

心臓特異的 long non-coding RNA による心肥大・心不全の病態制御

尾池雄一

熊本大学大学院生命科学研究部

【研究の背景】

心不全は、高血圧症や虚血性心疾患、心筋症などの様々な原因により生じた心機能低下による末梢循環不全状態である。医学・医療技術の目覚ましい進歩にもかかわらず、重度の心不全患者においてはその5年生存率が約50～60%と低く、依然として非常に予後不良である。さらに、心不全患者数は今後も世界規模で増加することが予想され、超高齢社会を迎えた本邦においては特に高齢者の心不全患者数の増加が問題となっている。また、心不全は医療経済への負担の観点からも健康長寿社会実現の大きな阻害要因となる。それ故、現在の対症療法的な治療に加え、効果的な心不全の発症メカニズムに立脚した根本治療の新規開発が重要な課題となっている。

マウスを用いた遺伝子トラップ法は、新規遺伝子の単離と同時にその遺伝子破壊マウスによる新規遺伝子の機能解析もできる利点がある。また、遺伝子トラップの際にはレポーター遺伝子として β -geo が挿入されるため、単離した遺伝子の発現の局在を容易に解析することが可能となる。心肥大、心不全病態においては、胎児期に強く発現する遺伝子が再発現し機能することが知られている。我々は、心肥大・心不全の病態形成に関わる心臓特異的な新規 long non-coding RNA (lncRNA) の単離・同定を目的に、マウス胎児心臓で強く発現することを指標に遺伝子トラップ法を行い、新規心臓特異的 lncRNA の同定に成功した。野生型マウスを用いて横行大動脈 banding による圧負荷心不全 (TAC; 大動脈縮窄) モデルを作製し、心臓における新規心臓特異的 lncRNA の発現を解析したところ、コントロールマウスの心臓に比べ、その発現が有意に減少することを見出した。さらに、新規心臓特異的 lncRNA 欠損マウスを用いて TAC モデルを作製したところ、同胞野生型マウスに比べ著明に心機能増悪が認められた。

【目 的】

我々は遺伝子トラップ法により新規心臓特異的 lncRNA を同定し、当該 lncRNA 欠損マウスを用いた圧負荷心不全モデル解析から、新規心臓特異的 lncRNA が心不全病態形成に抑制的に作用することが示唆された。本研究では、心負荷への代償機構としての心肥大・心臓リモデリングとその応答破綻である心不全における新規心臓特異的 lncRNA の機能解明および新規心臓特異的 lncRNA の心肥大・心不全病態形成における保護的作用効果を明らかにすることで、心不全に対する新規治療法や予防法開発に向けた基盤研究を行う。

【方 法】

TAC モデルにおいて野生型マウスに比べて、新規心臓特異的 lncRNA 欠損マウスは心不全の増悪を認めることから、心圧負荷による心不全への新規心臓特異的 lncRNA による保護的作用が示唆される。また、近年、lncRNA の作用機序の1つとして近傍の遺伝子発現に影響するシス効果が報告されている。そこで、本来の新規心臓特異的 lncRNA の遺伝子座で新規心臓特異的 lncRNA を CAG プロモーターにより高発現するトランスジェニック (Tg) マウスおよび本来の遺伝子座とは異なる X 染色体で新規心臓特異的 lncRNA を CAG プロモーターにより高発現する Tg マウスを用いて圧負荷心不全モデルマウスを作製し、TAC 術後に心エコーによる経時的な心機能測定、心肥大・心不全に関連する遺伝子の mRNA 及びタンパク発現解析を行い、新規心臓特異的 lncRNA の心不全病態における分子機構の解析およびその作用機序としてのシス効果の有無を検討した。

【結 果】

これまでの研究成果として、新規心臓特異的 lncRNA の欠損マウスを用いた TAC モデルでは、野生型マウスに比べ、有意に心臓が肥大し、心筋の収縮力低下や心不全マーカーである ANP、BNP、Mhy7 および心筋組織の線維化マーカーである CTGF、Collagen I の発現が著明に上昇するなど、心不全病態の増悪が認められた。一方、本来の新規心臓特異的 lncRNA の遺伝子座で新規心臓特異的 lncRNA を CAG プロモーターにより高発現する Tg マウスを用いた TAC モデルでは、野生型マウスに比べ、心臓の肥大化および心筋の収縮力低下が抑制されていた。また、心不全マーカーや線維化マーカーの上昇も野生型マウスに比べ有意に抑制されていた。さらに、本来の遺伝子座とは異なる X 染色体で新規心臓特異的 lncRNA を CAG プロモーターにより高発現する Tg マウスでは、上述の本来の遺伝子座で新規心臓特異的 lncRNA を高発現する Tg マウスの結果と同様に、心筋の収縮力低下や心不全マーカーおよび線維化マーカーの発現上昇の抑制が認められた。

【考 察】

TAC モデルの解析から、新規心臓特異的 lncRNA 欠損マウスが心不全病態の増悪を示すこと、一方、新規心臓特異的 lncRNA の Tg マウスが心不全病態の発症・進展に対して抵抗性を示すことから、新規心臓特異的 lncRNA が心不全の病態形成に対して保護的に作用することが明らかとなった。さらに、本来の遺伝子座で新規心臓特異的 lncRNA を高発現する Tg マウスと本来の遺伝子座とは異なる X 染色体で新規心臓特異的 lncRNA を高発現する Tg マウスはいずれも心不全の病態形成に対して抵抗性を示したことから、新規心臓特異的 lncRNA が近傍の遺伝子発現に作用するシス効果とは別のメカニズムによって心保護作用を示すことが示唆された。今後、新規心臓特異的 lncRNA の作用機序や発現制御機構を解明するとともに、心不全病態に対する新たな治療法としての心筋細胞における新規心臓特異的 lncRNA の発現誘導法の開発が重要な課題である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、心不全に対する新規治療法として遺伝子治療が注目されている。先行研究では、免疫原性が低く心筋感染指向性を持つアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、心筋細胞内のカルシウム濃度調節に関わる因子を心筋細胞に高発現させることで心不全病態の進展を抑制する臨床試験が行われている(文献 1、2)。最近、我々は、加齢や高血圧などの圧負荷により心筋細胞におけるアンジオポエチン様タンパク質 2(ANGPTL2)発現が誘導され、その結果、心筋細胞における細胞内カルシウム濃度調節機能および心筋エネルギー代謝の減弱による心機能低下が惹起され、心不全発症・進展につながることを、また、AAV を用いて shRNA により ANGPTL2 発現を抑制する遺伝子治療法を開発し(特願 2016-123615)、TAC モデルマウスに経静脈的に組換え AAV ベクターを投与する遺伝子治療により有意に心機能低下を抑制することに成功した(文献 3)。本研究成果として、新規心臓特異的 lncRNA の Tg マウスを用いた TAC モデルの解析では、その高発現が心不全の病態形成に対して保護的作用効果を示すことから、AAV ベクターを用いて心筋細胞で新規心臓特異的 lncRNA を高発現させる遺伝子治療が心不全病態に対する新たな治療法として有用である可能性が示唆される。また、上記の ANGPTL2 発現を抑制する遺伝子治療法と組み合わせることさらに効果的な治療法となることも考えられ、本研究成果は lncRNA を標的とした新規心不全治療戦略の創出といった観点からも重要な知見である。

【参考・引用文献】

文献 1

Hajjar RJ. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *J Clin. Invest.* 123: 53–61, 2013.

文献 2

Zouein FA and Booz GW. AAV-mediated gene therapy for heart failure: enhancing contractility and calcium

handling. *F1000Prime Reports* 5: 27, 2013.

文献 3

Tian, Z, Miyata, K, Kadomatsu, T, Horiguchi, H, Fukushima, H, Tohyama, S, Ujihara, Y, Okumura, T, Yamaguchi, S, Zhao, J, Endo, M, Morinaga, J, Sato, M, Sugizaki, T, Zhu, S, Terada, K, Sakaguchi, H, Komohara, Y, Takeya, M, Takeda, N, Araki, K, Manabe, I, Fukuda, K, Otsu, K, Wada, J, Murohara, T, Mohri, S, Yamashita, JK, Sano, M, Oike, Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nat. Commun.* 7: 13016, 2016.