

第 9 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <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、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
(図表、写真などの貼付を含む)

現在の高齢化社会では心臓の収縮力が低下した心不全（HF_rEF）に加え、心臓線維化を主体とした収縮能は維持されているが拡張能が低下した心不全（HF_pEF）が大きな問題となっている。また線維化は肝硬変、肺線維症、慢性腎不全等、多くの疾患背景となり、また CAR-T 等の癌免疫治療においても固形癌では腫瘍周囲の線維化が免疫細胞の浸潤を妨げることが問題となっている。しかし、現在この線維化に対する有効な治療方法は確立されておらずアンメット・メディガール・ニーズであり、新たな治療介入起点の解明が求められている。簡略化すると線維化は免疫細胞からのサイトカインにより線維芽細胞が活性化し、細胞外基質成分の産生が亢進する病態である。

そこで、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、活性化セクレトームの中心である CTGF（結合織成長因子）を指標にゲノムワイド CRISPR ライブラリによる順遺伝学スクリーニングを行った。マウス間葉系前駆細胞で CTGF-2A-GFP ノックイン細胞を作製し、TGFβ投与後の CTGF の発現の高い細胞群と、低い細胞群を GFP を指標に回収し比較解析を行ったところ、陽性コントロールである Smad2, 3, 4 や TGFβR が上位となり、スクリーニングの精度が高いことが確認できた。また MAPK 経路では活性化と抑制性の両経路が存在し、複雑な制御系を形成している事が分かった。関連がよく知られる TNF（腫瘍壊死因子）シグナルや、Smad 経路に関してクロストークが報告されている Notch シグナルも各因子がヒットしており重要な制御経路であることが分かる。さらに新規制御系として、Keap1-NRF2 経路が同定された。

Keap1-NRF2 経路は酸化ストレスや毒物刺激により活性化し、抗酸化、解毒関連の遺伝子発現を亢進させる。NRF2 が転写因子で通常状態では E3 リガーゼである Keap1 によりユビキチン化されプロテアソームで分解されるが、そこにストレス刺激が加わると、NRF2 は Keap1 から外れて核へ移行し転写因子としてはたらく。Keap1 がトップヒット遺伝子の 1 つで、さらに E1 の Uba3, E2 の Ube2m がヒットしており、Keap1-NRF2 経路の重要性が示唆された。

Keap1-NRF2 の抗線維化制御のメカニズムとしては Cut&Run の解析から NRF2 が線維化関連遺伝子のプロモーター領域に直接結合しており、よく知られている抗酸化作用による 2 次的な調節でなく、直接的な転写制御であることが分かった。さらに BioID により転写複合体解析を行ったところ、コリプレッサーである DDX54 と協調することで転写抑制していることが示唆された。

病態モデル動物での評価は新たに Keap1-flox マウスを作製し Postn-MerCreMer マウスを掛け合わせることで線維芽細胞特異的 Keap1 欠損マウスを準備して、圧負荷による心臓線維化モデルと、プレオマイシンによる肺線維症モデルで評価を行った。どちらもモデルでも線維芽細胞特異的 Keap1 欠損マウスにて線維化抑制効果が認められ、Keap1-NRF2 による抗線維化転写制御は病態モデルにおいても重要であることが確認された。今後はこの経路に基づく新たな抗線維化治療の開発が期待される。

第 9 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成）＜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

- 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。
- 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- 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、自分の名前に下線を引く。
- 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 <論文 PDF 添付あり>

1	Murashige D, Jung JW, Neinast MD, Levin MG, Chu Q, Lambert JP, Garbincius JF, Kim B, Hoshino A , Marti-Pamies I, McDaid KS, Shewale SV, Flam E, Yang S, Roberts E, Li L, Morley MP, Bedi KC Jr, Hyman MC, Frankel DS, Margulies KB, Assoian RK, Elrod JW, Jang C, Rabinowitz JD, Arany Z. Extra-cardiac BCAA catabolism lowers blood pressure and protects from heart failure. Cell Metab . 2022 Oct 4;S1550-4131(22)00398-9.査読あり
2	Arimori T, Ikemura N, Okamoto T, Takagi J, Standley DM, Hoshino A* . Engineering ACE2 decoy receptors to combat viral escapability. Trends Pharmacol Sci . 2022 Oct;43(10):838-851.査読あり
3	Ikemura N, Taminishi S, Inaba T, Arimori T, Motooka D, Katoh K, Kirita Y, Higuchi Y, Li S, Suzuki T, Itoh Y, Ozaki Y, Nakamura S, Matoba S, Standley DM*, Okamoto T*, Takagi J*, Hoshino A* . An engineered ACE2 decoy neutralizes the SARS-CoV-2 Omicron variant and confers protection against infection in vivo. Sci Transl Med . 2022 Apr 26;eabn7737.査読あり
4	Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Mihara E, Kirita Y, Ohgitani E, Mazda O, Motooka D, Nakamura S, Sakai Y, Itoh Y, Sugihara F, Matsuura Y, Matoba S, Okamoto T*, Takagi J*, Hoshino A* . Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2. Nat Commun . 2021 Jun 21;12(1):3802. 査読あり

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

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。 ● アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ● 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	2022/12	ISHR2022, Toshiyuki Nishiji, Shunta Taminishi, Atsushi Hoshino, Satoaki Matoba. Keap1-NRF2 pathway attenuates fibroblast activation and cardiac fibrosis.
2	2021/9	BCVR2021, Toshiyuki Nishiji, Shunta Taminishi, Atsushi Hoshino, Satoaki Matoba. Keap1-NRF2 pathway attenuates fibroblast activation.
3		
4		
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2023/4	Circulation research 誌
2		
3		
4		