

令和 3 年 10 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461114

研究課題名(和文) 長鎖 non-coding RNA による心不全病態形成制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of long non-coding RNA in pathological mechanism of heart failure.

研究代表者

宮田 敬士 (MIYATA, KEISHI)

熊本大学・生命科学研究部・特任准教授

研究者番号：50398228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子トラップ法により未知の長鎖non-coding RNA(lncRNA)のクローンの中から胎児期に心臓特異的に発現する複数のクローンを見出した。その中の1クローンのトラップベクター挿入部位はAK141659のintron領域に存在しており、そのクローンのホモマウスはAK141659欠損マウスであることを明らかにした。AK141659欠損マウスは野生型と比べ心臓組織及び心機能に関して明らかな表現型を認めなかった。心不全病態形成におけるAK141659の作用を検討するためAK141659欠損マウスを用いて横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作製し、心機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの個体を用いたlncRNAと心疾患の病態形成分子機構に関する解析は現在数少なく、この研究方法および結果は非常に貴重な成果になると期待される。本研究により細胞質に存在するlncRNAの新たな作用機構の解明だけでなく、種々の遺伝子改変マウスを用いることで生体の心臓における分子機構が明らかになると期待される。さらに、この心不全病態形成における細胞質lncRNAの基盤研究が、トランスレーショナルリサーチとして、心不全の予防医学に向けた新規治療法開発へと期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that embryonic cardiac specific expressed-clones among unknown long non-coding RNA (lnc RNA) clones using gene trap methods. In one clone of them, the trap vector was inserted into the intron site of lnc RNA AK141659 gene. We elucidated that its clone's homozygous mice were AK141659 KO mice. AK141659 KO mice did not exhibit significant differences in cardiac morphology and function compared with wild-type mice. To assess the role of AK141659 in pathological mechanism of heart failure, we operated transverse aorta constriction model (TAC) using AK141659 KO mice and analyzed the cardiac function of them.

研究分野：分子生物学

キーワード：non-coding RNA

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムのかなりの部分が転写され mRNA 以外に非常に多くの RNA が存在すると明らかになり、その中で比較的長い長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA; lncRNA) の発見が、最近続けて報告され、その役割について注目を集めている。lncRNA は、mRNA 同様 5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ A 鎖を持ち、スプライシングを受けるが、オープンリーディングフレームが見出されないことからタンパク質には翻訳されていないと考えられる RNA である。lncRNA のうち、コード領域との相対的な位置関係により分類され、特に遺伝子間に存在するものを large intergenic non-coding RNA (lincRNA) と総称され (Guttman, M *et al.*, *Nature*, 2009)、その機能については、広範な生理機能への関与が少数の例で報告されているが、大部分の lncRNA に関しては、ほとんど解明されていない。

本邦では超高齢化社会に伴って高血圧症に罹患する患者が増加し、それに起因する圧負荷心肥大の管理が重要な課題となっている。心肥大は生体の要求に応じた代償反応として生理的に重要な機構であるが、最終的には心不全という心機能破綻に繋がる現象と捉えられる。現在、心不全の 5 年生存率は平均して 50-60% と依然として非常に予後不良の症候群である。この心不全の病態形成には心筋肥大、アポトーシス、線維化といった心筋リモデリングが重要な役割を持っている事が明らかになっており、心肥大の病態形成に関わる分子機構やその促進因子の解明が進んでいるものの、抑制因子に関する情報は極めて少なく、lncRNA の関連した研究についてはほとんど行われていない。

申請者は本研究にて、変異 lox を用いることによりレポーター遺伝子を任意の遺伝子に変換可能な可変型遺伝子トラップ法により単離されたクローンの中で、未知の lncRNA のクローンの中から胎児期に心臓特異的に発現する複数クローンを認めた。その中の 1 クローンについて解析し、トラップベクター挿入配列は lncRNA である AK141659 領域のイントロン部に挿入されており、さらにそのクローンのホモマウスは AK141659 RNA の検出を認めず、AK141659 欠損であることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

胎児期より心臓に豊富に発現している lncRNA AK141659 と心不全病態形成との関連を明らかにし、心不全の新規治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

### 3. 研究の方法

AK141659 欠損マウスを用いて AK141659 の心臓における解析を行い、また、AK141659 に関する種々の遺伝子改変マウス作製し、表現型の解析及び横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作製し、心不全病態形成における AK141659 の機能解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) AK141659 の発現解析:

AK141659 の発現解析についてはトラップベクターに含まれる  $\beta$ -geo 遺伝子を利用した X-gal 染色により、マウス心臓組織の心室、心房共に発現を認めた。 $\alpha$ MHC-EGFP Tg マウスの心臓組織を用いて心筋細胞 (GFP 陽性) と非心筋細胞 (GFP 陰性) に分離し、qRT-PCR 解析を行ったところ、非心筋細胞の発現は非常に低く、心筋細胞に多く認められた。さらに AK141659 の細胞内局在を調べるために、核と細胞質の RNA を分離し qRT-PCR 解析を行った所、AK141659 は心臓組織において核内よりも細胞質に高発現を認めた。これを検証するため AK141659 に特異的に結合する複数の蛍光プローブを作製し、このプローブと C2C12 細胞株を用いて FISH 解析を行ったところ AK141659 の細胞内の局在は、核内ではなく細胞質に存在することを認めた。以上より、AK141659 は心筋細胞の細胞質に存在する lncRNA であることが明らかとなった。

#### (2) AK141659 に関連した遺伝子改変マウスの作製とその表現型の解析:

AK141659 欠損マウスとその同腹仔野生型を 16 週齢まで経時的に観察したが、心臓の形態および血圧に関しては、明らかな差異を認めなかった。AK141659 は心臓発生に関与していないと考えられた。病態における AK141659 の関与を検討するために、AK141659 欠損マウスを用いて圧負荷心不全モデルを作製し、経時的に動物用心エコー測定による心機能解析を行った。術後 4 週において AK141659 欠損マウスは野生型に比べ、明らかな心機能低下を認め、さらに術後の生存率の明らかな低下を認めた。心筋細胞において AK141659 の心保護作用の可能性が示唆されたため、CAG プロモーター (全身性) および  $\alpha$ MHC プロモーター (心筋細胞特異的) による AK141659 強制発現マウスを作製した (CAG-AK141659 Tg、 $\alpha$ MHC-AK141659 Tg)。両ラインを用いて圧負荷心不全モデルを作製したところ、いずれのラインにおいても同腹仔の野生型に比べ、心機能低下の明らかな抑制を認め、心筋における AK141659 が心保護作用を有することが示唆された。

#### (3) AK141659 と相互作用する分子の網羅的解析:

細胞質に存在する AK141659 と相互作用を認める分子を探索するため、AK141659 欠損マウスおよび全身性 AK141659 強制発現 Tg マウスの心臓組織を用いてプロテオーム解析を行った結果、変動を認める遺伝子を複数同定した。その中で最も変動を認める Hint1 遺伝子は、AK141659 欠損マウスの心臓において Hint1 mRNA の発現変化を認めないものの、Hint1 タンパク発現の明らかな上昇を認めた。逆に、全身性 AK141659 強制発現 Tg マウスの心臓においては Hint1 mRNA の発現変化を認めなかったが、Hint1 タンパク発現の明らかな低下を認めた。このことから AK141659 は

Hint1 の発現レベルを転写ではなく翻訳制御により抑制していることが示唆された。

## 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 24 件)

1. Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. Tian Z, Miyata K, Tazume H, Sakaguchi H, Kadomatsu T, Horio E, Takahashi O, Komohara Y, Araki K, Hirata Y, Tabata M, Takanashi S, Takeya M, Hao H, Shimabukuro M, Sata M, Kawasuji M, Oike Y. *J Mol Cell Cardiol.* **2013**;57:1-12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.004. (査読あり)
2. A molecular clock regulates angiopoietin-like protein 2 expression. Kadomatsu T, Uragami S, Akashi M, Tsuchiya Y, Nakajima H, Nakashima Y, Endo M, Miyata K, Terada K, Todo T, Node K, Oike Y. *PLoS One.* **2013**;8(2):e57921. doi: 10.1371/journal.pone.0057921. (査読あり)
3. Angiopoietin-like protein 2 is a potent hemangiogenic and lymphangiogenic factor in corneal inflammation. Toyono T, Usui T, Yokoo S, Kimakura M, Nakagawa S, Yamagami S, Miyata K, Oike Y, Amano S. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2013**;54(6):4278-85. doi: 10.1167/iovs.12-11497. (査読あり)
4. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. Mederle K, Schweda F, Kattler V, Doblinger E, Miyata K, Höcherl K, Oike Y, Castrop H. *Crit Care.* **2013**;17(4):R130. doi: 10.1186/cc12809. (査読あり)
5. Ecsr regulates insulin sensitivity and predisposition to obesity by modulating endothelial cell functions. Akakabe Y, Koide M, Kitamura Y, Matsuo K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Miyata K, Oike Y, Ikeda K. *Nat Commun.* **2013**;4:2389. doi: 10.1038/ncomms3389. (査読あり)
6. Angiopoietin-like protein 2 accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Ogata A, Horiguchi H, Odagiri H, Masuda T, Fukushima S, Jinnin M, Hirakawa S, Sawa T, Akaike T, Ihn H, Oike Y. *Mol Cancer Res.* **2014**;12(2):239-49. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0336. (査読あり)
7. Treatment of onychomycosis using a 1064nm Nd:YAG laser. Noguchi H, Miyata K, Sugita T, Hiruma M, Hiruma M. *Med Mycol J.* **2013**;54(4):333-9. (査読あり)
8. The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin  $\alpha 5\beta 1$ , p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, Miyamoto T, Kobayashi E, Miyata K, Aoi J, Horiguchi H, Nishimura N, Terada K, Yakushiji T, Manabe I, Mochizuki N, Mizuta H, Oike Y. *Sci Signal.* **2014**;7(309):ra7. doi: 10.1126/scisignal.2004612. (査読あり)
9. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2014**;34(4):790-800. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303116. (査読あり)
10. Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, Oike Y. *Int J Biol Markers.* **2014** 30;29(3):e239-45. doi: 10.5301/jbm.5000080. (査読あり)
11. Effects of Seijo-bofu-to, a traditional Japanese herbal medicine containing furanocoumarin derivatives, on the drug-metabolizing enzyme activities in healthy male volunteers. Saruwatari J, Takashima A, Yoshida K, Soraoka H, Ding TB, Uchiyashiki Y, Tsuda Y, Imamura M, Oniki K, Miyata K, Nakagawa K. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2014**;115(4):360-5. doi: 10.1111/bcpt.12224. (査読あり)
12. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. *Cell Metab.* **2014**;19(4):712-21. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.006. (査読あり)
13. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knockout mice exhibit enhanced energy expenditure through thermogenesis. Hanaoka Y, Yasuda O, Soejima H, Miyata K, Yamamoto E, Izumiya Y, Maeda N, Ohishi M, Rakugi H, Oike Y, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H. *PLoS One.* **2014**;9(4):e94930. doi: 10.1371/journal.pone.0094930. (査読あり)

- あり)
14. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y. *Trends Endocrinol Metab.* **2014**;25(5):245-54. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.012. (査読あり)
  15. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M. *Cell Metab.* **2014**;20(1):119-32. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002. (査読あり)
  16. Protection afforded by pre- or post-treatment with 4-phenylbutyrate against liver injury induced by acetaminophen overdose in mice. Shimizu D, Ishitsuka Y, Miyata K, Tomishima Y, Kondo Y, Irikura M, Iwawaki T, Oike Y, Irie T. *Pharmacol Res.* **2014**;87:26-41. doi: 10.1016/j.phrs.2014.06.003. Erratum in: *Pharmacol Res.* **2014**;89:57-58. doi: 10.1016/j.phrs.2014.06.003. (査読あり)
  17. IRAP deficiency attenuates diet-induced obesity in mice through increased energy expenditure. Niwa M, Numaguchi Y, Ishii M, Kuwahata T, Kondo M, Shibata R, Miyata K, Oike Y, Murohara T. *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**;457(1):12-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.071. (査読あり)
  18. Clinical features of 80 cases of tinea faciei treated at a rural clinic in Japan. Noguchi H, Jinnin M, Miyata K, Hiruma M, Ihn H. *Drug Discov Ther.* **2014**;8(6):245-8. doi: 10.5582/ddt.2014.01049. (査読あり)
  19. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. Wei FY, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, Koga Y, Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K. *Cell Metab.* **2015**;21(3):428-42. doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.019. (査読あり)
  20. Tinea nigra showing a parallel ridge pattern on dermoscopy. Noguchi H, Hiruma M, Inoue Y, Miyata K, Tanaka M, Ihn H. *J Dermatol.* **2015**;42(5):518-20. doi: 10.1111/1346-8138.12830. (査読あり)
  21. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, Odagiri H, Kadomatsu T, Nakamura T, Tanoue H, Ito H, Yugami M, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Iwase H, Mizuta H, Oike Y. *Sci Rep.* **2015** ;5:9170. doi: 10.1038/srep09170. Erratum in: *Sci Rep.* **2015**; 5:9789. doi: 10.1038/srep09170. (査読あり)
  22. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schütz G, Takeda S, Tanaka H. *Nat Commun.* **2015**;6:6693. doi: 10.1038/ncomms7693. (査読あり)
  23. The exacerbating roles of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the preventive effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against pulmonary fibrosis in mice. Tanaka Y, Ishitsuka Y, Hayasaka M, Yamada Y, Miyata K, Endo M, Kondo Y, Moriuchi H, Irikura M, Tanaka K, Mizushima T, Oike Y, Irie T. *Pharmacol Res.* **2015**;99:52-62. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.004. (査読あり)
  24. Angiotensin-like protein 2 increases renal fibrosis by accelerating transforming growth factor- $\beta$  signaling in chronic kidney disease. Morinaga J, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Tian Z, Sugizaki T, Tanigawa H, Zhao J, Zhu S, Sato M, Araki K, Iyama K, Tomita K, Mukoyama M, Tomita K, Kitamura K, Oike Y. *Kidney Int.* **2016** ;89(2):327-41. doi: 10.1016/j.kint.2015.12.021. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計1件)  
宮田敬士、病的血管リモデリングにおける血管周囲脂肪組織由来 Angptl2 の役割、第 23 回日本血管生物医学会学術集会、2015 年 12 月 11 日、兵庫県神戸市
- 〔図書〕(計1件)  
1. 宮田敬士、尾池雄一  
Angptl2 (第 11 節)  
第 4 章 慢性炎症関連因子  
**series モデル動物利用マニュアル**  
**疾患モデルの作製と利用 脂質代謝異常と関連疾患 下巻** 118-125 ,2015(分担)  
株式会社エル・アイ・シー
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

宮田 敬士 (MIYATA, Keishi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任准教授

研究者番号：50398228

### (2)研究分担者

荒木 喜美 (ARAKI, Kimi)

熊本大学・生命資源研究支援センター・教授

研究者番号：90211705

### (3)連携研究者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90312321