

令和元年6月19日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18876

研究課題名(和文) アルギニンメチル化酵素PRMT5による心不全発症機構の解析と薬物治療への応用

研究課題名(英文) Application of PRMT5 targeted pharmacological therapy for heart failure

研究代表者

刀坂 泰史 (Katanasaka, Yasufumi)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00583973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PRMT5を標的とする心不全分子標的薬物治療の可能性を明らかにすることを目的とする。その結果、心臓特異的PRMT5過剰発現マウスにおいて、p300のHAT活性が亢進していた。PRMT5選択的阻害剤の投与により、圧負荷応答性心肥大の抑制、心不全の進展が抑制された。これらの結果から、PRMT5はヒストンアセチル化酵素p300を介して、心肥大反応および心不全を促進することが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、世界で初めてアルギニンメチル化酵素を標的とする心不全薬物療法の可能性を示した。これは学術的にはもちろん、いまだ十分とは言えない心不全薬物治療の新たな可能性を示しており、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We investigate the potential of heart failure therapy targeting PRMT5. Pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure are suppressed by treatment with PRMT5 inhibitor. PRMT5 enhances p300 histone acetyltransferase activity in heart. These results indicate that PRMT5 is a possible molecular target for heart failure therapy.

研究分野：生物系薬学

キーワード：アルギニンメチル化酵素 心肥大 心不全 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全は高血圧性心疾患、弁膜症、虚血性心疾患など種々の心疾患の共通最終像であり非常に予後が悪く、十分な治療法の開発には至っていない。心肥大とは、高血圧や心筋梗塞などのストレスに対して、個々の心筋細胞が肥大する代償機構のことである。心肥大は、心不全発症における重要な危険因子であり、持続的なストレス負荷により、肥大による代償機構は破綻し、心不全へと移行する。この時、心筋細胞内で様々な遺伝子発現が変化し、心不全発症に寄与することが知られているが、非常に複雑な過程であることから、いまだ完全な解明には至っていない。

2. 研究の目的

当研究室では、心筋細胞核内転写機構に着目し、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を有する p300 と心筋特異的転写因子 GATA4 の協力 (p300/GATA4 転写経路) が心肥大とそれに続く心不全発症における遺伝子発現調節 (心肥大転写反応) に極めて重要であること、さらに p300HAT 阻害活性を有するクルクミンが、心不全の進行を抑制することを証明し、p300/GATA4 経路が有望な治療標的となることを示した。p300/GATA4 経路は様々な分子によって制御されていることが推測され、この制御機構の解明を目的として GATA4 結合タンパク質の網羅的解析を行い、73 個の新規 GATA4 結合タンパク質を同定した。これらの中から、申請者は新規 GATA4 結合分子として、アルギニンメチル化酵素 Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) とその活性制御因子である Methylosome protein 50 (MEP50) を同定し、心肥大転写反応における機能解析を行ってきた。申請者らは心肥大から心不全発症における遺伝子発現を制御している心筋特異的転写因子 GATA4 の新規結合分子としてアルギニンメチル化酵素 PRMT5 とその活性制御因子 MEP50 を同定し、PRMT5/MEP50 複合体が心不全発症に促進的に働くことを見出したが、治療薬の開発応用にはいまだ課題が多く残されている。本研究では、PRMT5/MEP50 複合体による心肥大及び心不全発症の分子機構、および PRMT5 を標的とする心不全分子標的薬物治療の可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究目的は心肥大及び心不全発症における PRMT5/MEP50 複合体の役割を明らかにし、心不全治療へと応用することである。これまでの研究結果から、「PRMT5/MEP50 複合体は p300 をメチル化し、p300 の HAT 活性を制御することで、GATA4 による心肥大転写反応を促進させ、心不全発症を促進する」という仮説を考えた。明らかにすべき課題として以下のことが挙げられる。

- (1) GATA4 誘導転写反応における p300 アルギニンメチル化の役割 (PRMT5-TG における p300/GATA4 転写活性、p300 のアルギニンメチル化部位、p300 アルギニンメチル化の役割)
- (2) PRMT5 標的心不全治療の有用性 (PRMT5 阻害剤の治療効果)

4. 研究成果

本研究結果の概要を下記および図 1 にまとめた。

- (1) GATA4 誘導転写反応における p300 アルギニンメチル化の役割

PRMT5-TG の心臓において、ヒストン H3R2、H4R3 の対照的なジメチル化とヒストン H3K9 と K14 のアセチル化が亢進していた。さらに核画分内の HAT 活性を測定した結果、TG マウスにおいて HAT 活性の有意な亢進がみられた。この TG による HAT 活性の亢進は p300 特異的阻害剤である C646 により抑制された。

HEK293T 細胞に p300 と PRMT5 を共発現して IP-WB を行った結果、PRMT5 による p300 のメチル化が確認され、このメチル化は酵素活性欠損型 PRMT5 では認められなかった。GST

pull-down assay により p300 と PRMT5 が直接的に結合することを明らかにした。またその結合部位は複数であり、p300 (aa1-450) および p300 (aa1514-1922) に結合が確認された。メチル化アッセイを行った結果、p300 (aa1-450) がメチル化した、aa1514-1922 はメチル化が確認できなかった。さらに 1-450 部位に含まれるアルギニンをリジンに変異させた mutant を作成し、in vitro methylation assay を行った結果、PRMT5 による p300 のメチル化部位は R200 であることが示唆された。また PRMT5 は GATA4 とも結合することが確認された。しかし、メチル化アッセイの結果、PRMT5 による GATA4 のメチル化は確認できなかった。

(2) PRMT5 標的心不全治療の有用性

大動脈狭窄術を施したマウスに PRMT5 特異的阻害剤である EPZ015666 を経口投与し、各種項目を評価した。結果の要旨は下記である。

①PRMT5 阻害剤は TAC による心肥大を抑制した。

大動脈狭窄術を施したマウスから心臓を摘出し、重量を測定した。その結果、溶媒投与群と比較して、PRMT5 阻害剤投与群では心体重比が有意に減少していた。

②PRMT5 阻害剤は TAC による左室収縮能の低下を抑制した。

大動脈狭窄術を施したマウスの心臓超音波検査を行い、心機能の指標である左室短縮率および左室区出率を算出した。その結果、溶媒投与群と比較して、PRMT5 阻害剤投与群では左室短縮率および左室区出率が有意に改善していた。

③HE 染色およびマッソントリクローム染色の結果、PRMT5 阻害剤は心筋細胞の肥大および線維化を抑制した。

大動脈狭窄術を施したマウスから心臓を摘出し、切片を作成後、HE 染色およびマッソントリクローム染色を行った。その結果、溶媒投与群と比較して、PRMT5 阻害剤投与群では心筋細胞肥大が有意に減少していた。また心臓の線維化も減少していた。

④リアルタイム PCR 解析の結果より PRMT5 阻害剤は心肥大マーカーの発現を抑制した。

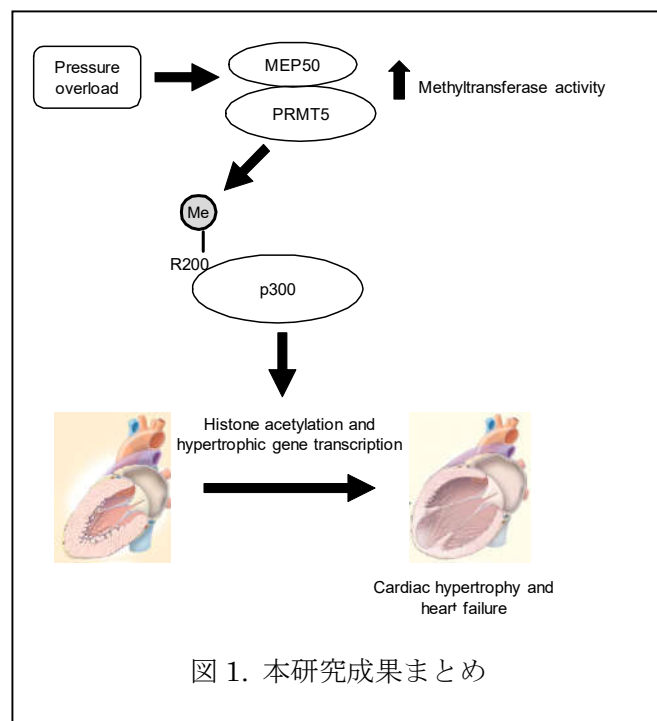
マウスから心臓を摘出し、mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を行った。その結果、溶媒投与群と比較して、PRMT5 阻害剤投与群では心筋細胞肥大マーカーである ANP および β MHC の発現が有意に減少していた。

以上の結果より、本研究より PRMT5 阻害剤は心肥大および心不全の発症を抑制することが示唆され、心筋細胞の核内メチル化シグナルを標的としたこれまでにない新たな治療標的となり得ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, Zuriaga MA, Yoshiyama M,



Goukassian D, Cooper MA, Fuster JJ and Walsh K. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1beta/NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:875-886.

2. Sano S, Oshima K, Wang Y, Katanasaka Y, Sano M and Walsh K. CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018;123:335-341.
3. Katanasaka Y. Development of Targeted Pharmacotherapy for Cardiovascular Disease. *Yakugaku Zasshi*. 2017;137:1349-1353.
4. Suzuki H, Katanasaka Y, Sunagawa Y, Miyazaki Y, Funamoto M, Wada H, Hasegawa K and Morimoto T. Tyrosine phosphorylation of RACK1 triggers cardiomyocyte hypertrophy by regulating the interaction between p300 and GATA4. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:1544-1557.
5. Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, Hasegawa K and Morimoto T. Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure. *Int Heart J*. 2016;57:672-675.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 刀坂泰史、本多大樹、佐藤光、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也：圧負荷応答性心不全に対する PRMT5 選択的阻害剤 EPZ015666 の薬理作用の検討
第 28 回日本循環薬理学会、2018 年
2. 刀坂泰史、佐藤光、櫻井涼賀、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也：アルギニンメチル化酵素 PRMT5 を標的とした心不全分子標的療法
日本薬学会第 138 年会、2018 年
3. Yasufumi Katanasaka, Ryoga Sakurai, Yuya Hojo, Yusuke Tsutsui, Yusuke Miyazaki, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto : Cardiac-specific PRMT5 overexpression accelerates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure、第一回日本循環器学会基礎研究フォーラム、2018 年
4. Yasufumi Katanasaka, Ayumi Saito, Yoichi Sunagawa, Takehide Akimoto, Riki Ueki, Mitsuru Kitano, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Genichi Sakaguchi, Tatsuya Morimoto : Wnt5a and Angiopoietin-like 4 expressions in epicardial adipose tissue were significantly increased in patients with coronary artery diseases、第 80 回日本循環器学会学術集会、2016 年
5. 刀坂泰史、若林弘樹、櫻井涼賀、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也：アルギニンメチル化酵素 PRMT5 は加齢に伴う心肥大を促進する、第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：心疾患治療用組成物

発明者：森本達也、刀坂泰史、宮崎雄輔、砂川陽一、大庭知慧、夏目みどり、長谷川浩二

権利者：静岡県公立大学法人、株式会社 明治、独立行政法人国立病院機構

種類：

番号：特願 2018-086629

出願年：2018 年 4 月 27 日

国内外の別： 国内

○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。