

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09501

研究課題名(和文)ATP産生増強による新規心不全治療法開発に向けた心筋エネルギー代謝調節機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of cardiac energy metabolism for the development of novel therapy for heart failure

研究代表者

木岡 秀隆 (Kioka, Hidetaka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70642099

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)：心臓は莫大なエネルギー(ATP)を消費している。ATPはミトコンドリアにおける酸素を用いた酸化的リン酸化により産生される事が知られているが、心不全では相対的虚血によるエネルギー不全が関与している事が報告されている。我々が同定したミトコンドリアでのATP産生を活性化させるタンパク質G0s2に着目した新たな心不全治療開発に向けて、動物モデルを用いてG0s2が心機能改善に関与するかどうかを検討した。ゼブラフィッシュを用いたG0s2の強制発現系、および発現抑制系を用いた検討によりG0s2は低酸素に対する臓器機能保持に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全にエネルギー代謝不全が関与している事が知られているが、現在治療薬として用いられている 遮断薬、ACE阻害薬は、エネルギー消費を抑制することで心不全予後を改善していると考えられている。しかし、今尚これらの薬物治療に抵抗性を示す難治性心不全があるようにその効果は不十分であり、ATP産生そのものを増やすことによりエネルギー状態を改善させる臓器保護薬の開発が求められる。本研究により、以前に我々が細胞実験によりミトコンドリアATP産生を増強させるタンパク質として同定したG0s2が生体内においても臓器保護的に作用することが示され、ATP産生増強による新規心不全治療法開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Heart consumes large amount of ATP. ATP is generated through mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) and oxygen is essential in this system. It has been known that energy impairment is involved in heart failure. In this study, we examined whether G0s2, which we identified as an activator of OXPHOS, protect tissue function for the development of novel therapy for heart failure. By establishing both gain of function and loss of function model of G0s2 in zebrafish, we demonstrated that G0s2 protect tissue function against hypoxia. Our findings suggests that G0s2 could become a therapeutic target for energy impairment-related diseases such as heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：エネルギー代謝 ミトコンドリア ATP 低酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心臓は常に自律拍動をするために莫大な ATP を産生し消費する宿命にある。心不全病態にエネルギー需給バランスの破綻が関与していることは以前より報告されている (Circulation.1997;96, 2190-6.)。現在心不全治療に用いられている遮断薬等の心筋保護効果を持つ薬剤は ATP 需要を減少させる効果を持つ一方で、ATP 需要を増強させる強心薬は長期予後悪化させると考えられている。ATP の供給はミトコンドリアでの酸素を用いた呼吸によりなされるが、虚血性心筋症はもとより、冠動脈病変を伴わない拡張型心筋症においても、相対的な虚血の関与が示唆されており (Nature.2007;446, 444-448)、心不全において ATP の供給不全を来している可能性が考えられる。

研究代表者らは培養心筋細胞において低酸素刺激により誘導され、ミトコンドリア呼吸鎖において ATP 合成を担う、FoF1-ATP 合成酵素と結合することにより低酸素下においても ATP 産生能を向上させる新規ミトコンドリア蛋白質 G0s2 を同定し、報告した (Kioka H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(1):273-8.)

### 2. 研究の目的

本研究では、G0s2 を標的とした ATP 産生増強による新規心不全治療法開発に向けた心筋代謝調整機構の解明を目指し、下記の項目を検討した

- (1) ミトコンドリア機能と心不全の予後についての検討
- (2) G0s2 を標的とした治療開発に向けた蛋白分解機構の解明
- (3) 動物モデルを用いた G0s2 の臓器保護作用の評価

### 3. 研究の方法

- (1) ミトコンドリア機能と心不全の予後についての検討  
心不全症例を対象に、ヒト心臓でのミトコンドリア機能を表すと考えられる Tc-MIBI 心筋シンチ洗い出し率と、治療反応性についての関係を調べる。
- (2) G0s2 を標的とした治療開発に向けた G0s2 蛋白分解機構の解明  
E3 リガーゼの siRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、G0s2 分解を抑制する遺伝子の同定を試みる。生化学的解析による分解機序解明を行い、更には G0s2 分解抑制により ATP 産生が増強するかを独自の ATP 産生評価系を用いて確認する。
- (3) 動物モデルを用いた G0s2 の臓器保護作用の評価  
Gal4-UAS system を用いた心臓特異的 G0s2 トランスジェニックゼブラフィッシュ、および TALEN を用いた G0s2 ノックアウトゼブラフィッシュを作成し、低酸素刺激モデルを用いた臓器の虚血耐性を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) ミトコンドリア機能と心不全の予後についての検討

当院にて入院加療を受けた特発性拡張型心筋症を対象として、治療により心機能が改善した群 (LVRR(+)) と、心機能の改善が見られなかった群 (LVRR(-)) に分けて、Tc-MIBI 心筋シンチ洗い出し率 (WR) を比較した。尚、健常者の WR は 7-16% である。治療に反応を示し心機能が改善した LVRR(+)-群の Tc-MIBI 洗い出し率は、LVRR(-)-群に比べ有意に低値であることが示された (図 1)。この結果はヒト心不全において、ミトコンドリア機能と治療反応性との関係を示す結果であり、ミトコンドリア機能改善を目的とした治療の妥当性を支持しているものと考えられる。

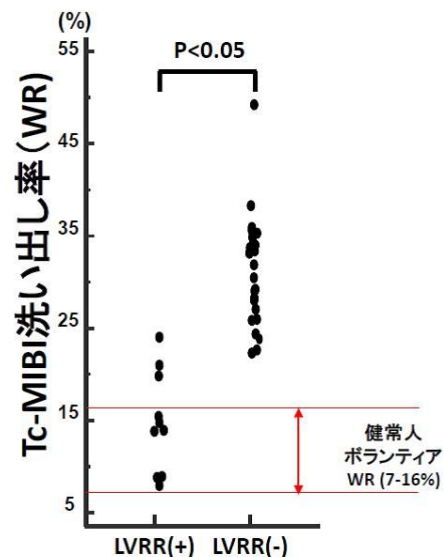


図 1. TC-MIBI 洗い出し率と左室リバースリモデリング (LVRR) の関係

#### (2) G0s2 を標的とした治療開発に向けた G0s2 蛋白分解機構の解明

siRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、G0s2 の E3 リガーゼの探索を行い、候補遺伝子を同定に成功した。現在更に詳細な生化学的解析を行うことで、ユビキチン化部位の同定、および機能解析として G0s2 分解抑制により ATP 合成活性が増強することを確認するために研究を進めている。

#### (3) 動物モデルを用いた G0s2 の臓器保護作用の評価

心臓特異的 G0s2 トランスジェニックは、低酸素指摘に対して虚血耐性を示すことが示

された(図2)。一方で G0s2 ノックアウトゼブラフィッシュは低酸素刺激に対する虚血耐性が弱いことが示された(図3)。これらのことから、生体内で G0s2 発現を上昇させる治療法は、心機能改善をもたらす可能性が示唆された。

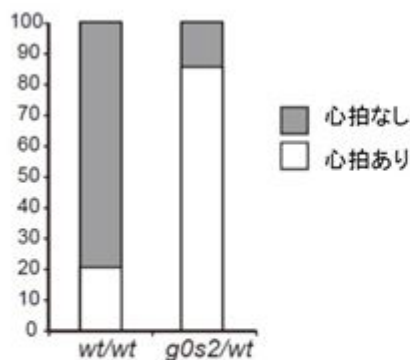


図2. 低酸素刺激(3%酸素 50分)後の心拍の有無  
心臓特異的G0s2トランスジェニックゼブラフィッシュ  
(g0s2/wt)は虚血耐性が強い

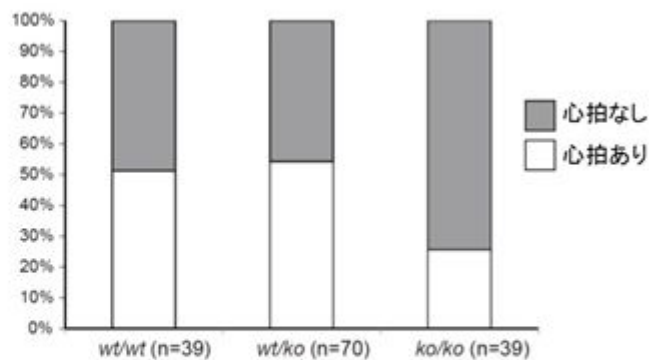


図3. 低酸素刺激(5%酸素 50分)後の心拍の有無  
ノックアウトゼブラフィッシュ(ko/ko)は虚血耐性が弱い

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件 全て査読あり)

1. Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S, Inanobe A, Matsuura N, Kobayashi H, Ohno S, Ebana Y, Tsukamoto O, Ishino S, Takuwa A, Kioka H, Yamashita T, Hashimoto N, Zankov DP, Shimizu A, Asakura M, Asanuma H, Kato H, Nishida Y, Miyashita Y, Shinomiya H, Naiki N, Hayashi K, Makiyama T, Ogita H, Miura K, Ueshima H, Komuro I, Yamagishi M, Horie M, Kawakami K, Furukawa T, Koizumi A, Kurachi Y, Sakata Y, Minamino T, Kitakaze M, Takashima S. Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation. *Circulation*. 2019 Feb 15. [Epub ahead of print]
2. Takahashi Y, Kioka H, Shintani Y, Ohki A, Takashima S, Sakata Y, Higuchi T, Saito S. Detection of increased intracerebral lactate in a mouse model of Leigh syndrome using proton MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging*. 2019 Jan 19;58:38-43.
3. Chimura M, Ohtani T, Tsukamoto Y, Kioka H, Katsimichas T, Onishi T, Nakamoto K, Konishi S, Sengoku K, Miyawaki H, Hikoso S, Yamaguchi O, Sakata Y. Ratio of pulmonary artery diameter to ascending aortic diameter and severity of heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2018 Nov;37(11):1341-1350.
4. Katsimichas T, Ohtani T, Motooka D, Tsukamoto Y, Kioka H, Nakamoto K, Konishi S, Chimura M, Sengoku K, Miyawaki H, Sakaguchi T, Okumura R, Theofilis K, Iida T, Takeda K, Nakamura S, Sakata Y. Non-Ischemic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction Is Associated With Altered Intestinal Microbiota. *Circ J*. 2018 May 25;82(6):1640-1650.
5. Ishihara S, Kioka H\*(corresponding author), Ohtani T, Asano Y, Yamaguchi O, Hikoso S, Toda K, Saito Y, Sawa Y, Takihara K, Sakata Y. Successful treatment of severe combined post- and pre-capillary pulmonary hypertension in a patient with idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Pulm Circ*. 2018 Jul-Sep;8(3):2045894018770131.
6. Taniguchi T, Ohtani T, Kioka H, Tsukamoto Y, Onishi T, Nakamoto K, Katsimichas T, Sengoku K, Chimura M, Hashimoto H, Yamaguchi O, Sawa Y, Sakata Y. Liver Stiffness Reflecting Right-Sided Filling Pressure Can Predict Adverse Outcomes in Patients With Heart Failure. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018 Jan 12. pii: S1936-878X(17)31139-7.
7. Saito Y, Ohtani T, Kioka H, Onishi T, Tsukamoto Y, Nakamoto K, Taniguchi T, Nakatani S, Hirayama A, Sakata Y. Clinical Significance of Pulmonary Arterial Capacitance Calculated by Echocardiography in Patients With Advanced Heart Failure. *Circ J*. 2017 Nov 24;81(12):1871-1878.

8. Tsuchiya H, Kioka H\*(corresponding author), Ozu K, Ohtani T, Yamaguchi O, Yazaki Y, Yamauchi-Takahara K, Sakata Y. Interferon Therapy Exacerbated Pulmonary Hypertension in a Patient with Hepatitis C Virus Infection: Pathogenic Interplay among Multiple Risk Factors. Intern Med. 2017;56(9):1061-1065.

9. Sakamoto Y, Kioka H\*(corresponding author), Hashimoto R, Takeda S, Momose K, Ohtani T, Yamaguchi O, Wasa M, Nakatani S, Sakata Y. Cardiogenic shock caused by a left mid-ventricular obstruction during refeeding in a patient with anorexia nervosa. Nutrition. 2017 Mar;35:148-150.

10. Masumura Y, Higo S, Asano Y, Kato H, Yan Y, Ishino S, Tsukamoto O, Kioka H, Hayashi T, Shintani Y, Yamazaki S, Minamino T, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S, Sakata Y. Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. Sci Rep. 2016 Jun 27;6:28592.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 第 82 回日本循環器学会学術集会シンポジウム ” Analysis of genetic variants and chamber specific RNAexpressions in patients with advanced heart failure.”, 口述 木岡秀隆, 2018/3/24
2. The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension 2/28/2018, Nice, France  
“ GENETIC ANALYSIS AND CHAMBER SPECIFIC GENE EXPRESSION ANALYSIS IN PATIENTS WITH CPC-PH AND IPC-PH ” ポスター発表 木岡秀隆 2018/2/28
3. 第 20 回日本心不全学会学術集会 シンポジウム 札幌  
Mitochondrial Energy Metabolism and Potential Metabolic Therapy for Heart Failure  
木岡秀隆 2016 年 10 月 7 日

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学  
<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂田 泰史

ローマ字氏名：SAKATA YASUSHI

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：00397671

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。