

## <研究課題> 加齢性心不全におけるプロテオスタシス破綻の病態解明研究

代表研究者 昭和大学臨床薬理研究所 講師 清水 峻志  
共同研究者 東京大学アイソトープ総合センター 准教授 川村 猛

### 【抄録】

本研究は、加齢による心筋細胞の老化メカニズムを、タンパク質恒常性維持機構（PS）と PERK シグナリングの観点から解明することを目的としています。PERK シグナリングが PS を維持し、心保護作用を持つことが既に報告されており、本研究では特に老化マーカーである PD-L1 と SGLT2 の発現に焦点を当てました。若年および高齢の PERK ノックアウト（KO）マウスとコントロールマウスを比較した結果、高齢 PERK KO マウスでのみ PD-L1 と SGLT2 の発現が顕著に増加していることが確認された。さらに、PD-L1+心筋細胞では、タンパク質翻訳開始因子と PERK 結合タンパク質である FLNA の発現が RNA およびタンパク質レベルで亢進していた。今後、老化マーカーである PD-L1 および SGLT2 の発現がこれらの因子によってどのように制御されるかを解明する必要がある、研究成果は学会や学術誌で公表する予定である。

### 1. 研究の目的

心筋細胞では加齢に伴いタンパク質恒常性維持機構(proteostasis, PS)が破綻する。タンパク質凝集体の基となる異常タンパク質が小胞体内に蓄積すると、小胞体ストレス応答(unfolded protein response;UPR)が誘発される。UPR の支流である PERK シグナリングは PS を維持し、細胞老化を抑制することが分かっている。申請者は、PERK シグナリングは心保護的に作用することを報告してきた(iScience, 2020)。そこで、心臓老化に内在する分子メカニズムを PERK と PS の観点から解明することを本研究の目的とした。とりわけ、最近老化マーカーとして注目されている PD-L1、SGLT2 などの発現の差異から検証することとした。

### 2. 研究方法と経過

2-1 心臓における老化マーカーの発現解析  
若年(2 ヶ月齢)、高齢(18~28 ヶ月齢)の PERK コントロール(WT)/ノックアウト(KO)マウス心臓切片を PD-L1、SGLT2 で免疫染色したところ、高齢 PERK KO マウスのみ、PD-L1、SGLT2 が発現していた(図 1)。さらに、これらのマウスから単離した心筋細胞に対し flowcytometry を行ったところ、PD-L1+及び PD-L1+/SGLT2+ 心筋細胞の発現が高齢 PERK KO マウスにおいて、高齢 PERK WT マウスに比べて亢進していた(図 2)。

2-2 トランスクリプトーム解析  
高齢 PERK WT/KO マウス由来の PD-L1+単

離心筋細胞に対し、トランスクリプトームを行ったところ、タンパク質翻訳開始因子(Eif5 等)の発現が亢進していた一方で、ミトコンドリア機能に関する遺伝子(Slc25a4 等)の発現が低下していた(図 3)。

### 2-3 プロテオーム解析

高齢 PERK WT/KO マウス由来の単離心筋細胞の細胞膜分画に対しプロテオーム解析を行ったところ、PERK 結合タンパク質である FLNA の発現が高齢 PERK KO マウスで亢進していた(図 4)。

### 3. 研究の成果

#### 3-1 免疫染色

高齢 PERK KO マウスで老化マーカー(PD-L1、SGLT2)の発現が亢進していた

#### 3-2 トランスクリプトーム解析

高齢 PERK KO マウス由来 PD-L1+単離心筋細胞ではタンパク質翻訳開始因子の発現が RNA レベルで亢進していた。

#### 3-3 プロテオーム解析

高齢 PERK KO マウス由来の単離心筋細胞の細胞膜分画では、FLNA の発現がタンパク質レベルで亢進していた。

### 4. 今後の課題

PD-L1、SGLT2 の発現がタンパク質翻訳開始因子、FLNA によりどのように制御されているか解明する必要がある。

## 5. 研究成果の公表方法

学会（日本循環器学会や米国心臓病学会）や学術誌（Nature 姉妹紙等）での公表を予定している。

以上

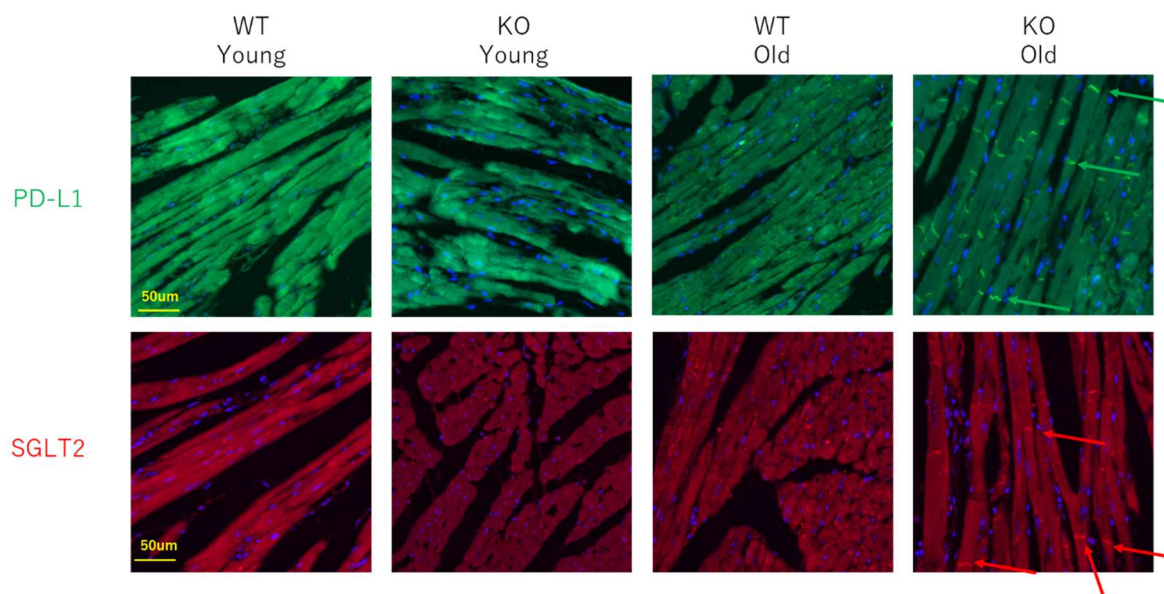


図1. 若年(2ヵ月齢)、高齢(18~28ヵ月齢)のPERKコントロール(WT)/ノックアウト(KO)マウス心臓をPD-L1、SGLT2で免疫染色を行った。矢印の部位にそれぞれ発現が亢進していた。

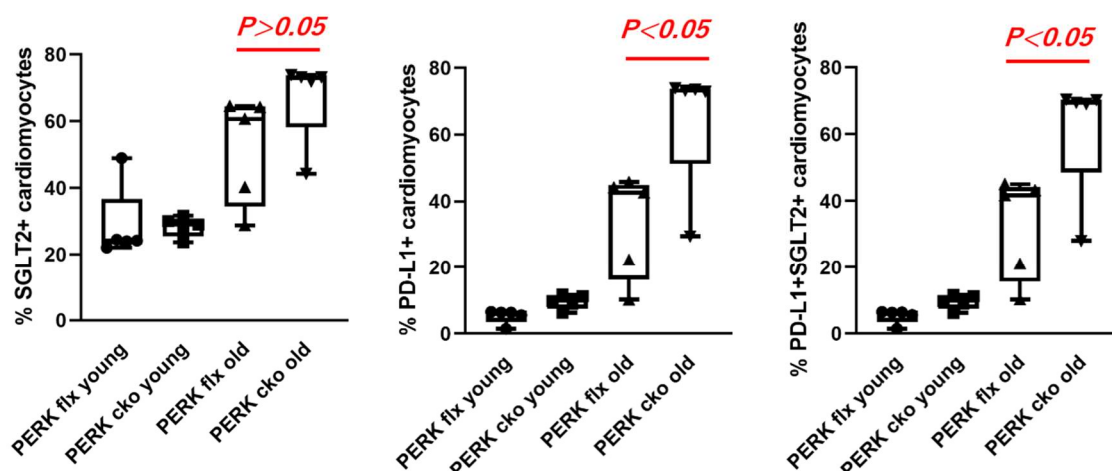


図2. 若年(young)、高齢(old)のPERKコントロール(fl x)/ノックアウト(cko)マウス由来単離心筋細胞に対し、flowcytometryを行った。

PERK KO由来PD-L1+  
心筋細胞で発現が亢進

PERK KO由来PD-L1+  
心筋細胞で発現が低下

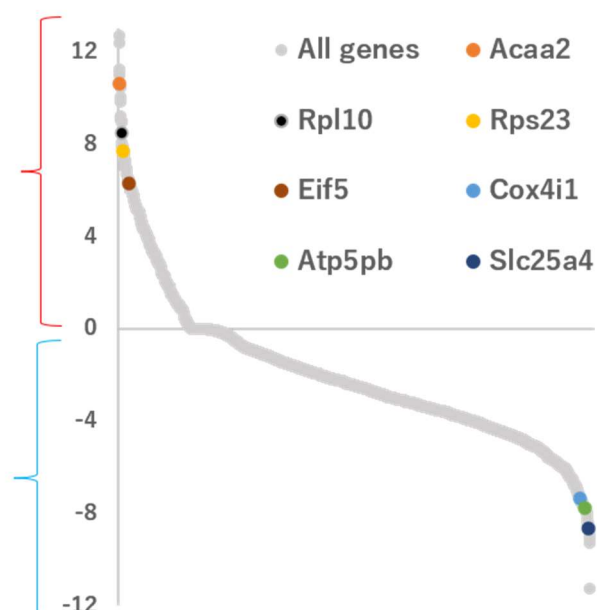


図3. 高齢のPERK WT/KOマウス由来PD-L1+心筋細胞に対し、トランスクリプトーム解析を行った。

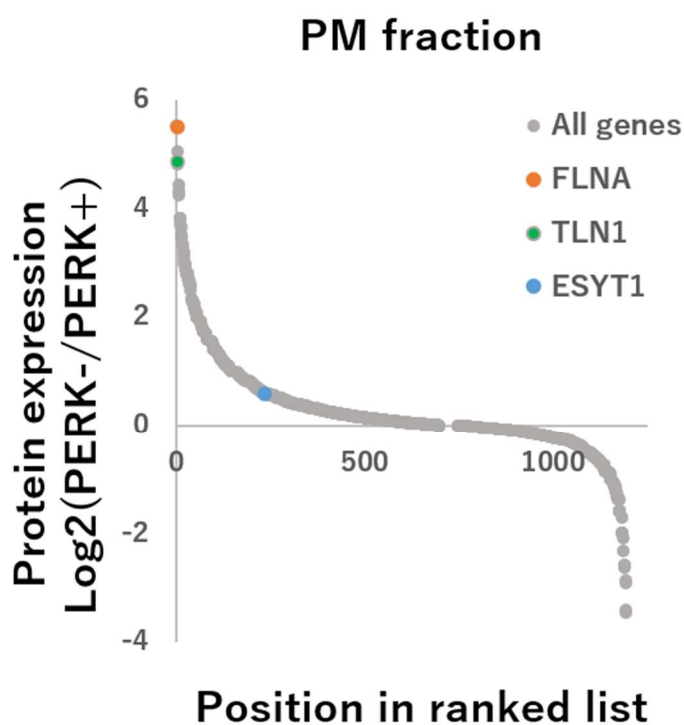


図4. 高齢のPERK コントロール(+)/ノックアウト(-)マウス由来心筋細胞の細胞膜分画に対し、プロテオーム解析を行った。

# Research to elucidate the pathophysiology of proteostasis failure in age-related heart failure

**Primary Researcher:** Takashi Shimizu  
Lecturer, Showa University  
**Co-researchers:** Takeshi Kawamura  
Associate Professor, University of Tokyo

## Abstract

This study aims to elucidate the mechanisms of myocardial cell aging due to aging from the perspectives of proteostasis (PS) and PERK signaling. PERK signaling has been previously reported to maintain PS and have cardioprotective effects. In this study, particular focus was placed on the expression of aging markers PD-L1 and SGLT2. By comparing young and aged PERK knockout (KO) mice with control mice, it was found that only in aged PERK KO mice, the expression of PD-L1 and SGLT2 was significantly increased. Furthermore, in PD-L1+ cardiomyocytes, the expression of protein translation initiation factors and the PERK-binding protein FLNA was enhanced at both RNA and protein levels. Future studies will need to clarify how the expression of aging markers PD-L1 and SGLT2 is regulated by these factors. The research findings are planned to be published in academic journals and presented at conferences.

## 1. Aim of Research

In cardiomyocytes, proteostasis (PS), which maintains protein homeostasis, becomes disrupted with aging. Accumulation of aberrant proteins, which serve as the basis for protein aggregates, occurs within the endoplasmic reticulum (ER), leading to the induction of the unfolded protein response (UPR). It is known that a UPR branch called PERK signaling helps maintain PS and suppress cellular aging. The applicant has previously reported that PERK signaling has a cardioprotective effect (*iScience*, 2020). Therefore, the purpose of this study is to elucidate the molecular mechanisms underlying cardiac aging from the perspectives of PERK and PS. Specifically, the study aims to investigate differences in the expression of recently recognized aging markers such as PD-L1 and SGLT2.

## 2. Method of Research & Progression

### 2-1 Expression Analysis of Aging Markers in the Heart

Immunostaining was performed on heart sections from young (2 months old) and aged (18–28 months old) PERK control (WT)/knockout (KO) mice using PD-L1 and SGLT2 antibodies. Interestingly, only aged PERK KO mice exhibited expression of PD-

L1 and SGLT2 (Figure 1). Additionally, flow cytometry analysis of isolated cardiomyocytes from these mice revealed an upregulation of PD-L1+ and PD-L1+/SGLT2+ cells in aged PERK KO mice compared to aged PERK WT mice (Figure 2).

### 2-2 Transcriptome Analysis

Transcriptome profiling was conducted on PD-L1+ isolated cardiomyocytes derived from aged PERK WT/KO mice. The expression of protein translation initiation factors (such as Eif5) was enhanced, while genes related to mitochondrial function (such as Slc25a4) showed decreased expression (Figure 3).

### 2-3 Proteome Analysis:

Proteome analysis of membrane fractions from isolated cardiomyocytes of aged PERK WT/KO mice revealed elevated expression of FLNA, a protein known to interact with PERK (Figure 4).

## 3. Results of Research

### 3-1 Immunostaining:

In aged PERK knockout (KO) mice, the expression of aging markers (PD-L1, SGLT2) was upregulated.

### 3-2 Results of Transcriptome Analysis

In PD-L1+ isolated cardiomyocytes derived from aged PERK KO mice, the expression of protein translation initiation factors was elevated at the RNA level.

### 3-3 Results of Proteome Analysis

In membrane fractions of isolated cardiomyocytes from aged PERK KO mice, the expression of FLNA was increased at the protein level.

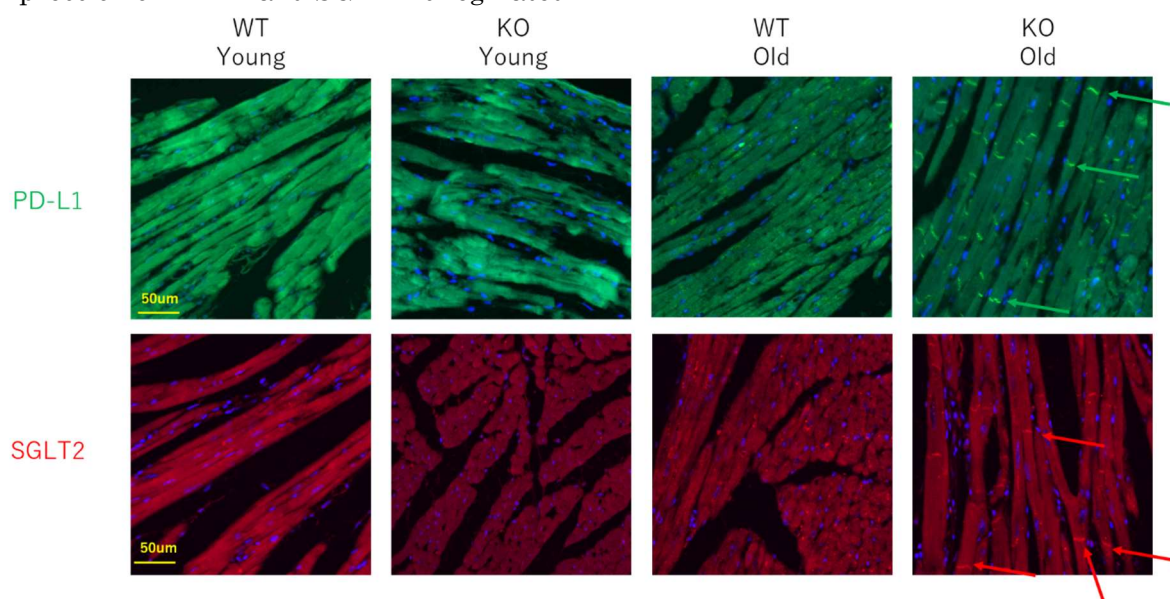
## 4. Future Area to Take Note of, and Going Forward

It is necessary to elucidate how the expression of PD-L1 and SGLT2 is regulated

by protein translation initiation factors and FLNA.

## 5. Means of Official Announcement of Research Results

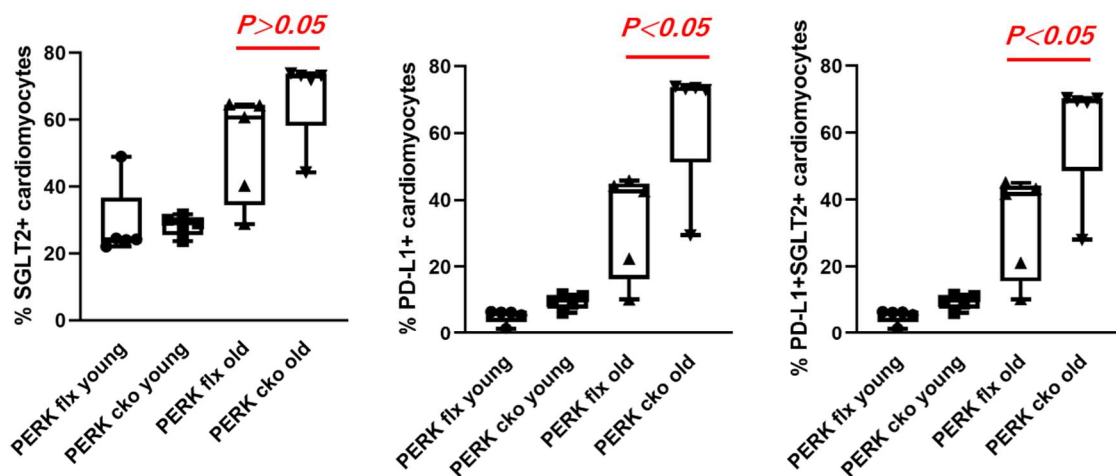
We plan to publish our research findings in conferences (such as the Japanese Circulation Society or the American Heart Association) and academic journals (including Nature-affiliated journals).



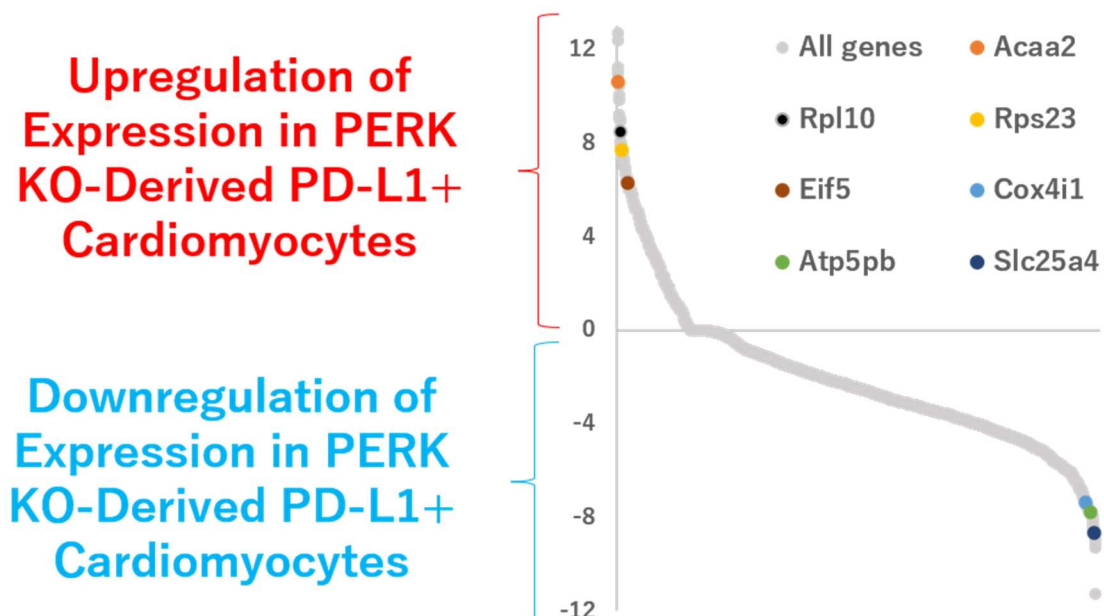
**Figure 1. Immunostaining of Hearts from Young and Aged PERK Control (WT)/Knockout (KO) Mice:**

Heart sections from young (2 months old) and aged (18–28 months old) PERK WT/KO mice were immunostained using **PD-L1** and **SGLT2** antibodies. Enhanced expression was observed at the indicated sites (arrows).

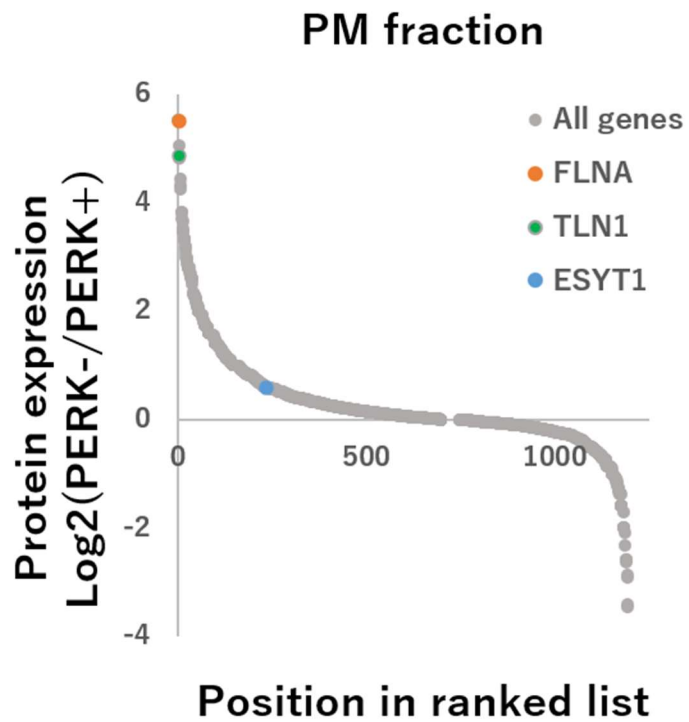




**Figure 2. Flow Cytometry on Isolated Cardiomyocytes from Young and Aged PERK Control (flx)/Knockout (cko) Mice:**  
Flow cytometry analysis was performed on isolated cardiomyocytes derived from young (young) and aged (old) PERK control (flx)/knockout (cko) mice.



**Figure 3. Transcriptome Analysis of PD-L1+ Cardiomyocytes from Aged PERK WT/KO Mice:**  
Transcriptome analysis was conducted on PD-L1+ cardiomyocytes isolated from aged PERK WT/KO mice.



**Figure 4. Proteome Analysis of Membrane Fractions from Cardiomyocytes of Aged PERK Control (+)/Knockout (-) Mice:** Proteome analysis was carried out on membrane fractions from cardiomyocytes of aged PERK +/- mice.

# Research to elucidate the pathophysiology of proteostasis failure in age-related heart failure

**Primary Researcher:** Takashi Shimizu  
Lecturer, Showa University  
**Co-researchers:** Takeshi Kawamura  
Associate Professor, University of Tokyo

This study aims to elucidate the mechanisms of myocardial cell aging due to aging from the perspectives of proteostasis (PS) and PERK signaling. PERK signaling has been previously reported to maintain PS and have cardioprotective effects. In this study, particular focus was placed on the expression of aging markers PD-L1 and SGLT2. By comparing young and aged PERK knockout (KO) mice with control mice, it was found that only in aged PERK KO mice, the expression of PD-L1 and SGLT2 was significantly increased. Furthermore, in PD-L1+ cardiomyocytes, the expression of protein translation initiation factors and the PERK-binding protein FLNA was enhanced at both RNA and protein levels. Future studies will need to clarify how the expression of aging markers PD-L1 and SGLT2 is regulated by these factors. The research findings are planned to be published in academic journals and presented at conferences.