

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460506

研究課題名(和文) マイクロRNA導入マウスにみられるアンジオテンシン変換酵素発現亢進と心不全の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of overexpression of angiotensin converting enzyme and heart failure in transgenic mice of miRNAs

研究代表者

岩本 隆司 (IWAMOTO, Takashi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：60223426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症の多くは原因不明の難治疾患である。マイクロRNAは最近発見された小さなRNAであるが、我々の樹立した心筋特異的マイクロRNA-143/145高発現マウスは早期より拡張型心筋症様の症状を呈して死亡する。その心臓ではアンジオテンシン変換酵素(ACE)が高発現しておりその阻害剤で症状が改善した。また、ACE2の発現も亢進しており、その産物の受容体であるMAS1の発現が有意に低下していたため、病態にはアンジオテンシン代謝関連分子のバランス異常の関与が考えられた。

また解糖系酵素ヘキソキナーゼ2(HK2)の発現も低下しており、HK2の低下によるオートファジー不全の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy is one of the intractable diseases. microRNAs are small molecules, which were discovered around two decades ago, and have turned out to be involved in many human diseases. We generated the transgenic mice that expressed miR-143/145 in the heart muscles, and found that they died due to the human-like dilated cardiomyopathy.

The expression of angiotensin converting enzyme (ACE) increased in their hearts and ACE inhibitor significantly improved the condition of the mice. In addition, while ACE2 expression was also increased, the MAS1 receptor was clearly downregulated. These data imply that the dysregulation of key molecules of angiotensin metabolism might be involved in the pathology of these mice. Furthermore, we found that one glycolysis enzyme, hexokinase 2(HK2), was dramatically decreased in the hearts of the mice, and the expression of key molecules of autophagy was disturbed, suggesting the disorder of autophagy might be involved in this pathology.

研究分野：分子生物学

キーワード：マイクロRNA 拡張型心筋症 アンジオテンシン変換酵素 ヘキソキナーゼ2 MAS1

1. 研究開始当初の背景

(1)マイクロRNA (以下 miRNA)とよばれる ~ 22 塩基の non-coding RNA は標的遺伝子の発現を抑制して発生や分化を調節する。ヒトでは 1000 種以上が同定されてきたが、その生理作用は不明な点が多い。中でも miR-143 と miR-145 はヒト・マウスとも約 2kB 内に近接して存在している miRNA であるが、生体正常組織での生理機能は殆ど解っていない。しかし Cordes らによりこれらが SRF, myocardin, Nkx2-5 により制御されており、分化型血管平滑筋で発現が高く、未分化型平滑筋で著名に低下している極めて重要な事実が明らかになった (*Nature*, 460, 705-710, 2009)。miR-143/145 欠損マウスでは心臓や腸管は正常に発達したが大動脈では血管壁の菲薄化、分化型血管平滑筋細胞の著名な減少、および未分化型血管平滑筋細胞の著しい増加を認め、結紮による血管内膜新生が抑制された (Xin et al., *Genes Dev.*, 23, 2166-2178, 2009)。これらの知見の集積から、miR-143/145 が平滑筋の分化・増殖に関与している事実はほぼ間違いないと思われるが、未解決な点も依然多い (Albinsson et al., *PhysiolGenomics*, 43, 529-533, 2011; Rangrez et al., *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 197-205, 2011)。

(2)心肥大や心不全の状態で、miR-1, miR-133 等の miRNA の発現が変化することが知られており、これらの遺伝子の欠損、あるいは過剰発現系から機能的な重要性が示唆されてきている (Prasad et al., *J of Cardiovasc Trans Res.* 3:225-234, 2010)。興味あることにマウスの解析では miR-143 と miR-145 は胎児期では心臓に非常に強く発現しており、平滑筋では逆に発現が低いが、出生後その発現パターンは逆転する (Cordes et al., *Nature*, 460, 705-710, 2009)。我々はこの血管平滑筋と心筋での発生段階でのドラスティックな発現パターンの逆転に興味をもち α MHC (ミオン重鎖) のプロモーターを用いて心筋細胞特異的にこれらの miRNA を発現するトランスジェニックマウス α MHC/miR-143/145TG を樹立した。その内 2 系統は加齢に伴い拡張型心筋症様の病態を示し、更にその 1 系統は生後半年の間に 90% 以上が心不全により死亡した。以上より心筋細胞での miR-143/145 の過剰発現が心臓機能に何らかの障害をもたらすことが明らかになった。これらのマウスの発現分子の解析により、興味あることにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) が TG の心臓で有為に発現が上昇している事、血圧が正常にも関わらず ACE 阻害剤の摂取が TG を劇的に延命させる事実を見出した。

(3)レニンアンジオテンシン (RAS) 系は心血管系細胞の増殖や肥大、線維化を促進するなどの心血管リモデリングの病態形成に深く関与している。アンジオテンシン I から ACE によりアンジオテンシン II (AgnII) が作られるが、AgnII は主に AT1 受容体に結合して心筋細胞では肥大・増殖・線維化・浮腫等を誘導する。

AT1 受容体を心筋に高発現した TG は心肥大や心臓の線維化が亢進するなど、この AgnII の多彩な作用が心臓局所での直接的な効果であると支持する報告も多いが、全身での作用の間接的な影響も否定出来ず未だ多くの議論がある。(Hein et al., *PNAS* 94, 6391-6396, 1997; Padris et al., *PNAS* 97, 931-936, 2000)。一方、最近発見されたアンジオテンシン変換酵素 ACE2 は AgnI あるいは AgnII から Agn-(1-7) を作り、主に MAS1 受容体を介して作用するが、その作用は主に ACE/AgnII と拮抗すると考えられている。また ACE と ACE2 の間には複雑なフィードバック機構が働いている事実も明らかになってきている (Ferrario et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, 2281-2290, 2005)。これらの事実より心臓における ACE/AgnII と ACE2/Agn-(1-7) はいずれかの分子単独の異常発現よりも、むしろそれらの分子間の発現のバランスの乱れが心臓機能に影響を与えていると考えやすい。そこで本 TG においても RAS 系分子全体の解析が肝要と考えられた。

拡張型心筋症の多くは原因不明の難治疾患である。本研究によりその病理や制御法に新しい知見をもたらすと期待する。

2. 研究の目的

(1) α MHC/miR-143/145TG 心での RAS 系分子の発現を詳細に検討して、如何なる発現制御異常が起きているかを精緻に理解する。また、それらの発現異常が miR-143/145 の過剰発現から如何なる分子経路でもたらされているかを解析する。

(2) 網羅的分子の発現解析とシグナル解析:

miRNA は複雑な相互ネットワークを形成して分子発現を制御している事実を我々を含め多くの研究者が現在までに報告してきている (*PLoS ONE*, 7(8): e42137, 2012)。そこで TG 心で miRNA の発現の乱れをマイクロアレイで網羅的に解析して、miR-143/145 が他の miRNA も介して TG の心臓機能に影響を与えている可能性を検討する。これら miRNA を含めた分子の発現プロファイルの解析により病態のメカニズムに迫る

miR-143/145 の重要な標的の同定とシグナル解析; 心臓のリモデリングに深く関与している insulin like growth factor 1 (IGF-1) 受容体は miR-143/145 の標的分子でもあるため、蛋白レベルでの発現を解析したが、意外にも発現はむしろ上昇していた。そこで IGF-1 シグナルをその主な下流シグナルである AKT キナーゼの活性を中心に解析し、TG の病態との関連を検討する。一方、他の標的分子の探索も並行して進めて、病態シグナルを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TG 心臓の RAS 系分子の発現の解析; TG および野生型マウスの心臓から RNA および蛋白を抽出して、ACE, ACE2, AT1 受容

体、AT2 受容体、MAS1 受容体の発現レベルをリアルタイムPCR法、ノザンプロット法、ウエスタンプロット法で調べる。

(2) TG 心臓での発現分子の網羅的解析

cDNA マイクロアレイを用いた網羅的発現分子解析

miRNA マイクロアレイを用いた網羅的発現解析

(3) IGF-1 受容体/AKT 系のシグナル解析

(4) 心筋培養細胞 H9c2 細胞での発現解析；

レトロウイルスベクターを用いて miR-143、miR-145 単独あるいは共発現するラット心筋培養細胞 H9c2 を既に樹立している。これら安定 miR-143/145 発現細胞において(1)(2)で明らかになった分子発現やシグナル伝達の異常を検討する。

(5) ACE 阻害剤・AT1 受容体拮抗薬 (ARB) の投与と解析; ACE 阻害剤の TG に対する効果の分子メカニズムを解析するために投与マウスの心エコーを経時的に施行するとともに病理学的解析により心臓の拡大、線維化、心筋細胞の大きさなどを検討する。

(6) 心不全モデルマウスとヒトサンプルでの解析

心不全モデルマウスとしてフロリダ大学で作成した圧負荷(TAC) マウスおよび冠動脈結紮心筋虚血モデルマウス、Cardiac MLCK KO mice (moderate heart failure), Nkx2-5 inducible KO (profound heart failure)の心臓について miR-143/145 の発現を解析する。

心不全患者から提供いただいた心筋サンプルについても同様に解析する

(7) 標的分子の同定; 発現に変化のみられた分子のうち miR-143 あるいは 145 の直接の標的である可能性のある分子において、TargetScan, miRanda, RNAhybrid などのアルゴリズムから可能性の高い配列を絞込み、ルシフェラーゼベクターに組み込んで心筋培養細胞 H9c2 細胞に導入してレポーターアッセイ法を試みる。

(8) アデノ随伴ウイルスベクターの構築と解析: miR-143 および miR-145 のアデノ随伴ウイルスベクターを作成する。ベクターを心筋初代培養細胞あるいはマウスに導入して機能解析を行う。

4. 研究成果

3系統ある α MHC/miR-143/145 TG において、症状の程度と miR-143 の発現は正に相関していたが、miR-145 では相関は見られなかった。これらの事実より本病態には miR-143 が深く関与していると考えられた。

(1) RAS 系分子の解析:

α MHC/miR-143/145TG 心臓において ACE のみでなく ACE2 の発現も増強している事が分かった。そこで更にアンジオテンシンの受容体の発現を解析した所、AT1 受容体には変化が見られないが、MAS1 受容体は α MHC/miR-143/145TG で発現が著しく低下

している事が明らかになった。興味あることにヒトの MAS1 の 3'末非翻訳領域には miR-143 の標的配列があった。

(2) IGF1 シグナルと解糖系の律速酵素ヘキソキナーゼ 2(HK2)の発現解析; IGF1 シグナルに関係している IGF1 受容体および AKT のリン酸化およびその下流分子の Foxo1 等の発現変化は認められなかった。一方、本研究中に miR-143 の標的分子として HK2 が報告された。そこで α MHC/miR-143/145TG について解析した結果、HK2 の低下は症状の重い系統においてより顕著であった。

(3) α MHC/miR-143/145TG での網羅的発現分子解析;

cDNA マイクロアレイのパスウェイ解析において、解糖系、脂肪酸酸化、グルタチオン合成系等の亢進が認められた。また、カルシウム代謝関連遺伝子の増強も認められた。

miRNA マイクロアレイの解析; 低酸素関連 miRNA の増加が認められた。

(4) ラット心筋培養細胞 H9c2 における解析;

miR-143 あるいは miR-145 安定発現株で、RAS 系分子、HK2 の発現を解析した所、miR-143 高発現株で有意に MAS1, HK2 の発現は低下していた。

上記の細胞に低血清とレチノイン酸で分化誘導をかけて、心筋分化に対する影響を検討した。miR-143 の過剰発現は分化誘導を抑制すると考えられた。

H9c2 細胞を 48 時間 1.5%酸素下で刺激した結果、miR-143, miR-145 共に誘導された。

(5) miR-145 の機能解析;

miR-145 が miR-143 と拮抗している可能性を検証するためにアデノ随伴ウイルス(AAV9)に鶏心筋トロポニン T のプロモーターの下流に miR-145 を繋いだカセットを導入した。日本医科大学三宅弘一博士の協力のもと、生後 48 時間の α MHC/miR-143/145TG に組み換えウイルスを静脈注射した。しかし、心臓での miR-145 の発現量と生存日数には相関は認められなかった。

α MHC のプロモーターを用いて、心筋特異的 miR-145 発現マウスを作製した。高発現するマウスを 1 系統樹立したが、心機能には異常が認められなかった。更に α MHC/miR-143/145 TG と交配しても生存日数の延長効果も認められなかった。

(6) オートファジーの解析;

最近 Miyamoto らは心筋の飢餓条件下でのオートファジーには HK2 が必須であるとの興味深い報告をした (Mol Cell. 2014 53:521-33)。そこで本マウスを解析した所、オートファゴゾームのマーカーである LC3II の低下と選択的分解基質である p62 の増加が認められた。これより本マウスでオートファジー不全が起こっている可能性が示唆された。

上記の観察を確認するために、東京大学の水島昇博士よりオートファゴゾームが可視化出来る GFP-LC3 マウスを供与いただき、 α MHC/miR-143/145 TG と交配し、ダブル

TG を得ることに成功し、現在解析中である。(7)心筋特異的 HK2 および MAS1 の発現マウスの作成；上記のように HK2 あるいは MAS1 が本病態と密接に関連していると考えられる為、これらの分子を補填して病態が改善出来るかを検討する目的で、それぞれの心筋特異的マウスを作製した。HK2 について 3 系統、MAS1 について 1 系統のマウスを樹立することに成功した。これらの TG と α MHC/miR-143/145TG を交配し、ダブル TG を得ることに成功し、現在解析中である。

(8) 心不全マウスにおける miR-143/145 の発現解析；フロリダ大学の笠原英子博士の協力を得て、大動脈結紮心肥大マウスや冠動脈結紮心虚血マウスのサンプルを得て、それらにおける発現を解析したが、有意な発現増強は認められなかった。

(9) まとめ

Barth らはヒトの心不全で変化する遺伝子を 27 に絞ったが (*J Am Coll Cardiol.* 2006 ;48:1610-7)、 α MHC/miR-143/145 TG ではそれらの内 13 個に同様な変動が認められた。この事より、本マウスはヒトの心不全のマウスの良いモデルになると考えられる。現在までに我々が明らかにした HK2 と MAS1 はヒトの心疾患であまり注目されてきていない分子である。miR-143 がこれらの分子を標的にして、拡張型心筋症の病態に関与しているかどうか、またそれが如何なる刺激で誘導されるかを中心に更なる発展に結び付ける。

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)

[雑誌論文](計 7 件)

長原美樹, 松永歩, 藤田芳顕, 上瀬菜美, 石坂みゆき, 上田潤, 岩本隆司

Pasteurella pneumotropica 感染後の対応について - ソフト酸化水を使用したクリーニング操作の検討, 中部大学生命健康科学研究所紀要, 12, 92-95, 2016

http://www3.chubu.ac.jp/research_life_health/ 査読無

Sobue S, Yamaki K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkukwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem.* 403: 231-241. 2015 doi: 10.1007/s11010-015-2353-y. 査読有

Iwamoto T, Ouchi Y. Emerging evidence of insulin-like growth factor 2 as memory enhancer: A unique animal model of cognitive dysfunction with impaired adult neurogenesis. *Reviews in the Neurosciences* 25, 559-574, 2014, doi: 10.1515/revneuro-2014-0010. 査読有

Ouchi Y, Yamamoto J, Iwamoto T. The Heterochronic Genes lin-28a and lin-28b play an Essential and Evolutionarily

Conserved Role in Early Zebrafish development. *PLoS One.* 9(2):e88086, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0088086, 査読有 Ouchi Y, Banno Y, Shimizu Y, Ando S, Hasegawa H, Adachi K, Iwamoto T.: Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the Dgcr8-deficient mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia can be rescued by IGF2. *J Neurosci.* 33:9408-9419. 2013. doi:10.1523/JNEUROSCI.2700-12.2013. 査読有

Masui R, Sasaki M, Funaki Y, Ogasawara N, Mizuno M, Iida A, Izawa S, Kondo Y, Ito Y, Tamura Y, Yanamoto K, Noda H, Tanabe A, Okaniwa N, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Kasugai K.: G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis.* 19:2848-2856. 2013. doi:10.1097/01.MIB.0000435444.14860. ea. 査読有

Toritsuka M, Kimoto S, Muraki K, Landek-Salgado MA, Yoshida A, Yamamoto N, Horiuchi Y, Hiyama H, Tajinda K, Keni N, Illingworth E, Iwamoto T, Kishimoto T, Sawa A, Tanigaki K.: Deficits in microRNA-mediated Cxcr4/Cxcl12 signaling in neurodevelopmental deficits in a 22q11 deletion syndrome mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:17552-17557. 2013. doi: 10.1073/pnas.1312661110. 査読有

[学会発表](計 8 件)

岩本隆司 上田潤 高岡祐司 松山留美子 野田明子 喬善楼 上山知己 安達興一；心筋特異的 miR-143 トランスジェニックマウスではヘキサキナーゼ 2 発現低下と相関して拡張型心筋症が発症し、ACE 阻害剤で改善する BMB2015 年会 2015 年 12 月 1 日 ~ 12 月 4 日(口頭発表) 神戸ポートアイランド、神戸市、兵庫県 上田潤 浦浜嵩 原田哲仁 他 14 名 10 番目；マウス精巢特異的ヒストン H3 バリエーションである H3t は精子形成過程に必須である BMB2015 年会 2015 年 12 月 1 日 ~ 12 月 4 日(口頭発表) 神戸ポートアイランド、神戸市、兵庫県

Ueda, J., Urahama, T., Harada, A., Machida, S., Maehara, K., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., Yao, T., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K.” Mouse testis specific histone H3 variant, H3t is essential for spermatogenesis and ensures the entry into meiosis.”

International Symposium ‘Non-coding DNA and Chromosomal Integrity’

Awaji Yumebutai International Conference Center, 2015 年 8 月 7 日 ~ 8 日、淡路島、

兵庫県

岩本隆司 上田潤; マイクロ RNA トランスジェニックマウスに発症する拡張型心筋症の解析、第 13 回がんとハイポキシア研究会 2015 年 6 月 5 日-6 日、(口頭発表) 国立遺伝学研究所、三島市、神奈川県

Ouchi Y, Tsuruda H, Nakashima T, Takaoka Y, Asaeda Y, Iwamoto T

“The Lin28/let-7 axis regulates intestinal epithelial cell proliferation and tumor formation”第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日,(ポスター発表)、神戸ポートアイランド,神戸市、兵庫県

Banno Y, Ouchi Y, Hakumoto Y, Shimizu Y, Andou S, Adachi K, Iwamoto T

“Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the DGCR8-deficient mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia can be rescued by IGF2” 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日,(ポスター発表)、神戸ポートアイランド、神戸市、兵庫県

大内靖夫, 坂野祐哉, 清水裕子, 安藤章太,

岩本隆司 “Deficiency of DGCR8 gene, a candidate gene for 22q11.2 deletion-associated schizophrenia, decreases cell

proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus” 成体脳のニューロン新生懇談会 2013 年 11 月 30 日 (ポスター発表)、東京慈恵医大, 東京

大内靖夫, 坂野祐哉, 清水裕子, 安藤章太, 安達興一, 岩本隆司

“Deficiency of DGCR8 gene, a candidate gene for 22q11.2 deletion-associated schizophrenia, decreases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus” 第 11 回幹細胞シンポジウム、2013 年 5 月 17 日、(ポスター発表) 東京大学, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www3.chubu.ac.jp/celar/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 隆司 (IWAMOTO, Takashi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 60223426

(2) 研究分担者

市原 正智 (ICHIHARA, Masatoshi)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 00314013

(3) 研究分担者

野田 明子 (NODA, Akiko)
中部大学・臨床検査技術教育・実習センター・教授
研究者番号: 80252287

(4) 連携研究者

大内 靖夫 (OUCHI, Yasuo)
千葉大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70553858

(5) 連携研究者

上山 知己 (UEYAMA, Tomomi)
京都府立医科大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 80379388