

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15304

研究課題名(和文) ゲノム編集と発生期APJリガンドを活用した新しい心不全治療法の探索

研究課題名(英文) Application of genome editing and development-associated APJ ligand for exploring novel therapeutic candidates for heart failure

研究代表者

久場 敬司 (Keiji, Kuba)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10451915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、APJリガンドELABELA (ELA)を含め発生期にかかわる新規遺伝子群に着目して、ゲノム編集を用いた遺伝子変異マウス作製系で心機能調節における役割、意義を検討した。心不全モデルを用いた解析から、ELAは心機能改善作用を持ち、Apelinとは異なる経路によりレニン-アンジオテンシン系を真に制御することが分かった。また、CRISPR/Cas9ゲノム編集により新規の遺伝子欠損マウスを作製し、心機能解析を行った。さらに、G0世代のゲノム編集変異マウスで心機能低下を認めた心不全候補遺伝子8個について、マウスを交配し、機能解析を続けたところ、5遺伝子が心機能制御因子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of APJ ligand ELABELA and novel heart failure gene candidates in controlling heart functions by utilizing CRISPR/Cas9 genome editing in ES cells and functional analyses of G0 mice. ELA peptide treatment improved heart function and hypertrophy and reduced cardiac fibrosis in mice with TAC pressure overload. Mechanistically, ELA down-regulated transcription of ACE and thereby negatively regulates renin-angiotensin system. We also generated several new lines of mutant G0 mice for heart failure gene candidates and analyzed heart functions. Furthermore, we crossed the G0 mice for F1 and F2 generations and analyzed heart functions, leading to confirmation of 5 heart failure genes. The candidate approach with rapid generation and functional screening is efficient and useful in identifying novel heart failure genes and might contribute to boosting up cardiovascular research.

研究分野：分子心臓学

キーワード：ELABELA Apelin CRISPR/Cas9 heart failure

### 1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン系(RAS)は心血管系において生体恒常性の重要な役割を担っているが、アンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) は、Angiotensin II (Ang II) を Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) に変換することにより RAS を負に調節する。これまでに本研究者らは、ACE2 が SARS (重症急性呼吸器症候群) ウイルスのレセプターであることを実証し(Nat Med. 2005)、ACE2 が ARDS/急性肺傷害における急性炎症を阻止すること(Nature 2005)、ACE2 が腸内細菌叢の恒常性を維持して腸炎を抑制することを明らかにした(Nature 2012)。また、酸化ストレスを介した TLR4 受容体の活性化が急性肺障害の増悪化に寄与すること(Cell 2008)、脂肪酸シグナルと RNA 核外移行のクロストークがインフルエンザ重症化阻止に重要であることを発見した (Cell 2013)。

Ang II が ACE2 のメジャーな標的ペプチドである一方で、G タンパク質共役型受容体 APJ のリガンドとして同定された Apelin ペプチドも ACE2 により高効率に代謝されることが分かった。興味深いことに ACE2 遺伝子欠損マウスが加齢や圧負荷心不全モデルにおいて心機能低下を示すが、Apelin 遺伝子欠損マウスも同様に心機能低下の表現型を示すことを見出した(Circ Res. 2007)。すなわち、Apelin が ACE2 によって代謝され不活性化されると考えられる一方で、Apelin は ACE2 と同様に心機能を正に制御する因子であるというパラドックスが明らかになった。

そこで、Apelin 系と RAS 系の相互作用を明らかにする目的で、本研究者は Apelin 遺伝子欠損 (KO) マウスの心臓の遺伝子発現解析を行い、ACE2 の発現レベルが Apelin KO マウスにおいて著しく低下し、血漿中の Ang 1-7 ペプチドの発現量が低下していることを見出した。重要なことに Ang 1-7 を Apelin KO マウスに投与したところ、Apelin KO マウスの心機能低下が改善された。また、培養細胞での解析から、Apelin が ACE2 のプロモーター活性を上昇させて ACE2 の発現を制御することが分かった。さらに、圧負荷の AT1R KO マウスに Apelin ペプチドを投与したところ、Apelin は野生型マウスと同様に AT1R KO マウスの心機能を改善し、ACE2 の発現を上昇させたことから、Apelin が AT1R と独立に ACE2 を制御することが分かった。以上の結果から、Apelin 系と RAS 系の 2 つのシステムを ACE2 が共役させることが初めて明らかになった (J Clin Invest. 2013)。

さらに、Apelin の受容体 APJ に結合する第 2 のペプチドリガンド ELABELA がほぼ同時期に報告された(Dev Cell 2013; Science 2013)。ゼブラフィッシュの発生において、ELABELA が初期胚の外胚葉に発現し、心臓の初期発生に寄与することが解明された。ELABELA は、Apelin よりも早い段階から

発現し、APJ 受容体のリガンドとして機能することで心臓形成に関与すると考えられている。重要なことにアフリカツメガエル的心発生において、心臓原基で ACE2 の発現が誘導されることが報告されていることから、ACE2 の発現が Apelin、ELABELA による APJ 受容体の活性化を介したものである可能性も考えられている。一方で、成体における ELABELA の役割、意義については未解明であり、その解明は急務の課題であったことから本研究計画を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ELABELA を含め、発生期にかかわる新規遺伝子群に着目して、ゲノム編集を用いた遺伝子変異マウス作製系で心機能調節における役割、意義を検討することにより、心不全の病態発症機序の解明、新しい治療法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 心不全モデルマウスにおける ELABELA (ELA) の発現変動の解析:

これまでの解析から、APJ 受容体の発現レベルは心不全病態でほとんど変化がないのに対し、Apelin は心不全代償期に発現上昇を示し、非代償期に発現が低下することが分かっている。大動脈縮窄による圧負荷心不全モデル(TAC)やアンジオテンシン II 持続投与モデルにおける ELA mRNA の発現パターンを RT-qPCR で調べ、Apelin の発現変動と比較した。

#### 2) Apelin、ELA による心機能制御の作用機構の解析:

圧負荷心不全モデル(TAC)において、オスモティックポンプによる ELA ペプチドの持続投与を行い、ELA ペプチドに Apelin と同様に心臓に対する陽性変力作用があるかを心エコーなどで検討した。さらに現在、ELA 遺伝子欠損マウスを共同研究ベースで作製し、エコーによる心機能解析を行った。また、Apelin との作用効果を比較するために、Apelin と ELA の二重遺伝子欠損マウスを作製した。

また、Apelin により ACE2 の発現が誘導されるが、ELA も同様な作用をもつかどうかを *in vitro* の培養細胞を用いた ACE2 プロモーターレポーターアッセイで解析した。また、*in vivo* の ELA 投与を行ったマウス的心臓でも ACE2 の発現レベルを解析した。さらに、ELA が ACE2 による制御を受けるかどうか重要な点であるので、質量分析のシステムで、ELA ペプチドの C 末端が切断されるかを検討した。

#### 3) ゲノム編集による心臓形成遺伝子のゲノム変異マウス作製・解析:

これまでに RNAi スクリーニングにより取得した心臓発生に関与する遺伝子群ならびに

他のスクリーニング解析で報告されているものの看過された遺伝子群について、ES 細胞での CRISPR/Cas9 ゲノム編集により遺伝子変異マウスを作製した。シークエンス解析により、ES 細胞でゲノムの変異を確認、ES クローンを選別した後、ヘテロの遺伝子欠損の ES クローンを個体化し、G0 世代での心エコーによる心機能スクリーニングの解析を行った。さらに交配を進めて F1 世代以降での心機能の解析を進めた。

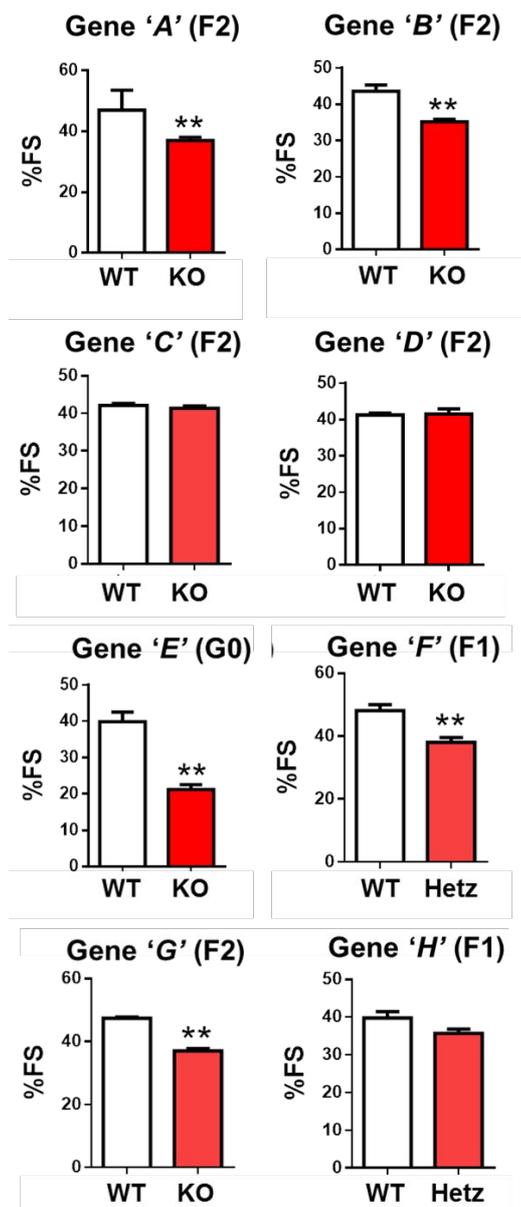
#### 4. 研究成果

1) 心不全モデルマウスにおける ELABELA (ELA) の発現変動の解析：大動脈縮窄による圧負荷心不全モデル (TAC) やアンジオテンシン II 持続投与モデルにおける ELA mRNA の発現パターンを調べたが、心不全ストレスにおける大きな発現変動は見られなかった。質量分析による解析から ELA ペプチドは ACE2 により C 末端アミノ酸が切断されなかったことから、ELA は Apelin とは異なり ACE2 による制御を受けないことが分かった。

2) ELA による心機能制御の作用機構の解析：TAC 心不全モデルにおいて、オスモティックポンプによる ELA ペプチドの持続投与を行ったところ、ELA ペプチドは Apelin と同様に心臓に対する陽性変力作用を持ち、有意に心肥大や線維化が抑制することが分かった。さらに ELA 遺伝子欠損マウスの準備を進め、ELA 遺伝子欠損マウスの心機能解析の予備的データを取得した。また、Apelin との作用効果を比較すると同時に、Apelin と ELA の二重遺伝子欠損マウスの作製を進めた。ELA は Angiotensin II に対し拮抗的に作用することによりレニン-アンジオテンシン系 (RAS 系) を抑制した。また、APJ KO マウスを用いた解析から、ELA は APJ 受容体依存的に心保護効果を発揮することが示された。また、*in vitro* の培養細胞を用いた ACE あるいは ACE2 のプロモーターレポーターアッセイを行ったところ、ELA は Apelin のように ACE2 の発現上昇は誘導しないもの、転写因子 FoxM1 の発現抑制を介して ACE の転写を阻害し、RAS 系の亢進を抑制することが明らかとなった。すなわち、ELA は Apelin とは違ったシグナル経路で心保護的に作用することが分かった。

2) ゲノム編集による心臓形成遺伝子のゲノム変異マウス作製・解析：RNAi スクリーニングにより取得した心臓発生に関与する遺伝子群ならびに他のスクリーニング解析で報告されているものの看過された遺伝子群について、ES 細胞での CRISPR/Cas9 ゲノム編集により 3 系統の遺伝子変異マウスを作製した。さらに、これらのマウスの G0 世代での心エコーによる心機能解析により、予備的なデータではあるが心機能に表現型を認めた。

3) 心不全病態における心不全関連の候補遺伝子の *in vivo* 機能解析：ゲノム編集により作製した 8 系統の遺伝子変異マウス (G0 世代) について、さらに交配を進めて F1、F2 世代以降での心機能の解析を行った。8 系統の遺伝子改変マウスについて、Taqman プローブによる遺伝子型タイピングの条件設定を行いながらマウスの交配、繁殖を進め、



Western blot により実際に蛋白の発現が欠失していることを確認した。3~6 か月齢の成体マウスで、心エコーによる心収縮能の検討ならびに心電図による伝導系のスクリーニングを行った。G0 世代のマウスで、8 系統のうち 6 系統で有意な心機能の低下を認め、2 系統では心機能の変化は明らかではなかった。F1 世代、F2 世代と交配を進めて、心エコーの解析を行ったところ、8 系統のうち 5 系統で交配を重ねても心機能低下の表現型が維持されることが分かった。

## 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 10 件)

1. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A, Fukamizu A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, \*Kuba K. (\*責任著者) ELABELA – APJ axis protects from pressure overload heart failure and Angiotensin II-induced cardiac damage. *Cardiovascular Research*, 113: 760-769, 2017. (査読有り)

2. Rodríguez-Gil A, Ritter O, Saul VV, Wilhelm J, Yang CY, Grosschedl R, Imai Y, Kuba K, Kracht M, \*Schmitz ML. The CCR4-NOT complex contributes to repression of Major Histocompatibility Complex class II transcription. *Scientific Reports*, 7: 3547, 2017. (査読有り)

3. Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodríguez Gil A, Mittler G, Imai Y, Kuba K, Grosschedl R. Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. *Genes & Development*. 30: 2310-2324, 2016. (査読有り)

4. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. *JCI Insight*. 2: e89462, 2017. (査読有り)

5. Koizumi Y, Nagai K, Hasumi K, Kuba K, Sugiyama T. Structure-activity relationship of cyclic pentapeptide malformins as fibrinolysis enhancers. *Bioorg Med Chem Lett*. 26:5267-5271, 2016. (査読有り)

6. Tanaka KI, Tamura F, Sugizaki T, Kawahara M, Kuba K, Imai Y, Mizushima T. Evaluation of Lecithinized Superoxide Dismutase for Prevention of Acute Respiratory Distress Syndrome in Animal Models. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016 Sep 26. [Epub ahead of print] (査読有り)

7. Sun Y, Guo F, Zou Z, Li C, Hong X, Zhao Y, Wang C, Wang H, Liu H, Yang P, Han Z, Liu K, Kuba K, Song B, Gao J, Mo Z, Li D, Li B, Li Q, Zhong N, Wang C, Penninger JM, Jiang C. Cationic nanoparticles

directly bind angiotensin-converting enzyme 2 and induce acute lung injury in mice. *Part Fibre Toxicol*. 12, 4, 2015. (査読有り)

8. Sato T, Watanabe H, Kimura A, Ito H, Imai Y, Kuba K. Apelin-APJ axis inhibits Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis via up-regulation of ACE2. The 79th Annual Scientific Meeting of JCS. Supplement to *Circulation Journal* 79: 210, 2015. (査読有り)

9. Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, Kuba K, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. *Cell Metabolism*. 20: 787-798, 2014. (査読有り)

10. Sato T, Kuba K, Watanabe H, Kimura A, Ito H, Imai Y. Apelin positively regulates Angiotensin Converting Enzyme 2(ACE2) in failing hearts. The 78th Annual Scientific Meeting of JCS, Supplement to *Circulation Journal* 78: 470, 2014. (査読有り)

{ 学会発表 } (計 17 件)

Keiji Kuba, CCR4-NOT complex controls adenine nucleotide metabolism and energy sensing in cardiac homeostasis. The 89th JBS meeting symposium, 26th September 2016, Sendai, Japan.

Teruki Sato, Tomokazu Yamaguchi, Hiroyuki Watanabe, Ayumi Kadowaki, Chitose Sato, Hiroshi Ito, Ymiko Imai, Keiji Kuba (2016) Dissecting the functional role of A Novel APJ ligand, ELABELA, in heart failure. 第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月、横浜 (英語、口頭発表)

Tomokazu Yamaguchi, Takashi Suzuki, Teruki Sato, Miyuki Natsui, Ayumi Kadowaki, Chitose Sato, Yukio Koizumi, Akinori Takahashi, Tadashi Yamamoto, Yumiko Imai, Keiji Kuba (2016) Analysis for the role of CCR4-NOT complex in regulation of adenine nucleotide

metabolism in the hearts. 第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月、横浜（英語、口頭発表）

小泉幸央、山口智和、門脇歩美、夏井美幸、佐藤チトセ、今井由美子、久場敬司：Cnot3 による ES 細胞の細胞周期制御機構の解析、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年 9 月、仙台（ポスター発表）

山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司：CCR4-NOT 複合体によるアデニン核酸代謝制御の分子機構の解析、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年 9 月、仙台（ポスター発表）

佐藤輝紀、山口智和、渡邊博之、門脇歩美、佐藤チトセ、伊藤宏、今井由美子、久場敬司：心不全病態における新規 APJ リガンド ELABELA の機能的意義の解明、第 26 回 日本循環薬理学会、2016 年 12 月、松本（口頭発表）

山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司：心臓の mRNA poly(A)分解とエネルギー感知シグナルの相互作用機構の解明、第 26 回 日本循環薬理学会、2016 年 12 月、松本（口頭発表）

Kuba, K. Signaling network to maintain cardiac homeostasis in failing hearts. The 4th Hsien Wu and Ray Wu Symposia “Proteins, Genes and Diseases”, August 2015, Beijing, China.（招待講演）

山口智和、門脇歩美、小泉幸央、夏井美幸、佐藤チトセ、今井由美子、久場敬司：Dissecting the role of CCR4-NOT associated ubiquitin converting enzyme in controlling heart functions. 第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月、名古屋（ポスター発表）

小泉幸央、山口智和、久場敬司：A crucial role of CNOT3 in stem cell proliferation and early embryonic development. 第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月、名古屋（口頭発表）

Kuba, K. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) links Apelin and angiotensin systems in controlling heart function. 第 120 回 日本解剖学会・第 92 回 日本生理学会合同大会 シンポジウム アンジオテンシンによる循環構造・機能調節研究の最前線、2015 年 3 月、神戸（口頭発表）

久場敬司：mRNA 分解制御を介した心臓の

恒常性維持、第 1 回 J-ISCP 学術集会（国際心血管薬物療法学会日本部会）医学・薬学ジョイントシンポジウム 心不全の分子病態と薬物治療、2015 年 6 月、京都（口頭発表）

山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司（2015）CCR4-NOT 複合体によるアデニン核酸制御機構の解析、第 17 回日本 RNA 学会、2015 年 7 月、札幌（口頭発表）

久場敬司：RNA 分解制御による心臓エネルギー恒常性維持の分子機構、BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大会）、2015 年 12 月、神戸（口頭発表）

久場敬司：酵母からヒトまで保存された CCR4-NOT 複合体による心機能制御メカニズム、第 24 回 日本循環薬理学会 シンポジウム、2014 年 12 月、山形（口頭発表）

久場敬司：CCR4-NOT deadenylase complex links mRNA metabolism to energy sensing in cardiac homeostasis、第 31 回 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会、2014 年 11 月、名古屋（口頭発表）

久場敬司：Dissecting the mechanisms for regulation of cardiac energy metabolism by CCR4-NOT complex、第 16 回 日本 RNA 学会年会、2014 年 7 月、名古屋（口頭発表）

〔図書〕(計 1 件)

久場敬司 ACE2 の多彩な生理機能 . Angiotensin Research 12, 12-17, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久場敬司 (Keiji Kuba)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10451915