

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590945
 研究課題名（和文）新たな心不全診断・治療を見据えた心不全におけるスプライシング機構の役割解明
 研究課題名（英文）
 Role of splicing variants in heart failure
 研究代表者朝倉 正紀（ASAKURA MASANORI）
 独立行政法人国立循環器病研究センター・臨床研究部・室長
 研究者番号：80443505

研究成果の概要（和文）：

高齢化社会を迎えた日本において、心不全は重要な病態であり、その診断、治療法の開発は喫緊の課題である。我々は、大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルより得られた心肥大による不全心筋を用いて、エクソンアレイによるスプライシングバリエーションの網羅的発現解析を行った。その結果、スプライシングパターンが変化しているが、遺伝子発現レベル全体では変化していない 46 遺伝子を抽出し、その中から Mtus1 遺伝子を同定した。Mtus1A バリエーションの上昇と Mtus1C バリエーションの低下を認め、特に Mtus1A バリエーションの上昇が病態と関連していると考えられた。機能解析から、Mtus1A バリエーションが新たな心肥大抑制因子であることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Number of patients with chronic heart failure is increasing in Japan. It is important to detect novel targets for heart failure. Alternative splicing is known to play important roles in the regulations of several diseases such as cancer and neurodegenerative diseases. However, the role of alternative splicing in the pathogenesis of heart failure remains unclear. In this study, we analyzed global expression levels of splicing variants in heart failure using exon arrays. We identified 46 genes with significant changes in splicing pattern but without changes in expression level. Out of 46 candidate genes responsible for heart failure, we narrowed our focus to Mtus1 gene. Our functional analyses revealed that Mtus1A variant is a novel inhibitory factor for cardiac hypertrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 マイクロアレイ 遺伝子 心不全 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

心不全患者は、高齢化社会の到来とともに、その患者数は増加の一途を辿っている。心不全に対する治療薬は、この20年間に、β遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アルドステロン拮抗薬などの有効性が明らかになり、心不全患者の予後は改善してきた。しかし、予後不良な心不全患者が多く存在することも事実であり、心不全に対する新たな治療法開発が喫緊の課題である。心不全治療に対する新たな標的因子の探索が重要であり、我々はマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を用いて、その探索を進め、心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの同定に成功した。研究開発当初、新たなマイクロアレイとしてエクソンアレイが開発され、エクソンレベルでの解析が可能となった。スプライシングの異常は、ガンや神経変性疾患などの疾病原因となることが報告されてきたが、循環器疾患におけるスプライシング異常の関与はほとんど明らかとなっていなかった。心不全におけるスプライシング機構の解明が新たな心不全治療標的に有用であることが期待された。

2. 研究の目的

心不全におけるスプライシングバリエーションの探索は、心不全の新たな病態機序を明らかにすることが期待されるため、我々はエクソンアレイ法を用いて、心不全とスプライシング機構の解明と新たなスプライシングバリエーション同定することを目的とした。さらに、同定したスプライシングバリエーションの機能解析を進め、心不全における病態解明を検討することとした。

3. 研究の方法

スプライシングパターンを網羅的に評価できるマイクロアレイとして、エクソンアレイが開発された。我々は、このアレイを用いて、心不全の病態とスプライシングバリエーションの関連を検討した。使用した心不全動物モデルは、大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを用いた。心臓超音波検査にて、心不全になっていることを確認したうえで、不全心筋よりRNA抽出を行い、Mouse Exon 1.0ST Arrayにより、スプライシングバリエーションおよび遺伝子発現レベルをエクソンアレイを用いて網羅的に解析した。スプライシングバリエーションの網羅的解析データから、心不全関連スプライシングバリエーションの探索を行い、心筋細胞における機能解析を行った。

4. 研究成果

■不全心筋におけるスプライシングバリエーションの網羅的発現解析

8週間の大動脈縮窄による不全心筋をMouse Exon 1.0ST Arrayにて網羅的解析したところ、222710プローブの中で、エクソンレベルにおける変化を認めた593プローブを同定した。この中で、遺伝子発現レベル全体で変化している遺伝子数が195遺伝子同定され、スプライシングパターンが変化している遺伝子数が131遺伝子同定した。スプライシングパターンが変化しているが、遺伝子発現レベル全体では変化していない遺伝子を46遺伝子同定した。

■不全心筋においてスプライシングパターンが変化した*Mtus1* 遺伝子の同定

公開されている遺伝情報をもとに、RefSeqに既にスプライシングバリエーションとして報告されている遺伝子として、*Mtus1*(mitochondrial tumor suppressor 1) 遺伝子を絞り込んだ。*Mtus1*には3種類のvariantが報告されており、*Mtus1*のバリエーションA(*Mtus1A*バリエーション)が有意に増加していた。*Mtus1*の全体量およびバリエーション毎の発現量をTaqMan PCRにて確認を行ったところ、エクソンアレイ解析と同様に、*Mtus1A*バリエーションの発現量増加に加え、*Mtus1C*バリエーションの発現量低下を確認した。*Mtus1A*バリエーションの上昇と*Mtus1C*バリエーションの低下のどちらが重要かを検討するため、圧負荷心における蛋白発現量を検討したところ、*Mtus1A*バリエーションの上昇を強く認めた。

■心不全・心肥大の程度と関連した*Mtus1A*バリエーションの上昇

他の肥大心および心不全モデルとして、1週間TAC心肥大モデル、4週間TAC心不全モデル、アンジオテンシンII浸透圧ポンプモデル、フェニレフリン浸透圧ポンプモデルを用いて、様々な病態における*Mtus1A*バリエーションの遺伝子発現量を検討した。その結果、大変興味深いことに、心臓超音波検査にて計測した心室壁の肥厚の程度と関連して、*Mtus1A*バリエーションの発現量が増加することが確認することができた。また、*Mtus1A*バリエーションは、心臓の免疫染色から、心筋細胞に強く発現していることも確認した。このことから、*Mtus1A*は、心肥大への関与が強く推測された。

■Mtus1A バリエントの機能解析

そこで、新生児仔ラット培養心筋細胞を用いて、Mtus1A バリエントの機能解析を進めた。最初にアデノウイルスでMtus1A バリエントを強制発現させたところ、対照ウイルスを強制発現した心筋細胞と比較して、心筋細胞面積の低下を認めた。さらに、心筋細胞にフェニレフリン添加することにより観察される心筋細胞肥大も、Mtus1A バリエントの強制発現により抑制されることが明らかとなった。この効果を、蛋白合成を指標に検討したところ、心筋細胞面積と同様の結果を得た。次にラット培養心筋細胞に、siRNA を用いたMtus1A バリエントのノックダウンを行ったところ、心筋細胞面積の増大を認めた。フェニレフリン刺激による心筋細胞肥大効果は、Mtus1A バリエントのノックダウンにより増強することが分かった。これらの作用は、蛋白合成の指標においても同様の傾向を示した。これらの結果から、Mtus1A バリエントは、心筋細胞肥大と密接に関連する遺伝子であることを明らかにした。その細胞内メカニズムを探索するために、細胞内のMEK/ERK シグナルを観察した。ラット培養心筋細胞において、Mtus1A バリエントの強制発現により、ERK のリン酸化が低下し、ERK の上流に存在するMEK のリン酸化も減弱した。一方、siRNA によるMtus1A バリエントのノックダウンにより、MEK-ERK シグナルが抑制されることがわかった。このことから、Mtus1A はMEK/ERK の上流を抑制することで、心肥大を抑制することがわかった。

■心筋特異的Mtus1A バリエントトランスジェニックマウスの構築

我々は心筋特異的にMtus1A バリエントが高発現するトランスジェニックマウスを3ライン作成した。その3ラインの中で、中等度にMtus1A バリエントが発現するマウスを用いて、その機能を検討した。Mtus1A バリエントの高発現マウスでは、予想された通り、対照マウスと比較して、心筋細胞サイズの低下、心重量の低下を認めた。さらに、それに伴い、心機能の低下を呈することも観察することができた。

■まとめ

大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルより得られた心肥大による不全心筋を用いて、エクソンアレイによるスプライシングバリエントの網羅的発現解析を行った。その結果、スプライシングパターンが変化しているが、遺伝子発現レベル全体では変化していない

46 遺伝子を抽出し、その中から Mtus1 遺伝子を同定した。Mtus1A バリエントの上昇と Mtus1C バリエントの低下を認め、特に Mtus1A バリエントの上昇が病態と関連していると考えられた。機能解析から、Mtus1A バリエントが新たな心肥大抑制因子であることを明らかにすることができた。

■今後の展開

Mtus1A バリエントが強力な心肥大抑制因子であることが分かったことから、心肥大、心不全の病態診断、治療法の開発につながる研究を進めていくことを目指す。

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)

[雑誌論文] (計1件)

1. Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamasaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of Genes related to Heart Failure Using Global Gene Expression Profiling of Human Failing Myocardium. Biochem Biophys Res Commun. 2010;393(1):55-60.

[学会発表] (計1件)

A Novel approach using exon array technique identifies Mtus1 as a new heart failure-related gene. European Society of Cardiology Congress 2011/08/28 Paris, France

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 正紀 (ASAKURA MASANORI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・臨床研究部・室長

研究者番号：80443505

(2) 研究分担者

北風 政史 (KITAKAZE MASAFUMI)
独立行政法人国立循環器病研究センター
・臨床研究部・部長
研究者番号：20294069

(3) 連携研究者

浅沼 博司 (ASANUMA HIROSHI)
京都府立医科大学大学院医学研究科・循環器内科学・准教授
研究者番号：20416217

高島 成二 (TAKASHIMA SEIJI)
大阪大学大学院医学系研究科・分子心血管医学・特任准教授
研究者番号：90379272

南野 哲男 (MINAMINO TETSUO)
大阪大学大学院医学系研究科・循環器内科学・講師
研究者番号：30379234