

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17607

研究課題名（和文）DNA損傷応答を介した心不全病態形成における分子機構解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanisms in the pathogenesis of heart failure mediated by DNA damage response

研究代表者

佐藤 迪夫（SATO, MICHIO）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教

研究者番号：10833410

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）：本研究では心不全病態促進の要因として「DNA損傷応答」に着目し、マウス圧負荷誘導性心不全モデル（Transverse aortic constriction：TACモデル）を用いた解析を行った。その結果、心不全時にHmgb2が著明に増加し、隣接するlong non-coding RNA（lncRNA）AK141659は有意に減少することを見出した。また、Hmgb2とAK141659 KOマウスはともに心不全を増悪させる一方で、AK141659 Tgマウスは心保護作用を示すことを確認した。さらに、AK141659は「DNA損傷応答」を軽減させることで、抗心不全作用を示すことを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は未だ予後不良であり、超高齢社会の到来により心不全患者数は今後も増加が予測されている。また、心不全は健康寿命延伸の大きな障害要因でもあり、効果的な治療法の開発が望まれている。一般に、加齢や高血圧などにより、心筋細胞におけるミトコンドリアの機能が低下し、その結果、DNA損傷を引き起こす活性酸素種（ROS）の産生が増加する。近年、このROSや、DNA損傷応答の活性化が心不全の発症・増悪の原因として注目されている。本研究で同定した新規lncRNAは、DNA損傷応答を軽減することで抗心不全作用を示す。そのため、本研究の成果は、既存の治療法とは異なる心不全治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the DNA damage response as a factor that promotes the pathogenesis of heart failure and analyzed it using the mouse transverse aortic constriction (TAC) model. As a result, we found that Hmgb2 was markedly increased and the adjacent long non-coding RNA (lncRNA) AK141659 was significantly decreased in the situation of heart failure. In addition, AK141659 was found to have a cardioprotective effect. Furthermore, we found that AK141659 exerts its anti-cardiac effects by reducing the "DNA damage response".

研究分野：循環器内科 分子遺伝学

キーワード：心不全 DNA損傷応答 HMGB2 lncRNA AK141659

1. 研究開始当初の背景

近年本邦では高齢化社会に伴って高血圧症に罹患する患者が増加し、それに起因する圧負荷心肥大の管理が重要な課題となっている。心肥大は生体の要求に応じた代償反応として生理的に重要な機構であるが、最終的には心不全という心機能破綻に繋がる現象と捉えられる。現在、心不全の5年生存率は平均して50-60%と依然として予後不良の症候群である。これまでに、心不全の病態形成に関わる分子機構やの解明が進んでいるが、未だ根本的な心不全治療法の開発には至っていない。近年、心臓において圧負荷による酸化ストレスが心筋組織へのDNA損傷を引き起こし、それにより引き起こされる不適切な修復応答が、心不全病態形成の進展に関与することが報告されている(*Eur J Clin Invest.* 2011、*Nat Commun.* 2016)。申請者は、心不全病態形成初期におけるDNA損傷応答(DNA Damage Response: DDR)に関連した遺伝子を同定するために、12週齢 wild-type マウスに横行大動脈結紮圧負荷心不全(transverse aortic constriction ;TAC)モデルを作製し、TAC群と sham 群で心臓におけるプロテオーム解析により網羅的に検索したところ、TAC群で発現上昇を認めた中からDNA損傷応答に関連した遺伝子候補を複数見出し、その中から High Mobility Group Box Protein 2 (*Hmgb2*) を同定した。さらに、心不全病態形成における *Hmgb2* の分子機構を検討するために、*Hmgb2*KO マウスを用いて TAC モデルを作製したところ、*Hmgb2* KO マウスは同腹仔の wild-type に比べ、著明な心機能低下を認めた。このことより、心不全の病態形成において *Hmgb2* が抑制的、つまり心保護的に作用しているか可能性が示唆された。

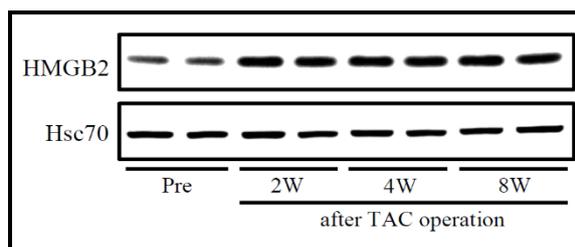
2. 研究の目的

本研究では、DNA恒常性維持に関与する *Hmgb2* の機能解明を通じて、心不全病態形成におけるDNA損傷応答のメカニズムを解明しすることを目的とする。さらに、DNA損傷応答を制御することにより、新規の心不全治療法開発のための基盤研究とする。

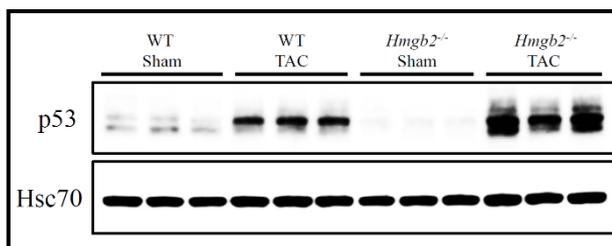
3. 研究の方法

① *Hmgb2*KO を用いて心不全病態形成における *Hmgb2* の分子機構を明らかにする。

本申請まで、圧負荷心不全モデルにおいて心組織中の *Hmgb2* タンパクの上昇を確認しており(右図)、心不全病態において *Hmgb2* が転写制御を含めた作用機構を有している可能性が示唆される。*Hmgb2* に制御される遺伝子について網羅的探索のため、*Hmgb2* KO マウスを用いて、RNA シークエンス及びプロテオーム解析による分子機構解明を行う。網羅的探索により同定された複数の候補遺伝子については、*Hmgb2* との転写制御機構について検討を行う。



② *Hmgb2* と心不全における DNA 損傷応答への関与を明らかにするため、マウス圧負荷誘導心不全モデルを用い、心組織中の γ -H2AX などの発現や P53 の上流および下流の評価を行う。本申請までに、*Hmgb2*KO マウスでは圧負荷心不全モデルにおいて、心組織中の p53 タンパク量が、WT に比べて上昇していることを確認している(右図)。*Hmgb2* の重要な機能の一つが DNA 修復であり、近年、DNA 損傷応答と心不全の関連が報告されてい

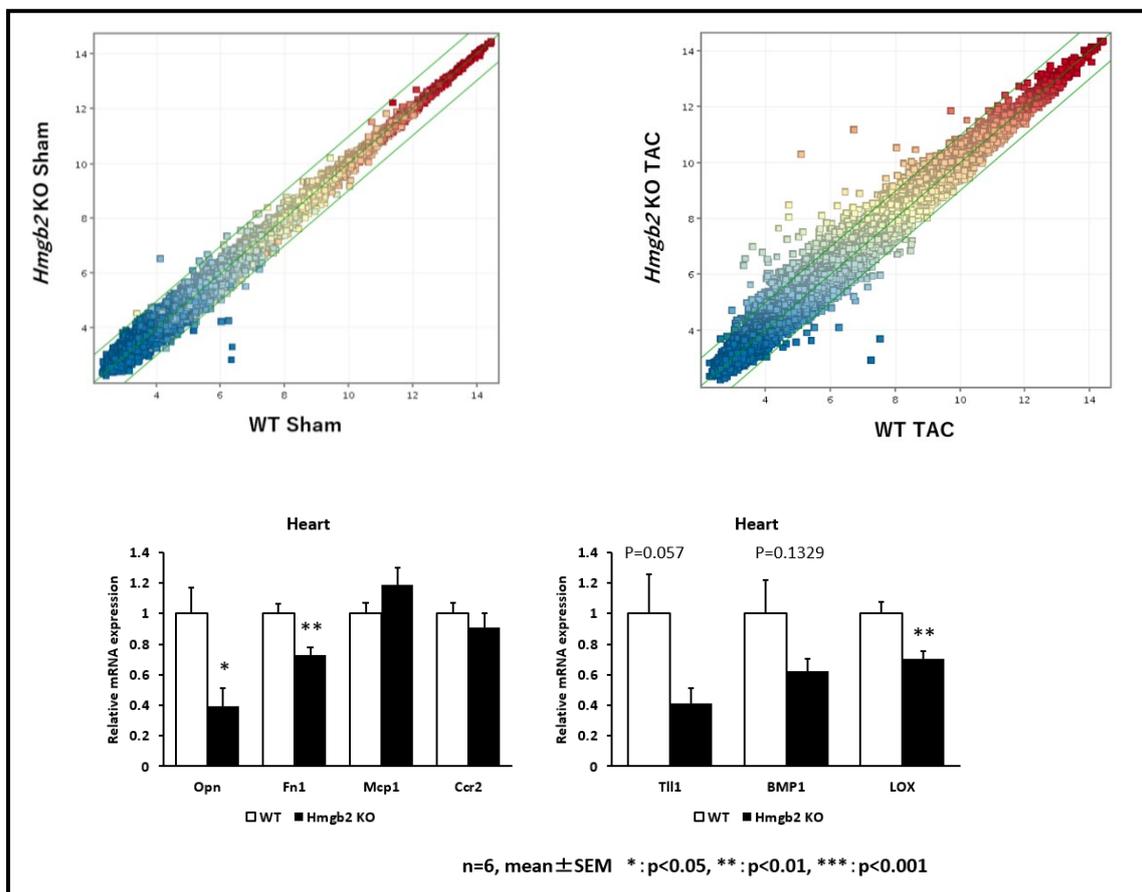


ることから (*Nat Commun*, 2016)、Hmgb2 と DNA 損傷応答との間に関連があることが予想される。そのため、DNA 損傷応答に関与するタンパクを Western blot や免疫染色などにより、Hmgb2 との関係性を評価する。

4. 研究成果

①WT および *Hmgb2*KO マウスを用いたマイクロアレイ解析

解析の結果、*Hmgb2*KO マウスでは炎症に関与する *Opn*、*Lox*、*BMP*、*Nfkβia* の発現が有意に減少していることを見出した (下図)。

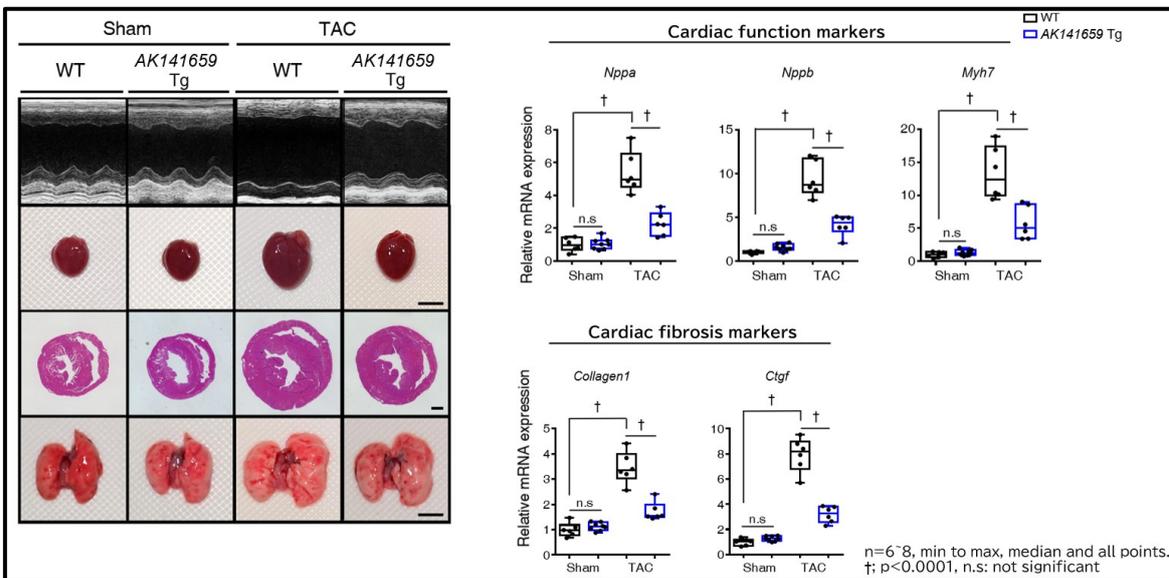
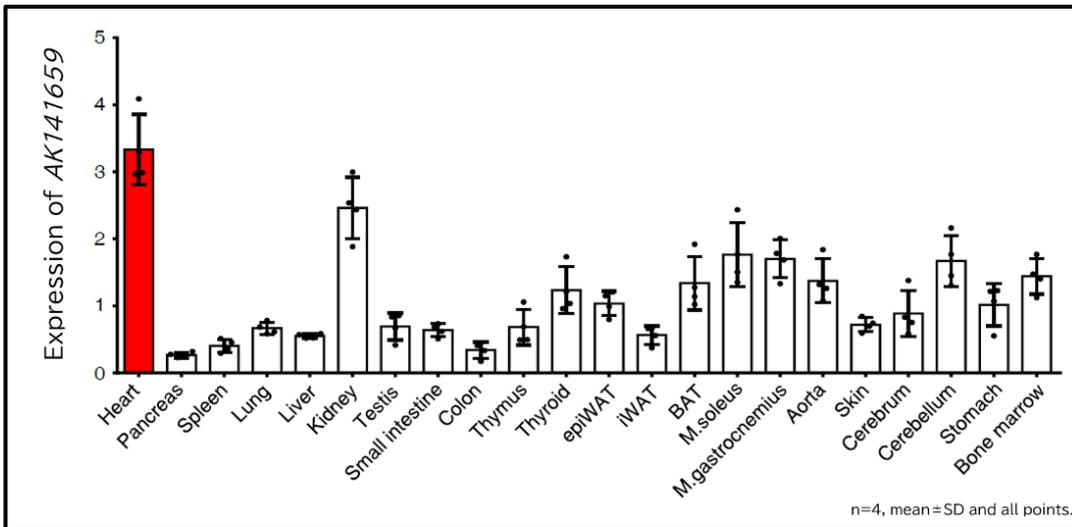


引き続き、*Nfkβia* に着目して Western blot による評価を行ったものの、期待に反して WT マウスと KO マウスの心臓組織における *Nfkβ* の核内移行に変化を認めなかった。また、DNA 損傷応答において、*p53* の上流と考えられている *Chx1/Chx2* についても Western blot で評価を行ったものの、WT マウスと *Hmgb2*KO マウスの間に有意な差を認めなかった。

しかし、一方で WT マウスの Sham と TAC 群を比較したマイクロアレイにおいて、TAC 手術後の心不全状態で有意に減少する long non-coding RNA (lncRNA) である *AK141659* を同定した。

② *AK141659* の解析

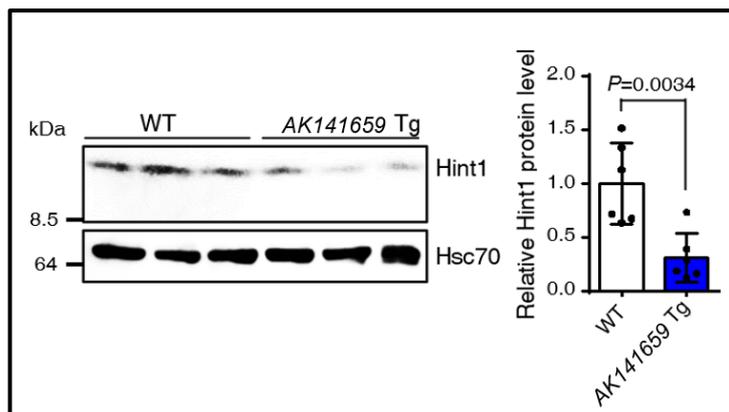
AK141659 はゲノム上、当初着目した *Hmgb2* に隣接しており、また心臓に高発現することが分かった。さらに KO マウスおよび Tg マウスを用いた TAC モデルによる解析の結果、*AK141659* の喪失は圧負荷誘導性心不全を増悪させ、一方の *AK141659*Tg マウスは抗心不全作用を示すことを明らかにした (下図)。



③AK141659の作用機序についての解析

一般に、lncRNAはゲノム上隣接する遺伝子を標的とすることが多いことから、AK141659に隣接する*Hmgb2*および*Sap30*に着目した。しかし、AK141659 KOマウスを用いた解析において、これら遺伝子の発現およびタンパク量に変化がないことから、AK141659の標的は隣接する遺伝子ではないと判断した。次に、AK141659 KOおよびTgマウスの心臓組織を用いたプロテオミクス解析の結果より、AK141659 TgマウスではHint1 (Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1) タンパクが減少している一方で、KOマウスではHint1タンパクが増加していることを見出した(下図)。Hint1はDNA損傷応答を促進することが知られており(JCB, 2008)、AK141659はHint1を負に制御することにより、DNA損傷応答を抑制し、心臓保護作用を示す可能性が示唆された。

今後、このAK141659の心臓保護作用の詳細なメカニズムを解明することにより、新規心不全治療法の開発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6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Michio Sato, Tsuyoshi Kadomatsu, Keishi Miyata, Junco S Warren, Zhe Tian, Shunshun Zhu, Haruki Horiguchi, Jun Morinaga, Taichi Sugizaki, Kaname Hirashima, Kumiko Yoshinobu, Mai Imasaka, Masatake Araki, Yoshihiro Komohara, Tomohiko Wakayama, Shinichi Nakagawa, Sarah Franklin, Koichi Node, Kimi Araki, Yuichi Oike	4. 巻 in press
2. 論文標題 The lncRNA Caren antagonizes heart failure by inactivating DNA damage response and activating mitochondrial biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Fukami Hirotaka, Morinaga Jun, Okadome Yusuke, Nishiguchi Yoshihiko, Iwata Yasunobu, Kanki Tomoko, Nakagawa Terumasa, Izumi Yuichiro, Kakizoe Yutaka, Kuwabara Takashige, Horiguchi Haruki, Sato Michio, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Tajiri Tetsuya, Oike Yuichi, Mukoyama Masashi	4. 巻 315
2. 論文標題 Circulating angiopoietin-like protein 2 levels and arterial stiffness in patients receiving maintenance hemodialysis: A cross-sectional study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 18 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.890	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 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Terada Kazutoyo, Sato Michio, Torigoe Daisuke, Morinaga Jun, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 40
2. 論文標題 Stroma-derived ANGPTL2 establishes an anti-tumor microenvironment during intestinal tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 55 ~ 67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-01505-7	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 Morinaga J, Kakuma T, Fukami H, Hayata M, Uchimura K, Mizumoto T, Kakizoe Y, Miyoshi T, Shiraishi N, Adachi M, Izumi Y, Kuwabara T, Okadome Y, Sato M, Horiguchi H, Sugizaki T, Kadomatsu T, Miyata K, Tajiri S, Tajiri T, Tomita K, Kitamura K, Oike Y, Mukoyama M	4. 巻 35
2. 論文標題 Circulating angiopoietin-like protein 2 levels and mortality risk in patients receiving maintenance hemodialysis: a prospective cohort study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 854 ~ 860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfz236	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 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 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 ~ 1366
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Michio Sato
2. 発表標題 The lncRNA Caren Protects Against Heart Failure by Inactivating the ATM-DNA Damage Response Pathway and Activating Mitochondrial Biogenesis
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤迪夫、宮田敬士、門松 毅、尾池雄一
2. 発表標題 lncRNA Caren制御による寿命延伸への試み
3. 学会等名 AMED「老化メカニズムの解明・制御プロジェクト」片桐拠点2020若手研究者発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Tsuyoshi Kadomatsu, Yuichi Oike
2. 発表標題 Identification of a novel cardiomyocyte-enriched long noncoding RNA counteracting against heart failure development
3. 学会等名 第4回 Basic Cardiovascular Research (BCVR) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤迪夫、森永 潤、向山政志、尾池雄一
2. 発表標題 血液透析患者における血中ANGPTL2値と死亡リスクの関連
3. 学会等名 第20回 日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Tsuyoshi Kadomatsu, Yuichi Oike
2. 発表標題 Identification of a Novel Cardiomyocyte-enriched Long Noncoding RNA Counteracting Against Heart Failure Development.
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Science (BCVS) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michio Sato
2. 発表標題 Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Tsuyoshi Kadomatsu, Yuichi Oike
2. 発表標題 The novel long noncoding RNA Caren protects against heart failure by inactivating Hint1-ATM signaling induced DNA damage response.
3. 学会等名 AMED-CREST 「恒常性領域」 & 「適応・修復領域」合同国際シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 迪夫
2. 発表標題 内因性HMGB2の欠損はマウス圧負荷誘導性心不全モデルにおける心不全を増悪させる
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会・日本抗加齢協会第4回学術フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Tsuyoshi Kadomatsu, Koichi Node, Yuichi Oike
2. 発表標題 The long noncoding RNA Caren protects against heart failure in mice
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム (BCVR)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 迪夫、宮田 敬士、尾池 雄一
2. 発表標題 内因性HMGB2の欠損はマウス圧負荷誘導性心不全モデルにおける心不全を増悪させる
3. 学会等名 Research planet 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 迪夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 循環器内科 第87巻第4号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院 生命科学部 分子遺伝学講座 http://www.kumamoto-u-molgene.jp/
--

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
---------	---------