

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16396

研究課題名(和文)心不全改善作用を持つ天然物ノビレチンの作用機序の解明及び心不全治療への応用

研究課題名(英文)The study of functional mechanism of Nobiletin, which possess the therapeutic potency for development of heart failure.

研究代表者

砂川 陽一 (Sunagawa, Yoichi)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：30466297

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)：本研究では申請者が新たに見出したノビレチン標的因子であるNBP1の機能解析を行った。その結果、ノビレチンはNBP1と直接結合し、その酵素活性を増大させた。NBP1過剰発現マウスは庄負荷による心不全の進展を抑制した。逆にNBP1KOマウスではノビレチンの心肥大抑制・心不全発症予防作用が消失していた。以上より、ノビレチンの効果を発揮するためにはNBP1が必須であることが示された。また、NBP1は心不全発症を制御する転写コアクチベーターであるp300と結合、その活性化を制御していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノビレチンは生活習慣病、ガン、アレルギー疾患、認知症、アルツハイマー病といった疾患に有効な作用を有している。これらの報告ではノビレチンの標的因子としてERK1/2やAMPKが関与している。ERK1/2やAMPKは162個のノビレチン標的候補因子の中に含まれてはいた。申請者が見出したNBP1はノビレチンにより活性が制御されており、心不全の進行との関与が示唆する成果が得られた。今後、ノビレチンの心不全進行抑制作用の詳細な作用機序の解明がなされれば、ノビレチンを用いた心不全病態に対するより根本的な新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pull-down assay demonstrated that nobiletin directly interacted with recombinant NBP1. In vitro enzyme assay showed that NOB enhanced NBP1 activity. NBP1 knockdown failed to exhibit NOB-mediated anti-hypertrophic effects. NBP1-KO mice and WT mice with TAC were divided into two groups: NOB (20 mg/kg/day) and vehicle. Oral administration was repeated for 6 weeks. NOB significantly improved TAC-induced cardiac hypertrophy, systolic dysfunction and increases in HW/BW ratio, myocardial cell hypertrophy, and mRNA levels of ANF and β -MHC in WT mice but not in NBP1-KO mice. IP-WB using HEK293T cells showed that NBP1 were associated with p300 and decreased its auto-acetylation, p300/GATA4-dependent promoter activity, and p300-mediated GATA4 acetylation. NBP1 decreased the post-transcriptional modification at activation loop motif of p300. These findings suggest that NBP1 is required to exhibit therapeutic potency of nobiletin for heart failure through the inhibition of p300 activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：NBP1 ノビレチン 心不全 p300 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省発表の「人口動態統計の概況」によると、死亡原因として心疾患は悪性新生物に次いで 2 位に位置している。中でも心不全は、高血圧性心疾患や虚血性心疾患をはじめとしたあらゆる心疾患の最終像であり、心疾患死亡患者の主な死因となっている。超高齢化が進む我が国では今後も増加が予想され、この問題を解決することは社会的、臨床的にも重要であると言える。心不全はあらゆる心疾患の最終像であり予後が非常に悪く、現在に至っても十分な治療法が開発されていない。現在、心不全の薬物療法としては、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、 β 遮断薬といった高血圧や心筋梗塞などの種々のストレスによって亢進した神経・体液性因子をターゲットとしたものが確立され、臨床で効果を上げている。しかしながら、慢性心不全の 5 年生存率は未だ 50-60% である。そのため、新たな心不全治療戦略の開発が求められている。

近年、果物や野菜に含まれる成分に高血圧、高脂血症、肥満、糖尿病などの生活習慣病を防ぐ効果や、がん抑制効果が見出されている。このような背景のもと、国民の健康に対する関心が高まっており、医薬に頼らず生活習慣や食生活を見直すことで生活の質を高め、疾病を予防しようという動きが活発になっている。そこで、食品由来の天然化合物の中に、心不全の進展予防効果が期待できるものがあるのではないかと考え、当研究室では心筋細胞肥大の抑制効果を指標に天然抽出物ライブラリーのスクリーニングを行った。そして、柑橘類果皮成分である Nobiletin に着目した。ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンは静岡特産の温州みかんやポンカン、シークワーサーの果皮に多く含まれる成分である。これまでにノビレチンの効果について様々な報告がなされてきた。

当研究ではノビレチンがラット初代培養心筋細胞において選択的 α_1 アゴニストである Phenylephrine (PE) 誘導性心筋細胞肥大を用量依存的に抑制すること、容量負荷モデルである心筋梗塞 (myocardial infarction, MI) モデルラットにおいて、左室駆出率の改善、左室後壁厚や細胞径、心不全マーカーである ANF、ET-1 の減少、血管周囲の線維化を抑制すること、大動脈縮窄 (transverse aortic constriction, TAC) 術を施した圧負荷モデルマウスでの検討ではノビレチン投与群が心機能を改善することを見出した。このことから、用いた新たな心不全の治療・予防戦略としてのカンキツ由来成分であるノビレチンを活用が期待される。しかしながら、ノビレチンがどのように心筋細胞肥大を抑制、心不全発症を防いでいるのか不明である。

ノビレチンの作用メカニズムを解析するため、ビオチンプローブを付与したノビレチンを合成、これを活用して心臓抽出液よりノビレチン結合タンパク質を精製、同定を試みた。そして、新たに 162 個のノビレチン標的候補因子を見出した。そのなかでも、心臓に多く発現し、サブファミリーのタンパク質に心臓への作用が報告されている Nobiletin binding protein1 (NBP1) に着目した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、NBP1 がどのように心筋細胞肥大を抑制するのか、その作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

心筋細胞への NBP1 過剰発現はアデノウイルスを用いて、NBP1 ノックダウンは siRNA のトランスフェクションで行った。ANF 及び ET-1 プロモーター活性はレポーターコンストラクトをトランスフェクションし、48 時間培養後、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。心筋細胞の肥大の評価として、 α アクチニン抗体を用いた蛍光免疫染色を行った後、 α アクチニン陽性細胞の面積を ArrayScan システムを用いて測定した。

NBP1 過剰発現マウスは京都大学大学院医学研究科の稲垣暢也教授より供与を受けた。NBP1KO マウスはジャクソン研究所より購入した。8 週齢のマウスに麻酔科にて 27G 針を用いて大動脈弓縮窄手術を行った。術後 6 週 ~ 8 週間後に心臓超音波検査を行うことで心機能を評価した。ノビレチンは 1% アカシアガムに懸濁し、20mg/kg となるように、ゾンデを用いた経口投与を毎日行った。サクリファイス後、心臓を摘出、心体重比を算出、薄切切片を作成、HE 染色、MT 染色を行うことで組織学解析を行った。心臓組織から mRNA を抽出、RT-qPCR により心不全マーカー遺伝子の発現を定量化した。

リコンビナント NBP1 及び p300 部位欠損変異体は大腸菌を用いて作成した。ビオチンプローブ化ノビレチンは東海大学海洋学部浅川倫宏准教授より提供を受けた。ノビレチンとの結合確認は、ビオチンプローブ化ノビレチンと Streptavidin ビーズを用いたビオチンプルダウンアッセイで行い、WB にて結合タンパク質を検出した。タンパク質間結合は GST プルダウンアッセイにより確認した。

NBP1 の酵素活性は市販の酵素活性測定キットを用いて行った。HEK293T 細胞に p300 の発現プラスミドをトランスフェクションし、p300 の過剰発現を行った。阻害剤処理を加えた後 48 時間培養、細胞から核タンパク質を抽出、p300 抗体で免疫沈降することで、p300 を精製した。SDS-PAGE で分離後、CBB 染色を行い、p300 のバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析に供することで p300 の翻訳後修飾部位の同定を行った。

4 . 研究成果

はじめに、新たなノビレチンの標的候補因子として見出した NBP1 が心筋細胞肥大反応を制御しているのかどうか、培養心筋細胞にて検討を行った。組換えアデノウイルスを用いて NBP1 を培養心筋細胞に過剰発現させたところ、PE 刺激によって引き起こされる心筋細胞肥大を有意に抑制した。ANF 及び ET-1 プロモーターコンストラクトを用いたレポーターを行ったところ、PE 刺激により増加する ANF、ET-1 プロモーター活性は NBP1 の発現により有意に抑制した。次に CAG プロモーター下流に NBP1 遺伝子を組み込んだプラスミドを導入したマウス (NBP1-TG マウス) 及び野生型マウス (WT マウス) に大動脈弓縮窄手術を行い、圧負荷による心肥大・心不全を誘発させ、術後 8 週間後に心臓超音波検査により心機能を評価した。その結果、圧負荷による左室後壁厚の肥厚、左室収縮能の低下を NBP1-TG マウスでは有意に改善していた。また、NBP1-TG マウスでは、心臓体重比の増加、個々の心筋細胞径の増大、血管周囲の線維化、心肥大マーカー遺伝子の増加を有意に抑制していた。以上の結果より、NBP1 の過剰発現は心筋細胞肥大反応を阻害し、圧負荷による心不全の進展を抑制することを見出した。

次にノビレチンと NBP1 の関連を明らかにするため、NBP1 のリコンビナントタンパク質を作成、*in vitro* 系での実験を行った。NBP1 にビオチンプローブを付与したノビレチンもしくはフリーのノビレチンを混合、Streptavidin セファロースによりプルダウンを行った。WB の結果、ビオチンプローブノビレチンを加えたサンプルのみ NBP1 を検出した。また、これにノビレチンを過剰に添加すると NBP1 のバンドが消失した。以上より、NBP1 はノビレチンと直接結合していることを確認した。次に NBP1 の酵素活性測定キットを用いて、NBP1 の活性に対するノビレチンの効果を検証した。その結果、ノビレチンは NBP1 の酵素活性を直接増加させていた。以上の結果より、ノビレチンは NBP1 と結合し、その酵素活性を増大することを見出した。

ノビレチンが NBP1 を介して心肥大抑制作用、心不全予防効果を発揮しているのかを明らかにするため、培養心筋細胞に NBP1 の siRNA を用いて NBP1 のノックダウンを試みた。その結果、コントロール siRNA を導入した心筋細胞ではノビレチンは PE 刺激による心筋細胞肥大、ANF・BNP の mRNA 量を有意に抑制するが、NBP1 をノックダウンさせた心筋細胞ではノビレチンの抑制効果が認められなかった。次にジャクソン研究所より購入した NBP1-KO マウス及び WT マウスに大動脈弓縮窄手術を行い、ランダムに 20 mg/kg ノビレチン投与群、Vehicle 投与群に分けた。手術 1 日後より連日経口投与を 6 週間行い、ノビレチンの効果を検証した。心臓超音波検査の結果、野生型マウスでは圧負荷により増大した左室後壁厚の肥厚、左室収縮能の低下をノビレチンは有意に改善していた。NBP1-KO マウスでは、ノビレチン投与による心肥大の抑制や心機能低下の改善作用が認められなかった。また、野生型マウスでみられたノビレチンによる心臓体重比の抑制、心筋細胞径・血管周囲の線維化の抑制、心肥大マーカー遺伝子の mRNA 量の抑制は、NBP1-KO マウスではみられなかった。以上の結果より、ノビレチンの心筋細胞肥大反応抑制、心不全発症予防効果には NBP1 が必須であることが示唆された。

最後に、NBP1 がどのように心筋細胞肥大反応を制御しているのか、その作用メカニズムの解明を試みた。当研究室ではこれまでに核内転写コアクチベーターである p300 のヒストンアセチル化酵素活性 (HAT 活性) が心不全発症に重要な役割を果たしていることを報告してきた。そこで、NBP1 が p300 の活性を直接制御しているのかどうか、検討を行った。HEK293T 細胞に各種発現プラスミドを導入、その細胞から抽出した核タンパク質を用いて免疫沈降-WB を行った。その結果、NBP1 は p300 と結合していること、NBP1 の発現増加により p300 の自己アセチル化レベルが減少していることを見出した。また、p300 過剰発現により増加した GATA4 のアセチル化を NBP1 は減少させることが判明した。p300 部位欠損変異体のリコンビナントタンパク質を用いたプルダウンアッセイの結果、NBP1 は p300 の 1069-1459 部位と直接結合していることを見出した。以上より、NBP1 が p300 に結合し、HAT 活性を直接、負に制御していることが示唆された。NBP1 が酵素活性を有していることから、NBP1 による p300 の翻訳後修飾が p300 の HAT 活性制御に関与していることが予想された。そこで、p300 の翻訳後修飾の解析を行った。p300 を過剰発現させた HEK293T 細胞に各種 NBP1 ファミリー因子の阻害剤処理を行い、48 時間培養後、核タンパク質を抽出、抗 p300 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたサンプルを LC-MS/MS 解析に供した結果、p300 の 1568 番目のリジン残基がある翻訳後修飾されていることを見出した。

本研究成果により、ノビレチンは NBP1 の活性化を介して心筋細胞肥大反応、心不全発症を制御していることが判明した。そして、作用メカニズムの 1 つとしてノビレチン/NBP1 が p300-

HAT 活性を制御していることを示した。NBP1 は p300 の 1568 番目のリジン残基の翻訳後修飾を制御することで、p300/GATA4 経路による心筋細胞肥大反応を抑制する可能性が示唆された。今後、さらに NBP1 と p300 の関連を詳細に検討することにより、ノビレチンによる心筋細胞肥大抑制メカニズムの解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂川陽一
2. 発表標題 Nobiletin Binding Protein 1 is Required to Exhibit Therapeutic Potency of Nobiletin for Heart Failure through inhibition of p300 activity
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井秀通、砂川陽一、内藤汐美、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 新規Nobiletin標的因子であるNBP1はp300の翻訳後修飾を介して心筋細胞肥大を抑制した
3. 学会等名 第143回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高井秀通、砂川陽一、内藤汐美、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 ノビレチン結合因子であるNBP1はノビレチンの心不全進展抑制作用の発揮に必要である
3. 学会等名 第4回ノビレチン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江部綾香、砂川陽一、内藤汐美、長谷川浩二、森本達也
2. 発表標題 新規Nobiletin標的因子（NBP1）はp300/GATA4経路を介して心筋細胞肥大を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川陽一
2. 発表標題 ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンの心不全進行抑制及びその作用機序の解明
3. 学会等名 第3回ノビレチン研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂川陽一
2. 発表標題 柑橘系果皮由来ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンの心不全進行抑制効果及びその作用機序の解明
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019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