

令和元年6月14日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19410

研究課題名(和文) miRNAを用いたコリン作動性心筋保護システム賦活化による虚血性心疾患の病態制御

研究課題名(英文) Activation of cardioprotective cholinergic system by miRNA in ischemic heart disease

研究代表者

戸高 寛 (TODAKA, Hiroshi)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：80769662

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)：本研究により、虚血性心疾患モデルの病態部においてAChEのスプライシングバリエーションのひとつであるAChE-Rの発現が増加することが明らかとなった。加えて、心筋細胞におけるAChE-Rの機能解析を行った結果、AChE-Rの発現増加は虚血ストレス刺激に対する抵抗性の獲得を促し、細胞の生存率を上昇させることが見出された。これらの結果より、AChE-Rは虚血性心疾患における心筋保護機能があることが示唆され、AChE-Rを基軸とした新たな分子治療法の足掛かりになる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AChEは、近年、神経伝達に関与しない組織や細胞に発現することが次々と明らかになってきており、その発現部位および機能の再考が求められている。本研究により、新たにAChE-Rが心臓において発現すること、および虚血ストレスに応じた心筋AChE-Rの発現増加することが明らかとなった。さらにAChE-Rの発現増加が虚血ストレスによる細胞死を抑制することが示唆された。これらの虚血ストレス刺激におけるAChE-Rの細胞死の抑制機構の解明は、心臓のみならず他の組織における虚血ストレスにおいても反映する可能性が高く、虚血性疾患の治療への足掛かりとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Acetylcholinesterase (AChE) terminates synaptic transmission at cholinergic synapses by hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine. Recently, AChE was found to express in non-cholinergic cells and play a role in non-hydrolytic functions. However, the expression and the function of AChE in cardiac tissue after ischemic heart disease is still unclear. To verify this, we measured the expression of AChE in ischemic heart disease mice and cell models. The expression of AChE-R, AChE splicing variant, was significantly elevated in the both models. Moreover, overexpression of AChE-R in cardiomyocyte cell line suppressed the cell death under the ischemic stress. These results suggest that the upregulation of AChE-R in ischemic heart disease may protective role in myocardium salvage under the ischemic stress.

研究分野：医歯薬学

キーワード：虚血性心疾患 心筋保護 アセチルコリンエステラーゼ アセチルコリン 細胞死

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は現代の高齢化社会における死因第二位とされており、それに対する治療法開発および予防対策は循環器領域の基礎・臨床研究における重要課題の一つである。虚血性心疾患、特に心筋梗塞は、幅広い重症度の病態を含み、医療技術や治療法が大きく進歩した現代においてもなお予後の悪い重篤な疾患である。また、適切な治療により血行を再建しても、再灌流による心筋への障害が病態の悪化に働く。梗塞領域周辺部、あるいは再灌流領域において残存心筋細胞がアポトーシスにより大量に失われ、これによる心臓ポンプ機能の低下が虚血性心疾患の予後不良因子の一つに挙げられている。従って、虚血および再灌流刺激誘導性のプログラム細胞死を抑制することが残存心筋細胞数の増加と組織障害の軽減を促し、虚血性心疾患の予後改善に繋がると考えられている。これを受けて、臨床応用を見据えた新たな心筋保護療法に関する基礎研究の遂行と成功が強く望まれている。

2. 研究の目的

申請者が所属する研究グループは、これまでに、心筋細胞から産生・遊離したアセチルコリン (ACh) が虚血による障害から近傍細胞を保護する「コリン作動性心筋保護システム」を見出した。このシステムには、虚血耐性獲得機構の活性化や血管新生の促進、抗アポトーシス作用、再灌流障害の抑制が含まれており、これらは心臓特異的 ACh 過剰発現マウスにおいても確認された。しかしながら、他の研究グループより、様々な細胞および臓器における虚血ストレスは ACh 分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の発現を上昇させることが報告され、AChE が心筋保護作用の抑制因子として、あるいは、虚血性心疾患の増悪因子として作用することが示唆されている。そこで本研究では 虚血ストレス刺激下における心筋 AChE の発現動態解析および機能解析、AChE 発現制御系を用いた心筋保護作用の賦活化による虚血性心疾患の病態制御を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、虚血ストレス刺激下における 心筋 AChE の発現動態解析および機能解析、AChE 発現制御系を用いた心筋保護作用の賦活化による虚血性心疾患の病態制御を目的とした。これらを解析するため、虚血性心疾患を模倣するモデルマウスおよび培養細胞の作製を行う。このモデルにおける AChE の発現動態解析を行う。さらに心筋 AChE の機能解析を行うために、AChE 過剰発現系を構築し、虚血ストレス状況下における細胞死への影響を明らかにする。心筋 AChE の機能解析後、AChE 標的型 microRNA を虚血性心疾患モデルマウスおよび培養細胞に導入し、虚血性心疾患の病態を評価する。これらの解析を行うことにより、虚血性心疾患における AChE 制御系による心筋保護作用の賦活化の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 虚血性心疾患モデルマウス作製は、C57BL/6 オスマウス 10 週齢の左冠動脈を結紮して作製した。このマウスが虚血性心疾患の病態を模倣しているか検証するために、低酸素応答因子 (HIF1 α) および細胞死誘導因子 (Bax/Bcl-2, Cleaved caspase-9/Procaspase-9) の発現量を測定した。その結果、低酸素応答因子および細胞死誘導因子の発現が増加していたことから、このモデルが虚血性心疾患の病態を模倣していることが確認できた。

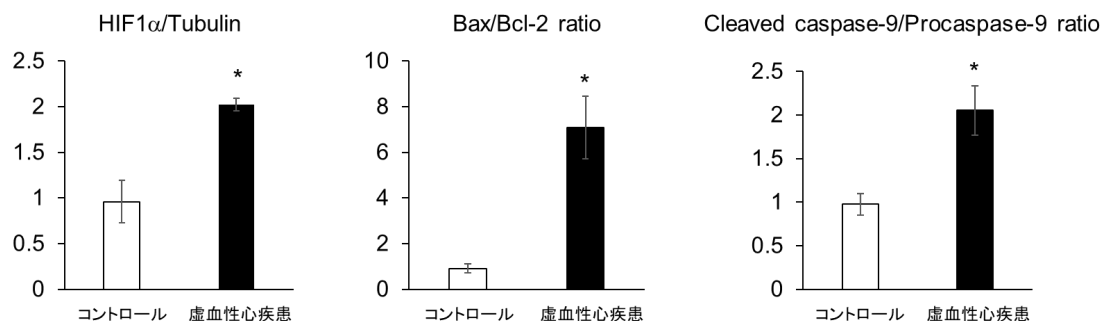


図 1. Western blotting による低酸素応答因子 (HIF1 α) および細胞死誘導因子 (Bax/Bcl-2, Cleaved caspase-9/Procaspase-9) の発現解析。Tubulin は内在性コントロールを示す。

(2) AChE の遺伝子構造とスプライシングバリエントである Synaptic-AChE (AChE-S) と Readthrough-AChE (AChE-R) を示す。矢印は AChE-S と AChE-R をそれぞれ検出するプライマー部位を示す。

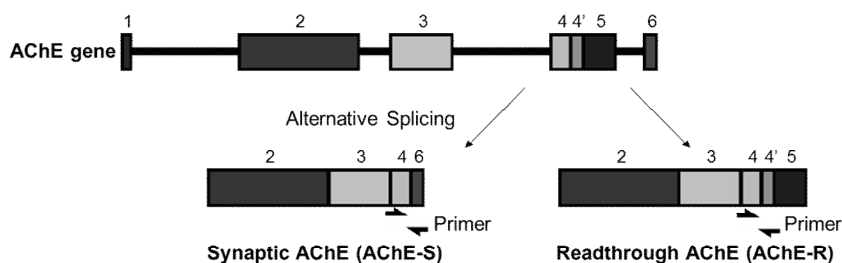


図 2. AChE 遺伝子構造とスプライシングバリエントの模式図。矢印はプライマー設計部。

(3) RT-PCR による虚血性心疾患モデルマウスの心臓 AChE-S と AChE-R の発現解析を行った。その結果、コントロールに比べ虚血性心疾患モデルマウスの病態部において AChE-R の発現が上昇することが明らかになった。

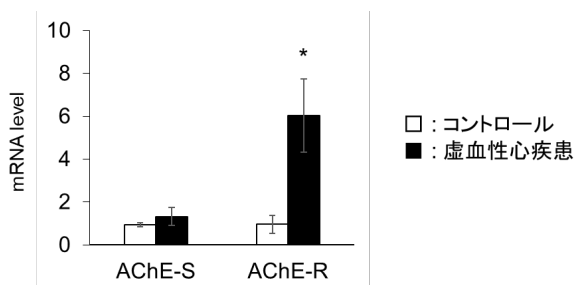


図 3. RT-PCR による虚血性心疾患モデルマウスの AChE-S と AChE-R の発現解析。

(4) ヒト心筋由来の培養細胞株 AC-16 に化学的に虚血ストレス刺激を誘導する塩化コバルトを添加し、培養を行った。このストレス刺激下で培養した AC-16 細胞が虚血性心疾患における病態部を模倣しているかを検証するため、低酸素応答因子 (HIF1 α) および細胞死誘導因子 (Bax/Bcl-2, Cleaved caspase-9/Procaspase-9) の発現を測定した。その結果、低酸素応答因子および細胞死誘導因子の発現が増加していたことから、正しくモデルが作製出来ていることが明らかとなった。

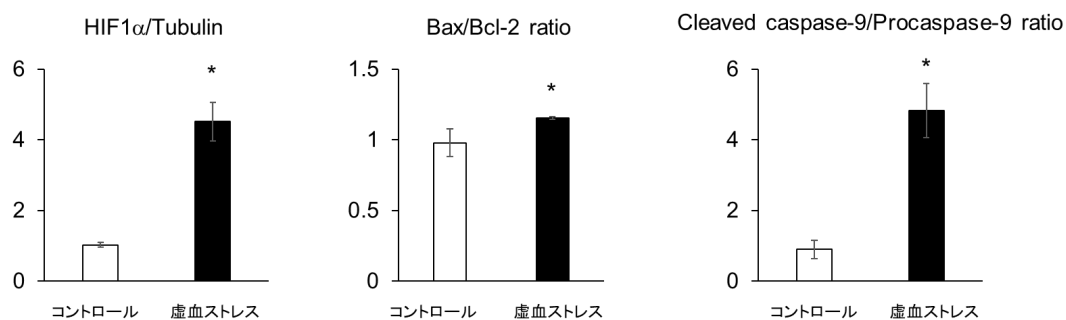


図 4. AC-16 細胞を虚血ストレス刺激下で培養し、Western blotting により低酸素応答因子 (HIF1 α) および細胞死誘導因子 (Bax/Bcl-2, Cleaved caspase-9/Procaspase-9) の発現を測定した。Tubulin は内在性コントロールを示す。

(5) ヒト心筋細胞由来の AC-16 細胞を虚血ストレス刺激下で培養すると AChE-R の発現が増加することが明らかになった。この結果より、虚血ストレス刺激は心筋 AChE-R の発現を増加させることが見出された。

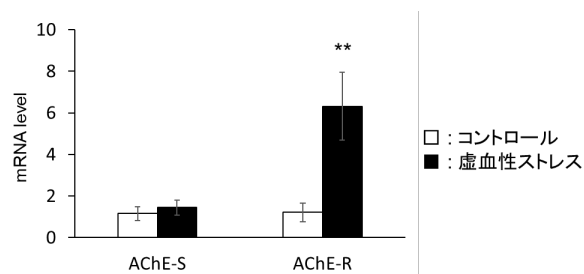


図 5. AC-16 細胞を虚血ストレス刺激下で培養し、RT-PCR により AChE-S と AChE-R の発現を測定した。

(6) AC-16 細胞における Flag 融合 AChE-R 発現系の構築を行い、Western blotting により AChE-R の発現の確認を行った。その結果、AChE-R の発現増加が確認された。

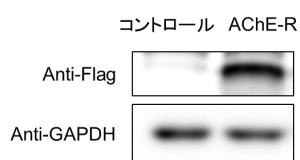


図 6. Western blotting による Flag-AChE-R の発現解析。GAPDH は内在性コントロールを示す。

(7) AChE-R を過剰発現した AC-16 細胞を虚血ストレス刺激下で培養し、細胞の生存率を測定した。その結果、AChE-R 過剰発現細胞の生存率が有意に上昇することが明らかとなった。

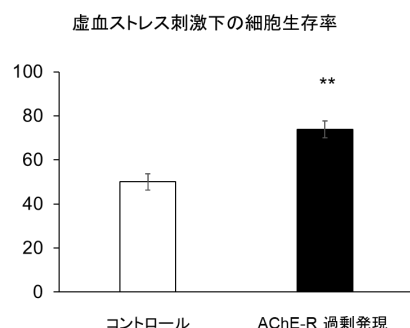


図 7. AChE-R 過剰発現 AC-16 細胞を虚血ストレス刺激下で培養した。培養後、WST-1 assay により細胞の生存率を測定した。

以上の結果より、心筋 AChE-R は虚血ストレス刺激により発現増加し、細胞死から心筋を保護する作用を有することが示唆された。今後は、AChE-R の制御系を用いて心筋保護システムを賦活化させ、虚血性心疾患に対する影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Higuchi T, Morisawa K, **Todaka H**, Lai S, Chi E, Matsukawa K, Sugiyama Y, Sakamoto S. A negative feedback loop between nuclear factor 90 (NF90) and an anti-oncogenic microRNA, miR-7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Sep 10;503(3):1819-1824. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.119. 査読あり

Higuchi T, **Todaka H**, Sugiyama Y, Ono M, Tamaki N, Hatano E, Takezaki Y, Hanazaki K, Miwa T, Lai S, Morisawa K, Tsuda M, Taniguchi T, Sakamoto S. Suppression of

MicroRNA-7 (miR-7) Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma. J Biol Chem. 2016 Sep 30;291(40):21074-21084. doi: 10.1074/jbc.M116.748210. 査読あり

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, **Todaka H**, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, attenuates LPS-induced inflammatory response in murine macrophage cell line RAW 264.7 through inhibition of nuclear factor kappa B translocation. Eur J Pharmacol. 2016 Oct 15;789:17-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.06.053. 査読あり

Todaka H, Higuchi T, Sakamoto S. Pathophysiological events induced by alteration of microRNA biogenesis pathway. 比較生理生化学 2016 年 33 巻 4 号 p.183-190 doi:<https://doi.org/10.3330/hikakuseiriseika.33.183>. 査読あり

[学会発表](計 18 件)

Hi roshi Todaka, Mikihiro Arikawa, Tatsuya Noguchi, Atsushi Ichikawa, Takayuki Sato, Acetylcholinesterase inhibitor accelerates muscle differentiation in C2C12 myoblasts, 9th FAOPS CONGRESS, Kobe Convention Center (KOBÉ, JAPAN), 2019-03-28 - 2019-03-31

戸高寛, 有川幹彦, 野口達哉, 市川厚, 佐藤隆幸, コリンエステラーゼ阻害剤を用いた筋再生機構の解明, 第 70 回日本生理学会中四国地方会, 愛媛大学(愛媛), 2018-10-27 - 2018-10-28

中根達人, 井戸彩詠, 樋口琢磨, **戸高寛**, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲, 膵臓 細胞における CPG16-JDP2 を介した新規インスリン発現抑制機構の解明, 第 91 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都), 2018-09-24 - 2018-09-26

樋口琢磨, **戸高寛**, 森澤啓子, Sylvia Lai, 池恩燮, 杉山康憲, 坂本修士, Nuclear Factor 90(NF90)の発現は miR-7 を介したフィードバックループにより制御される, 第 91 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都), 2018-09-24 - 2018-09-26

戸高寛, 有川幹彦, 市川厚, 野口達哉, 佐藤隆幸, Myocardial ischemia-reperfusion elevates the expression of anti-apoptotic acetylcholinesterase, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2017-12-06 - 2017-12-09

坂本修士, 森澤啓子, Sylvia Lai, 樋口琢磨, **戸高寛**, 池恩燮, 杉山康憲, 津田雅之, 骨格筋において過剰発現した NF90-NF45 は赤筋化を誘導する, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2017-12-06 - 2017-12-09

藤井修作, 飯田悟史, **戸高寛**, 樋口琢磨, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲, 膵臓 細胞におけるコレステロール増加はインスリン発現を抑制する, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2017-12-06 - 2017-12-09

井戸彩詠, 樋口琢磨, **戸高寛**, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲, 糖毒性状態の膵臓 細胞において Dclk1 はインスリンの発現を抑制する, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2017-12-06 - 2017-12-09

市川厚, **戸高寛**, 山中茂雄, 松村敬久, 佐藤隆幸, 慢性閉塞性肺疾患を示唆する心電図指標, 日本臨床検査自動化学会 49 回大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2017-09-21 - 2017-09-23

戸高寛, 有川幹彦, 市川厚, 野口達哉, 佐藤隆幸, 虚血誘導性アポトーシスは心アセチルコリンエステラーゼの発現量を増加させる, 第 94 回日本生理学会大会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2017-03-28 - 2017-03-30

有川幹彦, **戸高寛**, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸, マウス心筋梗塞モデルにおいて, 心線維芽細胞に認められる非神経性コリン作動系は虚血刺激により活性化する, 第 94 回日本生理学会大会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2017-03-28 - 2017-03-30

樋口琢磨, 森澤啓子, Lai Sylvia Chin See, 三輪武司, 池恩燮, **戸高寛**, 杉山康憲, 津田雅之, 坂本修士、がん部における miRNA を介した NF90-NF45 の発現制御、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016-11-30 - 2016-12-02

樋口琢磨, 三輪武司, 延本篤也, 森澤啓子, Sylvia Chin See Lai, 池恩燮, **戸高寛**, 杉山康憲, 津田雅之, 坂本修士、二本鎖 RNA 結合タンパク質 NF90-NF45 の発現増加は生体における造腫瘍能を上昇させる、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016-11-30 - 2016-12-02

藤井修作, **戸高寛**, 樋口琢磨, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲、慢性的な高グルコースによるインスリン分泌細胞 INS-1 内のコレステロールの増加はインスリン発現の障害を誘導する、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016-11-30 - 2016-12-02

Hiroschi Todaka, Takuma Higuchi, Keiko Morisawa, Takeshi Miwa, Lai Sylvia Chin See, Masayuki Tsuda, Yasunori Sugiyama, Mikihiro Arikawa, Takayuki Sato, Shuji Sakamoto. Elucidation of the role of the doublestranded RNA binding protein NF90-NF45 complex in muscular regeneration. RNA2016, THE RNA SOCIETY OF JAPAN 18TH ANNUAL MEETING AND THE 21st ANNUAL MEETING OF THE RNA SOCIETY. The International Conference Center in Kyoto (Kyoto, Japan) 2016-06-28 - 2016-07-02

樋口琢磨, **戸高寛**, 三輪武司, 森澤啓子, Sylvia Lai Chin See, 小野正文, 杉山康憲, 津田雅之, 坂本修士、造腫瘍能における二本鎖 RNA 結合蛋白質複合体 NF90-NF45 の影響、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、高知大学 (高知県南国市) 2016-05-27,28

井戸彩詠, 樋口琢磨, **戸高寛**, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲、2 型糖尿病の糖毒性に関わるリン酸化シグナル因子の同定と解析、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、高知大学 (高知県南国市) 2016-05-27,28

LAI SYLVIA CHIN SEE, 樋口琢磨, 杉山康憲, 森澤啓子, 三輪武司, **戸高寛**, 津田雅之, 坂本修士、膵臓ランゲルハンス島における RNA 結合タンパク質が有する新たな細胞制御作用、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、高知大学 (高知県南国市) 2016-05-27,28

〔その他〕

ホームページ ; http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_heart/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

戸高 寛 (TODAKA, Hiroshi)

高知大学 教育研究部医療学系基礎医学部門 助教

研究者番号 : 80769662

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。