

令和元年6月6日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09504

研究課題名(和文) マイクロRNAによる心不全病態形成の分子機構解明

研究課題名(英文) The role of microRNA in molecular mechanism of heart failure development

研究代表者

宮田 敬士 (Miyata, Keishi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授

研究者番号：50398228

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)：近年、運動誘導性miRNAが報告されているが、その心保護作用について明らかになっていない。本研究では、運動負荷モデルマウスにおいて血中及び心臓でのmiR-221及びmiR-222の明らかな発現上昇を認めた。また心不全病態モデルマウスにおいて心臓でのmiR-221及びmiR-222の明らかな発現上昇を認めた。さらに、心筋特異的miR-221/222欠損マウスを用いた心不全病態モデルの作製、検討を行い、心臓におけるmiR-221及びmiR-222の心保護作用を明らかにした。運動により発現誘導されるmiR-221及びmiR-222により心不全病態進展が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では運動によって誘導されるmiR-221及びmiR-222が心不全病態形成において心保護作用を示すこと、さらにその標的遺伝子を同定し、新たな心不全発症病態の分子機構を見出した。運動により産生・分泌されるmiR-221及びmiR-222の運動による組織部位だけでなく時間的な発現パターンを含めた分子機構が解明されれば、運動由来のmiRNAの心保護作用の観点からヒト心不全の新規予防・治療法開発に繋がる基盤研究となり大きく期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that miRNA is induced by exercise training. However, it is unclear whether the exercise-induced miRNAs have a cardioprotective function. We found that exercise training significantly increased the expression levels of miR-221 and miR-222 in serum and whole heart tissue compared with sedentary control mice. And pressure overload-induced cardiac stress following transverse aorta constriction (TAC) mouse model also markedly increased the expression levels of miR-221 and miR-222 in whole heart tissue compared with controls. Furthermore, cardiomyocyte-specific miR-221/222 KO mice with TAC operation were predisposed to heart failure development. Taken together, we indicated that miR-221 and miR-222 have a cardioprotective function. The study suggests that exercise-induced miR-221 and miR-222 may attenuate the development of heart failure.

研究分野：分子生物学

キーワード：心不全 運動 miR-221 miR-222

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

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦では高齢化社会に伴って高血圧症に罹患する患者が増加し、それに起因する圧負荷心肥大の管理が重要な課題となっている。心肥大は生体の要求に応じた代償反応として生理的に重要な機構であるが、最終的には心不全という心機能破綻に繋がる現象と捉えられる。心不全に罹患した場合、New York Heart Association(NYHA)分類 I~II 度の軽症の心不全では、1 年に 5~10%が死亡し、NYHA 分類 IV 度の重症においては、1 年に 50~60%が死亡しており、心不全は発症してから重症化すると予後不良の病態である。本邦の平成 29 年度人口動態統計の疾患別死亡において、悪性新生物(がん)が一番多く、総死亡約 130 万人のうち約 38 万人であり、次に心疾患で約 20 万人であり、そのうち約 8 万人が心不全で死亡している。超高齢社会へと突入した本邦においては、高齢者の心不全が増加しており、医療負担だけでなく医療経済において大きな社会問題となりつつある。心不全の新規治療及び予防法の開発に向けて、心不全発症・進展に関する分子的なメカニズムの解明が急がれている。薬物治療および外科的治療がなされ、状態の安定した慢性心不全では、安静によるコンディショニングは運動耐容能の低下を助長する共に、労作時の易疲労感や呼吸困難等の症状を悪化させる要因となる。しかし、心不全に対する運動療法は左室リモデリングを起こすことなく、左室拡張末期容積を減少して運動耐容能を改善することが明らかにされている(Flynn KE *et al.*, JAMA, 2009, O'Connor CM *et al.*, JAMA, 2009)。心不全の病態形成には心筋肥大、アポトーシス、線維化といった心筋リモデリングが重要な役割を持っている事が明らかになっており、心肥大の病態形成に関わる分子機構やその促進因子の解明が進んでいるものの、心臓リハビリ等の運動を含めた抑制因子に関する報告は極めて少ない。しかし、最近、運動により心臓の microRNA(miRNA)による心不全病態への抑制効果の報告があり注目を集めている(Liu *et al.*, Cell Metab, 2015)。運動による心保護作用については明らかになっているが、運動により miRNA を介した心保護作用とその miRNA の産生・分泌組織についての詳細な分子メカニズムについては十分に解明されていない。

2. 研究の目的

miR-221 及び miR-222 とその標的遺伝子による心保護作用について運動負荷および心不全病態モデルマウスを用いて分子機構の解明を行う。この研究より運動由来 miRNA の心不全病態における心保護作用という新たな観点から心不全の新規予防・治療法開発に向けて基盤研究を行う。

3. 研究の方法

1)運動負荷モデルにおける各臓器の miRNA、標的遺伝子の発現解析

トレッドミル強制運動負荷装置(MK-690S/RM、室町機械)を用いて 10 週齢 C57BL/6N 雄マウス(日本クレア)を warm-up treadmill running として 15 分間(5 m/min を 5 分間→10m/min を 5 分間→15m/min を 5 分間) 走行させた後、20m/min で 60 分間走行させる。単回運動の場合は、60 分間の 1 回の走行のみで、繰り返し運動の場合は単回運動を 1 日 1 回、1 週間に 5 日で 3 週間のプロトコルで行う。運動負荷前と繰り返し運動の終了時には、心エコーにおける心機能解析、組織解析、qRT-PCR による mRNA 発現解析およびタンパク解析を行う。

また、安静時、単回運動後、単回運動 3 時間後、繰り返し運動後に採血、心臓、大動脈(胸部)、骨格筋(腓腹筋、ヒラメ筋)、皮膚(背部)、内臓脂肪組織(精巣上体)、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓、腎臓を摘出し、それぞれの組織より RNA を抽出し、qRT-PCR を行う。

2)心不全病態モデルにおける心臓における miRNA、標的遺伝子の発現解析

10 週齢 C57BL/6N 雄マウスを用いて横行大動脈縮窄(transverse aorta constriction; TAC)による圧負荷心不全マウスモデルを作製する。TAC モデル術後に動物用超音波解像度イメージングシステム(Vevo2100;Visula Sonics Inc.)により詳細な心機能測定を行う。また組織解析、心臓より RNA を抽出し、qRT-PCR を行う。

3) miR-221/222 の標的遺伝子の網羅的解析

10 週齢雄の心筋特異的 miR-221/222 欠損マウス(miR-221/222 conditional KO; α MHC-Cre Tg)とコントロールマウス(miR-221/222 conditional KO)より心臓を摘出後、タンパク抽出を行い、LC/MS (Ultimate3000(Thermo Fisher Scientific))を用いてプロテオーム解析を行う。収集したデータを用いて label-free quantification (LFQ) annotation 解析及び分析を行う。

4. 研究成果

1)運動負荷モデルにおける各臓器の miRNA、標的遺伝子の発現解析

野生型を用いて安静時における miR-221 及び miR-222 の組織における発現部位の解析を行い、miR-221 は心臓と比較し、2 倍以上の有意に高発現する組織は認めなかった。一方、miR-222 は、心臓と比較し 2 倍以上の有意に高発現を認めた組織は大動脈、肺、褐色脂肪

組織であった。次にトレッドミル強制運動負荷を行い、miR-221 および miR-222 の運動による組織の発現解析を検討した。単回運動における血中 miR-221 及び miR-222 の発現は、運動直後が安静時に比べ、どちらとも約 3 倍程に有意な上昇を認め、運動 3 時間後は安静時の発現に軽減した。さらに、繰り返し運動についても検討を行った。繰り返し運動の心機能解析を検討したところ、心収縮率の明らかな上昇、軽度の壁肥厚、心不全マーカーである ANP、BNP mRNA の明らかな発現減少、PGC1- α 、PPAR α mRNA の明らかな発現上昇を認める心機能亢進を示した。この繰り返し運動モデルにおいて血中 miR-221 及び miR-222 のどちらとも安静時の 5 倍以上の有意な発現上昇を認めた。以前の報告と同様に血中 miR-221 及び miR-222 は運動により上昇し、さらに長期間の運動継続においても発現上昇を確認した。次に、単回及び繰り返し運動モデルにおける心組織における miR-221 及び miR-222 の発現検討を行った。単回運動直後の心臓における miR-221 及び miR-222 は発現は安静時と比べ、差異を認めなかったが、運動 3 時間後は明らかな発現上昇を認めた。さらに繰り返し運動においては miR-221 及び miR-222 はともに安静時の 40-50% の明らかな発現低下を認めた。

心組織以外の臓器における運動による miR-221 及び miR-222 の発現を検討した。単回および繰り返し運動による miR-221 の発現臓器に関して、安静時に比べ明らかな上昇を認めた臓器は、大動脈、褐色脂肪組織、内臓脂肪組織、骨格筋であった。これらの結果より、繰り返し運動による上昇を認める血中 miR-221 の発現の主な分泌・産生組織は大動脈、褐色脂肪組織、内臓脂肪組織、骨格筋の可能性が考えられた。一方、miR-222 に関しては、安静時に比べ、褐色脂肪組織において発現上昇の傾向を認めるのみで、繰り返し運動による血中 miR-222 の発現の主な分泌・産生組織は褐色脂肪組織の可能性が考えられた。

以上より、miR-221 及び miR-222 は持続的な運動により組織の発現パターンの変化を認め、運動による血中の発現変化については単一組織ではなく、複数の組織により分泌・産生が行われている可能性が示唆された。

2)心不全病態形成における心臓由来 miR-221/222 の機能解析

心不全病態における心臓由来 miR-221 及び miR-222 の発現を解析するために、野生型マウスに TAC モデル作製を行った。TAC 群は sham (コントロール) 群に比べ、miR-221 及び miR-222 のどちらとも明らかな発現上昇を認めた。心不全病態形成において miR-221 及び miR-222 の関与が示唆された。心臓由来 miR-221 及び miR-222 の心不全病態における作用機構を生体で検証するために心筋特異的遺伝子欠損マウス (miR-221/222 conditional knockout; α MHC-Cre Tg) のラインを樹立した。miR-221 と miR-222 は、X 染色体に連続する形で cluster として存在しており、今回は miR-221 と miR-222 両方を標的とした conditional knockout マウスを使用し、TAC モデルを作製を行い解析を行った。まず、sham において、miR-221/222 cKO; α MHC-Cre Tg マウスは、miR-221/222 cKO マウスと比較して、体重当たりの心重量は変わらず、左室内腔径は軽度の拡大を認めたが、左室内径短縮率 (FS) の差異を認めなかった。一方、TAC 術 4 週後において、miR-221/222 cKO; α MHC-Cre Tg マウスは、miR-221/222 cKO マウスに比べ、体重当たりの心重量および肺重量の増加、心エコーでは左室内腔径の明らかな拡大、FS の低下、心不全マーカーである ANP、BNP mRNA の明らかな発現上昇を伴う心不全の明らかな悪化を認めた。

以上より、心臓由来 miR-221 及び miR-222 は、心不全病態形成において抑制作用を有することが明らかとなった。

3)miR-221/222 の標的遺伝子の解析

miR-221/222 の標的遺伝子を探索するために、miRwalk, miRNAD, Target Scan の web データベースより標的遺伝子の候補を検索し、心臓において特に高発現を認める複数の遺伝子を見出した。その後、実際 miR-221/222 の候補となった遺伝子の mRNA 3'UTR の結合実験を検討するため、Luc 活性が観察可能な plasmid vector に候補遺伝子 mRNA 3'UTR を結合させ、miR-221 及び miR-222 強制発現ベクターとともに新生児ラット心臓由来初代心筋細胞を用いてトランスフェクションを行った。さらに、miR-221/222 結合予想部位を欠損させたベクターについても作製し、同様な実験を行った。その結果、結合部位に miR-221 及び miR-222 の結合を認める Angiopoietin-related protein2 (ANGPTL2) 遺伝子を見出した。ANGPTL2 が生体においても miR221/222 の標的遺伝子として作用していることを確認するために心筋特異的遺伝子欠損マウス (miR-221/222 cKO; α MHC-Cre Tg) を用いて心臓における ANGPTL2 のタンパク発現解析を行った。まず、野生型マウスを用いてトレッドミル運動負荷を行い、心臓における ANGPTL2 タンパク発現を検討した。安静時と比べ、運動後、心臓において miR-221、miR-222 の発現上昇と ANGPTL2 タンパク質の明らかな発現低下を認めた。次に miR-221/222 cKO; α MHC-Cre Tg マウスを用いて同様に運動負荷を行い、心臓の ANGPTL2 タンパク質の発現を検討したところ、miR-221/222 cKO マウスでは安静時に比べ、ANGPTL2 タンパク質の有意な発現低下を認めたが、miR-221/222 cKO; α MHC-Cre Tg マウスでは ANGPTL2 タンパク質の発現低下を認めなかった。以上より、生体において運動より発現誘導される心臓由来 miR-221 及び miR-222 は、心臓における ANGPTL2 タンパク質の発現抑制作用を有しており、*in vitro* だけでなく、*in vivo* 実験においても ANGPTL2

は miR-221 及び miR-222 の標的遺伝子であることを確認した。さらに、心不全病態と ANGPTL2 の関連を解析するため、種々の *Angptl2* 遺伝子改変マウスを用いて TAC モデル作製を行い、それぞれの心機能の検討を行った結果、心臓における ANGPTL2 の発現低下は、心不全病態悪化の抑制を認め、逆に心臓における ANGPTL2 の発現上昇は心不全病態悪化の進展を認めた。このことより心臓における miR-221/222 - ANGPTL2 signal pathway は、心不全病態形成抑制の一つの経路であることを見出した。

次に、心臓由来の miR-221/222 の標的遺伝子を網羅的に同定するために心筋特異的 miR-221/222 欠損 (*miR-221/222* cKO;*αMHC-Cre* Tg)マウスとコントロール(*miR-221/222* cKO)マウスの心臓組織を用いてプロテオーム解析を行った。その結果、有意な変化を認めるタンパク質 71 個を同定した(p -value<0.05; fold change>1.3)。これらのデータを用いてラベルフリー定量アノテーション解析を行い、変動を認めたタンパク質の多くは代謝、分子機能や細胞構造と関係しており、その中で発現上昇を認めたタンパク質は、主に代謝、脂質結合、ミトコンドリア代謝に関与していた。さらに条件を絞るために、 p -value<0.01; fold change>2.0 にカットオフ値を設定し再解析を行ったところ、12 個の上昇を認めたタンパクと 5 個の低下を認めたタンパクが同定された。これらのタンパク質のデータより心筋細胞由来 miR-221/222 は心臓ミトコンドリアや脂質代謝を制御している可能性を示唆された。上昇を認めたタンパク質の遺伝子配列について miRWalk2.0 より miR-221、miR-222 の結合の有無を調べた結果、データベース上、結合配列を有している標的遺伝子は Sulfite Oxidase (*Suox*)遺伝子であり、miR-221、miR-222 は、この遺伝子と結合し、翻訳抑制に作用している可能性が示唆された。現在、これらの遺伝子について Luc 活性にて確認を進めている。

今回の結果は、miRNA 制御機構の観点より心不全病態形成の発症・進展の分子機構解明を行った新たな知見であり、miRNA より制御される遺伝子と心不全病態形成の関連を明らかにすることで、マウスからヒトへの新規治療法だけでなく biomarker の開発も含めた予防医学の可能性も秘めており、大変有用かつ意義の高い成果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nat Commun*. 2016;7:13016. doi:10.1038/ncomms13016. (査読あり, co-first author)

2. Tian Z, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Kadomatsu T, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Sato M, Terada K, Okumura T, Murohara T, Oike Y. Circulating ANGPTL2 Levels Increase in Humans and Mice Exhibiting Cardiac Dysfunction. *Circ J*. 2018;82(2):437-447. doi:10.1253/circj.CJ-17-0327. (査読あり, co-first author)

3. Zhao J, Tian Z, Kadomatsu T, Xie P, Miyata K, Sugizaki T, Endo M, Zhu S, Fann H, Horiguchi H, Morinaga J, Terada K, Yoshizawa T, Yamagata K, Oike Y. Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice. *J Biol Chem*. 2018;293(5):1596-1609. doi:10.1074/jbc.M117.814996. (査読あり)

4. Sato M, Miyata K, Tian Z, Kadomatsu T, Ujihara Y, Morinaga J, Horiguchi H, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Igata K, Muramatsu M, Minami T, Ito T, Bianchi ME, Mohri S, Araki K, Node K, Oike Y. Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice. *Circ J*. 2019;83(2):368-378. doi:10.1253/circj.CJ-18-0925. (査読あり, co-first author)

〔学会発表〕(計1件)

1. Keishi Miyata, Endurance exercise-induced miR221/222 promotes cardioprotection via ANGPTL2 suppression., 第81回日本循環器学会学術集会 2017年03月17日, 石川県金沢市

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。