

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02807

研究課題名(和文) 内因性心筋炎症惹起分子制御機構の探索と心不全治療創薬への応用

研究課題名(英文) Investigation for a molecular regulatory mechanism inducing endogenous myocardial inflammation

研究代表者

大津 欣也 (OTSU, Kinya)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：20294051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の発症進展に炎症が重要な役割を果たしているため、無菌的炎症の発生機序に関わる分子が心不全治療標的となりうる可能性について検討した。炎症起点となるミトコンドリアDNAの分解を担うDNaseIIの発現に関わるmicroRNAを同定し、このmicroRNAがマウス心不全モデルにおいて心不全発症進展機構に関与していることが明らかとなった。また、HMGB1が炎症を介して心不全発症に関与していることが明らかとなった。さらに、TLR9阻害薬の心不全発症進展抑制作用や、心筋細胞内におけるサイトカインmRNA分解の重要性について報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、炎症メカニズムの下流に位置するサイトカインに対する介入では心不全の予後改善効果を得られなかった。本研究では、当該microRNAとHMGB1のいずれもが心不全発症進展メカニズムの一つである無菌性炎症に関わっており、炎症メカニズムの上流に位置する分子経路への介入が心不全治療標的となり得る可能性について示した。これらの結果は、今後の新しい心不全治療戦略に繋がることが期待され、学術的にも社会的にも意義深い。

研究成果の概要(英文)：Inflammation plays an important role in the development and progression of heart failure. We investigated a molecular mechanism in the induction of sterile inflammation to find a novel therapeutic target for the treatment to heart failure. 1) We identified a microRNA that regulates the expression of DNase II, which degrades inflammatogenic mitochondrial DNA. In addition, we revealed that the microRNA is related to the pathogenesis of heart failure in a mouse heart failure model. 2) It was revealed that HMGB1 is related to the development of heart failure through the induction of inflammation. 3) We reported that an TLR9 inhibitor attenuates the development and progression of heart failure in mice, and that cytokine mRNA degradation in cardiomyocytes regulates inflammation in the heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 炎症 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であり先進国における主要な死亡原因の一つである。ヒトの心不全において、炎症性サイトカインの血中濃度が心不全の重症度や予後と強い相関を有する事、また拡張型心筋症や虚血性心筋症において炎症細胞の浸潤が認められる事が報告されており、心不全発症進展過程において炎症が重要な役割を果たしている事は世界的にも既にコンセンサスが得られている。しかしながらこれまでの先行研究では、抗 TNF $\alpha$  治療など分泌された個々のサイトカインを標的とした薬剤では心不全の予後改善効果は得られず、炎症反応への介入について創薬標的としての期待は縮小した。その原因として不全心における炎症が単一のサイトカインのみならず、種々のサイトカイン・炎症細胞が複雑に絡み合った病態と考えられることが挙げられる。そこで本研究課題では、下流の炎症性サイトカインへの介入ではなく上流の無菌性炎症反応誘導分子機構への介入が心不全への治療効果を有するとの仮説を立てた。不全心において炎症を惹起する病原微生物が検出される症例は 10%程度とされており、不全心において無菌的に生じる炎症の原因は長らく不明であった。われわれは心筋細胞において主たるリソソーム酸性エンドヌクレアーゼである Deoxyribonuclease II(DNase II)の活性低下により、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の蓄積が生じることが不全心における炎症の一因であることを明らかにした (Nature 2012)。さらに、ヒト病理組織を用いた検討においても DNaseII 発現量低下や mtDNA 蓄積が一部の不全心において認められたのに対して、正常心では mtDNA 蓄積がほとんど認められなかったことから (未発表データ)、mtDNA 分解不全が無菌性炎症と心不全発症に関わっていることが強く示唆された。しかしながら、この DNaseII 発現量が不全心において低下する機構については全く不明である。さらに、無菌的炎症に関わる分子機構として、死細胞などに由来する内在性の傷害関連分子パターン(damage-associated molecular patterns, DAMPs)のうち主要な分子である HMGB1(High Mobility Group Box 1)が、インフラマソームなどの内因性炎症を誘導することが報告されている。他にも内因性の炎症惹起に関わる分子は多数報告されており、中でも我々はエイコサノイド合成の起点であるアラキドン酸産生に関わる鍵分子であるホスホリパーゼ A2 が、圧負荷時の心筋炎症惹起に非常に重要な働きをしているとの予備的検討結果を得ている。本研究課題における最大の問いは、こうした内在性炎症に関わる分子経路の上流への介入が心不全治療標的となりうるのか、という点にある。既に心筋特異的 DNaseII 過剰発現マウスにおいて異常 mtDNA 蓄積が阻害された結果、心不全治療効果が得られるとの予備的検討結果を得ており、この仮説についての POC は得られている。HMGB1 やホスホリパーゼを含めた種々の内因性炎症惹起機構の制御機構についても同様に POC を得た上でその制御機構について網羅的検討を行うことにより、本研究課題を遂行する。

## 2. 研究の目的

本研究では心臓における無菌的炎症の分子機構解析を通じて、心筋細胞および心臓における炎症反応への介入をおこなうことが心臓保護的に機能しうるか否かについての解明を目的とし、最終的には心不全の新規治療分子標的を解明し、心不全の新たな治療法の開発に繋げることを目標とするものである。

前述のごとく、DNaseII 発現量が低下し、その結果ストレスを受けた心臓でのミトコンドリア分解過程が完遂されず、mtDNA が蓄積し、TLR9 を介して心筋炎症と心不全を惹起していると考え、DNaseII 発現量低下をもたらす分子機構の解明

以上より我々は、無菌性炎症の上流に位置する鍵分子の候補として、これら 3 つの経路を中心にその生理的病態的機能を解明するとともに、心筋炎症から心不全にいたる病態の治療標的としての可能性を探ることを本研究課題の目的とした。

本研究では動物実験レベルだけではなく、基礎研究で得られた成果と臨床検体に由来する情報が統合されており、当初から特異的治療戦略が未だに存在しない重症心不全に対する臨床応用という出口に繋げることを意識した研究提案であり、成果は社会への還元に直接つながるものと期待される。さらに無菌的炎症反応は、動脈硬化や心不全などの心血管疾患のみならず、糖尿病を含めた生活習慣病など非常に広範囲な疾患との関わりが知られており、近年は神経疾患との関与も多く報告されている。すなわち本研究によって得られる知見は、幅広い分野への波及効果を有するものと期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、(I) ミトコンドリア DNA 蓄積による心不全発症において DNaseII 発現量の低下を惹起する分子機構の網羅的解析、(II) どのようなミトコンドリア DNA が心筋炎症を惹起するのか、(III) 心筋細胞由来の HMGB1 が内因性心筋炎症を惹起する分子機構についての解明、(IV) ホスホリパーゼ A2 が誘導するエイコサノイドが心筋炎症について果たす役割の解明と、その制御機構の解析、を中心として研究をすすめる。特に DNaseII 発現量低下機構について優先的に網羅的解析を行う。

(I) DNaseII 発現制御機構の解明

- a. microRNA(miR)ライブラリ(約3000種類)を用いて、DNaseII発現制御に関わるmiRを網羅的にスクリーニングする。解析のためのベクターは作成済みである。その後同定したmiRおよびanti-miRの機能解析をin vitroおよびin vivoで行う。
  - b. anti-miR発現AAVによる心不全病態モデル動物に対する治療効果の評価を行う。
  - c. CHIP-seqによりDNaseII発現調節領域結合蛋白質を同定し、分子機構を解析する。
  - d. 成獣マウスから単離した心筋細胞に、siRNA libraryを導入し網羅的に遺伝子を欠失させ、GPCRアゴニストで刺激してDNase II活性を測定する。
  - e. d, eで同定したDNA分解調節分子の遺伝子改変マウス(KOおよびTG)を作製し、心不全病態モデルを作成しin vivoでの役割を検討する。
  - f. 大阪大学医学部附属病院の倫理委員会にて承認を受けた後に、重症不全心臓の心筋生検サンプルを用いてDNaseII発現量を評価し、同時にaで同定したmiRもしくはd, eで同定した新規因子の発現量を評価し、ヒト病態における調節機構を検討する。
- (II) 酸化mtDNA、メチル化mtDNAなどの修飾を行った変性mtDNAを用い、炎症惹起性を評価する。mtDNA特異的な修飾酵素の遺伝子改変マウスを作成し病態モデルにおける評価を行う。
- (III) HMGB1心筋細胞特異的欠損マウスの作成並びに病態モデルにおける解析
- (IV) iPLA2beta心筋細胞特異的欠損マウスの作成並びに病態モデルにおける解析
- (III), (IV)については上記検討でPOCを得た後、Iと同様な方法で分子機構を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (I) DNaseII発現制御機構の解明

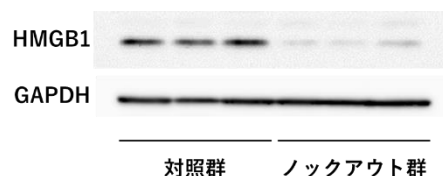
心筋特異的DNaseII過剰発現マウスにおいて異常mtDNA蓄積が阻害された結果、心不全治療効果が得られることについて、詳細な解析を行い、組織学的、生化学的なデータを得た。また、microRNA(miR)ライブラリ(約3000種類)を用いて、DNaseII発現制御に関わるmiRを網羅的にスクリーニングした結果、候補となるmiRを得た。当該miRは心不全モデルにおいて増加していること、またヒト心不全サンプルにおいても上昇していることを確認した。しかしながら、このmiRに対するanti-miRをマウス心臓特異的に発現する効果を持つAAVの作製に難渋し、継続して検討を行っている。

(II) 酸化mtDNA、メチル化mtDNAなどの修飾を行った変性mtDNAを用い、炎症惹起性を評価する。mtDNA特異的な修飾酵素の遺伝子改変マウスを作成し病態モデルにおける評価を行う。

mtDNAを用い、炎症惹起性について評価を行ったが、ポジティブなデータを得ることが出来ず、本研究期間中にmtDNA特異的な修飾酵素の遺伝子改変マウスを作成するに至ることが出来なかった。

##### (III) HMGB1心筋細胞特異的欠損マウスの作成並びに病態モデルにおける解析

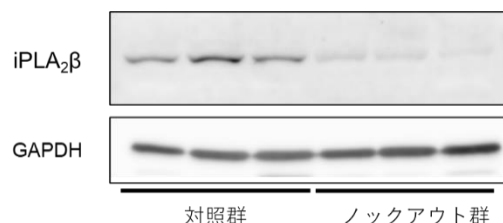
floxed HMGB1マウスと心臓特異的Cre recombinase発現マウスを交配し、心筋細胞特異的HMGB1欠損マウスを得た(図1)。このマウスは対照群と比べて、明らかな心臓表現型を認めなかったため、横行大動脈縮窄手術(TAC)を施行したところ、ノックアウト群で左心不全を発症した。また、これらの表現型に対する炎症の関与が示唆された。この表現型のメカニズムについての検討や、表現型を抑制する薬剤などについての検討を続けている。



(図1) 心筋細胞特異的HMGB1欠損マウスにおけるHMGB1のタンパク質発現量

##### (IV) iPLA2beta心筋細胞特異的欠損マウスの作成並びに病態モデルにおける解析

floxed iPLA2betaマウスと心臓特異的Cre recombinase発現マウスを交配し、心筋細胞特異的iPLA2beta欠損マウスを得た(図2)。このマウスは対照群と比べて、明らかな心臓表現型を認めなかったため、横行大動脈縮窄手術(TAC)を施行したところ、対照群で左心不全を発症する時期に、ノックアウト群では心臓の構造や機能が保たれていた。しかし、組織学的および生化学的評価にて炎症が主たる病因とは考えられなかった。これらの結果より本研究課題の炎症とは異なるメカニズムが想定されるため、この表現型のメカニズムについての検討は異なるプロジェクトとして行う予定である。



(図2) 心筋細胞特異的iPLA2beta欠損マウスにおけるiPLA2betaのタンパク質発現量

(以上、すべて未発表データ。)

なお、本研究課題に関連する研究として、TLR9 阻害薬の心不全発症進展抑制作用、心筋細胞内におけるサイトカイン mRNA 分解の重要性、オートファジー性フェリチン分解の心不全発症における役割について報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito Jumpei, Omiya Shigemiki, Rusu Mara-Camelia, Ueda Hiromichi, Murakawa Tomokazu, Tanada Yohei, Abe Hajime, Nakahara Kazuki, Asahi Michio, Taneike Manabu, Nishida Kazuhiko, Shah Ajay M, Otsu Kinya	4. 巻 10
2. 論文標題 Iron derived from autophagy-mediated ferritin degradation induces cardiomyocyte death and heart failure in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e62174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62174	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
1. 著者名 Klionsky Daniel J. et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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
1. 著者名 Omiya Shigemiki, Omori Yosuke, Taneike Manabu, Murakawa Tomokazu, Ito Jumpei, Tanada Yohei, Nishida Kazuhiko, Yamaguchi Osamu, Satoh Takashi, Shah Ajay M., Akira Shizuo, Otsu Kinya	4. 巻 141
2. 論文標題 Cytokine mRNA Degradation in Cardiomyocytes Restrains Sterile Inflammation in Pressure-Overloaded Hearts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 667~677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044582	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
1. 著者名 Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Taneike Manabu, Akazawa Yasuhiro, Wada-Kobayashi Haruko, Sugihara Ryuta, Yorifuji Hiroki, Nakayama Hiroyuki, Omiya Shigemiki, Murakawa Tomokazu, Sakata Yasushi, Otsu Kinya	4. 巻 4
2. 論文標題 Administration of a TLR9 Inhibitor Attenuates the Development and Progression of Heart Failure in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 348~363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2019.01.002	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

1. 著者名 Murakawa Tomokazu, Okamoto Koji, Omiya Shigemiki, Taneike Manabu, Yamaguchi Osamu, Otsu Kinya	4. 巻 26
2. 論文標題 A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 338 ~ 345.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.050	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2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大津欣也
2. 発表標題 The role of autophagy in cardiac remodelling
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 種池学
2. 発表標題 Ferritin degradation mediated by autophagy leads to cardiomyocyte death and heart failure by inducing iron release in mouse pressure-overload hearts
3. 学会等名 第37回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2021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	種池 学  (TANEIKE Manabu)  (30609756)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山口 修  (YAMAGUCHI Osamu)  (90467580)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	King's College London			