

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07003

研究課題名(和文) アルギニンメチル化酵素PRMT5/MEP50を標的とした新規心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic method for heart failure targeted on PRMT5/MEP50 complex

研究代表者

宮崎 雄輔 (MIYAZAKI, YUSUKE)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：40803466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：心肥大モデルマウスにメチル化酵素PRMT5選択的阻害剤を投与したところ、心機能は改善し心肥大が抑制された。また心筋細胞自体の肥大や組織線維化も抑制された。これまでに作成した遺伝子改変マウスを用いてPRMT5の心臓における役割をより詳細に解析するため、マイクロアレイ解析により遺伝子を網羅的に探索し、候補遺伝子の絞り込みを進めている。さらに任意のタイミングで遺伝子を欠損させることのできるマウスでの結果から、時期によってPRMT5の役割が異なる可能性が示唆されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は長きに渡って日本人の死因第2位を占めているにも関わらず、その前段階である心肥大の詳細な発生メカニズムは明らかにされておりました。心臓の中でどのような機序で心肥大が引き起こされるのか明らかにすることは、未だ開発されていない心不全の根本的な治療法の探索へとつながります。本研究では心臓に存在するメチル化酵素PRMT5の阻害剤が心肥大を改善することを示しました。また心臓におけるPRMT5の詳細な解析も行っており、これが明らかになることでより効果的な治療薬開発につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Methyltransferase PRMT5-specific inhibitor suppressed pressure overload-induced cardiac dysfunction and cardiac hypertrophy. Cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis were also suppressed by PRMT5-specific inhibitor.

To investigate the precise mechanism of PRMT5 on cardiac hypertrophy, microarray assay was performed with transgenic mice and still checking. Moreover, knockout mice which could be deleted with drug administration showed PRMT5 have different role on several phase.

研究分野：分子生物学

キーワード：循環器 メチル化 機能解析

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

1. 研究開始当初の背景

心疾患は我が国における死亡原因第2位を占めており、克服すべき重要な疾患である。中でも、心不全はあらゆる心疾患の最終像であり、予後が非常に悪く、十分な治療法が開発されていない。我々の研究室ではこれまでにヒストンアセチル化酵素 p300 と心臓特異的転写因子 GATA4 からなる p300/GATA4 経路が心不全発症に関与すること、治療ターゲットとなることを見出した。しかしながら p300/GATA4 経路の詳細な制御メカニズムは明らかになっていない。そこで我々は p300/GATA4 経路の制御メカニズムを解明するために、GATA4 複合体を網羅的に解析した。その結果、新規 GATA4 結合タンパク質としてアルギニンメチル化酵素 PRMT5 とその活性制御因子 MEP50 を同定した。

2. 研究の目的

PRMT5 の心臓における役割を明らかにするため、我々は心臓特異的 PRMT5 トランスジェニック (TG) マウスを作成し、TG マウスでは野生型に比べて大動脈縮窄術 (TAC 手術) による心肥大がより強く誘導されることを明らかにした。さらに心臓エコー検査による心短縮率も、心臓特異的 PRMT5-TG マウスでは TAC 手術を行うことで有意に低下した。そこで PRMT5 は心肥大の新たな治療標的となると考え、PRMT5 による心肥大誘導機構の解析及び PRMT5 選択的阻害剤を用いた治療効果の検討を行った。

また PRMT5 を心臓特異的に欠損させることで心肥大発症を抑制できないかと考え、心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスを作成したところ、予想と異なり早期に心機能が低下、死亡することが確認された。そこで成体における PRMT5 ノックアウトによる影響を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

・ PRMT5 特異的阻害剤による心肥大改善効果の検討

野生型 C57BL/6J マウス (、7-8 週齢) に TAC 手術を行い、翌日より PRMT5 特異的阻害剤 EPZ015666 を連日経口投与した。コントロール群には偽手術 (sham 手術) を行った野生型マウスを用い、阻害剤を投与しない群には同量の溶媒のみを投与した。期間中は毎週体重を測定し、投与量を調整した。投与開始から 8 週間後に体重測定、心臓エコー検査を行い、麻酔下で解剖し心重量、脛骨長を測定した。摘出した心臓は組織切片作成と RNA 抽出に用いた。

・ 遺伝子発現制御解析

心臓特異的 PRMT5 トランスジェニックマウスと心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスそれぞれの心臓における遺伝子発現制御機構を明らかにするために、マイクロアレイ解析を実施した。心臓特異的 PRMT5 トランスジェニックマウスには同系統の野生型マウスを、心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスには PRMT5^{fl/fl} マウスをそれぞれコントロール群として用いた。

・ タモキシフェン誘導型心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスの作出

MHC-MerCreMer マウスを Jackson Laboratory より購入し、PRMT5^{fl/fl} マウスと交配した。PRMT5^{fl/fl} マウスは以前心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウス作成に使用したものと同系統である。マウスは交配を繰り返し、MHC-MerCreMer PRMT5^{fl/fl} マウスを作成した。このマウスにタモキシフェンを投与し、心機能への影響を検討した。

4. 研究成果

・ PRMT5 特異的阻害剤は圧負荷誘導性の心肥大を抑制した

sham 群、TAC 群、TAC+PRMT5 特異的阻害剤投与群の 3 群で比較検討を行った。観察期間中において、体重の有意な群間差は見られなかった。投与開始から 8 週間時点での心臓エコー検査では、sham 群に比べ TAC 群で心臓左室壁の有意な肥厚と、心短縮率及び心駆出率の有意な低下が見られた。阻害剤投与群では TAC 群に比べ、左室壁の肥厚を有意に抑制し、また心短縮率及び心駆出率を有意に改善した。心重量脛骨長比により心肥大への効果を検討したところ、TAC 群で見られた有意な心肥大は阻害剤投与群で有意に抑制された (図)。ヘマトキシリン・エオシン染色及びマッソントリクローム染色により心臓組織観察を行ったところ、TAC 群で見られた心筋細胞径の有意な増加、及び心臓組織線維化の有意な亢進は、阻害剤投与によりいずれも有意に抑制された。心肥大関連遺伝子の発現量を定量的逆転写 PCR 法で測定したところ、心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) の発現は TAC 手術で有意に亢進し、阻害剤投与で有意に抑制された。

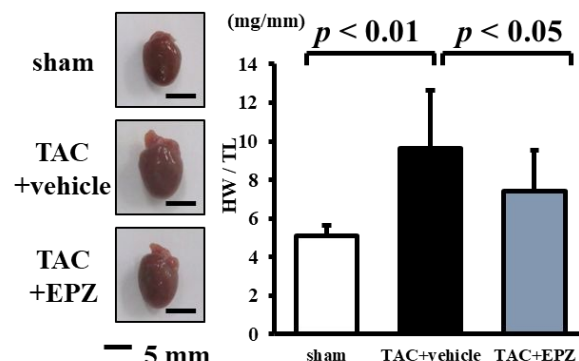


図. PRMT5 阻害剤は圧負荷による心肥大を有意に抑制した

以上のことより、PRMT5 特異的阻害剤は圧負荷誘導性心肥大を有意に抑制することが明らかとなった。

・マイクロアレイ解析により PRMT5 により発現変動した遺伝子群が判明した

野生型マウス、心臓特異的 PRMT5 トランスジェニックマウス、PRMT5^{fl/fl} マウス、心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスの 4 系統、それぞれ 2 匹づつの心臓から遺伝子を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。解析には SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 (Agilent Technologies) を用いた。トランスジェニックマウスでは約 28,000 遺伝子が、ノックアウトマウスでは約 29,000 遺伝子が測定され、それぞれ 2 倍以上の発現亢進または低下の見られた遺伝子群について検討を進めている。またクラスター解析を行ったところ、トランスジェニックマウスでは交感神経系や心筋収縮に関連する遺伝子群の亢進が、ノックアウトマウスでは交感神経系や心筋収縮に関連する遺伝子群の発現低下が確認されており、これらの遺伝子を制御する転写因子やコファクターに PRMT5 が関与することが示唆されている。

・タモキシフェン誘導型心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスを作出した

心臓特異的 PRMT5 ノックアウトマウスは 8 週齢前後で心機能低下による死亡されており、成体の心臓における PRMT5 の役割は不明であった。そこで任意のタイミングで PRMT5 をノックアウトできるように、タモキシフェン誘導型 PRMT5 ノックアウトマウスを作成した。作出されたタモキシフェン誘導型 PRMT5 ノックアウトマウスでは 8 週齢を超えても心機能低下や死亡は観察されなかった。またタモキシフェンを投与したところ、心臓における PRMT5 遺伝子の切断とタンパク質の発現量の低下が確認された。投与後 8 週間以上飼育しても心機能低下や死亡は見られなかった。このことより、PRMT5 は成体への成長過程や圧負荷がかかるなど非常事態に働き、心肥大誘導に関与する可能性が示唆されている。

以上の結果から、PRMT5 は心肥大の治療標的になる可能性が高い。一方、出生直後からと成体になってからでは役割が異なる可能性も示唆されており、今後動物モデルや培養細胞による更なる検討が必要である。元々 p300/GATA4 経路制御因子として PRMT5 を発見していることから、p300 のメチル化や転写因子 GATA4 を介した発現制御機構を中心に、心臓における PRMT5 の機能を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 8 件)

1. Minori Sobukawa, Yasuffumi Katanasaka, Noriyuki Murata, Hikaru Sato, Masafumi Funamoto, Nurmila Sari, Satoshi Shimizu, Kana Shimizu, Yusuke Miyazaki, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto, Pharmacological inhibition of PRMT5 suppresses cardiomyocyte hypertrophy and fibrotic phenotype in vitro. The 4th International Conference on Pharma-Food, 2018 年
2. 曾布川実里、刀坂泰史、筒井優介、村田膳行、清水聡史、船本雅史、Nurmila Sari、清水果奈、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也 心臓内 PRMT5 結合タンパク質の網羅的解析 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2018 2018 年
3. 花島一真、宮崎雄輔、刀坂泰史、本田大樹、船本雅史、Nurmila Sari、砂川陽一、長谷川浩二、森本達也 PRMT5 選択的阻害剤 EPZ015666 により圧負荷誘導性的心肥大は抑制された 第 22 回日本心不全学会学術集会 2018 年
4. 花島一真、宮崎雄輔、刀坂泰史、本田大樹、船本雅史、Nurmila Sari、砂川陽一、長谷川浩二、森本達也 圧負荷誘導性的心肥大を Protein Arginine Methyltransferase 5 選択的阻害剤 EPZ015666 は抑制した 第 20 回応用薬理シンポジウム 2018 年
5. 刀坂泰史、佐藤光、櫻井涼賀、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也 アルギニンメチル化酵素 PRMT5 を標的とした心不全分子標的療法 2018 年
6. Yasufumi Katanasaka, Ryoga Sakurai, Yuya Hojo, Yusuke Tsutsui, Yusuke Miyazaki, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto, Cardiac-specific PRMT5 overexpression accelerates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure. 第一回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018 年
7. 佐藤光、村田膳行、北条祐也、宮崎雄輔、刀坂泰史、砂川陽一、和田啓道、島津章、長谷川浩二、森本達也 PRMT5 選択的阻害剤 EPZ015666 は心筋細胞肥大及び線維化を抑制した 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2017 2017 年
8. 佐藤光、村田膳行、北条祐也、宮崎雄輔、刀坂泰史、砂川陽一、和田啓道、島津章、長谷川浩二、森本達也 PRMT5 選択的阻害剤 EPZ015666 は心筋細胞肥大と心臓線維化を抑制した 第 136 回日本薬理学会関東部会 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森本 達也
ローマ字氏名：Morimoto Tatsuya
所属研究機関名：静岡県立大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：50390779

(2)研究協力者
研究協力者氏名：刀坂 泰史
ローマ字氏名：Katanasaka Yasufumi
所属研究機関名：静岡県立大学

研究協力者氏名：砂川 陽一
ローマ字氏名：Sunagawa Yoichi
所属研究機関名：静岡県立大学

研究協力者氏名：長谷川 浩二
ローマ字氏名：Hasegawa Koji
所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構 京都医療センター

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。