

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09145

研究課題名(和文) 転写因子とDNA損傷応答因子による心不全の分子機構解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism and treatment application of heart failure by transcription factor and DNA damage response factor

研究代表者

相澤 健一 (Aizawa, Kenichi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70436484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は負荷に対する適応として心筋リモデリングを生ずる。すでに多くの心肥大誘導因子が知られているが、心不全に至る適応破綻の機構は十分に解明されていない。我々はこれまでに心筋間質細胞の転写因子KLF5が負荷適応に重要であり、KLF5のアセチル化は*in vitro*で細胞増殖に関わることを示してきた。本研究では、KLF5分子のアセチル化とDNA修復因子(ATM等)に着目し、個体レベルで心臓の適応と破綻における役割を明らかにした。KLF5の非アセチル化変異マウスとATM欠損マウスは心臓の発達や肥大に異常を生ずることが明らかになった。さらにこれらと相互作用する因子を単離し、新しい治療標的を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は近年増加しつつある高血圧性心疾患、虚血性心疾患の最終病態であり、この問題を解決することは臨床的のみならず社会的にも重要である。これまでの心不全の薬物治療は心不全状態で活性化される細胞外の神経・体液性因子を標的としたものであった。本研究は動脈硬化、心肥大が転写因子とその相互作用因子により制御されることを明らかにし、その鍵分子である転写因子KLF5とDNA損傷応答機構が、心肥大・心不全の発症機序の鍵となる可能性を示した。すなわち、本研究は心筋リモデリングにおける病態生理の解明、ひいては新規治療薬開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The heart causes myocardial remodeling as an adaptation to load. Although many cardiac hypertrophy inducers are already known, the mechanism of adaptive failure leading to heart failure has not been fully elucidated. We have previously shown that the cardiac stromal cell transcription factor KLF5 is important for load adaptation, and that acetylation of KLF5 is involved in cell proliferation *in vitro*. In this study, we focused on the acetylation of KLF5 molecule and DNA repair factor (ATM etc.) and clarified the role in adaptation and failure of the heart at individual level. It has been revealed that KLF5 non-acetylated mutant mice and ATM deficient mice produce abnormalities in cardiac development and hypertrophy. Furthermore, we isolated factors that interact with them and identified new therapeutic targets.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：循環器内科学 分子心臓学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管細胞は代謝的、虚血、物理的負荷などによる傷害を受けた際、適応・修復のための機転としてリモデリングを生じ、その破綻は心血管組織の機能不全を来す。すでに多くの心肥大誘導因子が知られているが、心不全に至る適応破綻の機構は十分に解明されていない。

我々は転写因子 KLF5 が活性化刺激や組織リモデリングを受けて心血管障害時の急性反応を司る主要な因子であることを、遺伝子改変マウスの解析から明らかにした(*Nat Med* 2002)。KLF5 の活性を人為的に制御できれば KLF5 の活性化により惹起される病態を制御し得るという仮説を立て、生化学的解析により KLF5 の相互作用因子の単離とその機能解析を行った。その結果、ヒストンアセチル化酵素 p300、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC、ヌクレオソーム形成・破壊を行うヒストンシャペロン SET と ANP32B、DNA 修復因子 PARP-1 を同定し(*Mol Cell Biol* 2003, *J Biol Chem* 2004, *J Biol Chem* 2005, *J Biol Chem* 2007, *Mol Cell Biol* 2008)、これらの因子が KLF5 分子の 369 番目のリジン残基をアセチル化・脱アセチル化し、in vitro で細胞増殖に関わることを示した。

同時に、我々は、DNA 損傷と慢性疾患との関連にも着目してきた。細胞の DNA 修復能力はその正常な機能と個体の恒常性の維持にとって重要である。細胞が老化状態に達し、DNA 修復機能の効率低下をもたらすような遺伝子発現調節の変化が起こると、結果として疾患が発症する。我々は、プロテオミクスを用いて KLF5 の相互作用因子の包括的単離手法を開発し、ATM (ataxia telangiectasia mutated)等の DNA 損傷応答に重要な因子群が複合体に含まれること、マウスモデルを用いて、ATM は血管の負荷応答に重要であり、血管保護の治療標的となり得ることを明らかにした(*J Biol Chem* 2010)。また、予備検討にて ATM は心臓の負荷応答においても重要であることを見いだしている(*Cardiovasc Res* 2016)。さらに、ATM 欠損マウスでは心肥大が減弱する予備データも得た。

2. 研究の目的

本研究では、KLF5 のアセチル化と DNA 損傷応答因子 (ATM 等) に着目し、種々の遺伝子改変マウスを用いて、心不全に至る適応破綻の機構を明らかにする。心肥大等の心筋リモデリングにおける増殖シグナル及び DNA 修復の役割を解明し、心不全に至る適応破綻の機構を明らかにする。さらに心不全への病態変化を抑制する新たな治療標的の同定を目指す。すでに KLF5 の非アセチル化変異マウスは作成済みであり、いずれも心臓の発達や肥大に異常を生ずるという予備データを得ている。

具体的には、まず、KLF5 のアセチル化変異マウスを用いて、心臓の適応と破綻における KLF5 アセチル化の個体レベルでの意義を明らかにする。次いで、心筋リモデリングにおける細胞修復反応に関わる ATM を中心とした DNA 損傷応答シグナルの関与があるか明らかにする。ATM はリン酸化により活性化されるため、リン酸化酵素を標的とした阻害薬等を用いれば心不全発症を防止できる可能性がある。我々はすでに ATM 遺伝子欠損マウスおよび ATM 特異的阻害薬を用いて、ATM の抑制が血管内皮細胞機能を改善することを示した。また、ATM がアドリマイシン心筋症の発症に重要であり、特に、心筋間質細胞の ATM が重要な役割を果たすという予備知見も得ている。そこで、本シグナルカスケードの心肥大形成および心不全発症における新たな役割を解明し、これらの因子と結合する蛋白を単離することにより、心不全への病態変化を抑制する新しい治療標的を同定する。さらに、負荷適応と破綻時の KLF5 ないし、ATM 等 DNA 損傷応答因子の複合体を包括的に同定する。これらの同定された因子を標的として、臨床へのトランスレーションを目指したバイオマーカー開発 (エクソソーム解析など) ないし創薬による新規治療法開発も目指す。

3. 研究の方法

本研究では、最初に KLF5 非アセチル化変異マウスを用いて、KLF5 アセチル化の病態における役割を個体レベルで解析する。KLF5 非アセチル化変異マウスは既に作成済みである。このマウスは発生工学的に組織特異的にアセチル化されない KLF5 変異体を発現することが可能なコンディショナルノックインマウスである。例えば、 α MHC-cre マウスと交配することにより心筋細胞特異的な KLF5 非アセチル化変異を生ずることが可能である。組織特異的な遺伝子改変のため、発生学上や他臓器への影響がなく、解析が容易である。また、KLF5 の相互作用因子であり、DNA 損傷応答反応の主要な構成因子と考えられる ATM、および DNA 損傷応答因子のリン酸化等により形成される DNA 損傷応答シグナルを解析する。この機構の異常な活性化ならびに制御は従来から発癌の分子メカニズムとして注目されていたが、非癌領域では不明であった。我々により、代謝ストレス下で老化やアポトーシス制御においても重要な役割を有することが近年明らかにされつつある。我々の ATM 欠損マウスを用いた予備検討により、心臓

においては、圧負荷心肥大時に ATM が心筋線維化を抑制する作用を有する予備データも得ている。一方で、ATM 基質の DNA 損傷応答因子は心肥大を促進する可能性があり、ATM と異なる反応が認められた。また、ATM 欠損マウスではアンジオテンシン II による心筋線維化が促進する。一方、DNA 損傷応答因子欠損マウスではアンジオテンシン II による心筋肥大が抑制される。

具体的には、心肥大、心筋梗塞モデルマウスを用いて、心臓の負荷適応と破綻に KLF5 のアセチル化と DNA 修復因子が関与するか明らかにする。また、シグナルの特異的な阻害薬が心不全発症を防止するかを明らかにする。さらにプロテオミクスを用いて負荷適応と破綻の際にこれらと相互作用する因子を単離することにより、新しい治療標的を同定する。

4. 研究成果

(1) KLF5 アセチル化の心臓の適応と破綻における役割の解明

KLF5 は p300 により唯一 369 番目のアミノ酸であるリジン残基(K369)がアセチル化される。KLF5 アセチル化は KLF5 の転写活性を亢進し、細胞増殖に寄与することが細胞レベル(in vitro)で明らかになったが、個体(in vivo)における役割については不明であった。また、KLF5 ヘテロ欠損マウスでは圧負荷心肥大応答が減弱していることから、アセチル化の関与が示唆されている。本研究では KLF5 のアセチル化の病態における意義を in vivo で検討した。我々は KLF5 のアセチル化されるリジン残基をアルギニンに置換したコンディショナルノックインマウス(K369R)を作成した。このマウスは組織特異的 Cre マウスと交配することにより、心筋細胞や線維芽細胞等の特定の組織に特異的に KLF5 の非アセチル化変異を生ずることが可能である。心筋細胞(α MHC)と線維芽細胞(Periostin)特異的 Cre マウスとの交配により全身ないし、心筋細胞、線維芽細胞特異的 KLF5 の非アセチル化変異マウスを作成した。今後、それらのマウスを用いて圧負荷心肥大モデルと心筋梗塞後心不全モデルを作成し、KLF5 アセチル化の有無による心臓の負荷応答の相違を明らかにする。

(2) DNA 損傷応答因子 (ATM 等) の心臓の適応と破綻における役割の解明

KLF5(K369R)マウスと同様に、DNA 損傷応答因子 ATM 全身ないし、心筋細胞、線維芽細胞特異的欠損マウスを用いて圧負荷心肥大モデルと心筋梗塞後心不全モデルを作成し、心臓の負荷適応と破綻における両因子の役割を in vivo で明らかにする。ATM、DNA 損傷応答因子およびそれらの関連する p53、Chk2 等のシグナルの発現分布および量変化を免疫組織染色法で解析した。全身ないし、心筋細胞および心筋線維芽細胞特異的 ATM、DNA 損傷応答因子欠損マウスを作成した。全身 ATM、DNA 損傷応答因子欠損マウスでは圧負荷に対する応答が減弱するデータを得た。心肥大における役割が明らかになったことから、今後は ATM 特異的阻害薬(KU59403 等)をマウスに投与し、心不全発症の防止における有効性について検討する。

(3)心臓の負荷適応と破綻に関する相互作用因子の単離・同定

KLF5 分子のアセチル化と DNA 修復因子(ATM 等) の個体レベルでの心臓の適応と破綻における役割について検討した。心肥大ないし心筋梗塞モデルにおける各因子の発現変化を定量評価し、負荷適応と破綻に関わるかを明らかにすれば、負荷適応と破綻を示すバイオマーカーになる可能性がある。また、負荷適応と破綻に関連し、KLF5 の複合体に変化が生ずると考えられるため、プロテオミクスを用いて、包括的に相互作用因子の単離・同定した。MALDI-TOF MS 型質量分析計で蛋白の発現量を定量的に比較した。一方、LC-MS/MS 型質量分析計で結合蛋白の包括的同定が可能である。本研究ではそのための解析技術を確立した。定常状態における in vitro における KLF5 結合蛋白を質量分析で解析し、KLF5 結合蛋白を多数同定した。すなわち、本研究では負荷適応と破綻時の in vivo における分子間相互作用が明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Mizushima Y, Karasawa T, [Aizawa K](#), Kimura H, Watanabe S, Kamata R, Komada T, Mato N, Kasahara T, Koyama S, Bando M, Hagiwara K, Takahashi M. Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1beta Contributes to Acid Aspiration-Induced Acute Lung Injury. *J Immunol* 査読有.2019.
2. Fujita D, Preiss L, [Aizawa K](#), Asch F, Eagle K, Suzuki T. Circulating interleukin-6 (IL-6) levels are associated with aortic dimensions in genetic aortic conditions. *PLoS One*.査読有. 14: e0214084, 2019.
3. Ushijima K, Ando H, Arakawa Y, [Aizawa K](#), Suzuki C, Shimada K, Tsuruoka SI, Fujimura A. Prevention against renal damage in rats with subtotal nephrectomy by sacubitril/valsartan (LCZ696),

- a dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor. *Pharmacol Res Perspect* 査読有.5: e00336, 2017.
4. Suzuki T, Lyon A, Saggari R, Heaney LM, Aizawa K, Cittadini A, Mauro C, Citro R, Limongelli G, Ferrara F, Vriza O, Morley-Smith A, Calabro P, Bossone E. Biomarkers of acute cardiovascular and pulmonary diseases. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*. 査読有.5:416-33, 2016
 5. Zhan H, Aizawa K, Sun J, Tomida S, Otsu S, Conway SJ, McKinnon PJ, Manabe I, Komuro I, Miyagawa K, Nagai R, Suzuki T. Ataxia telangiectasia mutated in cardiac fibroblasts regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res*. 査読有.2016;doi: 10.1093/cvr/cvw032.
 6. Yanagihara H, Ushijima K, Arakawa Y, Aizawa K, Fujimura A. Effects of telmisartan and olmesartan on insulin sensitivity and renal function in spontaneously hypertensive rats fed a high fat diet. *J Pharmacol Sci* 査読有.131(3): 190-197, 2016
 7. Sawaki D, Hou L, Tomida S, Sun J, Zhan H, Aizawa K, Son BK, Kariya T, Takimoto E, Otsu K, Conway SJ, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Modulation of Cardiac Fibrosis by Krüppel-like Factor 6 through Transcriptional Control of Thrombospondin 4 in Cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 査読有.107: 420-430, 2015.
 8. Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. *Nat Commun*. 査読有.doi:10.1038/ncomms7994.
 9. Aizawa K, Fujii J, Seko Y. A case of Takayasu's arteritis with total occlusion of the abdominal aorta treated only with oral medication for more than 40 years. *Annals of Vascular Diseases*. 査読有.8:124-7, 2015.

〔学会発表〕(計5件)

1. 相澤健一, 根岸経太, 今井 靖, 苅尾七臣, 永井良三, 鈴木 亨: トリメチルアミン N オキシドは心臓リモデリングを反映する有用な心疾患バイオマーカーである. 第 38 日本臨床薬理学会学術総会, 2017 年 12 月 7-9 日
2. 北村広子, 牛島健太郎, 鈴木智理, 荒川裕輔, 相澤健一, 藤村昭夫, 今井 靖: OLETF ラットを用いた Rivaroxaban の糖尿病性腎症進展抑制効果に関する検討. 第 38 回日本臨床薬理学会学術総会, 2017 年 12 月 7-9 日
3. 相澤健一, 根岸経太, 今井 靖, 苅尾七臣, 永井良三, 鈴木 亨: トリメチルアミン N オキシドは心疾患患者の心臓リモデリングを反映し, 予後予測マーカーとして有用である. 第 42 回日本医用マスペクトル学会年会, 2017 年 9 月 15 日
4. 相澤健一, 日野光貴, 廣瀬友靖, 大村 智, 砂塚敏明, 藤生克仁, 山下親正, 永井良三, 藤村昭夫.: 新規ピルビン酸キナーゼ阻害薬は心不全を改善する. 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016 年 12 月 1-3 日
5. 日野光貴, 相澤健一, 廣瀬友靖, 大村 智, 砂塚敏明, 藤生克仁, 山下親正, 永井良三, 藤村昭夫: PDK4 阻害薬のマウスモデルによる心不全治療の検証. 第 134 回日本薬理学会関東部会, 2016 年 7 月 9 日

〔図書〕(計6件)

1. 相澤健一. 循環器臨床におけるプロテオミクスの現状と将来展望. 循環器疾患における Precision Medicine. *Precision Medicine*. 1:136-139, 2018.
2. 詹紅, 相澤健一. アントラサイクリン心筋症のメカニズムを知る. がん診療における心血管合併症: onco-cardiology アップデート. *診断と治療*. 2018;106(8): 999-1004
3. 相澤健一, 藤村昭夫. 胸痛の治療薬. 藤村昭夫(編), 症状と患者背景にあわせた頻用薬の使い分け 改訂版. *羊土社*, 2015, 242-253.
4. 相澤健一, 永井良三. 血栓症研究のブレイクスルー. *International Journal of Thrombosis*. 2015;10(2):22
5. 相澤健一, 永井良三. 血栓症をめぐる将来展望. *International Journal of Thrombosis*. 2015;10(2):44-47
6. 相澤健一. 動脈硬化性疾患新規バイオマーカー. *Heart View*. 19:279-283, 2015

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 永井良三

ローマ字氏名: Ryozo Nagai

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: 医学部

職名: 学長

研究者番号(8桁): 60207975

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。