

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19388

研究課題名(和文) 心筋細胞エネルギー代謝に着目した右心不全治療法の開発

研究課題名(英文) therapeutic strategy for right heart failure considering energetic metabolism of cardiomyocytes

研究代表者

牧 尚孝 (Maki, Hisataka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00748147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞の収縮・拡張過程ではアデノシン三リン酸(Adenosine Triphosphate, ATP)が必要である。肺高血圧に伴う右室後負荷の増加は右室心筋におけるエネルギー(ATP)需要を大幅に増加させると考えられる。我々は右室心筋細胞のエネルギー代謝、特にATP産生と消費のミスマッチが右心不全を増悪させているとの仮説を構築し、その病態解明を目指して研究を行った。その結果、左室心筋と比較して右室心筋細胞におけるATP産生が減弱していることを見出した。併せて肺動脈縮窄術により右室肥大から右心不全を引き起こす病態モデルを樹立した。このモデルは右心不全病態解明に資すると考えられた。

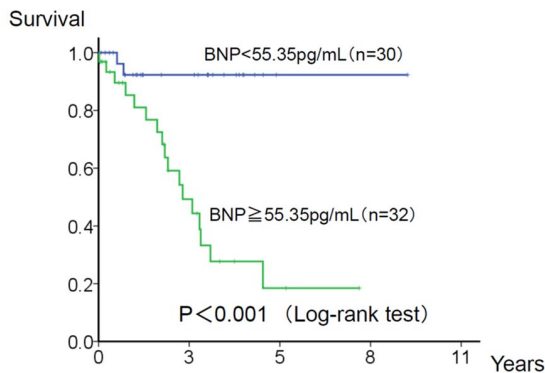
研究成果の概要(英文)：Adenosine Triphosphate (ATP) is consumed in a cardiomyocyte during its contraction process. Elevation of pulmonary artery pressure seemingly increases the ATP demand in the right ventricle. We now have a hypothesis that a mismatch between ATP demand and its production takes place in the hypertrophied heart of right ventricle, leading to a development of right ventricular failure. In this study, we evaluated oxygen consumption and ATP production in right or left ventricular cardiomyocytes and found that ATP synthesis is significantly decreased in right ventricle compared with that in left ventricle. We also mice performed pulmonary artery banding (PAB) and established an in vivo model of right ventricular hypertrophy and heart failure, which we believe will be useful in studying the pathological processes of right ventricular heart failure.

研究分野：Cardiology

キーワード：heart failure pulmonary hypertension

## 1. 研究開始当初の背景

近年エンドセリン受容体拮抗薬などの薬物治療の進歩により肺高血圧症の予後は著しく改善しているが、依然として数多くの症例が治療抵抗性であり予後不良なままとなっている。肺動脈圧の上昇は右室肥大を引き起こし、右心不全の原因となる。我々はこれまで数多くの肺高血圧症例の治療に携り、その病態機構の解明に取り組んできた。これまでの臨床研究において、右心不全が肺高血圧症例の予後増悪因子であることを確認している(下図、J Artif Organs (2012) 15:200-203, J Thorac Cardiovasc Surg. 2010 May; 139(5):1316-24)。肺高血圧症に伴う右室リモデリング機構を解明する事は臨床循環器病学において極めて重要な課題となっているものの、これまでその分子機構は明らかでは無かった。



近年の研究から、先天性心疾患に伴う右室負荷症例において、細胞の低酸素応答および細胞内代謝調節において中心的な役割を果たす転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF)-1 遺伝子の多型が右心不全の発症に大きく関わることが報告されている(Pediatric Research, 2012;72,407)。遺伝子改変マウスを用いた検討においても、HIF-シグナルはまた、肺高血圧、右心不全の発症に関与することが知られている(HIF-2 欠損マウス、Blood 2009;114,469)。

肺高血圧による後負荷の増加は右室心筋におけるエネルギー(ATP)消費を大幅に増加させると考えられる。このような背景から申請者は現在、本研究において、申請者は右室心筋細胞のエネルギー代謝、特にその収縮・拡張機能に必須であるアデノシン三リン酸(Adenosine Triphosphate, ATP)産生とその消費のミスマッチが右心不全を増悪させているとの仮説を構築している。

## 2. 研究の目的

我々は現在、右心不全の発症において右室心筋のエネルギー不全が大きく関わっているとの仮説を構築し、本研究を計画している。右室心筋細胞における ATP 産生、細胞内エ

ネルギー代謝のプロセスにつき、左室心筋細胞と比較して解析することで、右室心筋細胞特有の細胞内機構を明らかにすることを目的とする。

併せて右室負荷および右室不全の病態を反映する動物モデルの樹立に着手する。両アプローチを行うことで、最終的に右心不全病態の基盤となる細胞内エネルギー代謝機構を同定することを目指す。

## 3. 研究の方法

右室負荷、右心不全病態における心筋細胞代謝様式の役割を解析すべく、本研究では以下2つのアプローチを行う。

A ; 右室心筋細胞におけるエネルギー代謝、ATP レベル計測

右室心筋細胞の代謝プロファイルを解析すべく、1. Langendorff 灌流法を用いて心筋細胞を単離し細胞外フラックスアナライザー(XF24)を用いて心筋細胞の酸素消費量測定を行う。また2. Microwave Fixation 法を用いた右室および左室心筋組織のATP レベル測定を行うと共に、安定同位体標識グルコース(<sup>13</sup>C-Glucose)トレーサー法による *in vivo* 心筋糖代謝動態の解析を行う。

B ; 右室負荷・右心不全病態モデルの創出

右心不全の病態における心筋細胞代謝変容の役割を解析するために、右心室に対して後負荷を増強させるべく縮窄術(Pulmonary artery banding, PAB)を行う。PAB 術における縮窄率の検証を行うことで、まず右室肥大、引き続いて右心不全を引き起こす病態モデルの確立を目指す。右心不全病態モデルの樹立に成功した後に、上記右室心筋細胞単離および *in vivo* における代謝プロファイル様式の検証を行う。これら研究アプローチについては連携研究者(東京大学 武田憲彦)と共に行う。

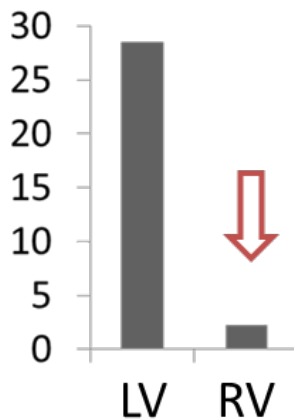
## 4. 研究成果

A ; 右室心筋細胞におけるエネルギー代謝、ATP レベル計測

まず最初に単离心筋細胞における酸素消費量を測定する解析系樹立に着手した。Langendorff 灌流法を用いて右心室および左心室心筋細胞を単離した。引き続き細胞外フラックスアナライザーでの *in vitro* 解析につき実験条件の調整を行った。その結果、単离心筋細胞を接着させ、酸素消費量を測定する解析系の樹立に成功した。この系を用いて右室・左室心筋細胞の酸素消費量を測定したところ、左室心筋細胞と比較して右室心筋細胞の酸素消費量が有意に低下していることを明らかにした。

引き続き右室・左室心筋組織における ATP 含有量の計測を行った。右室心筋組織では左室と比較して有意に ATP 産生量が低下していることを確認した（下図）。

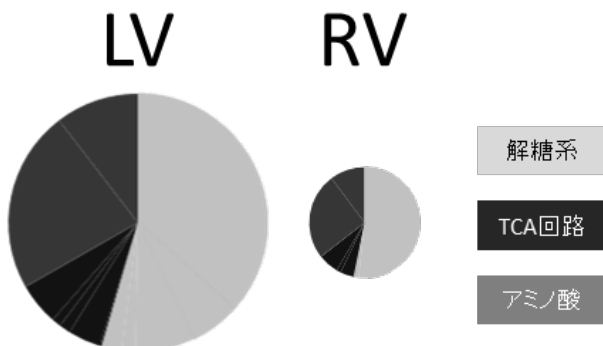
## ATP 産生量 / protein(mg)



上記知見から、右室心筋細胞ではミトコンドリア活性が低下している可能性が考えられた。この原因としてミトコンドリア電子伝達系の機能低下、またはグルコースをはじめとする心筋細胞代謝基質の取り込み減弱が考えられた。

そこで右室における心筋代謝低下の分子機構を更に詳細に検討するために、安定同位体を用いたグルコーストレーサー法による解析を行った。その結果、右室心筋細胞においては左室と比較してグルコース取り込み効率が有意に低下していること、その一方で取り込まれたグルコースの代謝様式には大きな違いが無いことを確認した（下図）。

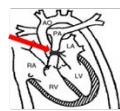
## <sup>13</sup>C-Glucose 取り込み



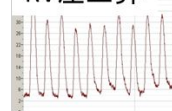
B ; 右室負荷・右心不全病態モデルの創出

右室肥大および右心不全の病態を再現する病態モデル樹立に着手した。その結果、マウス肺動脈に縮窄術 (Pulmonary artery banding, PAB) を施す事により、右心室への後負荷を増強させる病態モデルを作成することに成功した。興味深い事に、PAB 2 週間後に著しい右室肥大が引き起こされる一方、PAB 8 週間後には肝重量が増加し、右心不全を発症することを確認している（下図）。即ち左心室における Transverse aortic constriction (TAC) モデルと同様に、PAB は右室肥大・右心不全の病態モデルとして有用であると考えられた。今後、PAB 術により誘導した右室肥大・右心不全の心筋組織より心筋細胞を単離し、同じく本研究で樹立した心筋細胞代謝解析系を用いてその代謝様式を明らかにすることが期待できる。

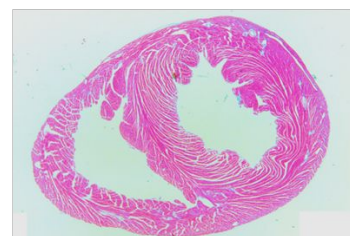
### PAB



### RV 圧上昇



2週間



右室肥大

8週間



右心不全

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 牧 尚孝  
(Maki Hisataka)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00748147

(2)研究分担者 無し  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 武田 憲彦  
(Takeda Norihiko)  
東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号：40422307

(4)研究協力者 無し  
( )