

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22714

研究課題名(和文)心不全発症に関与するエピジェネティックな変化を伴う転写制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of transcriptional regulatory mechanisms Involved in the development of heart failure with epigenetic changes

研究代表者

船本 雅文(FUNAMOTO, Masafumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：40882064

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、病的な心肥大から心不全への移行におけるヒストンのアセチル化修飾部位の変化にクロマチンリモデリング因子のBRG1がどのように関与しているのかを解明することを目的とした。培養心筋細胞においてBRG1の阻害剤が心筋細胞肥大を抑制し、H3K122のアセチル化並びにH3K9のアセチル化を抑制することを見出した。さらに、心不全誘導モデルの大動脈縮窄術を施したマウスにBRG1阻害剤を投与すると心不全の進展を改善することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は日本人の死亡原因第2位であり、なかでも心不全はあらゆる心疾患の最終像である。これまで多くの研究が行われているが、未だ心不全の根治的な治療法は確立されていない。そのため、心不全の新たな治療標的を解明することが求められている。本研究によりBRG1の阻害により心不全の進展が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文):This study aims to elucidate how the chromatin remodeling factor BRG1 is involved in the changes in histone acetylation modification sites in the transition from cardiac hypertrophy to heart failure. We found that inhibitors of BRG1 suppressed cardiomyocyte hypertrophy, H3K122 acetylation, and H3K9 acetylation in cultured cardiomyocytes. Furthermore, we found that BRG1 inhibitors ameliorated the progression of heart failure in TAC-induced heart failure.

研究分野：薬理学

キーワード：心不全 エピジェネティクス ヒストン BRG1 TAC

1. 研究開始当初の背景

心疾患は日本人の死亡原因第 2 位であり、なかでも心不全はあらゆる心疾患の最終像である。心臓は、高血圧などの負荷がかかると個々の心筋細胞が肥大(心肥大)することで代償する。この代償機構は、負荷が継続すると破綻し、心不全に陥る。これまで多くの研究が行われているが、未だ心不全の根治的な治療法は確立されていない。そのため、心不全の新たな治療標的を解明することが求められている。ヒストンのアセチル化修飾部位には、テールドメインと球状ドメインの 2 つのドメインが存在する。テールドメインの H3K9 などがアセチル化されると、遺伝子の転写が亢進する(Toth et al. Cancer Sci 2012)。近年、ヒストンの DNA が巻き付く足場に存在する球状ドメインの H3K122 が新たなアセチル化修飾部位として報告されている。この H3K122 がアセチル化されるとヌクレオソーム構造が緩み、転写がより強力に活性化する (Tropberger et al. Cell 2013)。研究代表者はヒストンのテールドメインと球状ドメインといったアセチル化修飾部位の違いに着目し、(1) 心筋細胞肥大時に p300 によってヒストンのテールドメインと球状ドメインがアセチル化されること、(2) 心肥大期から心不全期にかけてヒストンのアセチル化修飾部位がテールドメインから球状ドメインへと変遷すること、(3) 心不全期にクロマチンリモデリング因子の BRG1 と p300 との結合が増加し、BRG1 の肥大反応遺伝子上へのリクルートが増加していることを見出した。しかし、心肥大や心不全、ヒストンの球状ドメインのアセチル化に BRG1 がどのように関わっているかについて詳細に解明されていない。

2. 研究の目的

過去の研究において心肥大期から心不全期に肥大反応因子の転写が亢進し、p300 の肥大反応プロモーターへのリクルートは心肥大期・心不全期ともに上昇していた。しかし、両期間で p300 のリクルート量は変化しなかったが、ヒストンのアセチル化修飾部位は変遷していた。そこで、申請者は心不全期にヒストンのアセチル化修飾部位が変化するのは p300 と別のタンパク質との結合が変化するためと考え、クロマチンリモデリング因子等について検討した結果、心不全期に p300 とクロマチンリモデリング因子の BRG1 との結合が増加することを見出した。BRG1 は、SWI/SNF 複合体の主要なタンパク質で ATP 依存的にヌクレオソーム構造を緩め、転写を亢進する。ヒト心筋症において BRG1 と α -MHC の高発現が確認され、心臓特異的 BRG1KO マウスでは圧負荷誘導性の心不全が抑制された (Hang et al. Nature 2010)。また BRG1 と p300 はプロモドメインタンパク質の Brd4 を介して H3K27 と H3K56 をアセチル化し、転写を調節する (Wu et al. Cell Rep 2018)。上記より、心不全期における BRG1 のヒストンアセチル化修飾への役割を解明することで心不全の新規治療法開発を目指す研究発想に至った。本研究では、BRG1 の阻害や欠失により心肥大や心不全、球状ドメインのアセチル化への影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養心筋細胞における BRG1 の心筋細胞肥大への機能評価

ラット初代培養心筋細胞を用いて、BRG1 のノックダウンを行いフェニレフリン刺激により心筋細胞の肥大を誘導した。蛍光免疫染色を行った後に心筋細胞面積の測定並びに qRT-PCR により心筋細胞肥大について検討した。さらに、ウエスタンブロッティング法によりヒストンのアセチル化について検討した。また、BRG1 阻害剤を心筋細胞に処理し、フェニレフリン刺激により心筋細胞の肥大を誘導した。蛍光免疫染色を行った後に心筋細胞面積の測定並びに qRT-PCR により心筋細胞肥大について検討した。さらに、ウエスタンブロッティング法によりヒストンのアセチル化について検討した。

(2) 心不全モデルマウスにおける BRG1 の心肥大・心不全への機能評価

BRG1 阻害剤を用いて心肥大・心不全への影響を検討するために、大動脈縮窄術 (TAC 手術) を施したマウスに浸透圧ポンプを用いて BRG1 阻害剤の投与を行った。心エコー検査により心機能の評価を行った。また、サクリファイスを行った後に qRT-PCR により肥大反応因子について検討した。

4. 研究成果

(1) 培養心筋細胞において BRG1 の阻害はヒストンのアセチル化を抑制した

BRG1 のノックダウンした心筋細胞の細胞面積測定を行った結果、フェニレフリン刺激により心筋細胞は肥大するが BRG1 をノックダウンすると心筋細胞肥大は抑制された。また、qRT-PCR を行った結果、フェニレフリン刺激により肥大反応遺伝子である ANF、BNP は上昇するが BRG1 のノックダウンはそれらの上昇を抑制した。さらに、ウエスタンブロッティング法を行った結果、フェニレフリン刺激によりヒストンの H3K9 並びに H3K122 のアセチル化は亢進するが BRG1 のノックダウンは H3K122 のアセチル化を抑制した。一方、BRG1 の阻害剤を処理した心筋細胞の細胞面積測定を行った結果、フェニレフリン刺激により心筋細胞は肥大するが BRG1 阻害剤を処理すると心筋細胞肥大は抑制された。また、qRT-PCR を行った結果、フェニレフリン刺激により ANF、

BNPは上昇するがBRG1のBRG1阻害剤を処理するとそれらの上昇は抑制された。さらに、ウエストンプロット法を行った結果、フェニレフリン刺激によりヒストンのH3K9並びにH3K122のアセチル化は亢進するがBRG1のBRG1阻害剤処理によりH3K9並びにH3K122のアセチル化は抑制された。BRG1のノックダウン並びに阻害剤処理は、心筋細胞の肥大を抑制したがヒストンのアセチル化を抑制する程度が異なっていたことから、この違いに対して今後さらなる検討を行う予定である。

(2) BRG1阻害剤は心不全の進展を改善した

TAC手術を施したマウスにBRG1阻害剤を投与し心エコー検査を行った結果、Sham群と比べてTAC+vehicle群で心機能の指標であるFSが低下した。一方、TAC+BRG1阻害剤群ではTAC+vehicle群と比べてFSが改善した。また、心体重比はSham群と比べてTAC+vehicle群で増加し、TAC+BRG1阻害剤群ではTAC+vehicle群と比べて低下した。さらに、qRT-PCRを行った結果、TAC+vehicle群で上昇したANF, BNPがTAC+BRG1阻害剤群で低下した。現在、in vivoにおいてBRG1の阻害剤によりヒストンのアセチル化がどのように変化しているか検討を進めている。また、心臓特異的にBRG1を欠失させたマウスを用いてTAC手術により心肥大・心不全やヒストンのアセチル化への影響についても現在、検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Funamoto Masafumi, Sunagawa Yoichi, Katanasaka Yasufumi, Shimizu Kana, Miyazaki Yusuke, Sari Nurmila, Shimizu Satoshi, Mori Kiyoshi, Wada Hiromichi, Hasegawa Koji, Morimoto Tatsuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Histone Acetylation Domains Are Differentially Induced during Development of Heart Failure in Dahl Salt-Sensitive Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1771 ~ 1771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041771	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masafumi Funamoto, Yoichi Sunagawa, Ayumi Katayama, Kana Shimizu, Mai Gempei, Yasufumi Katanasaka, Yusuke Miyazaki, Nurmila Sari, Satoshi Shimizu, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
2. 発表標題 心不全時にp300/BGR1複合体形成によりヒストンのアセチル化修飾部位は変遷した
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船本雅文, 砂川陽一, 刀坂泰史, 清水果奈, 宮崎雄輔, Sari NURMILA, 清水聡史, 和田啓道, 長谷川浩二, 森本達也
2. 発表標題 心不全発症時におけるBRG1/p300の複合体形成がヒストン球状ドメインのアセチル化に関与していた
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船本雅文, 砂川陽一, 刀坂泰史, 清水果奈, 宮崎雄輔, 清水聡史, 長谷川浩二, 池田康将, 森本達也
2. 発表標題 心不全発症時におけるヒストンのアセチル化修飾部位の検討
3. 学会等名 第263回徳島医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船本雅文、砂川陽一、刀坂泰史、清水果奈、宮崎雄輔、清水聡史、長谷川浩二、池田康将、森本達也
2. 発表標題 心肥大期から心不全期におけるヒストンのアセチル化修飾部位の検討
3. 学会等名 第5回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船本雅文、砂川陽一、刀坂泰史、清水果奈、宮崎雄輔、清水聡史、長谷川浩二、池田康将、森本達也
2. 発表標題 The Interaction of the p300 with the BRG1 Increases the Acetylation levels of the H3K122 in Heart Failure
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------