

心筋細胞核をターゲットとした新しい心不全治療の可能性

森本達也¹⁾ 砂川陽一¹⁾ 川村晃久¹⁾ 高谷智英^{1,3)} 和田啓道¹⁾ 宮本昌一¹⁾
 長澤 淳⁴⁾ 米田正始⁴⁾ 藤田正俊⁵⁾ 島津 章²⁾ 北 徹³⁾ 長谷川浩二¹⁾

要旨 我々は、心不全発症における遺伝子発現調節にヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を持つ転写コアクチベーター p300 が中心的な役割を果たしていることを見出した。さらに、HAT 活性の欠損した p300 を心臓に過剰発現するマウスでは心筋梗塞後のリモデリング促進が起こらないことを示した。これらの事実は、p300 HAT 活性が心不全治療薬の標的となることを示唆する。最近、天然物ウコンの成分であるクルクミンが p300 の特異的アセチル化阻害作用を持つということが明らかになった。そこで、クルクミンの p300 抑制作用を用いて、心筋細胞肥大を抑制できないかを検討した。まず、ラット初代新生児培養心筋細胞に、フェニレフリン刺激にて心筋細胞肥大を誘導する系にクルクミンを投与しその効果をみたところ、心筋細胞径の増大など心筋細胞肥大反応を抑制し、ANF や β -MHC などのプロモーターの転写活性の亢進を有意に抑制した。さらに、クルクミンはフェニレフリンによる GATA4 のアセチル化や DNA 結合能を抑制した。次に、クルクミンが心不全の進行を抑制するかどうかを検討するために、2 つの心不全モデル (高血圧性心不全ラットおよび心筋梗塞ラット) に対する心不全進行抑制効果の有無の検討を行った。心エコーによる観察により、両モデルにおいても、クルクミンは心不全進行にともなう心筋収縮力の低下を抑制した。心筋壁の肥厚や個々の心筋細胞肥大も抑制した。心不全では心筋組織内の BNP の mRNA および血漿 BNP レベルが亢進するが、クルクミンはこれらを有意に抑制した。また、免疫沈降-ウエスタンブロットにて検討をしたところ、心不全心筋では、p300 による GATA4 のアセチル化ならびに GATA4 と p300 の結合能の亢進が認められたが、クルクミンはこれらを抑制した。p300 HAT 活性が心不全治療薬の標的となることを示唆され、クルクミンが心不全治療に用いられることが期待される。

1) 国立病院機構京都医療センター展開医療研究部

2) 国立病院機構京都医療センター臨床研究センター

3) 京都大学大学院医学研究科循環器科

4) 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科

5) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

A Novel heart failure therapy through inhibition of myocardial nuclear acetylation

Tatsuya Morimoto¹⁾, Yoichi Sunagawa¹⁾, Teruhisa Kawamura¹⁾, Tomohide Takaya^{1,3)}, Hiromichi Wada¹⁾, Shoichi Miyamoto¹⁾, Atsushi Nagasawa⁵⁾, Masashi Komeda⁵⁾, Masatoshi Fujita⁴⁾, Akira Shimatsu²⁾, Toru Kita³⁾, Koji Hasegawa¹⁾

1) Division of Translational Research, Kyoto Medical Center, National Hospital Organization

2) Clinical Research Institute, Kyoto Medical Center, National Hospital Organization

3) Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University

4) Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

5) Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Abstract Signals activated by increased hemodynamic overload to the heart finally reach nuclei of cardiac myocytes, change patterns of gene expression and cause their maladaptive hypertrophy. Nuclear acetylation controlled by histone deacetylases and an intrinsic histone acetyltransferase (HAT), p300, is a critical event during this process. However, a pharmacological heart failure therapy that targets this nuclear pathway has yet to be established. A natural compound curcumin inhibited hypertrophy-induced acetylation of GATA4, one of hypertrophy-responsive transcription factors, and its DNA binding in cardiac myocytes. Curcumin also disrupted p300/GATA4 complex and repressed agonist- and p300-induced hypertrophic responses in these cells. The acetylated form of GATA4 and p300/GATA4 complex markedly increased in hypertensive hearts *in vivo*. Then we examined the effects of curcumin in 2 different heart failure models *in vivo*: one model was hypertensive heart disease in salt-sensitive Dahl rats, and the other model was myocardial infarction in rats. In both models, curcumin prevented deterioration of systolic function as well as increase in wall thickness and hypertrophy of each myocyte. Thus, inhibition of p300 HAT activity by a non-toxic dietary compound, curcumin, will provide a novel therapeutic strategy for heart failure in humans.

● Key words : heart failure, Histone Acetyltransferases : HAT, p300, curcumin

はじめに

様々な心疾患の最終像である心不全は、心収縮障害がその病態形成において第一義的であることは疑う余地がない。しかし、この心収縮不全を是正する目的で開発された強心薬が必ずしも心疾患の生命予後を改善しないことが明らかになってきた。このため、既成概念にとらわれない従来とは異なった新しい視点でこの病態を解明する必要がある。これまでの研究によると、生体において何らかのストレスが心臓に加わると、交感神経系、レニン・アンジオテンシン系、エンドセリン系などの神経・体液・内分泌因子が作動することが明らかとなってきた。これらの因子は心筋細胞膜に存在するそれぞれの受容体に結合し、種々の細胞質内情報伝達を経て刺激は最終的に心筋細胞核に到達する。そして核内において何らかの転写調節因子が活性化されることにより、心筋細胞は心筋ミオシンアイソフォーム遺伝子のスイッチングなど成人型から胎児型へと遺伝子発現パターンを変化させる。これらの変化は種々の因子によって引き起こされる心筋細胞肥大に共通の変化であり、また、心筋機能不全と密接に結びついていることから、この核内情報伝達機構の詳細な解明は心不全の分子細胞レベルでの解明に非常に有用である。

心臓リモデリングを引き起こすシグナル伝達路は複雑で多数存在するため、心不全の治療のためには、シグナルの上流をターゲットとするよりも、共通の下流の核内経路シグナルをターゲットとした方がより効果的な治療になりうるのではないかと、多くの研究がなされてきた。最近の研究では、心臓の遺伝子発現のストレス反応調節因子として、ヒストンアセチル化を制御する酵素の重要性が指摘されている。ヒストンアセチル化などのクロマチンリモデリング因子は、心臓リモデリングを制御する遺伝子プログラム

へ至る複雑な上流シグナルと密接に結びつく核内調節因子としての役割を担っており、これらの因子が心不全の薬物治療の新しいターゲットとなりうると期待されている。

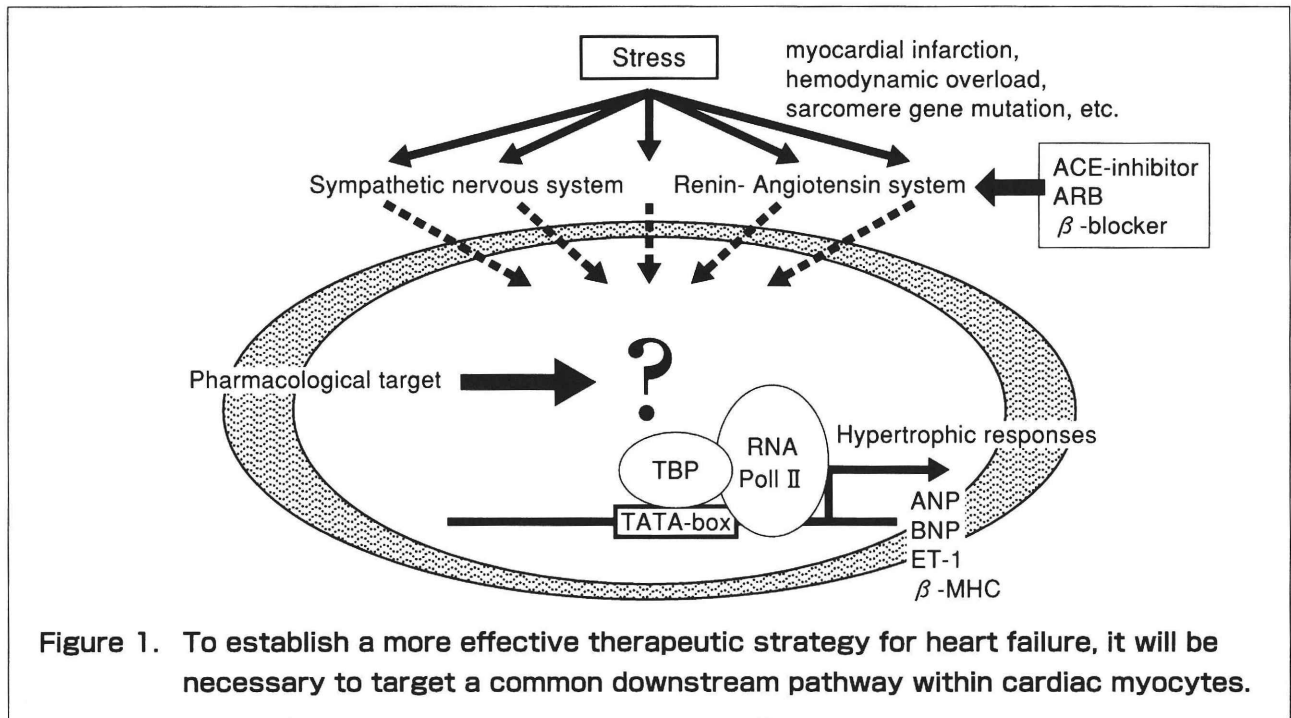
本稿では最近注目を浴びている、心筋細胞核内のアセチル化と心筋細胞リモデリングの関係ならびに、そこをターゲットとした新しい心不全治療の可能性について概説する。

I 心筋細胞核における共通経路の解明

(Figure 1)

生体において心筋梗塞などのストレスが心臓にかかる、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の神経体液因子が作動し、心筋細胞肥大や心不全の発症、進行に関与することはよく知られている。そこで心不全は今まで、 β 遮断薬、ACE（アンジオテンシン変換酵素）阻害薬やARB（アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬）などの細胞表面近くやシグナル伝達経路の上流をブロックする薬物で治療されてきた。これらの薬物による治療では、短期予後の改善を認めるが、重症心不全患者の5年生存率は50%を下回っている。

これらの因子は細胞表面の受容体を介して、種々の細胞質内情報伝達を経て最終的に心筋細胞核に到達し、転写調節因子により遺伝子発現パターンが変化する。心不全の発症においては種々の遺伝子発現が変化することが報告されている。 β ミオシン重鎖遺伝子や心房性利尿ペプチドの心室における発現亢進は古くから知られている。また、心筋エンドセリン-1 (ET-1) の発現亢進は心不全発症に重要な役割を果たしている。さらに、心不全においては脂肪酸代謝が低下し、それに関与する酵素群の遺伝子発現が低下することも明らかになってきた。これらの変化は主に転写レベルで調節されており、その転写調節機構を



解明することは心不全の発症機構解明に有用である。肥大反応刺激により、心筋特異的転写因子はそのタンパク質レベルでの増加により活性化されるのではなく、リン酸化やアセチル化による翻訳後調節により活性化されることが報告されている^{1,2)}。最近の研究では、心臓の遺伝子発現のストレス反応調節因子として、ヒストンアセチル化を制御する酵素の重要性が指摘されている。ヒストンアセチル化などのクロマチンリモデリング因子は、心臓リモデリングを制御する遺伝子プログラムへ至る複雑な上流シグナルと密接に結びつく核内調節因子としての役割を担っており、これらの因子が心不全の薬物治療の新しいターゲットになりうると期待されている。

II HATは心不全治療のターゲットとなりうるか？

心筋梗塞後の左室心筋細胞において核の過剰なアセチル化が認められることから、我々は、ヒスト

ンアセチル化酵素 (Histone Acetyltransferases: HAT) 活性が心不全発症に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そして、心不全発症における遺伝子発現調節にHAT活性を持つ転写コアクチベーターp300とGATA転写因子群の協力 (p300/GATA経路) が中心的な役割を果たしていることを見出した^{1,2)}。すなわち、p300やCBPを心筋細胞に過剰発現させると、HAT活性依存的に心筋細胞肥大を誘導するが、p300のドミナントネガティブ体は、肥大刺激による心筋細胞肥大をブロックする。さらに、我々はp300を心臓に過剰発現するマウスを作成したところ、心臓は肥大し、心不全を呈した²⁾。この過程において、ヒストンのアセチル化が亢進しているだけでなく、心筋特異的転写因子GATA4のアセチル化が亢進し、そのターゲット遺伝子であるET-1などのプロモーターとの結合能が亢進していることがわかった。

また、このトランスジェニックマウスでは心筋梗塞後の心臓のリモデリングが著明に亢進す

るが、HAT活性を消失させた変異体p300を心臓の過剰発現するマウスでは、このリモデリングの亢進が野生型マウスと同程度まで抑制された³⁾。このリモデリングの過程でストレスの増大した残存心筋細胞のGATA4のアセチル化やDNA結合能が亢進するが、正常なp300を過剰発現するマウスでは、これらが著明に亢進した。しかしながら、変異体p300を心臓に過剰発現するマウスでは、これらは正常マウスとほぼ同程度にまで抑制されていた。以上のデータより、心筋特異的転写因子GATA4のアセチル化を阻害することが、心筋梗塞後のリモデリングの進展を抑制することがわかり、心臓におけるp300のHAT活性は心不全治療のターゲットとなる可能性が示唆された (Figure 2)。

ここ数年来、HAT活性を抑制する薬物がいくつか報告されている (Figure 3)。最初にHATを抑制する薬物として合成された阻害薬はLys-CoAとH3-CoA-20がある。Lys-CoAはp300の、H3-CoA-20はPCAFをそれぞれ特異的に阻害す

る薬物であるが、細胞内に浸透することができない⁴⁾。次に天然物からHAT阻害薬が精製され報告されている。カシューナッツからAnacardic acid⁵⁾、さらにGarcinia indicaからGarcinol⁶⁾がそれぞれ精製された。これらは細胞内に浸透することができるが、p300/CBPやPCAFなどHATのすべてを阻害する非特異的な阻害薬である。p300以外のHATの心臓での役割が明らかでなく、非特異的阻害剤の心肥大、心不全における治療薬としての可能性は不明である。最近、健康食品として注目を浴びているウコンの主成分であるクルクミンがp300の特異的阻害薬であることが報告された⁷⁾。クルクミンは古くからインドではカレーに用いる香辛料・着色料として、中国では漢方として用いられ、米国では安全な着色物として認可されている。我が国でも、健康食品やカレーだけでなく、古くからマスタード、たくあん漬や和菓子に用いられている。この安価で安全性が確認された天然物を用いた心不全治療が行えないかを検討した。

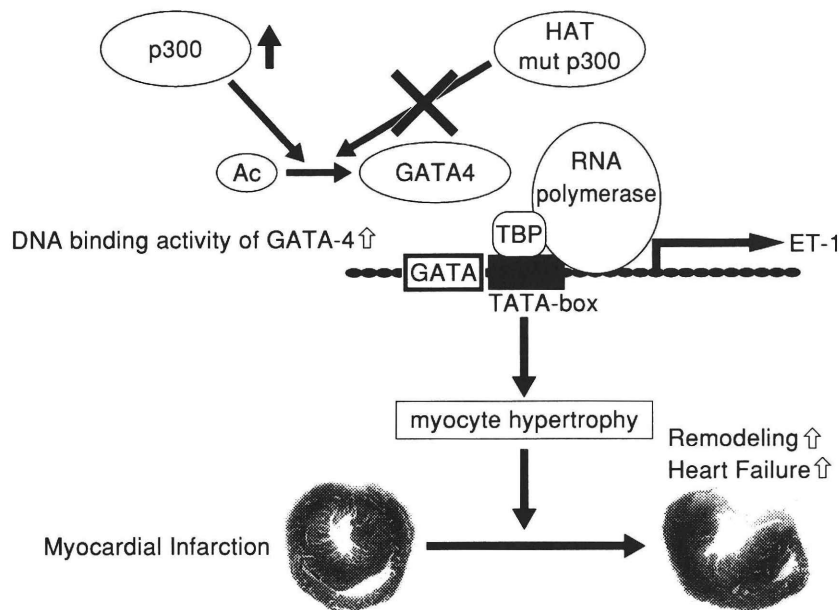


Figure 2. The nuclear acetylation by p300 is a critical event during myocardial cell hypertrophy and heart failure

Ⅲ p300のHAT特異的阻害作用をもつ クルクミンによる心不全治療の可能性

(1) クルクミンは培養心筋細胞における 心筋細胞肥大を抑制した。⁸⁾

クルクミンはフェニレフリンによる心筋細胞径の増大など心筋細胞肥大反応を抑制し (Figure 4)、ANF や β -MHC などのプロモーターのフェニレフリンによる転写活性の亢進を有意に抑制した。また、p300過剰発現による心筋細胞径の増大も抑制し、p300 による ANF や β -MHC などのプロモーターの転写活性の亢進を有意に抑制した。さらに、クルクミンはフェニレフリンによる心筋転写因子 GATA-4 のアセチル化および

GATA-4とp300の結合や DNA 結合能を抑制した。また、フェニレフリンによる核やヒストンのアセチル化の亢進も抑制した。以上より、クルクミンが p300 の HAT 活性を抑制し、心筋細胞肥大を抑制することが示された。

(2) クルクミンは心不全ラットモデルでの 心不全進行を抑制した。⁸⁾

高血圧性心不全モデルである、食塩感受性ダールラットにクルクミンを代償性肥大期より7週間、毎日経口投与した。クルクミンの投与量として過去にクルクミンがラットやマウスに投与された論文を参考にして、低濃度 (50mg/kg/日) と高濃度 (200mg/kg/日) を設定した。結果、生存曲線は低濃度 (50mg/kg/日) と高濃度 (200mg/kg/日) でクルクミンの効果が同等であったことから、以下、低濃度 (50mg/kg/日) にて行った実験結果を示す。心不全期での生存率がコントロール群44%に対して、クルクミン群76%と有意に改善した。さらに、心エコー検査にて、心収縮力の指標である左室短縮率 (Fractional shortening: FS)

	p300/CBP Specificity	Cell permeability	References
Lys-CoA	○	×	4)
H3-CoA-20	×	×	4)
Anacardic acid	×	○	5)
Garcinol	×	○	6)
Curcumin	○	○	7)

Figure 3. Histone acetyltransferase (HAT) inhibitors

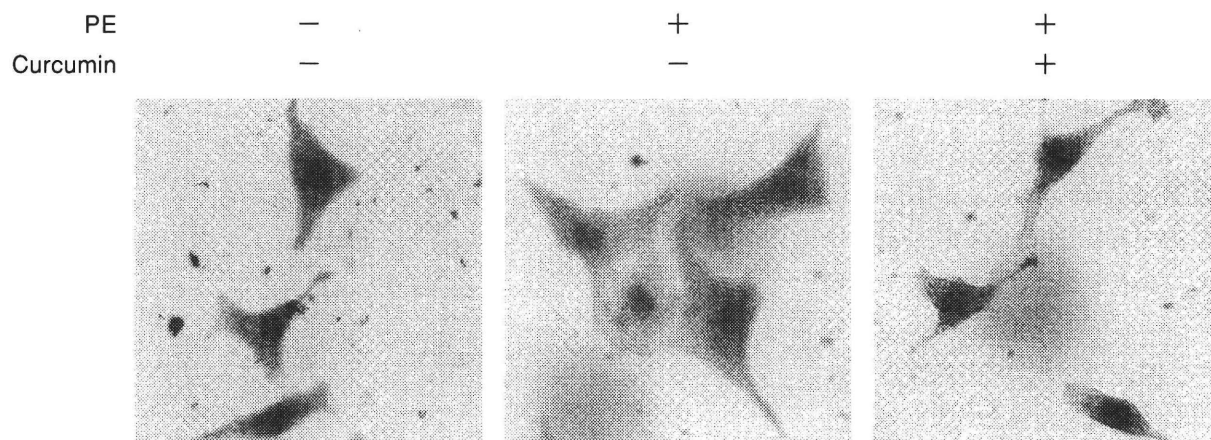


Figure 4. Curcumin represses hypertrophic responses in cardiac myocytes

が、コントロール群 $30.8 \pm 3.0\%$ に対して、クルクミン投与群 $48.6 \pm 6.6\%$ と有意にクルクミン群で低下が抑制された。さらに、18週齢のDSラットでは、血圧正常のコントロールのDRラットに比べて心室壁の肥厚が認められたが、クルクミンの投与によりその肥大は抑制された。個々の心筋細胞の径も18週齢のDSラットでは増大するが、クルクミンの投与により抑制された。心不全のマーカーであるBNPの心室でのmRNAレベルおよび血漿レベルを検討したところ、18週齢のDRラットに比べてDSラットでは増大するが、それらはクルクミンによって有意に抑制された。さらに、18週齢のDSラットではGATA-4やGAPDHの蛋白レベルは変化しないが、p300の蛋白レベルは亢進した。また、GATA-4のアセチル化やGATA-4とp300の結合も亢進したが、これらはクルクミンにて抑制された。

ラット心筋梗塞モデルにおいても、同様のクルクミン投与が心筋梗塞後の心機能を著明に改善することも確認した。すなわち、ラット心筋梗塞モデルにおいても、FSがコントロール群 $14.7 \pm 0.7\%$ に対して、クルクミン投与群 $29.8 \pm 1.0\%$ と有意にクルクミン群で低下が抑制された。さらに、心筋梗塞ラットではシャム手術群に比べて心室壁の肥厚が認められたが、クルクミンの投与によりその肥大は抑制され、個々の心筋細胞の径も心筋梗塞ラットでは増大するが、クルクミンの投与により抑制された。また、心筋梗塞ラットの心臓ではGATA-4のアセチル化も亢進したが、これらはクルクミンにて抑制された。

IV 最後に

ヒストンアセチルトランスフェラーゼによるヒストンあるいは転写因子のアセチル化が心筋細胞肥大、さらには心筋リモデリング、心不全の発症、進展に関与していることが明かとなって

きた。逆に、ヒストンの脱アセチル化がクロマチンの凝集と転写抑制により心筋細胞肥大を抑制する。生理的な肥大はストレスに対する心臓の代償のメカニズムであるが、限界を超えたストレスはこの適応力を破綻させ、非代償性心不全へと移行する。すなわち、アセチル化と脱アセチル化のバランスのよい制御が、急性、あるいは慢性のストレスに反応して心筋肥大とその遺伝子発現コントロールのキープポイントであると考えられる。

心筋細胞核内遺伝子の発現と機能のコントロールを目的とした「転写制御をターゲットとした治療戦略」は究極の新しい治療法になると考える。天然物ウコンの成分であるクルクミンが培養心筋細胞で心筋細胞肥大を抑制し、高血圧性心疾患および心筋梗塞ラットの心不全発症を抑制することが示された。安価で安全性の確認された生薬を用いた心不全治療の可能性が示された。

■参考文献

- 1) Kakita T, et al : p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene. J Biol Chem 274 : 34096-34102, 1999
- 2) Yanazume T, Morimoto T, Kawamura T, et al : Cardiac p300 Is Involved in Myocyte Growth with Decompensated Heart Failure. Mol Cell Biol 23 (10) : 3593-3606, 2003
- 3) Miyamoto S, et al : Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling following myocardial infarction in adult mice *in vivo*. Circulation 113 (5) : 679-690, 2006
- 4) Lau OD, et al : HATs off : selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. Mol Cell 5 : 589-595, 2000
- 5) Balasubramanyam K, et al : Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. J Biol Chem 278 : 19134-19140, 2003
- 6) Balasubramanyam K, et al : Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. J Biol Chem 279 : 33716-33726, 2004
- 7) Balasubramanyam, K, et al : Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. J Biol Chem 279 (49) : 51163-51171, 2004
- 8) Morimoto T, et al : Curcumin, an inhibitor of p300 histone acetyltransferase activity, prevents the development of heart failure. J Clin Invest, in press