

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15442

研究課題名(和文) 心血管疾患基盤病態としての肥満症における転写共役因子MRTF-Aの意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the significance of MRTF-A, a co-activator of SRF, in the development of obesity that is an underlying risk factor for cardiovascular diseases

研究代表者

桑原 宏一郎 (KUWAHARA, KOICHIRO)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：30402887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、心血管病の重要な発症基盤の一つとして、肥満、脂肪蓄積を中心としたメタボリックシンドロームの存在が明らかとなっている。しかし、肥満、脂肪蓄積に至る詳細な分子機序は不明な点が多い。研究代表者は、Rho依存性にSRFを活性化する転写共役因子であるMRTF-Aのノックアウトマウスの解析の結果から、MRTF-Aが脂肪細胞増殖、脂肪蓄積、さらには糖代謝制御に重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、肥満症・メタボリックシンドローム発症分子基盤としての、脂肪細胞分化、脂肪蓄積におけるMRTF-Aの役割とその分子機序の解明、臨床的意義の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome derived from central obesity and fat accumulation underlies the development of cardiovascular disease. Detailed molecular mechanisms leading to central obesity and fat accumulation remains unresolved. Recently, our study group found that MRTF-A, Rho-dependent transcriptional coactivator of SRF, plays a significant role in the regulation of adipocyte proliferation, fat accumulation and glucose metabolism by analyzing MRTF-A knockout mice. In this study, we investigated the precise molecular mechanisms and potential clinical relevance of MRTF-A in adipocyte differentiation and fat accumulation that lead to the development of metabolic syndrome and obesity

研究分野：循環器内科学

キーワード：分子心臓学 転写因子 シグナル伝達 糖代謝 肥満

1. 研究開始当初の背景

近年、心血管病の重要な発症基盤の一つとして、肥満、脂肪蓄積を中心としたメタボリックシンドロームの存在が明らかとなっている。肥満・脂肪蓄積過程においては、クロ

ナルな脂肪前駆細胞の増殖とそれに引き続く脂肪細胞の分化・成熟に至る一連の経路が明らかにされている。この過程では、PPAR および C/EBP family といった転写因子群が重要な役割を果たすが、最近 small G protein Rho の脂肪細胞分化における役割が新たに示された (Noguchi M, J Chem Biol 2007; Hara Y, et al Sci Signal 2011)。Rho はその下流で細胞骨格リアレンジメントに関与するのみならず、心血管系の分化・成長に重要な転写因子である serum response factor(SRF)を活性化し、細胞分化・機能調節、組織リモデリングに関与する。SRF の遺伝子欠損マウスは中胚葉の形成不全により胎生早期に死亡することから、SRF は心血管系細胞のみならず、脂肪細胞を含む中胚葉系細胞の分化・増殖に重要な働きを持つものと考えられる。実際、最近の genome-wide エピゲノム解析の結果から、SRF が脂肪細胞の増殖・分化に決定的な役割を果たす可能性が示された(Mikkelsen TS, et al. Cell 2010)。これらのことは、Rho-SRF 転写経路が脂肪細胞分化・増殖に大きな役割を果たす新しい可能性を提示する。しかし一方でそこに関わる詳細なメカニズムは不明であること、また Rho、SRF のノックアウトマウスは共に胎生致死であることから、本経路に関連したメタボリックシンドロームに対する有望な治療標的の探索・同定が必要とされていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、Rho 依存性に SRF を活性化する転写共役因子である MRTF-A のノックアウトマウスの解析の結果から、MRTF-A が脂肪細胞増殖、脂肪蓄積、さらには糖代謝制

御に重要な役割を果たすことを見出した。本研究では、肥満症・メタボリックシンドローム発症分子基盤としての、脂肪細胞分化、脂肪蓄積における MRTF-A の役割の詳細を解明し、心血管疾患予防における新規治療標的としての意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MRTF-A ノックアウトマウスにおける脂肪減少の分子機序解明とその糖脂質・代謝、肝機能、心機能への影響の検討。

MRTF-A ノックアウトマウスにおける脂肪量減少とその原因、またそれが糖脂質代謝に及ぼす影響とその分子機序に関してさらに詳細に解析するために、通常食、および高脂肪食を負荷した野生型マウスと MRTF-A ノックアウトマウスの表現形を多面的かつ詳細に比較検討した。

(2) 培養細胞を用いた MRTF-A の脂肪細胞分化・増殖過程における役割の検討。

NIH3T3-L1 細胞およびヒト脂肪由来幹細胞を用いて、同様に脂肪細胞分化を in vitro で誘導し、各分化段階における MRTF-A の発現を検討した。またこれら細胞においてレンチウイルスを用いたシステムにより MRTF-A をノックダウンし、その分化に及ぼす影響とそこに関わる分子機序に関して検討を試みた。

(3) 脂肪細胞特異的 MRTF-A 過剰発現マウスの作製とその解析。

脂肪細胞分化における MRTF-A の役割を多面的に解析するために、脂肪細胞特異的 aP2 promoter を用いて MRTF-A を脂肪細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス作製を行った。

(4) MRTF-A 阻害薬 CCG-1423 およびその誘導体の脂肪蓄積に及ぼす効果の検討。

近年 MRTF-A の核内移行を阻害し、その SRF transactivation を阻害する低分子化合

物として CCG-1423 が見出された。MRTF-A が新規抗肥満薬、メタボリックシンドローム治療薬となりうる可能性を検証するために、db/db マウスや高脂肪食負荷マウスなどの肥満モデル動物に CCG-1423 を投与した。

4. 研究成果

(1) MRTF-A ノックアウトマウスにおける脂肪減少の分子機序解明とその糖脂質・代謝、肝機能、心機能への影響の検討。

MRTF-A ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、通常食飼育下において加齢とともに体重増加が少ないことが確認され、また高脂肪食下においても、野生型マウスと比較して体重増加がおこりにくいことが明らかとなった。吻尾長に両者で差はなく、精巣周囲脂肪量が MRTF-A ノックアウトマウスでは有意に野生型マウスより少なく、また CT にて解析した脂肪率も MRTF-A ノックアウトマウスで有意に少なかったことから MRTF-A ノックアウトマウスには脂肪蓄積が起こりにくい肥満抵抗性が存在することが示された。食事摂取量に MRTF-A ノックアウトマウスと野生型マウスで差がなかったが、エネルギー消費量はノックアウトマウスで有意に増加していた。また血中脂質プロファイルには有意な差は認めなかった。また IPGTT による糖代謝は通常食群、高脂肪食群ともに MRTF-A ノックアウトマウスで野生型マウスより良好であり、またインスリン濃度も低い傾向が認められた。高脂肪食による脂肪肝もノックアウトマウスでは軽度であった。MRTF-A ノックアウトマウスと db/db マウスとの交配においても、MRTF-A の欠損は肥満抵抗性を同様に示したことから、MRTF-A の遺伝的欠損は肥満抵抗性を示し、糖代謝が改善する傾向にあることが示唆された。これらの結果を得て、高脂肪食下における MRTF-A ノックアウトマウスの心機能についても野生型との比較を開始した。

(2) 培養細胞を用いた MRTF-A の脂肪細胞分化・増殖過程における役割の検討。

MRTF-A ノックアウトマウスの肥満抵抗性の機序を明らかにするために、NIH3T3L1 細胞およびヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた脂肪細胞分化系において MRTF-A の発現を検討した。その結果 MRTF-A は未分化な死亡前駆細胞と思われる細胞に豊富に発現するが、脂肪細胞への分化とともにその発現が低下することを見出した。また高脂肪食負荷 MRTF-A ノックアウトマウスの精巣周囲細胞では多彩型と比較して C/EBPbeta の発現量が低下していた。3T3L1 細胞において MRTF-A をノックダウンしたところ、同様に C/EBPbeta の発現量の低下を認めた。これらのことから MRTF-A は脂肪細胞の分化に重要な働きをしていることが示唆された。

(3) 脂肪細胞特異的 MRTF-A 過剰発現マウスの作製とその解析。

脂肪細胞分化における MRTF-A の役割を多面的に解析するために、脂肪細胞特異的 aP2 promoter を用いて constitutive active MRTF-A を脂肪細胞特異的に発現するトランスジェニックマウス作製を行ったが、現在までに F1 マウスが得られず、aP2 プロモーター下での constitutive active MRTF-A 過剰発現は胎生致死である可能性が示唆された。現在、wild type MRTF-A を aP2 プロモーター下で過剰発現するマウスの作製に取り掛かっている。

(4) MRTF-A 阻害薬 CCG-1423 およびその誘導体の脂肪蓄積に及ぼす効果の検討。

MRTF-A の肥満、糖尿病治療標的としての意義をさらに探索するために、その阻害薬である CCG1423 の投与実験を開始した。現在その有効な投与方法の検討を継続しつつ、CCG1423 より選択性の高い誘導体の投与実験も予定しているところである。

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 13 件)

1. Fujii T, Hirota K, Yasoda A, Takizawa A, Morozumi N, Nakamura R, Yotsumoto T, Kondo E, Yamashita Y, Sakane Y, Kanai Y, Ueda Y, Yamauchi I, Yamanaka S, Nakao K, Kuwahara K, Jindo T, Furuya M, Mashimo T, Inagaki N, Serikawa T, Nakao K. Rats deficient C-type natriuretic peptide suffer from impaired skeletal growth without early death. **PLoS One**. Mar 22;13(3):e0194812. 2018. (査読有)
2. Ogasawara T, Okano S, Ichimura H, Kadota S, Tanaka Y, Minami I, Uesugi M, Wada Y, Saito N, Okada K, Kuwahara K, Shiba Y. Impact of extracellular matrix on engraftment and maturation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a rat myocardial infarct model. **Sci Rep**. Aug 17;7(1):8630. 2017. (査読有)
3. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, Nishida M, Kato T, Fukushima H, Yamashita J, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation contributes to the increased secretion of inactive human pro-BNP from failing hearts. **J Am Heart Assoc** 6(2):e0003601. 2017. (査読有)
4. Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Yamada Y, Tokudome T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide contributes to blood pressure regulation by maintaining endothelial integrity. **Hypertension**. 69(2):286-296. 2017. (査読有)
5. Setozaki S, Minakata K, Masumoto H, Hirao S, Yamazaki K, Kuwahara K, Ikeda T, Sakata R. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by oral administration of green tea polyphenol in a rat model. **J Vasc Surg**. 65(6):2803-1812. 2017. (査読有)
6. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. **J Am Soc Nephrol**. 28(1):278-289. 2017. (査読有)
7. Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. **Sci Rep** 6: 39383. 2016. (査読有)
8. Ueki Y, Izawa A, Kashiwagi D, Nishiyama S, Aso S, Suzuki C, Sakurai S, Oguchi K, Yazaki Y, Ikeda U, Kuwahara K. Diagnostic advantage of stress computed tomography myocardial perfusion over single-photon emission computed tomography for the assessment of myocardial ischemia. **J Cardiol**. 70(2):147-154. 2016. (査読有)
9. Nishimura H, Miura T, Minamisawa M, Ueki Y, Abe N, Hashizume N, Mochidome T, Harada M, Shimizu K, Shoin W, Yoshie K, Oguchi Y, Ebisawa S, Motoki H, Izawa A, Koyama J, Ikeda U, Kuwahara K. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients with High Ankle-Brachial Index from the IMPACT-ABI Study. **PLoS One**. 11(11):e0167150. 2016. (査読有)
10. Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M.

TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. **Sci Rep.** 6:37001.2016. (査読有)

11. Ohno S, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwahara K, Fujikura J, Naito M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Saleem MA, Numata T, Mori Y, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. Ablation of the N-type calcium channel ameliorates diabetic nephropathy with improved glycemic control and reduced blood pressure. **Sci Rep.** 6:27192.2016 (査読有)

12. Yamashita Y, Yamada-Goto N, Katsuura G, Ochi Y, Kanai Y, Miyazaki Y, Kuwahara K, Kanamoto N, Miura M, Yasoda A, Ohinata K, Inagaki N, Nakao K. Brain-specific natriuretic peptide receptor-B deletion attenuates high-fat diet-induced visceral and hepatic lipid deposition in mice. **Peptides.** 81:38-50. 2016 (査読有)

13. Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Junko Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Honjo H, Kamiya K, Nakao K and Kimura T. The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischemic cardiomyopathy. **Cardiovasc Res** 109(1):162-73. 2016. (査読有)
〔学会発表〕(計 14 件)

1. Kuwahara K, Nakao K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Tokudome T, Minamino N, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide regulates blood pressure through the maintenance of endothelial function. *Heart Failure* 2017 . 2017

2. Kuwahara K, Nakao K, Nishikimi T, nakagawa Y, Tokudome T, Minamino N, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Endothelial dysfunction underlies blood pressure elevation in endothelium-specific C-type natriuretic peptide knockout mice. *ESC Congress* 2017 . 2017

3. Cho Kozai, Takeya Minami, Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Kazuwa Nakao, Koichiro Kuwahara, Kaoru Koike, Takeshi Kimura. Adipocyte-derived adrenomedullin suppresses age-and obesity-related increase in blood pressure. *ESC Congress* 2017 . 2017

4. Koyama J, Kuwahara K. Long-term Prognostic Significance of Diastolic Wall Strain, and Heart Rate in Patients with Light-chain Amyloidosis. *American Heart Association's Scientific Sessions(AHA)* 2017 . 2017

5. Koyama J, Kuwahara K. Human Atrial Natriuretic Peptide Levels in Combination with Plasma Brain Natriuretic Peptide Levels Predict Cardiac Function in Patients with Light-chain Amyloidosis. *American Heart Association's Scientific Sessions(AHA)* 2017 . 2017

6. Kosai Cho, Takeya Minami, Koichiro Kuwahara, Toshio Nishikimi, Hideaki Inazumi, Kenji Moriuti, Kaoru Koike, Kenji Naoto Minamino, Kangawa Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura Adipocyte-derived adrenomedullin suppresses age-and obesity-related increase in blood pressure. *The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society* 2017.

7. Toshio Nishikimi, Yasuaki Nakagawa, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Hideaki Inazumi, Kenji Moriuchi, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura. O-linked oligosaccharide attachment underestimates N-terminal proBNP(NT-proBNP) levels in heart failure (HF) and chronic renal failure (CRF) on hemodialysis (HD). *The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society* 2017.

8. 趙晃濟、桑原宏一郎、南丈也、錦見俊雄、南野直人、中川靖章、木下秀之、稲住英明、森内健史、寒川賢治、中尾一和、木村剛。脂肪由来のアドレノメデュリンは加齢および肥満に伴う血圧上昇を抑制する。第 5 4

回日本臨床分子医学会学術集会 2017

9. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Hiroshi Sakai, Seiko Ohno, Hideyuki Kinoshita, Hideaki Inazumi, Kenji Moriuchi, Koichiro Kuwahara, Minoru Horie, Takeshi kimura. A case of Macro-pro-B-Type Natriuretic Peptide (proBNP). 第 21 回日本心不全学会学術集会 2017.

10. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Kazuwa Nakao and Takeshi Kimura
MiR30-GALNTs axis-mediated O-glycosylation plays an important role in the increased secretion of unprocessed pro-brain natriuretic peptide by failing heart. Keystone symposia 2016.

11. Kuwahara K, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation at threonine 48 and 71 plays an essential role in the increased secretion of unprocessed pro-brain natriuretic peptide by failing hearts. Heart Failure 2016 (ESC Heart Failure). 2016.

12. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Chinatsu Yamada, Hideaki Inazumi, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura. Unprocessed proBNP secretion is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-glycosylation in the pathological myocardium. AHA BCVS2016. 2016

13. Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Hideyuki Kinoshita, Hiroyuki Okamoto, Takao Kato, Kenji Kangawa, Naoto Minamino, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura. MiR30-GALNT1/2 axis-mediated glycosylation regulates the increase in inactive human pro-BNP secretion from failing heart. The 26th Scientific meeting of the International Society of Hypertension 2016.

14. Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi,

Koichiro Kuwahara, Hideyuki Kinoshita, Hideaki Inazumi, Kenji Moriuchi, Takao Kato, Naoto Minamino, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura. Secretion of proBNP is regulated by MiR30-GALNTs axis dependent O-linked glycosylation in the pathological myocardium. AHA Scientific Session 2016 2016.

〔図書〕(計 1 件)

1, T. Nishikimi, K. Kuwahara, Y. Nakagawa, K. Kangawa, and K. Nakao. Endocrinology of the Heart in Health and Disease; Chapter 2, Adrenomedullin. Edit by Jonathan C. Schisler, Charles H. Lang, Monte S. Willis. Publisher: Elsevier Science Imprint: Academic Press pp.41-58. 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/zouki/i-oreg/cardiovascular/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桑原 宏一郎 (KUWAHARA, Koichiro)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号 : 30402887