

平成22年 3月 12日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19590802
 研究課題名（和文） トランスクリプトーム解析と生体イメージングによる心不全に対する新しい治療法の開発
 研究課題名（英文） A novel therapeutic approach for heart failure with transcriptomic analysis and in vivo imaging.

研究代表者

中山 雅晴 (NAKAYAMA MASAHARU)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：40375085

研究成果の概要：

- 1) 心不全の形成過程で要因特異的な転写因子をトランスクリプトーム解析により同定した。
 - ① 大動脈結紮による圧負荷モデルとアンジオテンシン II 持続注入による液性因子負荷モデルをそれぞれ作成し、負荷開始後1週間目で左心室を回収した。
 - ② 有意に発現上昇が認められる遺伝子群を同定し、それらの遺伝子上流1kbにわたる塩基配列を、他の遺伝子上流情報とともにデータベースから情報収集した。
 - ③ その遺伝子上流域に含まれる転写因子結合配列の出現頻度を調べ、全体の遺伝子上流配列のなかで出現頻度が統計学的に有意に高くなるものを同定した。それらは両負荷モデル共通のもの、それぞれのモデルにのみ出現する配列とが認められ、圧負荷・液性因子負荷ともに共通して働く転写因子と、個別のモデル特有に関与する転写因子とに分けられた。
- 2) 対象とする転写因子の活性を生体の心臓においてリアルタイムに可視化することに成功した。
 - ① 上記1)で求めた転写因子の結合配列とルシフェラーゼ発現部位とを含んだプラスミドベクターを作成し、マウスの左心室に発現させたのち、基質であるルシフェリンを腹腔内に注入した上で、In vivo imaging systemで観察、発光を定量化することにより各々の転写因子による転写活性を生体で確認する方法を確立した。
 - ② 転写因子結合配列を含む発現ベクターを左心室に発現させたマウスを上記2つの負荷により左室肥大を形成させた。負荷開始翌日より血圧・体重・脈拍とともに転写因子活性を測定し、2日ごと2週間まで測定を繰り返すことで、心不全形成過程における各々の転写活性の程度を生体で連続観測することに成功した。
- 3) 上記実験により、解析結果同様、要因特異的な転写因子の介在を示した。今後、同様の手法で知見を積み重ねることにより、多因子疾患である心不全の診断・治療法開発の新しいアプローチになるものと期待される。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード: 分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心不全は様々な原因によって引き起こされる複合的病態であり、高齢化社会の現在、その有病率と死亡率とはますます高まるおそれがあるため、対応策が急務である。

多くの臨床研究の成果により、アンジオテンシン転換酵素阻害剤やアンジオテンシン受容体拮抗剤、 β 遮断薬、抗アルドステロン剤などの薬剤において心不全患者の予後を改善するというエビデンスが確立し、実際の診療現場においても、その効果を実感できる。しかしながら、それら薬剤の適応や至適量の選択において画一的な基準はなく、実地臨床家それぞれの判断に任されている。また、遺伝子背景や、弁膜症・心筋症・虚血性心疾患などの病因からも薬剤の選択は数多考えられるが、使用における明確な基準はやはり存在しない。もし、複合的要因の中からより重要な病因を特定し、その病因特異的に治療を進めていくことができるならば、薬剤による副作用を減少し、医療効率的にも優れる方法を選択できるものと期待される。

一方、今までの動物実験モデルによる解析研究を通して、心臓が負荷をうけ、心肥大を形成し、さらに進行するかたちで心不全になるという過程が示されてきた。その過程において、いくつもの細胞シグナル系が活性化され、様々な転写因子の介在により遺伝子発現が惹起されることも明らかになっている。そこで、異なる要因により活性化される転写因子を同定し、その活性や特異的に発現が亢進する遺伝子などを測定することが可能となれば、要因特異的なモニタリングというアプローチが可能になりうるのではないだろうか、と考えられる。本研究では、その仮説に基づき、まずは動物実験モデルのレベルで、生体における要因特異的なモニタリングを確立することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、心不全の形成過程において要因特異的に関与する転写因子に着目し、それを同定、さらに活性を生体内で可視化することにより、病因特異的なアプローチを可能とすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 心不全の形成過程で要因特異的な転写因子をトランスクリプトーム解析により同定する

- ① 大動脈結紮による圧負荷モデルとアンジオテンシンII持続注入による液性因子負荷モデルを作成し、左心室における遺伝子発現をマイクロアレイ解析した。

(実験)

Balb/c マウス6週例を用いて、全身麻酔下に大動脈弓部を糸で結紮することにより(TACモデル)、圧負荷心肥大モデルを作成した。また、皮下埋込浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシンII(2.0mg/kg/day)を投与することにより液性因子負荷モデル(ATIIモデル)を作成した。いずれも、tail-cuff 圧を測定し、心臓超音波で心肥大を確認、最終的な左心室質量も増大を示していた。

その両モデルにおいて負荷開始1週間で左心室を回収し、total RNAを回収した。Affymetrix M430を用いて、遺伝子発現解析を行い、収集したデータの中から affymetrix のプロトコールで P フラグをもち、コントロールに比し、2倍の増加を示し、さらにコントロールにおける発現の分散を計算して、その 5σ から外れた発現を以て有意な遺伝子発現変化群と定めた。TAC 379, ATII 12 遺伝子がそれぞれ同定された。

- ② 有意に発現上昇が認められる遺伝子群の遺伝子上流1kbにわたる塩基配列を、他の遺伝子上流情報とともにデータベースから情報収集した。

(実験)

同定した遺伝子群と affymetrix genechip 上にある遺伝子群それぞれの遺伝子上流配列を転写開始点デ

データベースである DBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/>) を用いてそれぞれの遺伝子上流 1kb におよぶ遺伝子配列を収集した。

- ③ その遺伝子上流域に含まれる転写因子結合配列の出現頻度を調べ、全体の遺伝子上流配列のなかで出現頻度が統計学的に有意に高くなるものを同定した。それらは両負荷モデル共通のものと、それぞれのモデルにのみ出現する配列とが認められ、圧負荷・液性因子負荷ともに共通して働く転写因子と、個別のモデル特有に関与する転写因子とに分けられた。

(実験)

転写因子結合配列は TRANSFAC データベースを用いて、遺伝子上流において存在するかを調べた。負荷モデル下での増加遺伝子群における転写因子結合配列とその他の遺伝子群における発現頻度を2項確率により検定し、有意に発現頻度が高かった転写因子結合配列を同定した。

両者に共通ものとして、転写因子として既にその役割が確立している GATA が同定された。さらに TAC モデルで 19、ATII モデルでは 3 つの配列が同定された。

- (2) 対象とする転写因子の活性を生体の心臓においてリアルタイムに可視化した。

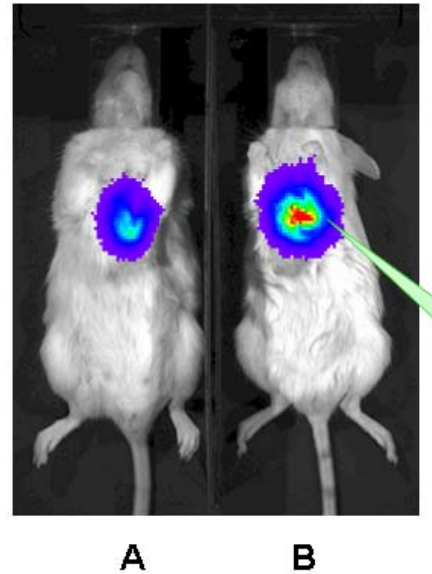
- ① 転写因子の結合配列とルシフェラーゼ発現部位とを含んだプラスミドベクターを作成し、マウスの左心室に発現させて生体で、その発現を測定した。

(実験)

転写因子の結合配列とルシフェラーゼ発現部位とを含んだプラスミドベクター (pGL3-promoter) を作成し、マウスの心臓へ直接注入する。筋肉は naked plasmid そのままでの発現が認められるため、正しく注入することにより、左心室におけるルシフェラーゼの発現が可能となる。さらに基質であるルシフェリンを腹腔内投与することにより、In vivo imaging system (Xenogen) で観察でき、発光を定量化することにより各々の転写因子によ

る転写活性を生体で確認する方法を確立した。生体において繰り返し、その発現を観察でき、転写因子結合配列を含むため、対象とする転写因子の活性を測定する系として利用できた (図1 参照)。

図1



マウス心臓における転写活性測定の一例

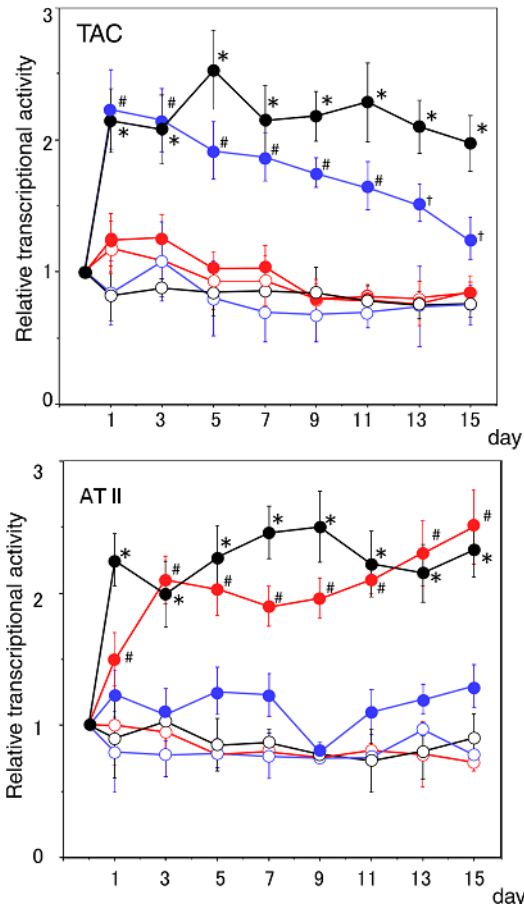
心臓部からルシフェラーゼによる発光が観測され、in vivo imaging system 付属のソフトウェアによりその発光量が色の強さにより色で分けられている。発現の強い部から赤→黄→緑→水色→青→紫と分けられており、A に比し、B のマウスにおける発現 (緑色 矢印) が亢進していることがわかる。上記は、対照としての pGL-promoter(A) と GATA 結合配列を組み入れた発現ベクター(B)を用いて、ATII 負荷モデルにおける発現 (3日目) を調べた。

- ② 転写因子結合配列を含む発現ベクターを左心室に発現させたマウスを用いて上記2つの負荷モデルを作成、心不全形成過程における各々の転写活性の程度を生体で連続観測することに成功した。

(実験)

上記 2)-①で同定した転写因子結合配列を含む発現ベクターを左心室に発現させたマウスを用いて上記2つの負荷モデルを作成した。負荷開始翌日より血圧・体重・脈拍とともに転写因子活性を測定し、2日ごと2週間まで測定を繰り返すことで、心不全形成過程における各々の転写活性の程度を生体で連続観測した (図2 参照)。

図2



TAC、ATII それぞれのモデルにおける転写因子活性測定

- は GATA 配列発現マウス(TAC or ATII 負荷)
- は GATA 配列発現マウス(sham or control)
- は TAC 特異的転写因子結合配列発現マウス(TAC or ATII 負荷)
- は TAC 特異的転写因子結合配列発現マウス(sham or control)
- は ATII 特異的転写因子結合配列発現マウス(TAC or ATII 負荷)
- は ATII 特異的転写因子結合配列発現マウス(sham or control)

それぞれ GATA はいずれの負荷においても転写活性亢進が確認され、他は各々の負荷モデルにおいてのみの亢進が確認された。

- (3) 上記実験により、解析結果同様、要因特異的な転写因子の存在を示した。今後、同様の手法で知見を積み重ねることにより、多因子疾患である心不全の診断・治療法開発の新しいアプローチになるものと期待される。

4. 研究成果

上記手法を通じて、異なる心肥大モデルにおいて要因特異的な転写因子が活性化されていること、その評価を生体のまま系時的に行えることを示した。さらに血圧や脈拍などの生理的なパラメーターを加味することにより、分子生物学的情報と生理的情報を統合して解析することを可能とした。今後、様々な心不全モデルにおいて代表となる誘因特異的な転写活性を測定し、それらのモデルにおける汎用心不全治療薬剤の効果を測定・評価し、より臨床応用に結びつけられる知見を提供できる基礎的実験を形成したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

1. Masaharu Nakayama, Naomi Yamaki, Morihiro Takeda, Hiroaki Shimokawa. Clustering Transcriptional Network is Useful to Characterize Heart Failure Models. American Heart Association, Annual Scientific Meeting 2008 (New Orleans, USA) Circulation,2008; 118: S276. 2008年11月10日発表

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 雅晴
(NAKAYAMA MASAHARU)
東北大学・病院・講師
研究者番号:40375085