

令和元年6月12日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08748

研究課題名(和文) マイクロRNA導入マウス心筋症におけるヘキソキナーゼ2とMAS受容体シグナル解析

研究課題名(英文) Analysis of signaling of Hexokinase 2 and MAS receptor in the cardiomyopathy overexpressing a set of microRNA

研究代表者

岩本 隆司 (IWAMOTO, Takashi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：60223426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNAであるmiR-143/145を心筋細胞に過剰発現したトランスジェニックマウス(miRTG)に発症した拡張型心筋症において、ヘキソキナーゼ2の関与は低い事が示唆された。一方、miRTGでは予想に反して、還元型グルタチオンが増加し、ペントースリン酸経路の亢進が示唆された。また、病態の進行にはアンジオテンシン変換酵素とインスリン様成長因子1受容体のシグナルが重要である事が示唆された。また、心筋特異的MASトランスジェニックマウスは加齢と共に心不全を起こすため、交配実験を試みる事は出来なかったが、miRTGは心筋症における新規の還元ストレスシグナル経路を解析するモデルとなると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miR-143/145は心臓における主要なマイクロRNAであるが、その心臓での機能の詳細は不明である。また、拡張型心筋症は難病の一つであるが、その進展には主に酸化ストレスの関与が考えられてきた。本研究により、miR-143の過剰発現は、むしろ還元状態を伴った心筋症を発症する事が明らかになり、その新しい分子機構の一部を提示する事が出来た。また、臨床レベルで高血圧や心不全の治療に用いられるアンジオテンシン変換酵素阻害剤が、心筋症でインスリン様成長因子1受容体のリン酸化を抑制し、心筋症の進展を抑制する可能性が得られた。本モデルマウスは心筋症の発症メカニズムと治療に新しいヒントを与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The transgenic mice that express miR-143/145 in the cardiomyocytes (miRTG) exhibit the cardiomyopathy, but down-regulation of hexokinase 2 would not be involved in the pathogenesis. In the hearts of these mice, GSH and the ratio of GSH/GSSG increases, suggesting the activation of pentose phosphate pathway. With aging, the expression of angiotensin converting enzyme (ACE), and the phosphorylation of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) increases. ACE inhibitor improves the survival rate of miRTG, and suppresses the phosphorylation of IGF1R. Since the transgenic mice overexpressing MAS receptor in the cardiomyocytes (MASTG) unexpectedly display the cardiomyopathy, we are not able to do crossbreeding experiments between miRTG and MASTG. Together, miRTG would be a novel model for analyzing the molecular mechanism of cardiomyopathy with reductive state.

研究分野：実験動物学

キーワード：マイクロRNA 心筋症 グルタチオン アンジオテンシン変換酵素 インスリン様成長因子1受容体 ペントースリン酸経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の研究の流れ microRNA (miRNA)は~22塩基の non-coding RNA で標的遺伝子の発現を抑制して生理機能を調節する。miR-143 と miR-145 はヒト・マウスとも約2kB上に近接して存在している miRNA であるが、共に当初癌抑制遺伝子として報告され、我々もその生合成が癌抑制遺伝子 p53 で促進され、マウス生体でも癌抑制的に働く事実を報告してきた^{1)~3)} 一方、miR-143/145 の生体正常組織での生理機能は殆ど解っていなかったが、分化型血管平滑筋で極めて発現が高く、平滑筋の分化に関与している事が明らかになってきた⁴⁾。

一方、ヒトの心不全でも miR-143 の発現が増強するという報告があり心機能との関係が示唆されたので⁵⁾、我々は MHC (ミオシン重鎖) のプロモーターを用いて心筋細胞特異的に miR-143/miR-145 を発現するトランスジェニックマウス (miRTG) を3系統樹立したが、その内2系統は拡張型心筋症様の病態により多くは3-6ヶ月齢で死亡した。これらのマウスでは miR-143 が非常に強く発現し、症状と正相関を示したが、miR-145 の発現は野生型と大きく変わらなかった。そこで miR-145 のみを強発現するトランスジェニックマウス (145TG) を新たに作製したが、145TG には明らかな病変は認められなかった事から miR-143 の過剰発現が主に miRTG の病態に関与すると考えられた。興味ある事に miRTG の心臓ではアンジオテンシン変換酵素 (ACE1) が上昇し、実際 ACE 阻害剤投与で症状が劇的に改善した。

(2) RAS系と心臓 レニンアンジオテンシン (RAS) 系は心血管リモルディングに深く関与すると考えられており、ACE1 により作られたアンジオテンシン (Agn) は主に AT1 受容体を介して心筋細胞の肥大・線維化等を誘導するが、最近発見された ACE2 は Agn-(1-7) の産生を促進し、MAS 受容体を介して ACE1/Agn と拮抗して働くと考えられている。興味深いことに ACE2 欠損マウスや MAS 欠損マウスでは心臓収縮能の低下が報告されている⁶⁾。

そこで miRTG においても ACE2/MAS の発現を調べた所、意外にも ACE1 同様 ACE2 も上昇し、逆に MAS の発現は有意に低下しており、ACE1 と MAS の発現は逆相関していた。一方 AT1 および AT2 受容体の発現には大きな変化は認められなかった。よって miRTG では MAS 受容体の発現低下が ACE1 axis 優位の状態を誘導している可能性がある。興味ある事にヒトの MAS の3'非翻訳領域には miR-143 の標的部位が存在し、その配列を用いた我々のルシフェラーゼアッセイでは miR-143 の導入により発現が低下した。しかしマウスではこの領域は保存されていない事からマウスでは miR-143 は他の分子を介して間接的に MAS を抑えている可能性が考えられた。

(3) ヘキソキナーゼ2の低下 そこで miR-143 が他の分子を介して RAS 系を調節している可能性を考えて、既報の miR-143 の標的の中から最近注目されてきているヘキソキナーゼ2 (HK2)⁷⁾ について解析した所、発現の低下とマウスの病態がよく相関していた。解糖系律速酵素 HK2 は最近多彩な機能をもつことが解ってきたが、HK の4つのアイソザイム HK1-4 の内 HK1, HK2 はミトコンドリアにも存在し、中でも HK2 はインスリン刺激により発現が増加し、インスリンに感受性のある脂肪組織、骨格筋、心筋で多く発現している。インスリン刺激により PI3 キナーゼ/AKT キナーゼ更に mTORC1 が活性化して HK2 の発現を増強すると考えられている。更に HK2 は AKT によりリン酸化されてミトコンドリアに転移して、cytochrome c の漏出や、ミトコンドリア透過性遷移孔の開口を防いでいる。

一方、HK2 は細胞質ではペントースリン酸経路を通してグルタチオンの還元維持に必須の NADPH を供給する。実際、HK2 のヘテロ欠損マウスでは心負荷により、活性酸素種 (ROS) の産生増加・ミトコンドリア内膜透過性亢進の増加を伴い心肥大が起こり^{8,9)}、逆に心筋特異的 HK2 の TG ではペントースリン酸回路を介して ROS の産生を抑制する¹⁰⁾。よって miRTG の心臓では HK2 の発現低下により、細胞質では還元型グルタチオンが低下すると共に、ミトコンドリアの機能不全により、ROS の異常産生が起きている可能性が考えられる。

(4) ヘキソキナーゼ2とオートファジー オートファジーはユビキチン・プロテオソーム系と並ぶ細胞内分子の分解系であり、心筋症との関係は以前より示唆されている。最近、HK2 が mTORC1 を抑制する事により、オートファジーを活性化するという興味深い事実が報告された¹¹⁾。

以上より miRTG では HK2 の低下により ROS の異常産生・オートファジーの抑制を起し、ACE1/ACE2 のバランスを崩し心臓の機能不全を引き起こしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

miR-143 とヒト拡張型心筋症 (DCM) の関係はまだ不明であるが、Barth らはヒト DCM に共通して変動する遺伝子を27個同定した所、興味深い事に miRTG ではその内9遺伝子が同じ挙動をしていた¹²⁾。この事実から miRTG はヒト DCM の病態をよく反映しているモデルであると考えられる。また、平滑筋で miR-145 は ACE1 を標的として抑制するという Braun らの報告¹³⁾以降、多くの論文がそれを引用し、根拠なく miR-143 までも ACE1 を下げるとしている論文が散見される。しかし miRTG では上述の様に逆に ACE1 が上昇し、我々が作った miR-145 の強発現 145TG の心臓では意外にも ACE1 の発現に変化は認められなかった事から少なくとも心臓ではこのコンセプトに再考が必要である。また、Braun らは ACE2/MAS の解析までは行っていない。そこで我々は

以下のプロジェクトを立案した。

I. HK2 の発現回復により miRTG 病態や発現分子異常は改善されるか? : 心筋特異的 HK2 トランスジェニックマウス(HK2TG)を作成してmiRTGと交配し、HK2の補填により病態やACE1/ACE2アンバランスが改善されるかを検討する。

II. MAS の発現回復により miRTG 病態や ACE1 ACE2 バランスは改善されるか? : ACE2 の欠損が ROS の産生を促進したり、Agn が AT1 受容体を介してオートファジーを活性化するという報告もある。そこで心筋特異的 MASTG を作成して miRTG と交配し、ACE2/MAS axis を増強することにより同様に病態が改善するかを検討する。

III. 多彩な HK2 のエフェクターシグナルの解析: HK2 の miRTG における antioxidant としての機能やオートファジーへの関与を明らかにする。東大水島昇博士から供与を予定している GFP-LC3 マウスと miRTG を交配させると共に生化学的解析を進めて miRTG におけるオートファジーとその病態への関与を評価する。

多彩な HK2 シグナルと ACE2/MAS シグナル、また心臓におけるオートファジーの機能は注目を集めているが未だ不明な点が多い。本研究は miR-143 過剰発現がそれらの破綻を招く事により如何なる経路で DCM を誘発するか の 解明 を 目指した。

3. 研究の方法

(1)心筋特異的 MHC/HK2 トランスジェニックマウスと心筋特異的 MHC/MAS トランスジェニックマウスを樹立し、miRTG との交配を進めてダブルトランスジェニックマウス (miRTG x HK2TG および miRTG x MASTG) の作成を行い、生存率への影響を検討した。

(2)(1)と並行して、miRTG での HK2 の低下をヘキソキナーゼアッセイやペントースリン酸経路を介するレドックスシグナルを中心に解析した。

(3)GFP-LC3 マウス¹⁴⁾を理研 B R C から受け入れ miRTG との交配を行い、オートファジー異常を生化学的および形態学的解析を駆使して解析した。

(4)Nrf2 欠損マウスと miRTG を交配して、本病態における Nrf2 の関与を解析した。

(5)ACE 阻害剤による効果を生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) HK2 のトランスジェニックマウスの作成とペントースリン酸経路 (PPP) の解析

HK2TG の作成と miRTG との交配実験 : MHC のプロモーターを用いて心筋細胞特異的に HK2 を発現するトランスジェニックマウスである HK2TG を 4 系統樹立した。これらはウエスタンブロット法で心筋に非常に高いタンパクの発現が認められた。これらのマウスと miRTG を交配して HK2/miRTG のダブルトランスジェニックマウスを樹立して、生存曲線を観察したが、miRTG に対して生存率の向上は認められなかった。また、*in vitro* のヘキソキナーゼアッセイを行ったところ、予想外に miRTG は野生型マウスに比べて、殆ど活性は低下していなかった。一方、HK2/miRTG では、HK2 の活性が約 4 倍に上昇しており、確かに導入した HK2 が機能していることが示された。これら事実より、miRTG における HK2 の発現低下は病態の主原因ではないと考えられた。

miRTG におけるペントースリン酸経路 (PPP) およびレドックスの解析 : HK2 は PPP の律速酵素の一つであり、PPP は主要な NADPH の産生経路である。そこで miRTG での還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) を定量した所、意外にも還元型グルタチオンの大幅な増加と GSH/GSSG の比率の明らかな上昇が確認された。次に活性酸素 (ROS) の産生を定量するために脂質の酸化について解析 (TBARS アッセイ) を行った。その結果、miRTG では ROS の産生増強は認められなかった。以上より miRTG では HK2 の低下にも関わらず GSH/GSSG の比が上昇しており、PPP が野生型マウスよりも亢進している事が示唆された。これは *in vitro* のヘキソキナーゼアッセイで miRTG が野生型と有意な差がない事実とも整合性がみられた。

グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素 (G6PD) の発現解析 : そこで我々は PPP の亢進のメカニズムを調べるために、PPP の律速酵素である G6PD の発現をウエスタンブロット法で確認したところ、G6PD の明らかな発現上昇が認められた。

(2) NRF2 欠損マウスとの交配実験

以上の解析より miRTG が酸化ストレス下ではなく、むしろ還元状態にあることが明らかになった。そこで酸化ストレス遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 遺伝子の本病態への関与を調べるために、Nrf2 遺伝子欠損マウスと交配させた。その結果、Nrf2 欠損 miRTG の生存曲線には大きな違いが起らず、本病態に酸化ストレス及び Nrf2 の関与は低いと考えられた。また、興味あることに G6PD の発現は Nrf2 の欠損により低下しなかった。

(3) miRTG におけるオートファジーおよびオートファジーアダプターの p62 の解析 : GFP-LC3 マウスと miRTG を交配して、GFP-LC3/miRTG を樹立した。これらのマウスでの心臓を自由飲食下および 24 時間絶食下で蛍光顕微鏡下で観察したところ、miRTG と野生型マウスとの間で GFP-LC3 のドットの違いは認められなかった。miRTG でオートファジーアダプターの分子である

p62 の発現が増強しているが、p62 は種々の細胞への刺激で発現が増加することが分かってきている。そこでリアルタイム qPCR で p62 の発現を調べたところ、miRTG では mRNA レベルで発現が上昇している事が明らかになった。また、Nrf2 遺伝子の欠損により p62 の発現には変化が認められなかった。

(4) 心筋特異的 MAS トランスジェニックマウスの作成

MHC のプロモーターを用いて心筋細胞特異的に MAS 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (MASTG) を複数系統樹立した。これらを miRTG と交配することにより、心筋症が改善されるかを試みたが、予想に反して、逆に交配により生存率は明らかに低下した。その後の解析により、MASTG の一部は心不全を発症することがわかった。

(5) アンジオテンシン変換酵素 1 (ACE1) 及びインスリン様成長因子 1 受容体 (IGF1R) の発現解析

ACE1 および IGF1R の発現解析: ACE1 は miR-145 の、IGF1R は miR-143 および miR-145 のそれぞれ標的になる事が以前の研究で報告されている。しかし miRTG では加齢と共に ACE1 の発現は逆に上昇していた。更に、IGF1R の発現も低下が認められなかった。興味あることに IGF1R のリン酸化は ACE の発現と相関して増強していた。

ACE 阻害剤による生存率の改善: 心臓局所の ACE1 には心筋肥大の作用があるという報告と、否定的な報告がある¹⁵⁾。我々は miRTG に ACE 阻害剤を投与して、生存率の改善を観察していた。興味深い事に、ACE 阻害剤は生存率を劇的に改善したのみならず、IGF1R のリン酸化を抑制した。以上の事実より本病態には ACE/IGF1R のシグナルが関与している可能性が示唆された。

(6) 結語

miRTG では還元型グルタチオンや G6PD の発現が増加しており、PPP の活性化が考えられ、HK2 の発現低下の病態への関与は低いと考えられた。これと一致して、*in vitro* のヘキソキナーゼアッセイでは低下が認められず、HK2TG との交配で生存率に影響を及ぼさなかった。一方、加齢とともに、心臓での ACE1 の発現や IGF1R のリン酸化が亢進しており、ACE 阻害剤で生存率の改善と IGF1R のリン酸化の抑制が認められ、これらのシグナルの本病態への関与が示唆された。また、オートファジーアダプタータンパクの p62 の発現増強が認められたが、オートファジーの低下は認められなかった。p62 は最近解糖系や PPP の活性化に重要であることがわかってきている¹⁶⁾。また、miRTG における Nrf2 遺伝子の欠損は p62 や G6PD の発現を低下させなかった。以上より、miRTG では Nrf2 非依存性に p62 や G6PD の発現が増強し、還元状態にシフトしていると考えられた。また、この状態の持続が ACE/IGF1R のシグナルの活性化を促して病態の発症へとつながっていると考えられる。p62 はラミン心筋症で発現が増強していることが示されており¹⁷⁾、また G6PD は還元ストレスのキー分子であることが示されている¹⁸⁾。今後 miRTG は新しい還元ストレス心筋症のモデルとして有用であると考えられる。

引用文献

- 1) Tsutsui et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 372:856-861, 2008
- 2) Suzuki et al., *Nature*, 460:529-533, 2009
- 3) Takaoka et al., *PLoS ONE*, 7(8): e42137, 2012
- 4) Cordes et al., *Nature*, 460, 705-710, 2009
- 5) Matkovich et al., *Circulation*, 119:1263-1271, 2009
- 6) Crackower et al., *Nature*, 417:822-828, 2002
- 7) Jiang et al., *EMBO J.*, 31:1985-1998, 2012
- 8) Smeele et al., *Circ Res.*, 108:60-69, 2011
- 9) Wu et al., *EMBO Mol Med.*, 4:633-646, 2012
- 10) McCommis et al., *J Am Heart Assoc.*, 2:e000355, 2013
- 11) Roberts et al., *Mol Cell*, 53:521-533, 2014
- 12) Barth et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 48:1610-1617, 2006
- 13) Boettger et al., *J Clin Invest.*, 119:2634-2647, 2009
- 14) Mizushima et al., *Mol. Biol. Cell* 15:1101-1111, 2004
- 15) Xiao et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 294:H659-67, 2008
- 16) Reina-Campos et al., *Curr Opin Cell Biol.*, 48:47-53, 2017
- 17) Dialynas et al., *PLoS Genet.*, 11(5):e1005231., 2015
- 18) Pérez-Torres et al., *Int J Mol Sci.*, 18(10), pii: E2098, 2017

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Matsuoka, H., Miyata, S., Okumura, N., Watanabe, T., Hashimoto, K., Nagahara, M., Kato

K., Sobue S., Takeda K., Ichihara M., Iwamoto, T., Noda. A.
Hydrogen gas improves left ventricular hypertrophy in Dahl rat of salt-sensitive hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 41, p307-311, 2019.

doi: 10.1080/10641963.2018.1481419 査読有

Nishikawa K., Itoi F., Nagahara M., Jose M., Matsunaga A., Ueda J., Iwamoto T.
The normality of sperm in an infertile man with ring chromosome 15: a case report.
J Assist Reprod Genet. 35, p251-256, 2018 doi:10.1007/s10815-017-1061-9. 査読有

岩田 悟, 仲臺 瞳, 上瀬 菜美, 長原 美樹, 岩本 隆司
エレクトロポレーション法を用いたマウス受精卵のゲノム編集技術の確立
中部大学生命健康科学研究所紀要 14, p92-96. 2018 査読無

Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Nogami, J., Horikoshi, N.,
Osakabe, A., Taguchi, H., Tanaka, H., Tachiwana, H., Yao, T., Yamada, M., Iwamoto, T.,
Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., Yamagata, K.

Testis-Specific Histone Variant H3t Gene is Essential for Entry into Spermatogenesis.
Cell Reports, 18, p593-600, 2017 doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065. 査読有

Tsukada Y., Iwahori Y. Funahashi K. Jose M. Ueda J. Iwamoto T.

Extraction of Cell Nuclei using CNN Features

Procedia Computer Science 112, p1633-1640, 2017, doi:10.1016/j.procs.2017.08.255
査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

小川 剛太、松山 留美子、上田 潤、喬 善楼、野田 明子、小形 岳寛、岩本 隆司
マイクロ RNA 導入マウスに発症した拡張型心筋症における ACE/IGF1 受容体シグナルの解析
ConBio2018, 2018 年

仲臺 瞳、岩田 悟、上瀬 菜美、長原 美樹、岩本 隆司
エレクトロポレーション法を用いたゲノム編集技術による染色体改変マウスの作製とその解析
ConBio2018, 2018 年

小川 剛太、松山 留美子、喬 善楼、小形 岳寛、上田 潤、岩本 隆司
マイクロ RNA 導入マウスに発症した拡張型心筋症における還元ストレスの解析
Conbio 2017, 2017 年

上瀬 菜美、高橋 幸司、中島 妙子、八尾 竜馬、岩本 隆司、上田 潤
メチロームマウスを用いた腫瘍分類の画像解析
Conbio 2017, 2017 年

善楼楼、加藤 智也、小澄 璃奈、川本 善之、武田 湖州恵、市原 正智、岩本 隆司
低酸素環境における RET 変異体の機能解析
conbio 2017, 2017 年

塚田裕也、岩堀祐之、舟橋健司、上田潤、岩本隆司
CNN 特徴量を利用した明視野画像からの細胞核抽出
第 42 回東海ファジィ研究会 in 日間賀島 (ヒマ研 2017)
2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/6322fcf3ae47743e17deca4b73899194b102cfe7.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：市原 正智

ローマ字氏名：(ICHIHARA, masatoshi)

所属研究機関名：中部大学

部局名：生命健康科学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 00314013

研究分担者氏名：小形 岳寛

ローマ字氏名:(OGATA, takehiro)
所属研究機関名:京都府立医科大学
部局名:医学(系)研究科(研究院)
職名:助教
研究者番号(8桁):10402877

研究分担者氏名:野田 明子
ローマ字氏名:(NODA, akiko)
所属研究機関名:中部大学
部局名:臨床検査技術教育・実習センター
職名:教授
研究者番号(8桁):80252287

研究分担者氏名:上田 潤
ローマ字氏名:(UEDA, jun)
所属研究機関名:旭川医科大学
部局名:医学部
職名:准教授
研究者番号(8桁):80450394

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。