

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20889

研究課題名(和文)抗腫瘍薬性心不全におけるRNA制御機構の意義の解明

研究課題名(英文)Dissecting the relevance of RNA regulatory mechanisms in anti-cancer drug-induced heart failure

研究代表者

佐藤 輝紀(SATO, TERUKI)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30733422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：脱アデニル化実行因子であるCnot6Lに着目し、その遺伝子欠損マウスの圧負荷肥大心を作製した。RNA-seqによる網羅解析において、野生型マウスと比較してgene-Xが上昇していることを見出した。TACによる圧負荷にてCnot6L欠損マウスの心機能低下や心肥大はCnot6L; gene-X二重欠損マウスでは改善が認められた。さらに、PATアッセイにてCnot6L欠損心筋細胞においてはgene-Xのpoly A鎖長が延長していることが分かった。以上より、Cnot6Lによる脱アデニル化機構はgene-X mRNA制御を介して心機能を調節していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌患者における心血管疾患は癌死を除いては最大の死因である。癌患者のみならず、心不全発症の分子機構はいまだに解明されていない点が多く、他臓器と違い分子標的薬が開発されていない。発症機序の解明が不十分であることから治療法の開発にも至っていない。RNA調節機構に着目して行った本研究は、これまでの研究とは違ったアプローチと考えられ、今後も推進していく価値があると考えている。

研究成果の概要(英文)：We focused on Cnot6L, which is one of crucial factor of deadenylation. RNA-sequence showed increased gene-X mRNA in Cnot6L knockout heart with TAC. Double knockout of Cnot6L and gene-X rescued pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy of Cnot6L single knockout mice, suggesting that Cnot6L deadenylation of gene-X regulates heart function. Moreover, PAT assay showed the elongation of poly A tail length of gene-X mRNA in Cnot6L knockout cardiomyocytes. Thus, deadenylation by Cnot6L contributes controlling heart function via regulation of gene-X mRNA.

研究分野：Onco-Cardiology

キーワード：Onco-cardiology heart failure

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因第一位は悪性腫瘍であるが、抗腫瘍薬の進歩や分子標的薬の創出によって癌患者の予後は改善している一方で、癌以外の予後規定因子は心血管疾患であることが多く、腫瘍循環器学が重要視されている。その背景に、抗腫瘍薬による心毒性の発症機序の解明や、その治療方法の開発が不十分な現状がある。とりわけ、抗腫瘍薬においてはアントラサイクリン系抗腫瘍薬と HER2 受容体阻害薬(トラスツズマブ)ではその頻度が高く、心機能が化学療法の継続の可否を規定し、それが癌患者の予後に直結することをしばしば経験する。これまでに、ドキシソルピシンやトラスツズマブによる心機能障害機序に関する研究は報告されてきたが、いまだ治療方法の開発に至っていない現状をふまえ、これまでに報告の無いアプローチが必要と考えられてきた。

2. 研究の目的

悪性腫瘍は我が国の死因の第一位であり、研究の進歩によって癌患者の予後は改善している一方で、癌以外の予後規定因子は心血管疾患であるとされることから、腫瘍循環器学が近年注目を集めている。その典型的な例として、抗腫瘍薬による心毒性の問題があるが、その分子機序は未解明である。また、患者因子の検討も不十分であり、薬剤性心筋症を発症する患者背景を解析することで、患者要因の同定も必要と考える。本研究では、これまで申請者が携わってきた Apelin やレニンアンジオテンシン系の分子ネットワークや、CCR4-NOT 複合体による心機能調節機構が、抗腫瘍薬が心毒性を発揮する機序にどのように関与するかを解明することで、治療方法あるいは予防法の開発へと応用することを研究目的とする。

3. 研究の方法

1. ノックアウトマウスの TAC 手術および心機能解析
2. マウス心臓から抽出した RNA を用いた RNA シークエンス
3. RIP アッセイ
4. PAT アッセイ

4. 研究成果

mRNA 発現制御が心機能調節に重要な役割を担っていることをこれまでに見出ししてきたことから、マウス不全心における CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子の探索を行った。まず、圧負荷(TAC)により作製したマウス肥大心の組織から調製したライセートに対し、抗マウス Cnot3-IgG 抗体を用いて RNA 免疫沈降(RIP)を行った。その RNA サンプルを網羅的に解析(RIP-seq)したところ、数多くの遺伝子が検出されたなかで、興味深いことに APJ 受容体 mRNA が検出された。すなわち、CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化を介して APJ 受容体 mRNA の発現を制御している可能性が示唆された。Apelin-APJ シグナルは強力な内因性心機能調節機構であることから、解析の軸になる知見のひとつと考えられる。

心筋細胞レベルでの解析を行うにあたって、これまでにマウス胎児心の単離心筋細胞を利用していたが、胎児心においては心臓発生に関与した遺伝子発現が多いことから今後作製する癌モデルの解析には適当ではなく、抗腫瘍薬による心機能障害は成体における実験を予定していること、そして癌治療の多くは成人に対して行われるものであることを踏まえ、成体マウス心臓から心筋細胞を順行性のコラゲナーゼ灌流により単離する手法を確立した。

さらに、mRNA の 3'-UTR(非翻訳領域)に含まれる制御情報のうち、AU-rich element(ARE)は mRNA の不安定性に関わる配列であり、RNA 結合蛋白を介して CCR4-NOT による制御を受けることが知られている。RNA-seq で得られた心不全により変動する遺伝子群ならびに RIP-seq により検出された CCR4-NOT 標的を含む mRNA のリストについて、データベースを利用した *in silico* の解析により ARE を有する遺伝子群、すなわち CCR4-NOT の標的候補遺伝子を抽出した。

また、野生型マウスと Cnot6L 欠損マウスの TAC 圧負荷肥大心において、RNA シークエンスをおこなって遺伝子発現の違いを網羅的に探索したところ、検出された複数の遺伝子のなかで心機能調節に関与する報告のある gene-X が上昇しているに着目して研究を進めた。Cnot6L; gene-X 二重欠損マウスを作製し、その心機能を測定したところ、ベースラインではその心機能に差が見られなかったが、TAC 手術を施したところ、Cnot6L 単欠損マウスの心機能低下と心肥大は、Cnot6L; gene-X ダブルノックアウトマウスにおいては改善が認められた。加えて、それらの心臓から抽出した total RNA を用いて RT-qPCR で遺伝子発現解析を行ったところ、Cnot6L 欠損マ

ウスで上昇していた BNP, Periostin, Tgfb2 などの遺伝子発現は、Cnot6L; gnen-X ダブルノックアウトマウスにおいてはその上昇が抑制されていた。

このことから、gene-X-mRNA は Cnot6L による脱アデニル化によって制御されていることが示唆された。

Cnot6L が gene-X の mRNA を制御していることを確認するために、gene-X 遺伝子の polyA 鎖長を PATassay で評価したところ、Cnot6L 欠損心筋細胞においては gene-X の polyA 鎖長は野生型心筋細胞に比較して延長していることが分かった。すなわち、Cnot6L の脱アデニル化機構は gene-X を標的としていることが分かった。以上より、Cnot6L はその脱アデニル化機構にて gene-X の発現制御を介して、心機能調節に関与していることが示唆された。

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 Kato Tsukasa, Sato Wakana, Umeta Yuri, Suto Yuta, Sato Teruki, Watanabe Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Bilateral deep vein thrombosis in pregnancy as first manifestation of an anomalous inferior vena cava	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Echocardiography	6. 最初と最後の頁 91 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12574-022-00570-z	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 Tashiro Haruwo, Sato Wakana, Seki Katsuhito, Ono Yuto, Kato Tsukasa, Sato Teruki, Watanabe Hiroyuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Asymptomatic Coarctation of the Aorta in Adults with Preserved Exercise Capacity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1171 ~ 1174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0285-22	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 Kato Tsukasa, Sato Wakana, Sato Teruki, Shimizu Hiroaki, Watanabe Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Carotid Artery Revascularization Improves Cardiac Sympathetic Nerve Activity in Patients With Carotid Artery Stenosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiology Research	6. 最初と最後の頁 289 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/cr1402	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 Chang Hsiang-Chun, Shapiro Jason Solomon, Jiang Xinghang, Senyei Grant, Sato Teruki, Geier Justin, Sawicki Konrad T, Ardehali Hossein	4. 巻 10
2. 論文標題 Augmenter of liver regeneration regulates cellular iron homeostasis by modulating mitochondrial transport of ATP-binding cassette B8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.65158	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sato T, Watanabe H.Hossein A
2. 発表標題 Sirtuin 2 deficiency protects against development of heart failure induced by pressure overload or ischemic reperfusion injury.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiho Semba, Teruki Sato, Hiroyuki Watanabe
2. 発表標題 Two cases of straddling thrombus via Patent Ductus Arteriosus
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------