

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22790693

研究課題名（和文）心臓リモデリング制御による新規心不全治療法創成の分子基盤の構築

研究課題名（英文）Development of the molecular basis of novel therapeutic strategy for heart failure by the control of cardiac remodeling

研究代表者

吉川 賢忠 (YOSHIKAWA NORITADA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396878

研究成果の概要（和文）：

【目的】心肥大/心臓リモデリングの分子機構を、転写伸長反応促進因子 P-TEFb の抑制蛋白質である HEXIM1 を基軸に解析し、HEXIM1 による新規心肥大/心臓リモデリング抑制・心不全治療法開発の分子基盤を構築する。【方法】アデノウイルスによる HEXIM1 の過剰発現系を構築した。心筋特異的 HEXIM1 過剰発現マウスを作成し、肺高血圧症-右心肥大発症モデルに付した。【結果・考案】心筋細胞における HEXIM1 の過剰発現は P-TEFb 活性抑制による RNA ポリメラーゼ II 依存性転写の抑制作用を介し、各種刺激による心肥大発症・心筋細胞肥大誘導を抑制したため、HEXIM1 は新規心肥大/心臓リモデリング抑制療法の分子標的として有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

[Objectives] Because HEXIM1 is the only molecule to inhibit P-TEFb, which is the key molecule for development of cardiac hypertrophy, we speculate that HEXIM1 may be a candidate for preventing cardiac hypertrophy/remodeling. [Methods and Results] Using adenovirus mediated gene delivery to the cultured cardiac myocytes and a new transgenic mouse model with conditional myocardial overexpression of HEXIM1, we confirmed that overexpression of HEXIM1 in the cardiac myocytes prevents cardiac myocyte hypertrophy both in vitro and in vivo. [Conclusion] HEXIM1 may be a candidate for preventing cardiac hypertrophy/remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心肥大、心臓リモデリング、心不全、HEXIM1、転写伸長反応、P-TEFb、RNA ポリメラーゼ II

1. 研究開始当初の背景

多くの心臓疾患が当初適応現象により心肥大/心臓リモデリングを引き起こすが、その後の病的負荷の持続は非代償性心不全を生じさせる。心肥大に関与するきわめて多岐にわたるシグナルの活性化は、最終的に転写制御因子の活性化による遺伝子発現の質的・量的なグローバルな変化を誘導し、タンパク質合成を促進する。近年、研究代表者の共同研究者らは、RNAポリメラーゼ II (RNAPII) を活性化する転写伸長反応促進因子 P-TEFb が心肥大誘導の鍵分子であることを明らかにした。ここで、研究代表者らが解析をすすめてきた、新規核蛋白質 Hexamethylene-bis-acetamide-inducible protein in human smooth muscle cells 1 (HEXIM1) は、P-TEFb を不活性型にする分子であり、HEXIM1 ノックアウトマウスは胎児期初期に左室肥大を呈し胎生致死であることなどから HEXIM1-P-TEFb-RNAPII の相互作用が心肥大の病態に密接に関与していることが示された。一方、副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド (GC) やミネラルコルチコイド (MC) の過剰は心肥大-心不全発症の危険因子であるが、研究代表者らは、その受容体である GC 受容体、MC 受容体の活性化が、P-TEFb 抑制作用とは独立した機構で HEXIM1 によって抑制されることを明らかにした。研究代表者はこれらの報告や成果から、P-TEFb-RNAPII というグローバルな転写促進機構と副腎皮質ホルモン受容体による遺伝子発現制御機構というふたつの転写制御系が、HEXIM1 を中心にクロストークし、心肥大病態形成に密接に関与していると考えた。

2. 研究の目的

心肥大/心臓リモデリングの分子機構を HEXIM1 を基軸により詳細に解析し、その病態解明ならびに、HEXIM1 による新規心肥大抑制・心不全治療開発の分子基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) loxP-HEXIM1 (野生型、各種変異体) トランスジェニックマウスと alphaMHC-Cre トランスジェニックマウスを交配させ、心筋特異的に HEXIM1 を発現するトランスジェ

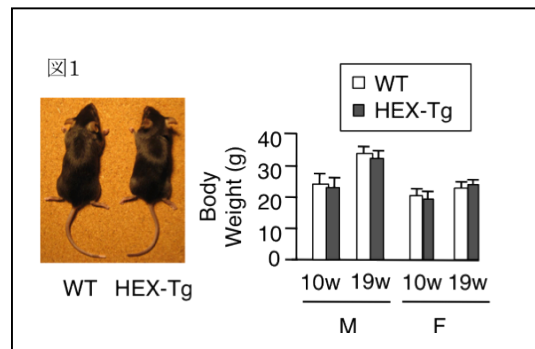
ニックマウス (HEX-Tg) を慶応義塾大学医学部循環器内科 佐野元昭講師の協力によって作成した。

(2) 低酸素負荷肺高血圧症 (PH) マウスモデルを構築した。野生型 (WT) マウスならびに HEX-Tg を正常もしくは低酸素分圧下 (10%O₂) で 10 週間飼育し、PH とそれに引き続く右室肥大における HEXIM1 の意義を、心臓超音波検査、屠殺後の心の解剖学的計測と病理組織学的解析などによって検討した。

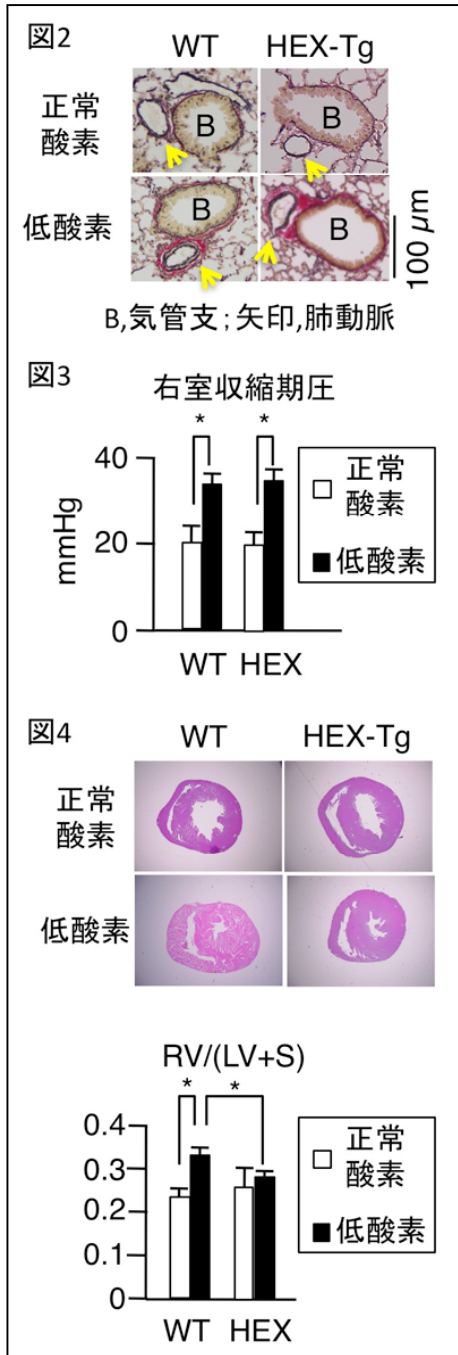
(3) 心肥大における HEXIM1 の意義を明らかにするため、Cre-loxP で制御可能な HEXIM1 発現アデノウイルス (野生型 HEXwt および P-TEFb 抑制活性消失変異体 HEXmt) の系を樹立した。新生仔ラット培養心筋細胞をエンドセリン-1 (ET-1) で処理した際の、HEXwt あるいは HEXmt の過剰発現の影響を、心筋細胞肥大 (免疫染色法)、遺伝子発現 (定量的 RT-PCR)、RNAPII リン酸化 (ウエスタンブロット法)、標的遺伝子上への RNAPII 結合 (クロマチン免疫沈降法) を指標に解析した。

4. 研究成果

(1) 心筋選択的に HEXIM1 野生型あるいは各種変異 HEXIM1 を内因性 HEXIM1 の 4~5 倍高発現するマウスの樹立に成功した。かかる Tg マウスはいずれも正常に生まれ、通常の飼育環境下においては成長速度、体重など、コントロールのマウスとの間には明らかな違いは認められなかった (図 1)。16 週で屠殺後の病理組織学的検討でも異常所見はなかった。

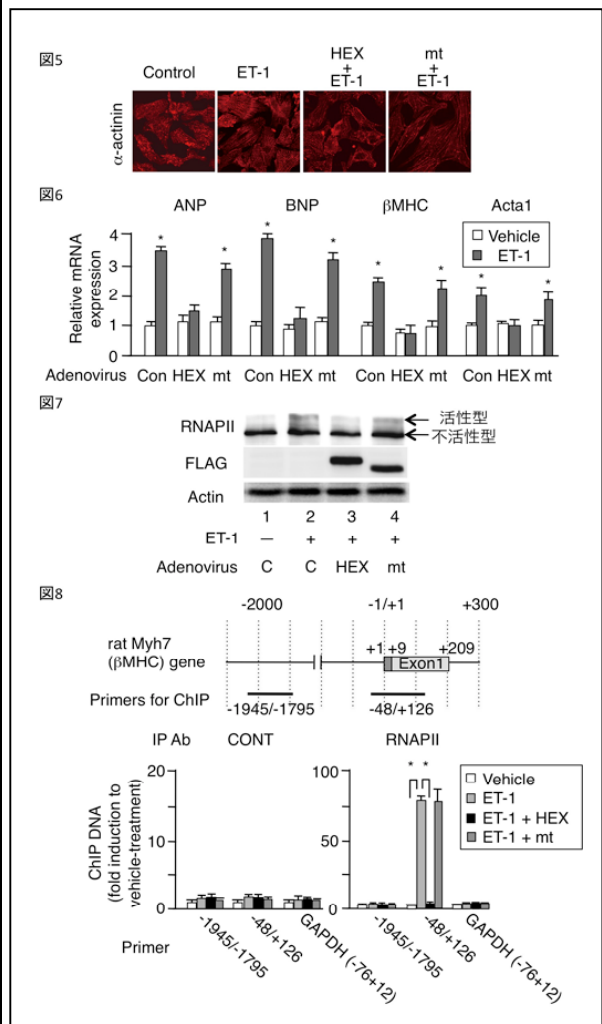


(2) 低酸素飼育により野生型 (WT) マウス、HEX-Tg いずれも肺高血圧症に合致した肺動脈の病理学的変化が誘導され (図 2)、右室圧が上昇した (図 3)。しかし、右室/(左室+中隔)重量比が増加したのは WT マウスのみであった (図 4)。



(3) HEXwtあるいはHEXmt発現アデノウイルスを培養心筋細胞に感染させ各種解析を行った。ET-1による細胞肥大の誘導はHEXwt

の過剰発現により抑制されたが、HEXmtは影響を与えなかった (図 5)。ET-1により心肥大マーカー遺伝子 ANP, BNP, β MHC, Acta1 の mRNA 発現は増加し、HEXwt の過剰発現はそれらの変動を抑制したが、HEXmt は影響を与えなかった (図 6)。P-TEFb 活性化指標である RNAPII のリン酸化は ET-1 によって誘導されたが、HEXIM1 の過剰発現によって抑制された。HEXmt は影響を与えなかった (図 7)。RNAPII の betaMHC プロモータ上のリクルートは ET-1 によって誘導されたが、HEXIM1 の過剰発現によって抑制された。HEXmt は影響を与えなかった (図 8)。



マウスにおける HEXIM1 の心筋特異的過剰発現は、低酸素誘導性 PH に伴う右心肥大の進行を抑制する可能性が示唆された。また、その分子機構の一つに、HEXIM1 による P-TEFb/RNAPII 抑制を介した心筋リモデリング関連遺伝子の転写抑制が示唆された。今後、

P-TEFb-RNAPII への影響のみならず、Erk1/2-転写因子系、Erk1/2-Akt/mTOR/S6K 蛋白合成促進系、カルシニューリン-NFAT 系など各種の心肥大シグナル伝達経路への影響や、右心不全、また左心肥大/左心不全に与える影響など、より詳細な解析を加えることで、心筋肥大/リモデリングにおける HEXIM1 の意義が明確になり、新規治療法創成の分子基盤を構築可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 吉川賢忠、肺動脈性肺高血圧症 PAH に対する新規分子標的薬開発へ向けた基盤研究、日本リウマチ学会、2011 年 7 月 19 日、神戸
- (2) 吉川賢忠、膠原病性肺高血圧症に対する新規分子標的薬開発へ向けた基礎的検討、日本リウマチ学会、2010 年 4 月 24 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 賢忠 (YOSHIKAWA NORITADA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70396878

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

- ① 田中廣壽 (TANAKA HIROTOSHI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：00171794
- ② 清水宣明 (SHIMIZU NORIAKI)
東京大学・医科学研究所・特任研究員
研究者番号：30396890
- ③ 佐野元昭 (SANO MOTOAKI)
慶応義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30265798