

平成 22年 5月 17日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790543
 研究課題名 (和文) 心不全における転写抑制因子NRSFの役割心・副腎連関について
 研究課題名 (英文) The Role of NRSF in Heart Failure (Cardio-Adrenal Connection)
 研究代表者
 柴川 智 (Satoshi Somekawa)
 奈良県立医科大学 医学部附属病院 研究員
 研究者番号：90453167

研究成果の概要 (和文)：転写抑制因子NRSFの転写抑制解除はCACNA1H遺伝子およびCYP11B2、CYP11B1遺伝子の発現上昇を介して副腎細胞におけるアルドステロンおよびコルチゾールの合成に参与している

研究成果の概要 (英文)：Transcriptional Repressor Neuron Restrictive Silencer Factor (NRSF) regulate aldosterone and cortisol/corticosterone synthesis by binding to NRSF-binding elements in CACNA1H gene in human and rat to indirectly induce CYP11B2 and CYP11B1 and by binding to those in human CYP11B2 and CYP11B1 genes to directly modify the expression of these genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1)NRSF/NRSE (2)アルドステロン (3)副腎 (4)心不全

1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは高血圧、心不全、心筋梗後の心筋リモデリングなどの病的な状態の進展に深く関与している。また最近では心不全患者においてアルドステロンおよびコルチゾールの血中濃度の上昇は独立した予後規定因子として報告されている。したがって、心不全時におけるこれらの副腎ホルモンの合成亢進の機序を解明することは非常に重要である。

2. 研究の目的

副腎におけるアルドステロンやコルチゾール合成はアンジオテンシン II や細胞外カリウム刺激により細胞内へカルシウム流入が起こりその下流でカルモデュリン・カルモデュリンキナーゼが活性化されてそれらがいくつかの転写活性因子を活性化してアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) や 11 β -hydroxylase (CYP11B1) をコードする遺伝子の転写が亢進することで引き起こされることが報告されている。しかし、依

然その分子機序は詳細に解明されていない。最近我々は、Neuron Restrictive Silencer Element (NRSE) という転写抑制エレメントに結合して遺伝子発現を抑制する転写抑制因子 Neuron Restrictive Silencer Factor (NRSF) の抑制解除が心不全時の心筋胎児型遺伝子(ANP、BNP)の再誘導に関与していることを証明した。NRSFはもともと神経特異的な遺伝子が非神経細胞で発現しないようにするための転写抑制システムとして報告された。すなわち非神経細胞においては転写抑制因子NRSFが存在してそれが神経特異的な遺伝子に含まれているNRSEに結合して神経特異的な遺伝子は非神経細胞において発現しないようにするための機序として知られている。しかし、最近では上述の心筋細胞のように非神経細胞における非神経遺伝子の転写発現調節にも関与していることが報告されている。コンピュータ検索の結果CYP11B2遺伝子やCYP11B1遺伝子の転写調節領域や副腎細胞でカルシウムの流入に深く関与するT型カルシウムチャネル(Cav3.2)の α サブユニットをコードする遺伝子CACNA1Hの転写調節領域にもNRSE配列が存在することを見いだした。今回はヒト副腎細胞株(H295R細胞)でNRSF/NRSE系がアルドステロンやコルチゾール合成に関与していないかを検討した。

3. 研究の方法優勢抑制変異型NRSFアデノウイルス(AD/dnNRSF)をヒト副腎細胞株のH295R細胞に感染させて内在性NRSFの機能を阻害するとコントロールに比してCYP11B2遺伝子のmRNAやCYP11B1遺伝子のmRNAが著名に上昇し、それに伴いアルドステロンとコルチゾール分泌が増加した(図1)。

次にCYP11B2プロモーターとCYP11B1プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポーター遺伝子を作成し、さらに下流でそれぞれのNRSEとそれぞれの変異NRSEを組み込んだレポーター遺伝子(CYP11B2/Luc/NRSE^{B2}、CYP11B2/Luc/mtNRSE^{B2}) (及びCYP11B1/Luc/NRSE^{B1}、CYP11B1/Luc/mtNRSE^{B1}) を作製し細胞に遺伝子導入した。確かに両方のNRSEとも変異NRSEに比して明らかにレポーター活性を抑制した。しかし、興

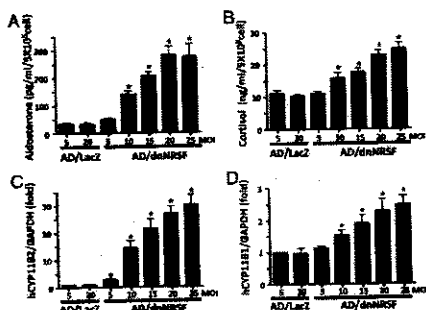


図1 優勢抑制変異型NRSFアデノウイルス(AD/dnNRSF)は副腎細胞株でアルドステロンおよびコルチゾールの分泌を亢進させる。

味深いことにこれらのプラスミドに優勢抑制変異型NRSF (dnNRSF) を共発現させると機能的な抑制エレメントを持たないプラスミド CYP11B2/Luc/mtNRSE^{B2}、CYP11B1/Luc/mtNRSE^{B1} やNRSE配列を持たないCYP11B2/Luc、CYP11B1/Lucでもレポーター活性の上昇が認められた(図2)。

別の機能的なNRSEを含む遺伝子の変化

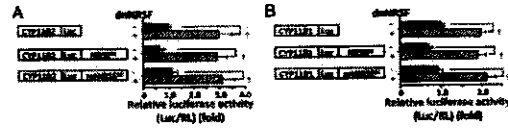


図2 NRSF/NRSE系はCYP11B2遺伝子およびCYP11B1遺伝子の転写活性を直接及び機能的に抑制している。

により直接CYP11B2プロモーターとCYP11B1プロモーターを制御する系も存在すると考えられた。副腎においてアルドステロンとコルチゾールの分泌に深く関与するT型カルシウムチャネルのCav3.2の α サブユニットをコードするCACNA1H遺伝子の関与が考えられた。実際AD/dnNRSFをH295R細胞に感染させるとCACNA1HのmRNAは上昇し、T型カルシウムチャネル遮断薬(エフォニジピン)やカルシウムの流入の下流で活性化されるカルモデュリンキナーゼの阻害剤(KN93)はAD/dnNRSFで誘導されるCYP11B2遺伝子とCYP11B1遺伝子の発現およびアルドステロンとコルチゾール分泌を抑制した(図3)。

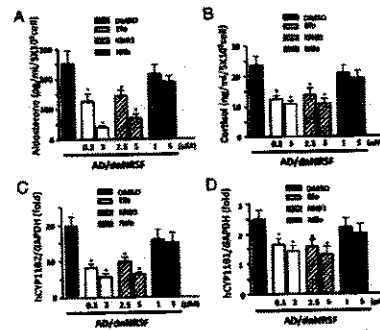


図3 T型カルシウムチャネル阻害薬は優勢抑制変異型NRSFアデノウイルス(AD/dnNRSF)による誘導されるアルドステロンおよびコルチゾールの分泌亢進を抑制する。

対して、L型カルシウムチャネル特異的な阻害剤(ニフェジピン)は抑制されなかった。また、AD/dnNRSFで前もって内在性NRSFの機能を阻害しておくこととアンジオテンシンIIや細胞外カリウムによるCYP11B2およびCYP11B1遺伝子の誘導が有意に低下することからやアンジオテンシンIIや細胞外カリウム刺激の下流でNRSFによる転写抑制解除が起こっ

ているものと推測された。

4. 研究成果

転写抑制因子NRSFの転写抑制解除はアルドステロンおよびコルチゾールの合成に深く関与している(図4)。

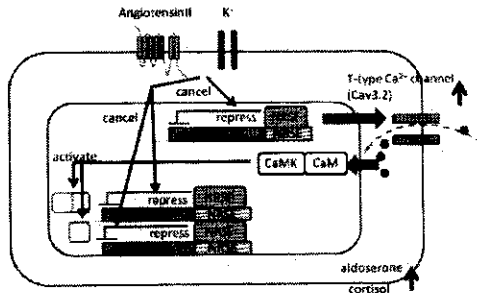


図4 概念図

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- 1) Somekawa S, Imagawa K, Naya N, Takemoto Y, Onoue K, Okayama S, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Uemura S, Mochizuki N, Saito Y. Regulation of aldosterone and cortisol production by the transcriptional repressor neuron restrictive silencer factor. *Endocrinology*.150(7):3110-3117,2009
- 2) Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Morikawa Y, Takemoto Y, Asai O, Soeda T, Okayama S, Ishigami K, Nakatani K, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Akai Y, Iwano M, Saito Y. Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation*, 115:120(24):2470-2477,2009
- 3) Takemoto Y, Kawata H, Soeda T, Imagawa K, Somekawa S, Takeda Y, Uemura S, Matsumoto M, Fujimura Y, Jo J, Kimura Y, Tabata Y, Saito Y. Human placental ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene transfer via gelatin-coated stents prevents in-stent thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29(6):857-862,2009
- 4) Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Nishida T, Morikawa Y, Nakagawa H, Tsutsumi T, Sung JH, Takemoto Y, Soeda T, Okayama S, Ishigami K, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Saito Y. Usefulness of soluble Fms-like tyrosine kinase 1 as a biomarker of acute severe heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2009 (in press)
- 5) Takeda Y, Uemura S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Onoue K, Takemoto Y, Soeda T, Okayama S, Somekawa S, Ishigami K, Takaoka M, Kawata H, Kubo A, Horii M, Nakajima T, Saito Y. Treatment with recombinant placental growth factor (PlGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction. *Circ J*, 73(9):1674-1682,2009
- 6) Ishigami K, Uemura S, Morikawa Y, Soeda T, Okayama S, Nishida T, Takemoto Y, Onoue K, Somekawa S, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Saito Y. Long term follow-up of neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: Evaluation with optical coherence tomography. *Circ J*, 2009 (in press)
- 7) Morikawa Y, Uemura S, Ishigami K, Soeda T, Okayama S, Takemoto Y, Onoue K, Somekawa S, Nishida T, Takeda Y, Kawata H, Horii M, Saito Y. Morphological features of coronary arteries in patients with coronary spastic angina: Assessment with intracoronary optical coherence tomography. *Int J Cardiol*, 2009 (in press)
- 8) Okayama S, Uemura S, Watanabe M, Morikawa Y, Onoue K, Soeda T, Iwama H, Somekawa S, Takeda Y, Uramoto H, Kobayashi Y, Saito Y. Novel application of black-blood echo-planar imaging to the assessment of myocardial infarction. *Heart and Vessel*, 2009 (in press)
- 9) Okayama S, Matsui M, Somekawa S, Iwano M, Saito Y. Non-contrast MRI for the evaluation of hydronephrotic and dysfunctioning kidney secondary to testicular cancer. *Ren Fail* 31(2):153-158,2009
- 10) Okayama S, Uemura S, Nishida T, Morikawa Y, Onoue K, Takemoto Y, Soeda T, Somekawa S, Ishigami K, Takeda Y, Horii M, Kawata H,

Takaoka M, Nakajima T, Saito Y. Progression of non-culprit coronary artery atherosclerosis after acute myocardial infarction in comparison with stable angina pectoris. *J. Atheroscler. Thromb.* 15(5): 228-234, 2008.

- 1 1) Zhang Q, Saito Y, Naya N, Imagawa K, Somekawa S, Kawata H, Takeda Y, Uemura S, Kishimoto I, Nakao K. The specific mineralocorticoid receptor blocker eplerenone attenuates left ventricular remodeling in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Hypertens. Res.* 31(6): 1251-1256, 2008.

[雑誌論文] (計 1 件)

染川 智、上村史朗、斎藤能彦。アルドステロン拮抗薬 総合臨床 2010年1月

[学会発表] (計 1 件)

1. Somekawa S, Qingfen Zhang, Nakagawa H, Sung J, Nishida T, Soeda T, Takemoto Y, Onoue K, Okayama S, Ishigami K, Kawata H, Horii M, Uemura S, Saito Y. Guanylyl Cyclase-A Signaling Attenuates Salt Effect on Aldosterone -Induced Cardiac Remodeling. American Heart Association Scientific Session 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~lint/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

染川 智 (Satoshi Somekawa)

奈良県立医科大学 医学部附属病院

研究員

研究者番号：90453167

(2) 研究分担者

()

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号：