

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21790719

研究課題名（和文） 病的心筋リモデリングにおける rho 依存性転写共役因子 MRTF-A の役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of roles played by MRTF-A, a rho-dependent transcriptional co-activator, in pathological cardiac remodeling

研究代表者 宇佐美 覚 (Satoru Usami)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30521752

研究成果の概要（和文）：

本申請研究では、rho 依存性転写共役因子 MRTF-A の病的心筋リモデリングにおける役割とその分子機構に関する研究を行った。まず MRTF-A が心筋肥大刺激により心筋細胞において細胞質から核内に rho-actin dynamics 依存性に移行することを確認し、MRTF-A ノックアウトマウスを用いて、MRTF-A が心肥大に重要な役割を果たしている結果を得た。さらに心臓ホルモンである BNP 遺伝子の発現制御領域に新たに MRTF-A に反応する SRF 結合部位を同定することに成功し、BNP が新たな MRTF-A-SRF 経路の直接的な標的遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we evaluated roles played by myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A), a co-activator of serum response factor (SRF), in pathological cardiac remodeling. Mechanical stress and neurohumoral stimulation onto cardiac myocytes induced nuclear translocation of MRTF-A, a co-activator of serum response factor (SRF) in a Rho and actin dynamics-dependent manner, thereby activating SRF. Our findings define the Rho- and actin dynamics-dependent nuclear translocation of MRTF-A as a novel common signaling mechanism underlying both mechanical stretch- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophy and fetal gene activation during pathological cardiac remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：心筋リモデリング、遺伝子転写調節、アンジオテンシンⅡ

1. 研究開始当初の背景

あらゆる心臓疾患の終末像として心不全は

予後不良の疾患であり、心不全発症・進展の分子機序のさらなる解明とそれを基にした新しい治療法の開発が望まれる。近年さまざまな細胞内シグナル伝達経路が明らかにされ、心不全に至る心筋リモデリングの過程に増殖因子や炎症性サイトカインにより活性化された細胞内シグナル伝達経路の活性化が大きく関与していることは周知の事実である。しかし最終的にこれら細胞内シグナルがどのように下流の転写因子を活性化させ、標的遺伝子の活性化につながっていくか、その詳細なメカニズムはまだ明らかにはされていない。近年平滑筋、骨格筋、心筋など種々の筋肉細胞において、転写因子である Serum response factor (SRF)がその標的遺伝子である細胞骨格関連たんぱく質や immediate early gene などの発現制御を介して、心筋を含むこれら細胞の発生、分化や増殖および病的リモデリングに重要な役割を果たしていることが徐々に明らかとなってきた。このような SRF の活性化機構に関しては複数の研究室から、SRF の活性を制御する転写共役因子が複数見出され、SRF の活性制御の一端が明らかとなってきた。中でも myocardin family に属する myocardin や myocardin-related transcriptional factor (MRTF)-A,-B は直接的に SRF と結合し転写活性を亢進させる強力な SRF のパートナーであることが知られている。さらに、最近、MRTF-A が Rho 依存性にアクチン動態と連動して SRF を活性化することが報告された。すなわち MRTF は通常その大多数が細胞質に存在するが、細胞に刺激が加わり Rho 依存性経路の活性化とそれに引き続く細胞骨格リアレンジメントが起こるとそれに伴い核内に移行し、SRF と結合してその転写活性を亢進させる。これら一連の発見により、以前よりその分子メカニズムが不明であった Rho 依存性の SRF 活性化

の分子メカニズムの一端が明らかとなったと同時に、この新規シグナル経路の心臓病発症・進展における重要性が示唆された。しかし今までのところ、これら Rho 依存性の MRTF-A による SRF 活性化が、成人における心臓病病態形成においてどのような役割を果たしているか、またその治療標的としての意義についてはまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

心不全発症のメカニズムの一端を解明し新たな心不全治療法の開発を目指す目的で、最近 Rho 依存性転写調節に関与することが明らかとなった転写共役因子 MRTF-A の、心肥大・心不全の発症・進展における病的シグナルの新規メディエーターとしての役割を解明し、その治療標的としての有効性を検討する。

3. 研究の方法

病的刺激に対する心筋細胞のストレス反応における MRTF-A の役割を MRTF-A ノックアウトマウス(KO)を用いて詳細に検討した。具体的には、MRTF-A KO に大動脈結紮モデルを作製することで慢性心肥大モデルを作製し、その生理学的、生化学的、分子生物学的解析を行い、圧負荷心肥大における MRTF-A の役割を探った。また単一のモデルのみでは心肥大における MRTF-A の役割が明らかでない可能性もあることを考え、アンジオテンシン II の慢性投与による心肥大モデルも作製し、上記と同様に解析を行った。いずれの実験においても、これらモデルの表現形質の観察に加え、心臓から蛋白質、RNA を抽出し、SRF 標的遺伝子およびその産物の発現などについての生化学的あるいは分子生物学的解析を行った。

また MRTF-A の心筋リモデリングにおける役割の分子機序をさらに検討する目的で、

アンジオテンシンⅡを投与した MRTF-A ノックアウトマウスの心臓の mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて野生型マウスと比較し、MRTF-A の下流の標的遺伝子群の同定を試みた。更にそこで発現に差が認められた BNP 遺伝子の発現亢進における MRTF-A の役割とその分子機序について培養心筋細胞を用いて解析を行った。

4. 研究成果

培養心筋細胞に機械的進展刺激あるいはエンドセリンやアンジオテンシンⅡなどの液性因子刺激を行うと MRTF-A が Rho および actin-dynamics 依存性に核内に集積することを確認した。そこで通常の飼育条件では妊娠時の乳腺の発達以外に明らかな表現形質の差が野生型と比して見られない MRTF-A KO を用いて、大動脈縮窄による圧負荷モデル作成およびアンジオテンシンⅡ慢性投与による心肥大モデルを作製した。MRTF-A KO は野生型マウスと比べ、大動脈縮窄、アンジオテンシンⅡ慢性投与に対する心肥大反応が共に減弱していた。複数の SRF 依存性遺伝子発現の心肥大刺激による亢進も減弱していた。

心臓ホルモンであり、肥大心で発現が亢進する BNP 遺伝子の発現亢進も MRTF-A KO では減弱していたことから、培養心筋細胞を用いて MRTF-A の BNP プロモーター活性に及ぼす効果を検討した結果、BNP プロモーター上に新規 SRF 結合領域を同定し、更に MRTF-A はその SRF 結合領域を介して直接的に BNP 遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。

以上の結果より MRTF-A は肥大刺激により核内に移行し、種々の肥大関連遺伝子の発現を亢進させ、病的な心肥大に関与することが明らかとなり、病的な心筋リモデリングにおけ

る MRTF-A の新規治療標的としての意義が示唆された。

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 5 件)

1. Hata L, Murakami M, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kinoshita H, Usami S, Yasuno S, Fujiwara M, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Yamada Y, Nakao K, Ueshima K, Nishikimi T, and Nakao K. Zinc-finger protein 90 negatively regulates neuron-restrictive silencer factor-mediated transcriptional repression of fetal cardiac genes. 査読有 **J Mol Cell Cardiol. in press** 2011.
2. Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami S, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, and Nakao K. MRTF-A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of BNP gene expression. 査読有 **Mol Cell Biol.** 30(17):4134-4148.2010
3. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S, Kuwabara Y, Kurose H, Inoue R, Mori Y, Li Y, Nakagawa Y, Usami S, Fujiwara M, Yamada Y, Minami T, Ueshima K, and Nakao K. Inhibition of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Anti-hypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. 査読有 **Circ Res.** 106(12): 1849-1860.2010
4. Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. 査読有 **Circ. Res.** 105(8):746-754. 2009.
5. Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. 査読有 **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 296(6):H1804-10.2009

[学会発表] (計 3 件)

1. Koichiro Kuwahara, Satoru Usami 他 7 名. Rho and actin dynamics-dependent nuclear translocation of MRTF-A is a common molecular mechanisms underlying both mechanical stretch-

and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophy. 14th Annual Scientific Session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and Metabolism.2010. 4.1. Nara.

2. Satoru Usami, et al. CT dinucleotide repeat polymorphism in the promoter region of Guanylyl Cyclase-A gene is associated with essential hypertension in the Japanese. 14th International Congress of Endocrinology. 2010.3.29.Kyoto
3. 木下秀之、桑原宏一郎、井上隆司、西田基宏、黒瀬等、清中茂樹、森泰生、榮向路、李育浩、村上政男、中川靖章、保野慎治、宇佐美覚、藤原正隆、桑原佳宏、山田優子、南丈史、原田昌樹、上嶋健、中尾一和。 ナトリウム利尿ペプチドの心保護作用における TRPC6 の役割。第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009.4.23-4.25(群馬、前橋)。

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/research/cardio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇佐美 覚 (Satoru Usami)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30521752