

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 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590817

研究課題名（和文）心臓保護因子 HB-EGF と相互作用する因子の同定および機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of the factors that interact with cardiac protective factor HB-EGF

研究代表者 山崎 悟 (YAMAZAKI SATORU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70348796

研究成果の概要（和文）：

本研究計画において、我々は、心不全におけるエンハンサーを解析する目的のために、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* エンハンサーシステム、*in vivo* における虚血システム、およびトランス制御因子の精製系の系を確立することができた。HB-EGF のエンハンサー同定にはいくつか課題を残したものの、今後これらを組み合わせることにより、心不全の病態解明と新規の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：

In this research project, we were able to establish *in vivo* enhancer system using zebrafish, *in vivo* ischemia systems and purification system of trans-regulatory factors to purpose of analyzing the enhancer in heart failure. Although identification of HB-EGF enhancer left some problems, combining these systems is expected to lead to the development of therapies and new pathogenesis of heart failure in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：(1)遺伝子 (2)核酸 (3)ゲノム (4)シグナル伝達 (5)循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年生活習慣変化に伴う急性・慢性心不全患者増加は深刻で、現在の EBM に基づく治療でも十分な治療成果が得られていない。また基礎実験で数々集積された知見に基づく臨床治療も大半は成功していない。この原因の一つには培養心筋細胞 (*in vitro*) での研究成果に基づく EBM の限界も考えられ、解決の為に心筋組織 (*in vivo*) のシグナル伝達や、組織全体の包括的な保護機序を検討する

必要がある。

心筋細胞は胎生期において活発に分裂・増殖を行っているが、出生以後においてはその能力は喪失し、分裂・増殖しない。心筋梗塞などにより心筋細胞が消失した場合、収縮可能な心筋細胞数は減少し、さらに心臓が持つポンプ機能は低下する。残存心筋細胞は生理的代償性肥大によってその機能を補うが、これには限界があり、最終的に心臓は機能不全に陥る。この心不全の発症には種々の遺伝子発現が転写レベルで関与しており、その転写

調節機構を解明することが、心不全の発症機構解明、さらには心不全治療につながると考えられる。

HB-EGF (ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子) は、ヒト末梢血より単離、培養されたマクロファージが産生、分泌する増殖因子として同定された。申請者らはこれまでに HB-EGF の様々な変異マウスの作成および解析を行い、その結果心臓においては特異的に重要な機能維持に働くことを明らかにした (Yamazaki et. al, PNAS 2003;163(3):469-47, Yamazaki et. al, J Cell Biol 2003;100(6):3221-3226)。心臓においては、HB-EGF の発現は存在するが、臨床不全心および圧負荷モデルの心臓でその発現がきわめて高くなるのが、近年報告されている。すなわち、我々の結果およびこれらの知見より HB-EGF は心筋保護因子の 1 つであると現在は考えられている。一方、HB-EGF の転写制御については、MAPK シグナルによる活性化、v-jun および c-jun などターゲットの候補として報告されているものの、現在までに心不全におけるその転写制御については、シスエレメント、転写制御因子を含めてまだ明らかになっていないことは多いと考えられる。シスエレメントにおいては、プロモーター以外にも組織特異的、あるいはストレス応答特異的な転写制御に関わる領域が転写開始点の遠位に存在することが知られており、それゆえ現在まで未同定の機能領域が想定される。

2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* エンハンサー検出系をまず確立し、これを応用することにより、心保護因子 HB-EGF の心不全エンハンサー領域を同定することを試みる。また、これと並行して、*in vivo* において心不全を惹起する系を検討する。さらにシスエレメントを基点に転写制御因子および複合体の同定することも視野に入っており、これを達成するための最初のステップとして、独自の精製系を組み合わせた DNA 結合タンパク質を精製する系を検討する。これらを行うことにより、心不全の病態解明、さらには治療への新たな治療への展開を図る。

3. 研究の方法

(1) HB-EGF の心不全応答エレメントの同定

転写制御のメカニズムを明らかにするためには、転写因子などの転写制御因子あるいはプロモーターやエンハンサーなどのシス

エレメントを同定することが必須である。本研究では、HB-EGF のエンハンサー領域のアッセイについて、ゼブラフィッシュを用いて行うことを試みた (これは、マウスで予備実験を行う場合に比べ、時間と予算が節約できることが想定されたためである)。

a. ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* エンハンサーアッセイ

最初にエンハンサーアッセイを行う遺伝子周辺を含む BAC について、ゼブラフィッシュゲノムデータベースを用いて *in silico* cloning を行った。続いて、Red / ET という入子由来の組み換え酵素を利用し、発現の検出を容易にするために coding 領域を GFP に変換した BAC を大腸菌内で作成した。さらに、同様の方法を用いてゲノム側面に To12 エレメントを挿入し、BAC コンストラクトを完成させた。続いて、トランスポザゼ 2 (以下、To12) とともに BAC クローンをゼブラフィッシュ受精卵に導入した (To12 システムを用いると巨大 DNA の宿主染色体への挿入が促進され、高い導入効率が得られる)。本研究では、上記の方法により、ゼブラフィッシュゲノム配列より HB-EGF 領域をカバーしている BAC、およびマウスの HB-EGF 領域をカバーしている BAC の coding 領域を GFP に置換したクローンを併せて作成し、実験に使用した。

b. ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 虚血システムの構築

通常 HB-EGF の発現は低く抑えられていると考えられる。しかしながら、エンハンサー領域を導入した状態で、心不全を惹起する状態を *in vivo* で作り出すことにより、鋭敏に発現上昇を検出されることが期待された。実際には、stage top インキュベータ上でガス混合装置 GM-8000 を用いることにより 5% 酸素濃度の虚血状態を作り出すことを試み (非虚血状態は、酸素濃度 20% とした)、72 hpf のゼブラフィッシュを上記の条件で、60 分および 120 分間処理を行った。

(2) 心不全応答エレメント結合蛋白質の精製

特異的な DNA 塩基配列に結合するタンパク質を精製する手法として、合成ヌクレオチドを結合したセファロースを用いた DNA アフィニティークロマトグラフィーがある。エンハンサー結合蛋白質を同定するためにまず行う試みとして独自の精製系を組み合わせた DNA 結合タンパク質を精製する系を検討した。実際には、5' ビオチン化 primer を用いて PCR 法によりプローブを作成し、streptavidin beads に直接結合させることにより、pull-down 用の beads を作成した。制御因子が含まれる核分画の精製については、

これまでにキナーゼの器質同定で培ってきた独自開発のカスタムカラムと逆相 HPLC を組み合わせた精製を行い、さらに上記の方法で作成した beads により pull-down を行った後に溶出を行い、最終的に SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより確認を行った。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュを用いた in vivo エンハンサーアッセイ

この系については研究開始時にはまだ充分に確立しているとはいえなかったため、最初にパイロット研究を行った。実際には、心臓特異的遺伝子 X において coding 領域周辺 200 kb をカバーする BAC をスクリーニングし、coding 領域内に GFP を挿入した。Tol2 エlement を BAC の側面に挿入し、Tol2 とともにゼブラフィッシュの受精卵に co-injection した。その結果、内因性の遺伝子発現から予想されるように、心臓の発生が完成している 60hpf のステージで GFP の発現が検出された。この事より in vivo BAC システムが work することが明らかになった(心臓特異的遺伝子 X を用いた study の成果については、現在論文投稿中)。

続いて、本実験においては、ゼブラフィッシュゲノムの HB-EGF coding 領域内を GFP に変換した BAC クローンの構築を試みた。ところが BAC の配列に不安定化が起こり、positive なクローンを得るのに意外に時間を取られる結果となった。これについては大腸菌の菌株の検討および培養方法などを工夫することにより乗り切ることができた。マウスの HB-EGF 領域についてもゼブラフィッシュゲノムと同様に、遺伝子周辺を持つ BAC クローンをスクリーニングし、coding 内を GFP に変換した BAC クローンを構築した。続いて、パイロット実験と同様に、それぞれのクローンを Tol2 の mRNA とともに、1 細胞期の受精卵にマイクロインジェクションした。その後、蛍光顕微鏡下にて心臓の発生が完了する 48-72 hpf の期間、観察を行った。その結果、残念ながらマウス BAC においては、まったく GFP の発現を得ることができなかった。また、ゼブラフィッシュ BAC においても、全体的に弱い発現が見えるのみであった。これと平行して、心不全を惹起する状態を、最初にカテコラミン、あるいは抗癌剤であるドキソルビシンなどで作り出すことを試みた。しかしながら、endogenous のマーカー遺伝子の発現上昇が見られないため、in vivo における虚血状態のモデル作成を試みた。72 hpf のゼブラフィッシュを 5% 酸素濃度の条件で、60 分および 120 分処理し、そこから mRNA を抽出して定量 qPCR を行ったところ、別の study

で虚血遺伝子として得られた遺伝子 Y の発現が、虚血依存的に上昇することが確認された(虚血依存性遺伝子 Y の study の成果については、現在論文投稿中)。今後は、虚血状態で HB-EGF の発現を見ることにより、エンハンサー同定への足がかりとなることが期待される。

(2) 心不全応答エレメント結合蛋白質の精製

本研究計画ではトランス制御因子の同定も視野に入れていたので、(1)のエンハンサーエレメントの探索とは別に、DNAカラム精製系について並行して進めた。ここでは、心血管系に重要な転写因子である GATA4 領域を系の構築に使用した。実際には、5' biotin 付加 primer を用いて GATA4 領域の配列を合成し streptavidin beads に直接結合させることにより、pull-down 用の beads を作成した。組織より核タンパク質 150 μ g を抽出し、続いて陽イオン交換カラムによる分離を行い、さらに上記の方法で作成した beads により pull-down を行った後に溶出を行い、最終的に SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより確認を行った。今回は抽出 buffer の塩濃度を 0.15M および 0.75M の NaCl による核可溶性画分への影響を調べた。その結果、細胞質画分には、どちらの濃度でも GATA4 が溶出していないことが確認された。また、可溶性、不溶性それぞれの画分については、0.75M の方がきれいに精製されており、この系が work されていることが確認された(図)。

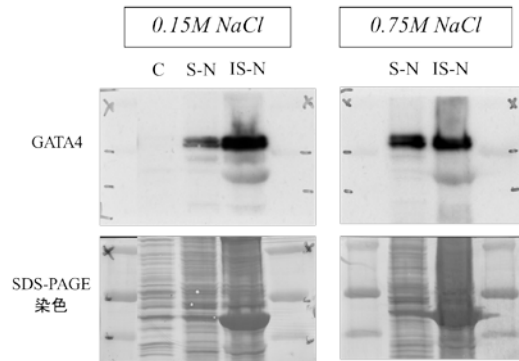


図. 核抽出画分における結合タンパク質の確認および Extraction Buffer の NaCl 濃度の影響。C: 細胞質画分、S-N: 可溶性核画分、IS-N: 不可溶性核画分。

HB-EGF のエンハンサーエレメントの同定については、まだ検討する課題は多いものの、ゼブラフィッシュを用いた in vivo エンハンサーアッセイ検出系の検討、ゼブラフィッシュを用いた in vivo 虚血システムの構築およびシスエレメントを用いた結合タンパクの精製については今回の研究を通じて確立することができたので、今後はこれらを組み合わせることでエンハンサーの役

割が明らかとなれば、心臓特異的な保護機構の解明さらには、治療法の開発につながると期待される。

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 8 件)

1. Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima S, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M: Dipeptidyl-peptidase IV inhibition improves pathophysiology of heart failure and increases survival rate in pressure-overloaded mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 May;304(10):H1361-9. doi: 10.1152/ajpheart.00454.2012. 査読有
2. Yamazaki S, Kobayashi H, Takashima S, Liu W, Okuda H, Yan J, Fujii Y, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Koizumi A: Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Mar 15;432(3):519-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.015. 査読有
3. Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M: H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012 Jun;26(3):217-26. doi: 10.1007/s10557-012-6381-5. 査読有
4. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzog R, Kriscsek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A: Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One.* 2011;6(7):e22542. doi: 10.1371/journal.pone.0022542. 査読有

5. Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S: Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). *J Biol Chem.* 2010 Oct 8;285(41):31337-47. doi: 10.1074/jbc.M110.155788. 査読有

6. Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S: AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2010 Jun;12(6):583-90. doi: 10.1038/ncb2060. 査読有

7. Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, Komuro I: X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jun;48(6):1280-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.02.004. 査読有

8. Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki 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 Feb 26;393(1):55-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.076. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Akira Funada, Hideaki Kanzaki, Satoru Yamazaki, Takuya Hasegawa, Yasuo Sugano, Takahiro Ohhara, Masanori Asakura, Masaharu Ishihara, Satoshi Yasuda, Wataru Shimizu, Hisao Ogawa, Masafumi Kitakaze, Toshihisa Anzai: Impact of the Polymorphisms of Renin-Angiotensin System on Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy in the Era of Cardiac Magnetic Resonance. 第 77 回日本循環器学会学術総会、2013 年 3 月 15-17 日、横浜

2. Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Kazuhiro Nagata: Regulation of mysterin, a moyamoya disease-associated protein, by de-ubiquitinating enzyme. EMBO/EMBL Symposium “Quality Control-From Molecules to Organelles-”, 2012年9月19-22日、Heidelberg(Germany)

3. Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Akio Koizumi, Yoshinori Fujimori, Kazuhiro Nagata: Structure and Function of AAA+/ubiquitin ligase Mysterin/RNF213. FASEB summer research conferences “Quality Life through Research”, 2012年7月29-8月3日、Saxtons River(USA)

4. 小林 果、山崎 悟、高島 成二、人見 敏明、劉 万洋、原田 浩二、小泉 昭夫: ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 mysterin の機能解析、第82回日本衛生学会学術総会、2012年3月24-26日、京都

5. Ayako Takahashi, Masanori Asakura, Shin Ito, Min Kyung-Duk, Kazuhiro Shindo, Yin Yan, Yulin Liao, Satoru Yamazaki, Shoji Sanada, Yoshihiro Asano, H atsue Ishibashi-Ueda, Seiji Takashima, Tetsuo Minamino, Hiroshi Asanuma, Naoki Mochizuki, Masafumi Kitakaze: Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitor Improved Cardiac Function and Survival in Mice with Pressure Overload Heart Failure. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月16-18日、福岡

6. Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Wangyang Liu, Satoru Yamazaki, Toshiaki Hitomi, Hatasu Kobayashi, Norio Matsuura, Susumu Miyamoto, Seiji Takashima, Nobuo Hashimoto, Yoshinori Fujiyoshi, Akio Koizumi, Kazuhiro Nagata: Structure and function of novel AAA+/Ubiquitin ligase mysterin. Cold Spring Harbor Asia Conference, “Protein Homeostasis in Health & Disease”, 2011年9月26-30日、Suzhou (China)

7. Ayako Takahashi, Masanori Asakura, Min Kyung-Duk, Shin Ito, Tetsuo Minamino, Yin Yan, Satoru Yamazaki, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Yulin Liao, Seiji

Takashima, Naoki Mochizuki, Masafumi Kitakaze: Effect of Vildagliptin on the Improvement of Survival in Murine Pressure-Overload Heart Failure Model. American Heart Association 83rd Scientific Sessions、2010年11月13-17日、Chicago (USA)

8. Akemi Yoshida, Hiroshi Asanuma, Hideyuki Sasaki, Shoji Sanada, Satoru Yamazaki, Seiji Takashima, Tetsuo Minamino, Masanori Asakura, Masafumi Kitakaze: Inhalation of Hydrogen Gas Reduced Infarct Size Following Ischemia and Reperfusion via Mitochondrial KATP Channels in Canine Hearts. European Society of Cardiology Congress 2010、2010年8月28-9月1日、Stockholm (Sweden)

9. 森戸 大介、劉 万洋、山崎 悟、人見 敏明、小林 果、松浦 範夫、箸方 宏州、原田 浩二、高島 成二、宮本 享、橋本 信夫、小泉 昭夫、永田 和宏: 新規巨大ATPアーゼ/ユビキチンリガーゼ Mysterin は血管新生を制御し、モヤモヤ病(ウイルス動脈輪閉塞症)に関与する、第62回日本細胞生物学会学術総会、2010年5月19-21日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 悟 (YAMAZAKI SATORU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号: 70348796

(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・研究開発基盤センター・部長

研究者番号: 20294096

(3) 連携研究者

高島 成二 (TAKASHIMA SEIJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 90379272