

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06212・19K21315

研究課題名(和文)ナトリウム利尿ペプチドの転写制御機構の解明と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Revealing the regulatory mechanism of the natriuretic peptides and developing the new therapy for heart failure

研究代表者

松岡 研 (Matsuoka, Ken)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90826190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナトリウム利尿ペプチド(ANP/BNP)両遺伝子はゲノム上隣接して存在し、その遺伝子産物は血管拡張・利尿作用を持つペプチド性ホルモンであり、心不全重症度指標・心不全治療薬として臨床で頻用されている。我々は不全心におけるANP/BNPの発現を誘導する機序を解明するため、先行研究にてANP/BNP遺伝子を誘導する650塩基からなる心不全感受性エンハンサー領域(CR9)を新規に同定した。しかしCR9が誘導される機序は依然として不明である。本研究において、CR9が培養細胞レベル・個体レベルにおいて交感神経受容体刺激や圧伸展機械的刺激により誘導されることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANP/BNPは心不全病態に非常に特異性高く発現誘導される生理活性ペプチドであり、ヒトでは既に血清で測定可能な心不全重症度指標として、また心不全治療薬として頻用されている、有望な分子標的である。本研究は我々が有する先行知財を用い、不全心におけるANP/BNP転写制御機構の解明を目的とした一貫した研究であり、心不全病態解明・新規心不全治療薬に繋がる大きな意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The natriuretic peptides, atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), encoded by the neighboring genes are well-known biomarkers that are strongly induced during heart failure and represent its severity. Cardiologists frequently use these peptides as natriuretic and vasorelaxant agents to treat various clinical conditions. We identified 650bp of heart-failure responsive enhancer (CR9) inducing ANP/BNP gene expressions in the previous study. However, the regulatory mechanism of CR9 remains unknown. In the present study, we revealed that the CR9 enhancer was induced by pharmacological and mechanical stimulations in both cultured cardiomyocytes and in-vivo murine hearts.

研究分野：医学

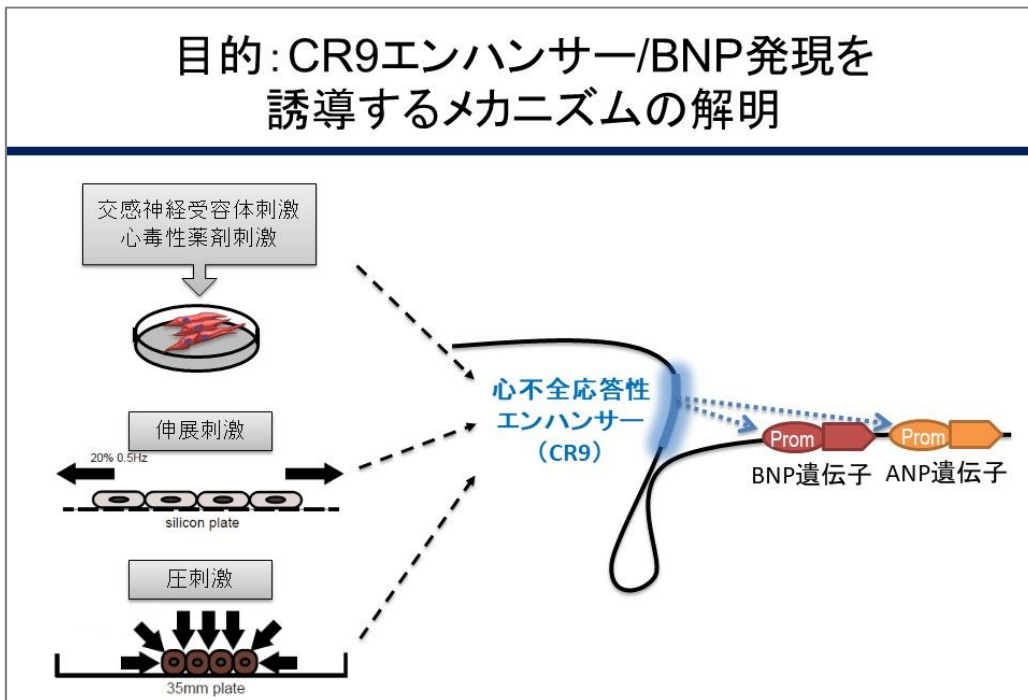
キーワード：CR9 エンハンサー 心不全 ナトリウム利尿ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ナトリウム利尿ペプチド(ANP/BNP)両遺伝子はゲノム上隣接して存在し、その遺伝子産物は血管拡張・利尿作用を持つペプチド性ホルモンであり、心不全重症度指標・心不全治療薬として臨床で頻用されている。我々は不全心における ANP/BNP の発現を誘導する機序を解明するため、先行研究にて ANP/BNP 遺伝子を誘導する 650 塩基からなる心不全感受性エンハンサー領域(CR9)を新規に同定した。CR9 エンハンサーは *Nppb* 遺伝子から 22 kb 上流に存在し哺乳類にて極めて保存性の高い領域である。CR9 エンハンサーの下流に minimal CMV promoter とルシフェラーゼ(Luc) 遺伝子を組み込んだ配列を全身に発現させたトランスジェニックマウス(CR9-Luc-Tg)では、圧負荷心不全モデルによる心肥大形成過程において心臓特異的に Luc の発現が誘導され、BNP 発現の増加と一致する。しかし CR9 エンハンサー が誘導される活性化機構は依然として不明であった。

2. 研究の目的

本研究において、同定した ANP/BNP のエンハンサー(CR9)が心不全によって誘導されるメカニズムを解明することを試みた。本研究は我々が有する先行知財と、世界に先駆けて開発した *in vivo*、*in vitro* 測定系を用い、ANP/BNP 発現制御機序の基礎的解明を目的とした一貫した研究であり、心不全病態解明・新規心不全治療薬に繋がる大きな意義を有する。



3. 研究の方法

(1) 培養心筋細胞における検討

まずは細胞レベルで評価するために、新生仔ラットから単離した培養心筋細胞に対して、CR9 エンハンサー領域 650bp に minimal BNP promoter (*miniP_{BNP}*)-ルシフェラーゼ(Luc) レポーター遺伝子を繋げたレンチウイルスを導入し、発光測定で CR9 のエンハンサー活性を評価できる系を確立した。この実験系を使用し、ラット培養心筋細胞に交感神経受容体刺激(Phenylephrine, Adrenaline) や心毒性薬剤刺激(Doxorubicine) や機械的刺激を行い、CR9 エンハンサー活性を評価した。機械的刺激としては、今までは生体における心不全容量負荷を模倣した培養心筋細胞への伸張刺激が用いられてきたが、今回新たに圧負荷心不全モデルを模倣するために細胞への圧負荷刺激を開発した。

(2) マウス心肥大モデル、心不全モデルにおける検討

in vivo においてエンハンサーを誘導する刺激を評価するために、先行研究で作成したトランスジェニックマウス(CR9-Luc-Tg)に対して、薬剤性心肥大モデル(Phenylephrine, Adrenaline 投与) や薬剤性心不全モデル(Doxorubicine 投与) において、発光ライブイメージングによりマウス心臓におけるエンハンサー活性を評価した。心肥大、心不全の評価としては、心臓超音波検査を用いた。

(3) CR9 ノックアウトマウスの検討

CR9 の生体における機能を検討するために、CR9 領域をノックアウトさせたマウス (CR9-KO) を作製した。CR9-KO マウスにおける ANP/BNP 発現の変化、クロマチン修飾変化、心不全モデルにおける表現型などを検討する。

4 . 研究成果

(1) 培養心筋細胞における検討

ラット培養心筋細胞において、交感神経受容体刺激・力学的負荷 (伸展刺激/圧負荷刺激) のいずれにおいても CR9 エンハンサー活性は増加し、内因性 BNP の発現増加と一致した。一方、Doxorubicine 刺激においては、逆に CR9 エンハンサー活性と内因性 BNP 発現は低下し、後述の *in vivo* の結果と解離を認めた。この Doxorubicine により低下した CR9 エンハンサー活性と内因性の BNP 発現は、更に力学的負荷 (伸展刺激・圧刺激) を加えることにより増加を認めた。これらの結果より、*In vivo* の Doxorubicine 心不全モデルにおける CR9 エンハンサー活性と内因性 BNP 発現の増加は、Doxorubicine そのものによる転写調節への直接的な影響よりも、Doxorubicine による心筋細胞障害によって発症した心不全のために生じた力学的負荷に起因すると考えられた。

次に力学的負荷により CR9 エンハンサーが誘導されるメカニズムを解明するために、心筋細胞において Mechanosensor/Mechanotransducer として報告されている Muscle LIM protein (MLP) を siRNA で Knock down する検討を行った。MLP を Knock down することで力学的負荷 (伸展刺激・圧刺激)、交感神経受容体刺激による CR9 エンハンサー及び内因性 BNP 発現の誘導が抑えられた。更に Mechanosensor/Mechanotransducer として報告されている心臓ミオシンについても、心臓ミオシン阻害剤 (MYK-461) を用いた検討を行った。MYK-461 を細胞に添加することにより、MLP knock down の時と同様に、力学的負荷 (伸展刺激・圧刺激)、交感神経受容体刺激による CR9 エンハンサー及び内因性 BNP 発現の誘導が抑えられた。

これらの結果より、心筋細胞は力学的負荷・交感神経受容体刺激を Mechanosensor/Mechanotransducer (MLP・心臓ミオシン) を介して感知し、CR9 エンハンサーと内因性 BNP 発現を誘導することが示唆された。また、今回新たに開発した細胞への圧負荷刺激モデルでは、心筋細胞肥大と内因性 BNP 発現の増加を認め、*in vivo* における圧負荷心不全モデルを模倣できていると考えられた。

(2) マウス心肥大モデル、心不全モデルにおける検討

薬剤性心肥大モデル (Phenylephrine, Adrenaline)・薬剤性心不全モデル (Doxorubicine) のいずれにおいても、心肥大・心不全の増悪に伴い、心臓における CR9 エンハンサー活性は誘導され、内因性 BNP 発現の増加と一致した。*In vivo* において、CR9 は心肥大・心不全の増悪を感じて BNP 発現を誘導されるエンハンサーであることが示唆された。

(3) CR9 ノックアウトマウスの検討

CR9 領域 (650bp) を欠損させたノックアウトマウスを作製した。今後、ホモ KO マウスを作製し、ANP/BNP 発現の変化、クロマチン修飾変化、心不全モデルにおける表現型などを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坪田朋也、松岡研、塚本蔵、高島成二
2. 発表標題 心臓および病態特異的エンハンサーCR9は力学的負荷で活性化されBNP発現を増加する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心不全に応答するエンハンサーポリヌクレオチド、及び前記エンハンサーポリヌクレオチドを含む発現ベクター	発明者 松岡研、高島成二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-206823	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----