

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07049

研究課題名(和文) 低酸素応答による生理的心肥大抑制を介した心不全発症機転の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of physiological hypertrophy in the transition from compensatory hypertrophy to heart failure

研究代表者

池田 昌隆 (IKEDA, MASATAKA)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：10567382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、過度な肥大によって生じた低酸素環境によって引き起こされる細胞内の変化、特に低酸素誘導因子(Hif-1)と転写制御されるREDD1に着目し、非代償性心不全の発症機転における同分子の機能解析を行った。心不全モデルの不全心筋ではHif-1 およびREDD1の発現は増加していた。単離心筋細胞を低酸素環境で培養することによりREDD1の発現は増加を伴って、細胞死が誘導されたが、siRNAによりREDD1をノックダウンすると細胞死が増悪した。以上の結果から、慢性心不全では過度な肥大によって生じる低酸素環境に反応して増加したREDD1が、保護的な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of REDD1 in the transition from compensatory hypertrophy to heart failure (HF), by focusing on intracellular changes, particularly Hif-1 and REDD1, in response to hypoxia induced by excessive hypertrophy. Hif-1 and REDD1 were upregulated in the failing myocardium of HF models. In isolated cardiomyocytes, 1% hypoxia induced cell death, accompanied by increased Hif-1 and REDD1, while the knockdown of REDD1 using siRNA aggravated it. Taken together, these results suggested that REDD1, which increased in response to hypoxia induced by excessive hypertrophy in HF, plays a protective role in the failing myocardium.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 低酸素 REDD1 DDIT4

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は高血圧や心筋梗塞といった器質的心疾患の終末像である。初期には代償性肥大により心拍出量は保たれるが、末期には過度な心肥大に伴って、非代償性心不全に移行する。しかしながら、依然として代償性心肥大から非代償性心不全(不全心筋)に至る分子メカニズムは明らかではない。

申請者らは、タンパク合成の律速キナーゼである mTOR が拡張末期圧に依存して活性化し、遠心性心肥大を惹起することで心拍出量を保ち、拡張末期圧を正常化するという feedback 制御により心不全の代償期が維持されていることを明らかにしてきた (Ikeda et al., *Sci Rep* 5: 15881 (2015))。本結果を踏まえ、心不全非代償期においては心拍出量を維持し、拡張末期圧を正常化する内在性的心不全制御機構が破綻していると考えた。

心肥大から非代償性心不全に移行する背景として、様々な病態が関与していることが報告されているが、申請者らは心肥大に伴う相対的な低酸素環境が非代償性心不全への移行に重要な役割を果たしており、低酸素応答による mTOR 活性抑制が内在性心不全制御機構の破綻を引き起こしているとの仮説を立てた。

低酸素環境においては、様々な分子機序を介して、mTOR 活性が抑制されることが知られているが、その代表的な分子が REDD1 (DDIT4) である。REDD1 は、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor-1 α : Hif-1 α) によって転写制御される分子として報告された分子であり、詳細な機序は不明であるものの TSC1/TSC2 複合体の活性化を介して、その下流である mTOR 活性を抑制することが知られている (Corradetti et al., *J Biol Chem* 280: 9769-9772 (2005))。近年、REDD1 がストレス下でのシナプス喪失やうつ病において重要な役割を果たしていること (Ota et al., *Nat Med* 20: 531-535 (2014))、またステロイド誘発性の骨格筋萎縮に関与していること (Britto et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1: 307: E983-93) が報告されており、様々な病態において重要な役割を果たしていることが報告されているものの、心不全(心筋組織)における役割は依然として明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、非代償性心不全の発症機序としての低酸素応答、特に Hif-1 α によって制御される REDD1 の役割を明らかにし、代償性心肥大から非代償性心不全に移行する分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々な心不全モデルにおける Hif-1 α および REDD1 の発現解析:

心筋梗塞後心不全モデル、大動脈縮窄 (Transverse Aortic Constriction: TAC) 圧負荷心

不全モデル、トロポニン T 変異型拡張型心筋症モデル等の様々な心不全モデルマウスの心臓組織における Hif-1 α および REDD1 を real-time PCR で mRNA、western blot 法により蛋白の発現を検証した。

(2) 低酸素環境での培養下における単離心筋細胞での REDD1 の機能解析:

心不全モデルにおける低酸素環境を、単離した心筋細胞を 1% 低酸素環境下で培養することで模擬し、Hif-1 α および REDD1 の発現、さらに mTOR の活性化を S6 蛋白のリン酸化で検討した。さらに siRNA を用いて REDD1 をノックダウンすることにより、心筋細胞レベルでの低酸素環境下における REDD1 の生理学的および病理学的な機能解析を行った。

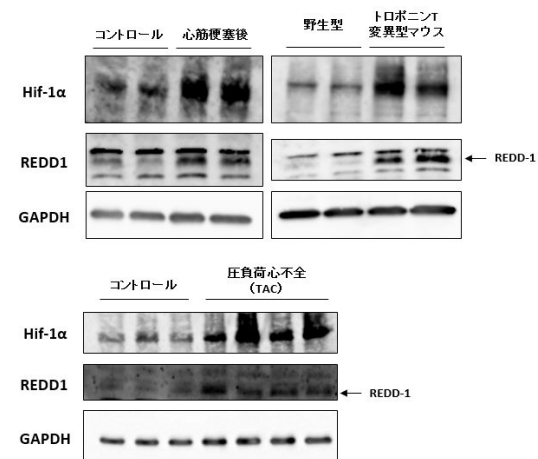
(3) REDD1 ノックアウトマウスに TAC 圧負荷心不全モデルを作成の上、心不全(不全心筋)における REDD1 の機能解析:

REDD1 ノックアウトマウスに心筋梗塞、もしくは大動脈縮窄 (TAC) 圧負荷モデルを作成し、生命予後や心エコー、血行動態、心肺重量、といった心不全の重症度指標を計測する。さらに回収した心筋細胞を生化学的に解析し、mTOR 活性を S6 蛋白のリン酸化で評価し、さらには心筋細胞の肥大、組織の線維化、アポトーシスを検証する。

4. 研究成果

(1) 不全心筋における Hif-1 α および REDD1 の発現:

心筋梗塞後心不全モデル、TAC 圧負荷心不全モデル、トロポニン T 変異型拡張型心筋症モデルの心筋組織において、Hif-1 α および REDD1 の発現は増加していた (下图)。

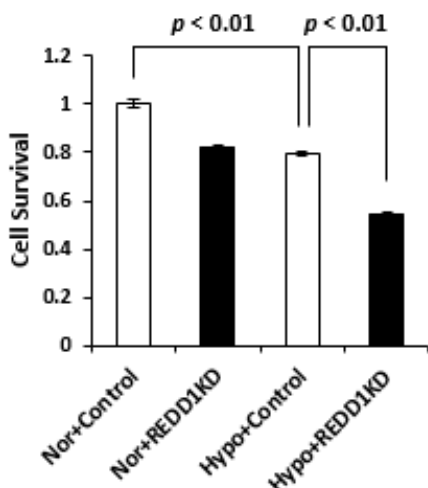


これらの結果より、慢性心不全の不全心筋においては心不全の病因によらず、低酸素環境に晒されていること (Hif-1 α が増加していること) およびそれに伴って REDD1 が増加していることを明らかにした。

(2) 低酸素環境での単離心筋細胞における

REDD1 の役割：

ラット新生仔単離心筋細胞を 1%低酸素環境にて培養することにより、Hif-1 α とともに REDD1 の mRNA および蛋白レベルでの発現が誘導され、mTOR 活性は著明に抑制された。一方で、REDD1 をノックダウンした細胞では、低酸素環境下でも mTOR 活性が保たれていることを確認した。さらに 1%低酸素環境下での 24 時間の培養は細胞死を引き起こすが、siRNA によるノックダウンによって、低酸素単独群と比較し、mTOR 活性は上昇し、1%低酸素環境下にて誘導される細胞死を増悪させた（下図）。



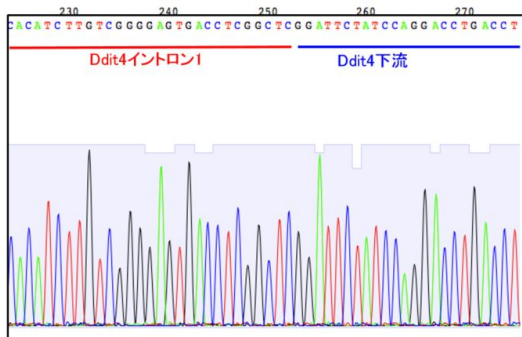
以上の結果から、REDD1 は低酸素環境下における細胞生存において mTOR を抑制することで、保護的に作用している可能性が示唆された。

(3) REDD1 ノックアウトマウスの作成：
KOMP より REDD1 ノックアウトマウスを入手予定であったが、KOMP での繁殖不良のためマウスの入手が困難であった。そのため、ノックアウトマウスの作成を開始した。
CRISPR_Cas9 システムにより第 2Exon の ATG 配列から第 3Exon の TGA を含む配列の deletion を行い、F0 を確立した。

```

214 CCGGGGTGTGCACATCTTGTGGGAGTGAACCTGGCTCGGATTCTATCCAGGACCTGAC 273
|||||
241 cccasatgtcacatcttctcassaastgaacctcaactcagattctatccasagcctgac 300
|||||
274 CTTTGGGGTAGCCAGGAGACCCACATCTCTTTCATAGAATCCTCAGAGCTTATCCOCA 333
|||||
301 ctttgssttagccasagagaccacatctctttcatagaatcctcagaacttattccoca 360
|||||

```



F0 マウスの DNA を用いて sequence 解析を行い、実際に設計した通りに deletion が行われていることを確認した（上図）。

続いて、F1 マウスを確立した後、現在、胚操作を経て九州大学医学部動物実験施設内に搬入し、繁殖交配中である。実験に使用できるマウスが準備でき次第、TAC 圧負荷心不全モデルを作成し、REDD1 の心不全病態における生理的および病的意義を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Shinobu Arai, Masataka Ikeda (Equally Contributed 1st author), Tomomi Ide, Yuka Matsuo, Takeo Fujino, Katsuya Hirano, Kenji Sunagawa, and Hiroyuki Tsutsui. Functional loss of DHRS7C induces intracellular Ca²⁺ overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation, Am J Physiol Cell Physiol Cell Physiol 312: C29-C39 (2017)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 池田昌隆、第 14 回 Cardiovascular Translational Research Conference 学術集会、福岡、2018.4.7
(2) 池田昌隆、第 21 回日本心不全学会学術集会、秋田、2017.10.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 昌隆 (IKEDA MASATAKA)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号：10567382

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()