

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16061

研究課題名(和文)新規lncRNAに着目した心不全の分子機構解明および新規治療法の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of heart failure development of novel therapeutic approach based on novel lncRNA

研究代表者

佐藤 迪夫(SATO, MICHIO)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特任助教

研究者番号：10833410

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、申請者が新規に同定したlong non-coding RNA Caren (cardiomyocyte-enriched noncoding transcript)の心臓保護作用のメカニズム解明を目指して解析を行った。Carenは、心筋細胞の細胞質に高発現し、「Hint1-ATM経路の制御によるDNA損傷応答の軽減」、「Tfam増加を介したミトコンドリア生合成の亢進」、により心臓保護作用を示すことを明らかにした。さらに、Carenのヒトホモログ(hCAREN)の同定に成功し、hCARENを過剰発現させたマウスも、抗心不全作用を示す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

超高齢化社会を反映して心不全患者は増加の一途を辿っている。心不全は悪性腫瘍と同程度に予後の悪い病態であり、健康寿命延伸の阻害要因としても重要である。近年、心不全病態の進展要因として、「ミトコンドリア機能の低下」による、心臓のエネルギー供給の減少とDNA損傷を引き起こす活性酸素種の産生の増加が注目されている。申請者が新規に同定したlong non-coding RNA Carenは、「ミトコンドリア生合成の亢進」と「DNA損傷応答の軽減」により、心臓保護作用を示すことを明らかにした。今後、本研究の成果・進展により革新的な心不全治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, we analyzed a recently discovered long non-coding RNA named Caren (cardiomyocyte-enriched non-coding transcript) to uncover its mechanism for providing cardioprotective effects. Caren is abundantly expressed in the cytoplasm of cardiomyocytes and functions by regulating the Hint1-ATM pathway to reduce the DNA damage response, as well as by enhancing mitochondrial biosynthesis through increased Tfam expression. Additionally, we successfully identified a human counterpart of Caren (hCAREN) and demonstrated that mice overexpressing hCAREN also exhibited beneficial effects in preventing heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 ミトコンドリア DNA損傷応答 ncRNA

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム DNA を構成する約 30 億対の塩基のうち、タンパク質をコードする遺伝子を構成しているものはわずか 1.2%である。ポストゲノム時代に突入して相次いで報告されたトランスクリプトーム解析により、ほ乳類ゲノムの多くの領域が non-coding RNA として転写されていることが明らかとなった。一方、超高齢化社会を迎えた本邦において、心不全患者が増加の一途を辿っている。これまでに、心不全の発症・進行における分子基盤解明が進められているにも関わらず、現在に至るまで根本的な治療法は確立していない。しかし近年、non-coding RNA(ncRNA)に関する研究報告数が加速的に増加し、心不全病態における関与・治療への応用と幅広く注目されている。

申請者は網羅的な Gene Trap 法を用いて、心筋細胞に特異的に高発現し、細胞質に局在する新規 lncRNA *Caren* (*cardiomyocyte-enriched noncoding transcript*)を同定した。*Caren*は加齢や心負荷により減少し、その欠失は心不全増悪を招き、補充により心保護作用を示すことを見出した。さらに、*Caren*は複数の標的に作用し、「DNA 損傷応答」を軽減し、「ミトコンドリア生合成・機能亢進」により心保護作用を示すことを明らかにした。しかし、そのメカニズムについては不明な点も多く、更なる解析が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、①新規 long non-coding RNA *Caren*の心臓保護作用メカニズムを明らかにすること、②心不全病態形成における「DNA 損傷応答」と「ミトコンドリア機能」の役割を明らかにすること、③*Caren*ヒトホモログの同定と、心保護作用の評価を行い、新規心不全治療法の開発のための基盤研究とすること。

## 3. 研究の方法

### ①*Caren*の心保護作用のメカニズム解明

CAG-*Caren* Tg マウスと KO マウスの心臓組織を用いて、プロテオミクスを行い、*Caren*による心臓保護作用のメカニズムの解明および実行因子の同定を目指す。

### ②*Caren*の標的分子である Hint1, ATM の心保護作用の検証

全身 Hint1<sup>+/-</sup>マウスおよび心筋細胞特異的 Hint1 CKO マウスを作製した上で、それぞれ TAC 手術による圧負荷心不全モデルを作製し、*Caren*のターゲット因子としての Hint1 の心臓機能への影響を検証する。これまでに ATM 阻害剤 (KU-60019) による心肥大抑制効果が報告されている (*JACC: Basic Translational Science*, 2019, *Circulation*, 2019)。これまでの準備研究で *Caren* KO マウスに対する KU-60019 投与により心保護作用が得られることを確認しており、本申請研究では投与量・再現性および副次作用の評価・検証を計画している。

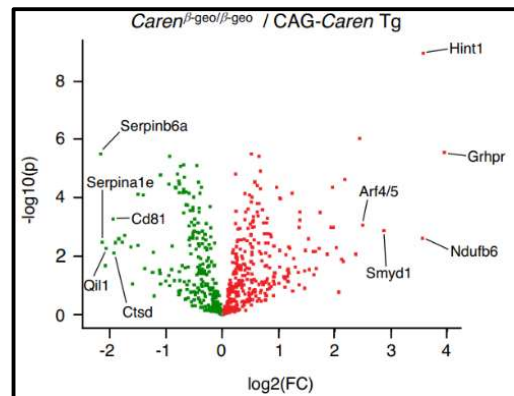
### ③ヒト *CAREN* オルソログ候補の心保護作用の検証

これまでにヒト *CAREN* オルソログ候補転写物を 2 つ同定し、現在これらを過剰発現させたマウスを作製中である。本申請研究では、これらのマウスに対して TAC モデルを作製し、心保護作用を示すか検証する。また、並行してヒト iPS 由来分化心筋細胞に対する候補転写物の過剰発現により、その機能を *in vitro* でも評価する。さらに同定されたヒト *CAREN* 候補が、マウス *Caren* 同様に心不全病態で発現低下を示すか、心不全と非心不全患者の剖検より得られた心臓組織を各 10-15 症例用いて、RT-PCR により比較検討する。また並行して心不全と HINT1 の関係について免疫染色で評価も進めており、心不全とヒト *CAREN*、DNA 損傷応答の関係を明らかにする。

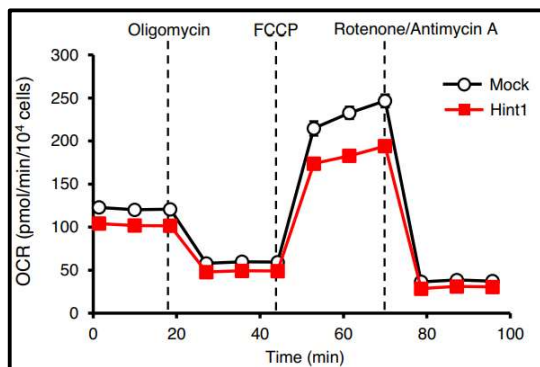
## 4. 研究成果

### ① *Caren* の心臓保護作用のメカニズム解明

CAG-*Caren* Tg マウスと *Caren* KO マウスの心臓組織を用いたプロテオミクスの結果、CAG-*Caren* Tg マウスの心臓組織では、Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (Hint1) タンパク量が有意に少ないことが判った (右図)。Hint1 は、DNA 損傷応答の key regulator の一つである Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) の活性化を抑制することにより、心臓組織における DNA 損傷応答を抑制していることが推察された。この仮説

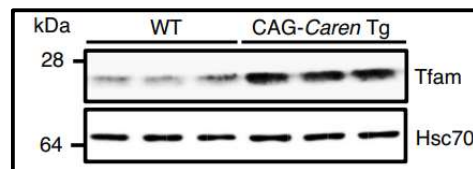


を検証するために、野生型マウスに対して transverse aortic constriction (TAC) 手術による圧負荷誘導性心不全モデルを作製し、Hint1 タンパク量を評価した。その結果、TAC 術後、経



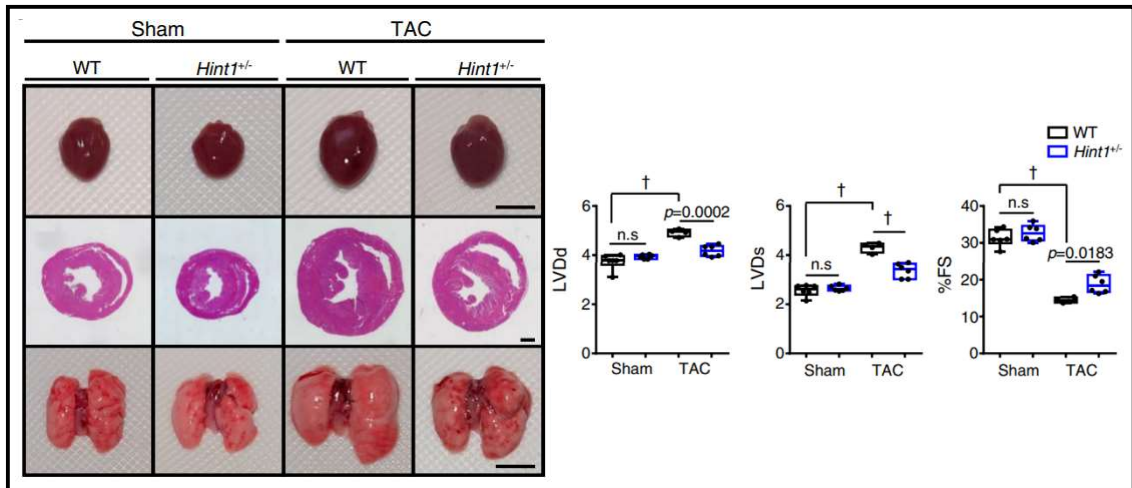
時的に Hint1 タンパク量が増加することを見出した (左図)。さらに、Hint1 を過剰発現した H9C2 細胞においては、ミトコンドリア機能が低下することを明らかにした。次に、CAG-*Caren* Tg マウスと *Caren* KO マウスの心臓組織を用いた Enrichment analysis の結果、CAG-*Caren* Tg マウスの心臓では、ミトコンドリア生成が亢進していることを見出した。さらに、Western blot

による解析の結果、CAG-*Caren* Tg マウスの心臓では transcription factor A, mitochondrial (Tfam) のタンパク量および mtDNA 量が増加していることが判った (右図)。以上より、lncRNA *Caren* の心臓保護作用のメカニズムが、「DNA 損傷応答の軽減」、「ミトコンドリア生成亢進」の 2 つによることが明らかとなった。

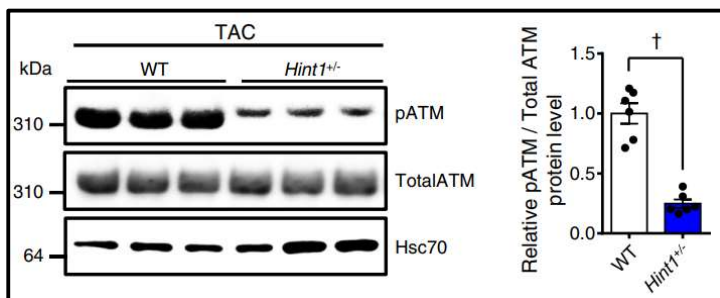


### ② *Caren* の標的分子である Hint1, ATM の心保護作用の検証

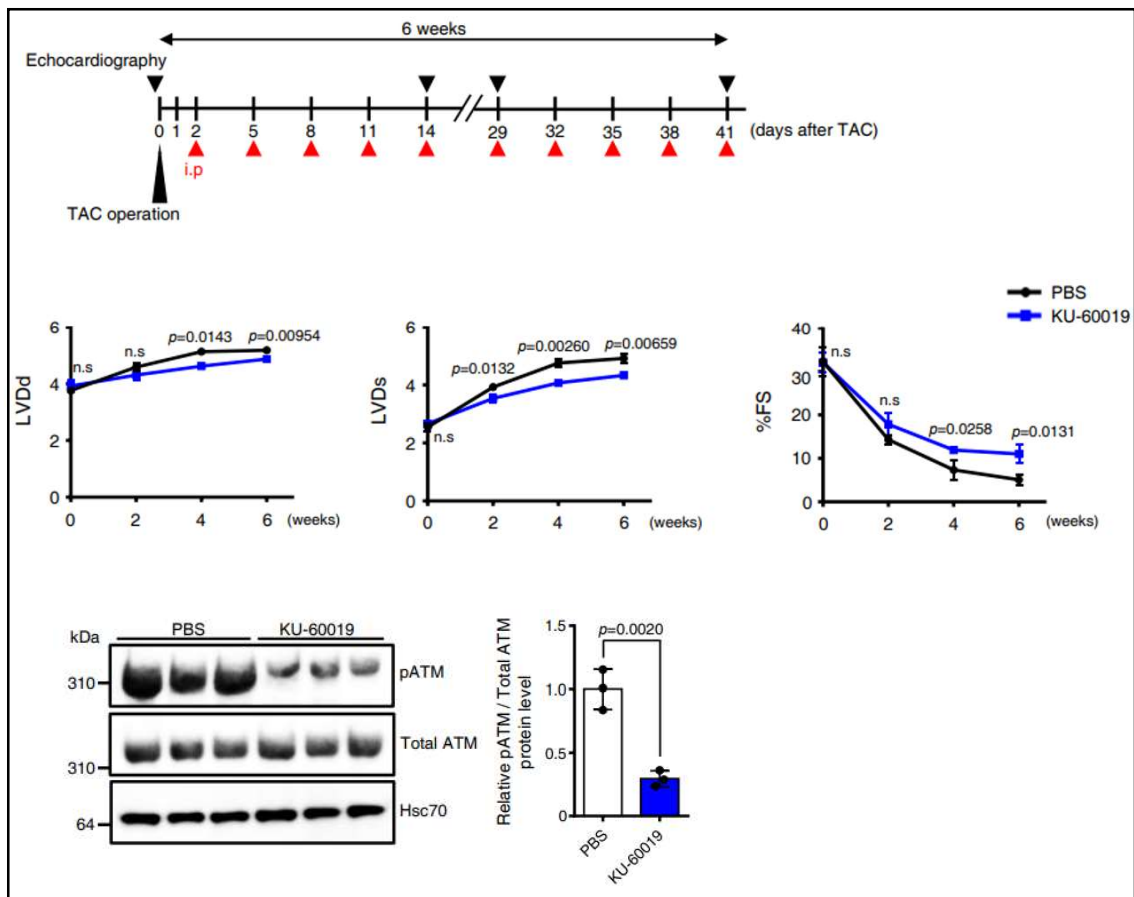
Hint1<sup>+/-</sup>マウスおよび  $\alpha$ MHC-Hint1 CKO マウスは、それぞれ圧負荷誘導性心不全モデルにおいて、心不全病態形成の進展が有意に抑制されていることが明らかになった (下図)。



さらに、圧負荷誘導性心不全モデルにおいて、*Hint1*<sup>+/-</sup>マウスおよび $\alpha$ MHC-*Hint1* CKO マウス心臓では、pATMの上昇が抑制されており、DNA 損傷応答が抑制されていることが判った（下図）。

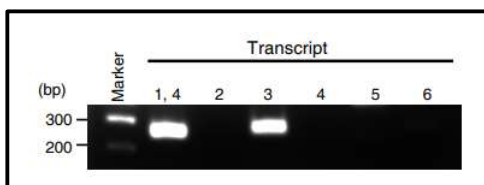


次に、*Caren* KO マウスに対して ATM 阻害剤 (KU-60019) 投与を行い、圧負荷心不全心臓の進展が抑制されることを、確認した（下図）。



### ③ヒト *CAREN* オルソログ候補の心保護作用の検証

ヒトデータベース (UCSC Genome Browser : GRCh37/hg19) を用いて、マウス *Caren* と相同の location に存在する non-coding transcript を探索したところ、ヒト *CAREN* 候補転写物が 6 種類存在し、そのうち 2 種類 (transcript1, 3) が、実際にヒト iPS 由来心筋細胞で発現することが判った (下図)。さらに、発現の確認された候補 transcript について、CAG-promotor 下に全



身に過剰発現するマウスを作製したところ、術後 6 週の時点における心不全進展が軽度であり、抗心不全作用を示した。

以上の結果より、マウスにおいて同定された新規 lncRNA *Caren* は、「DNA 損傷応答」と「ミトコンドリア生合」の制御により、心臓保護作用を示すことが明らかになった。さらに、ヒト *CAREN* が同定されたことにより、今後、新規心不全治療法の開発を目指した研究に発展することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Michio, Kadomatsu Tsuyoshi, Miyata Keishi, Warren Junco S., Tian Zhe, Zhu Shunshun, Horiguchi Haruki, Makaju Aman, Bakhtina Anna, Morinaga Jun, Sugizaki Taichi, Araki Masatake, Komohara Yoshihiro, Wakayama Tomohiko, Nakagawa Shinichi, Franklin Sarah, Node Koichi, Araki Kimi, Oike Yuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 The lncRNA Caren antagonizes heart failure by inactivating DNA damage response and activating mitochondrial biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22735-7	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 Fukami Hirota, Morinaga Jun, Nakagami Hironori, Hayashi Hiroki, Okadome Yusuke, Matsunaga Eiji, Kadomatsu Tsuyoshi, Horiguchi Haruki, Sato Michio, Sugizaki Taichi, Kuwabara Takashige, Miyata Keishi, Mukoyama Masashi, Morishita Ryuichi, Oike Yuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Vaccine targeting ANGPTL3 ameliorates dyslipidemia and associated diseases in mouse models of obese dyslipidemia and familial hypercholesterolemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100446 ~ 100446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xcrm.2021.100446	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 Okadome Yusuke, Morinaga Jun, Fukami Hirota, Hori Kota, Ito Teruhiko, Sato Michio, Miyata Keishi, Kuwabara Takashige, Mukoyama Masashi, Suzuki Ryusuke, Tsunoda Ryusuke, Oike Yuichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Hyperglycemia and Thrombocytopenia Combinatorially Increase the Risk of Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction Undergoing Veno-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 707 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.cr-21-0043	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 Okadome Y, Morinaga J, Yamanouchi Yi, Matsunaga E, Fukami H, Kadomatsu T, Horiguchi H, Sato M, Sugizaki T, Hayata M, Sakaguchi T, Hirayama R, Ishimura T, Kuwabara T, Usuku K, Yamamoto T, Mukoyama M, Suzuki R, Fukui T, Oike Y	4. 巻 27
2. 論文標題 Increased numbers of pre-operative circulating monocytes predict risk of developing cardiac surgery-associated acute kidney injury in conditions requiring cardio pulmonary bypass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02313-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi Haruki, Kadomatsu Tsuyoshi, Yumoto Shinsei, Masuda Takeshi, Miyata Keishi, Yamamura Shuji, Sato Michio, Morinaga Jun, Ohtsuki Sumio, Baba Hideo, Moroishi Toshiro, Oike Yuichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Tumor cell-derived ANGPTL2 promotes $\beta$ -catenin-driven intestinal tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4028 ~ 4041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02405-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Michio Sato
2. 発表標題 The lncRNA Caren Protects Against Heart Failure by Inactivating the ATM-DNA Damage Response Pathway and Activating Mitochondrial Biogenesis
3. 学会等名 ESC Congress 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Tsuyoshi Kadomatsu, Koichi Node, Yuichi Oike
2. 発表標題 The Long Non-Coding RNA Caren Improves Cardiac Dysfunction In Aged Mice
3. 学会等名 AHA Scientific Session 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Koichi Node, Yuichi Oike
2. 発表標題 Development of an Effective anti-Heart Failure Therapy through Regulating Mitochondrial Biogenesis and DNA Damage Response.
3. 学会等名 CVMW2021 ISHR
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michio Sato, Keishi Miyata, Koichi Node, Yuichi Oike
2. 発表標題 Development of an Effective Therapy for Heart Failure by Regulating DNA Damage Response and Mitochondrial Biogenesis
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michio Sato, Tsuyoshi Kadomatsu, Keishi Miyata, Yuichi Oike
2. 発表標題 A novel lncRNA 'Caren' antagonizes heart failure by inactivating ATM-DNA damage response and activating mitochondrial biogenesis.
3. 学会等名 第1回熊本大学大学院生命科学研究部附属健康長寿代謝制御研究センター 国際シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 迪夫、門松 毅、宮田 敬士、野出 孝一、尾池 雄一
2. 発表標題 「DNA損傷応答」と「ミトコンドリア機能」に着目した加齢性心機能低下改善および健康寿命延伸への挑戦
3. 学会等名 第22回 日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 佐藤 迪夫、門松 毅、宮田 敬士、野出 孝一、尾池 雄一
2. 発表標題 エネルギー代謝とDNA損傷応答機構をターゲットとした心不全治療法の開発
3. 学会等名 第22回 日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michio Sato, Tsuyoshi Kadomatsu, Keishi Miyata, Yuichi Oike
2. 発表標題 The long non-coding RNA Caren Improves Cardiac Dysfunction
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 迪夫、門松 毅、宮田 敬士、野出 孝一、尾池 雄一
2. 発表標題 心臓機能の恒常性維持に寄与するlncRNAを用いた加齢性心機能低下への挑戦
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会第18回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michio Sato, Tsuyoshi Kadomatsu, Keishi Miyata, Yuichi Oike
2. 発表標題 Identification of a long non-coding RNA Caren Human ortholog counteracting against heart failure development
3. 学会等名 CVMW2022（6th BCVR）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Michio Sato, Tsuyoshi Kadomatsu, Keishi Miyata, Yuichi Oike
2. 発表標題 lncRNA Caren Human ortholog attenuates heart failure progression in mice
3. 学会等名 第87回 日本循環器学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 治療剤	発明者 尾池雄一、佐藤迪夫、門松毅、宮田敬士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-086342	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>心不全病態の進行を抑制する新規RNAを同定—新たな治療法の開発に期待—  <a href="https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20210506">https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20210506</a>  心不全病態の進行を抑制する新規RNAを同定—新たな治療法の開発に期待—  <a href="https://www.amed.go.jp/news/release_20210506-02.html">https://www.amed.go.jp/news/release_20210506-02.html</a>  熊本大学 分子遺伝学講座  <a href="http://www.kumamoto-u-molgene.jp/">http://www.kumamoto-u-molgene.jp/</a></p>
--

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
---------	---------