

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461469

研究課題名(和文) 膠原病性肺高血圧症における新規治療法開発の分子基盤の構築

研究課題名(英文) Development of the molecular basis of novel therapeutic strategy for connective tissue disease-associated pulmonary hypertension

研究代表者

吉川 賢忠 (Yoshikawa, Noritada)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膠原病の難治性合併症の一つである肺高血圧症(PH)は致死性の右心肥大/右心不全を発症する。本研究では、右心肥大制御に基づいた新規膠原病性PH治療法開発の分子基盤を構築することを目的とした。

転写伸長反応促進因子P-TEFbの活性を抑制するHEXIM1の心筋細胞での過剰発現は、低酸素誘導性PHマウス、ブレオマイシン誘導性肺線維症-PHマウスにおいて、心筋細胞における細胞肥大抑制、心肥大関連遺伝子発現抑制、低酸素誘導因子HIF-1の蛋白発現とその標的遺伝子発現の抑制、心室壁血管新生抑制、により右心肥大発症を抑制した。従って、HEXIM1は膠原病性PHの新規治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To develop novel therapeutic strategies for connective tissue disease (CTD)-associated pulmonary hypertension (PH), we hypothesized that direct interruption of fatal right ventricular hypertrophy (RVH)/RV remodeling improves their prognosis.

We investigated that overexpression of HEXIM1, which suppresses positive transcription elongation factor b-dependent transcription, prevents cardiomyocyte hypertrophy and hypertrophic genes expression, and that cardiomyocyte-specific HEXIM1 transgenic mice (HEXcTg) ameliorates RVH in hypoxia-induced PH model. Moreover, we revealed that overexpression of HEXIM1 prevented hypoxia-induced expression of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) protein and its target genes in cardiomyocytes, and that HEXcTg repressed RV myocardial angiogenesis in hypoxia-induced PH model. We further investigated that HEXcTg could prevent RVH of bleomycin-induced PH/RVH model. Thus, HEXIM1 would be a molecular target for mitigating CTD-associated PH and RVH/RV remodeling.

研究分野：医歯薬学、内科系臨床医学・膠原病学、内分泌・代謝学、分子生物学

キーワード：膠原病 肺高血圧症 右心肥大 右心不全 心臓リモデリング HEXIM1 P-TEFb HIF-1

1. 研究開始当初の背景

膠原病性PHは多彩な病因による右心負荷の増大によって非可逆的右心肥大、右心不全を招来する致死性難治性疾患である。近年、免疫抑制療法の進展や肺血管拡張作用を有する新規PH治療薬の導入により、患者の予後が改善されつつあるが(Nakanishi N, *Allergol Int*, 2011)、他の原因によるPHに比し膠原病性PHの予後はいまだ不良であり、新しい視点からの治療法開発が強く望まれている。ここで近年、病的持続的な心負荷に対する生体の適応現象である心肥大を中心とした心臓リモデリングが、心不全発症・進展の本態であることを示唆する報告が相次ぎ(Esposito G, *Circulation*, 2002; Yamaguchi O, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; Xu D, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; Hedhli N, *Am J Physiol*, 2008)、とくに心肥大に関与する細胞内シグナル伝達経路や転写因子が数多く同定され、それらをターゲットにした心不全治療法開発が注目を集めている(Shah AM, *Lancet*, 2011)。したがって、膠原病性PHにおける右心肥大/右心不全進展の病態を明らかにし、右心肥大を標的とした膠原病性PH-右心肥大/右心不全治療の意義を明確にすることで、右心肥大制御に基づく新規膠原病性PH治療方法を開発できる可能性がある。

膠原病性PH患者の特徴のひとつに、強力な血管収縮、血管平滑筋増殖、心筋細胞肥大誘導作用を有するエンドセリン-1(ET-1)血中濃度の増加が知られ、ET受容体拮抗薬は膠原病性PH治療の中心薬剤の一つでもある(Mayes MD, *Arthritis Rheum*, 2003)。ここで、連携研究者の慶應義塾大学医学部循環器内科学 佐野らは、ET-1刺激、圧負荷、Gqやカルシニューリン活性化などの心肥大誘導刺激は、いずれもRNAポリメラーゼII(RNAPII)依存性の転写伸長反応

を促進する因子P-TEFbを活性化して心肥大を誘導すること、P-TEFbの恒常的活性化マウスは左心肥大を呈すること、などを明らかにし、P-TEFbが左心肥大進展のカギ分子のひとつであることを示した(Sano M, *Nat Med*, 2002)。一方、研究代表者らが先導して解析を進めてきた核蛋白質HEXIM1はP-TEFbと複合体を形成してその活性を抑制することが明らかとなった(Ouchida, *Genes Cells*, 2003; Shimizu N, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; Yoshikawa N, *BBRC*, 2008)。また、ET-1による心筋細胞刺激はHEXIM1をP-TEFbから解離させてP-TEFbを活性化すること、HEXIM1ノックアウトマウスは胎児期初期に左心肥大を呈し胎生致死であること、HEXIM1ヘテロ接合体ノックアウトマウスはP-TEFb過活性化状態において野生型マウスに比し著明な左心肥大を呈すること、などが明らかになった(Huang F, *Mech Dev*, 2004; Espinoza-Derout J, *Cardiovasc Res*, 2007, *Circ Res*, 2009)。したがって、HEXIM1はET-1などの心肥大誘導刺激に対し、P-TEFbの抑制作用を介して心肥大を抑制する分子である可能性が示唆された。

そこで研究代表者らは、HEXIM1を過剰発現させた培養心筋細胞を用いた解析を進め、HEXIM1はET-1によるANPなどの心肥大関連遺伝子の発現や細胞肥大の誘導を抑制することを明らかにした。また、心筋選択的HEXIM1トランスジェニックマウス(HEXcTg)は、低酸素飼育によるPHを発症するが右心肥大発症は抑制されることを明らかにした(Yoshikawa N, *PLoS One*, 2012)。したがって、研究代表者らの成果により、HEXIM1はPH-右心肥大病態にも働きうる心肥大抑制分子である可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

膠原病性 PH-右心肥大-右心不全病態における HEXIM1 の意義を明らかにし、HEXIM1 を標的とした右心肥大制御に基づいた新規膠原病性 PH 治療法開発の分子基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

培養心筋細胞に HEXIM1 野生型 (wt)・変異体 (mt) 過剰発現・ノックダウンアデノウイルスシステムを導入し、ET-1 や低酸素刺激に対する細胞応答に与える HEXIM1 の影響を分子生物学的手法を用いて詳細に明らかにする。

HEXIM1 過剰発現・ノックダウンアデノウイルス・AAV システムおよび心筋選択的 HEXIM1 Tg マウス (野生型 HEXcTg、変異型 HEXmt) を用い、PH-右心肥大誘導時の両心構造、病理、機能、生命予後の変化に与える HEXIM1 の影響とその分子機構を明らかにする。

PH-右心肥大誘導には低酸素下飼育マウスモデル (低酸素誘導 PH モデル)、ブレオマイシン処理マウスモデル (肺線維症/PH モデル)、Fra-2 Tg マウスモデル (強皮症-PH モデル)、モノクロタリン処理ラットモデルを用いて解析をすすめる。その際、右室心筋選択的 HEXIM1 発現制御方法を確立し、新規 HEXIM1 発現誘導薬の探索も開始する。

4. 研究成果

【研究の主な成果】

(1) HEXIM1 遺伝子改変マウスの確立

既に構築していた HEXcTg マウスに加え、P-TEFb 抑制活性を消失した HEXIM1 変異体 Tg マウスである HEXmt マウスを確立した。

(2) 低酸素誘導 PH モデルの解析

野生型 (WT) マウス、HEXcTg マウス、HEXmt マウスを用いた解析により、

低酸素飼育により WT、HEXcTg、HEXmt いずれも PH に合致した肺動脈の病理学的変化が誘導され、ET-1 の肺における mRNA 発現や血漿濃度が増加し、右室圧が上昇した。

低酸素飼育により WT、HEXmt の右室/(左室+中隔)重量比が増加したが HEXcTg では増加しなかった。

低酸素飼育により WT、HEXmt では右室壁内の血管新生が増加していたが、HEXcTg では増加していなかった。

低酸素飼育により WT、HEXcTg、HEXmt ともに心室壁血管周囲の線維化が誘導されたが有意な差は認められなかった。

(3) 肺線維症-PH モデルの解析

ブレオマイシン処理により WT、HEXcTg、HEXmt いずれも肺線維症が誘導され、PH に合致した肺動脈の病理学的変化が誘導され、右室圧が上昇した。

ブレオマイシン処理により WT、HEXmt の右室/(左室+中隔)重量比が増加したが HEXcTg では増加しなかった。

(4) 培養細胞の解析

HEXwt あるいは HEXmt、siHEX 発現アデノウイルス感染心筋細胞を各種条件下で培養・解析し、

ET-1 による細胞肥大の誘導は HEXwt の過剰発現により抑制されたが、HEXmt は影響を与えなかった。

ET-1 による心肥大マーカー遺伝子の mRNA 発現誘導は、HEXwt の過剰発現により抑制されたが、HEXmt は影響を与えなかった。

ET-1 による RNAPII の活性化誘導は HEXwt の過剰発現により抑制されたが、HEXmt は影響を与えなかった。

ET-1 による ERK1/2、JNK、p38MAPK、S6K1 の活性化誘導に HEXIM1 は影響を与えなかった。

低酸素下培養による HIF-1 の蛋白質発現増加は HEXwt の過剰発現によって抑制されたが、HEXmt は影響を与えなかった。

低酸素下培養による HIF-1 の標的遺伝子 VEGF や LDH などの mRNA 発現増加は HEXwt の過剰発現によって抑制されたが、HEXmt は影響を与えなかった。

肺高血圧症治療薬である PGI2 刺激により HEXIM1 蛋白質発現が増加した。

ET-1 による細胞肥大の誘導は PGI2 により抑制されるが、HEXIM1 ノックダウン下では PGI2 の細胞肥大抑制効果は減弱した。

HEXIM1 蛋白質発現誘導薬の候補薬剤を同定した。

(5) Fra2-HEXIM1 ダブル Tg マウスの作製

Fra-2 Tg マウスを HEXcTg、HEXmt マウスと交配し、Fra2-HEXIM1 ダブル Tg マウスを作製し、上記と同様の解析を進めた。

【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望】

本研究により、心筋細胞における HEXIM1 の過剰発現が、低酸素刺激、ET-1 刺激、肺線維症性の動脈圧負荷などによる右心肥大の誘導を抑制することが世界で初めて明らかになった。その分子機構として、HEXIM1 は P-TEFb、HIF-1 などの転写制御因子の抑制を介し、心臓リモデリング関連遺伝子の発現誘導や VEGF などを経た血管新生誘導を抑制する可能性が示された。また、既に汎用されている PGI2 などの PH 治療薬の作用機序の一つに心筋における HEXIM1 発現誘導作用が存在する可能性も示された。

本研究は研究代表者らがこれまで進めてきた HEXIM1 の分子機構解明の成果を基盤に、世界に類のない右心肥大/右心リモデリングを標的とした新規膠原病性 PH 治療方法開発を目指すものであり、きわめて独創的な研究である。今後、膠原病性 PH において、HEXIM1 を中心とする転写制御装置の役割をより詳細に解析することによって、新規膠原病性 PH 治療法開発に貢献出来ると考えられた。さらに、左心系モデルの解析を加えることによって、心筋肥大・リモデリングにおける HEXIM1 を分子標的とした新規心臓リモデリング/心不全治療法開発にも発展可能と考えられた。

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 3 件)

1. Shimizu N, Maruyama T, **Yoshikawa N**, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schutz G, Takeda S, Tanaka H. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat Commun.* 6:6693, 2015.
doi: 10.1038/ncomms7693. 査読有り
2. Hosono O, **Yoshikawa N (equal-first author)**, Shimizu N, Kiryu S, Uehara M, Kobayashi H, Matsumiya R, Kuribara A, Maruyama T, Tanaka H. Quantitative analysis of skeletal muscle mass in patients with rheumatic diseases under glucocorticoid therapy--comparison among bioelectrical impedance analysis, computed tomography, and

magnetic resonance imaging.

Mod Rheumatol. 25:257-63, 2015.

doi: 10.3109/14397595.2014.935078.

査読有り

3. **Yoshikawa N**, **Shimizu N**, Ojima H, Kobayashi H, Hosono O, **Tanaka H**. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor by HEXIM1 attenuates myocardial angiogenesis in hypoxic mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 53:600-605, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.135.査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 吉川賢忠:臨床医が行うリウマチの基礎研究 リウマチ膠原病の難治性病態克服へのアプローチ
第35回城南リウマチ会、2015年11月、東邦大学大橋医療センター(東京都目黒区)
2. 吉川賢忠:難治性病態克服への分子生物学的アプローチ 肺高血圧症の新規治療法創成へ向けた分子基盤の構築 - HEXIM1 による心臓リモデリング制御の可能性
第5回佐賀県肺高血圧症研究会、2014年6月、ホテルニューオータニ佐賀(佐賀市)
3. 吉川賢忠ら:HEXIM1 による膠原病性肺高血圧症に対する新規治療方法創成の基盤研究
第57回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013年4月、国立京都国際会館(京都市)

〔その他〕

ホームページ

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Rheumatol/allergy/index_1.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 賢忠 (Noritada Yoshikawa)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号:70396878

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

田中 廣壽 (Hirotohi Tanaka)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号:00171794

清水 宣明 (Noriaki Shimizu)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号:30396890

佐野 元昭 (Motoaki Sano)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号:30265798