

平成30年 5月23日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293052

研究課題名(和文) ポストGWAS研究による心房細動の新規創薬標的の同定

研究課題名(英文) Post-GWAS study for identification of druggable target of AF

研究代表者

古川 哲史 (FURUKAWA, Tetsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80251552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：コモン疾患の遺伝的リスクを調べ、個別化医療を展開する手段としてゲノムワイド関連解析(GWAS)が精力的に行われている。GWASの副次的成果として、新たな疾患経路が判明し、新たな創薬の標的が見つかることが期待された。我々は、最も頻度が高く、合併症の脳梗塞(心原性脳塞栓)による寝たきりが社会的問題となっている不整脈、心房細動を対象に3世代にわたりGWASを行い、14の心房細動感受性1塩基多型(SNPs)を同定した。これらの機能解析から、心房細動の新たな創薬標的の同定を目標に研究を行った。酸化ストレス、筋変性、交感神経の分化、などに関わるSNPsが新たな心房細動創薬のシーズであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association study (GWAS) has been introduced as a tool to examine genetic risk of common diseases and to deploy personalized medicine. As a by-product of GWAS, it is also expected to identify novel pathogenic pathways and thus novel druggable targets. Atrial fibrillation (AF) is the most frequent arrhythmia and associated cerebral infarction (cardiogenic embolism) is the main cause of disability. We performed 3 GWASs for AF, and found 14 AF-sensitive single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Japanese population. Against these 14 SNPs, we performed functional assay to identify novel druggable targets. There are SNPs associated with oxidative stress, myolysis, or differentiation of sympathetic nerve. These findings provide novel pathogenic pathways of AF, and are suggested to a potential targets of AF drugs.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心房細動 ゲノムワイド関連解析 1塩基多型

1. 研究開始当初の背景

コモン疾患の遺伝的リスクを調べ、個別化医療を展開する手段としてゲノムワイド関連解析(GWAS)が精力的に行われている。GWASはこの主目的に加えて、副次的成果として新たな疾患経路が判明し、新たな創薬の標的が見つかることが期待された。GWASは2002年に第1例が報告されており、すでに15年以上経過するが、残念ながらこの副次的目的は成果を出せておらず、創薬につながった例はほとんどない。

2. 研究の目的

我々は、最も頻度が高く、合併症の脳梗塞による寝たきりが社会的問題となっている不整脈、心房細動を対象に3世代にわたりGWASを行い、14の心房細動感受性1塩基多型(SNPs)を同定した。そこで、これらのSNPsの機能解析から、心房細動の新たな創薬標的の同定を目標に研究を行った。

3. 研究の方法

細胞培養：HL-1、新生仔マウス心室筋

siRNAによるノックダウン

免疫細胞染色

電子顕微鏡観察

ウェスタンブロット

4. 研究成果

NEURL / HSP27 DKD は F-アクチン重合抑制を無効化する

NEURLはRING型ユビキチンリガーゼである。NEURLのユビキチン化基質を同定するためLC-MS / MS解析を行ったところ、HSP27が同定され、NEURL抑制ではHSP27が増加傾向にあった(図1A)。HSP27が心房細動との関連を示された研究として、心房細動における電気的リモデリングを模してHL-1細胞へ高頻度電気刺激を加えた実験がある。HSP27過剰発現細胞ではアクチンストレスファイバーの脱重合が亢進する事が報告されている³。NEURL抑制細胞でF-アクチ

ンを観察すると、F-アクチンが減少していた(図1B)。そこで、F-アクチンの脱重合にHSP27が関わるかを検討する事にした。

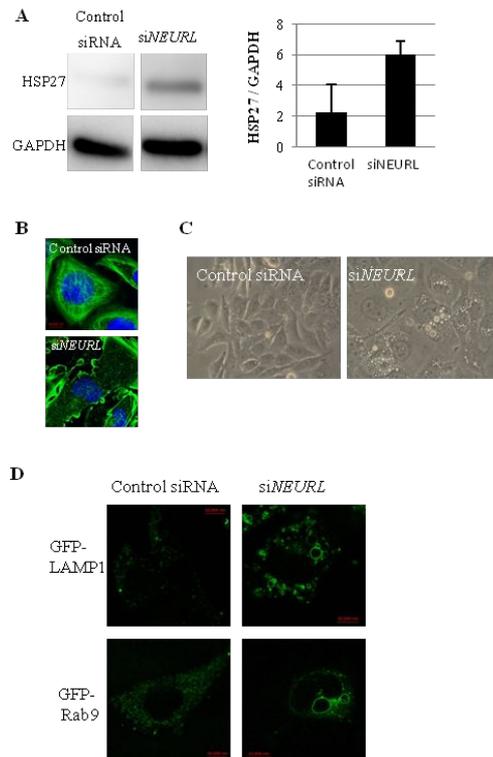


図1 NEURL抑制細胞で見られるF-アクチンの崩壊と多数の液胞

A: NEURL抑制48時間後、蛋白を回収し、ウェスタンブロットによりHSP27の発現を調べた。
B: F-アクチンを観察した。緑はF-アクチン、青は核を示す。
C: 液胞を位相差顕微鏡で観察した。
D: GFP-LC3, GFP-Rab9を導入し観察した。

NEURLとHSP27の関係を調べるために、それぞれのノックダウン (siNEURL, siHSP27) およびダブルノックダウン (siNEURL / HSP27) を行った。ファロイジン染色により細胞内のF-アクチンの状態を比較したところ、HL-1ではControlに比べsiNEURLでF-アクチンが減少し、繊維状構造が崩壊している様子が見られた。しかし、siHSP27、ダブルノックダウンでは繊維状構造が維持されていた。新生仔マウス心室筋細胞ではsiNEURLのみでサルコメアの横紋状の構造が失われていた(図2A)。定量化するために、ファロイジンの蛍光強度を測定した。Controlと比較しsiNEURLでは有意に低下していた。また、ダブルノックダウンはsiNEURLに比べ増加傾向にあった(図2B, 表1A)。これらの

事から, HSP27 を抑制する事で, NEURL 抑制心筋細胞で生じる F-アクチンの脱重合が取り消される可能性が示唆された.

次に, 筋繊維の微細構造を観察するため, 単離した新生仔マウス心室筋細胞に siRNA を導入し透過型電子顕微鏡試料を作製した. Control, siHSP27, ダブルノックダウンでは, 筋繊維束が構成されているのに対し, siNEURL では筋繊維束が細く, ばらついていく様子が観察された (図 2C). この事から, NEURL 抑制心筋細胞では HSP27 がサルコメアの制御に関係している事が考えられた.

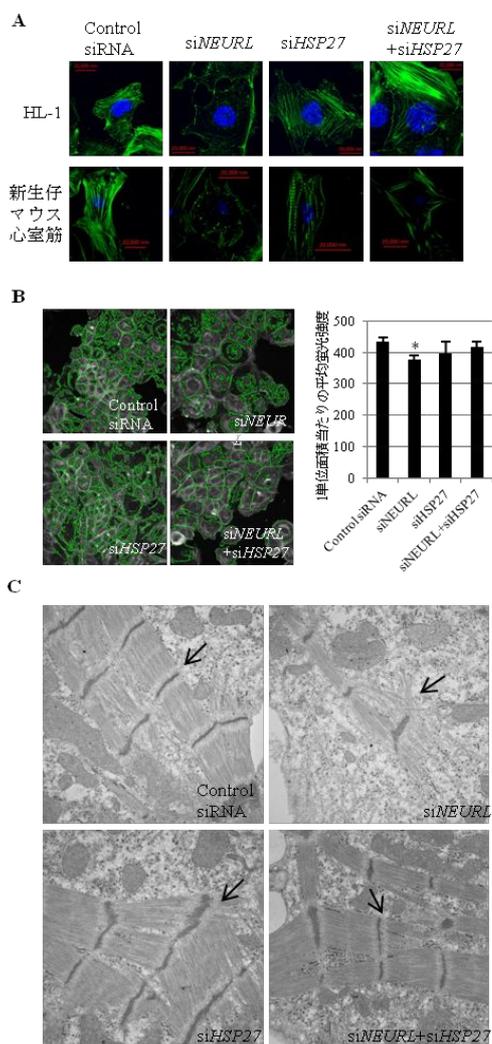


図2 siNEURL/siHSP27DKDはアクチン重合抑制を取消す
 A: HL-1 および新生仔マウス心室筋細胞を用いて, siRNA導入から48時間後にF-アクチンを観察した. 緑はF-アクチン, 青は核を示す.
 B: F-アクチンの1単位面積当たりの平均蛍光強度を測定した. (*p<0.05, vs Control)
 C: 新生仔マウス心室筋にsiRNA導入から48時間後, TEM試料を作製した. 20000倍で観察した. 矢印はサルコメアを示す.

HSP27 過剰発現は F-アクチンの重合抑制に関わる

さらに, HSP27 の増加が F-アクチンの減少に関係するか調べるため, HSP27 を過剰発現した細胞で F-アクチンの状態を観察した. HSP27 が導入された細胞 (赤) では F-アクチンが減少し (図 3A), 蛍光強度は低下していた (図 3B 表 1B) NEURL 抑制細胞では HSP27 がユビキチン化により分解されずに細胞内に増加する事が, F-アクチンの崩壊に繋がる可能性が示唆された.

表1 F-アクチンの1単位面積当たりの平均蛍光強度

細胞数	1単位面積当たりの平均蛍光強度
Control siRNA	2671
siNEURL	2610
siHSP27	2619
siNEURL+siHSP27	2640

細胞数	1単位面積当たりの平均蛍光強度
Halo-Control	2953
Halo-HSP27	2781

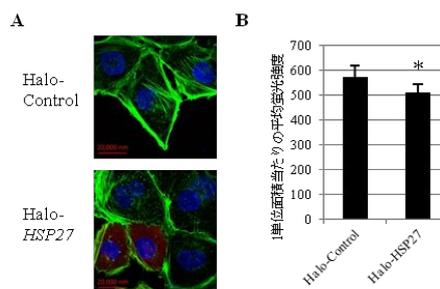


図3 HSP27の過剰発現によるF-アクチンの重合抑制
 A: HL-1 を用いて, Halo-HSP27導入から48時間後にF-アクチンを観察した. 緑はF-アクチン, 赤はHaloタグ, 青は核を示す.
 B: F-アクチンの1単位面積当たりの平均蛍光強度を測定した. (*p<0.05, vs Control)

F-アクチンの重合阻害は液胞形成を促進する

NEURL 抑制細胞では細胞質に多数の液胞が認められる (図 4). これらの液胞は, Rab9 / LAMP1 陽性であり, Atg5 非依存性のオートファジー⁴ によるものと考えられた. オートファゴソームの成熟にアクチンが関わるなどの報告があり⁵, 心筋においてもアクチン

とオートファジーが関係性をもつ事が推測される。そこで、*NEURL* を抑制する事によって生じる F-アクチンの減少と液胞形成の二つの現象に相互作用があるか検討するため、アクチン重合阻害剤サイトカラシン D で F-アクチンを脱重合後に、液胞が形成されるかを観察する事にした。共焦点顕微鏡による観察では、サイトカラシン D 投与 1 時間から F-アクチンが減少している様子が確認された。サイトカラシン D 投与 2 時間では細胞質に液胞が認められた。位相差顕微鏡では投与 1 時間では液胞が少数出現し、2 時間後から増加した(図 4)。この事から F-アクチンの重合阻害により液胞が形成されると考えられた。

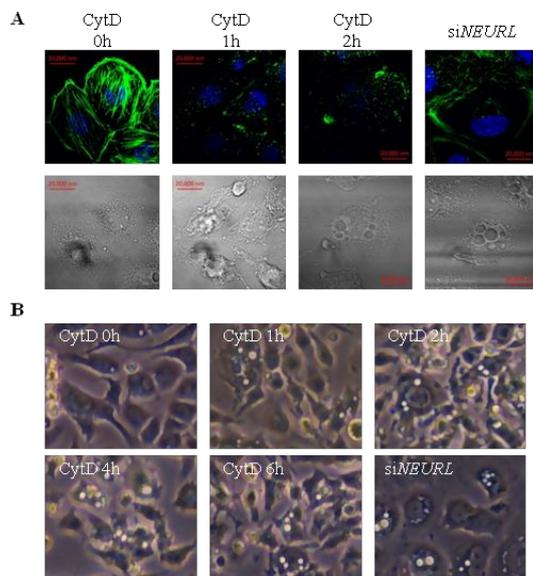


図4 サイトカラシンDによるアクチン重合阻害
A: 1 μM サイトカラシンD投与後、F-アクチンを観察した。
siNEURLは導入から48時間後のHL-1である。
B: サイトカラシンD投与後及び*siNEURL*ノックダウンHL-1を位相差顕微鏡で観察した。

F-アクチン脱重合後オートファジーが誘導される

サイトカラシン D 投与で形成される液胞がオートファジー由来かどうかを検討するため、マクロオートファジーのマーカーである LC3- の動態を調べた LC3- の発現は、サイトカラシン D 投与前と比べ投与後には増加し、1 時間の時点で特に増加していた。ポジティブコントロールとして行った飢餓

刺激においても、刺激後 1 時間の時点で特に増加していた(図 5A)。サイトカラシン D 投与、飢餓刺激開始から 1 時間の時点でオートファゴソームの形成が増加すると考えられた。この時点の細胞内の LC3 の発現を観察すると、飢餓刺激なしでは GFP-LC3 が細胞質全体に均質に発現しているのに対し、飢餓刺激、サイトカラシン D 投与では核周りに斑点状に発現し液胞と一致する部分も見られた(図 5B)。サイトカラシン D 投与により、マクロオートファジーが活性化する可能性が示唆された。*NEURL* 抑制細胞で陽性だった Rab9 についてもサイトカラシン D 投与で液胞と一致する部分が見られた。これらの結果により、F-アクチンの脱重合がマクロオートファジー、Atg5 非依存性オートファジーに関わる可能性が示唆された。

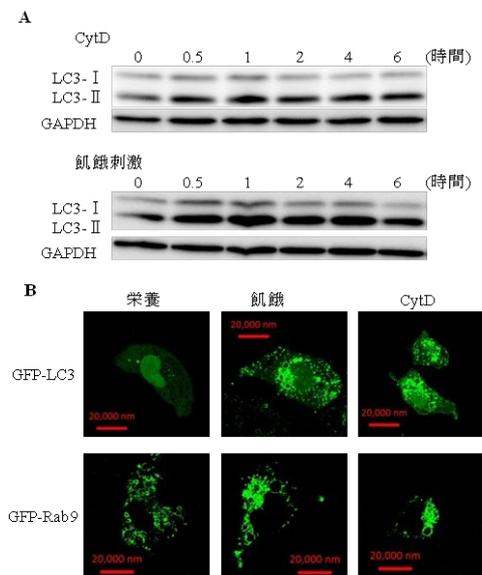


図5 アクチン脱重合後オートファジーが誘導される
A: HL-1で1 μMサイトカラシンD投与、および飢餓刺激後、蛋白を回収し、ウエスタンブロットによりLC3-IIの発現を調べた。
B: GFP-LC3, GFP-Rab9を過剰発現後、飢餓刺激及びサイトカラシンD投与を行い観察した。

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 12 件)

1. Sinner MF, Tucker N, Lunetta K, Ozaki K, Smith G, Trompet S, Bis J, Lin H, Chung M, Nielsen JB, Lubitz S, Krijthe B, Magnani J, Ye J, Gollob M, Tsunoda T, Müller-Nurasyid M,

- Lichtner P, Peters A, Dolmatova E, Kubo M, Smith J, Psaty B, Smith N, Jukema JW, Chasman D, Ebana Y, Furukawa T, Macfarlane P, Harris T, Darbar D, Dorr M, Holst A, Hastrup J, Svendsen H, Hofman A, Uitterlinden A, Gudnason V, Isobe M, Malik R, Dichgans M, Rosand J, Wagoner DV, Benjamin E, Milan D, Melander O, Heckbert SR, Ford I, Liu Y, Barnard J, Olesen M, Stricker B, Tanaka T, Käbb S, Ellinor P. (2014). Integrating genetic, transcriptional, and functional analyses to identify five novel genes for atrial fibrillation. **Circulation** 2014;130:1225-1235.(査読あり)
2. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T. High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 2016;90:38-46. (査読あり)
 3. Sugiyama K, Sasano T, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T. Oxidative stress induced ventricular arrhythmia and impairment of cardiac function in *Nos1ap* deleted mice. **Intern. Heart J.** 2016;57(3):341-349. (査読あり)
 4. Hasegawa Y, Hamada S, Nishimura T, Sasaki T, Ebana Y, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Koyama T, Furukawa T, Hirao K, Sasano T. Novel dielectric coagulation identifies hypercoagulability in patients with a high CHADS2 score without atrial fibrillation. **PLoS One** 2016;11:e0156557. (査読あり)
 5. Liu L, Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki S, Tanaka T, Komura M, Isobe M, Furukawa T. Genetic variants associated with susceptibility to atrial fibrillation in Japanese population. **Can. J. Cardiol.** 2017;33:443-449. (査読あり)
 6. Zaw KTT, Sato N, Ikeda S, Thu KS, Mieno MN, Arai T, Mori S, Furukawa T, Sasano T, Sawabe M, Tanaka M, Muramatsu M. Association of ZFH3 gene variation with atrial fibrillation, cerebral infarction, and lung thromboembolism: An autopsy study. **J. Cardiol.** 2017;70:180-184. (査読あり)
 7. Low SK, Takahashi A, Ebana Y, Ozaki K, Christophersen IE, Ellinor PT; AFGen Consortium., Ogishima S, Yamamoto M, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Naito M, Wakai K, Tanaka H, Furukawa T, Kubo M, Ito K, Kamatani Y, Tanaka T. Identification of six new genetic loci associated with atrial fibrillation in the Japanese population. **Nat. Genet.** 2017;49:953-958. (査読あり)
 8. Ebana Y, Ozaki K, Liu L, Hachiya H, Hirao K, Isobe M, Kubo M, Tanaka T, Furukawa T. Clinical utility and functional analysis of variants in atrial fibrillation-associated locus 4q25. **J. Cardiol.** 2017;70:366-373. (査読あり)
 9. Miyazaki S, Ebana Y, Liu L, Nakamura H, Hachiya H, Taniguchi H, Takagi T, Kajiyama T, Watanabe T, Igarashi M, Kusa S, Niida T, Iesaka Y, Furukawa T. Chromosome 4q25 variants and recurrence after second-generation cryoballoon ablation in patients with paroxysmal atrial fibrillation. **Int. J. Cardiol.** 2017;244:151-157. (査読あり)
 10. Ebana Y, Nitta J, Takahashi Y, Miyazaki S, Suzuki M, Liu L, Hirao K, Kanda E, Isobe M, Furukawa T. Association of the clinical and genetic factors with superior vena cava arrhythmogenicity in atrial fibrillation. **Circ. J.** 2017;82:71-77. (査読あり)
 11. Natusme Y, Oaku K, Takahashi K, Nakamura W, Oono A, Hamada S, Yamazoe M, Ihara K, Sasaki T, Goya M, Hirao K, Furukawa T, Sasano T. Combined analysis of human and experimental murine samples identified novel circulating microRNAs as biomarker for atrial fibrillation. **Circ. J.**, 2018;82:965-973. (査読あり)
 12. Ihara K, Sugiyama K, Takahashi K, Yamazoe M, Sasano T, Furukawa T. Electrophysiological assessment of murine atria with high-resolution optical mapping. **J. Vis. Exp.** 2018 in press. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. 古川哲史 . 網羅的ゲノム相関解析と心房細動 . 日本循環器学会第 144 回東海・第 129 回北陸合同学会 . 2014 年 10 月 26 日 . ウィンク愛知 .
 2. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T. High-fat diet increases vulnerability of atrial arrhythmia by conduction disturbance by microRNA. The 29th Annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society. 2014 年 7 月 22 日 . 品川プリンス .
 3. Furukawa T. Cardiac arrhythmia in the context of cardiac development. The 29th Annual Meeting of The Japanese

- Heart Rhythm Society. 2014年7月22日. 品川プリンス.
4. Hayashi Y, Nitta J, Iwasaki T, Lee K, Watanabe K, Hirao T, Kato N, Inamura Y, Suzuki M, Negi K, Satoh A, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Gohya M, Hirao K, Isobe. The occurrence of ectopy from pulmonary veins in atrial fibrillation in middle-aged women. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016年3月18日~3月20日. 仙台国際センター.
 5. Ito S, Ebana Y, Furukawa T. Neural ubiquitin E3 ligase, contributes to the maintenance of sarcomere structure and the regulation of autophagy. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016年3月18日~3月20日. 仙台国際センター.
 6. Hayashi Y, Nitta J, Iwasaki T, Lee K, Watanabe K, Hirao T, Kato N, Inamura Y, Suzuki M, Negi K, Satoh A, Yamato T, Matsumura Y, Asakawa K, Ebana Y, Furukawa T, Gohya M, Hirao K, Isobe M. The genotype of SNPs related whether ectopy is from pulmonary vein or others in atrial fibrillation. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016年3月18日~3月20日. 仙台国際センター.
 7. Hamada S, Hasegawa Y, Nishimura T, Furukawa T, Isobe M, Hirao K, Sasano T. Novel dielectric blood coagulometry can evaluate factor Xa and thrombin activity individually. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016年3月18日~3月20日. 仙台国際センター.
 8. 古川哲史. 心房細動はなぜ慢性化するのか: そのメカニズムと対策. 第30回不整脈学会学術集会・第32回日本心電学会学術集会. 2015年7月28日~7月31日. 国立京都国際会議場.
 9. 古川哲史. 心房細動とアンチエイジング. 第15回日本抗加齢医学会総会. 2015年5月30日~5月31日. 福岡国際会議場(福岡県/福岡市).
 10. 古川哲史. コモン不整脈の遺伝的リスク. 第243回日本循環器学会関東甲信越地方会. 2017年02月04日. ステーションカンファレンス東京、千代田区、東京.
- 他7件

〔図書〕(計 2件)

1. 古川哲史. 心臓イオンチャンネル A to Z.

ライフメディコム. 2015年. 168ページ.

2. 古川哲史. そうだったのか! 臨床に役立つ心臓の発生・再生. メディカルサイエンスインターナショナル. 2015年. 178ページ.

〔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〕
 特記事項なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川哲史(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授)

研究者番号: 80251552

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

笹野哲郎(東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授)

研究者番号: 00466898

井原健介(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授)

研究者番号: 50770210

(4)研究協力者

なし