物個体の心臓における *Fitm* の機能を検証した。

## 第 2 章

# 心不全の新規標的分子探索

### 1. イントロダクション

心不全は、世界 10 大死因と認知されており、その患者数の増大は世界のヘルスケアシステムに対し負の影響を与えることが示唆されている。しかし、心不全患者の 5 年生存率は未だ 50%以下と低値であり、心不全の予後を改善しうる新規薬剤のニーズは高い。そこで、本章では心不全の疾患メカニズムに関与する可能性のある分子を探索し、新規標的候補を見出すことを目的とし、解析を行った。

心不全の代表的なマウスモデルとして、Transverse Aortic Constriction (TAC)モデルと Myocardial Infarction (MI)モデルがある。TAC モデルは、人工的に大動脈狭窄を作製することにより心臓に圧負荷を与え、心拍出量低下、駆出率の低下、左心室の拡張を誘導するモデルである[28]。対して、MI モデルは、心筋梗塞を作製することにより心臓に容量負荷を与え、心臓壁の薄化を伴う心不全を誘導する[28]。

心筋細胞の SR、ER の機能不全が心不全の原因の 1 つと考えられていることから、正常マウスおよび TAC モデルマウスの心臓の SR/ER に発現するタンパク質を、LC-MS/MS 解析にて網羅的に同定した。加えて、原因の異なる心不全病態における遺伝子発現変動を解析するため、TAC モデル・MI モデルを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。オミックス解析で得られたデータに対し、公知情報および文献情報を付加することにより、心臓における機能が不明であり、かつ、膜タンパク質と推定される新規タンパク質をコードする遺伝子を選定し、標的候補リストを作成した。

ゼブラフィッシュを用いたスクリーニングは、個体における遺伝子の機能を、スループットよく簡便に予測できる点で有用である。特に循環器における機能においては、以下の 3 点が利点と言える。1. 循環器に異常が生じても数日間生存可能である、2. 心拍・血流を目視で確認でき

る、3. 循環不全を全身状態から確認できる。モルフォリノオリゴは特定の mRNA に結合することでタンパクの翻訳を阻害し、ノックダウン効果を示す[29]。本研究では、モルフォリノオリゴをゼブラフィッシュ受精卵に移入することにより、候補遺伝子の発生への影響を調べた。

候補分子について、ヒト組織における遺伝子発現量の解析とゼブラフィッシュを用いた解析により絞込みを実施し、最終的に *FITM1*、*FITM2* を選定した。

## 2. 材料と方法

### 実験動物

雄性 7 週齢のマウスを日本 SLC より購入し、湿度 55% (許容範囲 30-70%)、温度 23°C (許容範囲 20-26°C)、12 時間の明暗サイクルの部屋で飼育した。

すべての動物実験は、第一三株式会社研究開発本部動物実験委員会が定める「動物実験に関する細則」に従って実施した。

ゼブラフィッシュを用いた解析はすべて慶應大学にて実施した。野生型のゼブラフィッシュ (RIKEN WT) を用い、照明を明 14 時間、暗 10 時間の周期、飼育水は水道水を活性炭カラムに通して塩素除去したものを、熱帯魚用フィルターマット、多孔質な小石 (炉材) の 2 艘からなる濾過ユニットを循環させ、水温はヒーターで 28 度に保った。稚魚には初期飼料協和 (協和発酵工業) を、成魚には孵化させたブラインシュリンプエッグス (ミヤコ化学) を、1 日に 2 度与え飼育した。

### 動物倫理

本試験は以下の法律およびガイドラインに準拠して実施した。

「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号, 平成 11 年 12 月 22 日改正, 平成 17 年 6 月 22 日一部改正)

「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号, 平成 18 年 4 月 28 日)

「動物実験に関する指針」[(社)日本実験動物学会, 昭和 62 年 5 月 22 日]

### 心不全モデルマウスの作製

9 週齢のマウスに挿管し、イソフルランにより麻酔した。圧負荷による心不全モデル作製のた

めに、正中切開により横行大動脈を露出させ、27G 針を用いて横行大動脈を縮窄することで圧負荷を誘導した。心筋梗塞による心不全モデル作製のために、肋間を切開して胸腔を露出させた後、7-0 シルク糸で左冠動脈を結紮した。それぞれのモデルに対する偽手術マウス(sham マウス)は、それぞれ大動脈狭窄や冠動脈結紮をすることなく、同様の手術方法で作製された。

### マウス左心室サンプルの採取

手術 4-5 週後、15MHz のリニアプローブを用いて経胸的心エコーにより無麻酔下での心機能を測定した。心エコーにより心不全と診断されたマウスを安楽死し、左心室(LV)を摘出した。タンパク質や mRNA は液体窒素で急速凍結された LV 組織より下記方法にて調製した。

### SR タンパク質の調製

大動脈縮窄術(transverse aortic constriction:TAC)処置後 4-5 週の心不全マウスおよび無処置マウスの左心室を 3 個体より採材し混合の後、Endoplasmic Reticulum Enrichment Kit (Novus Biologicals)を用いて SR 画分を抽出した。ネガティブコントロールとして健常マウス 3 個体の肝臓から同様に ER 画分を抽出した。

### 質量分析によるタンパク質の同定

20  $\mu\text{g}$  のタンパク質を SDS-PAGE ゲルに供し、クマシーブリリアントブルー染色を行った。SDS-PAGE ゲルは低分子量側から高分子量側まで 12 のゲル片にスライス後、50%アセトニトリルを含む 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8)にて 30°C、30 分間、2 回の脱染色処理を行った。ゲル片はアセトニトリルで脱水し、遠心エバポレーターにて完全に脱水した。乾燥ゲル片は、6 M グアニジン塩酸、10 mM EDTA および 10 mM dithiothreitol を含む 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8)溶液に浸漬し、ゲル片内のタンパク質は、95°C、5 分間の処理により還元した。ゲル片は 20°C に冷却し 6 M グアニジン塩酸、10 mM EDTA および 50 mM iodoacetamide を含む 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、pH 8 溶液に浸漬しアルキル化処理を行った。ゲル内タンパク質はアセトニトリルで

脱水し、遠心エバポレーターにて完全に乾燥した、乾燥ゲル片を 0.005% n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DM, Nacalai Tesque) および 5 ng/ $\mu$ L trypsin (Modified trypsin, Promega) を含む 20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8) に浸漬し、ゲル内タンパク質を 37°C、12 時間処理し消化した。得られたペプチドを FA/ $\text{H}_2\text{O}$  buffer (0.005% DM を含む 0.05% formic acid) にて 1 回、FA/ACN buffer (0.05% formic acid を含むアセトニトリル) で 2 回、それぞれ 5 分間抽出した。回収した抽出液は 20  $\mu$ L に調製し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) に供した。

サンプルは Stage Tips [30] にて脱塩、濃縮した。まず、ピペットチップ (P200, Rainin) に 0.9 mm 径で 2 片切り抜いた Empore Disk C18 (3M) を挿入した。続いて、Stage Tip を methanol 20  $\mu$ L で活性化、50% アセトニトリル (5% formic acid 含有) でコンディショニング、5% formic acid で平衡化した。サンプル充填後、チップを 5% formic acid で洗浄し、50% アセトニトリル (5% formic acid 含有) 40  $\mu$ L で脱塩ペプチドを溶出した。

解析は、LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) または LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) に Agilent 1100 液体クロマトグラフィーシステム (Flow splitter で流速 200-300 nL/min に調整) を接続し行った。ペプチドの溶出は、Inertsil ODS-3 C18 (3  $\mu$ m, GL Sciences) を充填し内製したエレクトロスプレーイオン化チップカラム (100  $\mu$ m internal diameter  $\times$  150 mm length) にて、5-28% のアセトニトリル濃度勾配を用いて 100 分以上をかけて行った。

各サンプル量は 4  $\mu$ L にて、duplicate で測定を行った。MS/MS データは、IPI mouse Mascot database (Matrix Sciences) を参照検索し、target-decoy approach [31] を用いタンパク質レベル 1% false discovery rate で選定した。タンパク質の定量はスペクトラルカウント法により行った。

## Gene annotation

MS で同定されたタンパク質について、Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) を用いて、アノテーション分類を実施した。また、併せて、膜領域を有するか、SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

で予測した。

## RNA 抽出と Genechip 解析

MI モデルでは Sham 群 3 匹と心不全マウス 4 匹の左心室画分を用いた。TAC モデルでは Sham 群 3 匹と心不全期マウス 3 匹と心肥大期マウス 3 匹の左心室画分を用いた。

心臓を TRIzol でホモジナイズ後、PureLink Micro-to-Midi RNA Kit (invitrogen) を用いて total RNA の精製を行った。同時に PureLink DNase Set (invitrogen) で DNase 処理を行った。RNA のクオリティーは、OD260/280 比が一定以上であることおよび BioiAnalyzer RNA6000 Nano Kit (Agilent) で RIN 値が 7 以上を満たしていることにより担保した。

精製した 250 ng の total RNA を用いて GeneChip 実験を行った。実験操作は GeneChip 実験マニュアル (Affymetrix) に従い、GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix) および GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix) を使用して実施した。まず、total RNA を T7-Oligo(dT)プライマーで逆転写し、double-strand cDNA を合成した。次に 40°C で 16 時間、*in vitro* Transcription 反応を行い、ビオチンラベルした amplified RNA (aRNA) を合成した。合成された 15 µg のビオチン化 aRNA を断片化した後、12.5 µg を GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) に、45°C で 16 時間ハイブリダイズした。洗浄、染色を行った後、GeneChip アレイ上の蛍光を GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) で撮影し、AGCC (Affymetrix GeneChip Command Console) software により CEL ファイル (probe intensity data ファイル) を作成した。その後、Expression Console Software により、各 GeneChip アレイの全 probe set のうち、シグナル値が特に高いもの 2%、低いもの 2% を除いた際の平均値が 150 になるように数値のノーマライズを行い (MAS5)、アレイデータのクオリティーをチェックした。ノーマライズした数値を Expressionist 上で解析した。

## mRNA 発現解析

鋳型として市販 cDNA パネル(Clontech、Biochain)を用い、ABI PRISM にて定法に従い定量 PCR 解析を実施した。使用したプローブ(すべて Applied BioSystems)は下記のとおりである。ヒト組織解析では  $\beta$ -actin で補正した。

*FITM1*: Hs00416856\_g1

*FITM2*: Hs00380930\_m1

*TIMM21* (1700034H14Rik / C18orf55): Hs01003272\_g1

*FAM210A* (4933403F05Rik / C18orf19): Hs00935911\_m1

*SLC12A4*: Hs00957115\_g1

*TMEM242* (5730437N04Rik / C6orf35): Hs00218395\_m1

$\beta$ -actin: 4333762F

#### ゼブラフィッシュ モルフォリノノックダウン法

標的遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ(Gene Tools)を Nasevicius らの方法 [29]に従ってインジェクションした。インジェクションするには、Phenol Red を加え、濃度は 10  $\mu$ M ~ 500  $\mu$ M に調節した。インジェクションには IM-300 電動マイクロインジェクター (NARISHIGE)を用いた。インジェクションするゼブラフィッシュ胚の時期は 1 細胞期で、量は約 1 nL に調節した。インジェクションした胚は、28°Cでインキュベートし、随時観察した。ネガティブコントロールとして、5塩基ミスマッチあるいはコントロールのモルフォリノアンチセンスオリゴを用いた。各遺伝子のノックダウンに使用したモルフォリノの配列は以下に記した。

MO-control: 5'-TTTCAAATTTTGATACGTACGATG-3'

*fitm1*: 5'-CCACAAGGATCGAGTTTAGAAACAT-3'

*fitm1*-5mis: 5'-CCAGAACGATGGACTTTACAAACAT-3'

*fitm2*: 5'-TGCAACGGCAGCAGCCATGTTGTTC-3'

*mmtgt1*: 5'-CACCTTTCCAGAAGGACGAGGCCAT-3'

*mmtgt1*-5mis: 5'-CACGTTTGCACAAGCACCCAGGCCAT-3'

*timm21* (1700034H14Rik): 5'-ATGTCTTGTCTGTTTAAACCAACACAC-3'  
*ccdc51*: 5'-CAGTGTTTGTCTGAACCTCATTGA-3'  
*ccdc51-5mis*: 5'-CACTCTTTCTTCTCAACCTCATTCA-3'  
*fam210a* (4933403F05Rik): 5'-TCCAGAACACACAAACCGCTGCATC-3'  
*fam210a-5mis*: 5'-TCGACAACAGACAAAGCCCTGCATC-3'  
*tmem38a*: 5'-AGGACATCTAACACCTCCATGATGT-3'  
*tmem38b*: 5'-AACACATCCATAACTGAGCCGCTTC-3'  
*minos1* (2310028O11Rik): 5'-GCTCTTTCTCAGACATGATGACAGC-3'  
*ccdc90b*: 5'-GTCTCCGCATAAAGATCCCCCAGGA-3'  
*slc12a4*: 5'-TTTCATGTGTTTAGTGTCGGATCA-3'  
*coa3* (*ccdc56*): 5'-TACTCATGTCTGCCATGTTTGAGGC-3'  
*slc25a35*: 5'-CGACGCCACCGAGAATGAAATCCAT-3'  
*tmem65*: 5'-CAGCAACACCGAGCGGATCATCAGA-3'  
*tmem242* (5730437N04Rik): 5'-GCTCTACTGACATCTGAATAGGTC-3'

### ゼブラフィッシュへの mRNA インジェクション

IMAGE clone (Open Biosystems) を購入し、*FITM1* または *FITM2* のオープンリーディングフレームを PCR により増幅し pCS2+ベクター [32] に導入した。組換えクローンを *NotI* で直線化し、mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) を用いて capped mRNA を合成した。0.8 µg/µL の mRNA を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚にインジェクションし、発生過程を観察した。

### 統計解析

Excel 2010 (マイクロソフト) にて t 検定を用いて  $p$  値を算出し、 $p < 0.05$  を有意な差とみなした。また、多重検定補正した adjusted  $p$ -value を R にて、Benjamini & Hochberg 法 [33] を用いて算出した。

### 3. 結果と考察

#### 質量分析法によるタンパク質の同定

健常マウスの心臓由来 SR、TAC モデルマウス心臓由来 SR および健常マウスの肝臓由来 ER について SDS-PAGE gel electrophoresis を用いた LC-MS/MS 解析 [34]を行い、3,638 個のタンパク質を同定した。心臓、肝臓特異的に同定されたタンパク質はそれぞれ 1,232、824 個であった。このうち TAC モデルにおいて発現上昇あるいは低下しているタンパク質を検索したところ、それぞれ、333 個、163 個であった(図 1)。

同定されたタンパク質の中には、心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a)、リアノジン受容体 2 (RyR2)、Calumin [35]、TRIC-A [36] といった心臓 SR に発現するタンパク質が含まれていた。このことから、プロテオミクス解析により、心臓 SR に発現するタンパク質を同定可能であることが示され、本解析により得られたデータセットの信憑性は高いと判断した。一方で、ミトコンドリアへの局在が予測されたタンパク質も多く含まれていたことから、本研究の手法では、小胞体とミトコンドリアの完全な分画は行えなかったと考えられる。

心不全サンプルにおいて、発現が増加あるいは減少しているタンパク質は 333 個、163 個であり、心不全モデルにおける相対的なタンパク質量変動が小さいことが示された。これは、後述のトランスクリプトーム解析の結果とも矛盾がなかった。

#### マウス心臓のトランスクリプトーム解析

心不全における遺伝子発現変動を解析するため、TAC モデルより心不全および心肥大サンプル、MI モデルより心不全サンプルを用い、マイクロアレイ解析を実施した。

チップ間におけるプレゼントコール率は同等で、 $\beta$ -actin と Gapdh の 5',3'シグナルの差は許容範囲内であったことから、mRNA と cDNA の品質に問題はないと判断した。また、心不全マーカーである Anp ならびに Bnp のシグナルは心不全病態マウスで上昇しており、ピアソンの相

関係数で群内サンプルの相関は高いことから、サンプルの取り違いや実験エラーはないと考えられた。クラスタリングの結果、MI モデルは個体差が少なく Sham 群と心不全群での比較が可能と思われた。一方 TAC モデルは心肥大群に個体差が認められたため、病態により発現変動する遺伝子の抽出には Sham 群と心不全群を比較することとした。

MI、TAC それぞれにおいて 1 例以上でシグナル $>50$ 、valid value  $<0.05$  の遺伝子を解析対象とした(MI では 19,720 プローブセット、TAC では 20,280 プローブセット)。プロテオミクス解析で同定されたタンパク質の約 80%は本解析でも発現が確認された。MI、TAC それぞれにおいて Sham・心不全間で各群の平均シグナル値が 1.5 倍以上異なり(1.5 倍に上昇または 1/1.5 に低下)、群間の T 検定で  $p<0.05$  となる遺伝子を抽出した。それぞれ、MI では 2,608 プローブセット、TAC では 2,168 プローブセットが該当し、MI と TAC(心不全)で共有するプロローブセットは 978 個(MI の 38%、TAC の 45%)であった。

心不全モデル由来サンプルにおいて、心不全マーカーである *Anp* ならびに *Bnp* のシグナルが上昇していたことから、解析により得られたデータセットの信頼性は高いと判断した。

心不全サンプルで 1.5 倍以上の変動を示したプローブは、発現が確認された全プローブの約 1 割(MI 13%、TAC 11%)であった。プロテオミクス解析の結果と同様に、心不全モデルでは、遺伝子発現変動も小さいことが示された。ヒトサンプルを用いたマイクロアレイ解析においても同様に心不全で発現変動を示す遺伝子は少ないことが報告されている[37, 38]。したがって、本結果は妥当であると考えられた。

### 創薬標的候補分子の選定

本研究では、創薬標的候補分子として、SR/ER の機能制御を通じ、心筋細胞に対して作用を示す新規分子を探索した。心筋 SR においては、膜上の SERCA2a が SR への  $Ca^{2+}$  の汲み上げを、RyR2 が放出を担うことが知られている [9]。これらのような膜上のトランスポーターやイオンチャネルを標的にすることにより、SR/ER の機能を制御できる可能性が考えられることから、プロテオミクス解析で同定された 1,232 個の候補タンパク質に対して、Gene Ontology および

SOSUI、TMHMM を用いて、細胞内局在、機能ドメイン、推定膜貫通領域数を調べ、膜タンパク質、トランスポーター、イオンチャネル、カルシウム結合タンパク質としてアノテーション分類されたタンパク質を選定した。加えて、文献・関連特許を調査することにより、心臓における機能が不明であり、かつ、膜タンパク質と推定される新規タンパク質をコードする遺伝子を選定した。このうち、マイクロアレイ解析においても発現を確認し、ゼブラフィッシュで保存されている 22 個の遺伝子を選定した。さらに、22 遺伝子に含まれる *Fitm1* のファミリー遺伝子である *Fitm2* が、ヒト心臓サンプルを用いたプロテオミクス解析で同定された (data not shown) ため、これを追加し、23 の遺伝子リストを解析対象とした。

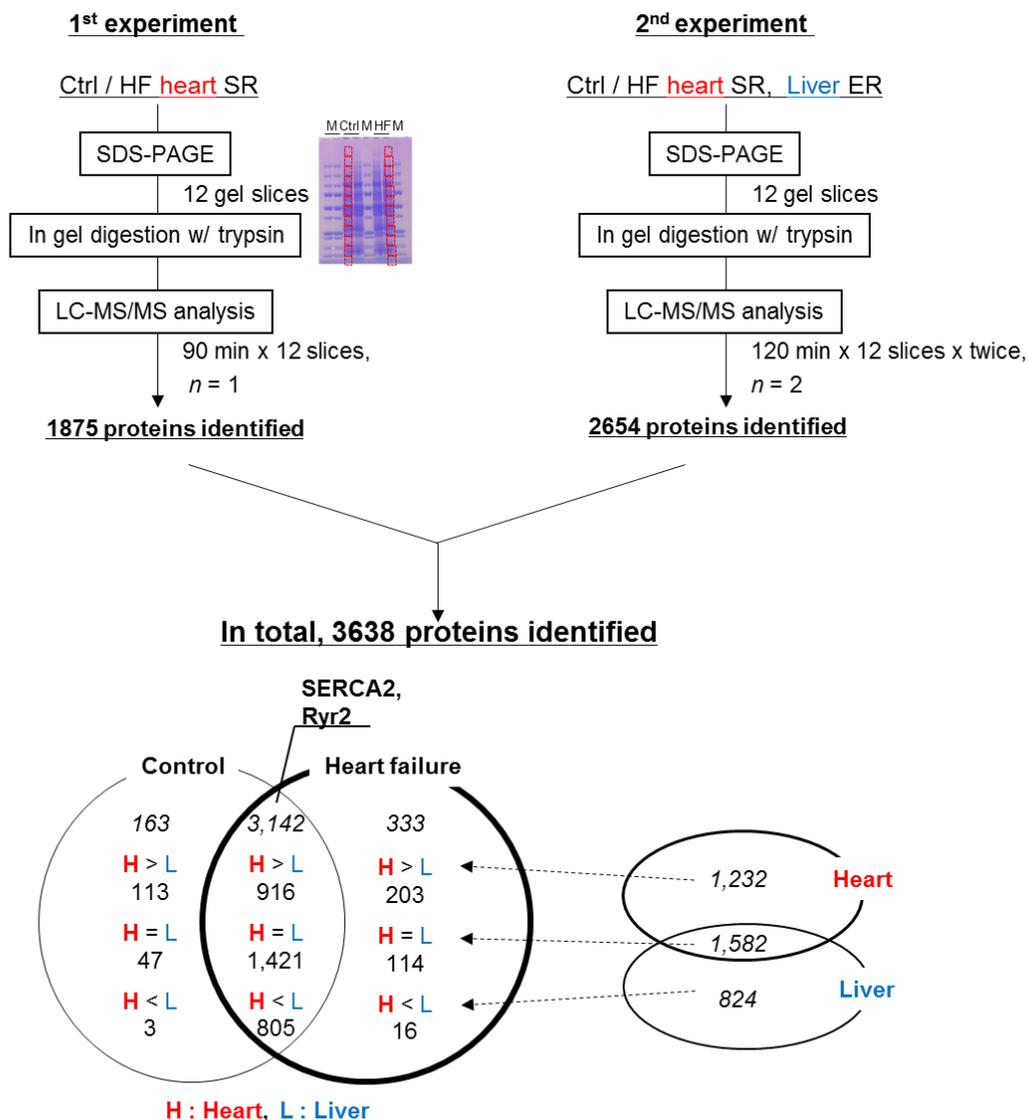
標的選定のため、市販 cDNA パネルを用いたヒト組織における発現分布解析を行い、心臓および骨格筋に特異的に発現する 6 遺伝子 (*FITM1*、*FITM2*、*TIMM21*、*FAM210A*、*TMEM242*、*SLC12A4*) を選定した (図 2、表 1)。組織特異的な発現は、薬剤の作用を標的臓器に強く発現させられるだけでなく、他臓器への副作用を軽減できる可能性が高く、創薬標的として重要な要素である。6 遺伝子について、機能を解析することにより、創薬標的としての妥当性を判断できると考えられる。そこで、本研究では、1 分子で機能することが報告されている *FITM1*、*FITM2* について、第 3 章にて *in vitro* における機能を解析することとした。

また、循環器系への影響を個体レベルで確認するため、慶應大学にてモルフォリノアンチセンスノックダウンにより対象遺伝子の発現を減少させたゼブラフィッシュの表現型を観察・解析した。スクリーニングの結果、10 遺伝子 (*fitm1*、*mmgt1*、*timm21*、*ccdc51*、*minos1*、*fam210a*、*coa3*、*ccdc90b*、*slc25a35*、*tmem242*、*slc12a4*) について、循環器系への影響を確認した。また、*fitm2* は、そのモルフォリノアンチセンスを単独でインジェクションした際には表現型を示さなかったが、*fitm1* モルフォリノアンチセンスと同時にインジェクションすることで、*fitm1* モルフォリノアンチセンスを単独で導入した時と比較し、循環器および骨格形成に強い影響を与えた (図 3)。ヒト *FITM1*、または *FITM2* mRNA をインジェクションした際にも、心臓水腫および骨格形成異常が観察された (図 4)。このことから、ゼブラフィッシュにおいて、*fitm1* と *fitm2* は循環器および骨格形成の発生時に機能している可能性が示唆された。しかしながら、本研究で用いたモルフォ

リノックダウン法では、アーチファクトの可能性を排除しきれない[39]。遺伝学的手法を用いて個体における遺伝子の機能を解析するには、変異体の解析が必要である。そこで、第 4 章において、*Fitm1*、*Fitm2* 両遺伝子のノックアウトマウスを作製し解析することとした。

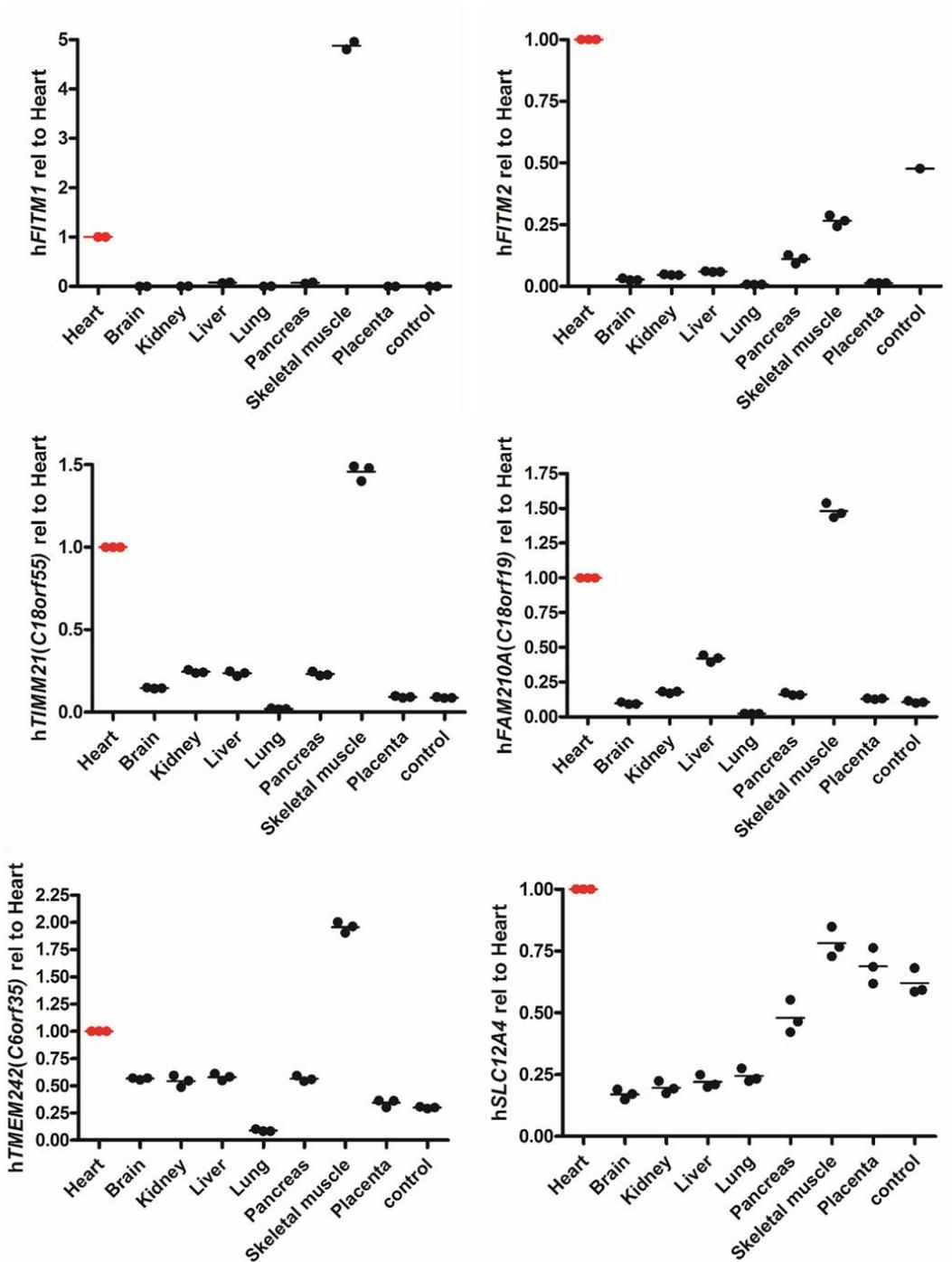
## 4. 小括

本章において、TAC マウスを用いたプロテオミクス解析、TAC マウスと MI マウスを用いたマイクロアレイ解析により、心不全の新規治療標的候補となりうる分子のリストを得た。さらに、このリストから、ヒトにおいて心臓および骨格筋に特異的に発現し、ゼブラフィッシュの発生過程で機能を有する可能性のある分子として、*FITM1*、*FITM2*、*TIMM21*、*FAM210A*、*TMEM242*、*SLC12A4* の 6 遺伝子を選定した。これらの分子は、心臓における機能が不明な膜タンパク質であることから、創薬標的としての妥当性を検証するため、機能解析が必要である。そこで本研究では、1 分子で機能することが報告されている *FITM1*、*FITM2* を最初の解析対象とし、次章以降にて、*in vitro*、*in vivo* における機能を検証することとした。



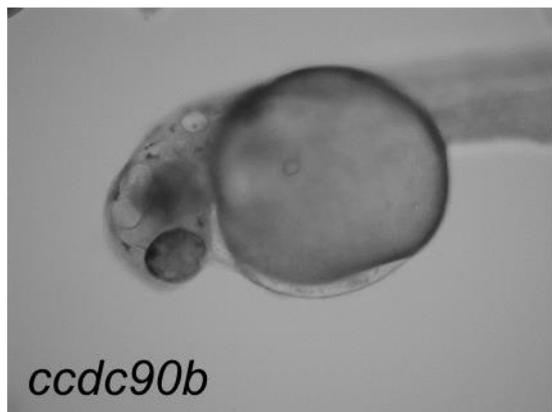
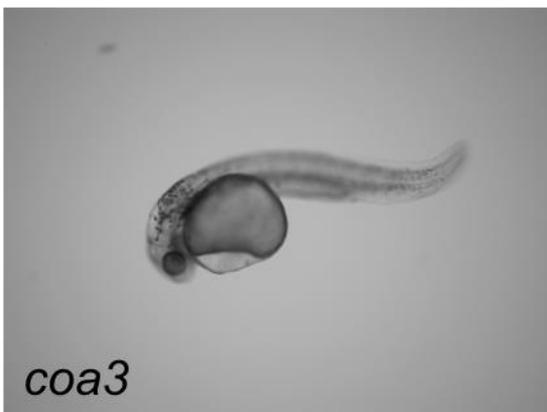
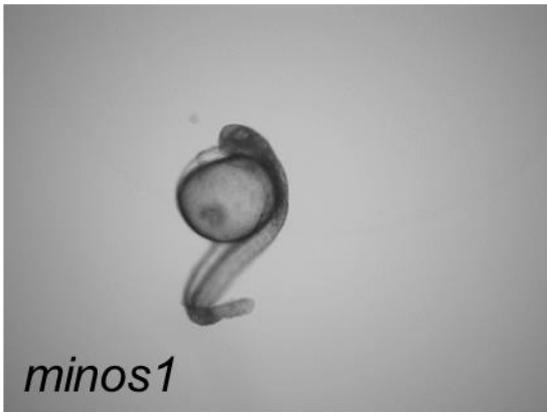
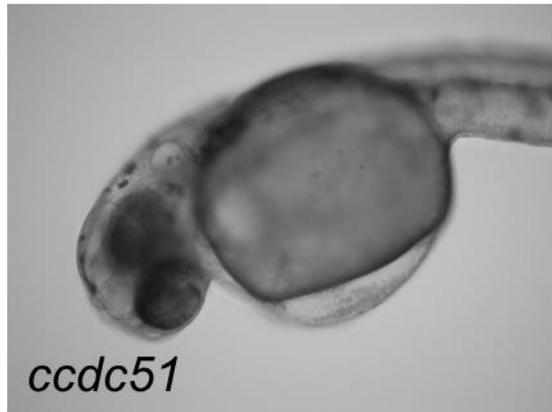
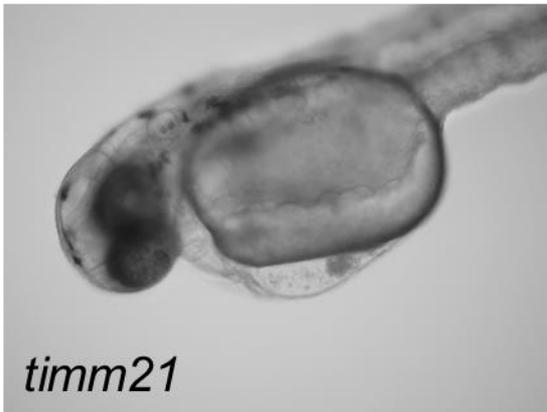
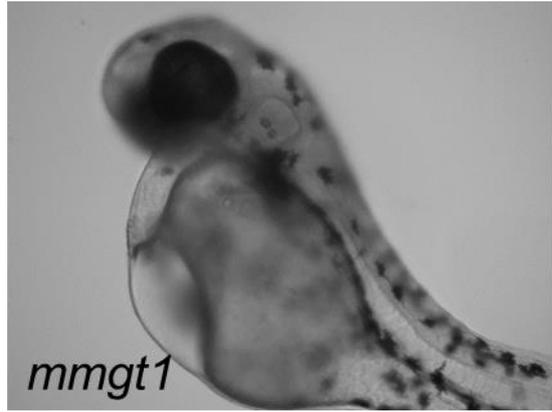
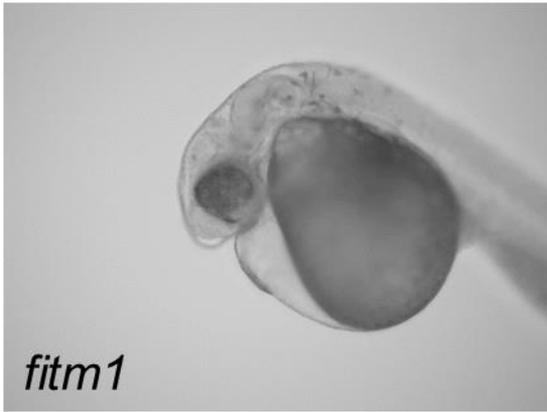
☒ 1. Summary of proteome analysis.

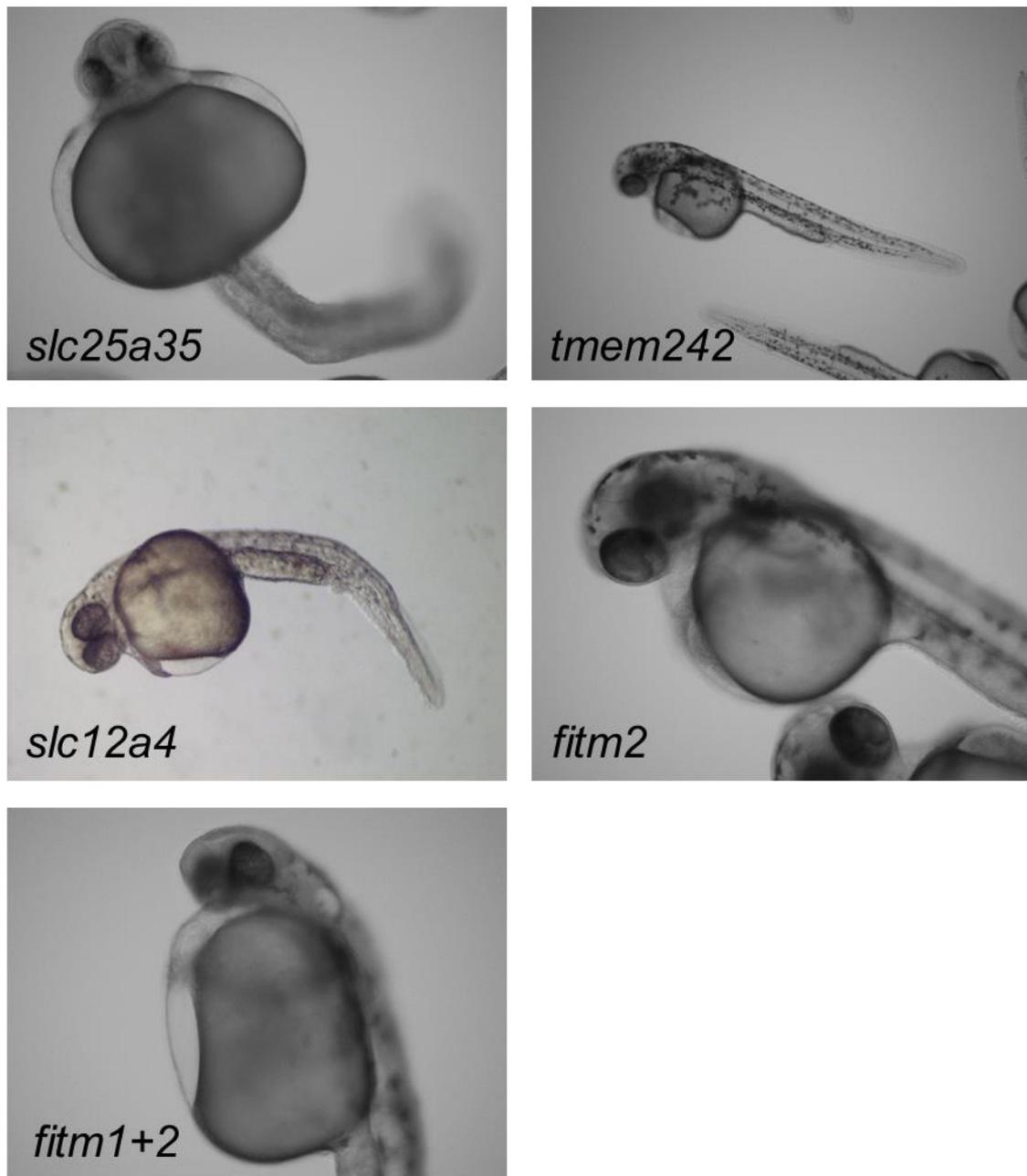
Left panel: Procedure and result of the 1<sup>st</sup> experiment. The LV from TAC (HF) and healthy control (Ctrl) mice were excised and the SR/ER fractions were isolated. Proteins were electrophoretically separated and stained with Coomassie brilliant blue staining. The gel was sliced into 12 pieces from the dye front to the top of the gel. Each slice was analyzed by LC-MS/MS and identified 1,875 proteins. Right panel: Procedure and result of the 2<sup>nd</sup> experiment. In this trial, the LV and liver were used. 2,654 proteins were identified. In total, 3,638 proteins were identified by GeLC-MS/MS. We categorized these proteins by their expression pattern, such as; H (heart) >L (liver): proteins expressed in heart than liver, H=L: proteins which were expressed almost equally in heart and liver, H<L: proteins expressed in liver than heart.



2. Quantitative analysis of mRNA expression in human tissues.

Relative mRNA levels were quantified using the comparative  $\Delta\Delta\text{CT}$  method with an internal control gene ( $\beta$ -actin). Expression levels relative to those of the heart are shown. Each dot represents a replicate (n=2 or 3).





☒ 3. Summary of target gene selection by screening of MO-mediated knockdown in zebrafish.

Injected concentrations of MO, the time point of imaging, and major phenotype were as follows:

*fitm1*, 200  $\mu$ M, 36 h: Edema, Hypertrophy

*mmgt1*, 100  $\mu$ M, 48 h: Growth retardation, Flexural tail

*timm21*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Slow heart rate

*ccdc51*, 100  $\mu$ M, 36h: Growth retardation, Twist stereotactic body, Weak heartbeat

*minos1*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Flexural tail

*fam210a*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Growth retardation, Bloodflow deficiency

*coa3*, 100  $\mu$ M, 36h: Bloodflow deficiency

*ccdc90b*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Bloodflow deficiency

*slc25a35*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Bloodflow deficiency

*tmem242*, 100  $\mu$ M, 36h: Edema, Slow heart rate

*slc12a4*, 200  $\mu$ M, 32 h: Cardiac arrest

*fitm2*, 100  $\mu$ M, 36 h: None

*fitm1+fitm2*, 100  $\mu$ M, 36 h: Edema, Bloodflow deficiency, Slow heart rate

no injection



FITM1



FITM2

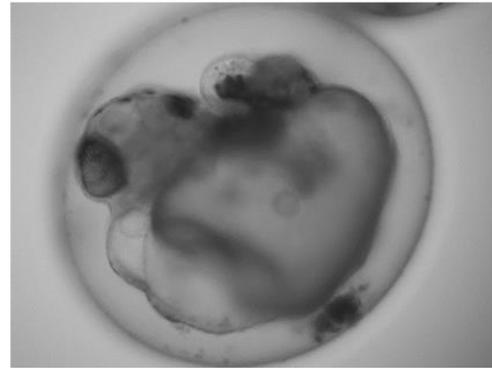


图 4. Human mRNA overexpression of *FITM1* or *FITM2* in zebrafish.

Injected concentrations of synthetic mRNA, the time point of imaging, and major phenotype were as follows:

no injection, 49 h

*FITM1*, 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 49 h: Edema, Flexural tail

*FITM2*, 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 49 h: Skeletal malformation

Symbol	Heart SR MS	Microarray			NCBI Accession #	Amino acids length & Transmembrane Prediction (TMHMM)	Cellular Localization (Prediction)
	Mouse TAC vs. Normal	MI vs. Normal	TAC (heart failure) vs. Normal	TAC (hypertrophy) vs. Normal			
Fitm1	→	0.62	0.58	0.8	NP_081084	292 AA., 6TM	ER
Fitm2	-	0.63	0.63	0.77	NP_775573	262 AA., 6TM	ER
Timm21	→	0.82	0.85	0.9	NP_080245	244 AA., 1TM	Mit
Fam210a	→	0.66	0.8	0.84	NP_722489	273 AA., 1TM	Mit
Tmem242	→	0.89	0.83	0.97	NP_081733	140 AA., 2TM	Mit
Slc12a4	→	1.5	1.07	1.16	NP_033221	1085 AA., 12TM	Mit

表 1. The putative targets from omics analysis, tissue expression pattern, and zebrafish screening.

Summary of selected targets which highly expressed in heart and skeletal muscle from results of MS using mouse heart samples, Gene Chip analysis, quantitative analysis of mRNA expression in human tissues, and zebrafish screening. “Symbol” indicates the gene names. “Heart SR MS” showed the results of proteomics analysis in which arrows indicate the change of expression levels in TAC samples compared with normal samples and a minus sign indicates not detected. In GeneChip columns, the change of expression levels of diseased samples vs. normal samples are shown. NCBI accession numbers of genes (*Mus musculus*) are listed in the middle column. Amino acid length and transmembrane prediction: information on the amino acid length obtained from NCBI and the prediction of transmembrane helices from TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) are indicated. Cellular localization shows the localization in the cell as predicted from NCBI information. ER: endoplasmic reticulum, Mit: mitochondria.

## 第 3 章

# Fat storage-inducing transmembrane protein の *in vitro* 機能解析

### 1. イントロダクション

第2章では、心不全の新規創薬標的候補として、*Fat storage-inducing transmembrane protein* (FITM) が見出された。本章では、その創薬標的としての可能性を評価するため、*in vitro*における機能を解析した。

FITM1、FITM2は細胞内脂肪滴形成に必須の因子であり、FITMの発現量と脂肪滴形成量は相関関係にあると報告されている[40]。そこで、一過性過剰発現細胞を用い、脂肪滴形成に与える影響を検証した。

また、FITMが中性脂肪と直接結合すること、FITMファミリーのコンセンサス配列(3アミノ酸)の変異によって結合力が変動すること、さらに脂肪滴形成能と相関することが2011年に報告された[41]。本報告はFITMのコンフォメーション変化によって脂肪滴形成能が変化しうることを意味しており、低分子による機能制御の可能性が示唆された。そこで、組換えタンパク質とRIラベル・トリグリセライド(TG)の結合を検証した。

さらに、FITM が小胞体膜タンパク質であること、小胞体が TG 合成の場であり脂肪滴形成とも関与していること、第 2 章にて心筋細胞では FITM は SR 膜上に局在する可能性が示唆されたことから、FITM の増減が、ER/SR 機能や心筋細胞の代謝シフトに影響する可能性が予想された。小胞体機能に影響を及ぼすか否か検証するため、小胞体ストレスマーカータンパク質の発現変動をウェスタンブロットで解析した。また、細胞内代謝への影響をメタボローム解析にて解析した。

## 2. 材料と方法

### 細胞培養

*Integrin  $\alpha\beta3$*  導入 HEK293 細胞株(社内保有株)は、10% FBS (Hyclone)を添加した DMEM 培地(Gibco)で培養した。

### mRNA 発現解析

第 2 章と同様の方法で実施した。解析には下記プローブを使用し、内部標準として Peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*)を用いた。

*Fitm1*: Mm01322192\_g1

*Fitm2*: Mm04212060\_m1

*Ppia*: 4326316E / Mm02342429\_g1

### *FITM* 一過性過剰発現細胞における脂肪滴量測定

ヒト *FITM* cDNA がクローン化されたプラスミドは、OriGene から購入した。細胞への *FITM* プラスミドの導入は Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) のプロトコールに基づいて実施した。具体的には、96well plate (Corning) に  $1.6 \times 10^5$  cells/ mL (100  $\mu$ L/well) の密度で細胞を播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 5% 条件で 1 晩培養した。Opti-MEM (Gibco) 25  $\mu$ L と plasmid 2  $\mu$ g、Opti-MEM 25  $\mu$ L と Lipofectamine 2000 Transfection Reagent 0.5  $\mu$ L をそれぞれ混合、室温静置(5分)した。前述の 2 種を混合、室温静置(20分)し、1well あたり 50  $\mu$ L ずつ添加、24 時間または 48 時間培養した。培地を吸引除去し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (WAKO) 100  $\mu$ L を添加、室温静置(15分)、DPBS (Invitrogen) で 3 回洗浄後、1well あたり DPBS 100  $\mu$ L を添加し 4°C にて保存した。DPBS を除去した well に BODIPY 493/503 (Invitrogen) 1  $\mu$ g/mL 100  $\mu$ L を添加、37°C 静置(5分)後、DPBS で 3 回洗浄し、脂肪滴染色を行い、続けて

Hoechst33342 (Invitrogen) で核染色を行った。DPBS に置換した共染色サンプルを蛍光顕微鏡観察または IN Cell Analyzer 1000 (GE healthcare) での解析に供した。IN Cell Analyzer 1000 を用いた解析では、各 well について 500 細胞以上の画像取得を行い(2~4 視野)、Developer (GE healthcare) にて細胞数、脂肪滴数、脂肪滴サイズ(面積)を指標とした解析を行った。

### 組換え型ヒト FITM タンパク質の作製

文献情報 [41] に基づき、第一三共 RD ノバーレ株式会社にてヒト FITM1 およびヒト FITM2 組換えタンパク質を作製した。pEX-Bac1 expression vector を用いて、FIT1-His6-StrepII, FIT2-His6-StrepII を HighFive 細胞に発現させ、細胞培養液から超音波でタンパク質抽出後、Strep-Tactin Superflow Plus (QIAGEN) 引き続き HiLoad16/60 superdex75 (GE Healthcare) を用いて精製した。

### FITM と TG との結合試験

下記、組成のバッファーを使用した。

バッファー1: 50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、0.1%(w/v) Fos-choline13(Anatrace, #F3105GM))

バッファー2: 50mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl

バッファー3: 10mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA、1%(w/v) Triton X-100

バッファー1 100  $\mu$ L 中に、バッファー1 に希釈した 90-150 pmol (3-5  $\mu$ g) の組換えタンパク質、バッファー2 に希釈した 50 nM-1  $\mu$ M [9, 10-3H(N)]-triolein、バッファー1 で予洗済の Strep-tactin macroprep (IBA GmbH) 15-30  $\mu$ L を懸濁し、室温で約 4 時間転倒混和した。反応液を vortex にて攪拌後、バッファー1 で 3 回洗浄し、バッファー3500  $\mu$ L で洗浄後、同バッファー500  $\mu$ L に再懸濁した。懸濁液をハイオニックフロー 10 mL へ添加し、シンチレーションカウンターにて測定した。

### 小胞体ストレスマーカータンパク質の発現解析

*FITM* 一過性過剰発現細胞における脂肪滴量測定と同様に lipofectamine 法で一過性過剰発現細胞を作製した。具体的には、24well plate (Sumilon) に細胞を  $1.6 \times 10^5$  cells/ mL (500  $\mu$ L/well) の密度で播種し、Opti-MEM 50  $\mu$ L と plasmid 0.8  $\mu$ g、Opti-MEM 50  $\mu$ L と lipofectamine 2000 Transfection Reagent 2  $\mu$ L の割合で使用した。何も処理をしていない細胞 (No transfection) および *hFITM1*、*hFITM2*、*hFITM1+hFITM2*、pCMV6-entry (mock) を導入した 5 群について、plasmid 導入後、24 時間後に培地を除去、PBS で洗浄し、 $-80^\circ\text{C}$  に保存した。1well あたり、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) 100  $\mu$ L を添加し、溶解した。溶解液の一部を用いて定法に従い BCA 法にてタンパク質濃度を測定した。残りの溶解液に SDS サンプルバッファー 100  $\mu$ L を添加し、定法に従い SDS-PAGE で分離し、ER Stress Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology Japan)、抗 myc-HRP 抗体 (Invitrogen) を用いたウェスタンブロットティングで検出した。

### メタボローム解析

*FITM* 一過性過剰発現細胞における脂肪滴量測定と同様に lipofectamine 法で一過性過剰発現細胞を作製した。具体的には、10cm dish (Sumilon) に細胞を  $1.6 \times 10^5$  cells/ mL (15 mL/dish) の密度で播種し、Opti-MEM 1.5 mL と plasmid 24  $\mu$ g、Opti-MEM 1.5 mL と lipofectamine 2000 Transfection Reagent 60  $\mu$ L の割合で使用した。No transfection および *hFITM1*、*hFITM2*、*hFITM1+hFITM2*、pCMV6-entry (mock) を導入した 5 群 (各  $n=3$ ) を、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社指定の方法で前処理後、送付し、委託試験を実施した。

### 統計解析

Excel 2010(マイクロソフト)にて t 検定 (Welch) を用いて  $p$  値を算出し、 $p < 0.05$  を有意な差とみなした。

### 3. 結果と考察

#### FITM1、FITM2 の mRNA 発現解析

*Fitm1*、*Fitm2*について、マウス組織におけるmRNA発現分布を解析し、ヒト同様、心臓と骨格筋での高発現を確認した(図5)。また、ヒト心臓組織パネルを用いた解析によって、*FITM1*、*FITM2*ともに右心室でもっとも高く発現していることを確認した(図6)。

#### FITM1、FITM2 の機能評価: 脂肪滴形成

*hFITM1*、*hFITM2*、*hFITM1+hFITM2* および mock 一過性過剰発現細胞と no transfection 細胞を BODIPY493/503 で染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。結果、脂肪滴数およびサイズの増加を確認した(図 7a)。Hoechst33342 で核染色を行った共染色サンプルについて、IN Cell Analyzer 1000 で画像取得、Developer にて解析を行い、脂肪滴数/全細胞数、並びに脂肪滴サイズ/全細胞数の 2 項目において、mock、FITM 導入細胞間で 2 倍以上の差を検出した(図 7b)。

本結果から、*FITM* の過剰発現によって脂肪滴形成が促進されることが再現された。本研究では、*FITM2* の過剰発現細胞において、*FITM1* 過剰発現細胞と比較し、より大きな脂肪滴の増加を認めた。一方、論文報告では、*FITM1* または *FITM2* の過剰発現によって形成される脂肪滴の数およびサイズに顕著な差は認められていない[40]。*FITM1* と *FITM2* の同時導入細胞において、同量のプラスミドから発現するタンパク質量は *FITM2* の方が多かった(data not shown)。このことから、脂肪滴数およびサイズに差が生じた原因として、導入されたタンパク質の発現量の差が想定された。しかしながら、それぞれの遺伝子によって形成される脂肪滴の数およびサイズの差、さらには機能的差異の有無については、更なる解析が必要である。

#### FITM1、FITM2 の機能評価: TG との直接結合

[9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein 50 nmol 添加条件において、FITM1、FITM2 共にタンパク質量依存的なカウントの増加を確認した(図 8)。再現性確認として、ロットの異なる FITM 組換えタンパク質 (lot.1~lot.3)について、FITM タンパク質 320 pmol、[9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein 50/100 nmol 条件下における結合能を検証した結果、FITM1、FITM2 ともに全ての lot で[9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein 量依存的なカウントの増加を認めた(data not shown)。[9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein 50 nmol 条件における結合能は 2 回の実験を通じてほぼ同程度であり、FITM タンパク質と中性脂肪の直接結合を再確認した。

#### **FITM1、FITM2 の細胞機能への影響:小胞体ストレスマーカー**

hFITM1、hFITM2、hFITM1+hFITM2およびmock一過性過剰発現細胞とno transfection細胞について、ウェスタンブロットで小胞体ストレスマーカータンパク質の変動を解析した。No transfection、mock導入細胞と比較し、hFITM1、hFITM2導入細胞では、ER oxidoreductase 1 alpha(Ero1-Lα)とprotein disulfide isomerase(PDI)のバンド強度が低下していた(図9)。また、その低下の程度は、hFITM1、hFITM2導入細胞間で同程度であった。再現性確認試験においても同様の傾向を確認した(data not shown)。

Ero1-LαおよびPDIは、UPR関連タンパク質として知られている。これらの分子の心不全病態への関与は明らかとなっていないが、心筋梗塞患者心臓の生存部位において発現が上昇していること、また、*in vivo*、*in vitro*の解析において心筋梗塞に対し保護的な作用を持つことが報告されている[25]。FITMの過剰発現によって、Ero1-LαおよびPDIの発現量が低下したことから、FITMの発現量の増加は、UPRあるいはER機能に負の影響を与える可能性が示唆された。今後、FITM過剰発現時のEro1-LαおよびPDIの発現量を心筋細胞・*in vivo*にて解析することにより、心臓における影響をより詳細に明らかにできると考えられる。

#### **FITM1、FITM2 の細胞機能への影響:細胞内代謝変動**

各一過性過剰発現細胞と no transfection 細胞について、メタボローム解析を実施した。Negative control として no transfection 細胞と mock 導入細胞を設定した結果、mock 導入による代謝物質の変動が認められたことから、mock 導入細胞と *FITM* 導入細胞での比較を実施し、有意に変動する代謝産物情報を抽出した。*FITM* 導入細胞では、総アミノ酸量の低下、尿素回路の不活性化が認められ、各遺伝子導入による特徴的な変動として、*FITM2* 導入細胞ではアシルカルニチンの減少、*FITM1* 導入細胞ではグルコース 6リン酸の増加を認めた(図 10)。本結果から、*FITM* 過剰発現が細胞内代謝を変動させることが示された。

本解析より、*FITM* 導入細胞において、アミノ酸異化反応が低下している可能性が示唆された。また、*FITM2* 導入細胞におけるアシルカルニチンの減少、*FITM1* 導入細胞におけるグルコース 6リン酸の増加はそれぞれ、 $\beta$  酸化異常、グルコース取り込みあるいは糖利用の増加を示唆している。骨格筋特異的 *Fitm2* 過剰発現マウス(CKF2 マウス)の解析では、骨格筋におけるエネルギー代謝を脂肪酸酸化から分岐鎖アミノ酸消費へとシフトさせること、グルコースの取り込みを増加させること、骨格筋細胞内の ATP 量を低下させることが報告されている[42]。文献では、C2C12 細胞を用いた解析ではマウス骨格筋の解析を再現することができなかったと報告されているが、HEK293 細胞を用いた本研究では、*in vivo* と同様の変動を確認できた。

## 4. 小括

*Fitm1*、*Fitm2* がマウスにおいて、ヒト同様、心臓および骨格筋で高く発現していることが示された。加えて、両遺伝子ともに、ヒト心臓においては右心室にもっとも高い発現を認めた。

*FITM1*、*FITM2* の生物学的機能の検証を *in vitro* にて行い、学術報告どおり、*FITM* 遺伝子の過剰発現による脂肪滴形成の促進および組換え *FITM* タンパク質と TG の直接結合を確認した。これは、脂肪滴形成および TG との結合能を指標とした、*FITM* に対する薬剤スクリーニング系構築が可能であることを示している。

加えて、*FITM* と小胞体機能や代謝との関係を考察すべく、一過性過剰発現細胞における小胞体ストレスマーカータンパク質量変動、メタボローム解析を行った。その結果、*FITM* の過剰発現は、小胞体ストレスマーカータンパク質の発現変動および細胞内代謝変動を誘導することを確認した。*FITM* がヒト心臓に高発現していることから、本分子を標的とすることにより、ER 機能や細胞内代謝を通じた心筋機能の制御が可能である可能性が示唆された。

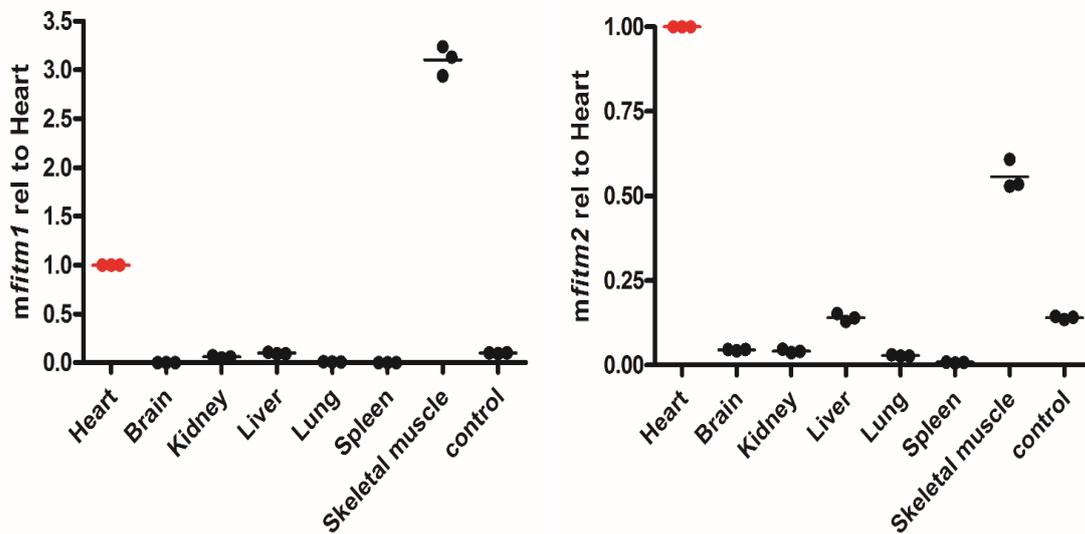


Fig 5. Quantitative analysis of mRNA expression in mouse tissues.

Relative mRNA levels were quantified using the comparative  $\Delta\Delta\text{CT}$  method with an internal control gene: *Ppia*. Expression levels relative to the expression levels of the heart are shown. Each dot represents a replicate (n=2 or 3).

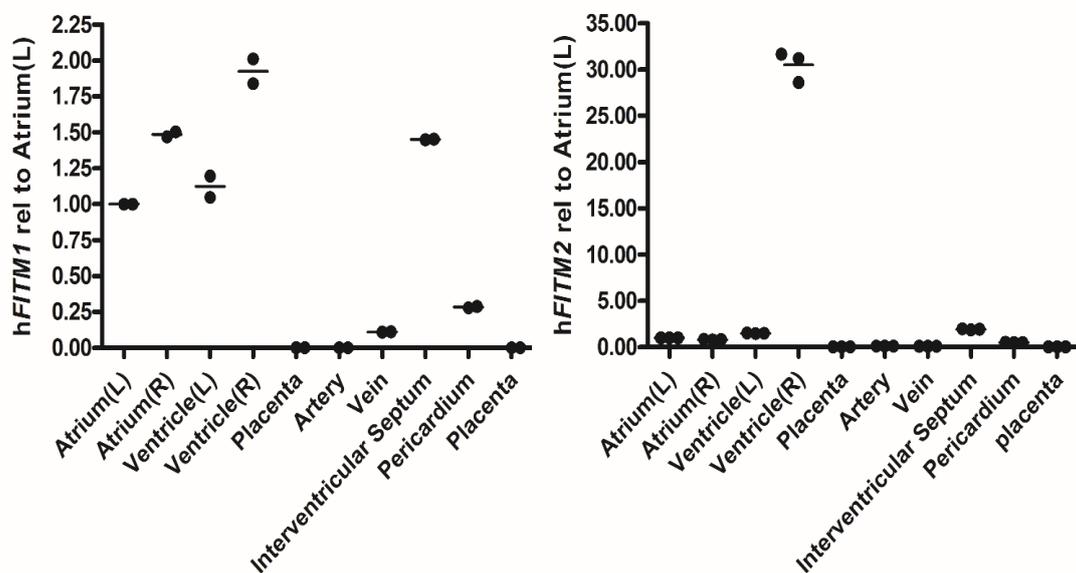
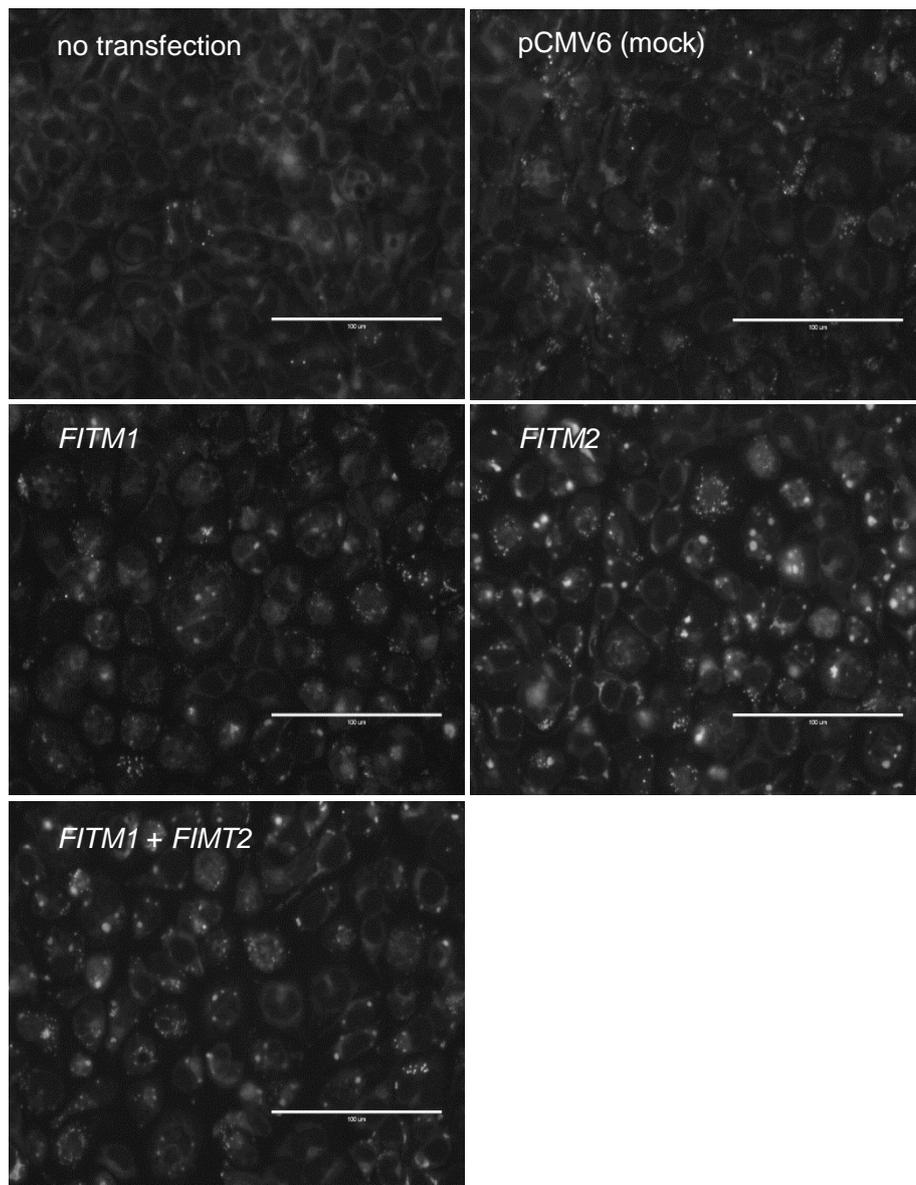


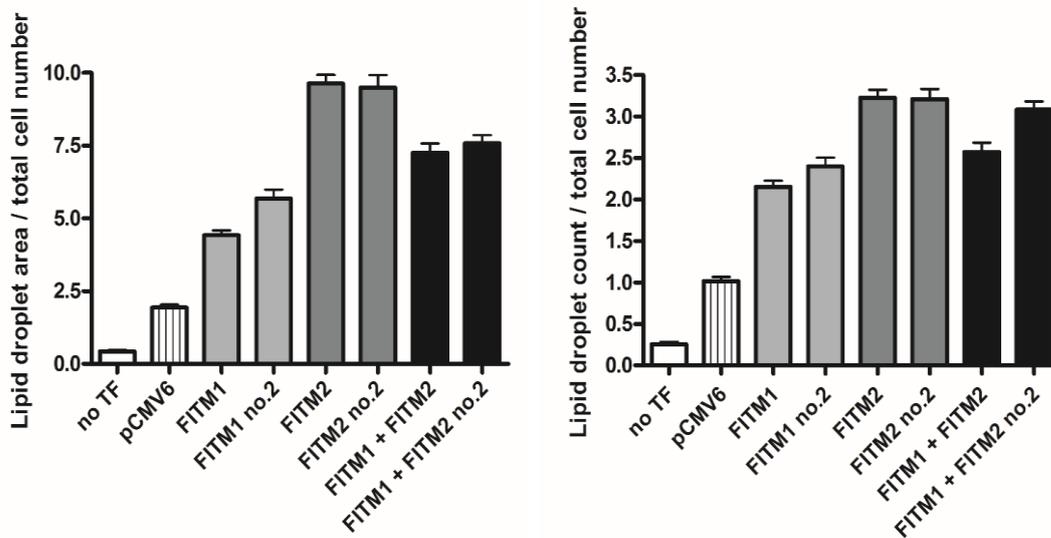
Figure 6. Quantitative analysis of *FITM* mRNA expression.

Analysis of the mRNA expression in chambers of the human heart. Relative mRNA levels were quantified using the comparative  $\Delta\Delta CT$  method with an internal control gene: *Ppia*. Expression levels relative to the expression levels of the left atrium are shown. Placenta was used as a control for the experiments. Each dot represents a replicate (n=2 or 3).



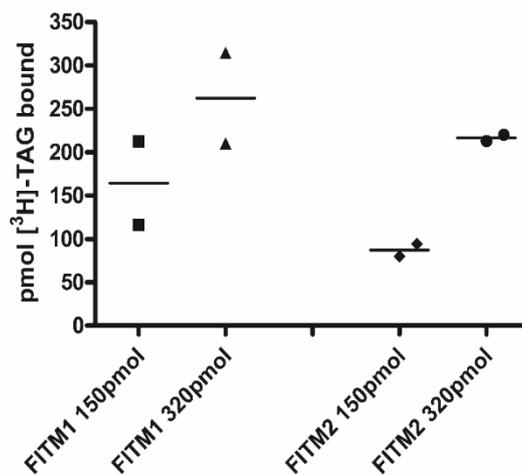
☒ 7a. Involvement of FITM1 and FITM2 in lipid droplet formation.

Constructs were transfected into HEK293 cells using Lipofectamine 2000 reagent. Cells were stained for lipid droplets using 1  $\mu\text{g/ml}$  BODIPY 493/503 and visualized by EVOS FL (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).



☒ 7b. Involvement of FITM1 and FITM2 in lipid droplet formation.

Constructs were transfected into HEK293 cells using Lipofectamine 2000 reagent. Cells were stained for lipid droplets using 1  $\mu\text{g/ml}$  BODIPY 493/503 and visualized and counted by In Cell Analyzer 1000. Analysis was performed in 12 wells for each bar and data are represented as mean  $\pm$ SD.



☒ 8. FITM1 and FITM2 binding to [9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein.

Recombinant proteins, [9,10-<sup>3</sup>H(N)]-triolein ([<sup>3</sup>H]-TAG), and Strep-tactin Macrorep beads were mixed by inversion for 4 h at room temperature. Beads were then measured for radioactivity using a scintillation counter. This experiment was repeated with similar results using three lots of recombinant proteins.

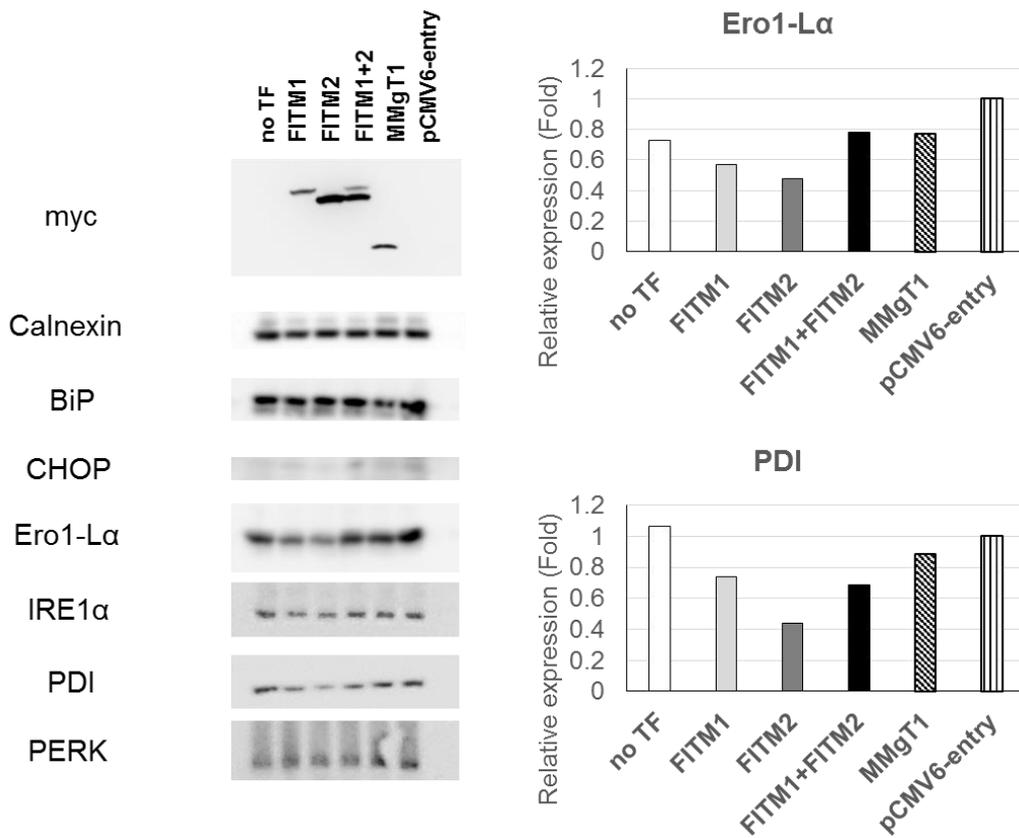
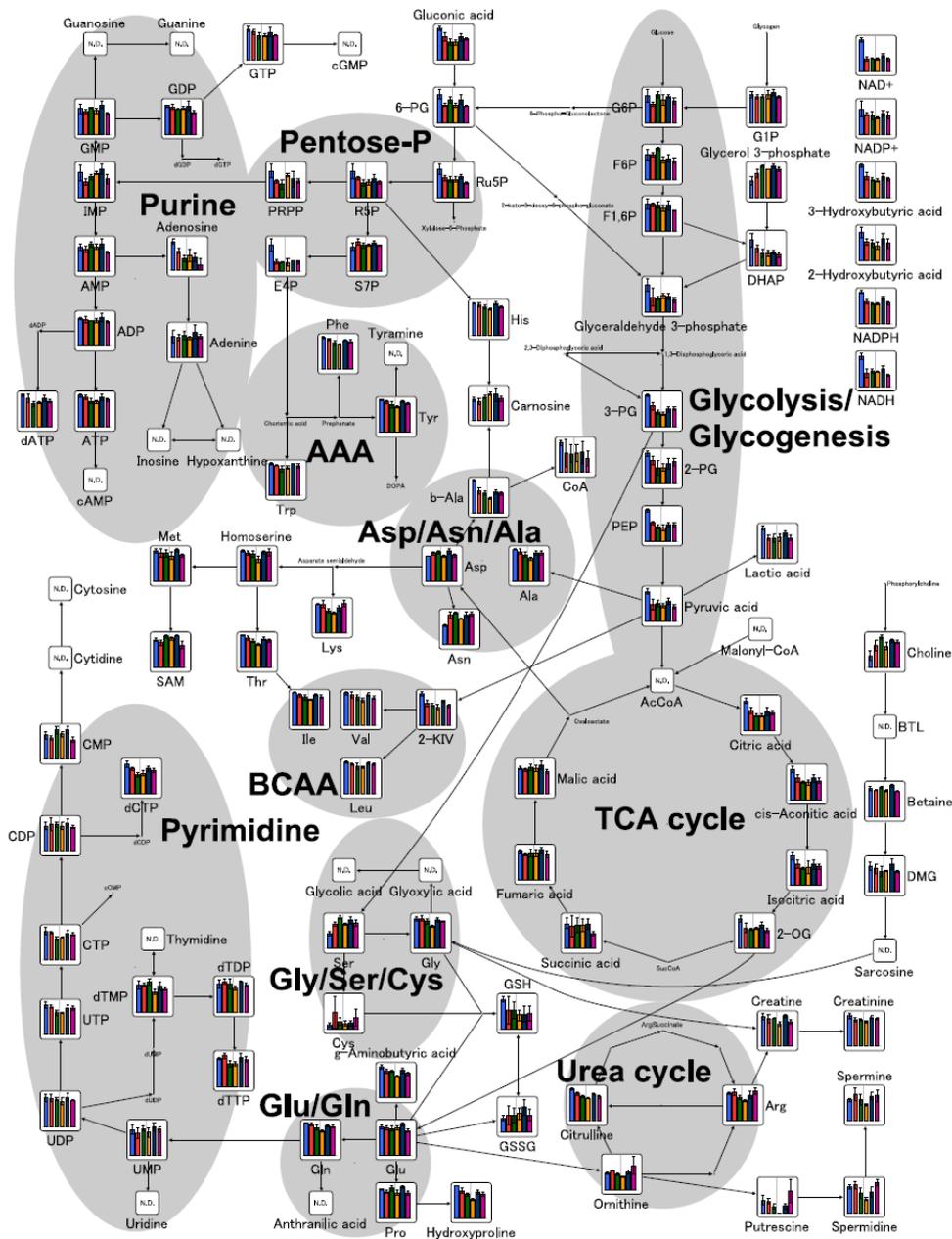


Figure 9. Effect of FITM overexpression on reducing the expression levels of ER stress marker proteins.

HEK293 cells were transiently transfected with mock, *FITM1*, *FITM2*, *FITM1+FITM2*, or *MMGT1*. Cells were lysed in Laemmli sample buffer and subjected to western blotting. Each sample was a pool of three wells. The graph at the right side of the blot shows quantification of Ero1-L $\alpha$  and PDI protein levels after normalization to Calnexin and these levels are presented as the fold-change of the pCMV6 transfected sample. This experiment was reproduced twice with similar results.



☒ 10. Metabolomic analysis of FITM-overexpressing cells.

Mock, *FITM1*, *FITM2*, and *FITM1+FITM2* were transiently overexpressed in HEK293 cells. Cell lysates were subjected to CE-TOFMS and LC-TOFMS measurements. In each bar graph, the blue bars indicate the no transfection; red bars, pCMV6-entry (mock vector); green bars, *FITM1*; orange bars, *FITM2*; navy bars, *FITM1+FITM2*; and purple bars, other membrane protein.

## 第4章

# Fat storage-inducing transmembrane protein の 心臓における機能解析

### 1. イントロダクション

*Fitm1*は、ブタの骨格筋分化の過程において発現変動を示すこと、またC2C12細胞の分化において、その発現がMyoD1によって制御されることが報告されている[43]。また、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) を過剰発現させたヒト骨格筋細胞において、脂肪滴の蓄積とともに、*FITM1*遺伝子発現が誘導されることが知られている[44]。

*Fitm2*の生理機能は、脂肪組織特異的遺伝子ノックアウト(KO)マウス[45]、出生後の全身性KO[46]、骨格筋特異的トランスジェニックマウス(CKF2マウス)[42]を用いて解析されており、マウス生体内で脂肪の貯蔵と腸機能に寄与することが報告されている。加えて、CKF2マウスの骨格筋では、脂肪酸酸化の減少、分岐鎖アミノ酸利用の増加、グルコース取り込みの増加、細胞内ATPレベルの低下が認められる[42]。

既報より、*Fitm1*と*Fitm2*は骨格筋において機能を有することが明らかとなっており、同様に酸化的組織である心臓の機能に対しても関与する可能性が予想された。加えて、第2章のゼブラフィッシュを用いた解析において、これらの分子が循環器に対し、機能を有する可能性が示唆されている。第3章においては、これらの分子がUPR関連タンパク質の発現量や細胞内代謝を変動させうることから、心不全の創薬標的候補となりうる可能性が示唆された。そこで、本章では、*Fitm*と心機能・心疾患の関連性を検討し、創薬標的としての可能性を検証するため、心疾患時のmRNA発現量解析、*Fitm1*および*Fitm2* KOマウスの心機能解析、並びにKOマウスを用いた心不全モデルの評価を行った。

## 2. 材料と方法

### 実験動物

雄性 7 週齢のマウスを日本 SLC より購入した。*Fitm1* KO マウスおよび *Fitm2* KO マウスは、特殊免疫研究所にて樹立し、雄性 7 週齢もしくは 8 週齢のマウスを購入した。第 2 章と同条件で飼育した。

### 心不全モデルの作製

第 2 章と同様の手法で、TAC モデルマウスを作製した。

### 心機能の測定

15MHz のリニアプローブを用いて経胸的心エコーによって無麻酔下での心機能を測定した。

### mRNA 発現量解析

第 2 章と同様の方法で実施した。解析には下記プローブを使用し、内部標準として TATA-binding protein (*Tbp*)を用いた。

*Fitm1*: Mm01322192\_g1

*Fitm2*: Mm04212060\_m1

*Tbp*: Mm00446971\_m1

### ヒト心疾患患者における遺伝子発現変動

第一三共 RD ノバーレ株式会社に解析を委託し、Bio Express system (Gene Logic Division, Ocimum Biosolutions)を用いた情報収集を行った。公知情報から、ヒト心疾患患者にて *FITM1* あるいは *FITM2* mRNA 発現量が健常群と比較し有意に変動している疾患を抽出した。

## 統計解析

Excel 2010(マイクロソフト)にてt検定を用いて  $p$  値を算出し、 $p < 0.05$  を有意な差とみなした。

### 3. 結果と考察

#### ***FITM* 遺伝子の心疾患時における発現変動**

マウス Sham 群、TAC モデル心不全群、TAC モデル心肥大群、MI モデル心不全群の左心室サンプルについて、mRNA 発現量を解析した。内部標準遺伝子の検討を行った結果、*Tbp* の使用が妥当であると判断した (data not shown)。mRNA 発現量解析を行った結果、いずれの遺伝子においても病態モデルにおける mRNA 発現量の低下が認められた。*Fitm1* は sham と比較して TAC モデル心不全群で 1.6 倍、TAC モデル心肥大群で 2 倍、MI モデル心不全群では 1.8 倍の低下が認められた。*Fitm2* は TAC モデル心不全群で 1.3 倍、MI モデル心不全群では 1.4 倍の低下が認められた (図 11)。

ヒト心疾患患者における *FITM1*、*FITM2* の mRNA 発現量変動について、BioExpress を用いて情報収集を行った。この結果、*FITM1* は左心室 Granulomatous Myocarditis, Nonhypersensitivity Type において、*FITM2* は、Myocardial Fibrosis without Infarction, Secondary to Coronary Artery Disease / Primary Congestive Dilated Cardiomyopathy / Primary Hypertrophic Cardiomyopathy / Viable Tissue; from Heart with Old (Healed) Myocardial Infarction (以上すべて右心室) において正常群と比較し、有意に発現が上昇していた ( $p$ -value < 0.05) (表 2)。

マウス心不全モデルの解析において、*Fitm1*、*Fitm2* の mRNA 量低下は、TAC および MI の 2 つの心不全モデルで認められた。このことから、両分子は圧負荷ならびに心筋梗塞 (容量負荷) を原因とする心不全に共通して応答する分子であると考えられた。

また、マウス病態モデルとヒト心疾患患者において、mRNA 発現量変動の方向が異なるが、後述の KO マウスを用いた心不全モデルの解析結果から、*Fitm* の量的減少は心不全に対し保護的に働くことが示唆されている。したがって、マウス心不全モデルにおける遺伝子発現量低下

は、防御的機構と推察される。一方で、発現上昇の認められるヒト心疾患においては、本分子の量的あるいは機能的阻害剤による奏功が予想される。

### ***Fitm1* KO マウスおよび *Fitm2* KO マウスの心機能解析**

生体における *Fitm* の機能を検証するため、Gene targeting 法にて KO マウスを作製した(図 12a, b)。特許情報のとおり、*Fitm1* のホモ KO 個体 (*Fitm1* (-/-)) は繁殖可能であったが、*Fitm2* のホモ KO 個体は胎生期 9~10 日の間に胎性致死となった[47]。*Fitm2* ヘテロ KO 個体 (*Fitm2* (+/-)) は出生し、繁殖可能であった。*Fitm2* (+/-) マウスを用いることにより、生体における *Fitm2* の機能を解析することができるため、以降の解析には、*Fitm2* (+/-) マウスを用いた。

ヒトにおいて、心不全患者の多くは高齢者である。そこで、本研究では老齢マウスの心機能を解析した。22 ヶ月齢にて、マウスの体重 (body weight、BW)、左室拡張終(末)期径 (Left Ventricular end-diastolic Diameter (dimension)、LVDd)、左室収縮終(末)期径 (Left Ventricular end-systolic Diameter (dimension)、LVDs) を測定し、あわせて駆出率 (Ejection Fraction、EF) を算出した。その後、24 ヶ月齢で解剖し、体重、右心室重量、左心室重量を測定した。

その結果、同月齢の野生型 (wild type, WT) マウスと比較し、22 ヶ月齢の *Fitm1* (-/-) マウスの体重、LVDd、LVDs、EF に顕著な差は認められなかった(図 13)。また、24 ヶ月齢において、体重、右心室および左心室重量に差はなかった(図 14)。

一方、22 ヶ月齢の *Fitm2* (+/-) マウスでは、LVDd および LVDs の短縮を認めたが、駆出率には差がなく、体重にも有意な差は認められなかった(図 15)。24 ヶ月齢での解剖時において、WT マウスと比較し、*Fitm2* (+/-) マウスの右心室重量の低下が認められた(図 16)。しかし、左心室重量および体重は、WT マウスと同等であった(図 16)。

以上の結果から、*Fitm1* の欠損は、マウスの発生および正常状態の心機能に影響を与えないことが示された。*Fitm2* (+/-) マウスでは、LVDd、LVDs の短縮を認めたが、EF は正常であったこと、生存率の低下を認めなかったこと (data not shown) から、正常時において心機能に負

の影響は与えないと考えられた。しかしながら、*Fitm2* ホモ KO マウスは胎性致死となり、また、出生後に *Fitm2* を全身性に KO したマウスは腸疾患によって死亡することが報告されている [46]。したがって、本分子は、正常なマウスの発生および出生後の腸機能に対し、機能を有すると考えられる。

### 心不全モデルに対する *Fitm1* または *Fitm2* の作用

続いて、*Fitm* が心不全の病態に及ぼす影響を解析するため、KO マウスを用いて TAC モデルを作製し、体重推移、経時的な心機能の変化、最終時点での臓器重量と生存率を評価した。WT マウスならびに *Fitm1* (-/-)マウスの TAC 処置群では、sham 群と比較し、1~8 週目にかけて体重減少が認められた(図 17a、表 3)。一方、TAC 処置した *Fitm2* (+/-)マウスの体重は、sham 群と同等であった(図 18a、表 4)。

心機能評価では、TAC 処置群において、TAC 処置後 1 週目から LVDd の拡張と EF の低下が認められた。本評価項目において、TAC 処置後 1~8 週を通じ、*Fitm1* (-/-)マウスと WT マウスの間に有意な差は認められなかった(図 17b, c)。対して、*Fitm2* (+/-)マウスは、TAC 処置後 4 週目から、LVDd の拡張と EF の低下を有意に抑制した(図 18b, c)。

心機能評価後、マウスを解剖し、左心室、右心室、肺の臓器重量を測定した。TAC 処置群では、すべての臓器において臓器重量の増加を認めた(*Fitm1*: 表 3、*Fitm2*: 表 4)。TAC 処置後の右心室・肺の重量では、*Fitm1* (-/-)マウスと WT マウスの間に差は認められなかった(表 3)が、*Fitm1* (-/-)マウス+TAC 群では左心室重量が増加していた(図 19)。*Fitm2* (+/-)マウスにおいても同様に、WT マウスと比較し、TAC 処置群における右心室および肺重量に差は認められなかった(表 4)。左心室重量は、*Fitm2* (+/-)マウス+TAC 群において、WT マウス+TAC 群と比較し、有意に少なかった(図 20)。

最終時点における生存率を算出したところ、*Fitm1* (-/-)マウス、*Fitm2* (+/-)マウスにおいて、TAC 処置による死亡を抑制する傾向が示された(表 3、表 4)。

以上の結果から、マウス個体における *Fitm1* の欠損は、圧負荷心不全モデルの病態に対し影響を与えなかったが、生存率を改善した。このことから、心不全病態に対する *Fitm1* の関与は、顕著なものではないと推察された。一方、*Fitm2* のヘテロKOは、病態(左室肥大、EF低下)を改善し、生存率を上昇させたことから、*Fitm2* が心不全病態に関与することが示唆された。また、第3章では、マウス組織における *Fitm1* の mRNA 発現量は骨格筋、次いで心臓の順で高いこと、対して *Fitm2* は心臓でもっとも多く発現していることを示した。心不全の病態に対し、*Fitm2* (+/-)の方が顕著な抵抗性を示した理由として、両分子の組織発現を反映している可能性が考えられる。

## 4. 小括

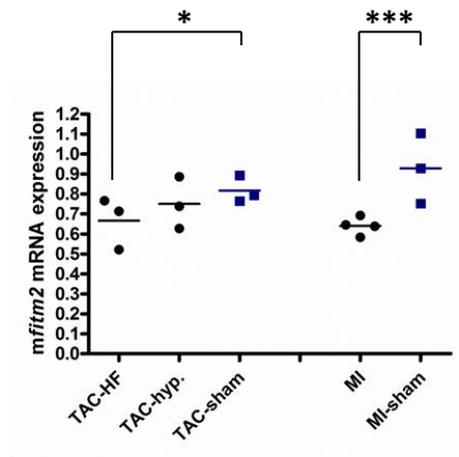
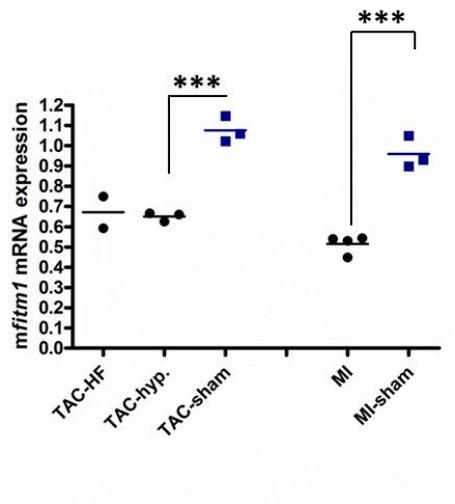
マウス心不全モデルの解析の結果、*Fitm1* と *Fitm2* は、圧負荷ならびに心筋梗塞心不全モデルに共通して発現が低下することが明らかとなった。加えて、ヒトにおいて、*FITM1* あるいは *FITM2* の発現上昇を示す心疾患が見出された。

老齢 KO マウスを用いた心機能解析において、*Fitm1* (-/-)マウス、*Fitm2* (+/-)マウスの EF は正常であり、体重や生存率も WT マウスと同等であった。このことから、*Fitm1* と *Fitm2* の両分子は、通常条件での飼育下において心臓機能に影響を与えないと考えられた。

また、TAC モデルにおける検討では、*Fitm2* (+/-)マウスにて、心不全の病態と生存率の改善が認められた。

以上の結果から、*Fitm1* の心機能および心不全病態に対する寄与は顕著でなく、心不全の創薬標的とするには適当でないと考えられた。

*Fitm2* について、正常時の心機能への影響は顕著でないが、心不全時に発現が変動し、病態に関与することが示唆された。このことから、*FITM2* の量的あるいは機能的阻害は、疾患時にのみ心機能に対し保護的な効果を発揮することが期待される。したがって、*Fitm2* は心不全の新規創薬標的候補となりうると考えられた。



\*  $p$ -value < 0.05

\*\*  $p$ -value < 0.01

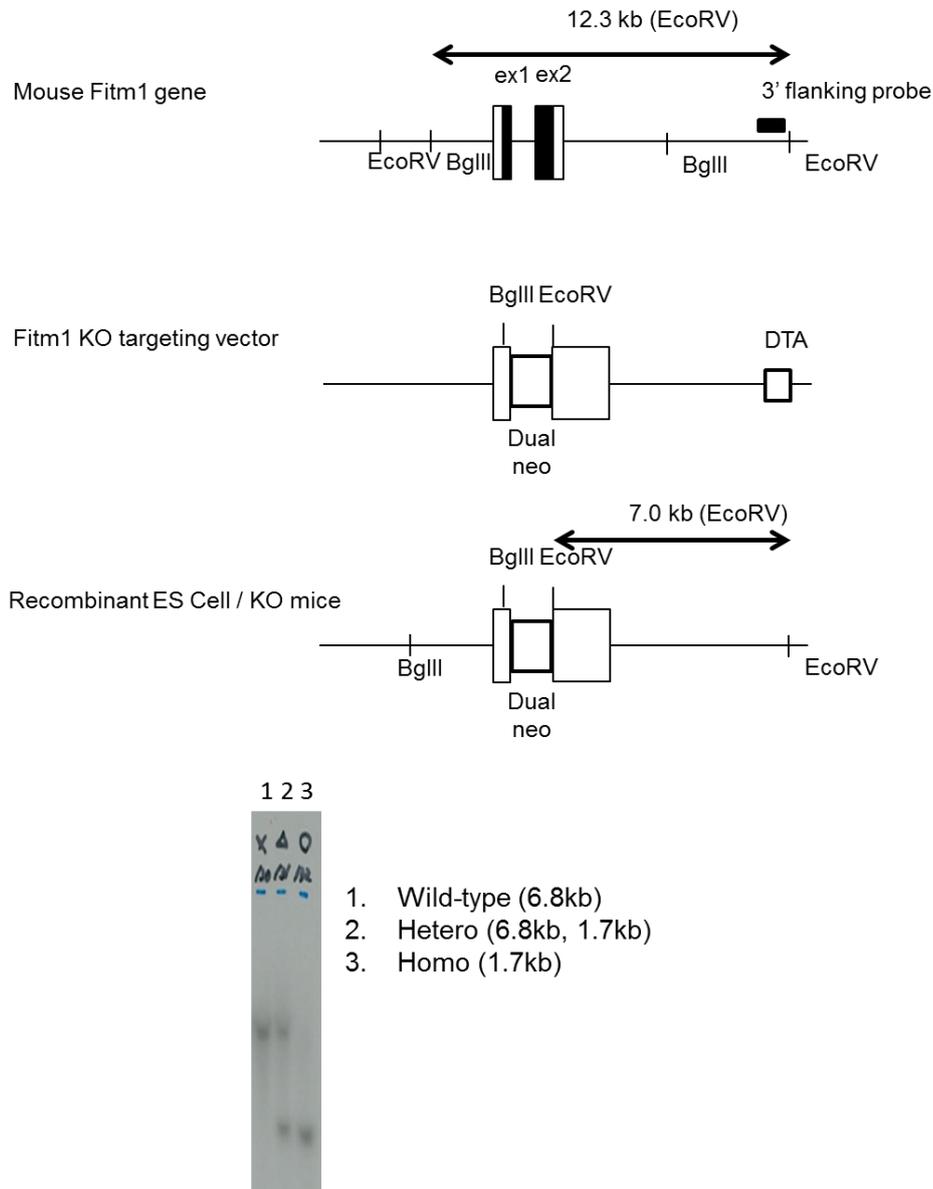
\*\*\*  $p$ -value < 0.005

☒ 11. Quantitative analysis of mRNA expression in hearts from TAC and MI model mice.

Relative mRNA levels were quantified using the comparative  $\Delta\Delta$ CT method with an internal control gene (*Tbp*). Each dot represents an individual animal.

HF: heart failure, hyp.: hypertrophy

## Fitm1 KO mice

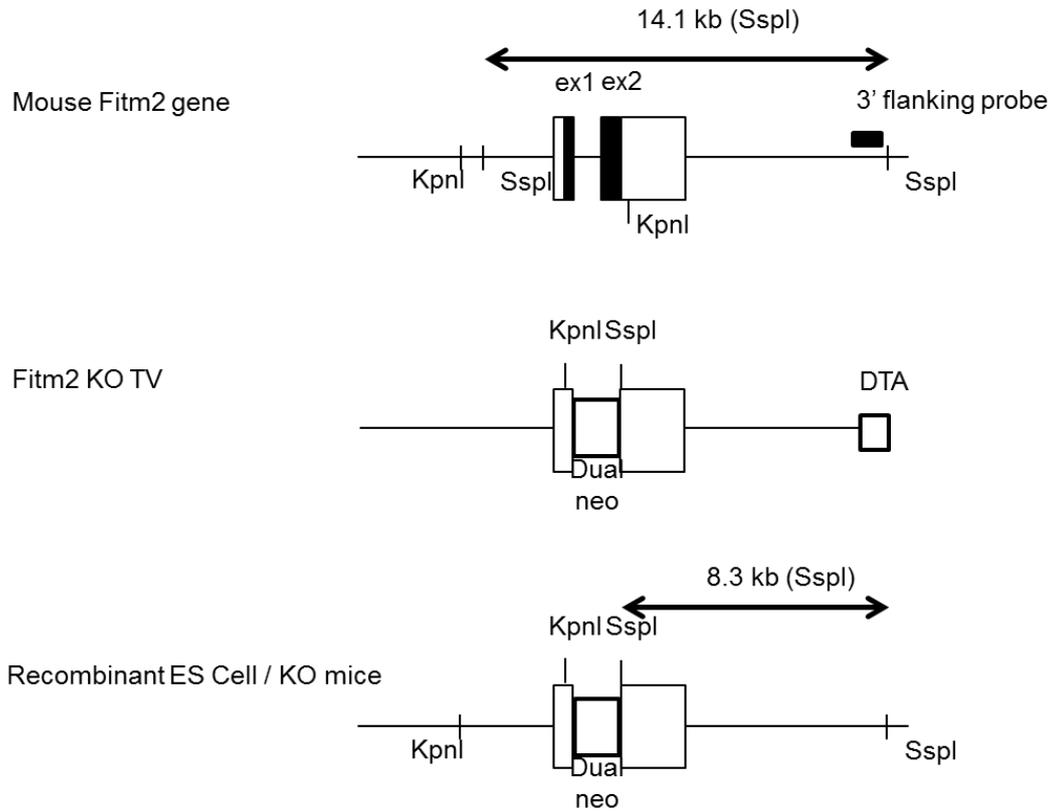


12a. Generation of *Fitm1*-knockout mice by gene targeting.

Gene-targeting strategy. Top: exon and restriction map of the *Fitm1* gene locus. Middle: targeting vector. In the targeting vector, the neo cassette replaces exon 1 and exon 2 of the *Fitm1* gene. Bottom: targeted allele in embryonic stem cells and knockout (KO) mice.

Southern blot analysis of genomic DNA from mouse tails. The target allele (~1.7 kb) was distinguished from the wild-type allele (~6.8 kb). The wild-type allele was identified in wild-type and heterozygous mice. The target allele was identified in knockout and heterozygous mice.

## Fitm2 KO mice



1 2

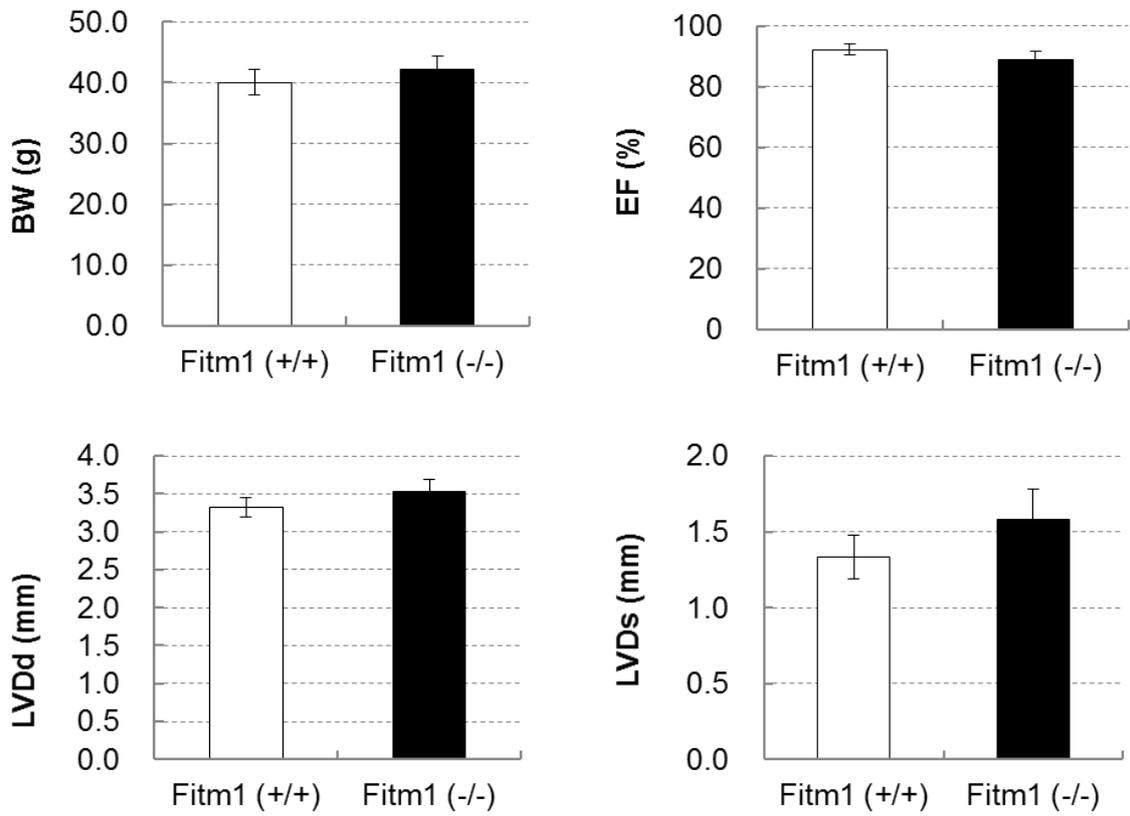


1. Wild-type (6.3kb)
2. Hetero (6.3kb, 3.2kb)

12b. Generation of *Fitm2*-knockout mice by gene targeting.

Gene-targeting strategy. Top: exon and restriction map of the *Fitm2* gene locus. Middle: targeting vector. In the targeting vector, the neo cassette replaces exon 1 and exon 2 of the *Fitm2* gene. Bottom: target allele in embryonic stem cells and knockout mice.

Southern blot analysis of genomic DNA from mouse tails. The target allele (~3.2 kb) was distinguished from the wild-type allele (~6.3 kb). The wild-type allele was identified in wild-type and heterozygous mice. The target allele was identified in heterozygous mice.



☒ 13. Analysis of the functions of aged hearts of *Fitm1* KO mice.

Measurements of body weight (BW) and cardiac function at 22 months of age. Cardiac function was assessed by echocardiography, and mean values for each parameter are shown. Error bars indicate SE. [*Fitm1 (+/+)*: n = 18, *Fitm1 (-/-)*: n = 17]

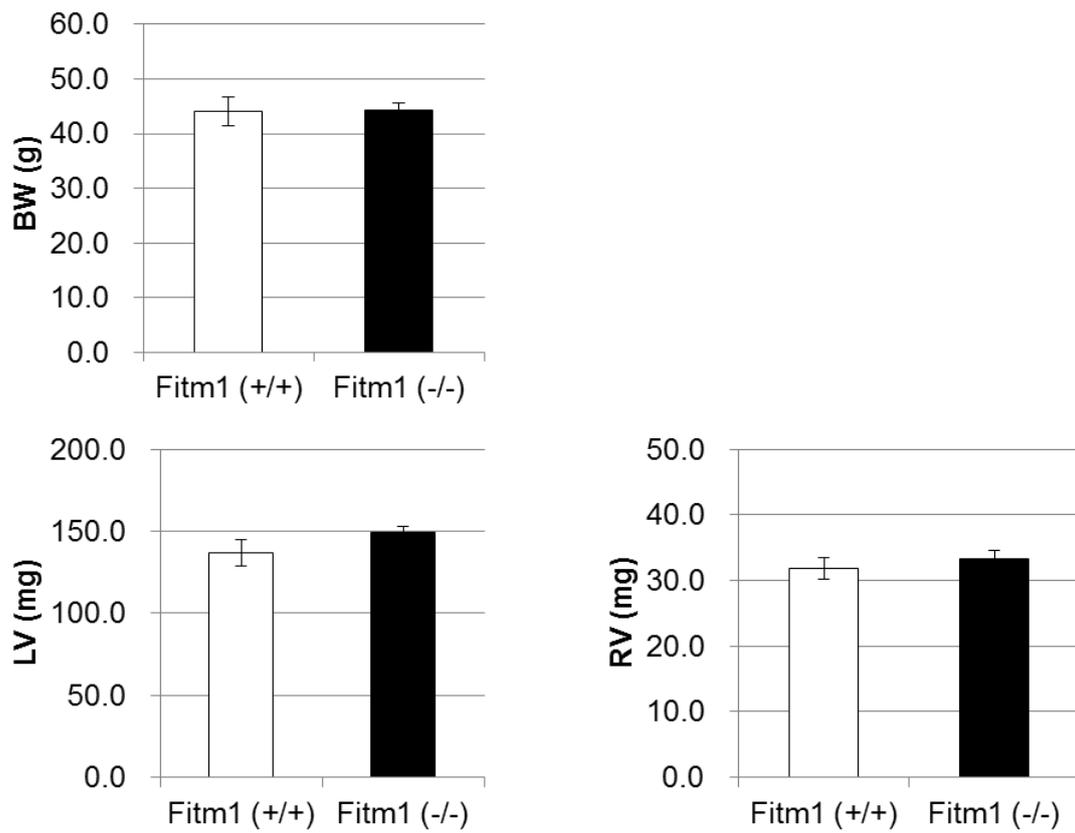
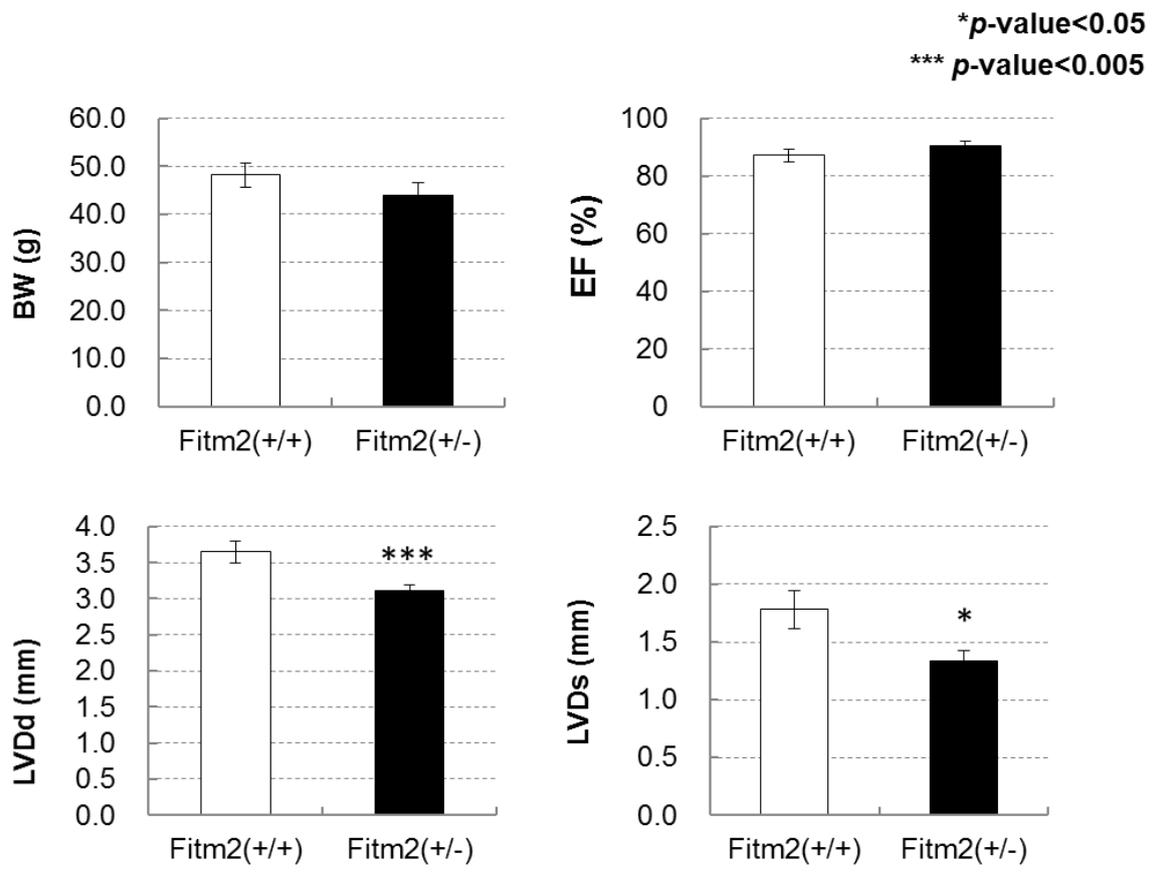


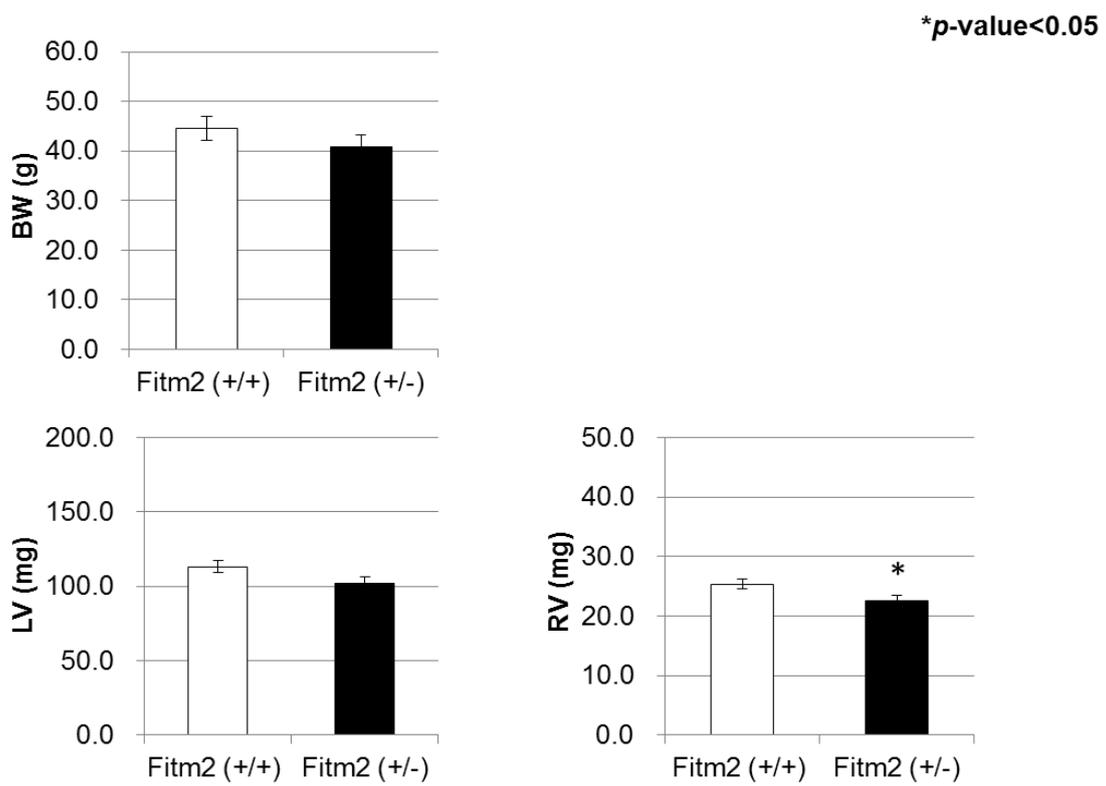
Figure 14. Measurements of Body weight (BW), Left ventricle (LV), and Right ventricle (RV) of *Fitm1* KO mice at 24 months of age.

Mean  $\pm$  SE [n = 12 in each group of *Fitm1* (+/+) and *Fitm1* (-/-)]



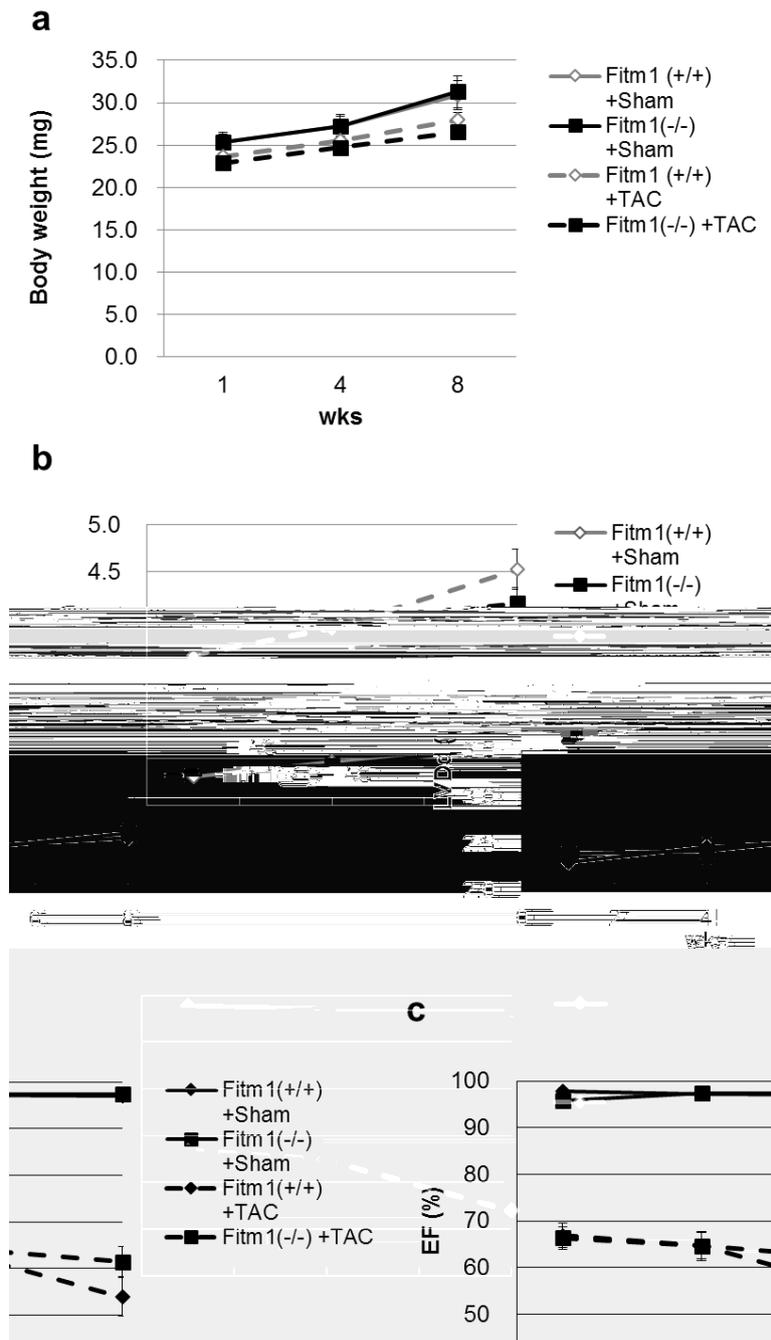
☒ 15. Analysis of the functions of aged hearts of *Fitm2* KO mice.

Measurements of body weight (BW) and cardiac function at 22 months of age. Cardiac function was assessed by echocardiography, and mean values for each parameter are shown. Error bars indicate SE. [*Fitm2* (+/+): n = 14, *Fitm2* (+/-): n = 16]



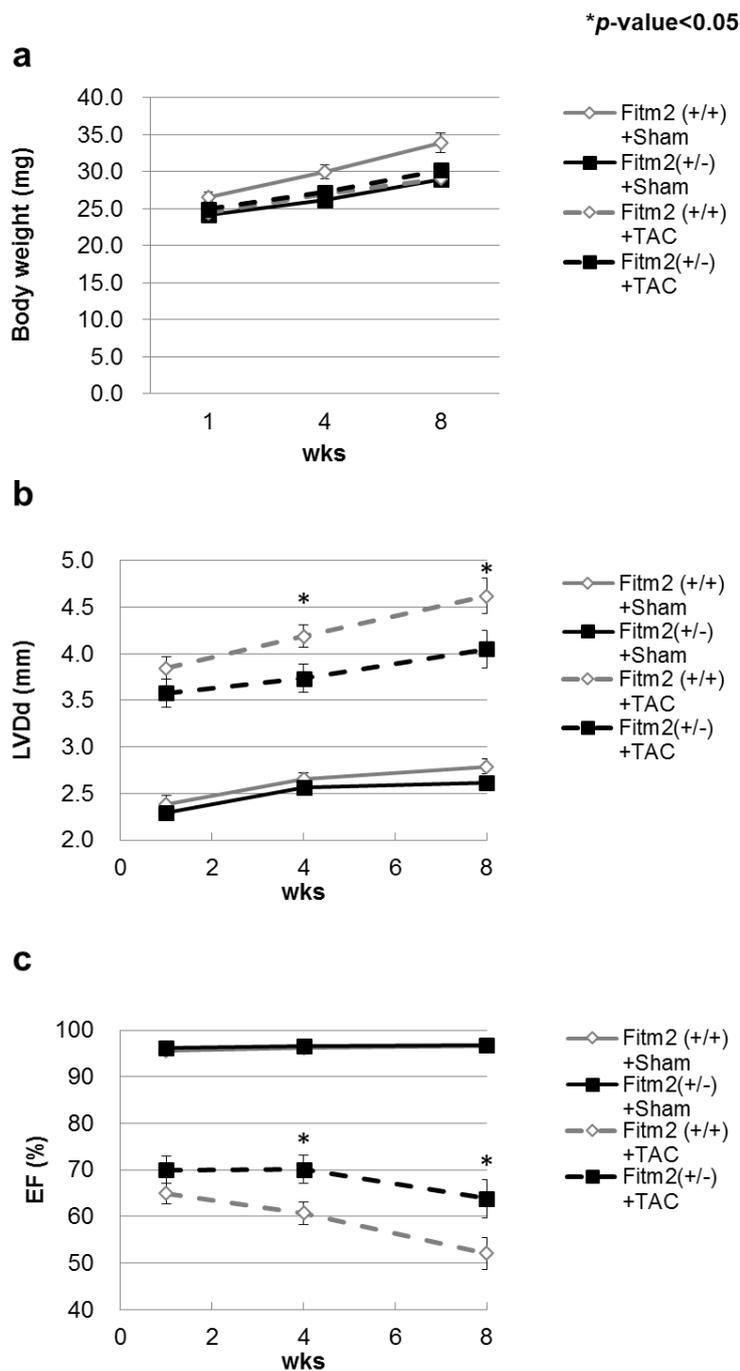
☒ 16. Measurements of Body weight (BW), Left ventricle (LV), and Right ventricle (RV) of *Fitm2* KO mice at 24 months of age.

Mean ± SE [*n* = 8 in each group of *Fitm2* (+/+) and *Fitm2* (+/-)]



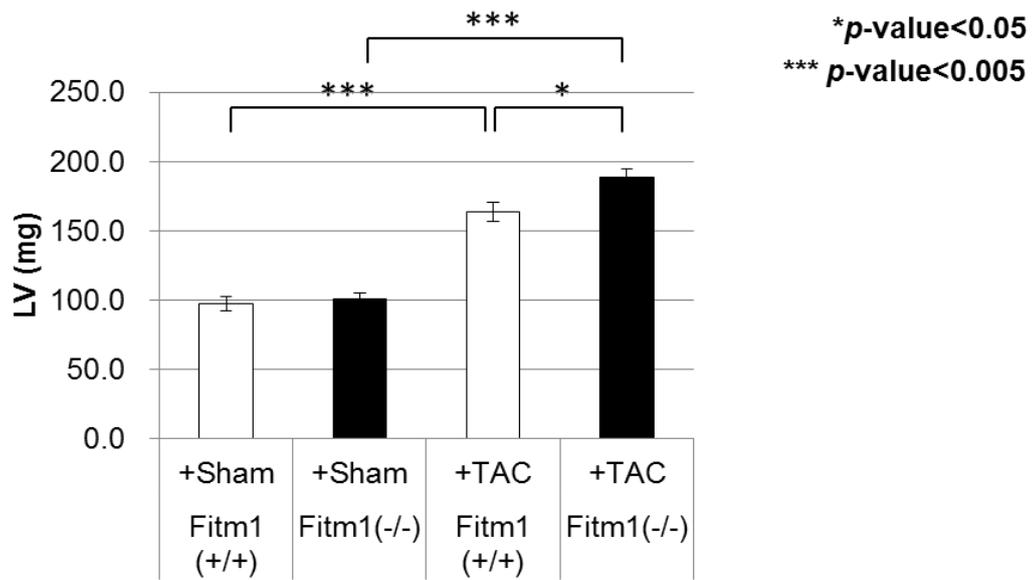
☒ 17. Changes in BW and cardiac function in TAC.

a–c) Mean values of the indicated parameter in *Fitm1* (+/+) and *Fitm1* (-/-) during 8 weeks after TAC [*Fitm1* (+/+) +sham:  $n = 9$ , *Fitm1* (-/-) +sham:  $n = 8$ , *Fitm1* (+/+) +TAC:  $n = 34$ , *Fitm1* (-/-) +TAC:  $n = 44$ ]. Values are the mean of three experiments. Error bars indicate SE.



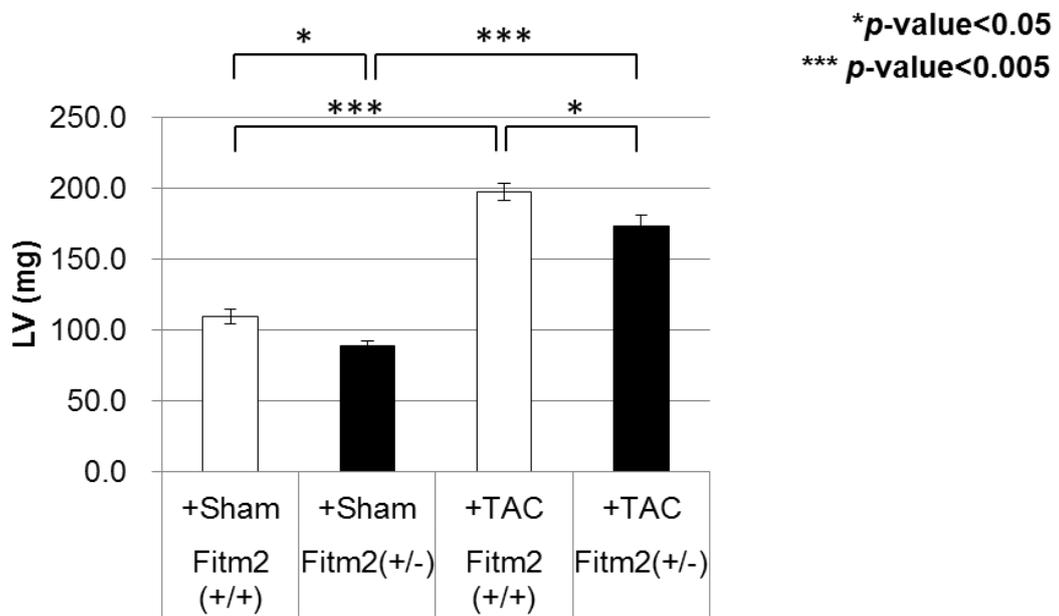
☒ 18. Changes in BW and cardiac function in TAC.

a–c) Mean values of the indicated parameter in *Fitm2* (+/+) and *Fitm2* (+/-) mice during 8 weeks after TAC. [*Fitm2* (+/+) + sham:  $n = 9$ , *Fitm2* (+/-) + sham:  $n = 9$ , *Fitm2* (+/+) + TAC:  $n = 34$ , *Fitm2* (+/-) + TAC:  $n = 33$ ]. Values are the mean of three experiments. Error bars indicate SE. An asterisk indicates the  $p$ -value from the comparison between *Fitm2* (+/+) + TAC and *Fitm2* (+/-) + TAC.



☒ 19. Mean LV weights at dissection.

Values are the mean of three experiments. Error bars indicate SE. [*Fitm1* (+/+)-sham: *n* = 9, *Fitm1* (-/-)+sham: *n* = 8, *Fitm1* (+/+)+TAC: *n* = 26, *Fitm1* (-/-)+TAC: *n* = 40]



☒ 20. Mean LV weights at dissection.

Values are the mean of three experiments. Error bars indicate SE.

[*Fitm2* (+/+)+sham:  $n = 9$ , *Fitm2* (+/-)+sham:  $n = 9$ , *Fitm2* (+/+)+TAC:  $n = 25$ , *Fitm2* (+/-)+TAC:  $n = 27$ ]

Symbol	Tissue	Disease	n	Fold change	p-value
<i>FITM1</i>	Left Ventricle	Granulomatous Myocarditis, Nonhypersensitivity Type	4	1.66 ↑	0.03
<i>FITM2</i>	Right Ventricle	Myocardial Fibrosis without Infarction, Secondary to Coronary Artery Disease	5	1.53 ↑	0.03
	Right Ventricle	Primary Congestive Dilated Cardiomyopathy	39	1.72 ↑	0.00001
	Right Ventricle	Primary Hypertrophic Cardiomyopathy	18	1.56 ↑	0.004
	Right Ventricle	Viable Tissue; from Heart with Old (Healed) Myocardial Infarction	83	1.64 ↑	0.00004

表2. List of cardiac diseases with altered FITM mRNA expression.

	Fitm1(+/+) +TAC	Fitm1(-/-) +TAC	Fitm1(+/+) +Sham	Fitm1(-/-) +Sham	p*	p†	p‡	p§
Survival rate (%)	58.1	72.7	100.0	88.9				
BW (g)	29.2 ± 1.1	27.9 ± 0.8	33.5 ± 2.7	32.7 ± 1.8	NS	NS	< 0.05	NS
RV (mg)	36.1 ± 2.8	40.8 ± 2.1	24.7 ± 1.5	25.8 ± 1.1	NS	< 0.05	< 0.01	NS
LV (mg)	163.5 ± 6.7	188.5 ± 6.4	97.4 ± 5.1	100.3 ± 4.4	NS	< 0.005	< 0.005	< 0.05
Lung (mg)	283.1 ± 25.6	334.6 ± 21.7	155.9 ± 6.4	142.3 ± 5.6	NS	< 0.01	< 0.005	NS

表 3. Survival rate and tissue weights in response to TAC in *Fitm1* (+/+) and *Fitm1* (-/-) mice.

*Fitm1* (+/+) and *Fitm1* (-/-) mice were subjected to TAC as described in the experimental procedures. The survival rate and mean weights of tissues from *Fitm1* (+/+) and *Fitm1* (-/-) sham- or TAC-operated mice are shown [*Fitm1* (+/+) + sham:  $n = 9$ , *Fitm1* (-/-) + sham:  $n = 8$ , *Fitm1* (+/+) + TAC:  $n = 26$ , *Fitm1* (-/-) + TAC:  $n = 40$ ].

NS, not significant.

\* *Fitm1* (-/-) + sham vs. *Fitm1* (+/+) + sham.

† *Fitm1* (+/+) + TAC vs. *Fitm1* (+/+) + sham.

‡ *Fitm1* (-/-) + TAC vs. *Fitm1* (-/-) + sham.

§ *Fitm1* (+/+) + TAC vs. *Fitm1* (-/-) + TAC.

	Fitm2(+/+) +TAC	Fitm2(+/-) +TAC	Fitm2(+/+) +Sham	Fitm2(+/-) +Sham	p*	p†	p‡	p§
Survival rate (%)	54.5	65.9	100.0	100.0				
BW (g)	31.1 ± 1.4	32.8 ± 1.0	37.3 ± 2.3	31.7 ± 1.7	NS	< 0.05	NS	NS
RV (mg)	37.2 ± 3.0	34.8 ± 2.7	24.4 ± 1.4	20.4 ± 1.1	< 0.05	< 0.05	< 0.01	NS
LV (mg)	197.3 ± 6.2	173.1 ± 7.9	109.9 ± 5.2	89.2 ± 2.9	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05
Lung (mg)	302.0 ± 29.6	280.9 ± 28.8	172.7 ± 12.7	140.8 ± 4.5	< 0.05	< 0.05	< 0.01	NS

表 4. Survival rate and tissue weights in response to TAC in *Fitm2* (+/+) and *Fitm2* (+/-) mice.

*Fitm2* (+/+) and *Fitm2* (+/-) mice were subjected to TAC as described in the experimental procedures. The survival rate and mean weights of tissues from *Fitm2* (+/+) and *Fitm2* (+/-) sham- or TAC-operated mice are shown [*Fitm2* (+/+)sham: *n* = 9, *Fitm2* (+/-)sham: *n* = 9, *Fitm2* (+/+)TAC: *n* = 25, *Fitm2* (+/-)TAC: *n* = 27].

NS, not significant.

\* *Fitm2* (+/-)sham vs. *Fitm2* (+/+)sham.

† *Fitm2* (+/+)TAC vs. *Fitm2* (+/+)sham.

‡ *Fitm2* (+/-)TAC vs. *Fitm2* (+/-)sham.

§ *Fitm2* (+/+)TAC vs. *Fitm2* (+/-)TAC.

## 第 5 章

### 総括と総合考察

本研究では、マウス心不全モデル小胞体画分で同定された機能未知タンパク質リストから、候補分子 FITM1、FITM2 を見出し、その創薬標的としての可能性を検証した。

第 2 章では、心不全の新規標的の探索のため、心不全モデルマウス心臓の SR/ER 画分を用いたプロテオミクス解析を実施した。同定したタンパク質に対して、トランスクリプトーム解析情報、公知情報および文献情報を付加し、心臓での機能が不明で、かつ、膜タンパク質と推定される新規タンパク質をコードする遺伝子を選定し、標的候補リストを得た。このうち、ヒト心臓および骨格筋に特異的に発現し、ゼブラフィッシュの発生過程で機能を有する可能性のある分子として、FITM1、FITM2、TIMM21、FAM210A、TMEM242、SLC12A4 の 6 遺伝子を見出した。

第 3 章では、FITM に着目し、その創薬標的としての可能性を検証するため、発現解析、*in vitro* における FITM1、FITM2 の機能解析を実施し、FITM がヒトとマウスの心臓・骨格筋で高く発現していること、心臓器官では右心室に高発現することを見出した。また、FITM が *in vitro* において、脂肪滴形成に関与することを再現した。加えて、FITM の過剰発現が、細胞内にて小胞体ストレスマーカータンパク質の発現変動および代謝変動を誘導することを示し、FITM の ER 機能、細胞内代謝への関与が示唆された。

第 4 章では、*in vivo* 解析を中心に *Fitm* と心機能、心疾患との関連性を検討した。心不全モデルマウスの解析から、*Fitm1* と *Fitm2* が圧負荷ならびに心筋梗塞を原因とする心不全に共通して応答することが明らかとなり、心不全病態への関与が示唆された。また、KO マウスにて TAC モデルを作製した結果、*Fitm2* (+/-)マウスで心機能と生存率の改善が認められた。*Fitm1* (-/-)マウスでは、生存率が改善したが、心機能の改善は認められず、寄与は大きくないと考えられた。一方、老齢 KO マウスの心機能解析では、表現型に大きな変化は観察されず、*Fitm* は健

常時の心機能に対して、重要な機能は担わないと考えられた。以上の結果から、特に *Fitm2* の心不全の病態形成への関与が示唆された。

本研究で得られたデータセットおよび標的候補遺伝子リストは、心不全に対する新規創薬ターゲットの探索において有用なリストであると考えられる。特に標的候補の 6 遺伝子については、今後の機能解析により、創薬標的としての妥当性を判断できると期待している。中でも、本研究から、心臓で高発現している FITM を標的とすることによる ER 機能や細胞内代謝を通じた心筋機能の制御の可能性が示され、また、FITM を標的とした薬剤スクリーニング系について、脂肪滴形成や TG との結合能を指標とした系の構築が可能であることが示された。加えて、*Fitm2* (+/-) マウスを用いた解析結果から、FITM2 の量的あるいは機能的阻害により、疾患時のみでの心保護効果を期待できることが判明した。ヒトで *Fitm2* の発現上昇を示す心疾患が本研究のデータベース解析により見出されており、KO マウスの解析結果とあわせ、本分子は心不全の新規標的分子となりえると考えている。

*Fitm1* と *Fitm2* は、脂肪滴形成に関与するファミリー分子として報告され、それぞれ、*Fitm1* は主として骨格筋における機能、*Fitm2* は脂肪組織、腸、骨格筋における機能が解析されてきた。本研究では、心不全モデルマウスを用いたオミックス解析より *Fitm* を同定し、*Fitm* の脂肪滴形成への関与を確認するとともに、マウスを用いて *Fitm* と心臓の機能や心疾患との関連性を初めて見出した。現時点において、*Fitm* による脂肪滴形成と心不全病態との関連性は未解明であるが、心不全患者（特に糖尿病や生活習慣病を合併している患者）では心筋細胞内の脂肪量が増加していることが報告されている[48]。興味深いことに、*Fitm2* (+/-) マウスが心不全に対し抵抗性を示したことから、脂肪滴の減少が心筋細胞内の脂肪量の低下に繋がっている可能性がある。一方、脂肪滴の減少は、遊離の脂肪酸の増加を招く可能性もあり、細胞への脂肪毒性や酸化ストレスの増加が懸念される。今後、*Fitm2* が有する *in vitro* の機能に着目しつつ、*Fitm2* (+/-) マウスの心筋細胞での脂肪滴あるいは脂肪の種類、量の変動等を解析することで、脂肪滴と心不全病態との関連、脂肪滴形成を通じた FITM2 の病態への関与など、*Fitm2* (+/-) マウ

スで認めた圧負荷心不全への抵抗性についての機序の解明に繋がるものと考える。

また、心不全患者の心臓では、脂肪酸酸化から糖利用へとエネルギー代謝シフトが起こること、細胞内 ATP レベルが低下することが報告されている[49-51]。本研究の *FITM1*、*FITM2* 過剰発現細胞および既報の CKF2 マウス骨格筋で確認された代謝変動は、心不全における代謝シフトと類似している。今後のメカニズム研究を進めるうえで、KO マウスの健常時および心不全時、また心筋細胞の代謝物を解析することにより、心不全での代謝シフトに対する *Fitm2* の影響を考察できると考える。さらに、*FITM* の発現増加が UPR あるいは ER 機能に対して負の影響を与える可能性が、本研究の *in vitro* 解析から示唆された。特に、HEK293 細胞でタンパク質量の低下を認めた Ero1-La および PDI について、これらの分子が心筋梗塞に対し保護的に働くことが報告されている[25]。将来的に、*Fitm2* (+/-)マウス心臓の Ero1-La および PDI の発現変動を解析することで、TAC 心不全モデルでの心保護作用の要因解明が期待できる。

心不全は、全世界で2600万人が罹患していると推定されており、さらに患者数は増大を続けていることから、治療薬の社会的ニーズは高い[2]。米国では、そのコストは2012年度で307億ドルであり、2030年度には697億ドルに増大すると予想されている[52]。本研究において、*FITM* が脂肪滴形成に関与すること、細胞内代謝や UPR に関与する可能性、また、*Fitm2* の阻害が心不全病態に対し、保護的に働く可能性が示唆された。本研究で得られた知見が、*FITM* と心不全の関連を明らかとする基礎となり、新規の作用機序を持つ心不全治療薬創出の一助となれば幸いである。

## 謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆するにあたり、ご指導、ご支援及び激励を賜りました全ての方に心より感謝いたします。

多大なご支援とご指導を賜りました指導教官の筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 深水昭吉教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は、第一三共株式会社にて実施されました。本研究を実施する機会および論文執筆の機会を与えてくださいました、第一三共株式会社 磯野藤男博士、福岡隆博士に感謝申し上げます。特に、本研究の開始より論文執筆までの長きにわたり、多大なご支援、ご指導及び激励を賜りました第一三共株式会社 小石龍太博士に心より感謝いたします。

共同研究にてゼブラフィッシュを用いた解析をご実施頂き、また、貴重なご助言を賜りました、慶應義塾大学医学部循環器内科 牧野伸司准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くのご協力およびディスカッションを賜りました、久保田一石博士(第一三共 RD ノバーレ株式会社)、平井岳大博士(第一三共 RD ノバーレ株式会社)、永山貴弘博士(第一三共株式会社)、上田健二郎博士(第一三共株式会社)に心より感謝いたします。また、データの取得及び論文執筆にご協力を賜りました、多くの第一三共株式会社の関係者の皆様にこの場をお借りし感謝申し上げます。

最後に、日々の研究活動ならびに学位論文の執筆を応援し見守ってくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

## 引用文献

1. 平成 28 年 人口動態統計月報年計(概数)の概況 厚生労働省
2. Ponikowski P, Anker SD, Al Habib KF, Cowie MR, Force TL, et al. (2014) Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail* 1(1): 4-25.
3. Shimokawa H, Miura M, Nochioka K, Sakata Y (2015) Heart failure as a general pandemic in Asia. *Eur J Heart Fail* 17(9): 884-892.
4. Harikrishnan S, Sanjay G, Anees T, Viswanathan S, Vijayaraghavan G, et al. (2015) Clinical presentation, management, in-hospital and 90-day outcomes of heart failure patients in Trivandrum, Kerala, India: the Trivandrum Heart Failure Registry. *Eur J Heart Fail* 17(8): 794-800.
5. Nguyen E, Weeda ER, White CM (2016) A review of new pharmacologic treatments for patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. *J Clin Pharmacol* 56(8): 936-947.
6. Metra M, Carubelli V, Ravera, A, Stewart Coats AJ (2017) Heart failure 2016: still more questions than answers. *Int J Cardiol* 15(227): 766-777.
7. Jones NR, Hobbs FDR, Taylor CJ (2017) Prognosis following a diagnosis of heart failure and the role of primary care: a review of the literature. *BJGP Open* 1 (3): BJGP-2016-0021

8. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. (2013) Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 529-541.
9. Bers DM (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
10. Sobie EA, Lederer WJ (2012) Dynamic local changes in sarcoplasmic reticulum calcium: physiological and pathophysiological roles. *J Mol Cell Cardiol* 52(2): 304-311.
11. Bers DM (2006) Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology* 21: 380-387.
12. Louch WE, Sejersted OM, Swift F (2010) There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> handling. *J Biomed Biotechnol* 503906.
13. Sanderson JE (2007) Heart failure with a normal ejection fraction. *Heart* 93: 155-158.
14. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M (2010) Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res* 107(9): 1071-1082.
15. Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M (2010) Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 107(10): 1185-1197.
16. Anelli T, Sitia R (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 27(2): 315-327.

17. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
18. Kim I, Xu W, Reed, JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7: 1013-1030.
19. Minamino T, Kitakaze M (2010) ER stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 48: 1105-1110.
20. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, et al. (2010) X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48: 1280-1289.
21. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, et al. (2004) Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 110: 705-712.
22. Dally S, Monceau V, Corvazier E, Bredoux R, Raies A, et al. (2009) Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium* 45: 144-154.
23. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, et al. (2010) Ablation of C/EBP

homologous protein attenuates ER-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122: 361-369.

24. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, et al. (2006) Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 99: 275-282.

25. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, et al. (2007) Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 50: 1029-1037.

26. Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, et al. (2010) ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 49: 113-120.

27. Nishihama N, Abe Y, Kubota K, Nagayama T, Hirai T, et al. (2018) Identification of Fat Storage-Inducing Transmembrane Proteins 1 and 2 as Putative Therapeutic Targets for Heart Failure by Integrated Analysis of Proteome and Transcriptome. *J Proteomics Bioinform* 11: 173-182.

28. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, et al. (2012) Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 111(1): 131-150.

29. Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish *Nature*

Genetics 26, 216-220.

30. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2: 1896-1906.

31. Elias JE, Gygi SP (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4: 207-214.

32. Turner DL, Weintraub H (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8: 1434-1447.

33. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289–300.

34. Dzieciatkowska M, Hill R, Hansen KC (2014) GeLC-MS/MS analysis of complex protein mixtures. *Methods Mol Biol* 1156: 53-66.

35. Zhang M, Yamazaki T, Yazawa M, Treves S, Nishi M, et al. (2007) Calumin, a novel Ca<sup>2+</sup>-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 42: 83-90.

36. Yazawa M, Ferrante C, Feng J, Mio K, Ogura T, et al. (2007) TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature* 448: 78-82.

37. Margulies KB, Matiwala S, Cornejo C, Olsen H, Craven WA, et al. (2005) Transcription Patterns in Failing and Recovering Human Myocardium. *Circulation Research* 96:592-599.
38. Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, et al. (2002) The gene expression fingerprint of human heart failure. *PNAS* 99 (17) 11387-11392.
39. Stainier DYR, Raz E, Lawson ND, Ekker SC, Burdine RD, et al. (2017) Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet.* 19;13(10):e1007000.
40. Kadereit B, Kumar P, Wang WJ, Miranda D, Snapp EL, et al. (2008) Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(1): 94-99.
41. Gross DA, Zhan C, Silver DL (2011) Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(49): 19581-19586.
42. Miranda DA, Koves TR, Gross DA, Chadt A, Al-Hasani H, et al. (2011) Re-patterning of skeletal muscle energy metabolism by fat storage-inducing transmembrane protein 2. *J Biol Chem* 286(49): 42188-42199.
43. Yan C, Xia X, He J, Ren Z, Xu D, et al. (2015) MyoD is a novel activator of porcine FIT1 gene by interacting with the canonical E-box element during myogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 16(10) 25014–25030.

44. Mormeneo E, Jimenez-Mallebrera C, Palomer X, de Nigris V, Vazquez-Carrera M, et al. (2012) PGC-1 $\alpha$  induces mitochondrial and myokine transcriptional programs and lipid droplet and glycogen accumulation in cultured human skeletal muscle cells. PLoS One 7 e29985.F.
45. Miranda DA, Kim JH, Nguyen LN, Cheng W, Tan BC, et al. (2014) Fat storage-inducing transmembrane protein 2 is required for normal fat storage in adipose tissue. J. Biol. Chem. 289(14) 9560–9572.
46. Goh VJ, Tan JS, Tan BC, Seow C, Ong WY, et al. (2015) Postnatal deletion of fat storage-inducing transmembrane protein 2 (FIT2/FITM2) causes lethal enteropathy. J. Biol. Chem. 16;290(42) 25686–25699.
47. D.L. Silver. (2008) Regulation of lipid droplet formation by modulation of FIT1 and FIT2 and uses thereof. WO08088694 A2.
48. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. (2016) Lipid Use and Misuse by the Heart. Circ Res. 118(11) 1736-51.
49. Lehman JJ, Kelly DP. (2002) Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 29(4) 339–345.
50. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, aswal JS, Stanley WC. (2009) Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. Physiol. Rev. 90(1) 207–258.

51. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. (2013) Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 113(6) 709–724.

52. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, et al. (2018) Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 20;137(12):e67-e492.