

研究助成 2018 – 生活習慣病領域 – 研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学
氏 名	星野 温
研 究 テーマ	多面的 CRISPR スクリーニングによる心臓線維化の包括的解明と治療応用

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は 1 ページにまとめること。（図表、写真などの添付を含む）

本研究ではこれまでに線維芽細胞の活性化に着目し、その分子基盤の網羅的解明のため、活性化セレクトームの中心である結合織成長因子（CTGF）をリードアウトに CRISPR ライブラリによる順遺伝学スクリーニングを行った。マウスの間葉系前駆細胞を用いて CRISPR で CTGF-GFP ノックインレポーター細胞を作製し、TGFβ 投与後の CTGF の発現の高い細胞群と、低い細胞群を回収し、比較解析（MAGeCK）を行った（図 1）。まず陽性コントロールである Smad2, 3, 4 や TGFβR が上位となり、スクリーニングがうまく機能していることが確認でき、さらに新規の制御系として、(1) Keap1-NRF2 経路、(2) FLCN-TFEB/3 経路を見出した（図 1）。よりインパクトの強い Keap1-NRF2 経路に注目してさらに検討を行ったところ、この経路は CTGF 以外の αSMA, Fibronectin 等の線維化関連遺伝子の発現調節も行っており、さらに CTGF ノックアウトでは αSMA や Fibronectin の発現に変化を認めなかったため、抗線維化において Keap1 は CTGF よりインパクトのある治療標的であることが示唆された（図 2）。また、ChIP-qPCR から直接プロモーター領域に結合し転写制御を行っていることが分かった。

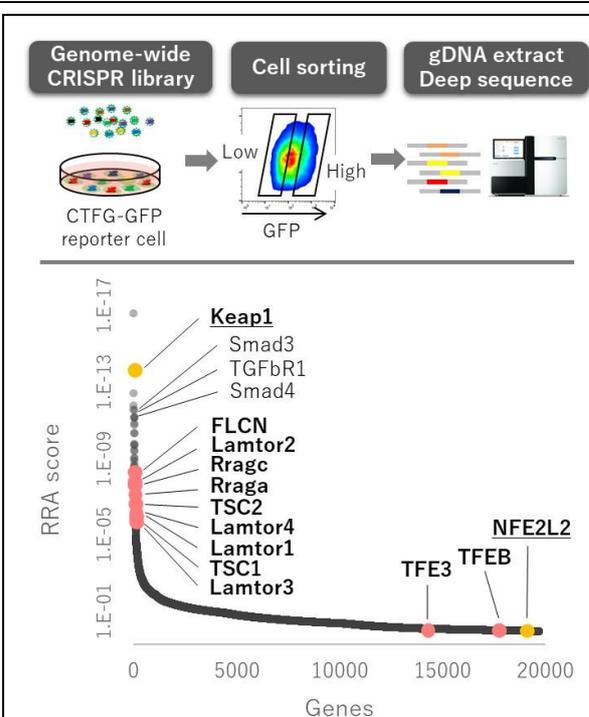


図 1. CTGF に対する CRISPR スクリーニング

今後は①TGFβなどの線維化刺激時における Keap1-NRF2 経路の病理学的意義、②転写因子 NRF2 の解析として Cut&Tag で網羅的な結合領域の解析を、また BioID による転写複合体の解析、③Keap1 ノックアウトマウスにおける抗線維化・臓器保護効果の確認、④Keap1 を標的としたペプチド中分子創薬、の 4 点に取り組むことで、抗線維化の最も効果的な制御機構の新規分子基盤を明らかにし、それに基づく治療薬の開発をめざす。

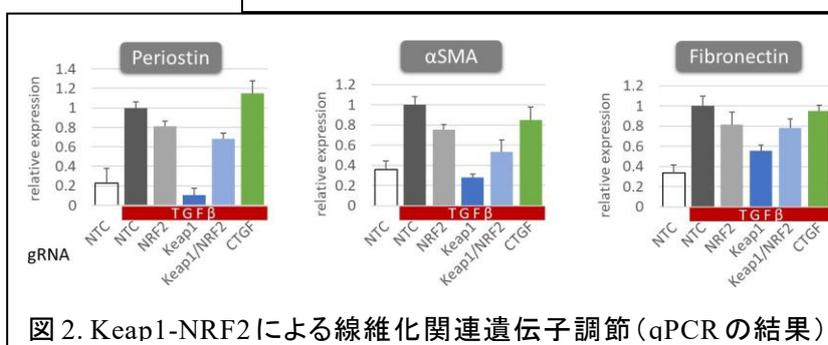


図 2. Keap1-NRF2 による線維化関連遺伝子調節（qPCR の結果）

の病理学的意義、②転写因子 NRF2 の解析として Cut&Tag で網羅的な結合領域の解析を、また BioID による転写複合体の解析、③Keap1 ノックアウトマウスにおける抗線維化・臓器保護効果の確認、④Keap1 を標的としたペプチド中分子創薬、の 4 点に取り組むことで、抗線維化の最も効果的な制御機構の新規分子基盤を明らかにし、それに基づく治療薬の開発をめざす。

研究助成 2018 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学
氏	名	星野 温

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Kirita Y, Ohgitani E, Mazda O, Yaoi T, Motooka D, Nakamura S, Matsuura Y, Matoba S, Okamoto T*, Takagi J*, <u>Hoshino A</u> *. High affinity modified ACE2 receptors prevent SARS-CoV-2 infection. bioRxiv 2020 Sep 16; 2020.09.16.299891. doi: 10.1101/2020.09.16.299891. 査読なし
2	<u>Hoshino A</u> , Wang WJ, Wada S, McDermott-Roe C, Evans CS, Gosis B, Morley MP, Rathi KS, Li J, Li K, Yang S, McMannus MJ, Bowman C, Potluri P, Levin M, Damrauer S, Wallace DC, Holzbaur ELF, Arany Z. The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange. Nature 2019;575(7782):375-379. 査読あり
3	Okawa Y, <u>Hoshino A</u> , Ariyoshi M, Kaimoto S, Tateishi S, Ono K, Uchihashi M, Iwai-Kanai E, Matoba S. Ablation of Cardiac TIGAR Preserves Myocardial Energetics and Cardiac Function in the Pressure Overload Heart Failure Model. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019 Jun 1;316(6):H1366-H1377. 査読あり
4	Chen L, Zhang Z, <u>Hoshino A</u> , Zheng HD, Morley M, Arany Z, Rabinowitz JD. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. Nat Metab. 2019 Mar;1:404-415. Epub 2019 Mar 11. 査読あり

様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2020/9	BCVR2020. Toshiyuki Nishiji, Shunta Taminishi, Atsushi Hoshino, Satoaki Matoba. Genome-wide CRISPR screen identifies Keap1-NRF2 pathway as a crucial regulator for fibrosis.
2	2020/7	BCVS2020. Toshiyuki Nishiji, Shunta Taminishi, Atsushi Hoshino, Satoaki Matoba. Genome-wide CRISPR screen identifies Keap1-NRF2 pathway as a crucial regulator for fibrosis.
3	2019/9	BCVR2019. Toshiyuki Nishiji, Shunta Taminishi, Atsushi Hoshino, Satoaki Matoba. Genome-wide CRISPR screen to identify genes involved in fibrosis
4		
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		