

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10137

研究課題名(和文)先天性心疾患におけるアセチル化修飾の役割の検討

研究課題名(英文)The role of protein lysine-acetylation in congenital heart disease

研究代表者

福島 新 (FUKUSHIMA, ARATA)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：40706553

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)：心不全を合併した先天性心疾患における心筋代謝変化を検討した。幼若家兔の先天性心疾患モデル(CHD群)では、偽手術群と比較し脂肪酸代謝およびエネルギー産生量が有意に低下した。心筋組織では脂肪酸酸化酵素(β -HAD, LCAD)の翻訳後修飾(アセチル化)がCHD群で減弱し、酵素活性や脂肪酸代謝率の低下と関連した。ミトコンドリアアセチル基転移酵素(GCN5L1)の蛋白発現がCHD群で低下しており、培養心筋細胞を用いてGCN5L1の遺伝子欠損操作を行うとLCAD, β -HADのアセチル化は減弱し細胞は病的肥大を呈した。外科的修復術を受けた先天性心疾患患者の心筋サンプルでも同様の現象が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

診断や外科手術の目覚ましい進歩により小児先天性心疾患の出生後の予後は飛躍的に向上した。しかし、成人以降も心不全を合併し日常生活が著しく障害されるため病態解明が急務である。本研究は先天性心疾患における病的肥大の分子基盤として、代謝酵素の翻訳後修飾であるアセチル化の減弱と、それに伴う脂肪酸代謝の成熟化遅延を同定した。アセチル化促進を標的とした新たな治療が先天性心疾患に合併する心不全に有効かもしれない

研究成果の概要(英文)：We investigated the maturational changes in cardiac energy metabolism in congenital heart disease (CHD) with heart failure. The CHD model was created using newborn rabbits subjected to an aortocaval shunt. Decreased cardiac fatty acid oxidation along with decline in energy production occurred in CHD group compared to sham group. In addition, reduced acetylation, an important post-translational modification of proteins, of fatty acid β -oxidation enzymes, LCAD and β -HAD, was observed in CHD group, associated with reduced enzymatic activities and fatty acid oxidation rates. Of note, the expression of the mitochondrial acetyltransferase, GCN5L1, was reduced in CHD group, and silencing GCN5L1 mRNA in cultured cardiomyocytes (H9c2 cells) significantly reduced acetylation and activity of LCAD and β -HAD, leading to an overt cardiac hypertrophy. A similar phenomenon was also proved in studies using myocardial specimens of patients with congenital heart disease.

研究分野：循環器内科

キーワード：先天性心疾患 心筋代謝 翻訳後修飾 心不全 アセチル化 脂肪酸代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年の診断精度ならびに外科手術の目覚ましい進歩により、複雑心奇形を含む小児先天性心疾患の生命予後は飛躍的に向上し90%以上が成人期に達する。しかしながら、遺残病変による慢性容量・圧負荷や先天性形態異常そのものによる心筋リモデリングによって、成人以降も心不全を合併し日常生活が著しく障害される。したがって先天性心疾患における心筋リモデリング・心不全の病態形成に関与する機序の解明と、それに基づく新たな治療法の開発は重要な研究課題である。
- (2) 心筋エネルギー代謝障害は心筋リモデリング・心不全の病態形成に深く関与する。生理的な心筋エネルギー代謝の特徴として、成人心筋では脂肪酸および糖が主要なエネルギー代謝基質であるが、幼若心筋ではミトコンドリア酸化的リン酸化が未熟なため、解糖系や乳酸代謝にエネルギー産生を依存する。しかし、出生後すぐに心筋脂肪酸代謝は劇的に増加しほぼ成人と同等レベルまで成熟するが、代わりに解糖系や乳酸代謝は低下する。この出生後に起こる生理的な心筋エネルギー代謝の成熟化と代謝基質のシフトの分子機序として、これまでにアロステリック調節や転写調節因子の関与が報告されているが、我々は新しいエネルギー代謝調節機構である非ヒストン蛋白のアセチル化修飾に着目した。非ヒストン蛋白のアセチル化は主要な翻訳後修飾の一つであり、アセチル化酵素と脱アセチル化酵素により可逆的に調節される。これらのアセチル化調節酵素は代謝の鍵物質であるアセチル CoA やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)を必須補因子として要求することから、細胞内エネルギー状態に連動して制御されることが知られる。
- (3) 最近、申請者は幼若心筋において、代謝酵素のアセチル化修飾が生理的な脂肪酸代謝の成熟化に重要に関与することを見出した。一方、成人心筋に血行動態的負荷(慢性圧・容量負荷)がかかると脂肪酸β酸化とミトコンドリアの酸化的リン酸化が抑制され、代わりに糖代謝や解糖系が亢進する(心筋代謝の胎児化)。しかしながら、なぜ幼若肥大心では心筋脂肪酸代謝の成熟化遅延やミトコンドリア発達異常をきたすのか、その背景となる分子機構はこれまで全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

先天性心疾患の心筋リモデリング・心不全の病態形成・進展における心筋蛋白のアセチル化修飾の役割を明らかにするとともに、幼若心筋のアセチル化修飾の適正化による心筋エネルギー代謝の成熟化とミトコンドリア機能の発達促進という独自のパラダイムに基づく先天性心疾患の心筋リモデリング・心不全の新たな予防・治療法の開発を目指す。

- (1) 幼若心筋のアセチル化修飾異常(過剰あるいは欠損)は脂肪酸β酸化酵素やミトコンドリア生合成制御因子の活性を変化させ、脂肪酸代謝能やミトコンドリア機能に関与するか？
- (2) 幼若肥大心筋のアセチル化修飾異常は心筋エネルギー代謝の成熟化の遅延やミトコンドリア発達異常を介して心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与するか？

3. 研究の方法

- (1) 先天性心疾患モデルにおける心筋アセチル化修飾が脂肪酸代謝を含むエネルギー代謝へ与える影響の解析：モデル動物での検討

1. 先天性心疾患モデルの作成

先天性心疾患モデル動物は3週齢の幼若家兔を用いて下大動静脈短絡による容量負荷心肥大モデルを作製する。

2. 心筋リモデリングの評価

- ① 心不全重症度評価(死亡率、心エコー、血行動態測定、心および肺重量測定)
- ② 心筋病理組織(心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシス)
- ③ 孤立心灌流による *in vivo* での代謝プロファイルの測定
- ④ 心筋アセチル化蛋白の発現と特異的アセチル化部位の同定
- ⑤ 脂肪酸代謝関連分子の発現および脂肪酸β酸化酵素活性の測定

- (2) 先天性心疾患患者の心筋検体標本を用いた心筋アセチル化修飾、脂肪酸代謝関連分子の発現、ミトコンドリア機能、および心機能や予後への影響の解析：ヒト手術検体での検討

1. 外科的心内修復術を要した84名の先天性心疾患患者の心筋組織標本を用いて、病的な心肥大合併患者(40名)、非合併患者(44名)に分け、さらにそれぞれ日齢(生後21-100日と100-200日)に層別化

2. 心筋アセチル化蛋白の発現と特異的アセチル化部位の同定
3. 脂肪酸代謝関連分子の蛋白発現および脂肪酸β酸化酵素活性の測定

- (3) ミトコンドリアアセチル基転移酵素(Gcn5l1)が心筋アセチル化に果たす役割の検討：培養心筋細胞での検討

1. siRNA を用いた Gcn511 の遺伝子欠損(ノックダウン)と特異的アセチル化部位の同定:抗アセチル化リジン抗体(Ac-Lys)を用いた免疫沈降と免疫ブロット法
2. 心筋細胞、核の免疫染色による心筋細胞形態の解析
4. 研究成果

- (1) 3 週齢の幼若家兔を用いて下大動静脈短絡による容量負荷心肥大モデル (先天性心疾患モデル動物) あるいは偽手術 (Sham)マウスを作製した。2 週間後の心エコーで短絡の存在、右室肥大、下大静脈径の拡張にてモデルが適正に作成されていることを確認した。working heart perfusion による心筋代謝の測定では先天性心疾患モデルでは Sham 群と比較し脂肪酸代謝が低下し全体の ATP 産生量が有意に低値であった (図 1)。

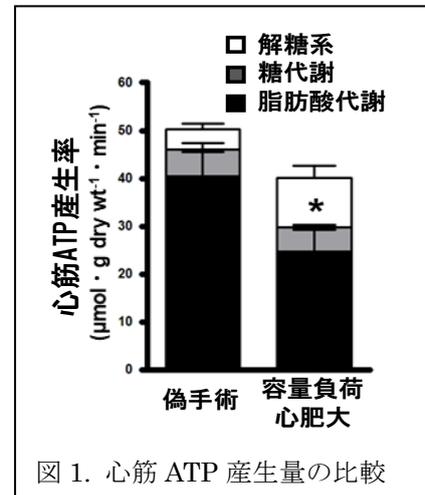


図 1. 心筋 ATP 産生量の比較

- (2) 心筋組織をホモジネートとし、脂肪酸 β 酸化酵素(β-HAD, LCAD)のアセチル化を抗アセチル化リジン抗体による免疫沈降と免疫ブロットにて確認したところ、先天性心疾患モデルで有意にアセチル化が低下しており、このアセチル化タンパクの発現量は心筋脂肪酸代謝 (パルミチン酸代謝率) および脂肪酸 β 酸化酵素活性と有意な正の相関を示した (図 2)。ミトコンドリアアセチル基転移酵素(Gcn5L1)の蛋白発現が先天性心疾患モデルで Sham 群と比較し有意に低下し、脱アセチル化酵素(SIRT3)の発現は 2 群間で有意差はなかった。

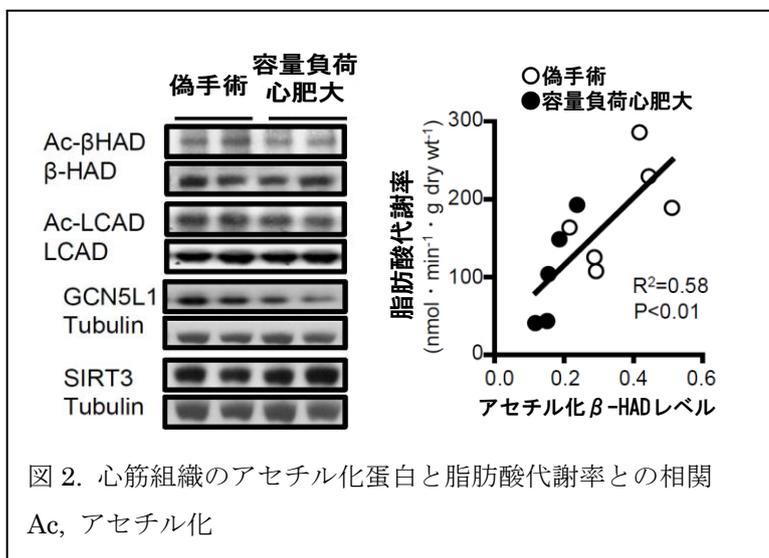


図 2. 心筋組織のアセチル化蛋白と脂肪酸代謝率との相関

Ac, アセチル化

- (3) 145 名の先天性心疾患患者を病的な心肥大合併患者(40 名)、非合併患者 (44 名)に分け、さらにそれぞれ日齢 (生後 21-100 日と 100-200 日)に分類した。心肥大非合併先天性心疾患患者では、心筋組織のアセチル化は日齢とともに増加したが、病的な心肥大を合併した先天性心疾患患者ではこの日齢に伴うアセチル化の増加は減弱していた (図 3)。特に、減弱したアセチル化蛋白として脂肪酸 β 酸化酵素 (LCAD, β-HAD) が同定され、これらの β 酸化酵素のアセチル化減弱の原因として、病的な心肥大合併例ではアセチル化転移酵素である Gcn511 の発現低下を認めた。

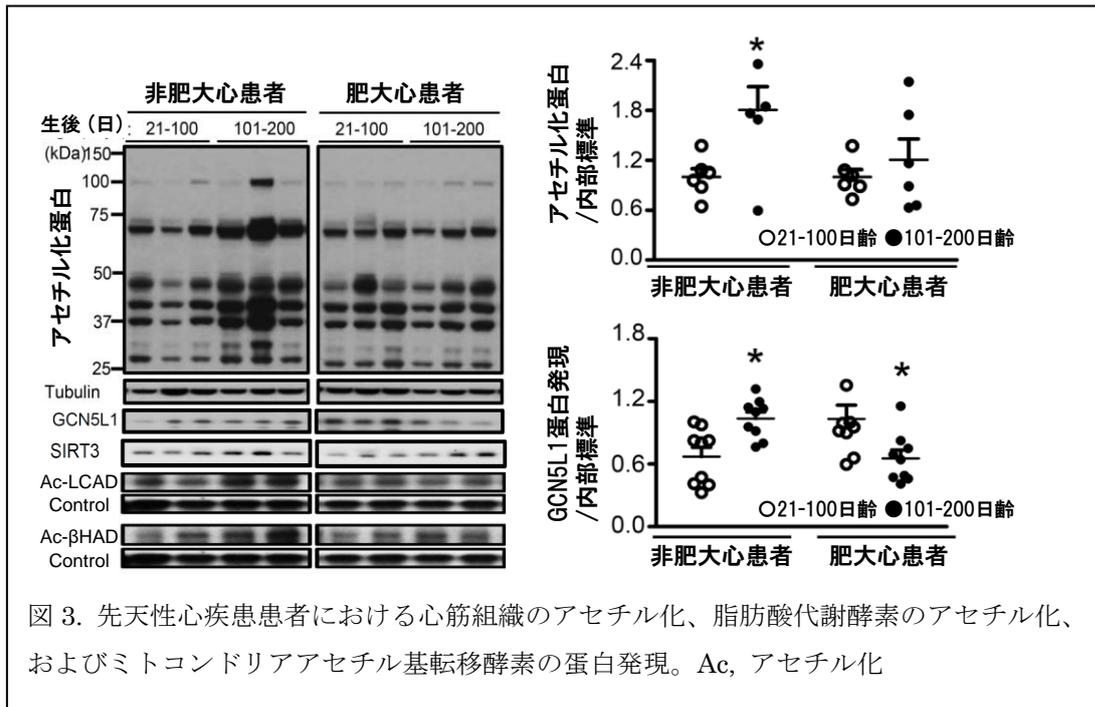


図 3. 先天性心疾患患者における心筋組織のアセチル化、脂肪酸代謝酵素のアセチル化、およびミトコンドリアアセチル基転移酵素の蛋白発現。Ac, アセチル化

- (4) ラット幼若心筋細胞(H9C2 cell)において siRNA を用いて Gcn5l1 のノックダウンを行った。Gcn5l1 の遺伝子欠損を施した培養心筋細胞では脂肪酸 β 酸化酵素のアセチル化減弱と脂肪酸代謝率の低下を認めた (図 4)。さらに、Gcn5l1 を遺伝子欠損によって心筋細胞は分化とともに病的な心筋肥大を呈した (図 4)。以上の結果により、先天性心疾患ではミトコンドリアアセチル基転移酵素の減弱によるアセチル化蛋白の減弱を引き起こし、その結果成熟に伴う心筋脂肪酸代謝の成熟が障害され、病的な心肥大を呈することを明らかにした。

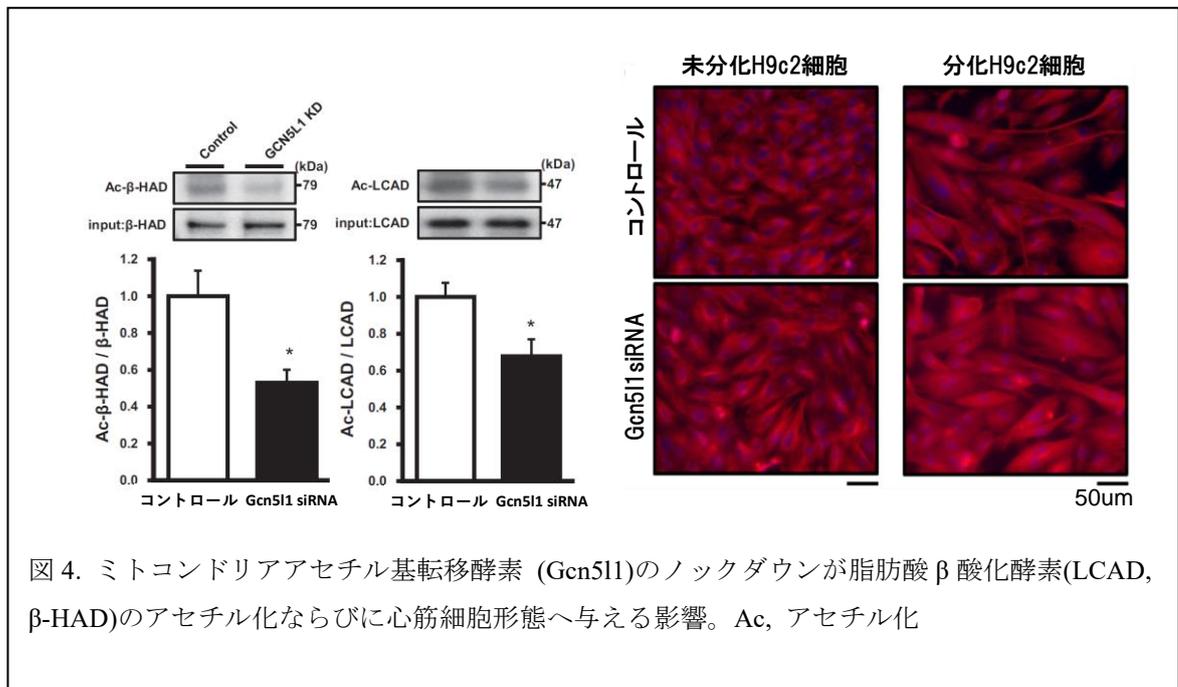


図 4. ミトコンドリアアセチル基転移酵素 (Gcn5l1)のノックダウンが脂肪酸 β 酸化酵素(LCAD, β-HAD)のアセチル化ならびに心筋細胞形態へ与える影響。Ac, アセチル化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukushima A, Zhang L, Huqi A, Lam VH, Rawat S, Altamimi T, Wagg CS, Dhaliwal KK, Hornberger LK, Kantor PF, Rebeyka IM, Lopaschuk GD.	4. 巻 3(10)
2. 論文標題 Acetylation contributes to hypertrophy-caused maturational delay of cardiac energy metabolism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 99239, 99256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.99239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fukushima A, Kinugawa S, Yokota T, Takada S, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Nakajima T, Katayama T, Nanbu H, Maekawa S, Kakutani N, Shirakawa R, Okita K, Kantor PF, Rebeyka, IM, Lopaschuk GD
2. 発表標題 Cardiac hypertrophy in congenital heart disease delays the maturation of cardiac fatty acid -oxidation by modifying myocardial acetylation control
3. 学会等名 第81回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山梨克真, 津田正哉, 福島 新, 高田真吾, 降旗高明, 松本純一, 前川 聡, 片山貴史, 横田 卓, 絹川真太郎
2. 発表標題 Protein acetylation in skeletal muscle impairs mitochondrial fatty acid oxidation and limits exercise capacity in post-infarct heart failure in mice.
3. 学会等名 第21回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukushima A, Tsuda M, Takada S, Yokota T, Saito A, Mizushima W, Furihata T, Matsumoto J, Katayama T, Nakajima T, Maekawa S, Nambu H, Shirakawa R, Kakutani N, Yoshikuni O, Yamanashi K, Okita K, and Kinugawa S
2. 発表標題 Mitochondrial Protein Hyperacetylation in Skeletal Muscle is Associated with Exercise Intolerance in Murine Model of Post-Infarct Heart Failure
3. 学会等名 22nd International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaya T, Fukushima A, Matsumoto J, Takada S, Yokota T, Furihata T, Katayama T, Nakajima T, Nambu H, Maekawa S, Shirakawa R, Kakutani N, Obata Y, Yamanashi K, Okita K, Kinugawa S
2. 発表標題 Acetylation of mitochondrial proteins alters fatty acid -oxidation in skeletal muscle and limits exercise capacity in post-infarct heart failure in mice.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	絹川 真太郎 (KINUGAWA SHINTARO) (60399871)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	
研究分担者	高田 真吾 (TAKADA SHINGO) (60722329)	北海道大学・医学研究院・博士研究員 (10101)	
研究分担者	横田 卓 (YOKOTA TAKASHI) (90374321)	北海道大学・大学病院・特任講師 (10101)	