

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07325

研究課題名(和文) 心臓線維化薬物治療法の開発を指向したアルギニンメチル化酵素PRMT5の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of arginine methyltransferase 5 in cardiac fibrosis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の発症と進展においても重要なリスクファクターである心臓線維化には、エピジェネティックな制御機構が寄与しているが、線維化治療に対する有用な創薬標的分子は同定されていない。本研究では、エピジェネティック制御因子であるアルギニンメチル化酵素PRMT5が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する分子である可能性を見出した。PRMT5選択的阻害剤を、圧負荷応答性心不全マウスに経口投与し、組織学的解析とqPCRを行った。その結果、心臓線維化と線維化関連遺伝子の発現量は、PRMT5阻害剤により有意に減少した。さらに初代培養心臓線維芽細胞において、PRMT5阻害剤はヒストンのメチル化を抑制していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRMT5を介したアルギニンメチル化反応が心臓線維化において重要であることが考えられる。PRMT5は慢性心不全時における新規線維化治療標的になりつると考える。本研究結果はいまだ難治である心不全の治療薬開発、ひいては国民の健康維持に貢献する。

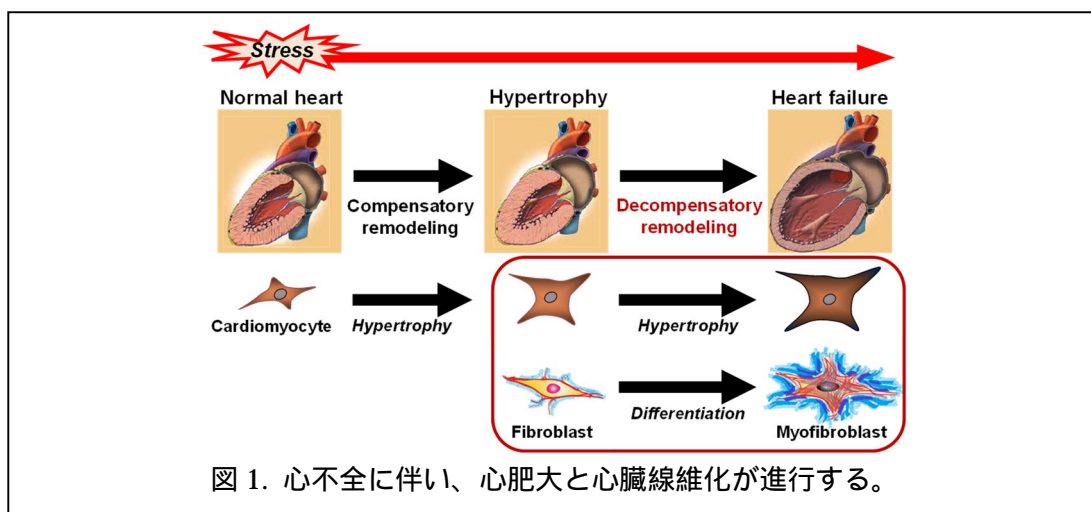
研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulatory mechanisms contribute to cardiac fibrosis, which is also a significant risk factor in the development and progression of heart failure. However, drug target molecules for fibrosis therapy have not been identified. In this study, we found that an arginine methyltransferase PRMT5 may be a molecule that promotes the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. EPZ015666, a selective inhibitor of PRMT5, was orally administered to mice and histological analysis and qRT-PCR were performed. Results showed that pressure overload-induced cardiac fibrosis and expression of fibrosis-related genes were significantly reduced by EPZ015666 treatment. Furthermore, in primary cultured cardiac fibroblasts, EPZ015666 suppressed histone methylation by PRMT5.

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 心不全 線維化

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患は我が国における死亡原因の第2位である。なかでも慢性心不全は非常に予後が悪く、十分な治療法の開発には至っていない。持続的な病的ストレス負荷により、心臓は肥大や線維化を伴いリモデリングし、最終的に心不全へと移行する(図1)。近年、慢性心不全の原因として、心臓線維化が重要であることがわかってきている。心臓線維化を抑制することは有効な治療戦略と考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多く、治療薬はいまだ開発途上である。心臓リモデリング時、心臓線維芽細胞で様々な遺伝子発現が変化し、活性化さらに筋線維芽細胞へ分化することがわかっている。その転写制御には、ヒストンのアセチル化やメチル化などのエピジェネティックな制御機構が寄与しているが、非常に複雑な過程であり、いまだ完全な解明には至っていない。



### 2. 研究の目的

申請者は上述した研究結果より「PRMT5はアルギニンメチル化反応を介して、心臓線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を制御している」という仮説を考え、本研究では「慢性心不全時の線維化におけるアルギニンメチル化酵素PRMT5の機能とそのメカニズム」を明らかにすることを目的とする。上述した研究成果より、申請者は「PRMT5はアルギニンメチル化反応を介して、心臓線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を制御している」と考えた。上記仮説を検証するため、本申請研究では下記3点を明らかにする。

線維芽細胞特異的KOマウスを用いた心不全におけるPRMT5の機能解析

PRMT5による線維化制御メカニズムの解析

慢性心不全モデルに対するPRMT5特異的阻害剤の薬理効果

以上の研究成果より、慢性心不全時の線維化におけるPRMT5の機能とそのメカニズムを明らかにし、PRMT5が新規心不全治療標的分子であることを証明する。

### 3. 研究の方法

線維芽細胞特異的KOマウスを用いた心不全におけるPRMT5の機能解析

心不全時の心臓線維芽細胞におけるPRMT5の機能解析を行うために線維芽細胞特異的PRMT5-KOマウスを用いた。Postn-CreまたはCol1a2-CreマウスとPRMT5-floxマウスを交配し、線維芽細胞特異的PRMT5-KOマウスを作成した。大動脈狭窄術を施した圧負荷応答性の心不全マウスモデルを作成し、超音波検査にて心機能を評価した。さらに心臓を摘出し、遺伝子発現解析(Col1a1, -SMA)および組織学的評価(HE染色、ピクロシリウスレッド染色)を行い、心不全に伴う線維化を評価した。

PRMT5による線維化制御メカニズムの解析

PRMT5が心臓線維芽細胞における遺伝子発現制御にどのような役割を担っているのか、その詳細な分子機構について検討した。具体的には心臓線維芽細胞を初代培養し、PRMT5のノックダウンまたはPRMT5阻害剤を添加し、線維化誘導因子であるTGF- $\beta$ 刺激後の線維化マーカーの遺伝子発現変化について評価した。さらにTGF- $\beta$ 刺激後のヒストン修飾(H3R2の対照的ジメチル化)についてウエスタンブロットおよびChIPアッセイにて検討する。またTGF- $\beta$ シグナル伝達因子であるSmad3とPRMT5との分子間相互作用について免疫沈降法(IP-WB)にて検討し、PRMT5の線維化制御メカニズムを明らかにした。

慢性心不全モデルに対するPRMT5特異的阻害剤の薬理効果

PRMT5特異的阻害剤EPZ015666を大動脈狭窄術を施した圧負荷応答性の心不全マウスモデルに投

与した。と同様に超音波検査、解剖評価、遺伝子発現解析、生化学的および組織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果 (図2)

##### 線維芽細胞特異的 KO マウスを用いた心不全における PRMT5 の機能解析

Postn-Cre または Col1a2-Cre マウスと PRMT5-flox マウスを交配し、線維芽細胞特異的 PRMT5-KO マウスを作成した。大動脈狭窄術を施した圧負荷応答性の心不全マウスモデルを作成し、超音波検査にて心機能を評価した。さらに心臓を摘出し、遺伝子発現解析 (Col1a1,  $\alpha$ -SMA) および組織学的評価 (ピクロシリウスレッド染色) を行い、心不全に伴う線維化を評価した。大動脈狭窄術を施した圧負荷応答性の心不全マウスモデルを作成し、超音波検査にて心機能を評価した。さらに心臓を摘出し、遺伝子発現解析 (Col1a1,  $\alpha$ -SMA) および組織学的評価 (ピクロシリウスレッド染色) を行い、心不全に伴う線維化を評価した。圧負荷応答により、心機能の減少がみられた。さらに Prmt5<sup>flox/flox</sup> マウスと比較して、線維芽細胞特異的 PRMT5-KO マウスにて心機能の減少が改善した。組織学的評価および遺伝子発現解析の結果、圧負荷にて亢進した線維化関連遺伝子の発現が線維芽細胞特異的な PRMT5 の KO にて減少した。

##### PRMT5 による線維化制御メカニズムの解析

心臓線維芽細胞での検討結果、PRMT5 阻害剤およびノックダウンにより TGF- $\beta$  により誘導された線維化反応 (プロリン取り込み亢進、遺伝子発現) が抑制された。TGF- $\beta$  により PRMT5 がリクルートされ、ヒストンをジメチル化することを示した。TGF- $\beta$  によるヒストンのジメチル化は PRMT5 阻害剤により抑制された。

##### 慢性心不全モデルに対する PRMT5 特異的阻害剤の薬理効果

上述の通り、心臓線維芽細胞での検討結果、PRMT5 阻害剤およびノックダウンにより TGF- $\beta$  により誘導された線維化反応 (プロリン取り込み亢進、遺伝子発現) が抑制された。TGF- $\beta$  により PRMT5 がリクルートされ、ヒストンをジメチル化することを示した。大動脈狭窄術を施した圧負荷応答性の心不全マウスモデルに投与した結果、TAC によって増加した心臓線維化面積と線維化関連遺伝子の発現量は、EPZ015666 投与により有意に減少した。

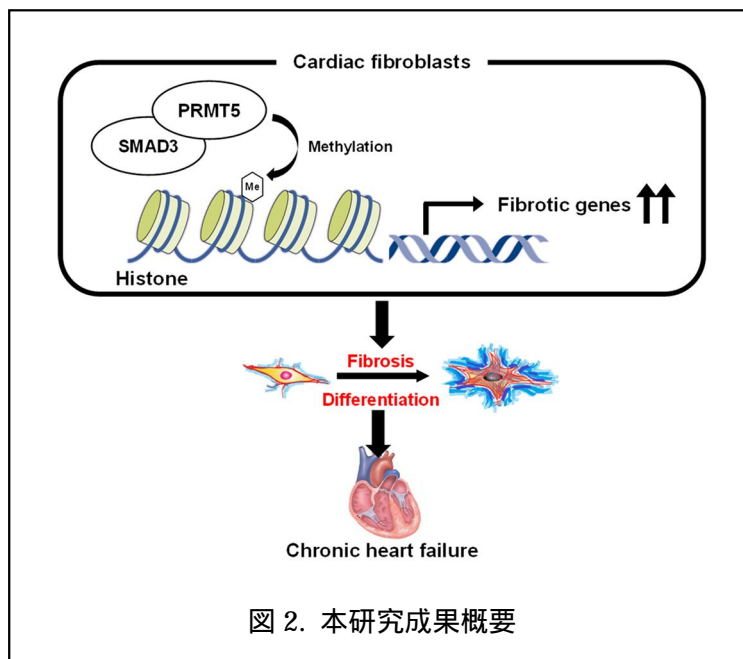


図2. 本研究成果概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 刀坂泰史、村田膳行、曾布川実里、船本雅文、Nurmila Sari、清水果奈、清水聡史、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 アルギニンメチル化酵素PRMT5を介した心臓線維化制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 刀坂泰史、曾布川実里、清水果奈、清水聡史、砂川陽一、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 アルギニンメチル化酵素PRMT5は転写因子Smad3との結合を介して線維化転写反応を制御する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 刀坂泰史、村田膳行、矢部晴海、砂川陽一、清水聡史、清水果奈、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 心臓線維化に対するPRMT5選択的阻害剤EPZ015666の薬理作用の検討
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------