

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08025

研究課題名(和文) 心筋傷害と心筋保護に与えるミッドカインの作用機構の解明と新規心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of Midkine on myocardial injury and protection and development of novel heart failure therapy

研究代表者

宍戸 哲郎 (Shishido, Tetsuro)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60400545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臓器低灌流状態や低酸素状態により肺と腎臓でMidkine (MK)が産生され、循環したMKが心不全増悪を関与する。他方でMKが心筋保護的に作用する二面性を持つ。本研究ではMKと結合する核タンパク質Nucleolinに着目し、MKが作用する細胞膜Nucleolinを介したEGFR活性の上昇や心肥大活性化機序、MKと結合し核内へ移行するNucleolinによる抗アポトーシス効果の二つを明らかにする。心臓特異的MK過剰発現マウス、GAR domain欠損Nucleolin心臓特異的過剰発現マウスを用いて横行大動脈縮窄術後の心臓を解析して、心機能に対するMKの役割を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、Midkine (MK)がEGFRを活性化し左室リモデリングの進展を促すことを報告したが、詳細な機序は不明であった。加えて、MKとNucleolinとの結合によって、EGFR活性が亢進することや左室リモデリングが進展することを明らかにした報告は皆無である。また、NucleolinがMKと結合後に核内に移行するが、核内Nucleolinによる抗アポトーシス効果やMKとの関連性に関しては、報告がない。本研究ではMKとNucleolin複合体が心筋細胞障害、心筋細胞保護のdual effectを発揮する機序に関して理解が深まるため、心不全の新規の治療法の開発につながる重要な基盤研究となる。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease and chronic pulmonary disease are risk factors for heart failure. Organ hypoperfusion and hypoxia produce midkine (MK) in the lungs and kidneys, and circulating MK is responsible for the exacerbation of heart failure. On the other hand, MK reportedly has a role as a cardioprotective agent. In this study, we focus on Nucleolin, a nuclear protein that binds to MK, to elucidate two mechanisms: 1) how MK increases epidermal growth factor receptor (EGFR) activity and activates cardiac hypertrophy via surface Nucleolin, and 2) the anti-apoptotic effect of Nucleolin, which binds to MK and enters the nucleus. We analyze hearts after transverse aortic stenosis using heart-specific MK overexpressing mice and GAR domain-deficient Nucleolin heart-specific overexpressing mice to clarify the role of MK on cardiac function.

研究分野：循環器内科

キーワード：midkine nucleolin 心不全 心腎連関

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い慢性腎臓病、慢性呼吸機能低下を伴う心不全患者は年々増加しており、臓器連関に伴う心不全の進展機序の解明が急務である。Midkine (MK) は生後すぐに発現が低下するが、腫瘍組織や慢性腎臓病では再び発現が亢進し、AKT/PKB、ERK1/2 を活性化して腫瘍増殖や遠隔転移に関与する成長因子である (J Clin Invest. 2009)。

我々は、血中 MK 濃度が心不全重症度や心不全増悪と相関すること (J Card Fail 2010)、心不全時に腎臓と肺で MK 発現が亢進すること、心臓圧負荷モデル (TAC) による心肥大と心機能低下が心臓特異的 MK 過剰発現 (MK-TG) マウスで進行すること (Biochem Biophys Res Commun 2014)、腎障害で MK が分泌され心臓の上皮成長因子受容体 (EGFR) に作用して心機能の低下を促す (Hypertension 2016) ことを明らかにし MK 関連シグナルが慢性心不全に対する新規治療法のターゲットとして有効である可能性を明らかにした。

しかし、心筋梗塞、虚血再灌流、頻脈による心筋傷害に対しては、MK が心臓保護的に作用する報告 (Circulation. 2006, Heart Vessels. 2016) がなされており、MK には心筋保護と心筋傷害の相反する二つの役割を持っている可能性がある。

Nucleolin は MK が結合する受容体のひとつである。Nucleolin は主として核内に存在し、DNA 修復、NAD 依存性脱アセチル化酵素の制御、クロマチンの制御、Bcl-2 と熱ショックタンパク質などの転写に関与し、核内 Nucleolin の過剰発現は抗 apoptosis 効果を持つ (Proteomics. 2014, Am J Pathol. 2017, Cardiovasc Res. 2011)。酸化ストレスで Nucleolin が細胞膜へ局在が変化し、リガンドと細胞膜 Nucleolin が結合すると核内に取り込まれる (Mol Cell Biol. 2002)。一方で、腫瘍細胞では、細胞膜 Nucleolin にリガンドが結合すると ERK1/2 の活性化を促し腫瘍増殖や血管新生に寄与している (Oncogene. 2005)。従って、Nucleolin は心筋細胞肥大、心筋保護の双方に作用している可能性がある。

MK がなぜ心筋保護効果と心筋傷害効果の相反する二つの効果に関与しているのか、また Nucleolin にどのように作用しているかは不明である。MK と Nucleolin の細胞内シグナルへの作用機序の解明は、臓器連関に関与する MK を標的とした心不全治療法を開発する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究は、心筋保護と心筋傷害メカニズムとして MK-Nucleolin-EGFR の関連性に注目している。MK の dual effect を解明するために、細胞膜へ移行した Nucleolin による EGFR を介する心筋傷害効果と、核内の Nucleolin による抗 Apoptosis 効果に関する検討を行い、MK の発現や血中濃度が亢進している慢性腎臓病、高齢者、慢性閉塞性肺疾患などを合併した慢性心不全に対する新規治療を開発する。

我々は、心臓、腎臓、肺などの臓器間の相互作用に MK が関与することに以前から着目し、MK の心不全進展機構の解明を行ってきた。本研究は、MK による心保護、心筋傷害の二面性の作用と、Nucleolin の機能に着目した研究であり、in vitro, in vivo とも世界に先んじた研究である。これまで、MK による EGFR 活性化メカニズムや、MK をリガンドとする Nucleolin の意義を明らかにした研究は皆無である。本研究によって、我々がこれまで明らかにしてきた MK による心不全進展メカニズムに関する理解を深め、MK 関連シグナル伝達経路のどの領域を薬剤ターゲットにしていくかを決定することが可能となるため、基礎研究から臨床基礎研究へ応用することが可能となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) MK による EGFR 活性化機構の解明

Nucleolin の GAR domain と EGFR との結合を介する心筋細胞肥大抑制効果を検討するために、培養心筋細胞と siRNA を用いて、EGFR、ERK1/2、AKT 活性、BNP-luciferase assay を行う。

(2) 核内 Nucleolin と細胞膜 Nucleolin の MK 刺激心筋に与える意義の違いの検討

Nucleolin の局在による効果の違いを検討するために、核移行シグナル NLS を欠失した Nucleolin (del-NLS-Nuc) や del-GAR-Nuc を培養心筋細胞に transfection し、MK 刺激下での Angiotensin II による肥大と Doxorubicin による心筋細胞 Apoptosis に関する検討を行う。心筋細胞肥大を顕微鏡的検討や BNP-luc, ANP-luc を用いた luciferase assay で、EGFR、ERK1/2、AKT 活性を Western blotting 法で行う。Apoptosis に与える効果に関して、real-time PCR、Western blotting 法で HSP、BCL-2、BCL-xl の発現の評価し、Caspase 活性を ELISA 法と Western blotting 法で、Apoptosis 細胞の検出を TUNEL assay を行う。del-GAR-Nuc では心筋細胞肥大シグナルと Apoptosis が抑制されており、del-NLS-Nuc では Apoptosis と心筋細胞肥大シグナルの双方の亢進が予想される。

(3) del-GAR-Nuc 過剰発現マウスと MK-TG マウスの掛け合わせたダブルトランスジェニック (DTG) マウスを用いて、TAC 手術を行い心機能、EGFR、AKT、ERK1/2 などの心筋細胞肥大シグナルの解析を行う。同様に Doxorubicin 心筋症モデルを用いて、野生型マウス、MK-TG マウス

と DTG マウスの心機能評価と Apoptosis の検討を行う。

(4) 核内 Nucleolin の核内から細胞表面への移行に関する検討

低酸素によって Nucleolin が核から細胞表面に移行すること、SUMO 化 E3 リガーゼである PIAS1 の siRNA によって Apoptosis が抑制されていることを確認した。Nucleolin の Sumo 化、アセチル化に関する翻訳後修飾部位を、deletion mutant を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) MK による EGFR 活性化機構の解明

MK と Nucleolin、Nucleolin と EGFR の結合を免疫沈降で確認し、MK 刺激によって Nucleolin と EGFR の結合が亢進することを確認した。臓器傷害時に、核や核近傍に位置する Nucleolin が細胞膜に局在が変化すること、心筋細胞では細胞表面に移行した Nucleolin と MK が結合する。

siRNA-Nucleolin、細胞膜 Nucleolin を阻害する AS1411 によって EGFR と Nucleolin の結合が減弱し、EGFR、ERK1/2 活性が抑制された。また、Nucleolin の GAR domain を欠失すると (del-GAR-Nuc) Nucleolin は EGFR と結合できず、ERK1/2 のリン酸化と BNP 発現が抑制された。

(2) 核内 Nucleolin と細胞膜 Nucleolin の MK 刺激心筋に与える意義の違いの検討

del-GAR-Nuc では心筋細胞肥大シグナルと Apoptosis が抑制された。核内の Nucleolin が作用する SIRT6、SIRT7 を siRNA を用いて抑制すると心筋細胞肥大が抑制された。

(3) del-GAR-Nuc 過剰発現マウスと MK-TG マウスの掛け合わせたダブルトランスジェニック (DTG) マウスの作成

AS1411 を投与した予備動物実験では細胞肥大シグナルが抑制されていたことから、Nucleolin が EGFR に作用できないため同様に肥大シグナルは抑制され、核内へ移行する Nucleolin が増加した。

(4) 核内 Nucleolin の核内から細胞表面への移行に関する検討

低酸素によって Nucleolin が核から細胞表面に移行すること、SUMO 化 E3 リガーゼである PIAS1 の siRNA によって Apoptosis が抑制されていることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe K, Watanabe T, Otaki Y, Shishido T, Kato S, Tamura H, S. Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Watanabe M	4. 巻 15
2. 論文標題 The association between microRNA-21 and hypertension-induced cardiac remodeling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0226053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0226053. eCollection 2020.	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 Takahashi T, Shishido T, Kinoshita D, Watanabe K, Toshima T, Sugai T, Narumi T, Otaki Y, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe JI, Takeishi Y, Kubota I, Watanabe M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac Nuclear High-Mobility Group Box 1 Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting DNA Damage Response.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2018.11.011.	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 Tetsuya Takahashi, Tetsuro Shishido, Daisuke Kinoshita, Ken Watanabe, Taku Toshima, Takayuki Sugai, Taro Narumi, Yoichiro Otaki, Harutoshi Tamura, Satoshi Nishiyama, Takanori Arimoto, Hiroki Takahashi, Takuya Miyamoto, Tetsu Watanabe, Chang-Hoon Woo, Jun-ichi Abe, Yasuchika Takeishi, Isao Kubota and Masafumi Watanabe	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac Nuclear High-Mobility Group Box 1 Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting DNA Damage Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2018.11.011	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 該当する
1. 著者名 Takahashi T, Shishido T, Watanabe K, Sugai T, Toshima T, Kinoshita D, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Shibata Y, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I, Watanabe M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Ventricular wall stress and silent myocardial damage are associated with pulse pressure in the general population.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Hypertens (Greenwich).	6. 最初と最後の頁 1319-1326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jch.13349.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Watanabe K, Watanabe T, Otaki Y, Shishido T, Kato S, Tamura H, S. Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Watanabe M
2. 発表標題 Elevated plasma xanthine oxidoreductase activity predicts cardiovascular events in patients with heart failure with preserved ejection fraction
3. 学会等名 ESC (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Takahashi
2. 発表標題 Cardiac nuclear high-mobility group box 1 attenuates angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy by inhibiting DNA damage response pathway.
3. 学会等名 ESC, Munich ; 2018.8 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------