

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08488

研究課題名(和文) DEAD-box型RNAヘリカーゼを標的とした新規心不全治療の開発

研究課題名(英文) Developing novel heart failure therapy targeting DEAD-box RNA helicase

研究代表者

東邦 康智 (Higashikuni, Yasutomi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10586481

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)：心不全発症にRNA代謝の変容が寄与するがその機序は不明である。DEAD-box型RNAヘリカーゼDdx41はRNA代謝に寄与する酵素である。本研究では心不全の病態におけるDdx41の役割とその機序の解明を行った。Ddx41はヒト不全心において発現が増加しており、心筋細胞特異的Ddx41過剰発現マウスでは圧負荷や心筋梗塞後の心不全の予後が悪化した。Ddx41は炎症関連因子のRNA及び蛋白質と結合し、心筋細胞におけるDNA損傷やミトコンドリア機能障害を増悪させた。Ddx41の発現抑制はその負の作用を抑制して、心筋細胞保護的に作用した。Ddx41は心不全の新規治療標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良の病態である心不全は超高齢化社会である我が国において急増しており、新規治療法の開発が急務である。本研究により、RNA代謝の担い手であるRNAヘリカーゼDdx41が心不全の病態に深く寄与することを解明した。心不全発症におけるRNA代謝の変容の重要性とその治療的介入点が明らかとなった。

学術的には、Ddx41が炎症関連因子のRNA及び蛋白質と結合し、DNA損傷とミトコンドリア機能障害を誘導することを解明した。心不全発症におけるRNA代謝と炎症誘導機構をつなぐ機序の一端が明らかとなった。Ddx41はがん等の疾患の発症にも寄与しており、本研究成果は心不全以外の疾患の病態生理の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：RNA metabolism is a fundamental mechanism that controls protein synthesis. Changes in RNA metabolism have been implicated in the pathogenesis of heart failure. However, their mechanisms remain largely unknown. Ddx41 is an RNA helicase that binds to RNA and regulates RNA metabolism. This study sought to elucidate the role and mechanism of Ddx41-mediated RNA metabolism in the pathophysiology of heart failure. Ddx41 was upregulated in human failing hearts. Mice with cardiomyocyte-specific overexpression of Ddx41 showed worse survival rate and cardiac remodeling during pressure overload or after myocardial infarction than wild-type mice. We found that Ddx41 binds to mRNAs and proteins related to inflammatory responses, which leads to DNA damage and mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes. Inhibition of Ddx41 protected cardiomyocytes against DNA damage and mitochondrial dysfunction. Collectively, our results suggest that Ddx41 might be a promising therapeutic target for heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 RNA代謝 RNAヘリカーゼ 炎症 DNA損傷 ミトコンドリア機能障害 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる心疾患の終末像である心不全は超高齢化社会である我が国において急増しており、「心不全パンデミック」が危惧されている。心不全は高齢者の活動度や認知機能の低下につながり、社会の活力の低下の原因となっている。心不全の発症メカニズムは未解明な部分が多い。現在の標準的心不全薬物治療は、心不全の病態の進行を抑制することが示されている。しかし、多くの症例では病態を逆行させることは難しい。心不全を「治癒」し社会の活力を維持するためには、より詳細な心不全発症機序の解明と新たな治療法の確立が必要である。

多因子疾患である心不全は、細胞レベル、臓器レベル及び個体レベルの複雑な生物学的プログラム全体の偏移により引き起こされる。生物学的プログラムはゲノム情報が蛋白質合成に変換されることで実行される。その変換は RNA を介して行われるプロセスである。RNA は転写から翻訳の過程において様々な代謝的・機能的修飾を受け、その修飾の変化が最終的に生体機能の変化につながる。実際、RNA 代謝や修飾はがんや糖尿病の病態生理に深く関与することが報告されている。しかし、これまでの心不全研究は主に遺伝子の転写及び翻訳後に焦点が当てられ、心不全発症における RNA の代謝・修飾の変化の役割とそのメカニズムは明らかではない。

我々はゲノム・スケールの表現型スクリーニングにより、様々なストレス環境下において心筋細胞保護作用に関係する因子として、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼである Ddx41 を同定した。DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼは標的となる RNA に結合し、転写・翻訳からスプライシング、貯蔵、輸送、分解やリボソーム生成に至るまで、幅広く RNA の代謝と機能を制御する。しかし、Ddx41 の発現への介入による心筋細胞保護メカニズムや、それらの酵素の心不全の病態生理における役割は不明である。本研究では、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼの機能解析を通じて、心不全の病態生理における RNA 代謝の役割を明らかにし、心不全の新規治療法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Ddx41 の心筋細胞における機能解析を通じて心不全発症における RNA 代謝の役割を明らかにし、RNA 代謝を標的とした新規心不全治療を開発することである。

Ddx41 の機能解析のために、Ddx41 の心筋細胞における結合標的 RNA 及び結合蛋白質を同定する。また、Ddx41 の過剰発現または抑制が心筋細胞のトランスクリプトームに与える影響を解析する。さらに、遺伝子改変マウスを用いて、マウス心不全モデルにおける Ddx41 の役割を解明する。最終的に、Ddx41 に対する shRNA を用いた心不全治療の有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) ラット新生児由来心筋細胞(NRVM)に Ddx41 の cDNA または siRNA を導入する。前者の導入にはレンチウィルスを、後者の導入には脂質ナノ粒子を使用する。NRVM におけるミトコンドリア機能、DNA 損傷及び酸化ストレスをそれぞれ、蛍光色素を用いたミトコンドリア膜電位差の検出、リン酸化 H2AX の検出及び過酸化水素レベルの測定により評価する。病的ストレスとしてドキシルピシンを使用する。

(2) NRVM に Ddx41 の cDNA または siRNA を(1)の方法を用いて導入する。Ddx41 を過剰発現または抑制した NRVM より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行う。

(3) Ddx41 の結合標的 RNA を同定するため、免疫沈降法を用いた解析(RIP-seq 解析)を行う。具体的には、NRVM に Flag tag で標識した Ddx41 をレンチウィルスベクターを用いて過剰発現させる。NRVM より採取した細胞溶解液から磁気ビーズを用いた免疫沈降法により Ddx41 結合 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて Ddx41 結合 RNA を同定する。

(4) Ddx41 の結合蛋白質を同定するため、免疫沈降法を用いたプロテオーム解析を行う。具体的には、NRVM に Flag tag で標識した Ddx41 をレンチウィルスベクターを用いて過剰発現させる。0.1%ホルムアルデヒドで固定後、NRVM より蛋白質を抽出する。抗 Flag tag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抽出した蛋白質を質量分析器で定量解析する。

(5) 心筋細胞特異的 Ddx41 過剰発現(Ddx41-Tg)マウス及び心筋細胞特異的 Ddx41 欠損マウスを作成する。後者は CRISPR 技術を用いて作成する。大動脈縮窄術による圧負荷心不全モデル及び前下行枝結紮術による心筋梗塞モデルを用いて、遺伝子改変マウスにおける予後と経時的な心機能及び心構造の変化をコントロール群と比較して評価する。心機能と心構造の評価には、心エコー及び組織学的解析を用いる。

(6) ヒト不全心臓の遺伝子発現データベースを解析し、拡張型心筋症及び虚血性心筋症における

Ddx41 の発現を検証する。

(7) 米国 Broad Institute が提供する Genetic Perturbation Platform を用いて Ddx41 に対する shRNA を設計し、AAV9 作成用プラスミドの心筋細胞特異的遺伝子プロモーター下流に導入する。上記 shRNA を心不全状態となった野生型マウスに導入し、その治療効果を心エコー及び組織学的解析で検証する。

#### 4. 研究成果

(1) Ddx41 を NRVM に過剰発現させると、非病的ストレス環境下でミトコンドリア機能障害を生じた。しかし、DNA 損傷や酸化ストレスの増加は検出されなかった。ドキシソルビシン負荷下では、Ddx41 過剰発現により NRVM におけるミトコンドリア機能障害、DNA 損傷及び酸化ストレス産生が増悪した。Ddx41 に対する siRNA で NRVM を処理すると、非病的ストレス環境下では control siRNA 処理群と比較してミトコンドリア機能や DNA 損傷及び酸化ストレス産生に有意差は認めなかった。しかし、ドキシソルビシン負荷下では、ミトコンドリア機能障害、DNA 損傷及び酸化ストレス産生を軽減した。

以上より、Ddx41 は病的ストレス下における心筋細胞のミトコンドリア機能障害や DNA 損傷及び酸化ストレス産生を増悪させ、その抑制はそれらを軽減し心筋細胞保護的に作用することが明らかとなった。

(2) Ddx41 を過剰発現させた NRVM におけるトランスクリプトーム解析では、炎症関連遺伝子の発現が全体的に増加しており、Ddx41 が心筋細胞における炎症誘導系の活性化に寄与することが明らかとなった。

一方で、Ddx41 の発現を抑制した NRVM におけるトランスクリプトーム解析では、心筋細胞肥大、電子伝達系及び細胞外マトリックス産生関連遺伝子の発現が低下し、組織修復関連遺伝子の発現が増加していた。以上から、Ddx41 の抑制は心筋細胞を中心とした心臓の恒常性維持につながり、心不全治療の有望な治療標的となり得ることが分かった

(3) Ddx41 を過剰発現させた NRVM による RIP-seq 解析により、Ddx41 は広汎な炎症関連遺伝子の RNA と結合することが明らかとなった。この結果は、トランスクリプトーム解析の結果と一致する所見であった。

(4) NRVM を用いたプロテオーム解析により、Ddx41 の心筋細胞における結合蛋白質を検出した。その結果、Ddx41 は NF- $\kappa$ B システムにおける転写調節因子やミトコンドリア電子伝達系の complex 関連因子、DNA 修復関連因子と結合することが明らかとなった。その結合が Ddx41 や結合蛋白質の機能を促進するのか、または抑制するのかについては引き続きの検討が必要である。

(5) NRVM におけるトランスクリプトーム解析、RIP-seq 解析及びプロテオーム解析の結果を統合すると、その共通項として特定の炎症関連転写調節因子が Ddx41 の機能発現に深く関与することが示唆された。同因子は心不全発症を引き起こす炎症変容機構のマスター・レギュレーターとして我々が同定した因子であり、ミトコンドリア機能や心筋細胞の収縮関連蛋白質発現を制御している。同因子の抑制は代償性心肥大から心不全への移行を抑制することから、Ddx41 は同因子の機能を促進することが示唆される。

(6) Ddx41-Tg マウスの解析を行った。若年においては野生型マウスとその表現型に差は認めなかった。しかし、老齢においては、Ddx41-Tg マウスにおいて老化が促進していた。

8-12 週令の Ddx41-Tg マウスに大動脈縮窄術による圧負荷を加えると、野生型マウスと比較して死亡率が増加した。さらに術後 4 週目及び 6 週目では、野生型マウスと比較して心収縮能の低下と心拡大の増悪を認め、心リモデリングが増悪していた。組織学的評価では、心筋細胞肥大や心線維化が野生型マウスと比較して増悪しており、細胞実験における遺伝子発現解析の結果と一致する所見であった。

同様に、Ddx41-Tg マウスに心筋梗塞を誘導すると、野生型マウスと比較して死亡率と心リモデリングが増悪していた。以上から、Ddx41 は様々な基礎疾患に起因する心不全の発症に普遍的に重要な役割を果たすことが示唆された。

なお、心筋細胞特異的 Ddx41 欠損マウスの作成は難渋しており、引き続きその作成に取り組んでいく。

(7) ヒト不全心の遺伝子発現データベースの解析により、Ddx41 は拡張型心筋症及び虚血性心筋症において心組織での発現が増加していることが分かった。マウスの心不全モデルでも偽手術群と比較してその発現が増加しており、Ddx41 は動物種横断的に心不全発症に寄与することが示唆された。

(8) Ddx41 の shRNA を心筋トロポニン T 遺伝子プロモーター下流に配した AAV9 ベクターを作成

した。現在、その治療効果について検証中である。

(9) Ddx41 は様々な機能が報告されている RNA ヘリカーゼである。Ddx41 は mRNA スプライシングや安定化及び mRNA の翻訳に寄与していることが報告されている (J Biol Chem. 2017;292:8331-8341)。また、mRNA とゲノム DNA が形成する R-loop 構造の解除に寄与しており、その欠損は骨髄異形成症候群や白血病を引き起こすことが報告されている (Blood. 2023;141:534-549) (Nature Commun. 2021;12:7314)。さらに、Ddx41 は二重鎖 DNA のセンサーとしても知られており、ウィルス由来 DNA やミトコンドリア DNA を感知して STING を介して NF- $\kappa$ B システムの活性化やインターフェロンの誘導に寄与することも報告されている (Cell Rep. 2022;39:110856) (iScience. 2022;25:104404)。

本研究成果と合わせると、Ddx41 は DNA 損傷、ミトコンドリア機能障害及び炎症をつなぐ核酸-蛋白質連関を制御する中心的因子であることが示唆される。特に、我々が Ddx41 との結合を確認した炎症関連転写調節因子は炎症性腸疾患やがん、生活習慣病にも深く関与する因子であり、本研究成果は同因子の機能制御機構の解明とそれらの疾患の病態生理の解明にもつながることが期待できる。

(10) 治療応用の観点からは、今後 Ddx41 の抑制による心不全治療効果の詳細な検討を進めていく。特に、Ddx41 の抑制は血球系に負の作用をもたらす可能性が高く、心筋細胞特異的な抑制の治療効果と副作用について十分に検証する必要がある。

心不全発症機序解明の観点からは、心筋細胞におけるミトコンドリア DNA などによる Ddx41 機能制御機構の解明などを進めていく必要がある。そして、DNA 損傷、ミトコンドリア機能障害及び炎症をつなぐ核酸-蛋白質連関の全容を解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wenhao Liu, Yasutomi Higashikuni, Masataka Sata	4. 巻 46
2. 論文標題 Optimizing antihypertensive therapy in patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 797-800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-022-01150-5	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 Wenhao Liu, Yasutomi Higashikuni, Masataka Sata	4. 巻 45
2. 論文標題 Linking RNA dynamics to heart disease: the lncRNA/miRNA/mRNA axis in myocardial ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1067-1069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-022-00905-4	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 Yasutomi Higashikuni, Wenhao Liu, Masataka Sata	4. 巻 29
2. 論文標題 Give a Leg Up: Screening for Peripheral Artery Disease after Acute Myocardial Infarction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 989-991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.ED186	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 Yasutomi Higashikuni, Wenhao Liu, Takumi Obana, Masataka Sata	4. 巻 22
2. 論文標題 Pathogenic Basis of Thromboinflammation and Endothelial Injury in COVID-19: Current Findings and Therapeutic Implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222112081	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasutomi Higashikuni
2. 発表標題 Homeostatic Inflammation in Heart Disease
3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasutomi Higashikuni
2. 発表標題 Next-Generation Gene Therapy for Heart Failure
3. 学会等名 The 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東邦 康智
2. 発表標題 次世代循環器病治療プラットフォーム開発の展望
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第67回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Higashikuni Lab <a href="https://www.higashikuni-lab.org/">https://www.higashikuni-lab.org/</a>
--

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			
米国	Massachusetts Institute of Technology			