

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月20日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08547

研究課題名(和文) 新しい肥大型心筋症病態遺伝子のシステムズ薬理学

研究課題名(英文) Systems pharmacology for discovering novel genes related to hypertrophic cardiomyopathy

研究代表者

西村 有平 (Nishimura, Yuhei)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30303720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肥大型心筋症の病態に関連する新たな遺伝子を同定することを目的として、5種類の異なる原因により発症した肥大型心筋症の網羅的遺伝子発現データを公共データベースから入手し、比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、5種類の肥大型心筋症モデルに共通して、酸化ストレスを制御するGSTK1の発現が低下していることを見出した。ゲノム編集技術を用いてgstk1ノックアウトゼブラフィッシュを作製し、心機能を解析したところ、肥大型心筋症に類似する病態が認められたことから、GSTK1の発現低下は肥大型心筋症の発症と密接に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥大型心筋症は、心筋細胞の肥大と心室拡張障害を起こす疾患であり、不整脈や心不全、運動時の失神、突然死などが生じうる。肥大型心筋症の約半数は家族性の発症を認め、心筋の収縮制御遺伝子の変異が原因となることが解明されている。一方、先天性代謝異常症やフリードライヒ失調症の原因遺伝子などの変異によっても肥大型心筋症が発症することが報告されている。本研究では、様々な原因により発症する肥大型心筋症の病態に共通するメカニズムのひとつとしてGSTK1の発現低下を見出した。今後、GSTK1の発現や機能を増加させることで肥大型心筋症の病態を改善しうることを示されれば、新たな治療法開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed comparative transcriptome analysis to identify dysregulated genes common to five mouse hypertrophic cardiomyopathy (HCM) models of differing etiology. Gene-by-gene comparison identified five genes dysregulated in all five HCM models. Glutathione S-transferase kappa 1 (Gstk1) was significantly downregulated in the five models. It has been known that GSTK1 is related to oxidative stress. The association between HCM and GSTK1, however, has not been reported. To investigate the implications of GSTK1 downregulation for cardiac function, we knocked out gstk1 in zebrafish using CRISPR/Cas9 system. In vivo imaging of zebrafish expressing a fluorescent protein in cardiomyocytes showed that gstk1 deletion significantly decreased the end diastolic volume and, to a lesser extent, end systolic volume. These results suggest that downregulation of GSTK1 may be a common mechanism underlying HCM of various etiologies, possibly through increasing oxidative stress.

研究分野：薬理学

キーワード：肥大型心筋症 トランスクリプトーム オミクス解析 データベース ゼブラフィッシュ ゲノム編集  
酸化ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症は、高血圧や弁膜症などの病気がないにもかかわらず、心筋細胞の肥大と心室拡張障害を起こす疾患である。有病率は一般人口の 1/500~1/1000 人である。自覚症状がない場合も多いが、症状を有する場合は不整脈や進行性の心不全を認める他に、運動時に失神や突然死が起きる事がある。肥大型心筋症の約半数は家族性の発症を認め、心筋の収縮を制御するサルコメア蛋白質をコードする遺伝子 ( $\alpha/\beta$  ミオシン重鎖遺伝子、トロポニン T 遺伝子、 $\alpha$ トロポミオシン遺伝子など) の変異が原因となることが明らかにされている。一方、先天性代謝異常症の原因遺伝子 ( $\alpha$  グリコシダーゼなど) や、フリードライヒ失調症の原因遺伝子フラタキシンの変異など、サルコメア蛋白質以外をコードする遺伝子によっても、肥大型心筋症が発症することが知られている。しかし、原因不明の肥大型心筋症患者も多く、病態に関しても不明な点が残されている。肥大型心筋症の病態メカニズムの解明と、新たな治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

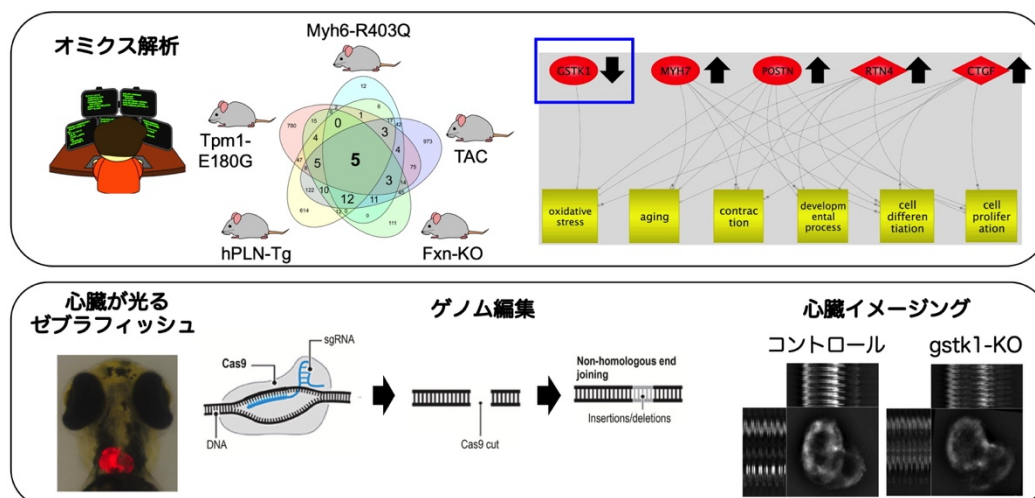
様々な原因により発症する肥大型心筋症の病態に共通するメカニズムを同定すること。

### 3. 研究の方法

公共データベースから、alpha ミオシン重鎖遺伝子変異、alpha トロポミオシン遺伝子変異、ヒト型フォスホランパン遺伝子発現、フラタキシシン遺伝子変異、または大動脈結紮による肥大型心筋症モデルマウスの心臓における網羅的遺伝子発現(トランスクリプトーム)データを手入れし、これら 5 種類のモデルに共通する遺伝子発現変化を解析した。原因の違いに関わらず、共通して発現変化が低下する遺伝子と、肥大型心筋症との関連性を解析するため、心臓に蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッシュに対して CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集を行い、遺伝子ノックアウトゼブラフィッシュを作製した。このゼブラフィッシュを用いた心臓イメージングと定量的 PCR により、遺伝子ノックアウトによる心機能の変化と、心筋収縮に制御遺伝子の発現変化を解析した。

### 4. 研究成果

比較トランスクリプトーム解析により、4 個の遺伝子の発現が、5 種類の肥大型心筋症モデルに共通して増加していることを見出した。一方、酸化ストレスを制御する Glutathione S-transferase kappa 1 (GSTK1) の遺伝子発現は 5 種類の肥大型心筋症モデルすべてにおいて低下していることを発見した。そこで gstk1 ノックアウトゼブラフィッシュを作製し、心機能を解析したところ、肥大型心筋症と同様に、心室拡張末期容積が有意に低下することを見出した。また、gstk1 ノックアウトゼブラフィッシュでは、myosin heavy chain 7 の発現が有意に増加することを見出した[1]。また、G 蛋白共役型エストロゲン受容体のノックアウトマウスも肥大型心筋症を発症すること、このマウスの心臓において Gstk1 の発現が低下することが示されている[2]。これらの結果は、GSTK1 の発現低下が肥大型心筋症の発症に密接に関与することを示唆している。今後、GSTK1 の発現や機能を増加させることで肥大型心筋症の病態を改善することを示すことができれば、新たな治療法開発につながることを期待できる。



### 参考文献

1. Sasagawa S, Nishimura Y, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Okamoto R, Ito M et al: **Downregulation of GSTK1 Is a Common Mechanism Underlying Hypertrophic Cardiomyopathy.** *Frontiers in pharmacology* 2016, 7:162.
2. Wang H, Sun X, Lin MS, Ferrario CM, Van Remmen H, Groban L: **G protein-coupled estrogen receptor (GPER) deficiency induces cardiac remodeling through oxidative stress.** *Translational research* 2018, 199:39-51.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

- 1) Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M. **Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease** *Advanced Science* 6:1801138, 2019
- 2) Tanaka K, Goto H, Nishimura Y, Kasahara K, Mizoguchi A, Inagaki M. **Tetraploidy in cancer and its possible link to aging.** *Cancer Science* 109:2632-2640, 2018
- 3) Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Mizoguchi A, Goshima N, Inagaki M. **EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase.** *Nature Communications* 9:758, 2018
- 4) Nishimura Y, Tagawa M, Ito H, Tsuruma K, Hara H. **Overcoming Obstacles to Drug Repositioning in Japan.** *Frontiers in pharmacology* 8:729, 2017
- 5) Ashikawa Y, Nishimura Y, Okabe S, Sato Y, Yuge M, Tada T, Miyao H, Murakami S, Kawaguchi K, Sasagawa S, Shimada Y, Tanaka T. **Potential protective function of the sterol regulatory element binding factor 1-fatty acid desaturase 1/2 axis in early-stage age-related macular degeneration.** *Heliyon* 3:e00266, 2017
- 6) Nishimura Y, Hara H. **Integrated Approaches to Drug Discovery for Oxidative Stress-Related Retinal Diseases.** *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016:2370252, 2016
- 7) Ashikawa Y, Nishimura Y, Okabe S, Sasagawa S, Murakami S, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Tanaka T. **Activation of Sterol Regulatory Element Binding Factors by Fenofibrate and Gemfibrozil Stimulates Myelination in Zebrafish.** *Frontiers in pharmacology* 7:206, 2016
- 8) Sasagawa S, Nishimura Y, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Okamoto R, Ito M, Tanaka T. **Downregulation of GSTK1 Is a Common Mechanism Underlying Hypertrophic Cardiomyopathy.** *Frontiers in pharmacology* 7:162, 2016
- 9) Sasagawa S, Nishimura Y, Sawada H, Zhang E, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Mitani Y, Maruyama K, Tanaka T. **Comparative Transcriptome Analysis Identifies CCDC80 as a Novel Gene Associated with Pulmonary Arterial Hypertension.** *Frontiers in pharmacology* 7:142, 2016
- 10) Kawase R, Nishimura Y, Ashikawa Y, Sasagawa S, Murakami S, Yuge M, Okabe S, Kawaguchi K, Yamamoto H, Moriyuki K, Yamane S, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, Tanaka T. **EP300 Protects from Light-Induced Retinopathy in Zebrafish.** *Frontiers in pharmacology* 7:126, 2016
- 11) Sasagawa S, Nishimura Y, Hayakawa Y, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Okabe S, Kawaguchi K, Kawase R, Tanaka T. **E2F4 Promotes Neuronal Regeneration and Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Zebrafish.** *Frontiers in pharmacology* 7:119, 2016

〔学会発表〕 (計 23 件)

- 1) Yuhei Nishimura  
Target discovery using omics and zebrafish  
The 22nd Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology 2019年3月16日
- 2) 西村有平  
公共オミクスデータベースの統合的解析を基盤とする創薬研究  
第92回日本薬理学会年会 2019年3月15日
- 3) 西村有平, 澤田博文, 三谷義英, 大下裕法, 平山雅浩, 丸山一男  
オミクスデータを利用した肺高血圧症の病態メカニズム解析  
第92回日本薬理学会年会 2019年3月14日

- 4) 西村有平、澤田博文、三谷義英、大下裕法、平山雅浩、丸山一男  
オミクス解析を用いた肺高血圧症の新規病態メカニズム解明  
第48回日本心脈管作動物質学会年会 2019年2月8日
- 5) 西村有平、笠原広介、青木啓将、清野透、王淑杰、弓削瑞葵、白水崇、田中利男、溝口明、  
五島直樹、稲垣昌樹  
新規嚢胞性腎疾患モデルゼブラフィッシュの開発  
第28回日本循環薬理学会 2018年12月7日
- 6) 西村有平、澤田博文、三谷義英、大下裕法、平山雅浩、丸山一男  
オミクス解析による肺高血圧症の新規治療標的探索  
第134回日本薬理学会近畿部会 2018年11月23日
- 7) 西村有平、笠原広介、青木啓将、清野透、王淑杰、弓削瑞葵、白水崇、田中利男、溝口明、  
五島直樹、稲垣昌樹  
新規線毛症モデルゼブラフィッシュの作出  
第4回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 2018年11月20日
- 8) 西村有平  
ゼブラフィッシュとビッグデータを活用した創薬研究を目指して  
第3回黒潮カンファレンス 2018年10月13日
- 9) 西村有平  
ゼブラフィッシュを用いた発達神経毒性評価  
第58回日本先天異常学会 2018年7月28日
- 10) 西村有平  
胎児毒性評価. 特に胎児致死と形態形成異常誘発用量の判断  
第58回日本先天異常学会 2018年7月27日
- 11) Yuhei Nishimura, Shiko Okabe, Mizuki Yuge, Tomoko Tada, and Yumi Sato  
Pharmacology Education and Outreach using a Web-based Simulation  
18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) 2018年7月3日
- 12) 西村有平、鈴木祐矢、岡部志功、柿本彰、中谷中  
リアルワールドデータを用いた薬効評価因子の探索  
第133回日本薬理学会近畿部会 2018年6月1日
- 13) 西村有平、澤田博文、田中利男、三谷義英、丸山一男  
トランスクリプトームを利用した肺高血圧の病態解析  
第47回日本心脈管作動物質学会年会シンポジウム 2018年2月9日 長崎大学
- 14) 西村有平、澤田博文、淀谷典子、三谷義英、丸山一男  
肺高血圧モデルの比較トランスクリプトーム解析  
第47回日本心脈管作動物質学会年会 2018年2月9日 長崎大学
- 15) 西村有平、岡部志功、鈴木祐矢、柿本彰、豊島侑、中谷中  
時系列検査データと薬物代謝関連遺伝子多型の統合解析による sitagliptin の薬効影響因子  
の探索  
第132回日本薬理学会近畿部会 2017年11月24日 千里ライフサイエンスセンター
- 16) 西村有平、芦川芳史、弓削瑞葵、笹川翔太、白水崇、島田康人、田中利男  
ゼブラフィッシュを用いた網膜疾患創薬研究

- 17) 西村有平  
SIDS のオミックス解析  
第23回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会 2017年3月18日 アスト津
- 18) 西村有平  
公共データを用いたドラッグリポジショニングによる神経保護薬探索  
第90回日本薬理学会年会 ワークショップ 2017年3月17日 長崎新聞文化ホール
- 19) 西村有平、笹川翔太、澤田博文、張尔泉、岡部志功、村上宗一郎、芦川芳史、弓削瑞葵、川口幸輝、多田智子、佐藤由美、宮尾遼、島田康人、三谷義英、丸山一男、田中利男  
肺高血圧症の新規関連遺伝子 CCDC80 の発見と機能解析  
第46回日本心臓血管作動物質学会年会 2017年2月10日 琉球大学
- 20) 西村有平、笹川翔太、岡部志功、村上宗一郎、芦川芳史、弓削瑞葵、川口幸輝、島田康人、岡本隆二、伊藤正明、田中利男  
肥大型心筋症の新規関連遺伝子 GSTK1 の発見と機能解析  
第26回日本循環薬理学会 2016年12月2日 信州大学
- 21) Nishimura Y, Okabe S, Sasagawa S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Shimada Y, Tanaka T.  
Pharmacological profiling of zebrafish sleep-awake states  
Society for Neuroscience, 2016 Annual Meeting 2016年11月12日 San Diego
- 22) 西村有平、笹川翔太、早川友香、村上宗一郎、芦川芳史、弓削瑞葵、岡部志功、川口幸輝、島田康人、田中利男  
脊髄損傷モデルゼブラフィッシュの作製と機能解析  
第2回ゼブラフィッシュ創薬研究会 2016年11月4日 みんなの森 ぎふメディアコスモ
- 23) Nishimura Y, Ashikawa A, Sasagawa S, Murakami S, Yuge M, Sato Y, Tada T, Okabe S, Kawaguchi K, Shimada Y, Tanaka T  
Development of in vivo fluorescent imaging of neuronal differentiation in zebrafish for developmental neurotoxicity testing  
ICCA-LRI and NIHS Workshop 2016年6月14日 淡路夢舞台

[図書] (計 2 件)

**1) Drug Repositioning: Current Advances and Future Perspectives**

Edited by: Yuhei Nishimura, Hideaki Hara

Frontiers Media SA, 2019, ISBN:9782889456963, 153 (p5-7, p146-151)

**2) Oxidative Stress in Retinal Diseases**

Guest Editors: Yuhei Nishimura, Hideaki Hara, Mineo Kondo, Samin Hong, and Takeshi Matsugi

Hindawi, 2017, 95 (p7-8, p79-87)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://mie-integrative-pharm.tumblr.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 利男  
ローマ字氏名：(Tanaka, Toshio)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：大学院医学系研究科  
職名：産学官連携講座大学教員  
研究者番号 (8 桁)：00135443

研究分担者氏名：川瀬 玲子  
ローマ字氏名：(Kawase, Reiko)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学部  
職名：技術補佐員  
研究者番号 (8 桁)：50746740