

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890094

研究課題名(和文) 心臓リモデリングに関わる lincRNA の機能の解明

研究課題名(英文) Investigations for lincRNA functions involved in cardiac remodeling.

研究代表者

桑原 康秀 (Kuwabara, Yasuhide)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：60632099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は心肥大・心不全に関与する非コーディングRNAの一つである lincRNA に着目した研究である。我々は網羅的解析により、心肥大・心不全マウスモデルにおいて有意に上昇する lincRNA を 3 つ同定しており、本研究で詳細に機能を検討した。まず、3 つの lincRNA を心筋細胞に過剰発現すると肥大が誘導された。また 2 つの過剰発現では肥大マーカーの有意な上昇も認めた。一方 1 つの lincRNA と microRNA との結合を評価したところ、肥大を抑制する microRNA と結合することを見だし、またサイクリン蛋白の有意な上昇を認めた。本研究で、lincRNA が心肥大に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on the lincRNAs, a non-coding RNA, which may be involved in cardiac hypertrophy. We screened lincRNAs which were upregulated in mouse heart subjected to transverse aortic constriction, and identified three lincRNAs. In the present study, we tried to clarify the functions of the lincRNAs. Firstly, we overexpressed the lincRNAs in neonatal mouse cardiomyocytes, and found that cardiomyocyte hypertrophy was induced. Also, we demonstrated that ANP and BNP, markers of cardiac hypertrophy, were significantly increased when the two lincRNAs were overexpressed. Furthermore, we sought to evaluate whether a lincRNA bound to microRNAs. We found that lincRNA could bind to some microRNAs that play inhibitory role to hypertrophy. Finally, we revealed that protein level of cyclin was significantly increased in neonatal cardiomyocytes overexpressed the lincRNA. These results indicate that lincRNAs may be involved in cardiac hypertrophy.

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：循環器内科学 分子細胞生物学 非コーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 心疾患は現在の日本の死亡原因では、悪性新生物に次いで第2位であり、生活習慣病の患者数増加や人口の高齢化に伴い、今後ますます増加すると予想される。心疾患の中でも心不全は、高血圧や心筋梗塞といった心血管疾患を背景とし、心臓の機能低下により全身臓器に必要な血液を供給できないという状態である。呼吸困難や浮腫等が出現するため、頻回の入院加療が必要となり、最終的には死に至る循環器領域における最終的な病態で、その予後は満足できるものとは言い難い。また心肥大は、高血圧等により心臓の壁厚が増加した状態で、無治療で経過観察すると心不全に陥るため、心不全の前段階ともいえる。この様に心不全への進行には心室壁肥厚と心室内径の拡大という、いわゆる心臓リモデリングが重要な病態であると考えられている。

心臓を構成する細胞の中で、特に重要な働きを持つ心筋細胞について考えると、これまで心臓リモデリングの過程で生じる分子メカニズムは、ゲノム DNA にコードされた約3万弱の遺伝子から作られるタンパク質の視点から多くの知見が得られている。機械的刺激、サイトカインやGタンパク結合型受容体等により細胞内にシグナルが伝わり、核内でいくつかの転写因子が活性化することで、心肥大を引き起こす様々な遺伝子の発現が増加すると考えられている。

(2) しかしヒトゲノムの中で、タンパク質をコードしている遺伝子領域は、ゲノム全体のわずか数%を占めるのみであり、近年タンパク質をコードしない領域からも RNA が積極的に転写されていることがわかってきた。その領域から転写される RNA は、タンパク質をコードしない RNA ということから非コーディング RNA と呼ばれている。非コーディング RNA の中で、近年積極的に研究されているものの1つに、22塩基程度の microRNA (miRNA 又は miR) がある。miRNA は進化の過程でよく保存されており、miR-1 というように数字を付けて呼ばれている。その機能はターゲットとなるメッセンジャー RNA と結合することによる、翻訳の抑制である。我々はこれまで循環器疾患における miRNA の機能について検討を重ねており、右図のように心筋細胞において miR-27a が心肥大に関与していること (Nishi H, Kuwabara Y, et al. *Mol Cell Biol.* 2011) や、miR-33 がコレステロール代謝に関係していること (Horie T, Kuwabara Y, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010) 等を報告してきた。miRNA はすでに治療対象となりつつあり、米国などでは疾患に関与する内因性の miRNA をターゲットとして、ヒトを対象に臨床治験が行われている。また miRNA は細胞内のみならず、血中にも存在しており、我々は患者血清において、筋肉特異的な miR-133a の上昇は心筋障害を示唆し、診断に用いるこ

とが可能であることを報告した (Kuwabara Y, et al. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011)。

(3) 一方で、非コーディング RNA には miRNA のような小さな RNA だけではなく、200塩基以上の長鎖非コーディング RNA の存在も知られている。近年長鎖非コーディング RNA の中でも、既知の遺伝子と遺伝子の間 (Intergenic) から転写される Long intergenic non-coding RNA (lincRNA) は、種を超えて保存されており、1000以上の種類が存在することが報告された。更にその lincRNA の中には、幹細胞の多能性の維持に重要な働きを持つものも存在した (Guttmann M, et al. *Nature.* 2009)。しかし現在のところ、循環器疾患における lincRNA の発現変化や機能は全くわかっていない。microRNA が生体内で多彩な機能を有するように、同じ非コーディング RNA である lincRNA も重要な働きを持っているであろうことは想像に難しくなく、これまでの我々の microRNA の成果を lincRNA の研究に展開できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、lincRNA に着目し、心臓リモデリングの病態解明を目的とする研究である。本研究開始時には既に、網羅的に発現変化を評価可能であるマイクロアレイを用いて、マウス心臓圧負荷モデルの心臓リモデリングの過程において変化する lincRNA のスクリーニングを終了し、2倍以上増加する lincRNA を lincRNA-Heart Failure (lincRNA-HF) と名付けていた。更にリアルタイム PCR により、実際に有意に増加していた lincRNA-HF を3つ同定していた。また、RACE法を行うことにより、転写開始部位と polyA 部位を同定し、全長のクローニングに成功していた。その3つの lincRNA-HF について、細胞レベルと生体内での機能解析を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) lincRNA-HF の生体内における機能の解析
着目する lincRNA の中で、1つはゲノム上でマウスからヒトまでよく保存されており、その lincRNA-HF について、ノックアウトマウスを作成する。

(2) 培養細胞を用いて、lincRNA-HF の細胞内での機能を解析する。

培養心細胞に、アンジオテンシン やフェニレフリンなどの肥大刺激を行い、lincRNA-HF 発現量が変化するかをリアルタイム PCR にて測定する。

培養心筋細胞における lincRNA-HF の機能を検討する。

レンチウイルスを用いて、心筋細胞において lincRNA-HF を過剰発現し、免疫染色等を用いて培養心筋細胞の形態学的変化を評価する。

また RNA を抽出し、リアルタイム PCR で肥大マーカーの変化を定量する。さらに lincRNA-HF を RNAi で発現抑制し、肥大マーカー発現をリアルタイム PCR やウエスタンブロッティングにて測定する。これらの実験により、lincRNA-HF が心筋細胞において肥大シグナルに参与しているかが解明できると考える。

培養細胞における lincRNA-HF の機能の探索

lincRNA の機能として、miRNA と結合することでその機能を抑制し、メッセンジャーRNA の翻訳を制御することも報告されている (Cesana M, et al. *Cell*. 2011)。lincRNA-HF と miRNA とが結合するか調べるために、ルシフェラーゼの下流に lincRNA-HF をつないだコンストラクトを作製し、miRNA との共発現によりルシフェラーゼ活性が低下するかを評価する。

心臓リモデリングに参与する microRNA はこれまでいくつか報告されているが、これらの miRNA と lincRNA が結合するなら、心臓リモデリングにおける lincRNA-miRNA 相互作用を初めて報告することができる。更に lincRNA が miRNA と結合するなら、その miRNA の target 遺伝子のタンパク発現が増加することが予想され、その評価もウエスタンブロッティングで行う。我々の研究室では、これまで miRNA の研究を行ってきたため、miRNA の過剰発現ベクターを 50 種類以上保有しており、本研究に生かすことができる。

(3)患者血清中の lincRNA-HF の発現レベルの測定。

我々は筋肉特異的な microRNA が心筋障害に伴い、血中に流出してくることを報告し、また放出された microRNA は他細胞によって取り込まれ、遺伝子発現を制御し得ることを示した (Kuwabara Y, et al. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011)。このように血中においても、RNA が安定して存在しており、すでに我々はいくつかの lincRNA も実際ヒト患者血清で測定可能であることを確認している。そのため、患者血清より RNA を抽出し、lincRNA-HF の発現量をリアルタイム PCR で測定する。もし血中で lincRNA-HF が定量可能ならば、生理活性を有する可能性や診断的な意義が評価できると考えられる。

4. 研究成果

(1) lincRNA-HF のノックアウトマウスの作成。

マウスからヒトまでゲノム上で、最もよく保存されている lincRNA-HF について、ノックアウトマウスを制作するために、ターゲティングベクターを作成した。今後、ES 細胞にインジェクションをする予定である。

(2) 培養細胞を用いて、lincRNA-HF の細胞内での機能を解析する。

肥大刺激による発現変化の評価
マウス心筋細胞を用いて、アンギオテンシン II やフェニレフリンの刺激を行ったところ、

濃度依存性に、3つの lincRNA-HF は有意な上昇を認めた (右図)。

lincRNA-HF の過剰発現による、心肥大マーカーの評価

3つの lincRNA-HF をマウスの新生仔心筋細胞に過剰発現させたところ、コントロールと比較し、有意な細胞面積の増加を認めた。また心肥大マーカーである ANF と BNP の mRNA レベルを評価したところ、3つのうち2つの lincRNA-HF の過剰発現で有意な上昇を認めた。

培養細胞における lincRNA-HF の機能の探索

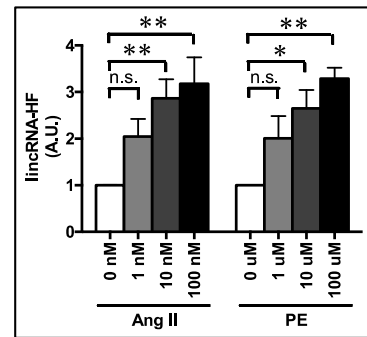
3つの lincRNA-HF の中で、着目している1つについて、microRNA との結合を評価した。過剰発現により、マウス新生仔心筋細胞で、心筋細胞肥大が誘導されたことから、肥大抑制の microRNA 結合することで、その機能を抑制することにより、心筋細胞肥大が誘導されるのではないかと仮説を立てた。着目する lincRNA-HF のレポータープラスミドを作成し、検討したところ、3つの心肥大を抑制する microRNA と結合することを見いだした。またウエスタンブロッティングにより、c-Myc → CyclinD2 の経路が、lincRNA-HF の過剰発現により活性化していることを発見した。

これらの結果は 2013 年 11 月にダラスで行われた米国心臓病学会の口頭発表に採択され、発表を行った

ただし、本当に心肥大を抑制する microRNA の機能を compete するかどうかは更なる検討が必要である。また機能喪失の系も現在のところ樹立できていない。機能喪失の系を確立するために、CRISPR-Cas システムを用いた系を立ち上げているところである。

(3) 患者血清の lincRNA-HF の発現レベルの測定

血清で測定する前に、ヒト心臓の RNA サンプルから cDNA を作成し、lincRNA-HF がヒトの心臓においても発現しているかどうかを検討した。しかし、リアルタイム PCR を用いた検討では発現は確認できなかった。測定できなかった可能性としては、プロモーター活性が、進化の過程で低下したか、消失した等の理由が考えられる。



ヒトの心臓における心肥大に關与する lincRNA を見つけようと現在検討を重ねているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2883.
2. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNAs and Lipoprotein Metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2013;21:17-22.
3. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K. MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc.* 2012;Dec 1:e003376.
4. Sowa N, Horie T, Kuwabara Y, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Kinoshita M, Takanabe-Mori R, Wada H, Shimatsu A, Hasegawa K, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 26b Encoded by the Intron of Small CTD Phosphatase (SCP) 1 Has an Antagonistic Effect on its Host Gene. *J Cell Biochem.* 2012;113:3455-65.

〔学会発表〕(計 9 件)

国際学会

1. Kuwabara Y, Izuhara M, Horie T, Watanabe S, Baba O, Usami S, Nakao T, Nishiga M, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. LincRNAs Regulated by Pressure-overload Induce Hypertrophy in Neonatal Mouse Ventricular Cardiomyocytes. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2013, November 16-20, Dallas, Texas, U.S.A.
2. Kuwabara Y, Izuhara M, Horie T, Watanabe S, Baba O, Usami S, Nakao T, Nishiga M, Nishino T, Kita T, Kimura T, Ono K. LincRNAs Regulated by Pressure-overload Induce Hypertrophy in Neonatal Mouse Ventricular Cardiomyocytes. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting. Metabolic Signaling & Disease: From Cell to Organism, 2013, August 13-17, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
3. Kuwabara Y, Sowa N, Takahiro H, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Hasegawa K, Kimura

T, Ono K. MicroRNA 26b encoded by the introns of small CTD Phosphatases (SCPs) 1 has an antagonistic effect on its host gene and suppresses cardiac hypertrophy. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting. Regulatory and non-coding RNA, 2012, August 28-September 1, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

国内学会

1. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe Shin, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Yuya Ide, Fumiko Nakazeki, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Cardiac Myocytes and High Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice Through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2014年3月21日-23日、東京国際フォーラム、東京
2. 桑原康秀、堀江貴裕、馬場理、出原正康、宇佐美俊輔、中尾哲史、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、木村剛、尾野巨。microRNA-451はLKB1-AMPK経路を抑制することで、ラット心筋細胞において細胞障害を、生体においては高脂肪食誘導性心肥大を誘導する。新学術領域 転写代謝システム 冬の若手ワークショップ 2014。2014年1月30日-2月1日、磯部、群馬
3. Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Cardiac Myocytes and High Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice Through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway. International Symposium on Transcription and Metabolism, 2013, November 11-13, Awaji, Hyogo.
4. 桑原康秀、尾野巨、堀江貴裕、ガーボル・バジヨー、渡邊真、馬場理、出原正康、宇佐美俊輔、中尾哲史、西賀雅隆、西野共達、井手裕也、中関典子、木村剛。循環器疾患におけるバイオマーカーとしての血清中microRNA。第115回日本循環器学会近畿地方会、平成25年6月15日、京都。
5. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Kinoshita M, Watanabe S, Nagao K, Baba O, Kita T, Kimura T. Elevated MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Acute Coronary Syndrome Indicate the Myocardial Damage. 第77回日本循環器学会学術集会、平成25年3月15-17日、横浜。
6. 桑原康秀。心血管疾患患者血清におけるmicroRNA-1とmicroRNA-133aの上昇は心筋傷害を示唆する。第49回日本臨床分子医

学会学術集会、平成24年4月13-14日、京都.

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 康秀 (KUWABARA, Yasuhide)

京都大学・医学（系）研究科・医員

研究者番号：60632099