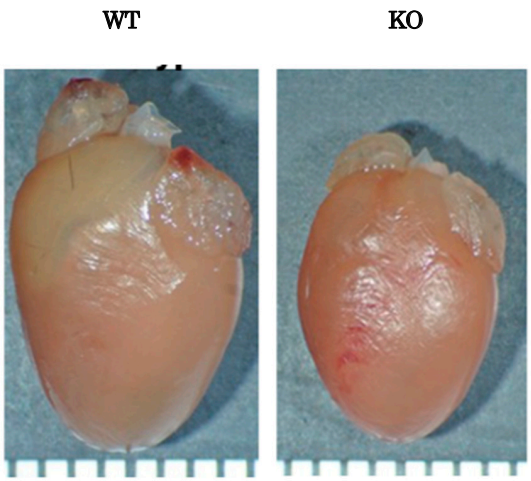
179　長鎖非コードRNA複合体を介した心不全の病態解明	西賀　雅隆

【目的】心肥大・心不全において重要な長鎖非コードRNA（long non-coding RNA）のスクリーニングおよび機能解析を行う。

【方法】網羅的スクリーニングにより心不全マウスモデルで発現変動するlncRNAのスクリーニングを行った。lncRNAの機能解析のために、結合タンパクの同定を行い、クロマチン免疫沈降、RNA pulldown等によりlincRNA-タンパク複合体の機能を解析した。また、*in vivo*でのlncRNAの役割を調べるため、lncRNA欠損マウスを作製し、心肥大・心不全モデルでの表現型解析を行った。

【結果】網羅的スクリーニングにより、複数個の候補lncRNAを得た。その中から、lncRNA#5が圧負荷（TAC）モデルにて、一貫して発現上昇することが判明した。このlncRNA#5は、骨格筋と心臓という筋組織で特異的に発現していた。さらに、質量分析にてlncRNA#5の結合タンパクを同定した。lncRNA#5のノックアウトマウスの作製にも成功し、このマウスは圧負荷による代償性の心肥大が不十分であることが判明した。この結果は、心肥大および心不全における新たな機序を示している。

lncRNA#5 ノックアウトマウスの心臓



179. 長鎖非コードRNA複合体を介した心不全の病態解明

西賀　雅隆

*京都大学 医学部附属病院 循環器内科

Key words：心不全，心肥大，Non-coding RNA，Epigenetics

緒　言

心不全は、全身に必要な血液量を拍出できなくなり、呼吸困難や浮腫等の症状が出現した症候群である［1］。加齢に伴い増加し、米国では 60 才を超えた男性の 10 人に一人が心不全を有することが報告されている。日本も高齢化に伴い、その患者数は 2035 年に 130 万人にも達すると予想されている。したがって、心不全における新たな発症メカニズムの解明、新規治療ターゲットの同定が求められている。近年、次世代シークエンサーを用いた網羅的解析により、DNA からはタンパク質をコードする mRNA のみならず、タンパク質をコードしない非コード RNA も多く転写されていることが判明し、非コード RNA の中でも microRNA（miR）という 22 塩基程度の短鎖非コード RNA が心臓の発生や病態に関わっていることが明らかとなってきている［2〜4］。一方、非コード RNA の多くを占める長鎖非コード RNA（lncRNA）に関しては、心不全において多くの lncRNA 発現が変化することは知られているものの、個々の機能は未知である［5〜7］。そこで、心肥大や心不全において変化する lncRNA の機能を解明しようと試みた。

方法および結果

1. 心肥大・心不全に関与する新規 lncRNA の同定

我々は、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、マウス心肥大モデル［8, 9］を用いて、心肥大や心不全において上昇する lncRNA を複数個同定した（図 1）。それらは Intergenic 領域から転写される long integenic non-coding RNA（lincRNA）に分類されるものであった。その中のゲノム配列がヒトまで保存されている lincRNA に着目した。着目した 10 個の候補 lincRNA のうち、lincRNA#5 は圧負荷モデル（TAC）の 2 week モデルでも 8 week モデルでも共通して上昇がみられた（図 2）。この lincRNA#5 をマウス心筋細胞に過剰発現すると、心筋細胞肥大が誘導された。またこの lincRNA#5 は心臓と骨格筋に特異的に発現していた（図 3）。

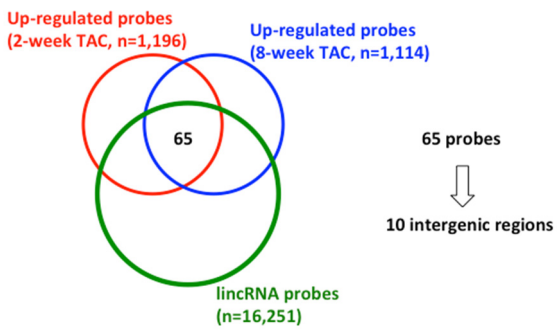


図 1. lincRNA のスクリーニング

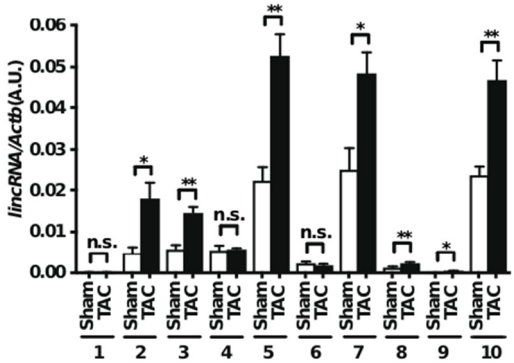


図 2. lincRNA#5 は圧負荷（TAC）で発現が上昇する
（*p < 0.05, **p < 0.01 ; Mann-Whitney test ; n = 4〜6）

*現在の所属：スタンフォード大学 医学部

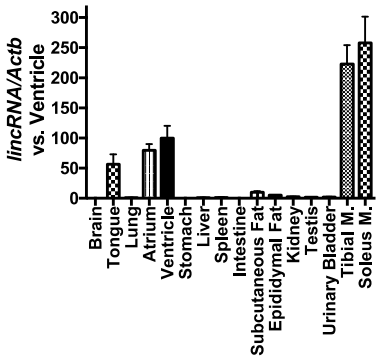


図 3. lincRNA#5 は筋組織特異的である

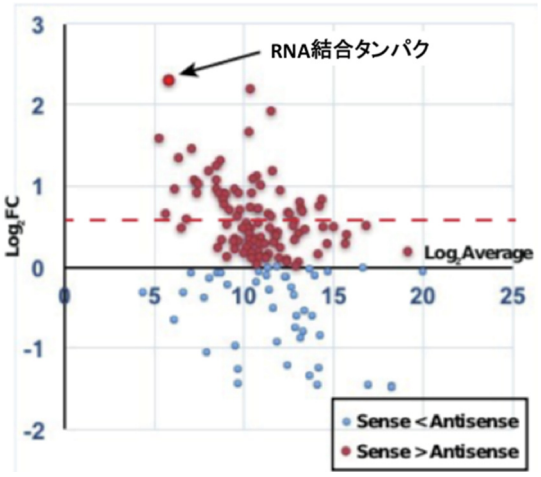


図 4. lincRNA#5 と特異的に結合するタンパクの同定

2. lincRNA#5 の機能解析

次にこの lincRNA の機能を解明することとした。lncRNA は核内で、RNA 結合タンパク質と相互作用することにより、遺伝子発現を制御することが報告されている。そこで、ビオチン化 lincRNA と肥大心より抽出した核タンパクを結合させ、回収したタンパク質を質量分析で網羅的に解析することにより、235 種類の核内 lincRNA 結合タンパク質を同定した。この中でもコントロール antisense RNA と比較し、特異的に lincRNA に結合する RNA 結合タンパク質を同定した（図 4）。この遺伝子は転写因子の機能を有しているため、この lincRNA#5 と RNA 結合タンパクとの複合体が転写レベルで心筋細胞の肥大に関わっている可能性がある。

3. lincRNA 欠損マウスの作製・解析

lincRNA#5 の *in vivo* での機能を解析するため、lincRNA#5 欠損マウスの作製を行った。着目する lincRNA#5 は、全長約 2.3 k のゲノムから転写され、2 つのエクソンから構成される。この領域をネオマイシンで置き換えることにより、lincRNA 欠損 ES 細胞を作製し、キメラマウスを得て、さらに野生型マウスと掛け合わせることで、lincRNA#5 の homozygous ノックアウトマウスおよび heterozygous ノックアウトマウスを得た。

図 5 に示すように、lincRNA#5 の発現量は heterozygous ノックアウトマウスでは約半分になり、homozygous ノックアウトマウスでは検出感度以下の発現を示した。この lincRNA#5 欠損マウスは心臓が野生型よりも小さく（図 6）、圧負荷（TAC）を行ったところ、心肥大が著明に抑制された。

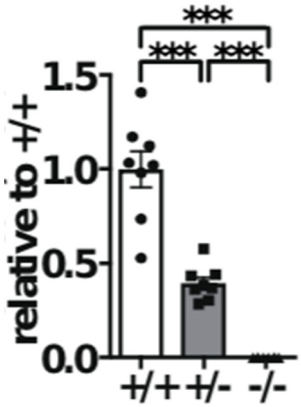


図 5. lincRNA#5 の発現量は allele 数に依存する
(***p < 0.001, One-way ANOVA with Bonferoni post-hoc test, n = 8)

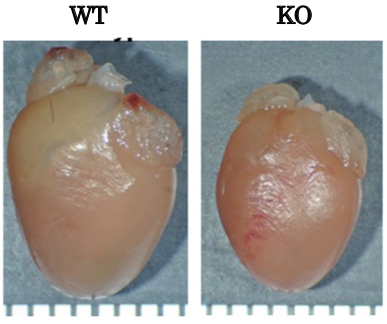


図 6. lincRNA#5 欠損マウスの心臓

考　察

本研究において、長鎖非コードRNA（long non-coding RNA：lncRNA）が心肥大・心不全に寄与している可能性を調べた。マウスモデルを用い、網羅的に発現量が変化するlong intergenic non-coding RNAをスクリーニングし、10個の候補を得た。その中から、異なる条件でも発現量が上昇していたlincRNA#5に着目した。

このlincRNA#5は心臓や骨格筋といった筋組織特異的なnon-coding RNAであった。また、*in vitro*での過剰発現にてマウス心筋細胞を肥大させた。機序として、転写因子として働くRNA結合タンパクと複合体を作っていることも明らかとなった。

lincRNA#5欠損マウスの作製を試み、lincRNA#5の発現量はallele数と平行して変化する欠損マウスの作製に成功した。このマウスは心肥大しにくく、圧負荷に対する代償性変化が不十分であると考えられた。したがって、このlincRNA#5は心肥大における代償性変化を促進している可能性がある。

本研究は、肥大心や不全心において、タンパク質をコードしない新規長鎖非コードRNAがゲノムより転写され、同疾患において機能を有することを示している。高齢化社会に増加傾向の難治性疾患群である心不全は未だに有効な治療法が少ない。本研究結果は、この心不全の新たな機序を示すものである。

RNAは核酸医薬を用いることで治療ターゲットに比較的しやすいので、non-coding RNAを標的とした将来の臨床応用の可能性がある。すでに、霊長類にPCSK9を標的としたLocked Nucleic Acid （LNA）という安定化人工核酸を投与したところ、LDL コレステロールの低下効果も報告されている［10］。その為、lincRNA を標的とした新規治療薬開発へと繋げることも可能と考えられる。本研究も、lincRNA#5 を治療標的とした核酸医薬の可能性を示すものである。

本研究では、網羅的質量分析によるRNA結合タンパクの探索を行った。多くのRNA結合タンパク質が心肥大や心不全に関与していることを示唆するものであり、様々なタンパク質にも着目すれば、新規の心不全関連タンパク質を明らかにすることも可能であり、創薬の可能性が広がると考えられる。

これまで悪性腫瘍等における non-coding RNA の機能解析はされてきたが、生活習慣病や循環器領域の疾患でのnon-coding RNAの機能解析の研究は少ない。筋組織の疾患において、non-coding RNAが関与することを示すことは、他の循環器疾患や代謝性疾患でもnon-coding RNAが重要な機能を有する可能性を示唆するものである。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科循環器内科学の尾野亘准教授および桑原康秀助教（現、Cincinnati Children's Hospital Medical Center）である。

文　献

1） Metra M, Teerlink JR. Heart failure. Lancet. 2017;390(10106):1981-95. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31071-1. PubMed PMID: 28460827.

2） Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. Science. 2005;309(5740):1559-63. doi: 10.1126/science.1112014. PubMed PMID: 16141072.

3） Flynn RA, Chang HY. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. Cell Stem Cell. 2014;14(6):752-61. doi: 10.1016/j.stem.2014.05.014. PubMed PMID: 24905165; PubMed Central PMCID: PMCPMC4120821.

4） Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. Cancer Cell. 2016;29(4):452-63. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010. PubMed PMID: 27070700; PubMed Central PMCID: PMCPMC4831138.

5) Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. Cell. 2013;152(3):570-83. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.003. PubMed PMID: 23352431; PubMed Central PMCID: PMCPMC3563769.
6) Han P, Li W, Lin CH, Yang J, Shang C, Nuernberg ST, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. Nature. 2014;514(7520):102-6. doi: 10.1038/nature13596. PubMed PMID: 25119045; PubMed Central PMCID: PMCPMC4184960.
7) Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature. 2009;458(7235):223-7. doi: 10.1038/nature07672. PubMed PMID: 19182780; PubMed Central PMCID: PMCPMC2754849.
8) Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, et al. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. Circ Res. 2015;116(2):279-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304707. PubMed PMID: 25362209.
9) Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, et al. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. Circ Res. 2017;120(5):835-47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309528. PubMed PMID: 27920122.
10) Lindholm MW, Elmen J, Fisker N, Hansen HF, Persson R, Moller MR, et al. PCSK9 LNA antisense oligonucleotides induce sustained reduction of LDL cholesterol in nonhuman primates. Mol Ther. 2012;20(2):376-81. doi: 10.1038/mt.2011.260. PubMed PMID: 22108858; PubMed Central PMCID: PMCPMC3277239.