

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07070

研究課題名(和文) 病態プロテオミクスを用いた心不全発症に関わるp300制御因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of p300 regulatory factors involved in the development of heart failure using medical proteomics

研究代表者

森本 達也 (Morimoto, Tatsuya)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：50390779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、心不全マウスと正常マウスの心臓からヒストンアセチル酵素活性を持つp300複合体を精製し、p300との結合が変化する蛋白の同定を行い、195個の新規p300結合タンパクを同定した。なかでも新規p300結合タンパク質1(p300BP1)に着目した。p300BP1を過剰発現やノックダウンすると培養心筋細胞の肥大反応やTGF- β 刺激による心線維芽細胞の線維化反応を抑制した。さらに、p300BP1を心臓で特異的にノックアウトしたマウスでは圧負荷心不全の進展を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は高血圧性心疾患、弁膜症、虚血性心疾患など種々の心疾患の共通最終像であり、この問題を解決することは極めて重要である。現在の薬物治療を用いても心不全の生命予後は悪く、新たな心不全治療薬の開発が必要である。我々は、ヒストンアセチル化酵素活性を持つp300の結合蛋白を同定し、その中でもp300BP1が心不全の発症・進展に関与することを見出した。今後p300BP1をターゲットとした新規治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We purified an instinct histone acetylase p300 complexes from the hearts of heart failure and normal mice, identified proteins with altered binding to p300, and identified 195 novel p300-binding proteins. In particular, we focused on a novel p300-binding protein 1 (p300BP1). Overexpression or knockdown of p300BP1 regulated the hypertrophic response in cultured cardiomyocytes and the fibrotic response in cardiac fibroblasts. Furthermore, we found that cardiac-specific p300BP1 knockout of p300BP1 inhibited the development of pressure overload-induced heart failure.

研究分野：循環器学、薬理学

キーワード：心不全 p300 エピジェネティクス ヒストンアセチルトランスフェラーゼ 病態プロテオミクス 心筋細胞肥大 心臓線維化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

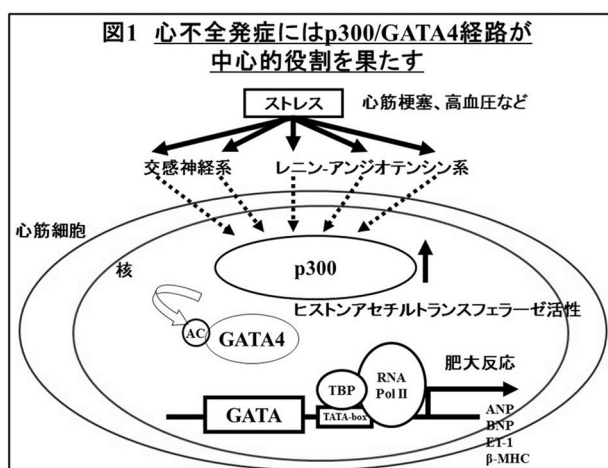
1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景

心不全は高血圧性心疾患、弁膜症、虚血性心疾患など種々の心疾患の共通最終像であり、この問題を解決することは極めて重要である。心不全の治療法開発のために最も必要とされていることは、治療薬のターゲットを解明することである。心不全は今まで、ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害薬や ARB (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) β 遮断薬といった細胞表面受容体などの上流シグナルをブロックする薬物で治療されてきた。これら薬物による治療で予後は改善するものの、重症心不全患者の 5 年生存率は依然 50% を下回っており、心不全の発症、進展を抑制する新たな治療法の開発が待たれる。心不全を引き起こすシグナル伝達経路は複雑で多数存在するため、心不全治療のためには、細胞内シグナルの上流をターゲットとするよりも、下流の核における共通シグナル経路をターゲットとしたほうがより効果的な治療になりうるのではないかと考えた。

p300/GATA4 経路の心不全発症における役割

我々は心不全発症において、心筋特異的転写因子 GATA4 が重要な役割を果たしていること (*J Biol Chem.* 1999;274:12811-8、*J Biol Chem.* 1999;274:34096-102) を見出した。次に我々は内因性ヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を有する p300 と GATA4 の協力 (p300/GATA4 経路) が心不全発症における遺伝子発現調節に極めて重要であり、p300 の HAT 活性が心不全治療の重要なターゲットなる可能性を示した (図 1、*Mol Cell Biol.* 2003;23: 3593-606、*Circulation.* 2006; 113: 679-690、*J Biol Chem.* 2008;283:9828-35、国際特許 WO2002-005633)。さらに、我々は、p300 特異的 HAT 阻害作用を持つクルクミンが心不全の進行を抑制することを高血圧性心疾患ならびに心筋梗塞後の 2 つの慢性心不全ラットモデルにおいて証明した (*J Clin Invest.* 2008;118:868-78、*Circ J.* 2011;75:2151-9、*J Pharmacol Sci.* 2014;126:329-36)。



研究課題の核心をなす学術的「問い」

以上より、p300 の HAT 活性が心不全の進行に重大な役割を果たし、心不全治療薬の標的となる可能性が示唆された。p300 は巨大な複合体を形成していると推測されるが、この複合体は心不全シグナルによって、時間的、空間的に変化し、さまざまな転写因子や転写制御因子が結合・解離することにより転写の活性・不活化を制御していると考えられる。しかしながら、心不全発症に関わる p300 の結合因子の全容、相互関係並びに p300 複合体活性化メカニズムに関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、FLAG と HA タグのついた p300 を心臓に発現する遺伝子改変マウスを用いて、正常の心臓と心不全期の心臓を単離し、p300 の複合体を精製・比較する病態プロテオミクスを行うことである。これにより、心不全発症に関わる p300 の結合蛋白を同定、解析することにより、心不全発症の詳細なメカニズムの解明や新規心不全治療ターゲットの同定、さらには画期的な心不全の治療法の創製につながることが期待される。

3. 研究の方法

1) 心不全マウスと正常マウスの心臓から p300 複合体を精製し、p300 との結合が変化する蛋白の同定

FLAG タグのついた p300 を心臓に発現するトランスジェニックマウスと野生型マウスの心臓から、核蛋白を抽出する。次に、FLAG の抗体をもちいたアフィニティー精製法にて、p300 複合体の精製をおこなう。精製した複合体をマスマスペクトメトリー解析と蛋白データベースから、p300 複合体を構成する蛋白を同定する。マスマスペクトメトリーに関しては、共同研究者である Harvard Medical School の Steven P. Gygi 教授に LC-MS/MS 法を用いた網羅的な解析を依頼する。

2) 初代ラット培養心筋細胞に新規 p300 結合蛋白をノックダウンあるいは過剰発現して 心筋

細胞肥大に対する効果検討

p300 複合体の解析後、新規 p300 結合蛋白について、心筋細胞にノックダウンあるいは過剰発現させ、肥大が抑制されるかどうかを評価する。次に、p300 の HAT 活性に対する影響を検討するために、ヒストンのアセチル化に対する効果を検討する。これらにより、新規 p300 を介した心筋細胞肥大情報伝達経路がノックダウンあるいは過剰発現により制御される蛋白を同定する。

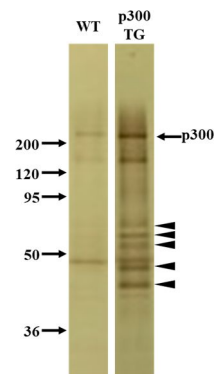
3) 新規 p300 結合蛋白を心臓にノックアウトした遺伝子改変マウスを用いて、生体内での役割の検討

生体内での新規 p300 結合蛋白の心不全に対する役割を検討するために遺伝子改変マウスを作成する。これら遺伝子改変マウスが心不全を発症するかどうかを検討する。さらにこれらマウスに大動脈縮搾術を行い、心不全の発症、進展に対する役割を検討する。

4. 研究成果

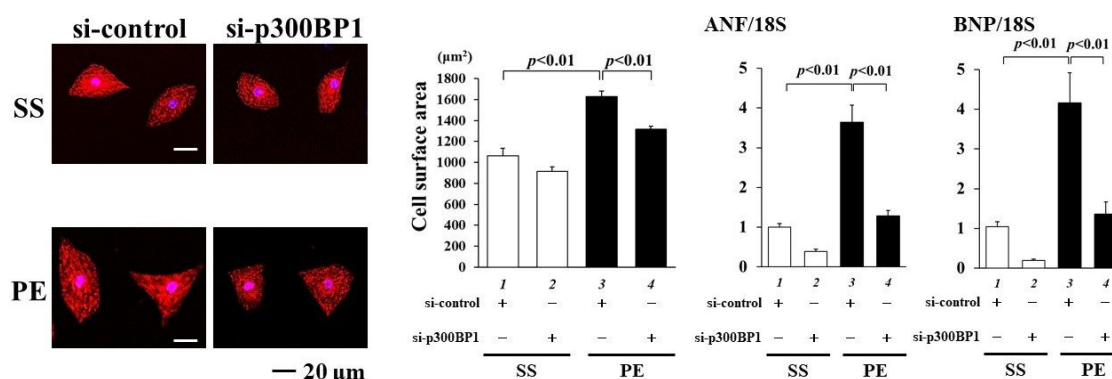
新規 p300 結合タンパク質として p300BP1 を同定した

16~20 週齢の C57BL/6J マウス、及び FLAG タグを付与した p300 を心臓特異的に過剰発現させたマウスの心臓から Dignam 法により核タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質に抗 FLAG 抗体アフィニティー担体を加え免疫沈降を行い、洗浄後、FLAG ペプチドにより溶出することで p300 複合体を精製した。精製したタンパク質を濃縮後、SDS-PAGE により分離して、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、553 個の p300 結合タンパク質を同定した。この中には、心筋細胞肥大のシグナル伝達系、遺伝子発現制御に関連するタンパク質、プロテインキナーゼ、分子シャペロンタンパク質、転写因子などが含まれていた。これら p300 結合タンパク質の中から、組織中の発現量や細胞内における局在により、その後の実験に用いるタンパク質を選定した。なお、タンパク質の組織中の発現量や細胞内における局在は、GeneCards®, The Human Gene Databas を用いて検索した。p300 結合タンパク質の中で、骨格筋の分化促進作用を有する p300BP1 に着目した。



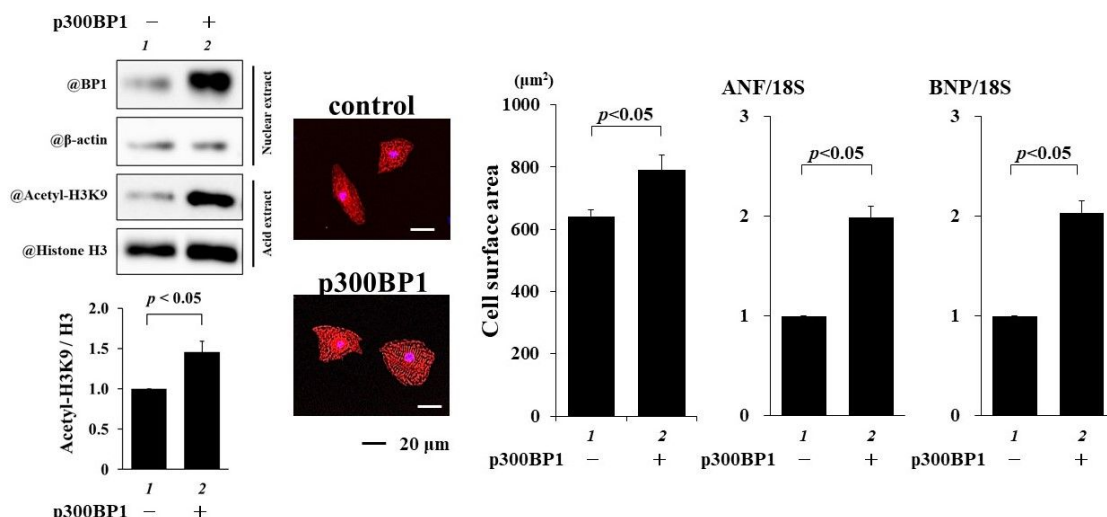
p300BP1 は心筋細胞肥大を誘導した

初代培養心筋細胞に siRNA を用いて p300BP1 をノックダウンし、PE 刺激を行った。細胞を固定後、-actinin 抗体で蛍光免疫染色を行い、細胞面積を測定することで心筋細胞肥大を評価した。si-p300BP1 により p300BP1 のノックダウンした培養心筋細胞では、PE 刺激による心筋細胞肥大が有意に抑制された。また p300BP1 をノックダウンした培養心筋細胞から mRNA を抽出し qPCR により肥大反応遺伝子である ANF、BNP の発現量を評価した。PE 刺激により増加した ANF、BNP の mRNA 量は、p300BP1 のノックダウンにより有意に抑制された。



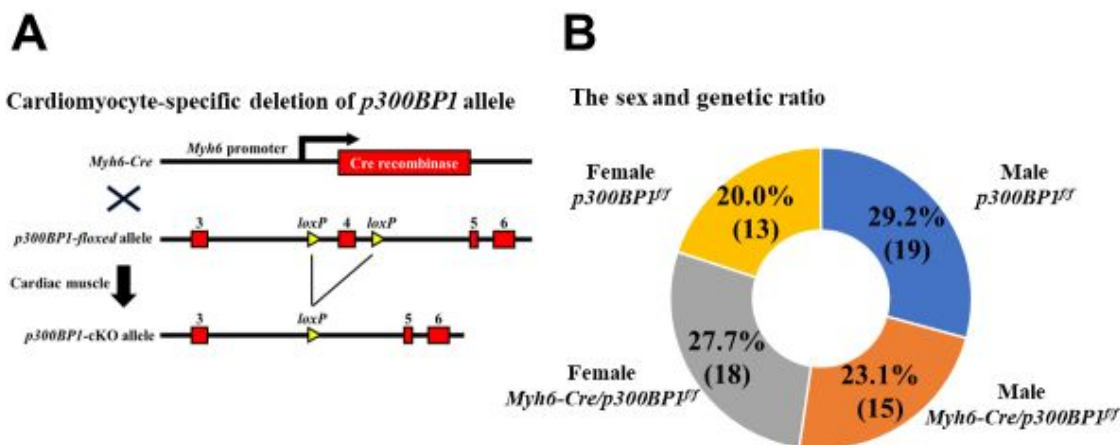
反対にレンチウイルスを用いて心筋細胞に p300BP1 を過剰発現した。細胞を固定後、免疫染色を行い、心筋細胞肥大を評価した。p300BP1 を心筋細胞に過剰発現させると心筋細胞面積は有意に増加した。また p300BP1 を過剰発現した培養心筋細胞から mRNA を抽出し qPCR により ANF、BNP の発現量を評価した。p300BP1 の過剰発現により、ANF、BNP の mRNA 発現

量は有意に増加した。さらにヒストンのアセチル化をウエスタブロット法にて評価したところ、p300BP1 の過剰発現によりアセチル化は亢進していた。



心筋細胞特異的 p300BP1 コンディショナルノックアウトマウスの作成

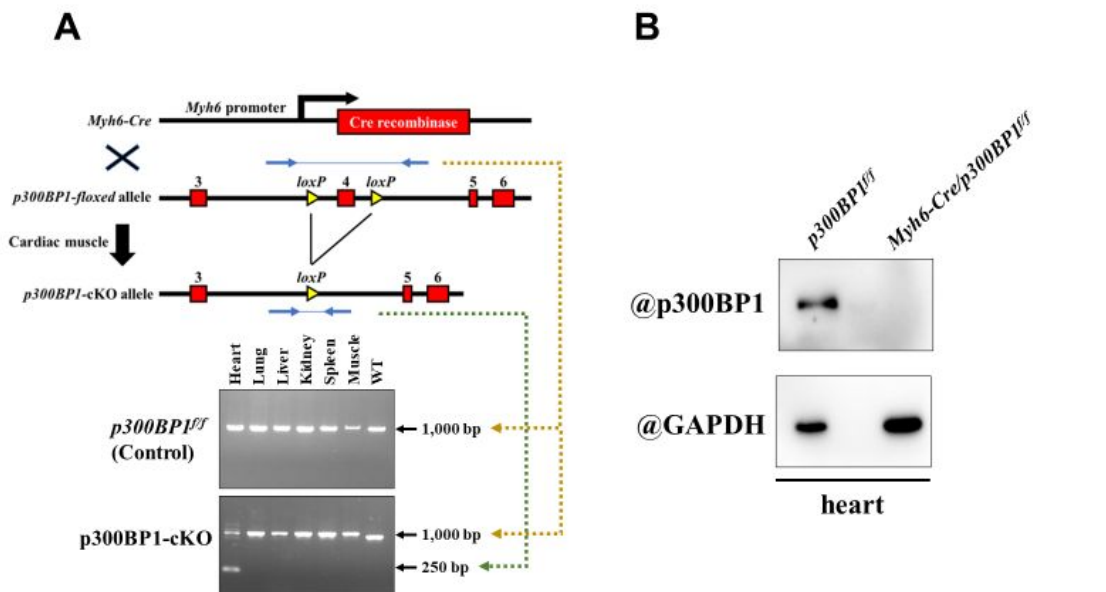
p300BP1 遺伝子の 4 番目のエキソンを LoxP 配列で挟み込むようにした遺伝子改変マウス (p300BP1-flox/flox) を作成し、このマウスに Myh6-Cre マウスを交配することで p300BP1-cKO マウスを作出した。交配により生まれたマウスは、多少のばらつきはあったがメンデルの法則に従い、雄雌の比率および所有する遺伝子背景の比率は其々約 1 : 1 となった。以上より、このノックアウトマウスは発生や性別に対しフェノタイプを示さなかった。



p300BP1-cKO マウスは心筋特異的に KO されていた

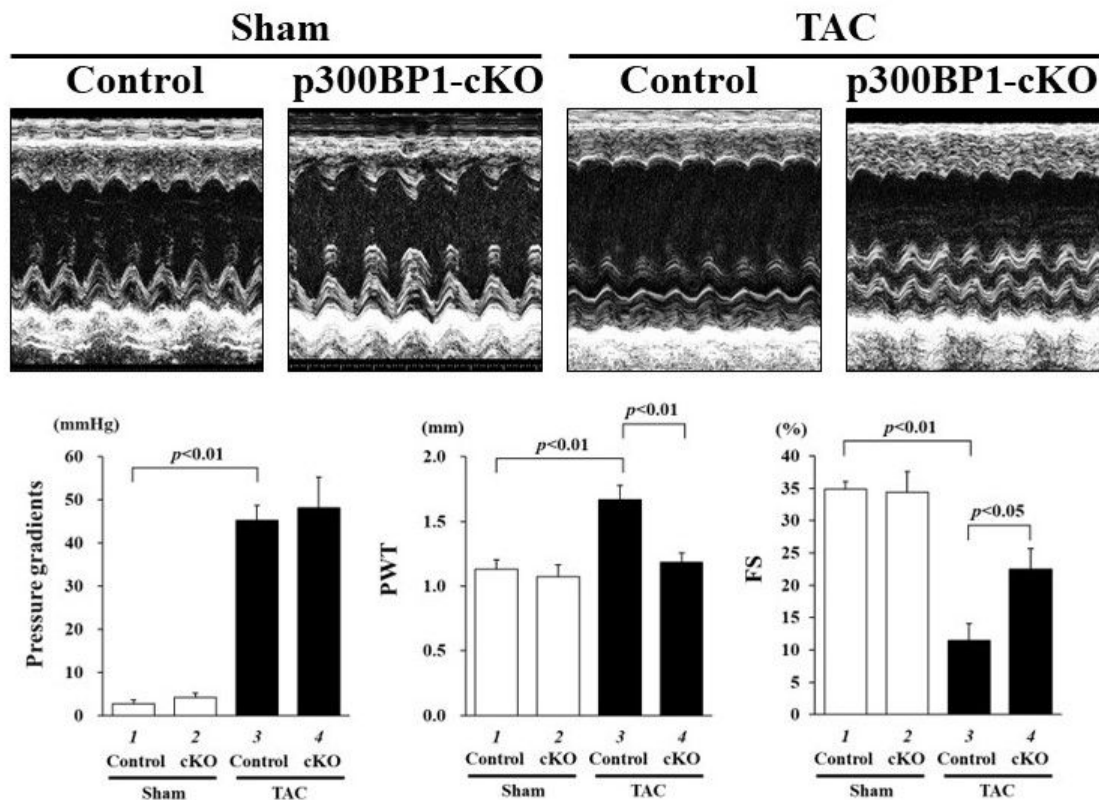
マウスの各種臓器よりゲノムを抽出し、これをテンプレートとした PCR を行うことで、ゲノムレベルでのノックアウトの確認を行った。2 つの LoxP 配列と 4 番目のエキソンを増幅するようなプライマーで PCR を行うと、コントロールマウスでは 1000bp の増幅バンドが確認できる。Cre リコンビナーゼにより p300BP1 遺伝子の 4 番目のエキソンが除去された組織では約 250bp のバンドが見られる。p300BP1-cKO マウスの結果は心臓のゲノムのみ 250bp のバンドが確認された。次にこのマウスの心臓を摘出し、WCL 画分を抽出し、WB を行うことで p300BP1 の発現量の確認を行った。その結果 p300BP1-cKO マウスでは心臓において、p300BP1 タンパク質量の減少が確認された。以上より、今回作成したマウスでは心筋特異的に p300BP1 を KO していることが明らかとなった。

また、cKO マウス及びコントロールマウス 14 週齢時点での、心臓超音波解析、血圧、体重測定を行った。左室の収縮能の指標である EF、FS、心拍数、各血圧や体重において有意な差はなかった。以上の結果、p300BP1-cKO マウスは通常飼育下において特にフェノタイプを示さなかった。



p300BP1-cKO マウスは TAC による心肥大及び心収縮能の低下を抑制した

7~9 週齢 (体重 20~23 g) の雄性 p300BP1-cKO マウスおよび control マウスに TAC 及び Sham 手術を施した。手術 6 週間後に心臓超音波検査を行い、心機能を評価した。左室後壁厚 PWT は TAC により有意に肥厚が起きたが、p300BP1-cKO マウスではその肥厚は有意に抑制された。また、心収縮能の指標である FS は TAC により有意に低下したが、p300BP1-cKO マウスではその低下は有意に抑制された。



今後さらに検討することにより、p300BP1/p300 経路を制御する化合物が新規心不全治療薬となる可能性が示唆された。この後さらに検討することで、新たな心不全治療法の開発に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yoichi Sunagawa
2. 発表標題 A novel p300 binding protein 1 is required for hypertrophic and fibrotic responses in cardiomyocytes and cardiofibroblasts
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石間彩花
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるp300BP1は心線維化反応を制御する
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 先野暁友
2. 発表標題 新規 p 300結合タンパク質 p 300binding protein1(p300BP1)は心筋細胞肥大を抑制する
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 先野暁友
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質p300 binding protein 1(p300BP1)は心筋細胞肥大反応に必須である
3. 学会等名 第27回 静岡 健康・長寿学術フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石間彩花
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるp300BP1は心線維化反応を制御した
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石間彩花
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるp300BP1は心線維化反応を制御する
3. 学会等名 第7回日本心血管協会(JCVA)学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海野瑞紀
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるp300-binding protein 1は培養心筋細胞において肥大反応を促進した
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoichi Sunagawa
2. 発表標題 A Novel p300 Binding Protein 1, BP1, is Required for Hypertrophic Responses in Cardiomyocytes
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海野瑞紀
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質1は心筋細胞肥大反応必須である
3. 学会等名 第6回日本心血管協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海野瑞紀
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質1はp300/GATA4経路を介して培養心筋細胞の肥大反応を促進した
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石間彩花
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質p300 binding protein1(BP1)は心筋細胞肥大に関与する
3. 学会等名 第145回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石間彩花
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質p300 binding protein1(BP1)は心筋細胞肥大に必須であった
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusaku Matsushita, Yoichi Sunagawa, Mizuki Unno, Masafumi Funamoto, Kana Smizu, Satoshi Shimizu, Nurmila Sari, Yasufumi Kataka, Yusuke Miyazaki, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
2. 発表標題 Analysis of a novel p300 binding protein in the regulation of cardiomyocyte hypertrophy
3. 学会等名 第4回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下優作、砂川 陽一、海野瑞紀、船本雅文、清水果奈、清水聡史、サリ ヌーミラ、刀坂泰史、宮崎雄輔、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 心不全発症に関与する新規p300結合タンパク質の同定及び機能解析
3. 学会等名 第20回抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下優作、砂川 陽一、海野瑞紀、船本雅文、清水果奈、清水聡史、サリヌーミラ、刀坂泰史、宮崎雄輔、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるBP1は心筋細胞肥大を促進した
3. 学会等名 第143回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuki Unno, Yusaku Matsushita, Yoichi Sunagawa, Masafumi Funamoto, Kana Shimizu, Satoshi Shimizu, Nurmila Sari, Yasufumi Katanasaka, Yusuke Miyazaki, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
2. 発表標題 BPK1, a novel p300-binding protein, regulated p300-mediated hypertrophic response in cultured cardiomyocytes
3. 学会等名 第25回 静岡健康・長寿学術フォーラム(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海野瑞紀、松下優作、砂川陽一、船本雅文、清水果奈、Nurmila Sari、清水聡史、宮崎雄輔、刀坂泰史、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 p300結合因子のSTK39はノックダウンにより培養心筋細胞の肥大反応を誘発した
3. 学会等名 第143回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusaku Matsushita, Yoichi Sunagawa, Mizuki Unno, Masafumi Funamoto, Kana Smizu, Satoshi Shimizu, Nurmila Sari, Yasufumi Kataka, Yusuke Miyazaki, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
2. 発表標題 A novel p300 binding protein regulates cardiomyocyte hypertrophy
3. 学会等名 第25回 静岡健康・長寿学術フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海野瑞紀、松下優作、砂川陽一、船本雅文、清水果奈、Nurmila Sari、清水聡史、宮崎雄輔、刀坂泰史、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 p300結合タンパク質であるSTK39のノックダウンは心筋細胞の肥大を誘発する
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下優作、砂川 陽一、海野瑞紀、船本雅文、清水果奈、清水聡史、サリ ヌーミラ、刀坂泰史、宮崎雄輔、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた心臓特異的なp300結合タンパク質の同定及び機能解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoichi Sunagawa, Yusaku Matsushita, Mizuki Unno, Sho Uehara, Masafumi Funamoto, Kana Shimizu, Satoshi Shimizu, Sari Nurmila, Yusuke Miyazaki, Yasufumi Katanasaka, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
2. 発表標題 Identification of Novel p300 Binding Proteins, which Are Involved in Cardiomyocyte Hypertrophy
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海野瑞紀、砂川陽一、松下優作、船本雅文、清水果奈、清水聡史、刀坂泰史、宮崎雄輔、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 新規p300結合タンパク質であるp300-binding protein 1は培養心筋細胞において肥大反応を促進した
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020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
研究分担者	砂川 陽一 (Sunagawa Yoichi) (30466297)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	
研究分担者	宮崎 雄輔 (Miyazaki Yusuke) (40803466)	静岡県立大学・薬学部・客員共同研究員 (23803)	

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
---------	---------