

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15879

研究課題名(和文) アルコール性心筋障害におけるHippo-YAP経路の破綻とマイクロRNAの役割

研究課題名(英文) Involvement of YAP inactivation and microRNA in ethanol-induced cardiotoxicity

研究代表者

則竹 香菜子(Noritake, Kanako)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：40758067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性・慢性的なアルコールの過剰摂取は心筋障害を引き起こすことが知られているが、その分子機構は未解明な部分が多い。これまでに、HL-1細胞においてエタノールによるアクチン細胞骨格の破綻とYAPの機能阻害がアルコールによる心筋細胞障害に関わる重要な因子であることが示唆された。さらに、心筋特異的なmiR-133aの発現量が減少することを確認した。miR-133aの標的mRNAである、不整脈誘発に関わるHcn2および細胞周期に関わるCyclin D2の発現量が増加していることを確認したことから、エタノールによるmicroRNAの発現変動が心筋細胞障害に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エタノールに限らず、様々な薬物刺激による細胞障害機構は複数のシグナル経路が複雑なネットワークを形成している場合が多い。本研究では、個体よりもより単純化した培養細胞系を用いることで詳細な分子機構の解析が可能となり、アルコールによる心筋細胞障害に関わる新規のシグナル経路としてHippo-YAPシグナルや、microRNAが関与することを見出した。

アルコールによる心筋障害の詳細な分子機構を解明することで、臨床医学上での治療法や法医学上での診断法の確立に貢献できると考える。また、アルコールのリスクを科学的に証明することで、アルコール乱用の抑制に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Excessive alcohol consumption often causes compromised myocardial contractile function, although the precise mechanism remains unknown. We have previously demonstrated that disruption of the actin cytoskeleton and inactivation of an anti-apoptotic transcriptional co-activator Yes-associated protein (YAP) are involved in ethanol cytotoxicity on cardiomyocytes. We found that expression of miR-133a, which is the most abundant and cardiac-specific microRNA (miRNA), was decreased in HL-1 murine atrial cardiomyocytes after exposure to ethanol. In addition, mRNA levels of Hcn2 and cyclin D2, which are miR-133 targets and involved in cardiac arrhythmia (electrical remodeling), were increased in ethanol-exposed cells. In summary, our data show that miRNAs should be crucially involved in the cytotoxicity of ethanol on HL-1 cardiomyocytes.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール 心筋細胞障害 YAP microRNA

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性的・慢性的なアルコール(エタノール)の過剰摂取は心筋障害を引き起こすことが知られているが、その分子機序は未解明な部分が多い。申請者はこれまでに、エタノールによる心筋細胞毒性の機序として、アポトーシス型細胞死の誘導、細胞間接着(ギャップジャンクション・デスモソーム・アドヘレンスジャンクション)の破綻およびアクチン細胞骨格の変性、細胞間接着などの物理的刺激を感知して細胞増殖や細胞死を制御する Hippo-YAP シグナルの破綻が関与していることを明らかにした。

(2) microRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない小分子 RNA で、標的 mRNA に結合し遺伝子発現を抑制することで、多様な生命現象に関わっている。心筋では発生や分化だけでなく、肥大・線維化・不整脈などの病態にも多種の miRNA が関与していることが報告されている。

Hippo-YAP シグナルは複数のシグナル伝達経路とクロストークしていることが明らかとなっており、miRNA は Hippo-YAP シグナルと相互作用し、がん化の促進や心筋の再生に関与しているとの報告がある。このことから、エタノールによる Hippo-YAP シグナルの破綻に miRNA が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、エタノールによる心筋細胞障害における Hippo-YAP シグナルと miRNA の役割について検討し、アルコールによる心筋障害の詳細な分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス心房筋由来細胞株 HL-1 細胞を用いて、エタノール投与群、および非投与群それぞれの細胞から小分子 RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析により、エタノール非投与群に比べシグナル強度が有意に変化している miRNA を同定した。さらに、変動のあった miRNA の発現量をリアルタイム PCR により定量した。

エタノール投与により発現変動のみられた miRNA を抽出し、その標的 mRNA の発現量の変化をリアルタイム PCR により定量した。

さらに、エタノール投与により発現変動のみられた miRNA を過剰発現またはノックダウンした HL-1 細胞にエタノールを刺激し、Hippo-YAP シグナル関連分子のタンパク質および遺伝子の発現変化を確認した。エタノールによる細胞死に対する miRNA の役割についてミトコンドリア機能を測定する MTT アッセイやアポトーシス関連分子の発現を確認することで評価した。

4. 研究成果

(1) エタノールを曝露した HL-1 細胞では、Hippo シグナルが抑制され、標的分子である転写共役因子 YAP が低リン酸化状態となるが、YAP の核への移行が障害されている様子が観察された(図1)。エタノールによりアクチン細胞骨格が変性し張力が減少することで YAP の核移行が阻害され、細胞死が抑制されないと考えられた。

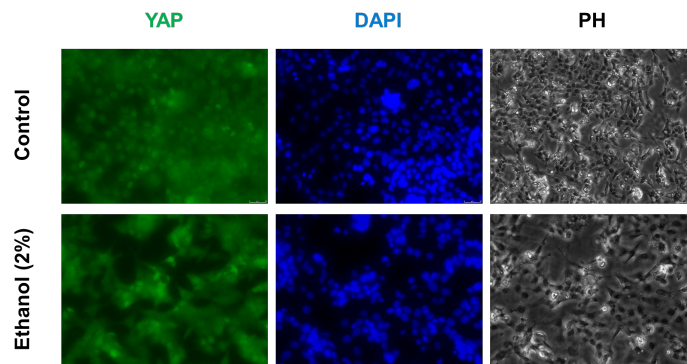


図1. エタノールによる YAP 不活性化

(2) miRNA マイクロアレイ解析により、エタノール投与で発現変動した miRNA を網羅的に解析した結果、いくつか同定された miRNA のなかで、心筋の肥大・線維化の誘導や再生を抑制するとの報告がある miR-133a の発現低下が顕著に見られた。リアルタイム PCR により、エタノール投与後時間依存的に miR-133a の発現が低下していた(図2)。

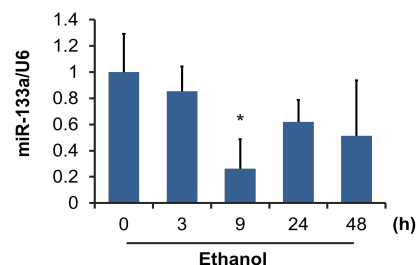


図2. エタノールによる miR-133a の発現低下

(3) miR-133a の標的 mRNA である Hcn2(過分極誘発陽イオンチャンネル)および cyclin D2 の有意な増加を認めた(図3)。しかし、miR-133a の標的であり、YAP の標的遺伝子でもある細胞増殖・生存に重要な CTGF は mRNA 及びタンパク質発現量がエタノールによって時間依存的に減少することが示された(図4)。

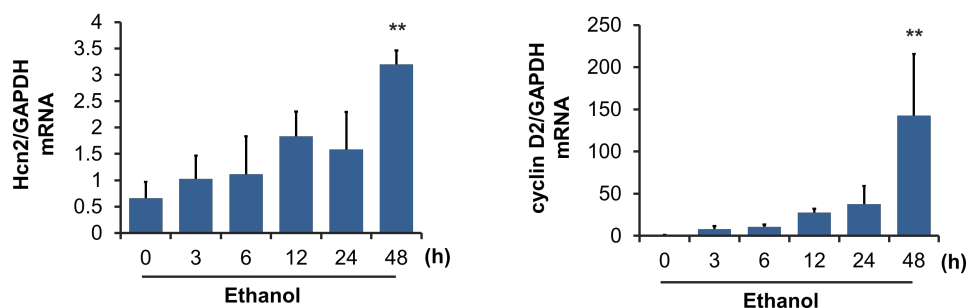


図 3. miR-133a の標的である Hcn2 および cyclin D2 の発現増加

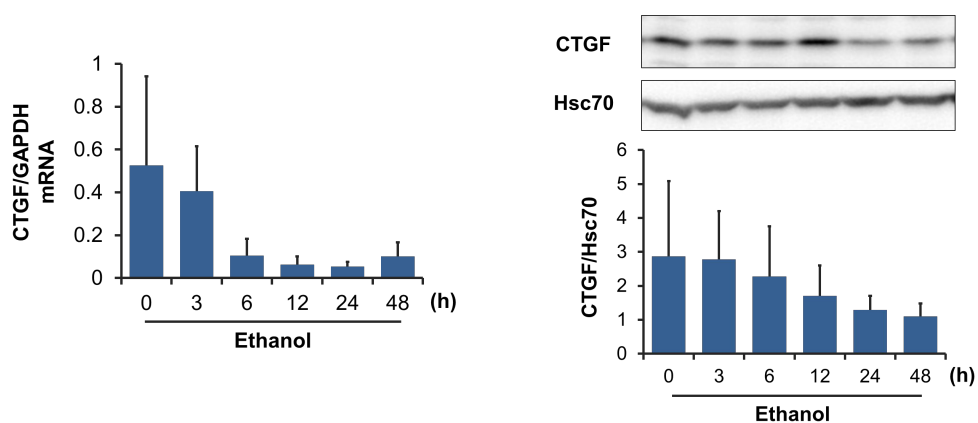
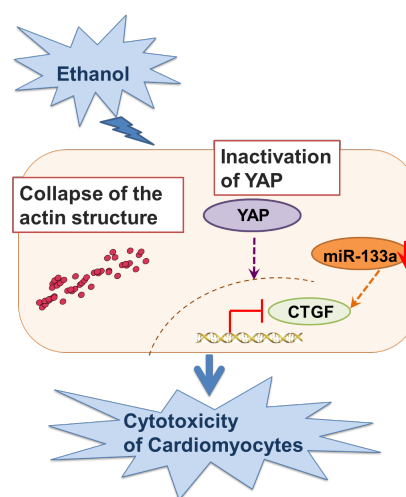


図 4. miR-133a および YAP の標的である CTGF の発現低下

(4) これまでの結果から、エタノールによるアクチン細胞骨格の破綻と YAP の機能阻害がアルコールによる心筋細胞障害に関わる重要な因子であることが示唆された。

さらに、エタノール曝露により心筋特異的な miR-133a の発現量が減少することが確認できた。また、miR-133a の標的 mRNA である、不整脈誘発に関わる Hcn2(過分極誘発陽イオンチャンネル)および、細胞周期に関わる Cyclin D2 の発現量が増加していることを確認したことから、エタノールによる microRNA の発現変動が、心筋細胞障害に関与している可能性が考えられた。しかし、miR-133a の標的であり、また YAP の標的としても知られる細胞生存に関わる CTGF の発現量は減少していた。miR-133a 過剰発現によりエタノール投与後の CTGF 発現量に変化はなかったことから、エタノールによる YAP 不活性化が心筋細胞障害に重要な役割を果たすと考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Moe Kimura, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Koichi Uemura. Restoration of YAP activation rescues HL-1 cardiomyocytes from apoptotic death by ethanol. J Toxicol Sci. 2017.10; 42 (5): 545-551. 査読有
<https://doi.org/10.2131/jts.42.545>

〔学会発表〕(計 2 件)

Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Koichi Uemura. Involvement of microRNA in ethanol-induced cardiotoxicity. ISBRA 2018. Sep 2018. Kyoto

則竹香菜子, 秋 利彦, 上村公一. エタノールによる心筋細胞死は YAP 活性化により抑制される. 第 52 回 日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 2017 年 9 月. 横浜

〔図書〕(計 2 件)

Toshihiko Aki, Kanako Noritake, Takeshi Funakoshi, Koichi Uemura. Comprehensive Toxicology 3rd ed Volume 1. Elsevier UK, 2018 Modes of Chemically Induced Cell Death. (ISBN : 9780081006016)

Toshihiko Aki, Kanako Noritake, Kana Unuma, and Koichi Uemura. “Autophagy in health and disease”, “Stem Cell Biology and Regenerative Medicine” book series. Humana press, Springer-Nature, 2018 Autophagic regulation of cardiomyocyte survival and heart regeneration. (ISBN : 978-3-319-98145-1)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_top.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

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。