

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09575

研究課題名(和文) NRDCによる洞房結節自動能制御機構および家族性洞不全症候群における意義の解明

研究課題名(英文) Metalloprotease nardilysin controls heart rate through the transcriptional regulation of ion channels critical for sinus automaticity

研究代表者

大野 美紀子 (Ohno, Mikiko)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10583198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多機能タンパク質ナルディライジン(NRDC)の全身性遺伝子欠損マウスは、高度の徐脈を呈する。本研究では「NRDCが核内において、転写因子と複合体を形成し、HCN4をはじめとする洞房結節自動能に必須のイオンチャネルの遺伝子発現を制御する」という仮説のもと解析を行った。NRDCが洞房結節自動能に関わるイオンチャネルの遺伝子発現を制御することを抗NRDC抗体を用いたChIP法で明らかにした。心房(洞房結節)特異的NRDC欠損マウスにおいても徐脈を呈し、全身性NRDC欠損マウスとほぼ同様のイオンチャネル群の発現低下を認めた。酵素活性欠失型変異NRDCノックインマウスの作製及び解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NRDCの生体における機能はこれまで全く不明であったが、NRDC^{-/-}における研究成果から、NRDCが心拍数、血圧、体温調節などの恒常性維持に重要な役割を持つことが示唆された。一方、NRDCは全身に広く発現するので、NRDC^{-/-}の表現型が一次的かどうかを判断するには困難を伴う。そこで、最近作製した臓器特異的NRDC欠損マウスや酵素活性欠失型変異NRDCマウスの解析を行い、心拍数調節のメカニズムの解明の足掛かりとした。これらの成果を今後発展させることで、ヒトにおける遺伝性洞不全症候群の原因解明やNRDCの酵素活性中心をターゲットとした創薬開発の基盤に役立てることができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have shown that NRDC, a multifunctional protease, controls heart rate by transcriptional regulation of HCN ion-channels responsible for cardiac sinus node automaticity. We specifically demonstrated that NRDC regulates gene expression of these ion channels involved in sinus automaticity by ChIP method using anti-NRDC antibody. Moreover, bradycardia was also shown in atrial (sinoatrial node) specific NRDC-deficient mice (Sin-Nrdc-KO), and expression levels of HCN ion channels were also reduced in Sin-Nrdc knockout hearts. In addition, we generated and analyzed the enzyme-activity-deficient mutant NRDC knock-in mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：洞房結節自動能 メタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

心拍数は、洞房結節細胞の自動能、自律神経系や内分泌系によって制御される。洞房結節細胞には、ペースメーカー細胞に特有の電位依存性イオンチャネルが発現しており、自発活動電位の形成に必要である。「If 電流 (過分極活性化内向き電流)」は、洞房結節特有の浅い静止膜電位の維持に必要であり(右図)、それを形成するイオンチャネルが HCN (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation)である。

洞房結節には HCN1 と 4 が発現しており、それぞれの遺伝子欠損マウスや遺伝性洞不全症候群の解析から HCN1,4 が If 電流形成に必須であることが報告されている。

我々が研究対象とするナルディライジン(NRDC)は、膜タンパク質の細胞外ドメインシエディングの活性化因子として、また核内では転写制御因子としても働く「多機能プロテアーゼ」である(図1)。全身性 NRDC 欠損マウス(NRDC^{-/-})は高度の心拍数低下(徐脈)を呈するが、その原因は家族性洞不全症候群の原因遺伝子の一つであるイオンチャネル(HCN1/4)の発現低下による If 電流の低下であることが明らかとなった(図2)。ラット初代心筋培養細胞において、内因性の NRDC 発現をノックダウンすると、HCN4 の発現が低下することから、NRDC が核内で HCN4 の発現を直接制御している可能性が考えられた。

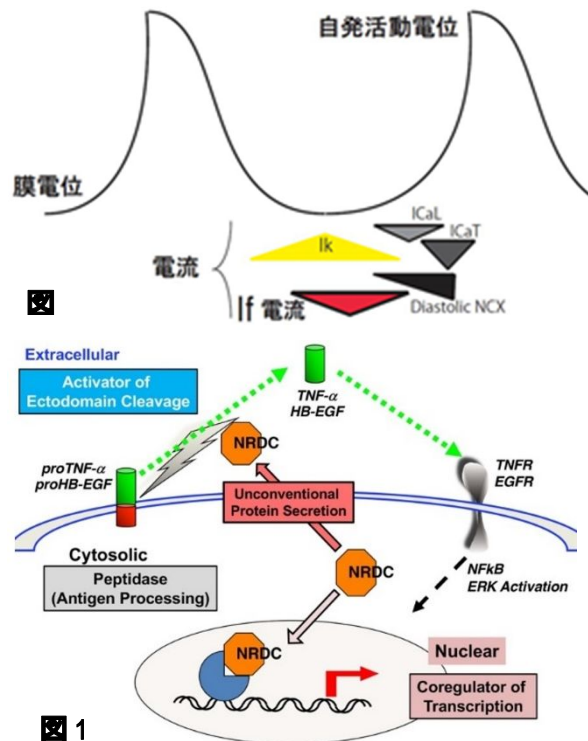


図1

2. 研究の目的

本研究では「NRDC が核内において、転写因子と複合体を形成し、HCN4 の発現を制御する」という仮説のもと、NRDC による、生理的状态と家族性洞不全症候群における洞房結節自動能制御の役割解明を目的とした。さらに転写制御における NRDC の酵素活性の意義を検討することを目的とした。洞房結節特異的 NRDC 欠損マウスや酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスの解析に加え、家族性洞不全症候群における NRDC 遺伝子変異の検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)NRDC による洞房結節自動能制御機構：

NRDC が核内で HCN1/4 の遺伝子発現を制御するという仮説のもと、以下の実験を行った。

NRDC が HCN1/4 の上流に存在し、転写を制御することの確認；クロマチン免疫沈降(ChIP)法：野生型マウス心臓由来クロマチン、抗マウス NRDC 抗体を用いて ChIP 法を行った。

心筋細胞における標的遺伝子の網羅的解析(ChIP シークエンス法)：と同様、抗マウス NRDC 抗体を用いて ChIP シークエンス法を行った。

③ 心房(洞房結節)特異的 NRDC 欠損マウス(SIn-NRDC-KO)を解析した。

(2)NRDC のプロテアーゼ活性の意義： HCN1/4 などの転写制御における NRDC の酵素活性の役割を明らかにするために、

酵素活性欠失型変異 NRDC(NRDC^{E>A})と野生型 NRDC(NRDC-WT)の、転写因子との協調や挙動を検討した。

酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウス(NRDC^{E>A-KI})の心臓表現型解析を行うこととした。

(3)家族性洞不全症候群における NRDC の意義：

不整脈疾患データベースから、家族性洞不全症候群の発端者 37 例のゲノム DNA に対し、次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析にて解析を行った。

(4)コンピューターシミュレーション解析：ヒト iPS 細胞由来洞房結節細胞のモデルを用いて、NrDC^{-/-}で得られた表現型が再現できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1)NRDC による洞房結節自動能制御機構：ChIP 法により NRDC が HCN1, HCN4 のプロモーター領域に結合し、その転写を制御する可能性を明らかにした。さらに、NRDC と複合体を形成してイオンチャネルの発現を制御する転写因子の候補として Is11 に着目した。最近、HCN1/4 及び Cav3.1 は、転写因子 Is11 による発現制御を受けることが他グループにより報告された(Vedantham et al., Circ. Res. 2015)。我々は、NRDC が Is11 と複合体を形成し、膵細胞におけるインスリン分泌に必須の MafA の転写を制御することを示しており、心臓においても Is11 と協調して転写

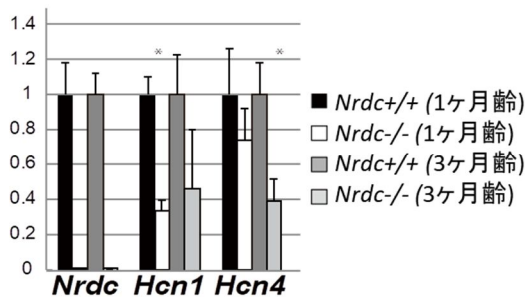
に關与している可能性に着目した。驚くべきことに、NRDC^{-/-}においても Cav3.1 の発現が低下しており、NRDC が Cav3.1 のプロモーター領域にも結合することが明らかとなった。以上より、NRDC と Isl1 が心臓においても複合体を形成し、HCN1/4, Cav3.1 の転写を制御することが示唆された。

(2) NRDC のプロテアーゼ活性の意義： NRDC 欠損 MEF 細胞に、酵素活性欠失型変異 NRDC(NRDC^{E>A})を遺伝子導入しても HCN1 の発現はレスキューされないが、NRDC-WT ではレスキューされることを見出した(図 3)。さらに、この NRDC のプロテアーゼ活性が生体でどのような意義を持つのかを明らかにするために、酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウス(NRDC^{E>A} KI)の作製と解析を行った。NRDC^{E>A} KI ホモマウスは生後 1 日齢(P1)では生存するが、2 日齢以降には存在せず、全て死亡していることが明らかとなった。P1 のマウスを 400 匹解析しても NRDC^{E>A} NRDC KI ホモマウスは 11%程度の生存にとどまっていた。そこで、胎生期(E13.5-15.5)にサクリファイスしたところ、NRDC^{E>A} KI ホモマウスはメンデルの法則通りに存在することから、E>A KI ホモマウスは P1 において、なんらかの原因によって死亡することが示唆された。P1 のマウスの心電図、体重、体温を測定したところ、NRDC^{E>A} KI ホモマウスは野生型と比較して心拍数・体重・体温ともに低下している可能性が示唆された。原因を明らかにするため、P1 マウスの心臓における遺伝子発現解析(RNA-seq)を行い NRDC の酵素活性により制御される遺伝子の絞り込みを行った。

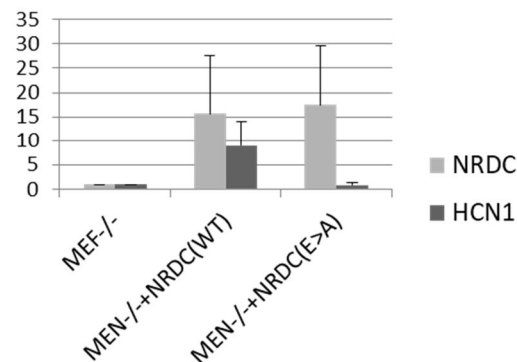
(3) 家族性洞不全症候群における NRDC の意義：次世代シーケンサーを用いた家族性洞不全症候群の発端者 37 例のゲノムからは NRDC の変異は認められなかった。(当初変異と考えられていた部位は、精査の結果正常人にも存在する variation であることが明らかとなった。)

(4) コンピューターシミュレーション解析：ヒト iPS 細胞由来洞房結節モデルによるシミュレーションを行い、Nrdc^{-/-}で認められたイオンチャネルの発現を低下させることで、洞房結節自動能が低下すること、即ちマウスの表現型がシミュレーションによっても再現された。

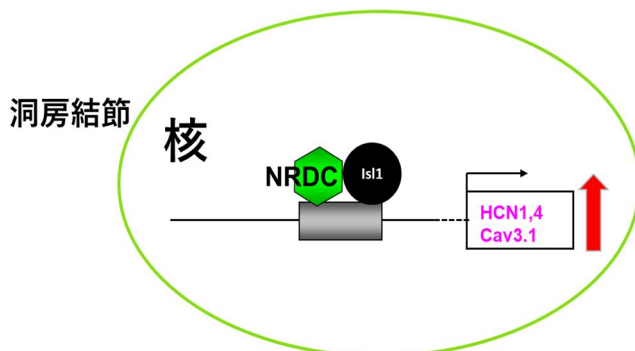
【図2】Nrdc^{-/-}心臓における Hcn1/4mRNAの発現低下



【図3】HCN1の発現はNRDCの酵素活性によって制御される



NRDC は Isl1 と複合体を形成し、HCN1/4, Cav3.1 の遺伝子発現を制御することで洞房結節における自動能形成を制御する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoh T, Hatano E, Kasai Y, Fujii H, Nishi K, Toriguchi K, Sueoka H, Ohno M, Seo S, Iwaisako K, Taura K, Yamaguchi R, Kurokawa M, Fujimoto J, Kimura T, Uemoto S, and Nishi E. | 4. 巻 25(2) |
| 2. 論文標題 Serum nardilysin, a surrogate marker for epithelial-mesenchymal transition, predicts prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical resection | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin Cancer Res. | 6. 最初と最後の頁 619-629 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-0124. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ohno M, Chen PM, Kimura T, Nishi E. | 4. 巻 277 |
| 2. 論文標題 Response to Letter of Stephenson et al.: Nardilysin: A potential biomarker for the early diagnosis of acute coronary syndrome | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Cardiology | 6. 最初と最後の頁 249-249 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcard.2018.10.022. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Chen PM, Ohno M, Kimura T, Nishi E. | 4. 巻 265 |
| 2. 論文標題 Reply: Nardilysin is a promising biomarker for the early diagnosis of acute coronary syndrome. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Cardiology | 6. 最初と最後の頁 236-236 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcard.2018.04.056. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, Sakuma S, Ito K, Kumon H, Hirose H, Okamoto H, Nogawa M, Iwasaki M, Kihara S, Fujio K, Matsumoto T, Higashi N, Hashimoto K, Sawaguchi A, Harimoto KI, Nakagawa M, Yamamoto T, Handa M, Watanabe N, Nishi E, Arai F, Nishimura S, Eto K. | 4. 巻 174(3) |
| 2. 論文標題 Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell | 6. 最初と最後の頁 636-648 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2018.06.011. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kanda Keitaro, Sakamoto Jiro, Matsumoto Yoshihide, Ikuta Kozo, Goto Norihiro, Morita Yusuke, Ohno Mikiko, Nishi Kiyoto, Chiba Tsutomu, Nishi Eiichiro, Seno Hiroshi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53?dependent transcriptional regulation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 JCI Insight | 6. 最初と最後の頁 1-15 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.91316 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Wang Hao, Zhang Xiao-Meng, Ohno Mikiko, Chen Po-Min, Nishi Eiichiro, Ono Koh, Kimura Takeshi, Machida Toshio, Takizawa Hirota, Kashiwado Koichi, Shimada Hideaki, Ito Masaaki, Goto Ken-ichi, Iwase Katsuro, Ashino Hiromi, Taira Akiko, Arita Emiko, Takiguchi Masaki, Hiwasa Takaki | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Association of serum levels of antibodies against MMP1, CBX1, and CBX5 with transient ischemic attack and cerebral infarction | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Oncotarget | 6. 最初と最後の頁 5600-5613 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23789 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. 著者名 Fujii Takayuki, Nishi Eiichiro, Ito Hiromu, Yoshitomi Hiroyuki, Furu Moritoshi, Okabe Namiko, Ohno Mikiko, Nishi Kiyoto, Morita Yusuke, Morita Yugo, Azukizawa Masayuki, Okahata Akinori, Tomizawa Takuya, Kimura Takeshi, Matsuda Shuichi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of tumour necrosis factor alpha secretion | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 RMD Open | 6. 最初と最後の頁 e000436 ~ e000436 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/rmdopen-2017-000436 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kasai Yosuke, Toriguchi Kan, Hatano Etsuro, Nishi Kiyoto, Ohno Mikiko, Yoh Tomoaki, Fukuyama Keita, Nishio Takahiro, Okuno Masayuki, Iwaisako Keiko, Seo Satoru, Taura Kojiro, Kurokawa Masato, Kunichika Makoto, Uemoto Shinji, Nishi Eiichiro | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 910 ~ 917 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13204 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Chen Po-Min, Ohno Mikiko, Hiwasa Takaki, Nishi Kiyoto, Saijo Sayaka, Sakamoto Jiro, Morita Yusuke, Matsuda Shintaro, Watanabe Shin, Kuwabara Yasuhide, Ono Koh, Imai Masao, Inoue Katsumi, Murai Tatsuya, Inada Tsukasa, Tanaka Masaru, Kita Toru, Kimura Takeshi, Nishi Eiichiro | 4. 巻 243 |
| 2. 論文標題 Nardilysin is a promising biomarker for the early diagnosis of acute coronary syndrome | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Cardiology | 6. 最初と最後の頁 1~8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2017.04.047 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mikiko Ohno, Hiroshi Matsuura, Takeru Makiyama, Hirotaka Iwasaki, Shintaro Matsuda, Eiichiro Nishi |
| 2. 発表標題 Metalloprotease nardilysin controls heart rate through the transcriptional regulation of ion channels critical for sinus automaticity |
| 3. 学会等名 第83回日本循環器学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野美紀子, 西 清人, 平岡 義範, 新妻 晋一郎, 西城 さやか, 坂本 二郎, 陳 博俊, 森田 雄介, 松田 真太郎, 椋本 淑子, 清成 寛, 松浦 博, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎. |
| 2. 発表標題 Nardilysin regulates cardiac dynamics and cardiac sympathetic innervation through modulating p75NTR shedding |
| 3. 学会等名 神経科学大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ohno M, Chen P-M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Kita T, Kimura T, and Nishi E. |
| 2. 発表標題 Nardilysin is a Promising Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome. |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野美紀子、陳博俊、日和佐隆樹、西清人、西城さやか、森田雄介、松田真太郎、木村剛、西英一郎. |
| 2. 発表標題 急性冠症候群における新規バイオマーカー「ナルディライジン」の有用性についての検討 |
| 3. 学会等名 第22回日本病態プロテアーゼ学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野美紀子 |
| 2. 発表標題 多機能タンパク質Nardi lysinのACSバイオマーカーとしての意義 |
| 3. 学会等名 第3回Cardiac Biomarker研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野美紀子、西 清人、平岡 義範、新妻 晋一郎、西城 さやか、坂本 二郎、陳 博俊、森田 雄介、松田 真太郎、椋本 淑子、清成 寛、松浦 博、北 徹、木村 剛、西 英一郎 |
| 2. 発表標題 ナルディライジンは神経栄養因子受容体(p75NTR)のシェディングを介して心臓交感神経の分布を制御する |
| 3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 滋賀医科大学薬理学講座 http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/ |
|--|

