

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09421

研究課題名(和文) 左室収縮能が保持された心不全患者におけるアディポネクチンの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Study of Molecular Mechanisms of Heart Failure

研究代表者

田中 孔明 (Komei, Tanaka)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：70572725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全はあらゆる心臓病の終末像であり、癌とともに最も予後不良な疾患群の一つである。しかしながら、心不全の病態生理はいまだに不明な点が多く、有効な治療法も確立されていない。そこで、本研究では、網羅的代謝物質解析技術(メタボロミクス)を用い、臨床的指標と比較検討することにより、心不全患者(特に、治療抵抗性患者)における代謝リモデリングの解明を目指す。その結果、心不全患者の血液検体のメタボローム解析や心筋生検サンプルを用いたトランスクリプトーム解析により、Mfn1が心不全治療反応性に関連する分子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その心不全はあらゆる心臓病の終末像であり、種々の薬物療法(遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬、アルドステロン拮抗薬)や非薬物療法(心臓再同期療法、非侵襲的陽圧換気療法)が進歩した現在においても、癌とともに未だに予後不良な疾患群の一つである。本研究はこのような治療抵抗性の心不全患者に対する新たな治療の開発へつながるものである。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of severe heart failure is unacceptably poor and it is urgent to establish new therapies for this critical condition. Some patients with heart failure do not respond to established multidisciplinary treatment and are classified as “non-responders”. The outcome is especially poor for non-responders, and underlying mechanisms are largely unknown. We examined endomyocardial biopsies and metabolomic analysis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM). Patients were classified as non-responders when the left-ventricular (LV) ejection fraction and LV end-diastolic dimension did not show more than 10% improvement over the long-term after cardiac biopsy. We here demonstrate that reduction of mitofusin-1 expression impairs cardiomyocyte metabolism and may have a crucial role in the pathology of non-responsive IDCM.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全とは、心臓のポンプ機能障害により全身の組織代謝に見合うだけの血液量を絶対的にまた相対的に供給できない状態であり、肺・体静脈系または両系にうっ血を来し日常生活に障害を生じる臨床症候群と定義される。原因疾患は、心筋梗塞等の冠動脈疾患、心臓弁膜症、各種心筋症、肺動脈疾患等の心肺器質的疾患、高血圧症、貧血、甲状腺疾患等の全身疾患等、多岐にわたる。その心不全はあらゆる心臓病の終末像であり、種々の薬物療法 (β 遮断薬、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬、アルドステロン拮抗薬) や非薬物療法 (心臓再同期療法、非侵襲的陽圧換気療法) が進歩した現在においても、癌とともに未だに予後不良な疾患群の一つである。また、急速に進行している社会の高齢化や、食生活・生活様式の変化による肥満関連疾患 (高血圧症、糖尿病、脂質異常症など) の増加と相俟って、日本の心不全患者は、2035 年にはおよそ 130 万人に到達すると予測されている。これらの現状に対応すべく、心血管疾患の発症と進展に關与する未知のメカニズムの継続的な探求とそれらを標的とする新規治療法の開発は極めて重要な課題である。

心臓は、脂肪酸やグルコースなどからエネルギー通貨である ATP を効率よく生合成することにより絶え間ない収縮と弛緩を繰り返し、全身へ血液を循環させるポンプの役割を果たしており、その基礎的メカニズムについては既に多くの知見が存在する。一方、心不全においては、脂肪酸やグルコースなどの利用障害やミトコンドリアの機能異常によるエネルギー生合成の低下、すなわち非心不全状態とは異なったエネルギー代謝の変化 (代謝リモデリング) が生じているとされている。このような代謝リモデリングは、心機能障害のみならず心臓リモデリングの進展にも影響を及ぼす。また、肺高血圧疾患においては、基礎実験レベルにおいて、各種代謝をターゲットとした治療介入の可能性が示されている。我々のグループも独自に研究を進め、老化に伴う代謝リモデリングが様々な心肺血管疾患の病態生理に關与する可能性を示唆してきた (Nature 2007, Nat Med 2009, Cell Metab 2012, Cell Metab 2013, Cell Rep 2014)。しかしながら、基礎研究では多くの知見が得られているものの、心肺血管疾患における代謝リモデリングは依然として未知の部分が多く、臨床におけるデータは皆無に等しい。また数千種類といわれる代謝物質全てを解析することは困難を伴う。近年、ガスクロマトグラフ・液体クロマトグラフ・キャピラリー電気泳動などの高分解能を有する分析計に、高感度かつ高選択検出器である質量分析計を組み合わせた網羅的代謝物質解析技術 (メタボロミクス) が確立され、様々な臨床分野における疾患の病態解析に応用されつつある。このメタボロミクスを利用することにより、心血管疾患における代謝リモデリングの詳細な解析が可能となるため、心肺血管疾患の発症と進展に關与する未知の代謝メカニズムの発見が期待できる。また、この結果得られた代謝産物は疾患の病状、病態、あるいは治療介入の結果を示すバイオマーカーとして有用である可能性が高く、さらに遺伝子改変マウスの作成等、より深い病態解明を目的とした基礎研究の検討も可能である。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的代謝物質解析技術 (メタボロミクス) を用い、臨床的指標と比較検討することにより、心肺血管疾患患者における代謝リモデリングの解明を目指す。それにより、心肺血管疾患の発症と進展に關与する未知の代謝メカニズムを明らかにし、新たな病態解明、それらを標的とする新しい治療戦略の基盤の構築、病状把握のためのバイオマーカーを確立する。また、その結果を遺伝子改変マウスの作成等、基礎研究へ還元することにより、より深い病態解明につなげることを目標とする。

3. 研究の方法

対象は心肺血管疾患を有するもしくはその存在が疑われ、待機的な心血管カテーテル検査の適応があると判断された患者とする。通常の方法にて心血管カテーテル検査を施行し、その際に計 4 ヲ所から血液検体を採取、後日にこれらの検体を用いてメタボロミクスによる代謝リ

デリングの解析を行う。心血管カテーテル検査後に原疾患に対して必要に応じて治療介入を行い、6ヶ月および12ヶ月後に上記臨床検査による追跡調査を施行する。再度心血管カテーテル検査が必要と判断された患者は、メタボローム解析を再度施行する。メタボロミクスの解析結果と臨床的パラメーターとの相関を検討し、疾患や病態との関連が強い代謝産物を同定する。さらに、心血管カテーテル検査時に得られた心筋生検サンプルを用いて、トランスクリプトーム解析や電子顕微鏡・免疫染色などの組織解析も行う。平行して心肺血管疾患マウスモデルを用いたメタボローム解析・トランスクリプトーム解析も行い、ヒトで得られたデータのバリデーションを行うとともに、マウスモデルにおいても疾患・病態特異的代謝産物・関連分子の同定を試みる。疾患や病態と相関がありそうな代謝産物・関連分子を明らかにし、その代謝経路に重要な酵素や関連分子の組織特異的遺伝子欠失マウスを作製することによって、候補となった代謝産物の病態生理学的な役割を明らかにする。

4．研究成果

今回の研究では特に治療抵抗性心不全患者（ノンレスポonder）に特異的な変化を調べることとした。ノンレスポonderの定義は、適切な治療にも関わらず、左室駆出率や左室径の改善が10%に満たない症例とした。今回解析した22例の症例のうち、14例はレスポonder、8例がノンレスポonderであった。メタボローム解析の結果、ノンレスポonderにおいてミトコンドリアに関連する代謝産物の低下傾向が認められた。心筋生検サンプルの組織解析では、ノンレスポonderにおいてミトコンドリア数やサイズが有意に減少していることがわかった。トランスクリプトーム解析では、ミトコンドリアのフージョンに重要な分子であるMfn1の発現がノンレスポonderで有意に低下していた。

心筋組織におけるMfn1の役割を調べるため、Mfn1をノックダウンした培養心筋の細胞内代謝について調べたところ、ミトコンドリア関連遺伝子の発現には変化がないのに対して、ミトコンドリア代謝が有意に低下していることがわかった。同様に解糖系酵素の発現には変化がなかったが、解糖系代謝の低下が認められた。

さらに心不全におけるMfn1の役割を調べるため、心筋特異的Mfn1ノックアウトマウスを確立し、解析を進めた。その結果、心エコーでは変化を認めないものの、心不全患者ノンレスポonderで認められた組織変化、すなわち、ミトコンドリアサイズの減少などが観察された。メタボローム解析を行ってみると、心筋特異的Mfn1ノックアウトマウスの心筋組織では、phospho-creatine/ATPレベルが著明に減少しており、その他ミトコンドリア関連代謝分子のレベルも低下していた。次に、心筋特異的Mfn1ノックアウトマウスに圧負荷心不全モデルを作成してみると、心筋細胞死の増加とそれに伴う心筋組織の繊維化の増加が認められた。

不全心においては持続的な交感神経系の刺激が生じていることが知られている。培養心筋細胞にイソプレテレンールを持続的に負荷したところ、Mfn1の発現が有意に低下することがわかった。これらの変化は、cAMP/PKA阻害によって減少することから、持続的な交感神経系の刺激がMfn1の発現調整に関与していることが明らかとなった。

以上の結果より、ノンレスポonderにおけるMfn1の発現の低下は、ミトコンドリア代謝の低下を招くことで、心不全治療抵抗性に関与していることが明らかとなった。今後、Mfn1を標的とした治療は、次世代の心不全治療になりうることが示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計40件のうち抜粋)

1. Ikegami R, Shimizu I, Sato T, Yoshida Y, Hayashi Y, Suda Ma, Katsuumi G, Li J, Wakasugi T, Minokoshi Y, Okamoto S, Hinoi E, Nielsen S, Zenius Jespersen N, Scheele C, Soga T, Minamino T. Gamma-aminobutyric acid signaling in brown adipose tissue promotes systemic metabolic derangement in obesity. **Cell Rep**. 2018; 24: 2827-2837.
2. Takano T, Tanaka K, Ozaki K, Sato A, Iijima K, Yanagawa T, Izumi D, Ozawa T, Fuse K, Sato M, Tanabe N, Minamino T. Clinical predictors of recurrent ventricular arrhythmias in secondary

- prevention implantable cardioverter defibrillator recipients with coronary artery disease-Lower left ventricular ejection fraction and incomplete revascularization. **Circ J.** 2018; 82: 3037-3043.
3. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Nishikawa M, Yamamoto J, Hibi T, Miura S, Minamino T, Oike Y, Hokari R, and Kanai T. Aortic carboxypeptidase-like protein, a WNT ligand, exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Invest.** 2018; 128: 1581-1596.
 4. Otuki S, Izumi D, Suda M, Sato A, Hasegawa Y, Yagihara N, Iijima K, Chinushi M, Fuse I, Minamino T. Effects of direct oral anticoagulants at the peak phase, the trough phase, and after vascular injury. **J Am Coll Cardiol.** 2018; 71: 102-104.
 5. Si S, Nakajima-Takagi Y, Iga T, Tsuji M, Hou L, Oshima M, Koide S, Saraya A, Yamazaki S, Takubo K, Kubota Y, Minamino T, Iwama A. Hematopoietic insults damage bone marrow niche by activating p53 in vascular endothelial cells. **Exp Hematol.** 2018; 63: 41-51.
 6. Furuuchi R, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, Katsuumi G, Wakasugi T, Nakao M, Minamino T. Boysenberry polyphenol inhibits endothelial dysfunction and improves vascular health. **PLoS One.** 2018; 13: e0202051.
 7. Kayamori H, Kashimura T, Horii Y, Kanazawa T, Fujita T, Kubota N, Ikami Y, Takano T, Okubo T, Hoyano M, Yanagawa T, Ozawa T, Ozaki K, Minamino T. Bidirectional shunt trajectory in ventricular septal defect with Eisenmenger's syndrome. **Circ J.** 2018; 82: 2925-2926.
 8. Suda M, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Katsuumi G, Wakasugi T, Yoshida Y, Okuda S, Soga T, Minamino T. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 ameliorates cardiac ischemia and systolic dysfunction by up-regulating the FGF-2/EGR-1 pathway. **PLoS One.** 2017; 12: e0182422.
 9. Nishiuchi S, Makiyama T, Aiba T, Nakajima K, Hirose S, Kohjitani H, Yamamoto Y, Harita T, Hayano M, Wuriyanghai Y, Chen J, Sasaki K, Yagihara N, Ishikawa T, Onoue K, Murakoshi N, Watanabe I, Ohkubo K, Watanabe H, Ohno S, Doi T, Shizuta S, Minamino T, Saito Y, Oginosawa Y, Nogami A, Aonuma K, Kusano K, Makita N, Shimizu W, Horie M, Kimura T. Gene-based risk stratification for cardiac disorders in LMNA mutation carriers. **Circ Cardiovasc Genet.** 2017; 10: pii: e001603. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001603.
 10. Iijima K, Ishida N, Izumi D, Minamino T. Inappropriate inhibition of biventricular pacing due to diaphragmatic myopotentials amplified by the selectable sensing filter. **Circ Cardiovasc Genet.** 2017; 19: 2014.
 11. Sonoda K, Ohno S, Otuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T, Horie M. Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. **Europace.** 2017; 19: 644-650.
 12. Ikegami R, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Metabolomic analysis in heart failure. **Circ J.** 2017; 82: 10-16.
 13. Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, Duboscq-Bidot L, Thomas AC, Yang P, Ohno S, Hasegawa K, Kuwano R, Chatel S, Redon R, Schott JJ, Probst V, Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AA, Nakano Y, Aiba T, Miyamoto Y, Kamakura S, Darbar D, Donahue BS, Shigemizu D, Tanaka T, Tsunoda T, Suda M, Sato A, Minamino T, Endo N, Shimizu W, Horie M, Roden DM, Makita N. Variants in the SCN5A promoter associated with various arrhythmia phenotypes. **J Am Heart Assoc.** 2016; 5. doi: 10.1161/JAHA.116.003644.
 14. Hasegawa K, Watanabe H, Hisamatsu T, Ohno S, Itoh H, Ashihara T, Hayashi H, Makiyama T, Minamino T, Horie M. Early repolarization and risk of arrhythmia events in long QT syndrome. **Int J Cardiol.** 2016; 223: 540-542.
 15. Sato A, Hasegawa Y, Minamino T. The first reported case of a transvenous left ventricular pacing lead of cardiac resynchronization therapy causing aggravation of coronary atherosclerosis. **Europace.** 2016; 18: 1734.
 16. Tahara N, Dobashi H, Fukuda K, Funauchi M, Hatano M, Ikeda S, Joho S, Kihara Y, Kimura T, Kondo T, Matsushita M, Minamino T, Nakanishi N, Ozaki Y, Saji T, Sakai S, Tanabe N, Watanabe H, Yamada H, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and safety of a novel endothelin receptor antagonist, macitentan, in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. **Circ J.** 2016; 80: 1478-1483.
 17. Watanabe H, Minamino T. Rare variants in ANK2 associated with various inherited arrhythmia syndromes. **Circ J.** 2016; 80: 2423-2424.
 18. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol.** 2016; 97: 245-262.
 19. Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. A role for circadian clock in metabolic disease. **Hypertens Res.** 2016; 39: 483-491.

〔学会発表〕(計 47 件のうち抜粋)

1. Minamino T. Targeting Cellular Aging for Cardio-metabolic Disease. The 3rd Annual 2019 International Hawaii Cardiovascular Symposium, 2/6/2019, Honolulu, Hawaii, USA
2. Minamino T. Targeting Cardiovascular Senescence through Senescence-associated Glycoprotein. The 14th Annual Winter Research Meeting on Translational Heart Failure Research, 1/26/2019, Les Diablerets, Switzerland
3. Minamino T. Novel Aspects of Direct Oral Anticoagulants. Joint Session with AHA & The Japanese Circulation Society, Scientific Session 2018, American Heart Association, 11/11/2018, Chicago, USA
4. Minamino T. Targeting metabolites for HF treatment. The 62nd Annual Scientific Meeting of the Korean Society of Cardiology, JCS-KSC Joint Symposium: Drug Discovery for Heart Failure, 10/11/2018, Seoul, Korea
5. Minamino T. Targeting cellular aging for the treatment of cardio-metabolic disease. Scott Lecturer Invitee, 9TH ANNUAL ALLIANCE FOR HEALTHY AGING CONFERENCE, 10/5/2018, Rochester, MN, USA
6. Minamino T. White and brown adipose tissue as a therapeutic target for cardiovascular diseases. ESC 2018 Symposium: Adipose tissue and cardiovascular disease. Joint with the Japanese Circulation Society, 8/26/2018, Munich, Germany
7. Minamino T. Targeting cellular aging for the treatment of cardiovascular diseases. BCVS 2018 Scientific Sessions Mitochondrion and Heart Failure, 2018/7/30, Grand Hyatt San Antonio, TX, USA
8. Minamino T. Role of Cellular Aging in Cardio-metabolic Disease. 24th IUBMB Congress & 15th FAOBMB Congress (IUBMB SEOUL 2018), 2018/6/8 COEX Seoul, Korea
9. Minamino T. Targeting cellular aging for the treatment of cardiovascular diseases. Symposium “Myocardial aging and cardiometabolic disorders” 2018/6/4 Auditorium de la Galerie de l’Evolution Museum, d’Histoire Naturelle, Paris, France
10. Minamino T. Targeting cellular senescence in cardiovascular aging. International Symposium Advances in Heart Failure 2018/1/4-5 King’s College London, UK
11. Minamino T. DNA Damage and Diabetes. DNA Damage Response and Cardio-metabolic Disease. AHA/Japanese Circulation Society Joint Session. AHA Scientific Sessions 2017 11/12/2017 Anaheim, CA, USA
12. Minamino T. Metabolism, Adipose Tissue, and CVD. INTERNATIONAL SYMPOSIUM Cardiometabolic risk and Vascular Disease-from Mechanisms to Treatment-2017/12/1 Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
13. Minamino T. Hypertension, Diabetes, and Vascular Aging. Hypertension Seoul 2017 The Korean Society of Hypertension 2017/11/3 Seoul, Korea
14. Minamino T. A critical role of cellular senescence in metabolic and cardiovascular disease. 6th EU-US Conference on Repair of Endogenous DNA Damage 2017/9/27 Udine, Italy
15. Minamino T. Pathophysiological mechanisms of heart failure in diabetes. Joint with the Japanese Circulation Society. European Society of Cardiology 2017 2017/8/29 Barcelona, Spain
16. Minamino T. Cellular senescence in cardiovascular disease - The future. Symposium, European Society of Cardiology 2017 2017/8/28 Barcelona, Spain
17. Minamino T. Cellular Senescence and Age-associated Diseases. Keystone Symposia Conference Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (E2) 5/18/2017 Yokohama
18. Minamino T. Hypertension, Diabetes, and Vascular Aging. The 47th Annual Convention & Scientific Session of the Taiwan Society of Cardiology APSC-TSOC Joint Session 2017/5/6 Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan
19. Minamino T. Cellular senescence and cardio metabolic disease. Joint with the Japanese Circulation Society. European Society of Cardiology 2016 8/28/2016 Rome, Italy
20. Minamino T. Future direction for research in metabolism, adipose tissue and cardiovascular disease. Metabolism, adipose tissue and cardiovascular disease. European Society of Cardiology 2016 8/27/2016 Rome, Italy
21. Minamino T. A critical role of cellular senescence in metabolic and cardiovascular disease. The 26th International Conference the Korean Society for Gerontology 6/16/2016 Hotel Laonzena, Daegu, Korea

〔図書〕(計 54 件のうち抜粋)

1. 南野 徹 近未来の心不全治療薬の展望 心臓 2019;5 1 : 377.
2. 池上龍太郎、清水逸平、吉田陽子、南野 徹 脂肪の量と質を制御するー老化による制御 実験医学 2018;36:2739-2743.
3. 南野 徹 細胞老化を標的とした循環代謝制御 血管 2018;41:1-7.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 5 件のうち抜粋）

名称：老化細胞除去薬

発明者：南野徹

権利者：新潟大学

種類：特許

番号：特願 2016-167679

出願年：2016 年

国内外の別：国際

○取得状況（計 1 件）

名称：糖尿病の治療剤

発明者：南野 徹、森谷純治

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特許第 5721211 号

取得年：2015 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学大学院医歯学研究院循環器内科

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/car/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：南野 徹

ローマ字氏名：MINAMINO TOHRU

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号（8 桁）：90328063

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。