

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860596

研究課題名(和文)心筋形質維持におけるNRSF転写抑制複合体によるエピゲノム制御の意義の研究

研究課題名(英文)Elucidation of the role of epigenetic regulation by NRSF complex in maintaining cardiac integrity

研究代表者

桑原 佳宏(Kuwabara, Yoshihiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40647400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、本研究において、転写調節因子NRSFの心筋特異的ノックアウトマウス作成に成功し、その解析の結果、心拡大・心収縮能の低下・心室性不整脈の出現等のヒト心不全に類似した表現型が出現することを見出し、NRSFが正常な心臓の形態・機能維持に必須の分子であることを明らかにした。またその分子的機序の詳細を解明するために、HDAC1/2といったヒストン修飾因子のノックアウトマウスとの交配モデルの作成、解析などを行った。さらに三量体Gタンパク質の抑制型サブユニットであるG<sub>α0</sub>の発現増加を介した機序に注目し、G<sub>α0</sub>の機能阻害が心機能の改善や生存率の改善を来す可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, I succeeded to generate cardiac-specific NRSF conditional knockout mice (NRSF cckO) and found that these mice show cardiac dysfunction, malignant arrhythmias and sudden cardiac death, implying that NRSF plays an essential role in maintaining normal cardiac function. To address the underlying mechanisms, I crossed these mice with HDAC1/2 cardiac-specific double heterozygote knockout mice and analyzed NRSF/HDAC1/2 cardiac-specific triple heterozygote knockout mice. I also found that GNAO1 gene expression is increased in NRSF cckO. To examine the contribution of G<sub>α0</sub> to cardiac dysfunction seen in NRSF cckO, I treated these mice with PTX and found that PTX improved cardiac function and the survival curve in NRSF cckO. Currently I am further analyzing the role of G<sub>α0</sub> in the phenotype of NRSF cckO.

研究分野：循環器内科

キーワード：転写因子 NRSF 心不全 エピゲノム 循環器

## 1. 研究開始当初の背景

各種心疾患の終末像である慢性心不全は先進諸国において医療経済的な負担も含めて重大な問題となっており、その病態理解に基づく新規の治療法開発が求められている。

心不全においては胎児型心筋遺伝子とよばれる各種の遺伝子発現の変化が出現し、心筋の構造的・機能的変化に關与していると考えられているが、その制御機構はいまだ明らかでない。申請者らは転写抑制因子 NRSF がヒストン修飾因子と複合体を形成し、胎児型心筋イオンチャンネルなどの発現制御を介して正常な心筋の形質維持に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

近年 NRSF はヒストン脱アセチル化酵素や脱メチル化酵素などの複数のヒストン修飾因子と複合体を形成することが明らかとなった。そこで本研究では、最近申請者が作製に成功した NRSF 心筋特異的のノックアウトマウスをはじめ、NRSF との複合体形成が知られる複数のヒストン修飾因子のノックアウトマウスの解析と、その詳細な比較検討を行い、NRSF 転写抑制複合体の心筋形質維持に係わる分子機序とその破綻のメカニズムを、特にエピゲノム制御の観点から明らかにし、新規心治療標的探索を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 3-1. NRSF conditional ノックアウトマウスにおける遺伝子転写・エピゲノム変化の解析

最近申請者らが作成に成功した NRSF flox マウスを用いて、心筋特異的・時期特異的に NRSF を欠失する NRSF conditional ノックアウトマウスを作製し解析する。

具体的には、NRSF<sup>flox/flox</sup> マウスを心臓特異的な MHC-Cre マウスおよび薬剤誘導性 MHC-MerCreMer マウスと交配し、表現型解析を行う。

### 3-2. LSD1 conditional ノックアウトマウスおよび HDAC1/2 ダブル conditional ノックアウトマウスにおける遺伝子転写・エピゲノム変化の解析

NRSF と共同して働くことが知られているいくつかのヒストン修飾タンパクに關して、心筋特異的なノックアウトマウスの作

成と表現型解析を行う。

### 3-3. NRSF 複合体の機能を修飾する分子、および低分子化合物の同定・解析

NRSF トランスジェニックを作成し、tandem affinity purification を行い、NRSF と複合体を形成したり、その転写・エピゲノム制御活性に影響を与える分子の新規同定を試みる目的で、NRSF の心筋特異的過剰発現マウスの作成を行う。

## 4. 研究成果

### 4-1. NRSF conditional ノックアウトマウスにおける遺伝子転写・エピゲノム変化の解析

NRSF<sup>flox/flox</sup> マウスと心臓特異的な MHC-Cre マウスを交配して得られた NRSF cKO マウスは生後 10 週までに顕著な心拡大と心収縮能の低下、心室性不整脈を発症して死亡することを示し、その遺伝子プロファイルも他の心不全モデルやヒト心不全と類似していることを見出した。これらの結果から NRSF が心臓の正常な機能の維持に必須であることが示され、また NRSF の機能変化が心不全発症に寄与していることが示唆された。また NRSF の欠失が心機能低下を引き起こす機序を明らかにするために、NRSF cKO マウスの心臓においてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現解析を行った結果、心不全で増加することが知られている 3 量体 G 蛋白の抑制型サブユニットである G<sub>o</sub> の発現が同モデルで増加していることを見出した。G<sub>o</sub> の発現は申請者らが以前に作成した優性抑制変異型 NRSF 心筋特異的過剰発現マウスでも発現亢進しており、NRSF の直接の下流標的である可能性が示唆された。そこでこの G<sub>o</sub> に着目し、同サブユニットの阻害剤である PTX を投与したところ心機能・生存率の改善を認めた。以上のことは NRSF 機能阻害による心不全発症の一部が G<sub>o</sub> 発現亢進を介している可能性が示唆され、心不全の病態解明、新規治療標的の手掛かりになる知見と考え、現在 G<sub>o</sub> ノックアウトマウスとの交配を含め、さらに詳細な検討を続けている。

一方、adult の心筋における NRSF の意義をさらに検証する目的で、NRSF<sup>flox/flox</sup> マウスと薬剤誘導性 MHC-MerCreMer マウスとを交配し、薬剤誘導性心筋特異的 NRSF ノックアウトマウスを作製した。本マウスにおいても、上記マウスと類似した

心機能低下の所見を認め、NRSF が adult の心臓を含めその発生分化の複数の段階において心機能維持に必須である可能性を確認すると共に、adult の心臓における心不全発症に重要な役割を果たすことを示す知見が得られたと考え、さらなる解析を継続しているところである。

#### 4-2. LSD1 conditional ノックアウトマウスおよび HDAC1/2 ダブル conditional ノックアウトマウスにおける遺伝子転写・エピゲノム変化の解析

NRSF は HDAC1/2 と複合体形成をして機能することが知られている。既報の HDAC1/2 の心筋特異的ダブルノックアウトマウスの結果と、申請者らの作成した NRSF 心筋特異的ノックアウトマウスの表現型は遺伝子発現パターンを含め類似していることから、NRSF と HDAC との機能的な相違あるいは重複性を検討する目的で、HDAC1/2 のヘテロノックアウトマウスと NRSF ヘテロノックアウトマウスを交配し、NRSF/HDAC1/2 トリプルヘテロノックアウトマウスを作製した。NRSF/HDAC1/2 トリプルノックアウトマウスの心機能などの解析を行ったところ、HDAC1/2 のヘテロノックアウトマウスあるいは NRSF ヘテロノックアウトマウスと比較して特に有意な表現型の変化を認めなかった。これらのことは NRSF と HDAC1/2 との機能的な重複性を示唆するものであり、心筋における HDAC1/2 の重要なパートナーが NRSF である可能性が示唆されたと考えている。現在、心筋特異的薬剤誘導性 HDAC1/2 ダブルノックアウトマウスの作成に取り掛かると共に、やはり NRSF と複合体を形成するヒストン脱メチル化酵素である LSD1 の心筋特異的ノックアウトマウスの作成、表現型の解析にとり組んでいる。

#### 4-3. NRSF 複合体の機能を修飾する分子、および低分子化合物の同定・解析

まず、心筋特異的 NRSF トランスジェニックマウスを作製する目的で、conventional な MHC プロモーターを用いての過剰発現マウスの作成を試みたが、目的のマウスを得ることができなかった。そこで、CAG プロモーター下に STOP シークエンスを loxp 配列で挟み、その下流に myc-tag を付加した NRSF をコードする遺伝子を挿入したベクターを作製し、そのトランスジェニックマウスを作製した。本マウス

(CAG-STOP-mycNRSF マウス) を MHC-cre マウスと交配し、心筋のみで myc-tag を付加した NRSF が発現するマウスを得ることに成功した。現在本マウスを用いて NRSF と複合体形成する因子の探索を行う準備を進めているところである。

#### 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 3 件)

1. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M.

Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2.

J Mol Cell Cardiol. Epub 2015 Jan 3.

2. Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K.

Inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure.

Cardiovasc Res. 2014 Oct 1;104(1):183-93.

3. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K.

The effects of super-flux (high performance) dialyzer on plasma glycosylated pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and glycosylated N-Terminal proBNP in end-stage renal disease patients on dialysis.

PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92314.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 31 回日本心電学会学術集会学術奨励賞  
2014.7/22-25 東京

Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara,  
Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita, Yuji  
Arai, Yasuaki Nakagawa, Shinji Ysuno,  
Sachiyo Igata, Satoru Usami, Takeya  
Minami, Yuko Yamada, Kazuhiro Nakao,  
Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio  
Nishikimi, Kenji Ueshima and Kazuwa  
Nakao

Increased Expression of HCN channels  
in the Ventricular Myocardium  
Contributes to Enhanced Arrhythmicity in  
Mouse Failing Hearts

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ:

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/jpn/research/cardio.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑原佳宏 (KUWABARA, Yoshihiro)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 40647400