

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07285

研究課題名(和文)心不全病態におけるmRNA脱アデニル化因子CNOT6Lの抗線維化作用の解明

研究課題名(英文)Dissecting the anti-fibrotic role of mRNA deadenylation factor CNOT6L in heart failure.

研究代表者

山口 智和 (Ymaguchi, Tomokazu)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30749940

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)：CCR4-NOT複合体はmRNAのpoly(A)鎖の分解消化(脱アデニル化)を介してmRNAの代謝調節を行うタンパク質複合体であり、CNOT6Lは脱アデニル化を行う酵素の一つである。本研究において、圧負荷刺激下の心臓線維芽細胞においてCNOT6Lが線維化遺伝子であるGeneXの脱アデニル化調節を行い、遺伝子発現を負に調節することが、心臓の線維化及びリモデリングの悪化の抑制に重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は、欧米をはじめとする先進国の多くで長年にわたり死因の上位を占めており、今後も心不全患者は世界規模で増加の一途を辿ることが予想されている。心不全の発症に関与する遺伝子変異は多数報告されているが、分子の制御異常から病態形成に至る機序が十分に理解されていないことが心不全を根治困難に至らしめている一つの要因ではないかと考えられる。本研究では、心不全病態発症における、CCR4-NOT複合体による遺伝子制御機構の実体を明らかにすることで、既存の循環器学にはない診断・治療法を確立するための重要な基礎研究になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The CCR4-NOT complex is a protein complex that regulates mRNA metabolism through degradation of the poly(A) tail of mRNA (deadenylation), and CNOT6L is one of the enzymes responsible for deadenylation. In this study, we demonstrated that CNOT6L negatively regulates the gene expression of GeneX, the fibrosis gene, through deadenylation in cardiac fibroblasts under pressure overload, suggesting that CNOT6L plays an important role in suppression of aggravating cardiac fibrosis and cardiac remodeling.

研究分野：分子生物学

キーワード：CNOT6L CCR4-NOT複合体 心不全 心臓線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CCR4-NOT 複合体は酵母からヒトまで進化的に保存されたタンパク質複合体であり、核内における転写制御から、細胞質での翻訳制御、poly(A)鎖の分解消化(脱アデニル化)を介した mRNA 分解に至るまでの、広範な遺伝子発現調節の場に寄与することが報告されている。私達の研究室では、ショウジョウバエにおける *in vivo* RNAi 心不全スクリーニングにより、心機能調節に關与する遺伝子のうち複合体の構成因子を多数同定していた(Kuba et al. *Cell* 2010)。また申請者は、CCR4-NOT 複合体の scaffold タンパク質である CNOT3 が、オートファジー関連タンパク質 ATG7 の遺伝子発現制御を介し心筋細胞の生存と心機能の恒常性維持に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(Yamaguchi et al., *Sci Signal.* 2018)。しかし、その他の構成タンパク質、特に複合体の実働的な酵素活性を担う脱アデニル化因子の心臓における機能はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者らの予備的な検討により、心臓の圧負荷ストレスに応答して、CNOT6L の発現が上昇することにより、心臓の線維化が抑制されることを見出していた。そこで、本研究では心不全病態における脱アデニル化因子 CNOT6L による抗線維化作用の分子機序を解明し、心不全の新たな病態解明や治療戦略の応用開発につなげることを研究目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

(1)マウス圧負荷心不全(TAC)モデルにおいて施術 2 週後の心臓では、心肥大が生じ代償的に心機能が保たれた状態を示すが、この時 CNOT6L タンパク質の発現が顕著に上昇することが予備検討にて明らかになっていた。このことから CNOT6L が何らかの遺伝子発現調節に寄与している可能性が考えられたため、TAC 後 2 週の野生型及び CNOT6L 遺伝子を欠損したマウス心臓の遺伝子発現変動を次世代シーケンス(RNA-seq)により解析した。

(2)CNOT6L 遺伝子欠損心臓の RNA-seq 解析により線維化遺伝子である GeneX の発現上昇を認め、GeneX の発現上昇が心臓リモデリングの増悪に寄与しているのかを明らかにするために、CNOT6L 遺伝子欠損マウスと GeneX 遺伝子欠損マウスのかけ合わせから CNOT6L:GeneX 二重遺伝子欠損マウスを作成し、TAC 誘導後の心臓における線維化病態を解析した。

(3)心臓線維化において CNOT6L が生理的に寄与する心臓組織中の細胞種を特定するために、新生児マウス及び成体マウス心臓から心筋細胞及び心臓線維芽細胞を単離した。CNOT6L を欠損した細胞、もしくは siRNA により CNOT6L のノックダウンを行った細胞に対し、アンジオテンシン II(AngII)を添加することで、GeneX タンパク質の発現が亢進するのかを Western blot にて確認した。

(4)抗 CNOT6L 抗体を用いた RNA 免疫沈降法により心臓組織において CNOT6L と GeneX mRNA が結合しているのかの検証を行った。また、AngII を持続投与し肥大を誘導した野生型及び CNOT6L 遺伝子欠損マウスの心臓から RNA を抽出し、GeneX mRNA の poly(A)鎖長を比較した(PAT 解析)。さらに、Luciferase 遺伝子の下流に GeneX の 3' UTR 配列を連結したレポーターベクターを作成し、CNOT6L の過剰発現下、もしくは遺伝子欠損下におけるレポーター活性を測定した。

4. 研究成果

(1)CNOT6 遺伝子欠損マウス心臓における遺伝子発現変化: CNOT6L 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ、TAC 後 2 週で有意に心機能が低下することが申請者らによる予備検討によりわかっていた。

そこで、このような病態形成がどのような遺伝子発現変動により生じているのかを明らかにするために、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、CNOT6L を欠損した心臓において 202 個の遺伝子の発現上昇を認め、Gene ontology 解析の結果、その多くが細胞外マトリックス因子、および細胞浸潤や炎症反応に關与する遺伝子群であることがわかった(図 1)。qPCR 解析により遺伝子発現変動の再現性

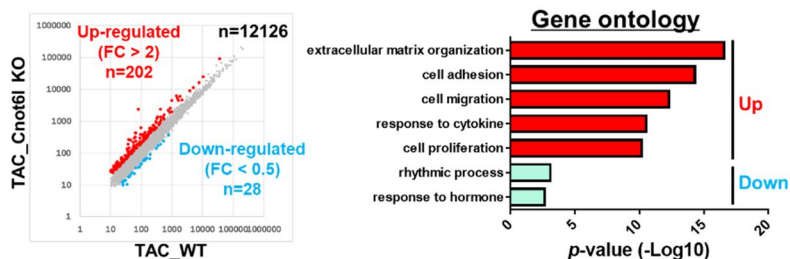


図1: TAC2週心臓のRNA-seq解析

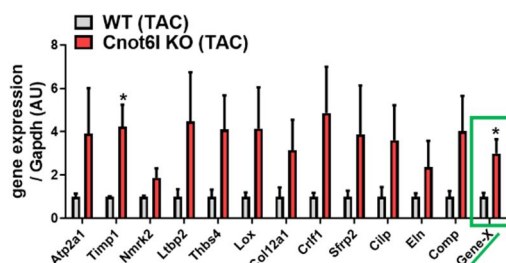


図2: TAC2週心臓のqPCR解析

を確認したところ、とりわけ心臓リモデリングに関与することで知られる線維化誘導因子 (GeneX) が、CNOT6L 遺伝子欠損マウスの心臓において有意に上昇していることがわかった (図 2)。

(2) CNOT6L;Gene-X 二重欠損による心臓線維化の改善: CNOT6L を欠損した心臓における線維化遺伝子 GeneX の発現上昇が心不全病態の悪化の一因であると考えられたことから、CNOT6L;Gene-X 二重遺伝子

欠損マウスを作成し、TAC 後の心不全病態の表現型を解析した。その結果、CNOT6L;Gene-X 二重欠損マウスでは CNOT6L の欠損で増悪した心臓線維化病態 (図 3) や線維化関連遺伝子の遺伝子発現 (図 4) の有意な改善を認めた。また、AngII を持続投与して心肥大を誘導した CNOT6L 欠損マウスにおいても、GeneX の欠損による線維化の減少を認めており、以上の結果から、レニン-アンジオテンシン系に誘導される圧負荷心不全病態において、CNOT6L による GeneX の発現調節機構が線維化の抑制に重要な役割を果たすと考えられた。

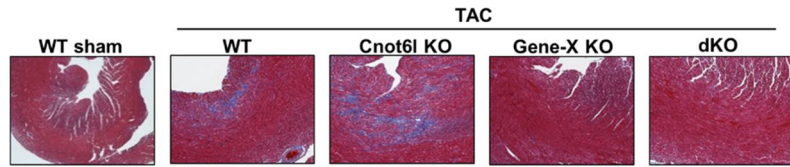


図3: 心臓組織におけるマッソン・トリクローム染色像

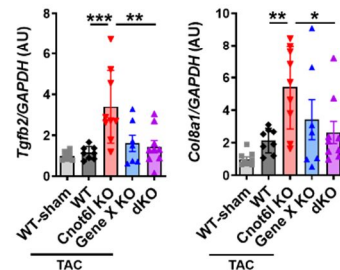


図4: 心臓の線維化関連遺伝子のqPCR解析

(3) 心臓線維芽細胞における GeneX の発現制御: CNOT6L の標的細胞を明らかにするために、マウス新生仔の心臓より心筋細胞及び線維芽細胞を単離して AngII 刺激を行ったものいずれも GeneX の発現誘導を認めなかった。そこでコラゲナーゼ灌流法により、成体マウス心臓から心筋細胞及び線維芽細胞を単離し、AngII 刺激を行

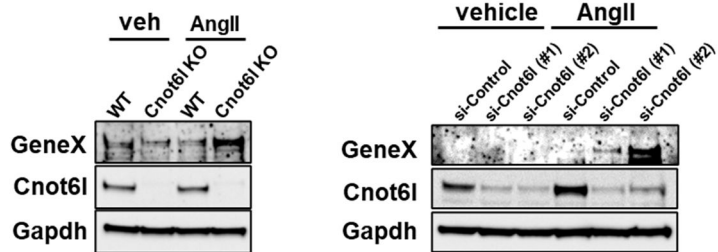


図5: 心臓線維芽細胞における GeneX タンパク質の発現

ったところ、CNOT6L を欠損した心臓線維芽細胞において GeneX タンパク質の発現上昇を認めた。同様に siRNA を用いて CNOT6L のノックダウンを誘導した成体心臓線維芽細胞においても GeneX タンパク質の発現上昇を再現した (図 4)。以上の結果から、心臓線維芽細胞における CNOT6L の GeneX 遺伝子の発現制御が心臓線維化を抑制するうえで重要な役割を担う可能性が示唆された。

(4) CNOT6L による GeneX 遺伝子発現制御の解析: RNA 免疫沈降法を用いて、心臓組織サンプルを解析したところ、CNOT6L の免疫沈降画分に GeneX mRNA の共沈を認めた (図 5A)。また、AngII 持続投与により肥大した心臓において PAT 解析を行ったところ、CNOT6L 欠損心臓では GeneX mRNA の poly(A) 鎖が伸長していることがわかった (図 5B)。さらに、GeneX の 3' UTR 配列をルシフェラーゼ遺伝子に融合したレポータープラスミドを構築し、AT1 受容体及び CNOT6L の発現ベクターを HEK293T 細胞へ導入したところ、AngII 処理下において CNOT6L の強制発現によりレポーター活性が減衰した。逆に、CRISPR/CAS9 システムを用いて、CNOT6L 遺伝子の欠損を導入した HEK293T 細胞に同レポーターを導入した結果、レポーター活性の上昇を認めた。以上の結果から、CNOT6L は直接的に GeneX mRNA に結合し、脱アデニル化制御による安定性制御を介して同遺伝子の発現調節を行っていると考えられる。また、Gene X の 3' UTR 配列に存在する何らかの cis-element が CNOT6L による脱アデニル化制御に重要な役割を果たすことが示唆されたことから、現在は GeneX mRNA の二次構造や RNA 結合因子の探索に焦点を当て、分子制御の詳細について解析を進めている。

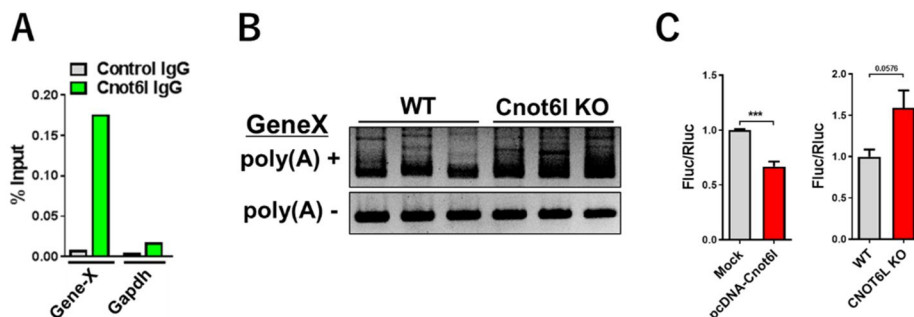


図6: 抗Cnot6l抗体を用いた心臓のRNA免疫沈降(A)、GeneX mRNAのPAT解析(B)、およびLuc-GeneX 3'UTRを用いたレポーター解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kuba Keiji, Yamaguchi Tomokazu, Penninger Josef M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Pathogenesis of ARDS in COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.732690	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 Fujita Hiromu, Motoyama Satoru, An Jianbo, Nagakai Yushi, Yamaguchi Tomokazu, Koyota Souichi, Sato Yusuke, Wakita Akiyuki, Imai Kazuhiro, Kuba Keiji, Minamiya Yoshihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Peritumoral CD16b positive-neutrophil accumulation strongly correlates with regional lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 S0039-6060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2021.11.022	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 Yamaguchi T, Hoshizaki M, Minato T, Nirasawa S, Asaka MN, Niiyama M, Imai M, Uda A, Chan JF, Takahashi S, An J, Saku A, Nukiwa R, Utsumi D, Kiso M, Yasuhara A, Poon VK, Chan CC, Fujino Y, Motoyama S, Nagata S, Penninger JM, Kamada H, Yuen KY, Kamitani W, Maeda K, Kawaoka Y, Yasutomi Y, Imai Y, Kuba K.	4. 巻 12
2. 論文標題 ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP protects from SARS-CoV-2-induced lung injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27097-8	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 Asaka Masamitsu N., Utsumi Daichi, Kamada Haruhiko, Nagata Satoshi, Nakachi Yutaka, Yamaguchi Tomokazu, Kawaoka Yoshihiro, Kuba Keiji, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter?driven hACE2-transgenic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e152529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.152529	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 Takahashi Akinori, Suzuki Toru, Soeda Shou, Takaoka Shohei, Kobori Shungo, Yamaguchi Tomokazu, Mohamed Haytham Mohamed Aly, Yanagiya Akiko, Abe Takaya, Shigeta Mayo, Furuta Yasuhide, Kuba Keiji, Yamamoto Tadashi	4. 巻 3
2. 論文標題 The CCR4-NOT complex maintains liver homeostasis through mRNA deadenylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900494	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 Nagaki Yushi, Motoyama Satoru, Yamaguchi Tomokazu, Hoshizaki Midori, Sato Yusuke, Sato Teruki, Koizumi Yukio, Wakita Akiyuki, Kawakita Yuta, Imai Kazuhiro, Nanjo Hiroshi, Watanabe Hiroyuki, Imai Yumiko, Minamiya Yoshihiro, Kuba Keiji	4. 巻 25
2. 論文標題 m6A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 547 ~ 561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12792	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 An Jianbo, Nagaki Yushi, Motoyama Satoru, Kuze Yuta, Hoshizaki Midori, Kemuriyama Kohei, Yamaguchi Tomokazu, Ebihara Takashi, Minamiya Yoshihiro, Suzuki Yutaka, Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Galectin-7 as a crucial metastatic enhancer of squamous cell carcinoma associated with immunosuppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5319 ~ 5330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02525-1	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 Minato Takafumi, Yamaguchi Tomokazu, Hoshizaki Midori, Nirasawa Satoru, An Jianbo, Takahashi Saori, Penninger Josef M., Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 17
2. 論文標題 ACE2-like enzyme B38-CAP suppresses abdominal sepsis and severe acute lung injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0270920 ~ 0270920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0270920	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

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口智和、湊隆文、星崎みどり、葦澤悟、安健博、高橋紗織、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 ACE2様カルボキシペプチダーゼB38-CAPは、誤嚥性肺炎、腹部敗血症、およびSARS-CoV-2感染によって誘発される急性肺損傷を抑制する
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、安健博、河原行郎、鈴木穰、稲田利文、今井由美子、山本雅、久場敬司
2. 発表標題 胚発生及び細胞増殖におけるCNOT4ユビキチンリガーゼの生理的役割の解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、久場 敬司
2. 発表標題 Physiological roles of CCR4-NOT complex and CNOT4 in neuronal homeostasis.
3. 学会等名 第9回 CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、湊隆文、葦澤悟、浅賀正充、安健博、永田諭志、鎌田春彦、神谷亘、河岡義裕、保富康宏、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 微生物由来の ACE2 様酵素 B38-CAP による循環器及び呼吸器病態の治療効果
3. 学会等名 2022 年度生理研心血管研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、湊隆文、菲澤悟、浅賀正充、内海大知、安健博、永田諭志、鎌田春彦、神谷亘、河岡義裕、保富康宏、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2様酵素B38-CAPによるCOVID-19急性肺傷害の治療効果
3. 学会等名 第73回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomokazu Yamaguchi, Midori Hoshizaki, Jianbo An, Yukio Kawahara, Yutaka Suzuki, Yumiko Imai, Toshifumi Inada, Tadashi Yamamoto, Keiji Kuba
2. 発表標題 Dissecting the roles of CCR4-NOT complex and CNOT4 in maintaining tissue homeostasis.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、湊隆文、菲澤悟、浅賀正充、新山真由美、安健博、内海大知、永田諭志、鎌田春彦、神谷亘、河岡義裕、保富康宏、今井由美子、久場 敬司
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2(ACE2) 酵素活性によるCOVID-19急性肺傷害の治療効果
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口智和、久場 敬司
2. 発表標題 Dissecting the roles of CCR4-NOT complex and CNOT4 in maintaining tissue homeostasis.
3. 学会等名 第8回 CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、湊隆文、葦澤悟、浅賀正充、新山真由美、安健博、永田諭志、鎌田春彦、神谷亘、河岡義裕、保富康宏、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)酵素活性によるCOVID-19急性肺傷害の改善
3. 学会等名 第31回 日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智和、星崎みどり、安健博、河原行郎、鈴木稯、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 胚発生及び細胞増殖におけるCNOT4ユビキチン リガーゼのmRNA制御作用の解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、湊隆文、安健博、星崎みどり、渡邊博之、今井由美子、山本雅、久場敬司
2. 発表標題 圧負荷心不全におけるCNOT6L脱アデニル化因子の抗線維化作用の解明
3. 学会等名 第86回 日本生化学会 東北支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湊隆文、山口智和、佐藤輝紀、葦澤悟、今井由美子、高橋砂織、渡邊博之、久場敬司
2. 発表標題 微生物由来のACE2様酵素B38-CAPはマウスにおける心臓のリモデリングと機能不全を改善する
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、湊隆文、安健博、星崎みどり、渡邊博之、今井由美子、山本雅、久場敬司。
2. 発表標題 圧負荷心臓リモデリングにおけるCNOT6L脱アデニル化因子の抗線維化作用の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湊隆文、山口智和、佐藤輝紀、葦澤悟、今井由美子、高橋砂織、渡邊博之、久場敬司。
2. 発表標題 微生物由来のACE2様酵素B38-CAPはマウスにおける心臓リモデリングと心機能不全を改善する
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智和、湊隆文、星崎みどり、浅賀正充、葦澤悟、新山真由美、今井正樹、高橋砂織、内海大知、安健博、永田 諭志、鎌田春彦、河岡義裕、保富康弘、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 Suppression of SARS-CoV-2-induced lung injury by ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP in COVID-19 mouse model
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場 敬司
2. 発表標題 The CCR4-NOT deadenylase complex controls the expression of autophagy genes and prevents Atg7-dependent cell death in the heart.
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会（招待講演）
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
---------	---------