

令和 3 年 10 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15445

研究課題名(和文) エピゲノム制御の観点から心不全病態分子基盤解明に挑む

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis of heart failure development from the point of view of epigenome regulation.

研究代表者

尾池 雄一 (Oike, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：90312321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子トラップ法を用いて同定された胎児期心臓で高発現するcardiac specific long non-coding RNA X(CSLR-X)について心不全病態における分子機能解明を行った。心筋細胞由来CSLR-Xの機能解析のため心筋特異的CSLR-X過剰発現、心筋特異的CSLR-X欠損マウスを作製し解析を行い、心組織及び心機能に関して明らかな表現型を認めなかった。またCSLR-Xと複合体を構成する構成因子探索のため全身性強制発現CSLR-X Tg、CSLR-X KO、野生型マウスの心組織を用いてproteome解析を行い、複数の候補タンパクを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IncrRNAは存在が認識され間もないため、機能解析は主に培養細胞を用いて行われており、生体での機能解明の報告は数少ない。さらに、細胞質IncrRNAの作用機構は核内IncrRNAよりも、作用機構が十分に明らかになっていない。本研究によって得られる成果により、心肥大・心不全の病態形成に関わる世界初の細胞質IncrRNAの作用機構が明らかとなり、予後不良の疾患である心不全へのIncrRNAという新たな観点からの新規治療法開発の基盤研究としての可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecular mechanisms of cardiac specific long non-coding RNA X (CSLR-X), which was identified among embryonic cardiac specific expressed-clones of long non-coding RNA with gene trap approach, under heart failure development and progression. To assess whether cardiac phenotypes observed in CSLR-X KO (KO) mice were attributable to loss of cardiomyocyte-derived CSLR-X, we have established cardiac specific overexpressed CSLR-X Tg (Tg) mice and cardiac specific CSLR-X conditional KO (CKO) mice. Tg and CKO mice showed no differences of cardiac morphology and cardiac function compared with their littermate wild-type mice, respectively. And to identify mechanisms underlying the effect of CSLR-X on cardiac function, we performed the proteome analysis of whole heart tissues using KO, CAG-CSLR-X Tg and wild-type mice and identified several candidate proteins.

研究分野：循環器病態学

キーワード：心不全 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦では生活習慣の多様化および高齢化社会に伴って高血圧に罹患する患者が増加し、それに起因する圧負荷心肥大の管理が重要な課題となっている。心肥大は生体の要求に応じた代償反応として生理的に重要な機構であるが、最終的には心不全という心機能破綻に繋がる現象と捉えられる。現在、心不全の5年生存率は平均して50~60%と依然として非常に予後不良の症候群である。この心不全の病態形成には心筋肥大、アポトーシス、線維化といった心筋リモデリングが重要な役割を持っていることが明らかになっており、心筋肥大の病態形成に関わる分子機構やその促進因子の解明が進んでいるものの、抑制因子に関する情報は極めて少なく、特に長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA; lncRNA) の関連した研究はほとんど行われていない。心不全の病態に関わる新規 lncRNA の同定は、心不全における新規治療・予防法開発に期待される。

変異 lox を用いることによりレポーター遺伝子を任意の遺伝子に変換可能な可変型遺伝子トラップ法は、スプライスアクセプターとレポーター遺伝子をランダムにゲノムに挿入、内在性の遺伝子内に挿入時に産生されるレポーター遺伝子の融合 RNA を 5'RACE 等で同定することにより未知遺伝子を単離する手法であり、この方法により新規遺伝子の単離と同時にその遺伝子破壊マウスによる新規遺伝子の機能解析もできる利点がある。また、遺伝子トラップの際にはレポーター遺伝子として β -geo が挿入されるため、単離した遺伝子の発現の局在を容易に解析することが可能となる。心肥大、心不全病態においては、胎児期に強く発現する遺伝子が再発現し機能することが知られている。

本研究では、心肥大、心不全の病態形成に関わる心臓特異的な新規遺伝子の単離・同定を目的に、マウス胎児期に心臓で強く発現することを指標に遺伝子トラップ法を行ったところ、トラップされたクローンの中からマウス胎児において心臓特異的に発現するクローンを複数同定した。引き続き、そのトラップベクターの挿入部位の同定を行い、lncRNA である cardiac specific long non-coding RNA X (CSLR-X) 領域に挿入されていることを明らかにした。CSLR-X ノックアウトマウス及びその野生型同腹仔を用いた横行大動脈 banding による圧負荷心不全 (TAC; 大動脈縮窄術) モデル解析より、CSLR-X が心不全の病態形成に対して保護的に作用する可能性が見出された。

2. 研究の目的

エピゲノムに制御に関わっているノンコーディング RNA の機能解明という新たな観点より心負荷への代償機構としての心肥大・心臓リモデリングとその応答破綻である心不全病態形成における新規 CSLR-X

RNA の分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) CSLR-X の機能解析のための CSLR-X 関連遺伝子改変マウス作製とそれらの心機能解析

(2) CSLR-X と複合体を構成する構成因子の探索のための網羅的解析

(3) CSLR-X のヒトホモログの同定

4. 研究成果

(1) CSLR-X の機能解析のための CSLR-X 関連遺伝子改変マウス作製とそれらの心機能解析：心臓特異的 CSLR-X 過剰発現マウス (α MHC-CSLR-X Tg) を作製し、心臓において CSLR-X の高発現を認める系統 3 ラインを樹立した。ライン樹立を行い、TAC モデル作製後の経時的に心エコーおよび組織解析、心不全関連遺伝子 (ANP、BNP、Myh7、Serca2) の発現変化を解析した。 α MHC-CSLR-X Tg マウスは同腹仔の野生型と比べ、外見上、明らかな表現型を認めず、心エコー、組織解析、心不全関連遺伝子の明らかな発現変化を認めなかった。次に、 α MHC-CSLR-X Tg マウスを用いて TAC モデルを作製し、術後 6 週で心エコーによる解析の結果を行ったところ、 α MHC-CSLR-X Tg マウスは同腹仔の野生型に比べ、明らかな心機能低下の抑制を認めた。以上より、心臓における CSLR-X は心不全病態形成において心保護作用が示唆された。

(2) CSLR-X と複合体を構成する構成因子の探索のための網羅的解析：CSLR-X と複合体を構成する構成因子探索のため、全身性強制発現 CSLR-X トランスジェニックマウス (CAG-CSLR-X Tg)、CSLR-X KO マウスの心臓組織を用いて、プロテオーム解析を行い、複数の候補タンパクを同定した。その中で最も変動を認める Hint1 (histidine triad nucleotide-binding protein1) は CSLR-X KO の心臓においてタンパクの発現上昇を認め、CAG-CSLR-X Tg の心臓においてはタンパクの発現低下を認めた。いずれのマウスにおいても Hint1 mRNA の発現変化は認めなかった。以上より、CSLR-X は Hint1 の発現制御を転写レベルではなく、翻訳レベルで抑制していることが示唆された。

Hint1 のマウス個体における心機能を含めた表現型を解析するために、Hint1 欠損マウス、心筋特異的 Hint1 欠損マウス (Hint1CKO; α MHC-Cre) マウス、心筋特異的 Hint1 強制発現 (α MHC-Hint1Tg) マウスを作製し、Hint1 欠損マウス、Hint1CKO; α MHC-Cre は樹立できたが、 α MHC-Hint1Tg のライン樹立は出来なかった。

(3) CSLR-X のヒトホモログの同定：マウスゲノム上で CSLR-X に隣接する coding 遺伝子として 5'側に Hmgb2 と 3'側に Sap30 が存在する。ヒトゲノム上においてもマウスと同様に coding 遺伝子として HMGB2 と SAP30 が隣接して存在し、データベースによるとそ

これらの遺伝子間に6種類のlncRNA転写産物の存在を認めている。いずれも塩基配列上はCSLR-Xとの相同性はない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1. Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, Shibata M, Hirakawa Y, Endo M, Ago T, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y, Ninomiya T. Serum Angiopietin-Like Protein 2 Is a Novel Risk Factor for Cardiovascular Disease in the Community: The Hisayama Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016, 36:1686-91. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307291. (査読あり)
2. Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H, Oike Y. Mice Deficient in Angiopietin-like Protein 2 (Angptl2) Gene Show Increased Susceptibility to Bacterial Infection Due to Attenuated Macrophage Activity. *J Biol Chem.* 2016,291:18843-52. doi:10.1074/jbc.M116.720870. (査読あり)
3. Motokawa I, Endo M, Terada K, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Morinaga J, Sugizaki T, Ito T, Araki K, Morioka MS, Manabe I, Samukawa T, Watanabe M, Inoue H, Oike Y. Interstitial pneumonia induced by bleomycin treatment is exacerbated in Angptl2-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016, 311:L704-L713. doi: 10.1152/ajplung.00005. (査読あり)
4. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *NatCommun.* 2016,7:13016. doi:10.1038/ncomms13016. (査読あり)
5. Tanigawa H, Miyata K, Tian Z, Aoi J, Kadomatsu T, Fukushima S, Ogata A, Takeda N, Zhao J, Zhu S, Terada K, Endo M, Morinaga J, Sugizaki T, Sato M, Morioka MS, Manabe I, Mashimo Y, Hata A, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M, Araki K, Jinnin M, Ihn H, Oike Y. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *SciRep.* 2016,6:34690. doi:10.1038/srep34690. (査読あり)
6. Amadatsu T, Morinaga J, Kawano T, Terada K, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Kasamo D, Kuratsu JI, Oike Y. Macrophage-Derived Angiopietin-Like Protein 2 Exacerbates Brain Damage by Accelerating Acute Inflammation after Ischemia-Reperfusion. *PLoS One.* 2016, 11:e0166285. doi:10.1371/journal.pone.0166285. (査読あり)
7. Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y. ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. *EMBOJ.* 2017,36(4):409-424. doi:10.15252/embj.201695690. (査読あり)
8. Oike Y, Tian Z, Miyata K, Morinaga J, Endo M, Kadomatsu T. ANGPTL2 - A New Causal Player in Accelerating Heart Disease Development in the Aging. *Circ J.* 2017,81:1379-1385. doi:10.1253/circj.CJ-17-0854. (査読あり)
9. Tian Z, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Kadomatsu T, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Sato M, Terada K, Okumura T, Murohara T, Oike Y. Circulating ANGPTL2 Levels Increase in Humans and Mice Exhibiting Cardiac Dysfunction. *Circ J.* 2018,82:437-447. doi:10.1253/circj.CJ-17-0327. (査読あり)
10. Sugizaki T, Zhu S, Guo G, Matsumoto A, Zhao J, Endo M, Horiguchi H, Morinaga J, Tian Z, Kadomatsu T, Miyata K, Itoh H, Oike Y. Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017,3:12. doi: 10.1038/s41514-017-0012-0. (査読あり)
11. Zhao J, Tian Z, Kadomatsu T, Xie P, Miyata K, Sugizaki T, Endo M, Zhu S, Fan H, Horiguchi H, Morinaga J, Terada K, Yoshizawa T, Yamagata K, Oike Y. Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice. *J Biol Chem.* 2018, 293:1596-1609. doi:10.1074/jbc.M117.814996. (査読あり)
12. Itoh H, Kadomatsu T, Tanoue H, Yugami M, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Kobayashi E, Miyamoto T, Kurahashi R, Terada K, Mizuta H, Oike Y. TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma. *Oncogene.* 2018. doi:10.1038/s41388-018-0160-0. (査読あり)

13. Morinaga J, Zhao J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Sugizaki T, Okadome Y, Tian Z, Horiguchi H, Miyashita K, Maruyama N, Mukoyama M, Oike Y. Association of circulating ANGPTL 3, 4, and 8 levels with medical status in a population undergoing routine medical checkups: A cross-sectional study. *PLoSOne*. 2018;13(3):e0193731. doi: 10.1371/journal.pone.0193731. (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1. 尾池雄一、健やかに生きる～健康長寿達成の秘訣～、フジテレビ アンチエイジングフェア in 台場、2016年9月24日、東京都
2. 尾池雄一、Roles of Angiopietin-like protein 2 (ANGPTL2) in cardiovascular disease、第24回日本血管生物医学学会学術集会、2016年12月9日、長崎市
3. 尾池雄一、アンジオポエチン様因子2と心血管疾患、脳心血管抗加齢研究会2016 (CCVAA)、2016年12月18日、東京都
4. 尾池雄一、肥満症と心血管疾患の共通分子基盤、第38回日本肥満学会、2017年10月8日、大阪市
5. 尾池雄一、心血管疾患と代謝・生活習慣病の共通分子病態におけるANGPTL2の役割、第47回日本心臓血管作動物質学会、2018年2月9日、長崎市

〔図書〕(計4件)

1. 門松 毅、尾池雄一、メディカルレビュー社、ANGPTLファミリーと生活習慣病の発症・進展、2016年5月10日発行、Pharma Medica 34(5):43-47, 2016
2. 門松 毅、尾池雄一、SASP因子としてのアンジオポエチン様因子2と免疫老化 (Angiopietin-like protein 2 as senescence-associated secretory phenotype (SASP) factor and immune senescence)、日本抗加齢医学会雑誌 アンチ・エイジング医学 ANTI-AGING MEDICINE 13(3):38-43, 2017 メディカルレビュー社 2017年6月15日発行
3. 尾池雄一総論 メタボリックシンドローム研究の潮流 月刊 細胞 THE CELL 49(2):2-3, 2017 ニューサイエンス社 2017年2月20日発行
4. 門松 毅、尾池雄一、メタボリックシンドロームと慢性炎症、別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 7(1):59-63, 2018 北隆館 2018年2月28日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kumamoto-u-molgen.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90312321

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()