

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19519

研究課題名（和文）ノンコーディングRNAによるミトコンドリア機能制御の分子機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of mitochondrial function by non-coding RNA

研究代表者

尾池 雄一（Oike, Yuichi）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：90312321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではミトコンドリア機能活性化作用をもつ新規long non-coding RNA CELR-Xの標的分子の同定とその分子機構を明らかにした。また、ヒトオルソログ候補lncRNA遺伝子を同定し、in vivoで機能解析を行うため、全身過剰発現マウスを作製した。さらにアデノ随伴ウイルスを用いてミトコンドリア機能活性化作用をもつCELR-Xを強制発現させて加齢に伴う老化表現抑制の検討を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた本邦において老化関連疾患に対する対策が急務となっており、近年、ミトコンドリアの機能低下と老化関連疾患との関連が注目されている。本研究ではミトコンドリア機能活性化を有する新規長鎖ノンコーディングRNAであるCELR-Xの標的分子の同定と分子機構の解明、さらにヒトオルソログ候補遺伝子を同定した。本研究がミトコンドリア機能不全に起因する老化関連疾患の分子病態解明の基盤となれば、心不全、サルコペニアなどの老化関連疾患の新規治療法や予防法となりうる可能性もあり、社会的貢献度は極めて高いと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified the target gene of CELR-X, a novel long non-coding RNA that activates mitochondrial machinery and clarified its molecular mechanism. In addition, human ortholog candidate CELR-X genes were identified and the systemic overexpressing mice were prepared for functional analysis in vivo. Furthermore, we investigated whether it is possible to suppress the aging-related disease by using adeno-associated virus to express CELR-X.

研究分野：循環器病態学

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は世界に先駆け高齢化社会から超高齢化社会に突入し、それに伴い心機能低下による末梢循環不全状態である心不全や加齢に伴い筋肉量および身体機能が低下するサルコペニア・フレイル等の老化関連疾患の急増加が大きな課題となっている。超高齢社会を迎えた本邦において老化関連疾患に対する対策が急務となっているが、心不全など有効な治療法や予防法が確立されていない疾患も少なくない。

ミトコンドリアはエネルギー産生を担う重要な細胞小器官だが、その機能低下により活性酸素の発生やミトコンドリア関連代謝産物量の変化が生じ、結果として種々の疾患発症・進展につながる。近年、ミトコンドリア機能低下と細胞老化や個体老化、老化関連疾患発症・進展との関連が注目されているが、ミトコンドリア機能の恒常性維持に重要な機構として、ミトコンドリアの融合、分裂などダイナミクスに関する解明は進んでいる一方で、ミトコンドリアのエネルギー代謝機能やミトコンドリア機能制御機構については十分には解明されていない。

タンパク質をコードしないゲノム DNA 領域は機能持たないと考えられてきたが、このような DNA 領域から転写された non-coding RNA が様々な機能を持つことが明らかとなり、特に全長が約 200 塩基以上の非コード RNA である long non-coding RNA (lncRNA) の生体における機能が、近年注目されている。最近、我々は心臓に豊富に発現し、細胞質に局在を認める新規 lncRNA である cardiac enriched long non-coding RNA-X (CELR-X) を同定した。種々の CELR-X 遺伝子改変マウスを用いた心不全モデルの表現型解析から、CELR-X が心筋細胞のミトコンドリア機能活性化により心不全病態進展に対して抵抗性を示すこと、さらにアデノ随伴ウィルスベクター (AAV6) を用いた心筋細胞における CELR-X の高発現により心不全病態の進行が抑制されることを明らかにした。近年の lncRNA に関する機能解明やその生理的または病態生理的意義解明に関する報告は、そのほとんどが核内に局在する lncRNA に関するものであり、最近、lncRNA が核とミトコンドリアの橋渡しとしてミトコンドリアの活性、増殖などの生物現象の制御に作用し、核とミトコンドリアとのクロストークを行っているとの報告がある (Vendramin R *et al.* *EMBO J.* 2017, Dong Y *et al.* *Epigenetics Chromatin.* 2017)。しかし、細胞質に局在する lncRNA とミトコンドリア機能制御との関連についての報告はほとんどない。

2. 研究の目的

細胞質に局在する CELR-X によるミトコンドリア機能活性化の詳細な分子機構及び制御機構を解明し、CELR-X が老化関連疾患に対する新規治療法や予防法と成り得るか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) CELR-X と複合体を形成する因子の同定
- (2) CELR-X 強制発現マウスの老化表現型解析
- (3) マウス CELR-X のヒトのオルソログ同定と機能解明

4. 研究成果

(1) CELR-X と複合体を形成する因子の同定
CELR-X 欠損マウス、CELR-X Tg マウスを用いたプロテオーム解析より CELR-X の複数の標的遺伝子を同定し、その中で発現変化が最も大きかった CELR-X Target Gene1 (CTG-1) について検討を行った。CELR-X 改変マウス及び *in vitro* translational assay (無細胞タンパク質合成システム) を用いた解析より CELR-X は CTG-1 の転写ではなく翻訳を抑制し、CTG-1 のタンパク発現を低下させることを明らかにした。さらに CTG-1 欠損、心筋特異的 CTG-1 欠損マウスを作製し検討を行ったところ、心臓での CTG-1 の発現減少によって心不全病態の進行抑制を認めたと、ミトコンドリア機能に関しては差異を認めなかった。以上の結果より CELR-X の心不全病態抑制作用は CTG-1 を介さないミトコンドリア機能を亢進する機構と CTG-1 タンパク発現抑制を介した機構の存在が示唆された。心筋特異的 CTG-1 過剰発現マウスを 2 度作製したが、いずれもライン樹立には至らなかった。また、CELR-X と CTG-1 の interaction 部位、つまり CELR-X の機能ドメインもつ領域を同定するために CELR-X を断片化し *in vivo* において検討を行った。配列の一部をオーバーラップさせた 5 断片を設計し、CELR-X と同じ遺伝子座にそれぞれの断片を挿入し、強制発現マウス (CAG-CELR-X fragment A-E Tg) を作製、ラインを樹立した。CELR-X の全長の強制発現マウス (CAG-CELR-X Tg) は野生型に比べ、CTG-1 の翻訳抑制、心不全病態の抑制効果を認めるのだが、断片化したそれぞれの Tg マウスは、CTG-1 の翻訳抑制を認めず、圧負荷心不全モデルを作製し検討を行ったが、心不全病態の抑制効果を認めなかった。このことから CELR-X は一部の配列領域ではなく、全長配列の立体構造構造が CTG-1 の翻訳抑制、さらには心不全抑制作用として重要であることが示唆された。

(2) CELR-X 強制発現マウスの老化表現型解析
2 年齢の高齢野生型マウスに心筋、骨格筋に特異的に感染し、CELR-X を強制発現するアデノ随伴ウィルス AAV6-CELR-X とコントロールとして AAV6-GFP を尾静脈から投与し検討を行った。運動負荷装置による運動耐用能の測定や心エコーによる心機能解析だけでなく、呼代謝測定、体重、体温、摂餌、飲水量測定を行う予定である。

- (3) マウス CELR-X のヒトのオルソログ同定と機能解明

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

ヒトにおいてもマウス CELR-X と同様の遺伝子配置および方向性を維持した状態であり、マウス CELR-X に相当するヒトゲノム配列部位に lncRNA 転写産物の存在を複数認めた。ヒト iPS 由来分化心筋細胞を用いて、それらのヒト lncRNA 転写産物の解析を行ったところ、2 つ lncRNA 転写産物がマウスと同様、ヒト心筋細胞において高発現していることを認めた。lncRNA は通常タンパク質に翻訳される coding RNA と異なり、種間での塩基配列上の保存性が極めて低い。一方で、種間で相同する染色体上の相同部位に存在する lncRNA は、塩基配列の保存性に関わらず高次構造の類似性により、その機能が保存されることが予想されているが、まだ十分に解明されていない。この 2 つの lncRNA 転写産物の塩基配列は、マウス CELR-X との相同性は低いが、ヒト遺伝子配列上の存在がマウス遺伝子配列上と同じ部位に相当すること、さらに心筋細胞で高発現を認めることから、これらの lncRNA 転写産物がヒト CELR-X のオルソログである可能性が強く示唆される。in vivo での機能解析を行うため、マウス CELR-X と同じ遺伝子座に hCELR-X を挿入し、全身過剰発現ヒト CELR-X マウス(CAG-hCELR-X1 Tg、CAG-hCELR-X2 Tg)を作製、樹立を行った。今後、心機能を解析し、マウス CELR-X と同様な心不全保護作用の有無について圧負不全モデルマウスを作製し、表現型を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhu Shunshun, Tian Zhe, Torigoe Daisuke, Zhao Jiabin, Xie Peiyu, Sugizaki Taichi, Sato Michio, Horiguchi Haruki, Terada Kazutoyo, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Oike Yuichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221366	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 Sato Michio, Miyata Keishi, Tian Zhe, Kadomatsu Tsuyoshi, Ujihara Yoshihiro, Morinaga Jun, Horiguchi Haruki, Endo Motoyoshi, Zhao Jiabin, Zhu Shunshun, Sugizaki Taichi, Igata Kimihiro, Muramatsu Masashi, Minami Takashi, Ito Takashi, Bianchi Marco E, Mohri Satoshi, Araki Kimi, Node Koichi, Oike Yuichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 368 ~ 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0925	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 Kadomatsu Tsuyoshi, Oike Yuichi	4. 巻 165
2. 論文標題 Roles of angiopoietin-like proteins in regulation of stem cell activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 309 ~ 315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz005	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 Kurahashi Ryoma, Kadomatsu Tsuyoshi, Baba Masaya, Hara Chiaki, Itoh Hitoshi, Miyata Keishi, Endo Motoyoshi, Morinaga Jun, Terada Kazutoyo, Araki Kimi, Eto Masatoshi, Schmidt Laura S., Kamba Tomomi, Linehan W. Marston, Oike Yuichi	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA 204 5p: A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1897-1908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14026	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 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Kurahashi Ryoma, Hara Chiaki, Miyata Keishi, Baba Masaya, Osumi Hironobu, Terada Kazutoyo, Araki Kimi, Takai Toshiyuki, Kamba Tomomi, Linehan W. Marston, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 33
2. 論文標題 Dual functions of angiopoietin-like protein 2 signaling in tumor progression and anti-tumor immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.329417.119	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 Morinaga Jun, Zhao Jiabin, Endo Motoyoshi, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Sugizaki Taichi, Okadome Yusuke, Tian Zhe, Horiguchi Haruki, Miyashita Kazuya, Maruyama Nobuhiro, Mukoyama Masashi, Oike Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Association of circulating ANGPTL 3, 4, and 8 levels with medical status in a population undergoing routine medical checkups: A cross-sectional study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0193731	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 Itoh Hitoshi, Kadomatsu Tsuyoshi, Tanoue Hironori, Yugami Masaki, Miyata Keishi, Endo Motoyoshi, Morinaga Jun, Kobayashi Eisuke, Miyamoto Takeshi, Kurahashi Ryoma, Terada Kazutoyo, Mizuta Hiroshi, Oike Yuichi	4. 巻 37
2. 論文標題 TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2903 ~ 2920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0160-0	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuichi Oike
2. 発表標題 A Novel lncRNA Protects from Pressure Overload Induced Heart Failure in Mice
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Sciences 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾池 雄一
2. 発表標題 心不全の薬物療法の現状と新たな治療法の可能性
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (JSGCT2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾池 雄一
2. 発表標題 心不全病態における新規長鎖ノンコーディングRNAの機能解明
3. 学会等名 CVMW2019 心血管代謝週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichi Oike
2. 発表標題 Identification of a novel cytoplasmic long noncoding RNA protecting against heart failure
3. 学会等名 2020 Keystone Symposia ConferenceA1: Noncoding RNAs: Mechanism, Function and Therapies2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----