

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860052

研究課題名(和文)メチル化酵素PRMT5による心肥大抑制機構の解明と心不全薬物治療への展開

研究課題名(英文)Study on the role of protein arginine methyltransferase 5 in cardiac hypertrophy

研究代表者

刀坂 泰史 (Katanasaka, Yasufumi)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00583973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの研究で心不全発症における遺伝子発現調節に極めて重要であることを示した。本研究ではアルギニンメチル化酵素PRMT5が心不全発症に関与する新たな分子である可能性を明らかにした。本研究結果から、PRMT5は、心肥大反応および心不全を促進することが考えられる。今後さらに心肥大反応および心不全発症におけるPRMT5について詳細な解析を行うことで新たな心不全治療戦略の開発へとつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is one of the leading causes of death in industrialized countries, and cardiac hypertrophy is a risk factor for heart failure. We have demonstrated that PRMT5, a protein arginine methyltransferase, is involved in the promotion of cardiac hypertrophy and the development of heart failure. These results indicate that PRMT5 is a possible molecular target for heart failure therapy.

研究分野：生物系薬学

キーワード：心肥大 心不全 アルギニンメチル化酵素 転写

1. 研究開始当初の背景

心不全は高血圧性心疾患、弁膜症、虚血性心疾患など種々の心疾患の共通最終像であり非常に予後が悪く、十分な治療法の開発には至っていない。この問題を克服することは臨床的・社会的に重要であり、新たな薬物治療戦略が求められている。心肥大とは、高血圧や心筋梗塞などのストレスに対して、個々の心筋細胞が肥大する代償機構のことである。心肥大は、心不全発症における重要な危険因子であり、持続的なストレス負荷により、肥大による代償機構は破綻し、心不全へと移行する。この心肥大時には、心筋細胞内で様々な遺伝子発現が変化し、心不全発症に寄与することが知られているが、この転写経路を標的とする治療薬は未だ開発されていない。この経路を標的とする薬物を開発するためには、心筋細胞核内における転写制御機構の解明が必要不可欠であるが、非常に複雑な過程であることから、いまだ完全な解明には至っていない。

2. 研究の目的

これまでに、p300/GATA4 転写経路が心肥大から心不全発症に至る遺伝子発現調節に極めて重要であることを示した。さらに申請者は新規 GATA4 結合分子としてアルギニンメチル化酵素 PRMT5 とその活性制御因子 MEP50 を同定し、心筋細胞において PRMT5/MEP50 複合体が p300/GATA4 経路に対し、抑制的に働くことを明らかにした。しかし、その作用分子機構と生体での心肥大及び心不全発症における役割は不明である。そこで本研究では、心肥大及び心不全発症における PRMT5/MEP50 複合体による p300/GATA4 転写経路調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

心肥大及び心不全発症における PRMT5/MEP50 複合体の機能とその作用機構を解明するために、本研究では以下の2つの研究を実施した。

(1) GATA4 誘導転写反応における p300 アルギニンメチル化の役割

PRMT5 は p300 をメチル化させることから、p300 のメチル化と HAT 活性、さらに GATA4 によって誘導される転写反応に与える影響について検討する。p300 のメチル化部位を同定し、アルギニン点変異体を作成する。

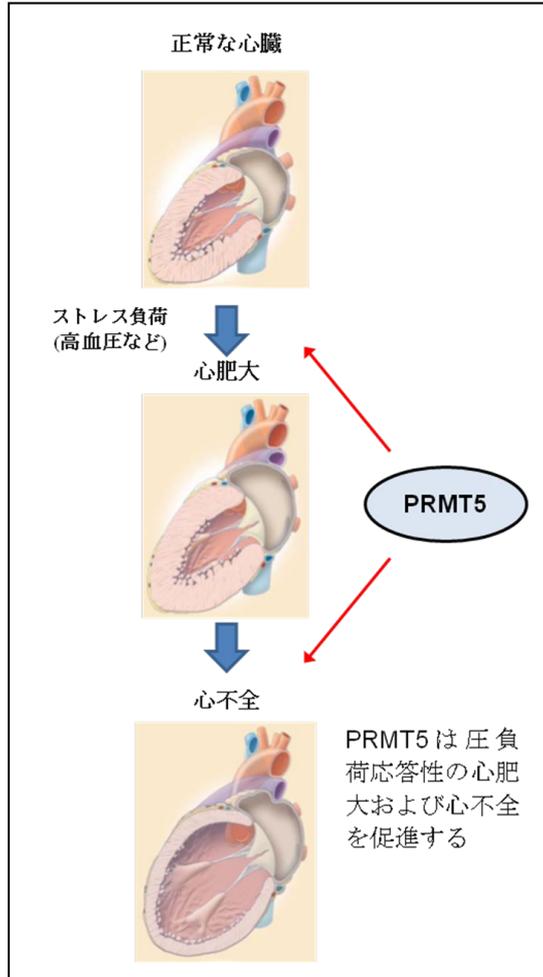
(2) 動物レベルにおける PRMT5 の心肥大・心不全発症における機能

PRMT5 を心筋細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス (PRMT5-TG) を作成し、圧負荷心不全モデルマウスを用いて、心肥大・心不全に対する個体レベルでの PRMT5 の役割を解析する。野生型マウスおよび PRMT5-TG マウスに大動脈狭窄術を施し、心臓超音波検査を行った。またサクリファイして、心臓重量、心組織切片の解析、mRNA 抽出

しリアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

本研究成果の概要は下記図の通りである。



(1) GATA4 誘導転写反応における p300 アルギニンメチル化の役割

p300 と PRMT5 が直接的に結合することを明らかにした。またその結合部位は複数あった。p300 (aa1-450) および p300 (aa1514-1922) に結合が確認された。メチル化アッセイを行った結果、p300 (aa1-450) がメチル化したが、aa1514-1922 はメチル化が確認できなかった。

(2) 動物レベルにおける PRMT5 の心肥大・心不全発症における機能

心臓特異的に PRMT5 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (PRMT5-TG) を作成した。野生型 (WT) および PRMT5-TG に大動脈狭窄術 (TAC) を施すことにより、圧負荷心不全モデルマウスを作成し、心肥大および心不全の指標について評価した。結果の要旨は下記である。

PRMT5-TG では TAC による心肥大が亢進した。大動脈狭窄術を施したマウスから心臓を摘出し、重量を測定した。その結果、野生型マウス群と比較して、PRMT5-TG 群では心体重比

が有意に増加していた。

PRMT5-TGではTACによる左室収縮能の低下が促進した。

大動脈狭窄術を施したマウスの心臓超音波検査を行い、心機能の指標である左室短縮率および左室区出率を算出した。その結果、野生型マウス群と比較して、PRMT5-TG群では左室短縮率および左室区出率が有意に減少していた。

HE染色およびマッソントリクローム染色の結果、PRMT5-TGでは心筋細胞の肥大および線維化の促進がみられた。

大動脈狭窄術を施したマウスから心臓を摘出し、切片を作成後、HE染色およびマッソントリクローム染色を行った。その結果、野生型マウス群と比較して、PRMT5-TG群では心筋細胞肥大が有意に亢進していた。また心臓の線維化も亢進していた。

リアルタイムPCR解析の結果よりPRMT5-TGでは心肥大マーカーの発現が亢進していた。マウスから心臓を摘出し、mRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。その結果、野生型マウス群と比較して、PRMT5-TG群では心筋細胞肥大マーカーであるANPおよびMHCの発現が有意に亢進していた。

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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Hidetoshi Suzuki, Yasufumi Katanasaka, Yoichi Sunagawa, Yusuke Miyazaki, Masafumi Funamoto, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto
Tyrosine phosphorylation of RACK1 triggers cardiomyocyte hypertrophy by regulating the interaction between p300 and GATA4
BBA - Molecular Basis of Disease, in press
査読有

2. Y. Sunagawa, Y. Katanasaka, H. Wada, K. Hasegawa, T. Morimoto, Functional Analysis of GATA4 Complex, a Cardiac Hypertrophy-response Transcriptional Factor, Using a Proteomics Approach, Yakugaku Zasshi. 136(2) (2016) 151-6. 査読有

3. Nakamura K, Sano S, Fuster JJ, Kikuchi R, Shimizu I, Ohshima K, Katanasaka Y, Ouchi N, Walsh K. Secreted frizzled-related protein 5 diminishes cardiac inflammation and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. J. Biol. Chem. 2016;291:2566-2575

4. Morimoto T, Katanasaka Y, Sunagawa Y, Hirano S, Miyazaki Y, Funamoto M, Hojo Y,

Suzuki H, Morimoto E, Ueno M, Shimatsu A, Satoh-Asahara N, Yamakage H, Wada H, Hasegawa K. Effects of statins on left ventricular diastolic function in patients with dyslipidemia and diastolic dysfunction (stat-lvdf study). Biol Pharm Bull. 2015;38:1404-1409

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 刀坂泰史、若林弘樹、櫻井涼賀、宮崎雄輔、砂川陽一、和田啓道、長谷川浩二、森本達也:アルギニンメチル化酵素PRMT5は加齢に伴う心肥大を促進する、第16回日本抗加齢医学会総会(神奈川)、2016年6月10日

2. Yusuke Miyazaki, Yasufumi Katanasaka, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa and Tatsuya Morimoto:PRMT5/MEP50 complex regulates p300/GATA4-induced cardiac hypertrophy、第80回日本循環器学会学術集会、宮城、2016年3月20日

3. Hiroki Wakabayashi, Ryoga Sakurai, Yasufumi Katanasaka, Yusuke Miyazaki, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto:PRMT5 accelerates cardiac hypertrophy and the deterioration of left ventricular systolic function with aging、第32回ISHR日本部会総会、兵庫、2015年12月11日

4. Yusuke Tsutsui, Yusuke Miyazaki, Yasufumi Katanasaka, Ryoga Sakurai, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto:MEP50 inhibites p300/GATA4-induced hypertrophic gene transcription by recruiting PRMT5 to p300、第32回ISHR日本部会総会、兵庫、2015年12月11日

5. Yusuke Miyazaki, Yasufumi Katanasaka, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa and Tatsuya Morimoto:Protein Arginine Methyltransferase 5/Methylome Protein 50 Complex Inhibits p300 Histone Acetyltransferase Activity and Hypertrophic Gene transcription in Cultured Cardiomyocytes、AHA Scientific Sessions 2015、Orlando, USA、2015年11月8日

6. 刀坂泰史、中田淳也、宮崎雄輔、砂川陽一、鈴木秀敏、和田啓道、長谷川浩二、森本達也:PRMT5/MEP50メチル化複合体による心筋細胞肥大制御機構の解析、第61回日本薬学会東海支部大会、名古屋、2015年7月4日

7. 刀坂泰史:心筋細胞内核内情報伝達機構

の老性変化、日本薬学会第 135 年会一般学術
発表、神戸、2015 年 3 月 26 日

8. Yusuke Miyazaki, Yasufumi Katanasaka,
Yukiko Nakagawa, Yoichi Sunagawa, Junya
Nakada, Hidetoshi Suzuki, Hiromichi Wada,
Akira Shimatsu, Koji Hasegawa, Tatsuya
Morimoto : Methylosome protein 50 promoted
the association of Protein arginine
methyltransferase 5 with p300、World
Congress of Cardiology Scientific
Sessions 2014、オーストラリア・メルボル
ン、2014 年 5 月 5 日

9. 刀坂泰史，中川由紀子，宮崎雄輔，中田
淳也，砂川 陽一，鈴木秀敏，和田啓道，長
谷川浩二，森本達也：新規 GATA4 結合タン
パク質 PRMT5 の機能解析、日本薬学会第 134
年会、熊本・熊本大学、2014 年 3 月 28 日

〔図書〕(計 1 件)

刀坂泰史、森本達也、メジカルビュー社、ア
ンチエイジング医学の基礎と臨床、p316-317、
2015 年

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刀坂 泰史 (Yasufumi Katanasaka)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00583973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：