

平成 30 年 12 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04820

研究課題名(和文) 経口心不全治療薬開発に向けたナトリウム利尿ホルモン発現調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanism of natriuretic hormone expression for oral heart failure drug development

研究代表者

高島 成二 (TAKASHIMA, Seiji)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：90379272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ナトリウム利尿ペプチドANP、BNPは、心不全にて血中濃度が上昇し重症度のマーカーになるとともに治療薬としても使用されている。そこで、ANP、BNPが生体内でいかに発現調節されているのかを検討した。結果、ANP、BNPの心不全時の発現は3つの転写因子がエンハンサー部に結合すること、機械刺激がANP、BNP発現のシグナル誘導にかかわることを示した。以上の結果により心不全における重要な適応現象であるANP、BNP発現誘導がメカニカルストレスで活性化される因子を通しておこることを明らかにした。この成果はこれらのシグナルを標的とした心不全治療薬開発につながると期待されます。

研究成果の概要(英文)：We clarified how natriuretic peptides ANP and BNP, which are elevated and become severity markers during heart failure and are also used as therapeutic agents, are regulated in vivo. The results of this project are as follows.(1) Expression of heart failure in ANP and BNP is regulated by about 600 bp enhancer positioned about 20 kb upstream of the gene, and is induced by binding of factors.(2) Even in catecholamine stimulation, this expression signal is not transmitted when the movement of the heart is stopped, and this signal is transmitted by the two types of mechanostress, so that mechanical stimulation is involved in this signal induction even at the cellular level.

It is clarified how signal transduction in heart failure is transmitted, and it is expected to lead to the development of drugs for the treatment of heart failure targeting these signals.

研究分野：医化学

キーワード：心不全 ナトリウム利尿ホルモン エンハンサー シグナル伝達 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ホルモン (ANP, BNP) は心臓から分泌され、心不全時にその発現が顕著に誘導される。そのため心不全重症度の分子マーカーとして広く臨床応用されているだけでなく、その利尿作用・血管拡張作用等により心不全治療にも積極的に使用されている。しかし心不全時におけるその発現誘導のメカニズムは意外なことに不明である。

我々は、世界に先駆けて心不全により ANP, BNP を誘導するエンハンサー領域 CR9 を同定した。本事業では、3 年間で CR9 に直接結合する転写因子を同定し、その活性につながるシグナル経路を明らかにすることを目標とする。これに成功すれば ANP, BNP の産生を直接増加させる薬剤の開発につながると期待される。

## 2. 研究の目的

ANP, BNP の誘導にかかわる心不全感受性エンハンサー領域 CR9 の狭小化及び生体内エンハンサーアッセイ系の高感度化

CR9 結合タンパク質の直接精製によるエンハンサータンパク質の同定

同定されたエンハンサータンパク質の活性化経路および発現調節因子の決定。これらのタンパク質群の中でナトリウム利尿ペプチド産生増強剤の創薬標的となる分子の選別及び生化学的・構造学的解析

## 3. 研究の方法

心不全感受性エンハンサー領域 CR9 の狭小化と生体内アッセイ系の高感度化

現在エンハンサー領域は 600bp 程度まで狭められており、結合タンパク質精製のためのプローブとしては適切な塩基長である。しかし、ネガティブコントロールとして使用するプローブの設計、結合する転写因子の種類および数の推定のために、さらなる領域の狭小化が必要である。そこで 30bp 単位の欠損部を有する CR9 変異体を 10 種程度作成し、生体内・生体外でそのエンハンサー活性を計測する。

CR9 に結合するタンパク質の精製・同定

### A) 結合タンパク質の直接結合

CR9 および新たに同定された結合に重要な部位を除いたコントロール配列をピオチン化核酸として合成し、精製用プローブとして利用する。結合タンパク質の精製原料としては、大動脈縮窄により作成したマウス心不全心及びラット培養心筋細胞を使用する。それぞれのホモジネートから収縮タンパク質を沈

殿分離した後、造影剤を使った密度勾配により分画を行う。

B) 光クロスリンクアミノ酸の導入による生体内タンパク質クロスリンク系の確立とエンハンサー結合タンパク質同定への応用

光クロスリンクアミノ酸を導入することにより、結合タンパク質を効率よく同定しエンハンサー結合タンパク質候補の絞り込みを行う。

C) 複数の同定候補からの絞り込み

候補遺伝子のレンチウイルス発現ベクターを作成し、CR9 レポーターを発現する培養心筋細胞に導入する。サブトラクション法により、一つあるいは複数のエンハンサー活性化因子を同定する。

同定された結合タンパク質の活性化経路の解析

同定された因子の種類によって特異的なシグナル伝達にかかわる因子の同定を進める。研究の進行により 3 種の転写因子が同定された。特殊な修飾などは観察されなかったが、活性化により核内移行が観察されたことにより、さらに上流のシグナル解析を施行、同定した ANP, BNP のエンハンサー活性化につながる分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

心不全感受性エンハンサー領域 CR9 の狭小化と生体内アッセイ系の高感度化

A) エンハンサー領域の狭小化

30bp 単位の欠損部を有する CR9 変異体を 10 種作成し、生体内・生体外でそのエンハンサー活性を計測した。結果 CR9 の 5' 側 n120bp が心不全時に ANP, BNP を発現誘導するのに十分であることが明らかとなった。そこで以降はこの 120bp の領域と CR9 の領域を併用して、結合タンパク質の同定、エンハンサー活性化機構の解明を進めた。

B) 細胞および生体内エンハンサー活性の高感度・継時測定法の開発

近赤外を含む複数の蛍光レポーターを導入したマウスにおいて、無侵襲でレポーターアッセイが可能かを検討したが、発光系に勝る透過度を得ることができず、蛍光法は断念した。

発光系に関しては、エンハンサーコンストラクトを持つマウスを白色の純系マウスと繰り返しかけなおし、白色化することにより剃毛なしでも正確に定量可能となった。

ゲノムの挿入部位により非特異的に発現する部位を対照とすることにより、発光レポ-

ター使用による定量性問題を克服した。本系を使用して、大動脈縮窄圧負荷心不全モデルで CR9 エンハンサー活性の上昇が観察された。さらに、より多彩な心不全の病態で共通して CR9 が責任領域であることを証明するため、in vivo における CR9 のエンハンサー活性を 3 つの心不全系において検討した。

心臓毒性を示す抗がん剤であるドキソルビシン、2 種類のカテコラミンにより CR9 エンハンサー活性の上昇が観察された。これらの結果は CR9 が心不全の生理学的病態に反応して活性化されることを強く示唆した。すなわち ANP, BNP のエンハンサーは原因にかかわらずポンプ機能の落ちた心臓の何らかのシグナルを感知することが示された。

#### CR9 に結合するタンパク質の精製・同定

##### A) 結合タンパク質の直接結合

CR9 および活性に重要な部位を除いたコントロール配列をビオチン化核酸として合成し、CR9 結合タンパク質の同定を試みた。精製原料はマウス心不全心ホモジネートし、分画したものを使用した。

5 回のショットガン解析の結果を集約し、8 個のタンパク質が結合タンパク質候補として同定され、CR9 を介する ANP, BNP 発現に寄与することを細胞アッセイ系などにより確認した。新規の分子が同定されると期待したが、これら既知の心臓に比較的特異的転写遺伝子の組み合わせがエンハンサー活性に重要であることが示された。

##### B) 光クロスリンクアミノ酸の導入による生体内タンパク質クロスリンク系の確立とエンハンサー結合タンパク質同定への応用

心臓における光クロスリンク用のベクターセットの作成に成功した。結合タンパク質はすでに同定されてしまったため、今後この手法を他の分野に応用する。

#### 同定された結合タンパク質の活性化経路の解析

CR9 のエンハンサー活性は前述したように、特定のシグナルではなく心不全の病態そのものに反応する可能性が示唆された。しかし心臓毒性を示す DOX 投与によりカテコラミンが誘導されて、カテコラミン受容体を介するシグナルがその活性化に関与している可能性は残る。臨床現場では左室の拡張末期圧がもっともよく ANP BNP 濃度と相関することが示されている。そこでメカニカルな刺激、あるいは心筋細胞への張力が CR9 の活性化に関与するかを検討した。

カテコラミンによる CR9 活性化は、ミオシンキナーゼ阻害剤で心筋の収縮を抑えると有意に抑制されることが示された。このこと

は、心筋細胞膜にかかるメカニカルストレスが CR9 の活性化に重要である可能性を示唆した。

さらにシリコン膜状の心筋細胞の引っ張り刺激 (Stretch) さらに大気圧を上昇させる刺激 (Pressure) により CR9 エンハンサー活性が増強することが示されたこのことは CR9 が細胞膜へのメカニカルな刺激により活性誘導されていることを示唆する。

#### 考察

ナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP) はその心不全における重要性にも関わらず、その発現調節システムは不明であった。これはとりあつた遺伝子である ANP, BNP の近傍には心不全で活性上昇するエンハンサーが存在せず、同定できていなかったことに起因する。今回、20kB 上流の 120bp の CR9 領域が、さまざまな病因の心不全で共通して刺激されるエンハンサーであることがしめされた。そして心筋細胞に対するメカニカルな刺激がその活性化につながることを示した。この事実は、ヒトでも心臓に対するメカニカルな刺激が ANP, BNP 発現上昇の引き金となっている可能性を示唆する。またエンハンサー刺激に必要な因子の同定にも成功したため、これらの成果は今後 ANP, BNP 発現誘導による心不全治療法の開発にも資すると期待される。

公的資金の補助はプロジェクトの推進に非常に役立ちました。深く感謝いたします。

#### 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 14 件 )

Beyond Homozygosity Mapping: Family-Control analysis based on Hamming distance for prioritizing variants in exome sequencing. Beyond Homozygosity Mapping: Family-Control analysis based on Hamming distance for prioritizing variants in exome sequencing. Imai A, Nakaya A, Fahiminiya S, Tetreault M, Majewski J, Sakata Y, Takashima S, Lathrop M, Ott J. Sci Rep. 2015 Jul 6;5:12028.

Usefulness and Limitation of Protein Mass Analysis. Takashima S. Circ J. 2015;79(12):2549-50.

Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. Kotani Y, Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K,

Takashima S, Hirata H, Nagata K. Sci Rep. 2015 Nov 4;5:16161.

A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart Failure. Kanzaki M, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Oiki E, Nishida T, Asanuma H, Kato H, Oka T, Ohtani T, Tsukamoto O, Higo S, Kioka H, Matsuoka K, Sawa Y, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S, Sakata Y. PLoS One. 2016 Feb 4;11(2):e0148209.

Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. Masumura Y, Higo S, Asano Y, Kato H, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Sci Rep. 2016 Jun 27;6:28592.

Targeted Therapy for Acute Autoimmune Myocarditis with Nano-Sized Liposomal FK506 in Rats. Okuda K, Fu HY, Matsuzaki T, Araki R, Tsuchida S, Thanikachalam PV, Fukuta T, Asai T, Yamato M, Sanada S, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Hanawa H, Hao H, Oku N, Takashima S, Kitakaze M, Sakata Y, Minamino T. PLoS One. 2016 Aug 8;11(8):e0160944.

Adenovirus vector-based incorporation of a photo-cross-linkable amino acid into proteins in human primary cells and cancerous cell lines. Kita A, Hino N, Higashi S, Hirota K, Narumi R, Adachi J, Takafuji K, Ishimoto K, Okada Y, Sakamoto K, Tomonaga T, Takashima S, Mizuguchi H, Doi T. Sci Rep. 2016 Nov 11;6:36946.

Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. Kotani Y, Morito D, Sakata K, Ainuki S, Sugihara M, Hatta T, Iemura SI, Takashima S, Natsume T, Nagata K. Sci Rep. 2017 Mar 9;7:44293.

Targeted Genome Replacement via Homology-directed Repair in Non-dividing Cardiomyocytes. Ishizu T, Higo S, Masumura Y, Kohama Y, Shiba M, Higo T, Shibamoto M, Nakagawa A, Morimoto S, Takashima S, Hikoso S, Sakata Y. Sci Rep. 2017 Aug 24;7(1):9363.

A specific single-stranded DNA induces a distinct conformational change in the

nucleoid-associated protein HU. Nishida Y, Ikeya T, Mikawa T, Inoue J, Ito Y, Shintani Y, Masui R, Kuramitsu S, Takashima S. Biochem Biophys Rep. 2016 Oct 11;8:318-324.

Novel Synthesized Radical-Containing Nanoparticles Limit Infarct Size Following Ischemia and Reperfusion in Canine Hearts. Asanuma H, Sanada S, Yoshitomi T, Sasaki H, Takahama H, Ihara M, Takahama H, Shinozaki Y, Mori H, Asakura M, Nakano A, Sugimachi M, Asano Y, Minamino T, Takashima S, Nagasaki Y, Kitakaze M. Cardiovasc Drugs Ther. 2017 Dec;31(5-6):501-510.

Heat Failure Phenotypes Induced by Knockdown of DAPIT in Zebrafish: A New Insight into Mechanism of Dilated Cardiomyopathy. Nagata Y, Yamagishi M, Konno T, Nakanishi C, Asano Y, Ito S, Nakajima Y, Seguchi O, Fujino N, Kawashiri MA, Takashima S, Kitakaze M, Hayashi K. Sci Rep. 2017 Dec 12;7(1):17417.

Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, Satoh M, Fujita K, Naito AT, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakanishi T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I. Sci Rep. 2018 Jan 31;8(1):1998.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://medbio.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 成二 (TAKASHIMA, Seiji)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：90379272

(2)研究分担者

朝野 仁裕 (ASANO, Yoshihiro)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号： 60527670

塚本 蔵 (TSUKAMOTO, Osamu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号： 80589151