

**研究テーマ**

心筋機能破綻に關与する転写抑制因子 NRSF の機能制御機構の解明とそれを基盤とする  
新規心不全治療薬開発の試み

## 1、目的

申請者は転写抑制因子NRSF/RESTの心臓における機能低下が心不全における心筋胎児型遺伝子の再発現と病態の進行に重要な役割を果たしていることを明らかにし(Kuwahara, et al. *Mol Cell Biol* 2001, Kuwahara, et al., *EMBO J.* 2003)、さらにそのNRSFの活性低下機序に、心筋に多く存在するストレス応答性HDACであるクラス II HDACのNRSF転写抑制複合体からの離脱や、NRSF自身の発現量の低下が一部関与していることを報告した (Nakagawa, Kuwahara, et al., *J Mol Cell Cardiol* 2006) 以上のことから、NRSFが病的シグナルにより種々の機序により活性抑制を受けることが、病的心筋リモデリング及びそれに引き続く心不全発症・進展に重要な役割を果たしていることが考えられる。これらの研究を受け、本研究では、心筋におけるNRSFの機能・発現制御に関わる因子を探索し、その機能制御機構を明らかにすると同時に、NRSFの下流の標的遺伝子も探索し、それらの病的心筋リモデリング・心不全発症における役割を解析する。さらにこれらの知見を基に新規心不全治療標的を明らかにし、新たな心不全治療薬開発の基盤創成をめざす。

## 2、方法

①、心不全・突然死モデルマウスである優勢抑制変異型NRSF過剰発現マウスにおけるNRSF標的遺伝子の探索。

心筋におけるNRSFの機能を明らかにする目的で作製した dominant-negative NRSF transgenic mouse(dnNRSF-Tg)は心機能低下と突然死を発症する。このマウスの遺伝子発現をマイクロアレイにて解析し、心不全・突然死発症に関わる因子を解析し、新規心不全治療標的を探索する。

②、NRSF と新規相互作用する蛋白質の同定。

心臓組織などさまざまな組織由来のライブラリーを用いて NRSF の断片を bait とした yeast two-hybrid screening や、NRSF 依存性転写抑制活性を指標とする各組織由来 cDNA ライブラリーを用いた high throughput screening を行う。また tag をつけた全長 NRSF の心筋特異的過剰発現マウスを作製し、生体の心室筋において NRSF と会合する蛋白質も免疫沈降法にて検索する。

③、NRSF 依存性転写抑制を指標とした低分子化合物ライブラリーのスクリーニング。

NRSF 応答領域をプロモーター上流に挿入したレポーター遺伝子を用い、低分子化合物ライブラリーから、NRSF 依存性転写抑制が解除されるもの、あるいは逆に増強される化合物をスクリーニングする。

④、NRSF コンディショナルノックアウトマウスの作製と解析。

心筋特異的に NRSF を欠失するマウスを作製し、その表現形質の解析を通じて NRSF の心機能維持における役割を明らかにすると同時に、新規 NRSF 標的遺伝子を同定する。

### 3、結果

#### ①、心不全・突然死モデルマウスである優勢抑制変異型NRSF過剰発現マウスの解析。

dnNRSF-Tgの心臓における遺伝子発現を野生型のそれとmicro arrayにて比較検討したところ、T型カルシウムチャンネル(TCC)の発現亢進をdnNRSF-Tgに認めた。TCCは、胎児期の心筋には発現するが、生後その発現は低下し、病的心において再誘導されるイオンチャンネルであることが知られ、心機能低下や不整脈発症への関与が考えられている。我々はTCCがNRSFにより直接的に制御されている可能性を遺伝子発現領域のシーケンス解析にて明らかにした。さらにTCC再発現の病的意義をその阻害薬を用いて検討したところ、dnNRSF-Tgの突然死をTCC阻害薬が減少させる結果を得た。このことからNRSFの標的遺伝子であり、病的心で再誘導されるTCCが慢性心不全における突然死発症に関わる可能性が示され、新規心不全治療法としてのTCC阻害薬の可能性が示唆された(Kinoshita, Kuwahara, et al. *Circulation* 2009)。

#### ②、NRSFと新規相互作用する蛋白質の同定。

NRSFをbaitとしたyeast two-hybrid screeningを行い、ZFP90として知られる機能が未知の蛋白質が、NRSFの新規結合蛋白として示された。ZFP90はNRSFのDNAへの結合を阻害し、その転写抑制機能を阻害する方向に働いた。病的心におけるZFP90の発現を見たところ、その遺伝子発現は有意に亢進していた。このことから病的心におけるZFP90の発現亢進がNRSFの機能低下に関与する可能性が示唆された。

またtagをつけた全長NRSFの心筋特異的過剰発現マウス作製を試みたが、心筋特異的プロモーターによる過剰発現では生後生存可能なマウスが得られなかった。そこで現在cre-loxpシステムを用いてコンディショナルにNRSFを過剰発現するマウスを作成中である。現時点で2系統のマウスが得られ、NRSFの発現を検討しているところである。

#### ③、NRSF依存性転写抑制を指標とした低分子化合物ライブラリーのスクリーニングの開始。

NRSF依存性転写抑制を指標とした低分子化合物ライブラリーのスクリーニングの結果、数個のNRSF機能を修飾する可能性のある化合物が得られた。現在さらに詳細に検討中である。

#### ④、NRSFコンディショナルノックアウトマウスの作製と解析。

Cre-loxpシステムを用いてNRSFをコンディショナルにノックアウトすることが可能なマウスの作製に成功した。現在、心筋特異的にcreを発現するマウスと交配し、心筋特異的NRSFノックアウトマウスを作成中である。

### 4、考察

本研究によりNRSFの標的遺伝子としてTCCを明らかにし、さらにその阻害がdnNRSF-Tgの突然死を改善することを見出し、TCC阻害薬の新規突然死予防薬としての可能性を見出した。また新規NRSF結合蛋白としてZFP90を見出し、それが病的心で発現亢進していることを見出した。また直接的にNRSFの機能を修飾する低分子化合物の候補を得、さらに解析中である。このように本研究においてNRSFに関連し、新規心臓病治療標的、あるいは治療薬となる可能性のある物を同定することができた。今後もこれら研究を継続すると共に、さらにNRSF過剰発現マウスを用いた免疫沈降法やNRSFコンディショナルマウスの解析を引き続き行い、さらなる新規心不全治療標的の同定、治療法の開発に努める。

5. 発表論文、参考文献

1. Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K. p300 plays a critical role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. **Circ. Res.** 105(8):746-754. 2009.
2. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K. T-type Ca<sup>2+</sup> channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. **Circulation.** 120(9):743-752. 2009.
3. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu SI, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita J, Arai Y, Kuwahara K, Takano M. The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. **Cardiovasc Res.** 83(4):682-7. 2009.
4. Yasuno S, Usami S, Kuwahara K, Nakanishi M, Arai Y, Kinoshita H, Nakagawa Y, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Harada M, Nakao K. Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 296(6):H1804-10.2009
5. Kuratomi S, Kuratomi A, Kuwahara K, Ishii TM, Nakao K, Saito Y, Takano M. NRSF regulates the developmental and hypertrophic changes of HCN4 transcription in rat cardiac myocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 353(1):67-73.2006
6. Nakagawa Y, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Yasuno S, Adachi Y, Kawakami R, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Kinoshita H, Saito Y, Nakao K. Class II HDACs mediate CaMK-dependent signaling to NRSF in ventricular myocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 41(6):1010-1022. 2006.
7. Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, and Nakao K. NRSF regulates fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. **EMBO. J** 22(23), 6310-6321.2003.
8. Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izumi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N and Nakao K. The neuron-restrictive silencer element-neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin-1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. **Mol. Cell. Biol.** 21(6), 2085-2097. 2001.