

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15838

研究課題名(和文)大動脈弁狭窄症発症におけるCircular RNA ITCHの機能解明

研究課題名(英文)The role of circular RNA ITCH in the development of aortic stenosis

研究代表者

大瀧 陽一郎 (Yoichiro, Otaki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80732693

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)：医学の進歩にもかかわらず大動脈弁狭窄症の発症を抑制する薬物療法はない。大動脈弁狭窄症の発症には、大動脈弁硬化と左室肥大が関与する。我々はユビキチン転移酵素ITCHおよびCircular RNA ITCHに注目して検討を行った。circular RNA ITCHの標的であるmiR214は予想に反して、大動脈弁狭窄症で著大な変化を認めなかった。そこで、ITCHに注目して検討を行いITCHはDvlを標的蛋白質とし、Wnt/ カテニン経路を介して左室肥大を抑制することを発見し、報告した。人大動脈弁サンプルでは、ITCHの発現が低下しており、ITCHの機能低下が大動脈弁硬化に関与することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン転移酵素ITCHが大動脈弁狭窄症発症(左室肥大や大動脈弁硬化)に関連することを示した。左室肥大に関しては、心筋特異的ITCH過剰発現マウスを用いて、ITCHがWnt/ カテニン経路を介して、野生型マウスに比較して心肥大を抑制し、心機能を改善することを示した。大動脈弁硬化に関しては、人大動脈弁サンプルを用いて、大動脈狭窄症の発症に、ITCHの機能低下が関与することを示した。また、ITCHがRunx2の発現を抑制するデータを得た。本研究により得られた新たな知見から、ITCHが左室肥大と大動脈弁硬化に対する新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Left ventricular hypertrophy and aortic valve calcification are associated with the development of aortic stenosis. We examined the role of circular ITCH and ITCH on the development of aortic stenosis. Unexpectedly, expression level of miR214, a target of circular ITCH, was not changed after left ventricular hypertrophy induced by transverse aortic constriction. Thus, we focused on the ubiquitin E3 ligase ITCH, but not circular ITCH, and found that ITCH attenuates left ventricular hypertrophy through Wnt/ catenin signaling pathway. Furthermore, mRNA expression level of ITCH in aortic valve was lower in patients with AS than in those without it. These findings suggest a pivotal role of ITCH in the development of aortic stenosis and identify ITCH as a potential treatment target for preventing aortic stenosis.

研究分野：循環器領域

キーワード：ITCH E3 ligase cardiac hypertrophy aortic stenosis

1. 研究開始当初の背景

生活様式の変化や人口の高齢化に伴い大動脈弁狭窄症は増加傾向にある。医学の進歩にもかかわらず、有効な薬物療法が確立しておらず、依然として死亡率の高い疾患である。これまで、大動脈弁狭窄症の適切な動物モデルが少なく、病態解明や新たな薬物治療の開発には至っていない。大動脈弁狭窄症は、先天性二尖弁を除けば、多くが加齢・動脈硬化による加齢性大動脈弁狭窄症である。大動脈弁の硬化および大動脈弁狭窄に伴う左室圧負荷による左室肥大が主な形態的变化である。これらの形態変化に共通の病態を解明することで、新たな薬物開発につながると考えられる

ユビキチン転移酵素 ITCH は 113 kDa のタンパク質で、標的タンパク質を認識する WW 領域、HECT 領域を含めた 4 つの領域から構成される。WW 領域は、標的タンパク質の PPXY 配列を認識し、HECT 領域が直接ユビキチンを標的蛋白質に付加する。標的蛋白質と相互作用することで細胞内の恒常性維持・シグナル伝達・細胞死・細胞形態を調節する機能を有する。Circular RNA は、恒常的に細胞内に発現しており、近年その役割が注目を集めている。従来はスプライシングエラーによる産物と考えられていたが、miRNA と同様に転写調節に関与することが報告された。Circular ITCH は、種々の癌細胞において、ITCH の 3'非翻訳領域近辺に寄り添うように発現しており、miR7 や miR214 といった発がん性 miRNA を吸着し、ITCH の転写を促進する。

ITCH は様々なタンパク質を標的とし、Circular ITCH は様々な miRNA を標的とするが、我々は Dishevelled protein (Dvl)と miR214 に注目した。Dvl は Wnt/ β catenin 経路の主要な調節因子である。Wnt/ β catenin 経路は大動脈弁の石灰化、左室肥大において重要な役割を担うと報告された。Dvl は Dvl1・Dvl2・Dvl3 の 3 種類が存在するが、Dvl1 心筋特異的過剰発現マウスは左室肥大を来し、Dvl1 ノックアウトマウスは左室肥大を抑制することが報告された。また、miR214 は、EZH2 を介して心肥大を促進することが報告された。

2. 研究の目的

大動脈弁狭窄症において細胞内のシグナル伝達を担うタンパク質がユビキチン修飾を受けることに注目した。ユビキチン転移酵素 ITCH は、Dvl と相互作用することで Wnt/ β catenin 経路を介して左室肥大や大動脈弁硬化を抑制する可能性がある。また、Circular ITCH を過剰発現することで、ユビキチン転移酵素 ITCH の発現も増加し、miR214 や Dvl の発現を抑制する可能性がある。ITCH や Circular ITCH を調節することで Wnt/ β catenin 経路を中心とした複数のシグナル伝達系を介して、強力に大動脈弁の硬化や心肥大を抑制し、大動脈弁狭窄症や心不全発症を抑制すると仮説をたてた。本研究の目的は、大動脈弁狭窄症発症におけるユビキチン転移酵素 ITCH と Circular ITCH の役割や機能を検討するである。

3. 研究の方法

左室肥大に関する実験系と大動脈弁硬化に関する実験系の二つに分けて研究を行った。

○左室肥大に関する実験系

新生仔ラット心筋細胞と H9C2 心筋細胞による細胞実験および心臓特異的 ITCH 過剰発現マウス

を用いた動物実験を行った。

細胞実験において、免疫沈降法を用いて、ITCH と Dvl の相互作用を検討した。同様に、ユビキチン化の評価を行った。心肥大刺激として、Wnt3a 刺激、Angiotensin II 刺激、Endothelin-1 刺激を行った。心肥大の評価として、Myh7 の mRNA 発現や免疫染色で細胞サイズを計測した。心筋細胞に ITCH を過剰発現や knockdown することで、ITCH の機能が心筋細胞肥大に与える影響を検討した。

動物実験においては、大動脈縮窄手術により左室肥大を誘導した。心筋特異的 ITCH 過剰発現マウスと野生型マウスを用いて、左室肥大を比較検討した。心臓超音波検査を行い、心収縮能を比較検討した。また、大動脈縮窄手術後の生存率を比較検討した。

○大動脈弁硬化に関する実験系

豚間質細胞による細胞実験を行った。Osteogenic medium による刺激を行った。

人大動脈弁サンプルを採取し、マイクロアレイで遺伝子発現を解析した。

4 . 研究成果

○左室肥大に関する成果

左室肥大のモデルとしてマウスに大動脈縮窄手術を施行した。手術後 28 日で評価を行ったところ、野生型マウスでは、Circular ITCH の標的である miR214 は発現量が 1.4 倍と有意ではあったが、著名な変化を認めなかった。また、ITCH の mRNA レベルでの発現を検討したが、心肥大刺激で著変なく、心肥大に関しては Circular ITCH による ITCH の転写調節への関与が少ない可能性が示唆された。一方、ITCH や ITCH の標的タンパク質である Dvl 1 や Dvl 2 は既報通り、大動脈縮窄手術後に有意な増加を示した。そのため、左室肥大に関しては Circular ITCH ではなく ITCH に注目して検討を行う方針とした。

ユビキチン転移酵素 ITCH は、心筋細胞において Dvl 1 ・Dvl2 ・Dvl3 と相互作用を認めた。ITCH を心筋細胞に過剰発現すると、心肥大刺激 (Wnt3a 刺激 ・AngII 刺激 ・ET-1 刺激) に対して、心筋細胞肥大を抑制した。逆に siRNA で ITCH を knockdown すると、心肥大刺激後に心筋細胞肥大が増悪した。心筋特異的 ITCH 過剰発現マウスは、大動脈縮窄手術後に生存率が高率で心機能が保持された。以上から、ITCH は左室肥大を抑制し、心不全発症を予防する可能性が示唆された。

○大動脈弁硬化に関する成果

人大動脈弁サンプルを用いて、マイクロアレイで遺伝子発現を解析した。大動脈弁狭窄症例と大動脈弁閉鎖不全症の大動脈弁を比較した。ユビキチン転移酵素 ITCH は、大動脈弁狭窄症の弁サンプルでは有意な発現の低下を認めた。本結果より、人において大動脈弁狭窄症発症において、ITCH の機能低下が関与する可能性が示唆された。豚大動脈弁間質細胞に、Osteogenic medium 刺激を行うと Runx2 の発現が亢進し、大動脈弁石灰化が惹起される。Runx2 は ITCH の基質である。豚大動脈弁間質細胞にユビキチン転移酵素 ITCH を過剰発現したところ、Runx2 の発現が蛋白質レベルで抑制された。これらの結果を踏まえて、ITCH が大動脈弁硬化を抑制する可能性があり、実験を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goto J, Otaki Y, Watanabe T, Kobayashi Y, Aono T, Watanabe K, Wanezaki M, Kutsuzawa D, Kato S, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Watanabe M.	4. 巻 76
2. 論文標題 HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)-Type Ubiquitin E3 Ligase ITCH Attenuates Cardiac Hypertrophy by Suppressing the Wnt/ -Catenin Signaling Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1968-1878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15487.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jun goto, Otaki yoichiro et al.
2. 発表標題 HECT-type E3 ligase ITCH attenuates cardiac hypertrophy by suppressing Wnt signaling pathway
3. 学会等名 ESC
4. 発表年 2019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
---------	---------