

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17151

研究課題名(和文) 不全心におけるナトリウム利尿ペプチドの転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of the transcriptional regulatory mechanism of natriuretic peptides in failing hearts

研究代表者

松岡 研 (Matsuoka, Ken)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90826190

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)：ナトリウム利尿ペプチド(ANP/BNP)両遺伝子はゲノム上隣接して存在し、その遺伝子産物は血管拡張・利尿作用を持つペプチド性ホルモンであり、心不全重症度指標・心不全治療薬として臨床で頻用されている。我々は不全心におけるANP/BNPの発現を誘導する機序を解明するため、先行研究にてANP/BNP遺伝子を誘導する650塩基からなる心不全感受性エンハンサー領域(CR9)を新規に同定した。しかしCR9が誘導される機序は依然として不明である。本研究において、CR9ノックアウトマウスを用いてCR9転写制御機構の更なる解明を行い、遺伝子治療応用への可能性を探った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANP/BNPは心不全病態に非常に特異性高く発現誘導される生理活性ペプチドであり、ヒトでは既に血清で測定可能な心不全重症度指標として、また心不全治療薬として頻用されている、有望な分子標的である。本研究は我々が有する先行知財を用い、不全心におけるANP/BNP転写制御機構の解明を目的とした一貫した研究であり、心不全病態解明・新規心不全治療薬に繋がる大きな意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The natriuretic peptides, atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), encoded by the neighboring genes are well-known biomarkers that are strongly induced during heart failure and represent its severity. Cardiologists frequently use these peptides as natriuretic and vasorelaxant agents to treat various clinical conditions. We identified 650bp of heart-failure responsive enhancer (CR9) inducing ANP/BNP gene expressions in the previous study. However, the regulatory mechanism of CR9 remains unknown. In the present study, we generated CR9 knockout mice and revealed the transcriptional regulatory mechanism of CR9 in failing hearts.

研究分野：循環器内科

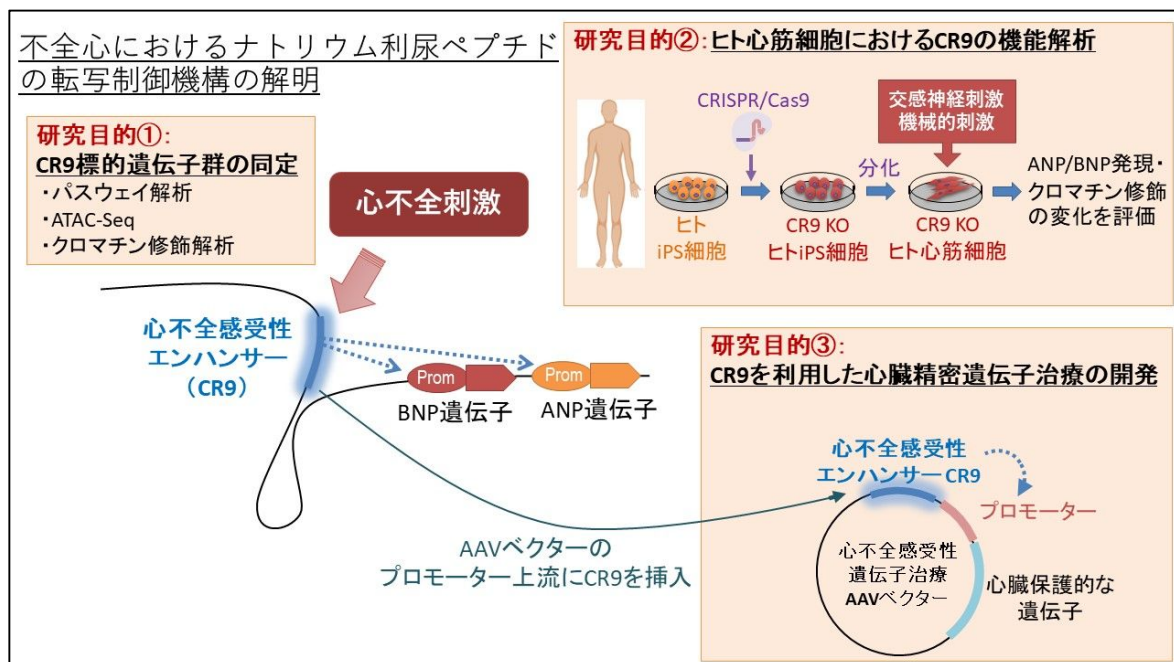
キーワード：CR9 エンハンサー 心不全 ナトリウム利尿ペプチド 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチド(ANP/BNP)両遺伝子はゲノム上隣接して存在し、その遺伝子産物は血管拡張・利尿作用を持つペプチド性ホルモンであり、心不全重症度指標・心不全治療薬として臨床で頻用されている。我々は不全心における ANP/BNP の発現を誘導する機序を解明するため、先行研究にて ANP/BNP 遺伝子を誘導する 650 塩基からなる心不全感受性エンハンサー領域 (CR9) を新規に同定した。CR9 エンハンサーは *Nppb* 遺伝子から 22 kb 上流に存在し哺乳類にて極めて保存性の高い領域である。CR9 エンハンサーの下流に minimal CMV promoter とルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を組み込んだ配列を全身に発現させたトランスジェニックマウス (CR9-Luc-Tg) では、圧負荷心不全モデルによる心肥大形成過程において心臓特異的に Luc の発現が誘導され、BNP 発現の増加と一致する。しかし CR9 エンハンサー が誘導される活性化機構は依然として不明であった。

2. 研究の目的

本研究において、同定した ANP/BNP のエンハンサー (CR9) が心不全によって誘導されるメカニズムを解明することを試みた。本研究は我々が有する先行知財と、世界に先駆けて開発した *in vivo*、*in vitro* 測定系を用い、ANP/BNP 発現制御機序の基礎的解明を目的とした一貫した研究であり、心不全病態解明・新規心不全治療薬に繋がる大きな意義を有する。



3. 研究の方法

(1) CR9 ノックアウトマウスにおける検討

CR9 の生体における機能を検討するために、CR9 領域をノックアウトさせたマウス (CR9-KO) を作製した。CR9-KO マウスの心臓における ANP/BNP 発現の変化、ATAC-Seq 解析、クロマチン修飾解析、心不全モデルにおける表現型などを検討した。心肥大、心不全の評価としては、心臓超音波検査を用いた。

(2) ヒト iPS 由来心筋細胞における検討

ヒト心筋細胞における CR9 の機能を評価するために、ヒト iPS 由来心筋細胞に対して、CR9 エンハンサー領域 650bp に minimal BNP promoter (*miniP_{BNP}*)-ルシフェラーゼ (Luc) レポーター遺伝子を繋げたレンチウイルスを導入し、発光測定で CR9 のエンハンサー活性を評価できる系を確立した。この実験系を使用し、ヒト iPS 由来心筋細胞に交感神経受容体刺激 (Phenylephrine, Adrenaline) や機械的刺激を行い、CR9 エンハンサー活性を評価した。機械的刺激としては、今までは生体における心不全容量負荷を模倣した培養心筋細胞への伸展刺激が用いられてきたが、

今回新たに圧負荷心不全モデルを模倣するために細胞への圧負荷刺激を開発した。

またヒト心筋細胞における内因性の CR9 の機能を評価するために、CR9 をノックアウトしたヒト iPS 由来心筋細胞を作製した。この CR9 をノックアウトしたヒト iPS 由来心筋細胞に対して交感神経受容体刺激 (Phenylephrine, Adrenaline) や機械的刺激を行い、ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子発現を評価した。

(3) CR9 を応用した心臓精密遺伝子治療の検討

ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に CR9 を組み込んだ AAV ベクターを作製し、マウスに静脈投与し、発光ライブイメージングによりレポーター遺伝子の発現確認を行った。また薬剤負荷心不全モデルにおいて、ルシフェラーゼレポーターの発現変化をライブイメージングで経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) CR9 ノックアウトマウスにおける検討

CR9 の生体における機能を検討するために、CR9 領域をノックアウトさせたマウス (CR9-KO) を作製した。CR9-KO マウスの心臓における ANP/BNP 発現の変化、ATAC-Seq 解析、クロマチン修飾解析などを検討した。CR9 ノックアウトマウスでは内因性の ANP/BNP 発現の低下を認めた。また心臓サンプルの ATAC-Seq 解析では正常マウスでは CR9 領域周辺は Open chromatin を示していたが、CR9 ノックアウトマウスでは CR9 領域周辺は Closed chromatin に変化していた。また、クロマチン修飾解析として、Cut & Tag 法を用いて解析を行うことに成功した。CR9 ノックアウトマウスでは、CR9 を含む ANP/BNP 周辺のクロマチン修飾が変化することを発見した。

これらの結果より、CR9 は生体内において、ANP/BNP 周辺のクロマチン修飾を介して、ANP/BNP 遺伝子発現を制御していることが示唆された。

(2) ヒト iPS 由来心筋細胞における検討

ヒト iPS 由来心筋細胞に対して、CR9 エンハンサー領域 650bp に minimal BNP promoter (miniP_{BNP})-ルシフェラーゼ(Luc)レポーター遺伝子を繋げたレンチウイルスを導入し、発光測定で CR9 のエンハンサー活性を評価した。ヒト iPS 由来心筋細胞においても交感神経受容体刺激 (Phenylephrine) により CR9 のエンハンサー活性の増加が見られた。また CR9 をノックアウトしたヒト iPS 由来心筋細胞では内因性 ANP/BNP の遺伝子発現の低下が見られた。

(3) CR9 を応用した心臓精密遺伝子治療の検討

ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に CR9 を組み込んだ AAV ベクターを作製し、マウスに静脈投与し、発光ライブイメージングによりレポーター遺伝子の発現確認を行った。薬剤負荷心不全モデルにおいて、心臓における AAV レポーター遺伝子の発現増加を認めた。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyashita Yohei, Tsukamoto Osamu, Matsuoka Ken, et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 The CR9 element is a novel mechanical load responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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） 10.1096/fj.202002111RR	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心不全に应答するエンハンサーポリヌクレオチド、及び前記エンハンサーポリヌクレオチドを含む発現ベクター	発明者 松岡研、高島成二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/042283	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------