

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15879

研究課題名（和文）心筋リモデリングにおけるCCR4-NOT複合体の機能的意義の解明および応用研究

研究課題名（英文）The investigation of functional role of CCR4-NOT complex in pathological cardiac remodeling

研究代表者

佐藤 輝紀（SATO, TERUKI）

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30733422

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、CCR4-NOT複合体の心臓リモデリングにおける役割を解析した。ひとつの構成因子に着目してそのノックアウトマウスの心機能を解析したところ、心機能低下を認め、心肥大も有意に増悪していた。RNAシーケンスにて標的遺伝子の探索を行った。同定したY遺伝子との二重欠損マウスを作製したところ、心肥大は抑制された。以上より、protein XはgeneY遺伝子の発現調節を介して病的な心臓リモデリングを制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全パンデミックと称されるように、今後心不全患者が増加することが予想されている。有効な薬物療法やデバイス治療が開発されてきた一方で、いまだに心不全の予後は不良であるが、そこには心不全発症の分子病態解明が不十分であることから新規治療方法の開発が進まない背景がある。本研究では、RNA代謝制御に着目して、心臓リモデリングの病態解明を目的とした解析を行った。CCR4-NOT複合体は巨大なタンパク質複合体であり、生命維持に必須であることが分かっている。その機能的意義を解明することで、新たな心不全発症機序の解明やひいては治療法開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the functional role of CCR4-NOT deadenylase in pathological cardiac remodeling. Since protein X, a key factor of deadenylase, was upregulated in pressure overload-induced cardiac hypertrophy, we analyzed heart function of protein X KO mice which showed cardiac dysfunction and hypertrophy. RNA sequence revealed upregulation of inflammatory, cardiac hypertrophy and fibrosis associated genes. We thus focused on geneY, and generated protein X; gene Y double KO mice. Gene Y deficiency rescued cardiac dysfunction and hypertrophy of X KO mice with pressure overload. These results implicate that CCR4-NOT deadenylase negatively regulates cardiac remodeling induced by pressure overload via shortening of poly(A) tail of target mRNA.

研究分野：循環薬理学

キーワード：CCR4-NOT複合体 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全は、多くの薬物療法や人工心臓や心臓再同期療法といった非薬物療法が開発され現代においても、病態の詳細な発症機序が未解明であるために根本的な治療法開発に至っておらず、悪性腫瘍同等に予後不良であるという現状がある。

心不全発症の分子機序において、転写による遺伝子発現調節に関する研究が多くなされてきた一方で、近年の研究ではRNAレベルでの制御の重要性が示唆されてきた。

CCR4-NOT 複合体は酵母からヒトまで保存されたタンパク質複合体であり、mRNA poly(A)鎖の分解(脱アデニル化; deadenylation)による mRNA 発現抑制の実行因子である。私達の研究室の先行研究において、Cnot3 が心機能調節に重要な役割を担っていることが明らかにしていた(Cell 2010)。また、Cnot1 は CCR4-NOT 複合体の scaffold タンパクであり、Cnot3 と同様に、オートファジー関連タンパクの Atg7 依存的に心機能を調節していることを見出してきた。しかし、複合体におけるその他の構成タンパク質の心臓における機能は未解明であった。そこで、マウス圧負荷心不全モデル(TAC)を用いて、マウスの心臓を観察したところ、TAC2 週間後までは心重量は増加し、心機能は保たれていたが、TAC4 週間後からは心機能が低下し始め、8 週間後には著明な心機能低下と心重量は再上昇を認めた。TAC1~8 週間の心臓リモデリング過程における CCR4-NOT 構成タンパク質の発現解析を行ったところ、心機能が保持された代償期に発現が上昇するのに対し、心機能が低下する非代償期においては発現が低下していることが分かった。このように、CCR4-NOT 複合体構成因子が圧負荷心肥大のリモデリングプロセスに関与することが示唆された。

2. 研究の目的

上記学術的背景より、心臓リモデリングにおける CCR4-NOT 複合体の役割を解明し、心不全患者の新たな治療戦略に応用することを研究目的とする。

3. 研究の方法

CCR4-NOT 複合体構成因子の脱アデニル化作用の心不全病態における遺伝子制御メカニズムを解析することを研究の主軸とする。以下の3つの検討項目について実験・解析を行うことによって研究目的を達成する。

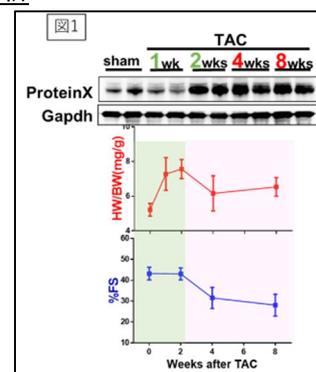
- A) CCR4-NOT 複合体構成因子の心不全病態モデルにおける役割の解析
- B) CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子の探索
- C) CCR4-NOT 複合体の遺伝子制御機構の解析

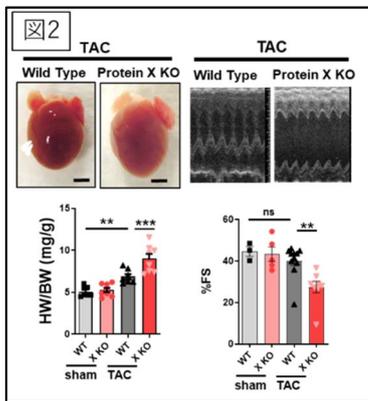
4. 研究成果

A) CCR4-NOT 複合体構成因子の心不全病態モデルにおける役割の解析

図1のように、マウス圧負荷心において心機能代償期以降に CCR4-NOT 複合体を構成する各タンパク質の発現上昇がみられたことから、脱アデニル化実行因子である X に着目してその遺伝子欠損マウスを作製し、心機能を評価した。ベースラインの心機能や心体重比には野生型と比較して変化は見られなかったが、TAC 術後の心機能は術後2週間で心機能の低下が認められた。また、心体重比も有意に上昇していた(図2)。このことから、脱アデニル化実行因子である Protein X が欠損することで心肥大が促進され、心機能が早々に低下することがわかり、つまり心保護的に働いていることが示唆された。

B) CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子の探索



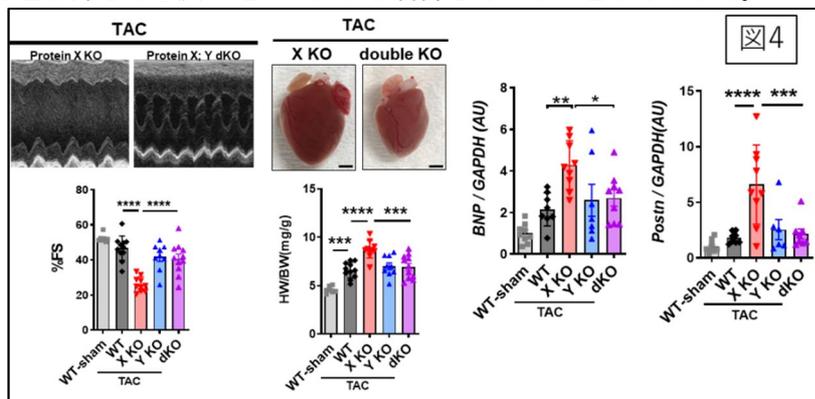


確認された。

これらのことから、protein X は gene-Y の mRNA の遺伝子発現制御を介して病的な心臓リモデリングに寄与していると考えられた。

そこで、gene-Y KO マウスを購入し、X KO マウスとの交配によって gene X; Y 二重欠損マウスを作製し、その心機能を評価した。TAC 手術 2 週間後、X KO マウスの心機能は低下、心肥大が促進されるのに対し、二重欠損マウスでは心機能が保たれ、心肥大の程度も抑制されていた。同様に、BNP や Periostin などの心臓リモデリング関連遺伝子の発現も二重欠損マウスの心臓においては有意に抑制されていた(図 4)。

以上より、圧負荷心不全病態においては CCR4-NOT 複合体構成因子 protein X が gene-Y を負に調節することを介して心臓リモデリングを制御していることがわかった。

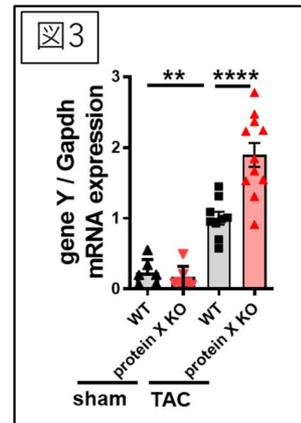


C) CCR4-NOT 複合体の遺伝子制御機構の解析

今回の実験で着目した protein X は、mRNA の poly(A)鎖長を短縮する脱アデニル化によって遺伝子発現を制御する。gene Y の poly(A)鎖長を確認する PATassay や、実際にヒトのサンプルを用いた発現解析は未施行であり、引き続き今後の課題として研究を継続していく。

次に、protein X の標的遺伝子を探索するため、遺伝子欠損マウスの心臓を用いて RNA シークエンスによる網羅解析を行ったところ、各種の炎症性サイトカインの発現がノックアウトマウスの心臓において共通して上昇していることが分かった。とりわけ、TGF- β 1 などの心臓リモデリングに關与する遺伝子が有意に上昇していた。その中で、gene-Y に着目したところ、qRT-PCR にて TAC 術後の protein X KO マウスの心臓においてその有意な上昇が認められた(図 3)。

また、In-situ hybridization 法による免疫染色を用いて gene-Y を検出したところ、TAC 心臓組織において発現の上昇を認めた。さらに、TAC マウス心臓における protein X 抗体を用いた RIP (RNA 免疫沈降)では、gene-Y の発現上昇が



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Teruki, Kuba Keiji	4. 巻 153
2. 論文標題 The functional role of endogenous APJ agonists; Apelin and Elabela/Toddler in cardiovascular diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 172 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.172	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Wakana, Sato Teruki, Iino Takako, Seki Katsuhito, Watanabe Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Visualization of arterial wall vascularization using superb microvascular imaging in active-stage Takayasu arteritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Heart Journal - Cardiovascular Imaging	6. 最初と最後の頁 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ehjci/je285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Teruki, Kadowaki Ayumi, Suzuki Takashi, Ito Hiroshi, Watanabe Hiroyuki, Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 20
2. 論文標題 Loss of Apelin Augments Angiotensin II-Induced Cardiac Dysfunction and Pathological Remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 239 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20020239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuba Keiji, Sato Teruki, Imai Yumiko, Yamaguchi Tomokazu	4. 巻 111
2. 論文標題 Apelin and Elabela/Toddler; double ligands for APJ/Apelin receptor in heart development, physiology, and pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Tomokazu, Suzuki Takashi, Sato Teruki, Kuba Keiji et al	4. 巻 11
2. 論文標題 The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 3638 ~ 3638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aan3638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Teruki Sato, Hiroyuki Watanabe, Akinori Kimura, Hiroshi Ito, Yumiko Imai, Keiji Kuba
2. 発表標題 A novel APJ ligand, ELABELA, protects from pathological cardiac remodeling induced by pressure overload and Angiotensin II
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤輝紀、久場敬司
2. 発表標題 新規心血管病治療標的としてのApelin/ELABELA -APJ受容体システム
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teruki Sato, Hiroyuki Watanabe, Tomokazu Yamaguchi, Hiroshi Ito, Keiji Kuba
2. 発表標題 ELABELA, a novel APJ ligand, protects against pressure overload or Angiotensin II-induced cardiac remodeling.
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teruki Sato, Hiroyuki Watanabe, Ayumi Kadowaki, Keiji Kuba
2. 発表標題 Endogenous Apelin supresses Angiotensin II-induced Cardiac hypertrophy and fibrosis
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----