

心疾患における心筋ミオシン重鎖
m R N A 遺伝子発現の動態

(01570551)

平成2年度科学研究費補助金（一般研究費C）
研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 松岡 瑠美子

東京女子医科大学付属日本心臓血圧研究所 循環器小児科 助手

研究組織

研究代表者：松岡瑠美子（東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所
循環器小児科 助手）

研究分担者：今村伸一郎（同 研究部 助手）
高尾 篤良（同 循環器小児科 名誉教授）
河田 正明（同 循環器小児外科 助手）
黒沢 博身（同 循環器小児外科 助教授）
今井 康晴（同 循環器小児外科 教授）

研究経費

平成元年度	1, 100 千円
平成2年度	1, 000 千円
計	2, 100 千円

研究発表

1) 学会誌等

1) 松岡瑠美子, 他: 遺伝子工学を導入した心臓病成因解明へのアプローチ.
(財)日本心臓血圧研究振興会昭和62年度研究業績集 pp1-25, 1989.

2) Rumiko Matsuoka, et al: Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosomal region 14q11.2-q13. Am.J.Med.Gen. 1989;32: 279-284.

3) 松岡瑠美子, 他: ヒト心筋ミオシン重鎖 (MHC) 遺伝子の構造と染色体上の位置決定. Jpn.Circ.J. 1989;53:904.

4) 今村伸一郎, 他: 一側性心臓圧負荷による負荷側心室筋および対側心室筋のミオシン重鎖遺伝子発現の制御. Jpn.Circ.J. 1989;53:604-905.

5) 柴田利満, 他: 異なった収縮速度をもつ摘出乳頭筋に及ぼすカテコールアミンの影響. Jpn.Circ.J. 1989;53:586.

6) 松岡瑠美子, 他: 脊椎動物の進化に伴う心臓の発達. 心筋ミオシン重鎖に関する生化学的, 遺伝子工学的アプローチ. (財)日本心臓血圧研究振興会昭和63年度業績集 pp7-12, 1990.

7) Shin-ichiro Imamura, et al: Local response to cardiac overload on myosin heavy chain gene expression and isozyme transition. Circ.Res. 1990;66:1067-1073.

8) Rumiko Matsuoka, et al: Molecular cloning and chromosomal localization of a gene coding for human cardiac myosin heavy-chain. Jpn.Circ.J. 1990;54:1206-1213.

9) 今村伸一郎, 他: 右心室圧負荷解除後の心筋ミオシン重鎖アイソザイムの変換動態. Jpn.Circ.J. 1990;54:851.

10) 柴田利満, 他: 後負荷が左室心筋収縮速度に及ぼす影響. Jpn.Circ.J. 1990;54:902-903.

11) Toshimitsu Shibata, et al: Developmental change in contractile rate of cardiac myofilaments and effect of isoproterenol on their rate. Biophys.J. 1990;57:551a.

12) 柴田利満, 他: 摘出心室筋単収縮のTime-to-Peak Forceは心筋収縮速度を反映するか? 日本小児循環器学会誌 第26回日本小児循環器学会抄録集 1990;6:181.

13) 吉田迪弘, 他: ヒト心筋ミオシン重鎖遺伝子 (MYH6およびMYH7) の染色体マッピング. 人類遺伝学雑誌 1990;35:39.

14) Shin-ichiro Imamura, et al: Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. Am.J.Physiol. 1991;260:H73-H79.

15) 松岡瑠美子, 他: 脊椎動物の進化に伴う心臓の発達. 心筋ミオシン重鎖に関する生化学的, 遺伝子工学的アプローチ. (2年目) (財)日本心臓血圧研究振興会平成元年度業績集 1991, in press.

2) 口頭発表

1) 松岡瑠美子, 他: 肥大型心筋症における心筋ミオシン重鎖DNA遺伝子の制限酵素による切断部位の多型. 日本循環器学会総会 1991年4月2日発表予定.

2) 今村伸一郎, 他: 心筋ミオシン重鎖アイソザイムの変換動態は左右心室で異なるか? 日本循環器学会総会 1991年4月2日発表予定.

3) 出版物

1) 松岡瑠美子: 心臓の発達. 臨床発達心臓病学(高尾篤良 編集). 中外医学社 pp10-13, 1989.

2) Rumiko Matsuoka, et al: Human cardiac myosin heavy-chain gene mapped within chromosomal region 14q11.2-q13. In New Haven Human Gene Mapping Library Chromosome Plots. Yale University Howard Huges Medical Institute. pp34-35, 1989.

3) Rumiko Matsuoka, et al: Molecular cloning and chromosomal localization of a gene coding for human cardiac myosin heavy chain. In Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function. (eds) E.B. Clark and A. Takao. Futura, New York. pp27-39, 1990.

4) Shin-ichiro Imamura, et al: Adaptational changes of myosin heavy chain gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. In Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function. (eds) E.B. Clark and A. Takao. Futura, New York. pp79-93, 1990.

心疾患における心筋ミオシン重鎖 mRNA 遺伝子発現の動態

松岡瑠美子，今村伸一郎^{*}，高尾篤良，
河田正明^{**}，黒沢博身^{**}，今井康晴^{**}

東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所 循環器小児科

* 同 研究部

** 同 循環器小児外科

[要旨]

心筋ミオシン重鎖(MHC)タイプには α および β の2種が存在する。これらは心臓に対する薬理的，物理学的，生理学的作用により α から β へ，または β から α へと変換されることが，多くの動物実験より明らかにされている。しかしヒトにおける研究は種々の技術的障害により遅れているのが現状である。本研究ではヒト心筋MHC 遺伝子発現ならびにアイソザイムの動態を知る方法を確認すべく，S1ヌクレアーゼマッピング法によるmRNA検索ならびにピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法によるアイソザイムの検索を行い，臨床応用への有用性について検討した。その結果，両方法の臨床応用の有用性が確認され，心臓病の病態，進行状況の把握に大きく役立つ可能性が示唆された。

[緒言]

心筋の収縮に関与する重要な蛋白の1つであるミオシン重鎖(MHC) 遺伝子には、 α および β の2種類が存在し、これに相当するアイソザイムとしてV1($\alpha\alpha$), V2($\alpha\beta$), V3($\beta\beta$)の3種類の存在が知られている¹⁾。我々はこの遺伝子発現が、発達、ホルモン、薬物、心臓圧負荷等により変化することを動物実験にて確認してきた²⁻⁸⁾。また、これらの因子によるMHC 遺伝子発現は、蛋白レベルに先行して起こることが確認されている^{2,5,8)}。これらの成果に基づき、本研究ではヒト心筋MHC 遺伝子発現ならびにアイソザイムの動態を知る方法を確立し、心臓疾患の病因ならびに病状の変化を早期に把握する道を開くことを目的とし、S1ヌクレアーゼマッピング法ならびにピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法の臨床応用への有用性について検討した。

従来、ヒト心筋MHC タイプを解析するにはモノクローナル抗体⁹⁾による組織染色が主流であったが、 α 、 β 特異的抗体を得ることが難しいこと、組織中における α (V1)と β (V3)の比率が求めにくいこと等問題点が多かった。ATPase活性の測定^{10,11)}の応用も試みられているが、これは直接アイソフォームの量の割合を見ているわけではない。遺伝子を直接検出する方法としてNorthern Blotting 法が活用されたが、これは方法論的に問題があり、抽出したtotal RNA 中のDNA 量がサンプルにより異なること、正確に等量のtotal RNA サンプルを別々のゲルに泳動することが困難であること、Northern Blotting 法は定性または量的に大きく異なるサンプル間の比較には向くが、上記の理由により誤差が多いため、量的にあまり差のないものの定量には不向きである。また、ピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法によるヒト心筋MHC の分離は、従来不可能とされてきた^{12,13)}。これらの理由から、ヒトにおける心筋MHC アイソフォームと循環動態の臨床的分析は進んでいなかった。

我々は、S1ヌクレアーゼマッピング法により、 α および β -MHC mRNA 遺伝子発現の比率が正確に検出できることを、動物実験により確認している^{8,14)}。また、ピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法では、ゲルの組成を再検討することにより、ヒト心筋MHC アイソザイムの電気泳動による分離に初めて成功した¹⁵⁾。

本研究では、先天性心疾患患者の心筋生検標本を材料とし、S1ヌクレアーゼマッピング法によるMHC mRNA遺伝子発現検索と共にピロリン酸アクリルアミドゲル

電気泳動法によるアイソザイムの検索を行い，両方法の臨床応用への有用性について検討した．

[方法]

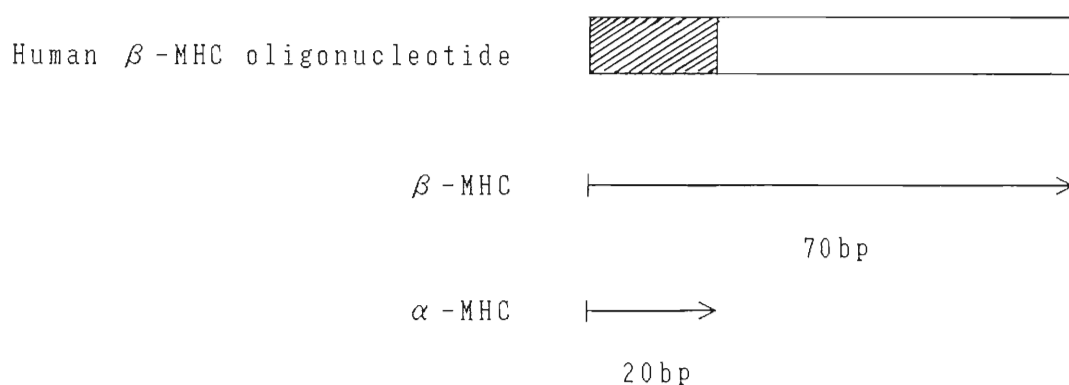
1). 材料

心筋材料としては，先天性心疾患（ファロー四徴症，大血管転換症，心房および心室中隔欠損症等）患者の心房および心室筋生検標本を用いた．手術時に採取された心筋は直ちに液体窒素にて凍結し， -80°C に保存した．

2). S1ヌクレアーゼマッピング法

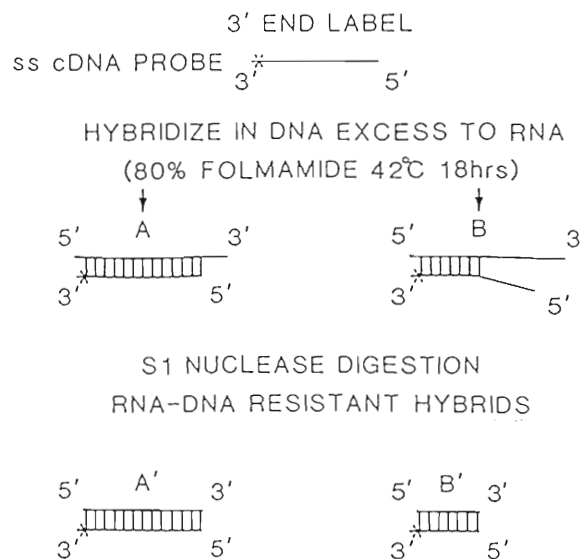
ヒト心筋cDNAライブラリーより α および β -MHC cDNAを単離して，これらの塩基配列を調べ，この一部塩基配列よりオリゴヌクレオチドをDNA合成機（DNA synthesizer, MilliGen）により合成し，これをプローブとしてS1ヌクレアーゼマッピング法に供した（図1）．

図1．



心筋標本よりホットフェノール法¹⁶⁾によりRNAを抽出し、実験開始まで-20℃エタノール中に保存した。用意されたプローブの3'末端を³²Pで標識し、抽出されたRNA 30μgと、80%ホルムアミド存在下で、42℃、18時間ハイブリダイゼーションさせた。続いてS1ヌクレアーゼ消化処理を行い(図2)、8.3Mウレア加6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った¹⁷⁾。

図 2 .



αおよびβ-MHC mRNAの量の比率は、オートラジオグラフからレーザーデンシトメーター(Ultrosan XL, Pharmacia LKB)により読み取り、Gaussian曲線より算出した。

3). ピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法

mRNA検索に用いた心筋標本の一部(約5mg)から、Hasselbach-Schneider液によりミオシンを抽出した¹⁸⁾。電気泳動法はHohら¹⁾の方法に準じて行ったが、アクリルアミドの量を約6%とした。分離されたアイソザイムをレーザーデンシトメーターで読み取り、Gaussian曲線より各アイソザイムの比率を算出した。

[結果]

図3はS1ヌクレアーゼマッピング法によるヒト心筋MHC mRNAのオートラジオグラフの1例である。図に示すごとく、 α および β -MHC mRNAの検出が非常に明瞭であることがわかる。また、心筋標本約50mgより抽出されたRNAは約70 μ gであり、S1ヌクレアーゼマッピング法を行うのに十分な量が抽出できることも判明した。

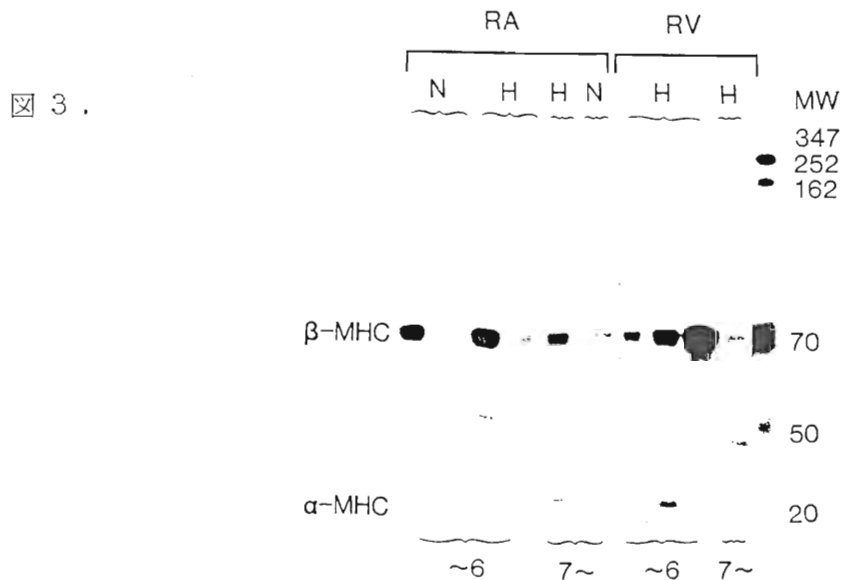


図4はピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法によるヒト心筋MHCアイソザイムの泳動像の1例である。図に示すごとく、2本のバンドが検出された。この2本のバンドは、Western Blotting法により転写した蛋白を抗MHCポリクローナル抗体¹³⁾で染色したところ、両バンドともに染色されたため(データは示していない)、心筋MHCアイソザイムであると判定した。

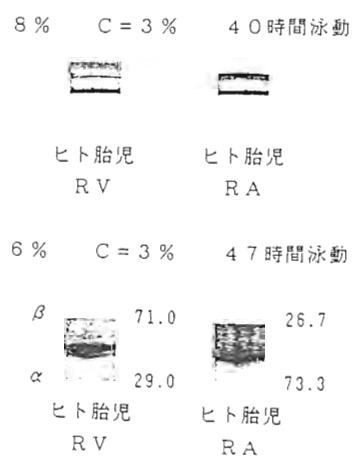










図4.

ヒト胎児心筋MHCアイソザイムのピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法による分離
2つのアイソフォームに分離されている。
RV: 右心室, RA: 右心房

図5は今回検索した患者の一部の結果を示したものである。心房筋では、従来の報告通り正常では α タイプMHCアイソザイムの割合が70%以上を占めるため、心臓負荷によるアイソザイムの β 化が著明に確認された。しかし心室筋では、正常でも β タイプMHCアイソザイムの占める割合が非常に高いため、心臓負荷によるアイソザイムの変化が顕著ではなかった。

図5.

患者名	年齢	診断	血圧	MHC泳動像
J. T	11M	VSD (I+II), PH	RA a=10 (5.5)	 50.2 49.8
M. K	1Y	VSA, PDA, CoA (post subclavian flape, PAB)	RA a=8.5 (6) v=7.5	 71.4 28.6
S. F	1Y3M	VSD (III), PH, MS	RA a=6 (5)	 42.0 58.0
K. M	4Y6M	VSD (II), Infundibular PS	RA a=7.5 (5) v=5	 41.8 58.2
			RV 125 EDP 5	 92.7 7.3
M. T	5Y6M	DORV [S, D, L], VSD, Criss-Cross Heart, PFO, Straddling MV	RA a=9/0.5 (5.5)	 51.4 48.6
			LA a=7.5 (6.0)	 35.7 64.3
K. H	2Y	ASD (II)	-----	 34.4 65.6

先天性心疾患患者の心房または心室筋の変化による心筋MHCアイソフォームの変換例

VSD: 心室中隔欠損症, PH: 肺高血圧症, PDA: 動脈管開存症, CoA: 大動脈縮窄症, PAB: 肺動脈絞扼, MS: 僧帽弁狭窄症,

PS: 肺動脈狭症, PFO: 卵円孔開存症, DORV: 两大血管右室起始症, MV: 僧帽弁, ASD: 心房中隔欠損症, RA: 右心房,

RV: 右心室, LA: 左心房

[考察]

新しく作成したヒト心筋MHCオリゴヌクレオチドをプローブとし、ヒト心筋生検標本を用いてS1ヌクレアーゼマッピング法によるmRNA遺伝子発現の検索を行ったところ、非常に正確な検索が行えることが確認され、また、心筋生検時に得られる約50mgという少量の標本から、mRNAの検索が十分に行えることも確認された。一方、ピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法では、ゲルの組成を再検討することにより、ヒト心筋MHCアイソザイムの電気泳動による分離に初めて成功した。また、この方法はS1ヌクレアーゼマッピング法よりさらに少量(5mg)の標本での検索が可能であることも確認された。

心筋MHCタイプが心臓圧負荷により α から β へ変換されることは多くの動物実

験から確認されている^{2,3,4,7,8}). また, 負荷に対して心筋が適応できると, このMHC タイプの変換が停止することも確認されている⁸). これらの実験結果を臨床の場で活用することにより, 心臓病の病態の程度, 進行状況等を把握するための大きな指標とすることができる. 即ち, S1ヌクレアーゼマッピング法またはピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法を臨床応用することにより, 遺伝子レベルまたは蛋白レベルでの検索が可能となる. 特にピロリン酸アクリルアミドゲル電気泳動法による検索は, 標本量が極めて少量(5mg) で検索できるため, 臨床での活用が大いに期待される.

今後の課題としては, 現在臨床面で使用されている心臓力学的, 生理学的指標と遺伝子あるいは蛋白レベルでの α および β -MHCの比率がどのような相関を示すかについて検討する必要があると考えられる.

[文献]

1. Hoh JFY, McGrath PA, Hale HT: Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. J.Mol.Cell Cardiol. 1978;10:1053-1076.
2. Matsuoka R, Mahdavi V, Nadal-Ginard B: α - and β -myosin heavy chain gene expression in response to systolic overload hypertrophy. Circulation 1984;70 (suppl II):196.
3. Imamura S, Matsuoka R, Nakanishi T, Takao A: Change in α and β myosin heavy chain in coarctated rat heart. Jpn.Circ.J. 1986;50:720.
4. 松岡瑠美子: 心筋ミオシン重鎖遺伝子. 小児医学 1987;20:941-959.
5. Matsuoka R, Komatsu K, Takao A: Change in α and β myosin heavy chain gene in hypothyroid rat heart after treatment with caffeine.

Circulation 1985;72 (suppl III):328.

6. Imamura S, Matsuoka R, Hiratsuka E, Kimura M, Takao A: The effect of caffeine, theophylline and cyclic AMP on the expression of the cardiac myosin heavy chain gene. Jpn.Circ.J. 1987;51:951.

7. Imamura S, Matsuoka R, Hiratsuka E, Kimura M, Nishikawa T, Takao A: Local response to cardiac overload on myosin heavy chain gene expression and isozyme transition. Circ.Res. 1990;66:1067-1073.

8. Imamura S, Matsuoka R, Hiratsuka E, Kimura M, Nakanishi T, Nishikawa T, Furutani Y, Takao A: Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. Am.J.Physiol. 1991;260:H73-H79.

9. Tsuchimochi H, Sugi M, Kuro-o M, Ueda S, Takaku F, Furuta S, Shirai T, Yazaki Y: Isozymic changes in myosin of human atrial myocardium induced by overload: Immunohistochemical study using monoclonal antibodies. J.Clin.Invest. 1984;74:662-665.

10. Urthaler F, Walker AA, Hefner LL, James TN: Comparison of contractile performance of canine atrial and ventricular muscles. Circ.Res. 1975;37:762-771.

11. Scheuer J, Bhan AK: Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphatase activity and physiological function. Circ.Res. 1979;45:1-12.

12. Mercadier JJ, Bouveret P, Gorza L, Shiaffino S, Clark WA, Zak R, Swynghedauw B, Schwartz K: Myosin isozymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. Circ.Res. 1983;53:52-62.

13. Schwartz K, Apstein C, Mercadier JJ, Lecarpentier Y, Bastie D, Bouveret P, Wisnewsky C, Swynghedauw B: Left ventricular isomyosins in normal and hypertrophied rat and human hearts. *Eur.Heart J.*1984;5:77-83.
14. 平塚江里子, 今村伸一郎, 木村美佐, 高尾篤良, 松岡瑠美子: S1ヌクレアーゼマッピング法応用による心筋ミオシン重鎖mRNA遺伝子発現検索.
Jpn.J.Clin.Pathol. 1987;補35:297.
15. 松岡瑠美子, 今村伸一郎, 古谷喜幸, 平光厲司, 高尾篤良: 脊椎動物の進化に伴う心臓の発達. 心筋ミオシン重鎖に関する生化学的, 遺伝子工学的アプローチ. (財)日本心臓血圧研究振興会 昭和63年度研究業績集 pp7-12, 1990.
16. Soeiro R, Birnboim H, Darnell H: Rapidly labeled HeLa cell nuclear RNA: II. Base composition and cellular location of a heterogeneous RNA fraction. *J.Mol.Biol.* 1966;19:362-373.
17. Berk AJ, Sharp PA: Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids.
Cell 1977;12:721-732.
18. Takano-Ohmuro H, Obinata T, Masaki T, Mikawa T: Changes in myosin isozymes during development of chicken breast muscle.
J.Biochem. 1982;91:1305-1311.
19. Pollard TD, Fujiwara K, Niederman R, Maupin-Szamier P: Evidence for role of cytoplasmic actin and myosin in cellular structure and motility. In *Cell Motility*. (eds) R. Goldman, T. Pollard and L. Taylor. Cold Spring Harbor Laboratory. pp689-724, 1976.