

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25年 5月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590802

研究課題名（和文） 心肥大から心不全発症におけるRNAポリメラーゼの脱リン酸化調節による役割解明

研究課題名（英文） The regulatory role of dephosphorylation at RNA polymerase II in the process from cardiac hypertrophy to failure

研究代表者

本間 覚 (HOMMA SATOSHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00302422

研究成果の概要（和文）：リン酸化と脱リン酸化により転写活性が制御される RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) は、心肥大の形成過程においてその活性が亢進する。RNAPII 活性を負に制御する脱リン酸化酵素 FCP1 の心不全発症における役割は不明である。心筋特異的 FCP1 過剰発現マウスを作製したところ、このマウスは加齢と共に著明な心拡大と心機能低下を呈し、心不全となることを見出した。このことは、RNAPII 活性が適切に制御されず FCP1 により抑制されていると心不全に陥ることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：In the development of cardiac hypertrophy, the transcriptional activity of RNA polymerase II (RNAPII), which activity is increased by phosphorylation and is reduced by dephosphorylation, is augmented. It is unknown the role of phosphatase FCP1 on RNAPII in the development of heart failure. We generated the FCP1 transgenic mouse specifically overexpressing in the heart. The mice developed heart failure accompanied with the severe chamber dilatation and cardiac dysfunction, age-dependently. It implies that the impaired activity of RNAPII, especially the reduced phosphorylation of RNAPII, induces cardiac failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環器内科学

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：心肥大・心不全・RNAポリメラーゼ II・脱リン酸化酵素 FCP1

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は増殖能を持たず、血行動態的負荷や心筋ポンプ失調に対して肥大という形で反応するが、そのストレスが解消されない限り心臓は心機能不全に陥る。つまり心肥大は生体の適応現象であるとともに心不全発

症に到る潜在的な前段階状態といえる。しかしながら心肥大から心不全に到る過程の詳細については不明な点が多い。

C末端ドメイン[CTD]のリン酸化による RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の活性化は、転写伸長反応の促進や mRNA へのプロセッ

ングに必要不可欠であり、遺伝子発現の制御において中心的役割を担う。RNAPII の CTD リン酸化の促進因子としては Cdk9 (Cyclin dependent kinase 9) が関与し、申請者らは、心肥大の形成において Cdk9 活性の増加が RNAPII CTD のリン酸化を亢進 (RNAPII の活性化) させることを明らかにした。一方、RNAPII の不活性化因子としては、CTD 脱リン酸化酵素である FCP 1 (transcription factor IIF-associating C-terminal domain phosphatase 1) が関与していると考えられている。FCP 1 の遺伝子変異が原因である Congenital cataract facial dysmorphism neuropathy syndrome という先天性疾患に心筋病変を伴う例があり、拡張型心筋症の一部に RNA 転写制御の異常が関与する可能性を示唆する。このように、FCP1 は不全心の形成に関与していると推測されるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

心肥大から心不全に移行していく過程で FCP1 活性の増加があり、そのことが RNAPII CTD のリン酸化レベルの低下をもたらし、心筋細胞の機能維持に働く遺伝子の発現低下による細胞死が生じ、結果として心不全が発症するという仮説を立てている。そこで、次の点を明らかにする。

(1) FCP1 および非機能型 FCP1 過剰発現マウスも用いて次の項目を明らかにする。

① DNA マイクロアレイでの遺伝子発現は FCP1 過剰発現により全体的に低下するのか、特異性があるのか、

② 蛋白レベルの減少は mRNA 発現を反映するのか、特異性があるのか、

③ 心筋細胞の機能維持に重要な遺伝子群 (血管新生・エネルギー代謝・ミトコンドリア機能維持関連の遺伝子など) の発現低下が生じていないか、

④ アポトーシスという細胞死に結びつく系の亢進が認められないか。

(2) 心肥大から心不全に移行するモデルにおいて、肥大型から不全期に移行するに従い、FCP1 の RNAPII CTD 脱リン酸化活性が増加するのではないか。

以上の点について実験を行い、FCP1 の病態生理的役割を明らかにしていく。

3. 研究の方法

心肥大から心不全に移行していく過程において FCP1 による RNAPII CTD 脱リン酸化活性が亢進し、心筋細胞の機能維持に重要な遺伝子群の発現低下が生じることが予想され、その結果、RNAPII CTD のリン酸化レベルの低下とともに心筋細胞のアポトーシスが生じ、不全心筋へ移行していくものと仮説を立てている。

(1) FCP1 および非機能型 FCP1 過剰発現マウスを用いた検討

① FCP1 過剰発現マウスの生存率を検討した。

② 心筋細胞特異的 FCP1 (FCP1-Tg) および非機能型 FCP1 過剰発現マウス (dnFCP1-Tg) を用いて、経時的に小動物用心臓超音波器を用いて心機能を評価した。

③ 設定したポイントにおける FCP1 および非機能型 FCP1 過剰発現マウスから心臓を採材した。total RNA を抽出し、心不全マーカーを測定した。

④ ウェスタンブロットにて、RNAPII CTD のリン酸化状態を検討した。

⑤ ウェスタンブロットにて、アポトーシスの亢進が認められるかを検討した。

(2) ダール食塩感受性ラットを用い、心肥大から心不全に移行するモデルでの検討

4. 研究成果

(1) FCP1 および非機能型 FCP1 過剰発現マウスを用いた検討

① FCP1 過剰発現マウスの生存曲線は、野生型マウスに比し、有意な生存率の低下が認められた。

② 小動物用心臓超音波器を用いた心機能評価からは、野生型 (WT) に比べ FCP1-Tg の経時的な左室収縮能の低下および心拡大が認められた。一方、dnFCP1-Tg には心機能の低下が認められなかった。

③ 心不全マーカーである ANP および β -MHC 遺伝子発現を検討した。明らかな心機能の低下と心拡大が認められた 20 週齢の FCP1-Tg においては、ANP および β -MHC 遺伝子発現は WT に比し著明に増加していた。また、心機能の低下が認められていない 5 週齢の FCP1-Tg においても、ANP および β -MHC 遺伝子発現は有意に増加していた。一方、dnFCP1-Tg における ANP および β -MHC 遺伝子発現は WT と有意差はなかった。

④ RNAPII CTD のリン酸化レベルは、WT に比し FCP1-Tg にて有意に低下していた。一方、dnFCP1-Tg では、WT と違いはなかった。

⑤ FCP1-Tg では、週齢が進むと共に、アポトーシスが生じていることを示す Cleaved Caspase3 の増加が認められ、アポトーシス促進因子である Bax の発現増加とアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現低下が認められた。一方、dnFCP1-Tg においては、アポトーシス関連分子の発現変化は認められなかった。

(2) ダール食塩感受性ラットを用いた心肥大から心不全に移行するモデルでの検討は施行できなかった。

なお、マイクロアレイ解析および心筋エネルギー代謝関連遺伝子の発現は、現在検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Sakai S, Kimura T, Wang Z, Shimojo N, Maruyama H, Homma S, Kuga K, Yamaguchi I, Aonuma K, Miyauchi T. Endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy is partly regulated by transcription factor II-F interacting C-terminal domain phosphatase of RNA polymerase II. *Life Sci.* 2012;91:572-7. 査読有
2. Miyauchi Y, Sakai S, Maeda S, Shimojo N, Watanabe S, Homma S, Kuga K, Aonuma K, Miyauchi T. Increased plasma levels of big-endothelin-2 and big-endothelin-3 in patients with end-stage renal disease. *Life Sci.* 2012;91:729-32. 査読有
3. Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, Naka T, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 2012;189:2043-53. 査読有
4. Sato A, Hiroe M, Akiyama D, Hikita H, Nozato T, Hoshi T, Kimura T, Wang Z, Sakai S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Aonuma K. Prognostic value of serum tenascin-C levels on long-term outcome after acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2012;18:480-6. 査読有
5. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 2012;47:924-35. 査読有
6. Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;50:91-105. 査読有
7. Tajiri K, Maruyama H, Sato A, Shimojo N, Endo M, Aihara H, Kawano S, Watanabe S, Sakai S, Aonuma K. Prediction of Chronic Renal Insufficiency after Coronary Angiography by an Early Increase in Oxidative Stress and Decrease in Glomerular Filtration Rate. *Circ J* 75, 437-442, 2011. 査読有
8. Hoshino T, Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Nakayama M, Ishii T, Warabi E, Yanagawa T, Shimizu R, Yamamoto M, Hara A. Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415:94-8. 査読有
9. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Yamadori T, Masuko H, Sakamoto T, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Hizawa N. Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:600-9. 査読有
10. Sugimoto R, Warabi E, Katayanagi S, Sakai S, Uwayama J, Yanagawa T, Watanabe A, Harada H, Kitamura K, Noguchi N, Yoshida H, Siow RC, Mann GE, Ishii T. Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodelling in sequestosome 1 deficient mice. *J Cell Mol Med.* 2010;14:1546-54. 査読有
11. Tabuchi K, Oikawa K, Hoshino T, Nishimura B, Hayashi K, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Tanaka S, Hara A. Cochlear protection from acoustic injury by inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase and sequestosome 1 stress protein. *Neuroscience.* 2010;166:665-70. 査読有
12. Sugimoto H, Okada K, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, Taguchi K, Yanagawa T, Nakahara A, Hyodo I, Ishii T, Yamamoto M. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298:G283-94. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. Sakai S, Warabi E, Kimura T, Miyauchi T, Aonuma K, Ishii T: Protective Activity to Oxydative Stress is Attenuated in Development of Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis and Dysfunction. The 16th Society for Free Radical Research International Biennial Meeting. 2012.9.8 (London, UK)
2. Ishii T, Warabi E, Sakai S, Yanagawa T. Roles of sequestosome1/p62 in prevention of obesity, hypertension and atherosclerosis. The 16th Society for Free Radical Research International Biennial Meeting. 2012.9.9 (London, UK)
3. Sakai S, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T: Cardiomyocyte hypertrophy incuded by endothelin-1 is regulated by

- transcription factor II-F interacting C-terminal domain phosphatase (FCP1) of RNA polymerase II The 12th International Conference on Endothelin. 2011.9.14 (Cambridge, UK)
4. Warabi E, Sakai S, Suzuki E, Tomoo T, Yanagawa T, Mann GE, Ishii T: Non-dipper-like hypertension in sequestosome1/p62/A170 deficient mice in early phase of obesity Physiology. 2011.7.13 (Oxford, UK)
 5. Warabi E, Sakai S, Yanagawa T, Harada H, Siow RCM, Mann GE, Ishii T: Deficiency of sequestosome1/p62/A170 in mice is associated with metabolic syndrome: (II) Enhanced neointimal hyperplasia and carotid artery remodeling. International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. 2010.5.1 (Salamanca, Spain)
 6. Warabi E, Sakai S, Suzuki E, Tomoo T, Tomoike S, Enomoto Y, Harada H, Yanagawa T, Mann GE, Ishii T: Deficiency of sequestosome1/p62/A170 in mice is associated with metabolic syndrome: (III) Non-dipper type hypertension. International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. 2010.5.1 (Salamanca, Spain)

[図書] (計2件)

1. 酒井 俊・河野 了・青沼和隆 副腎皮質ステロイド合併症としてみられる病態—高血圧— 小池隆夫、住田孝之編 「GUIDELINE 膠原病・リウマチ —治療ガイドラインをどう読むか— 第2版」 診断と治療社 164-171, 2010
2. 前田清司・宮内裕美・酒井 俊・宮内 卓 肺高血圧モデル 北 徹、堀内久徳、柳田素子、猪原匡史、富本秀和、並河 徹 編 「シリーズモデル動物利用マニュアル・疾患モデルの作製と利用-循環器疾患」 ANIMAL MODELS Life-Science Information Center 社 123-126, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 覚 (HOMMA SATOSHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00302422

(2) 研究分担者

酒井 俊 (SAKAI SATOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30282362

石井 哲郎 (ISHII TETSURO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20111370