

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659380

研究課題名(和文)慢性組織障害とクロマチン構造変化を介した心不全治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of treatment of heart failure targetting at chronic organ damage and chromatin remodeling

研究代表者

久保田 功 (Kubota, Isao)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30161673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：核内転写調節因子であるHMGB1は、様々な働きを有しているが、心不全時の胎児型遺伝子発現に与える意義に関しては明らかではなかった。マウス圧負荷心やヒト不全心サンプルでHMGB1が核内から細胞質へ局在変化をしていることを明らかにした。HMGB1を過剰発現すると、心肥大刺激時のANP、BNP発現や心筋細胞肥大が優位に抑制されていた。SiRNA-HMGB1を用いてHMGB1の発現を低下させると、心肥大刺激によるANP、BNPの発現がさらに亢進した。この一連の研究成果は、HMGB1の心筋細胞保護効果を示唆しており、心不全治療の開発への重要な基盤研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：High Mobility Group Box 1 (HMGB1) is a nuclear DNA-binding protein that has multiple functions, however little is known about the effects of nuclear HMGB1 on fetal gene expressions under hypertrophic stimulation. We observed decreased nuclear HMGB1 expression in human failing hearts and pressure overloaded mice heart. Nuclear HMGB1 decreased in response to endothelin-1 (ET-1) or angiotensin II (AT II) stimulation in cardiomyocytes, where nuclear HMGB1 was acetylated and translocated to the cytoplasm. Overexpression of nuclear HMGB1 attenuated ET-1 or ATII induced fetal gene expression such as ANP and BNP and induction of cardiomyocyte hypertrophy. These results suggest that the maintenance of stable nuclear HMGB1 levels prevents hypertrophy and heart failure.

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：慢性心不全 胎児型遺伝子 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

高齢化により心不全を呈する患者が増加しており、慢性心不全が肺炎や感染を機に急性増悪し、改善後も症候性心不全が持続するメカニズムの解明が期待されている。心不全の進行は組織障害によるクロマチンリモデリングを契機とした心筋胎児型遺伝子発現が関与している。

心筋細胞の G 蛋白質共役型受容体(GPCR) 刺激は転写亢進因子 GATA4, NF-AT3, CSX/NKX-2.5 活性化によって胎児型遺伝子発現が亢進する。そのため、転写亢進因子の抑制を目的に ACE 阻害薬や β ブロッカーが心不全の治療薬として用いられている。正常状態では転写抑制因子 NRSF が胎児型遺伝子発現を抑制する機構が存在している。しかし、感染や低酸素血症を機に急性増悪する慢性心不全で、その抑制機構が障害されるメカニズムが詳細には検討されていなかったため、転写抑制因子の活性低下予防や抑制をターゲットとした治療法が皆無であった。

HMGB1 はクロマチン構造を弛緩させることで転写因子や DNA 修復因子の DNA へのアクセスを間接的に調節している。近年、慢性炎症、低酸素、組織障害による病態進展と HMGB1 の関連性が注目されている。しかし、壊死細胞から血中に流出し toll-like receptor や receptor for advanced glycation end-product に結合する、いわゆる炎症や敗血症での細胞外 mediator として作用が主なものである。

我々も梗塞心筋細胞から遊離した HMGB1 の血管新生を介した心筋保護作用を報告した (Cardiovasc Res. 2008) が、慢性心不全患者を対象とした臨床研究では、予想に反して血中 HMGB1 濃度が心不全重症度や予後と相関しないことを見出し、これまで報告のない、心筋細胞核内での DNA 結合タンパク質としての HMGB1 の作用と心機能障害、心保護への関連に着目した。

2. 研究の目的

様々な転写因子が転写抑制因子として作用しているが、HMGB1 による調節機構は十分に解明されていない。本研究の目的は、炎症と低酸素血症に伴う障害心筋での核内 High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) の意義と、HMGB1 による胎児型遺伝子制御機構を解明し、治療抵抗性心不全に対する新規の治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト心筋核内 HMGB1 心不全重症度との相関関係

拡張型心筋症、肥大型心筋症で入院した患者から得られた心筋生検サンプルを用いて、HE 染色、Elastica-Masson 染色、HMGB1 抗体を用いて免疫染色を行い、心不全重症度や臨床経過を対比させ、ANP, BNP 血中濃度と HMGB1 の局在変化の比較検討を行う。

(2) 心筋細胞での HMGB1 の核外移行メカニズムの解明

LPS, Endothelin-1, Angiotensin II, H₂O₂ で心筋細胞を刺激し、核内蛋白、細胞質蛋白分画の HMGB1 のアセチル化を免疫沈降法で検討する。

(3) 心筋細胞内への HMGB1 保持による胎児が多遺伝子発現に与える効果の検討

pGEX-HMGB1 を培養心筋細胞に transfection を行い、Endothelin-1, Angiotensin II 刺激による胎児型遺伝子発現の変化を ANP-luc, BNP-luc を用いた luciferase assay, 定量 PCR 法を用いた mRNA 定量で検討する。逆に、SiRNA-HMGB1 を用いて、HMGB1 の silencing を検討する。その地に、SiRNA-HMGB1 を transfection を行い、上記刺激による胎児型遺伝子発現を ANP-luc, BNP-luc を用いた luciferase assay, 定量 PCR 法を用いて mRNA 定量評価を行う。

(4) 不全心マウスでの HMGB1 心不全重症度との相関関係

大動脈縮窄術を野生型マウスに行い、HMGB1 の局在の変化を、Western blotting 法を用いて検討する。同様に、野生型マウスにおける局在変化を免疫染色法を用いて検討する。

(5) 不全心における HMGB1 の翻訳後修飾の評価

大動脈縮窄術を野生型マウスに行い、HMGB1 のアセチル化の評価を、免疫沈降法で検討する。

(6) 不全心における核内 HMGB1 保持による心筋保護作用の評価

大動脈縮窄術を野生型マウスと HMGB1-Tg マウスに行い、心不全マウスを作成する。心機能の評価はすでになされており、HMGB1 の心機能は優位に保たれていた。そこで、心筋細胞の DNA 障害、apoptosis に与える効果について検討する。DNA 障害は 8-OHdG 抗体を用いた免疫染色法で行う。apoptosis の評価は、TUNEL assay を行い検討する。

(倫理面への配慮)

遺伝子導入や遺伝子改変マウスの輸送、飼育・管理は、山形大学組み換え DNA 実験安全管理規則に従い、許可を取得後に行なっている。また実験は施設の取り決めに従い、廃棄物の物理的封じ込めを徹底している。心不全患者の研究プロトコルは山形大学医学部倫理委員会で承認を受けて、患者からは文書で同意を得ている。

4. 研究成果

ヒト心筋生検サンプルで HMGB1 の局在について免疫染色法を用いて検討を行なったところ、心機能を保持した心筋では HMGB1 が核内で染色される一方で、心不全に陥った心筋では HMGB1 が核内で染色されないことを見出した。

大動脈縮窄術後のマウス心臓において HMGB1 の局在変化を Western blotting 法で検討を行った。ヒト心筋生検サンプルで推測されたのと同様に核内の HMGB1 が細胞質へ局在変化していた。また、免疫沈降法で、HMGB1 の翻訳後修飾をけんとうしたところ、TAC により核内 HMGB1 はアセチル化を受けていることを見出した。この現象は、LPS 投与後のマウス心臓でも認められた。

培養心筋細胞を用いた検討では、Endothelin-1, Angiotensin II, LPS, 刺激により時間依存性に HMGB1 はアセチル化を受けていることを見出した。また、Endothelin-1, Angiotensin II 投与によって、核内 HMGB1 が細胞質へ局在変化をしていることを明らかにした。

核内 HMGB1 の意義を明らかにするために、HMGB1 の transfection を行い、肥大刺激に対する胎児型遺伝子発現の検討を行った。Endothelin-1, Angiotensin II によって BNP-luc, ANP-luc 活性は亢進するが、HMGB1 の transfection によりこれらの亢進が抑制されていた。さらに、Si-RNA HMGB1 を用いて、培養心筋細胞の HMGB1 発現を欠失させると、Endothelin-1 や Angiotensin II による ANP-luc, BNP-luc 活性の上昇がさらに上昇しており、BNP 遺伝子発現も優位に亢進していた。

心臓特異的 HMGB1 過剰発現マウスでは、野生型マウスに比べ TAC 後の心機能の低下が抑制されており、心臓リモデリングが抑制されていることを明らかにした。

(考察)

これまで、我々は、梗塞心筋細胞から遊離した HMGB1 が心保護作用を有することを報

告したが、核内における HMGB1 の役割は明らかとなっていなかった。今回の検討では、大動脈縮窄術による圧負荷や神経体液性因子 Angiotensin II, Endothelin-1 刺激によって、核内の HMGB1 が核外へ局在変化をきたし、その結果ヌクレオソームの構造や転写因子活性に關与する結果胎児型遺伝子発現が亢進し心機能の低下が進展する可能性を明らかにした。これらのことは、レニンアンジオテンシンアルドステロンの抑制や交感神経活性の抑制による心不全進展予防とは異なった新しい治療法の開発の基盤研究となると考えられ、引き続きその詳細なメカニズムの解明が必要である。

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 48 件)

Netsu S, Shishido T, Kitahara T, Honda Y, Funayama A, Narumi T, Kadowaki S, Takahashi H, Miyamoto T, Arimoto T, Nishiyama S, Watanabe T, Woo CH, Takeishi Y, Kubota I. Midkine exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443:205-210. 査読有

Katoh S, Honda S, Watanabe T, Suzuki S, Ishino M, Kitahara T, Funayama A, Netsu S, Sasaki T, Shishido T, Miyamoto T, Sadahiro M, Kubota I. Atrial endothelial impairment through Toll-like receptor 4 signaling causes atrial thrombogenesis. *Heart Vessels.* 2014;29: 263-272. 査読有

Sasaki T, Shishido T, Kadowaki S, Kitahara T, Suzuki S, Katoh S, Funayama A, Netsu S, Watanabe T, Goto K, Takeishi Y, Kubota I. Diacylglycerol kinase α exacerbates cardiac injury after ischemia/reperfusion. *Heart Vessels.* 2014;29:110-118. 査読有

Funayama A, Shishido T, Netsu S, Narumi T, Kadowaki S, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe J, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I. Cardiac nuclear high mobility group box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2013;99: 657-664. 査読有

Otaki Y, Watanabe T, Shishido T, Takahashi H, Funayama A, Narumi T, Kadowaki S, Hasegawa H, Honda S, Netsu S, Ishino M, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Konta T, Kubota I. The impact of renal tubular damage, as assessed by urinary

β 2-microglobulin-creatinine ratio, on cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2013;6:662-668. 査読有

Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Ishino M, Kitahara T, Sasaki T, Katoh S, Otaki Y, Watanabe T, Shibata Y, Mantovani A, Takeishi Y, Kubota I. Long Pentraxin PTX3 Exacerbates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Dysfunction. *PLoS One.* 2013;8:e53133. 査読有

〔学会発表〕(計 120 件)

Narumi T, Kubota I et al, Cardiac-specific overexpression of high-mobility group box 1 attenuates cardiovascular apoptosis and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of doxorubicin cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Dallas; 16-20 Nov 2013 USA, (Dallas Convention Center)

Kadowaki S, Shishido T, Narumi T, Kubota I et al.,: Multiple kidney biomarkers can risk-stratify chronic heart failure patients. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 3-7 Nov 2012; Los Angeles USA, (Los Angeles Convention Center)

Sasaki S, Tamura H, Watanabe T, Kubota I et al.,: Left atrial ejection fraction is a feasible parameter to predict poor prognosis in patients with heart failure and sinus rhythm. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 3-7 Nov 2012; Los Angeles USA, (Los Angeles Convention Center)

Katoh S, Shishido T, Arimoto T, Kubota I et al.,: Combination of iodine-123-meta-iodobenzylguanidine imaging and heart-type fatty acid binding protein for risk stratification in heart failure with preserved ejection fraction. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 3-7 Nov 2012; Los Angeles USA, (Los Angeles Convention Center)

Narumi T, Shishido T, Kadowaki S, Kubota I et al.,: Cardiac-specific overexpression of high-mobility group box 1 protects cardiomyocyte from apoptosis during the pathogenesis of doxorubicin cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 3-7 Nov 2012; Los Angeles USA, (Los Angeles Convention Center)

〔図書〕(計 1 件)

渡邊哲, 久保田功 南江堂 循環器疾患最新の治療 2014、528 (424-426)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久保田 功 (KUBOTA, Isao)
山形大学・医学部・教授
研究者番号 : 30161673

(2)研究分担者

宍戸 哲郎 (SHISHIDO, Tetsuro)
山形大学・医学部・助教
研究者番号 : 60400545