

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16004

研究課題名(和文) RNA代謝を起点とした心筋肥大の新規メカニズムの解明および病態との関連性の検討

研究課題名(英文) Verification of novel molecular mechanism of cardiac hypertrophy via regulation of mRNA degradation

研究代表者

増村 雄喜 (Masumura, Yuki)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：60793437

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)：RNA代謝という新たな観点から心肥大メカニズムの解明に迫り、新たな心肥大関連因子の探索を行った。肥大刺激下の新生仔マウス培養心筋細胞を対象とし、次世代シーケンサーを用いた2つのアプローチからBtg2の標的遺伝子の探索を行ったところ、RNA・タンパク合成に関連する遺伝子が標的候補遺伝子として挙げられた。イメージングサイトメトリーを用いた肥大刺激に対する細胞の形態評価に加え、細胞内の肥大誘導因子であるカルシウム動態の評価系を樹立し、InVitroでの候補遺伝子の機能解析を進めた。またゼブラフィッシュを用いた心臓のライブイメージングを行い、InVivoでの肥大刺激に対する表現型の検討を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来心筋肥大に関する分子メカニズム解明の焦点は、遺伝子発現やタンパク合成であった。しかし、肥大刺激に対するmRNAの安定性の変化(RNA代謝の変化)については未知の部分が多く、次世代シーケンサーを用いて、Btg2を介したmRNAの安定性の網羅的解析は、従来とは全く異なったアプローチで心筋肥大の分子メカニズムに迫るものと考えられる。またRNA代謝という観点での研究は、RNAの質的・量的制御のメカニズムを通し、心臓の恒常性を維持していくメカニズムの解明にも今後つながっていくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：For exploratory research aimed at regulatory mechanisms of cardiac hypertrophy through new perspective of RNA metabolism, we applied two genome-wide analyses to reveal targets of negative regulator of RNA metabolism, Btg2, in cardiomyocytes. We performed RNA sequence and RNA immunoprecipitation using Btg2 specific antibody coupled with high throughput sequencing (RIP-seq) to obtain genome-wide binding profiles of Btg2. From these analysis, 52 genes were listed for candidate Btg2 targeted genes in cardiomyocytes, which are related to metabolism of RNA and protein synthesis. To perform molecular functional analysis of these candidate genes, we establish analysis method to measure intracellular calcium dynamics using imaging cytometry. We are now working on verification of cardiac phenotype and gene expression under hypertrophic stimulation using zebrafish. These candidate genes through our exploratory research are expected to be new regulatory factor of cardiac hypertrophy.

研究分野：心不全

キーワード：心肥大 RNA代謝 次世代シーケンサー

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

## 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は、神経体液性因子の慢性的な亢進状態や圧負荷による代償機構により、心筋肥大を来す。心筋肥大は心室リモデリングをもたらし、心臓の線維化、心腔拡大および収縮能の低下を来し、心不全の重要な原因の1つとなっている。現在、薬物・非薬物治療では改善が困難なステージに進行した重症心不全患者においては、最終的な治療法は心臓移植のみであるが、ほとんどが長期移植待機を要するのが現状である。我が国においても、左室補助人工心臓 (LVAD) による移植への橋渡し (Bridge to transplant) も普及しつつあるが、感染症や脳血栓などの合併症などの問題点を多く抱えている。さらなる心肥大のメカニズムの解明および薬物による予防法・治療法の開発が必要とされている。

心筋細胞の肥大化メカニズムとして、肥大刺激による RNA・タンパク合成の亢進が大きく関与している。タンパク量がオートファジー、ユビキチン・プロテアソーム系などで制御されることは広く研究されているが、心筋細胞の RNA 量制御に関してはほとんど未解明である。しかし、我々は心筋細胞において RNA 分解制御因子である Btg2 を介して、RNA 分解による心筋肥大抑制用を示したように、心筋における RNA 代謝機構による遺伝子発現量・タンパク合成量の制御に着目したアプローチの重要性について多く報告されている。

## 2. 研究の目的

我々は、心筋細胞において Btg2 による RNA 代謝機構を介した心筋肥大抑制作用を明らかにした。さらにこの研究を進展させ、RNA 代謝という新たなアプローチから、心筋肥大のメカニズムに迫り、心筋肥大に関連する新たな分子・シグナル伝達を明らかにし、その機能解析から心疾患治療ターゲットを探索すること、を挙げた。

本助成事業においては、下記項目を経て新たな心肥大関連因子の探索を目的とした。

- (1) mRNA 制御因子 Btg2 の標的候補遺伝子の網羅的探索
- (2) Btg2 標的遺伝子の同定
- (3) 生化学解析、細胞イメージング、動物モデルを用いて Btg2 標的遺伝子の機能解析
- (4) ヒト生体試料の遺伝子解析および臨床情報を含めた解析

## 3. 研究の方法

### (1) 次世代シーケンサーを用いた網羅的解析による Btg2 の標的遺伝子の絞り込み

RNA-seq を用いて遺伝子発現変化量より標的遺伝子を絞り込む

心筋細胞において、肥大刺激にตอบสนองし、様々な遺伝子の発現が上昇するが、Btg2 による強力な mRNA 分解活性により、mRNA の質的・量的管理制御が働いている。新生仔マウス培養心筋細胞に対して shRNA を用いて Btg2 をノックダウンし、フェニレフリン刺激下において遺伝子発現変化を、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより網羅的に解析し、mRNA 発現量が上昇している遺伝子を Btg2 標的遺伝子として絞り込みを行う。

RIP-seq を用いて Btg2 を介して RNA 分解制御複合体が結合する標的遺伝子を絞り込む

RNA 分解制御は、RNA 結合タンパクと RNA 分解制御複合体が標的 mRNA に結合することで起こるが、Btg2 は RNA 分解制御複合体と結合し、分解活性を活性化している。新生仔マウス培養心筋細胞に対し、フェニレフリン刺激下において Btg2 に対する特異的抗体を用いて、Btg2 を免疫沈降し、同時に回収される RNA を対象とし、次世代シーケンサーを用いたシーケンスを行い (RIP-seq) 網羅的に解析し、Btg2 標的遺伝子として絞り込みを行う。

### (2) Btg2 の標的遺伝子の同定

標的候補遺伝子の安定性の評価

Btg2 強制発現に伴う RNA 分解亢進により、RNA の半減期短縮 (RNA の不安定化) が生じる一方、Btg2 ノックダウンにより RNA 分解抑制により半減期延長 (RNA の安定化) が生じる。上述の方法により絞り込まれた標的遺伝子を対象とし、Btg2 の存在の有無により、mRNA の半減期の変化を評価し、Btg2 の直接的な標的遺伝子として同定していく。

### (3) 生化学解析、細胞イメージング、動物モデルを用いた Btg2 標的遺伝子の機能解析

同定された Btg2 標的遺伝子について、培養心筋細胞における生化学的、分子生物学的解析を行い、心筋肥大との関連性を評価していく。

我々が確立したイメージングサイトメトリーを用いた心筋細胞の細胞イメージング解析を用いて、遺伝子の強制発現およびノックダウンによる心筋細胞の形態・構造変化を評価する。また、肥大誘導因子である細胞内のカルシウムイオンの動態をイメージングサイトメトリーを用いて評価する。

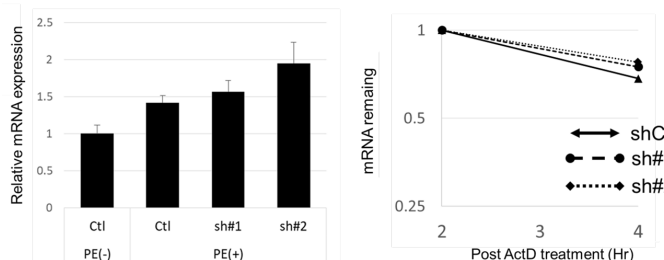
また標的遺伝子改変ゼブラフィッシュを作製し、我々が確立したイメージングサイトメトリーを用いたゼブラフィッシュの心機能評価法を用いて、In vivo における標的遺伝子と心機能との関連性を評価する。

#### (4) ヒト生体試料の遺伝子解析および臨床情報を含めた解析

大阪大学附属病院には全国からの重症心筋症症例が集積し、300 症例を超す全エクソームデータ、及び移植心 50 検体以上の RNA シークエンス発現データを取得している。これらデータベースに加え、心不全患者の臨床情報を踏まえて、Btg2 の発現と心不全の病態との関連性を評価していく。

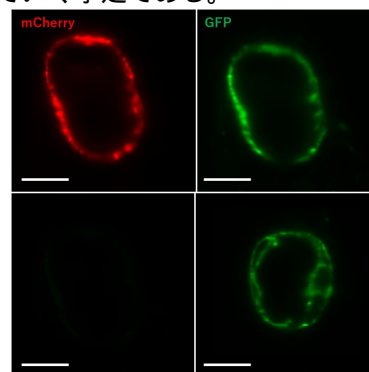
#### 4. 研究成果

当初研究計画に則り、新生仔マウス培養心筋細胞を対象とし mBtg2 をノックダウンし、フェニレフリン刺激に伴う遺伝子発現を、RNA シークエンスを用いて網羅的に解析した。RNA 発現量が上昇している遺伝子は 209 遺伝子同定できた。リン酸化関連タンパク、リボソーム関連タンパク、アセチル化関連タンパクをコードする遺伝子が上位を占めており、フェニレフリン刺激に対し、RNA・DNA 合成を促す因子を標的としていることが考えられた。新生仔マウス培養心筋細胞に対してフェニレフリン刺激下に細胞質を回収し、Btg2 に対する特異抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、Btg2 の濃縮と、RNA 分解複合体構成因子も共沈降されてきていることを確認した。免疫沈降を行ったサンプルより RNA を回収し、RNA シークエンスにより、結合 mRNA を網羅的に解析した。結果、標的候補遺伝子は、398 遺伝子同定できた。リン酸化タンパクやリン酸化酵素関連タンパクをコードする遺伝子が上位を占めていた。これら 2 つの網羅的解析方法から共通して挙げられた標的候補遺伝子は 52 遺伝子であった。これら遺伝子の発現量変化、半減期を評価し、標的遺伝子として同定することを試みたところ、shRNA を用いて Btg2 をノックダウンすると、フェニレフリン刺激により mRNA 発現量が増加し、遺伝子の半減期が延長することが確認できた。(右図)引き続き、標的候補遺伝子の中より標的遺伝子を同定し、これら分子の心筋細胞における機能評価および心肥大との関連性を評価していく。



我々が確立したイメージングサイトメトリーを用いた心筋細胞の細胞イメージング解析を用いて、遺伝子の強制発現およびノックダウンによる心筋細胞の形態・構造変化を評価する。また、イメージングサイトメトリーを用いて肥大誘導因子である細胞内のカルシウムイオンの動態を、単一細胞レベルでかつ細胞種を識別して、多検体可能な評価系を樹立した。我々は、Cas9 ノックインマウスから抽出した新生仔マウス培養心筋細胞を対象とし、CRISPR/Cas9 システムを用いた標的遺伝子の遺伝子編集技術は樹立しており、標的候補遺伝子のノックアウトは簡便に行える。今後、Btg2 標的遺伝子として同定されてきた遺伝子をノックアウトし、細胞形態、肥大刺激への応答性、カルシウム動態の評価を、引き続き行っていく予定である。

ゼブラフィッシュに対し Tol2 トランスポゾンベクターを用いて遺伝子導入させ、心室筋特異的に Btg2 を過剰発現させた (cmlc2p-zBtg2-2A-mCherry) ゼブラフィッシュラインを有しており、心臓に GFP が発現するゼブラフィッシュライン (hspGFF3A) と掛け合わせ、mCherry 陽性群 / 陰性群の 2 群間で、心機能評価を行った。ベースライン (4pdf) では、mCherry 陽性群で、壁菲薄化・心拡大を認める傾向を(右図; 上段 mCherry 陽性群、下段 mCherry 陰性群、Scale bar: 50 $\mu$ m)認め、引き続き、形態評価および肥大刺激に対する応答性の評価を継続中である。また肥大刺激による心不全モデルの作成、および Btg2 標的候補遺伝子改編モデルを作成し、肥大との関連性の評価を予定している。



Btg2 の発現およびその他遺伝子の発現プロファイルの作成に加え、心不全患者の臨床情報を踏まえて、Btg2 の発現と心不全の病態との関連性を評価し、心不全の重症化の予防・治療法の開発を目指し、心不全重症化の原因探索やメカニズム解明を引き続き行っている。

本助成事業を通して、RNA 分解制御という新たなアプローチから、心肥大の分子メカニズム解明を試みている。肥大刺激に対し、RNA・タンパク合成の方向に強力に動いているが、と同時に恒常性を維持するために、量的・質的制御を RNA レベルでも受けていることを見出した。合成と分解のバランスが破綻した際に、心肥大へと向かっていくことが予想され、現在挙げられてきている候補遺伝子を、InVitro、InVivo の両面から心肥大との関連性の評価を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suwa Y, Higo S, Nakamoto K, Sera F, Kunimatsu S, Masumura Y, Kanzaki M, Mizote I, Mizuno H, Fujio Y, Hikoso S, Sakata Y Old-Age Onset Progressive Cardiac Contractile Dysfunction in a Patient with Polycystic Kidney Disease Harboring a PKD1 Frameshift Mutation. International Heart Journal 査読有 Vol.60 (2019), No.1 220-225. doi: 10.1536/ihj.18-184.

〔学会発表〕(計 10 件)

Yuki Masumura, Suzuka Kunimatsu, Shuichiro Higo, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Masato Shibamoto, Tomoaki Higo, Seiji Takashima, Shigeru Miyagawa, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata Rapid Evaluation of Candidate Causal Gene Mutation using High-content Image Analysis American Heart Association Scientific Sessions 2018 Oral Session 2018年11月10日-14日、Chicago、USA

肥後 修一朗、増村 雄喜、彦惣 俊吾、坂田 泰史 ゲノム編集の重症心不全医療応用 第22回日本心不全学会学術集会 2018年10月13日、東京

Yuki Masumura, Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Seiji Takashima, Yasushi Sakata Verification of novel molecular mechanism of cardiac hypertrophy via regulation of mRNA degradation 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム ポスター 2018年9月2日、奈良

Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata Genome Editing in Cardiomyopathy European Society of Cardiology Congress 2018 2018年8月26日 Munich、Germany

増村雄喜、國松鈴花、肥後修一朗、小濱康明、志波幹夫、近藤匠巳、肥後友彰、柴本将人、高島成二、宮川繁、彦惣俊吾、坂田泰史 第3回心筋症研究会 Young Investigation Awards 2018年6月2日、奈良

Yuki Masumura, Suzuka Kunimatsu, Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Tomoaki Higo, Masato Shibamoto, Seiji Takashima, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata 第82回日本循環器学会学術集会 ポスターセッション 2018年3月23日、大阪

Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yuki Masumura, Tomoaki Higo, Shungo Hikoso, Yasushi Sakata Therapeutic Genome Editing Targeting an Upstream Genetic Basis of Advanced Heart Failure 第82回日本循環器学会学術集会 プレナリーセッション 2018年3月23日、大阪

Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yuki Masumura, Tomoaki Higo, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi Homology-directed Repair-mediated Genome Replacement Targeting Pathological Mutation in Dilated Cardiomyopathy 第9回武田科学振興財団薬科学シンポジウム 医薬応用を目指したゲノム編集 2018年2月7日、大阪

Yuki Masumura, Suzuka Kunimatsu, Shuichiro Higo, Takamaru Ishizu, Yasuaki Kohama, Mikio Shiba, Takumi Kondo, Tomoaki Higo, Masato Shibamoto, Seiji Takashima, Shungo Hikoso and Yasushi Sakata Evaluation of Calcium Handling Properties of Individual Cardiomyocytes using High-content Image Analysis 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム ポスター 2018年1月6-7日、東京

Yuki Masumura, Shuichiro Higo, Shungo Hikoso, Seiji Takashima, Yasushi Sakata Verification of novel molecular mechanism of cardiac hypertrophy via regulation of mRNA degradation Workshop "Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression" 2017年11月13日-17日、沖縄

石津宜丸、肥後修一朗、増村雄喜、小濱康明、志波幹夫、肥後友彰、柴本将人、中川彰人、森本幸生、高島成二、彦惣俊吾、坂田泰史 拡張型心筋症遺伝子変異に対する相同組み換え修復(HDR)を介したゲノム編集治療の開発 MCM2017 2017年9月1日 神戸

〔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〕

ホームページ等

## 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。