

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590825
 研究課題名（和文） p53, SCO2 による心筋ミトコンドリア好氣的エネルギー代謝調節と心筋細胞死
 研究課題名（英文） Regulation of mitochondrial energetics and cell death by p53 and SCO2

研究代表者
 的場 聖明（MATOBA SATOAKI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：10305576

研究成果の概要：

p53 により転写制御される細胞内シグナルとして TIGAR(TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator)及びミトコンドリアの構成蛋白である SCO2(Synthesis of Cytochrome c Oxygenase 2)が、細胞のエネルギー代謝を調節しマウス、ラットを用いて虚血時における心筋の生存に関わっている事を発見証明した。この成果は、今後の臨床治療研究に結びつく。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア、p53、エネルギー代謝、アポトーシス、心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

心不全は、種々の病因による心臓病の終末像であるが、心不全の成因において常に心筋エネルギー代謝の変化が中心的役割を果たしている。Framingham研究では、心拍数が高いほど総死亡および心血管死亡が多いと報告されており、拡張型心筋症患者において磁気共鳴スペクトロスコピー (magnetic

resonance spectroscopy: MRS)により高エネルギーリン酸を測定すると心筋クレアチニンリン酸/ATP比 (PCr/ATP) の低値は、長期予後不良の予測因子と報告されている。BMIPP心筋シンチグラムの評価により脂肪酸代謝による好氣的代謝の障害の程度が心不全の予後予測に有用とも報告されており、心筋エネルギー

ギー代謝が心不全の予後規定因子とも考えられるが、エネルギー代謝異常の点から心筋の収縮不全に至る細胞内機序は、充分には解明されていない。心不全患者の予後は、薬物療法の進歩により改善しているが、慢性心不全に対して予後改善効果を示した薬物（ACE阻害薬、β遮断薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬）は、いずれも前負荷、後負荷、心拍数の減少効果などにより心筋酸素消費量減少作用を有している。しかし、これらの治療の進歩にも関わらず、心不全患者の総数は増え続けており、現在、既存の薬剤による細胞保護メカニズムを上回る積極的治療法が求められている。

申請者は、SAGE（Serial Analysis of Gene Expression）による遺伝子解析から、細胞のcell cycleやアポトーシス制御を通して“ゲノムの守護神”とされている癌抑制因子 p53 が SCO2(Synthesis of Cytochrome Oxidase 2)を介してミトコンドリアの好氣的代謝を直接制御し、さらにそれが運動耐用能を規定していることを初めて発見した。

(Science 2006:312:1650)。すなわち、マウス及びヒトにおけるミトコンドリア好氣的代謝による酸素消費量がp53によって調節されていることを世界で初めて見だし、遺伝子ライブラリーからp53依存性ミトコンドリア関連遺伝子としてSCO2を初めて同定し、分子生物学的にその関与を証明した。また、申請者は、ラット心不全モデルにおいてp53蛋白の心筋での発現が増加していることを見いだした。現在、米国立衛生研究所における p53 遺伝子変異患者 (Li-Fraumeni syndrome) の運動耐用能評価プロジェクトの臨床研究に参加している。

2. 研究の目的

前述の世界で初めて明らかになった研究成果であるp53依存性ミトコンドリア好氣的

代謝調節機序を利用して、新たな心不全改善治療に応用実現化させる研究目的は下記である。

- 1) 心不全時におけるp53・SCO2の心筋代謝制御機構の解明（ラット・マウス）
- 2) p53・SCO2の導入またはノックダウンによる心筋好氣的代謝調節を利用した心不全治療の検討

3. 研究の方法

(1)マウス心不全モデルを用いたミトコンドリア機能・定量研究および心筋エネルギー代謝の評価

エネルギー代謝からみた心不全モデルとして、ラットを用いて①エネルギー供給障害モデル(心筋梗塞モデル)②エネルギー利用障害モデル(糖尿病性心筋症モデル、アドリアマイシン心筋症モデル)③エネルギー過消費モデルとして肥大心モデル（腹部大動脈狭窄モデル）を作製し、経時的に心臓超音波検査にて心機能を評価し、心不全初期、中期、後期における左心機能をミラーカテーテルにて計測後、心臓を摘出しミトコンドリアを抽出する。

基本的なミトコンドリアの機能解析は、従来から用いられているクラーク型酸素濃度計による酸素消費量測定及び比色光度計による Cytochrome Oxidase C complex の酵素活性、乳酸産生能を測定し心筋代謝の指標とする。ミトコンドリア膜電位測定は、TMRM 染色及び JC-1 染色にて行い、蛍光顕微鏡及び、FACS により観察解析を行う。ミトコンドリアのバイオジェネシスの影響を検討するため、細胞を 10-nonyl acridine orange(NAO)により染色し FACS にて解析定量する。また、Real time PCR 法を用いて、ミトコンドリア遺伝子である COXI と核遺伝

子 (PPRC1, C17) の DNA 量を定量する。本研究では、ミトコンドリア蛋白に変化がみられた際に、blue native gel 法により、その構成蛋白の検討を行う。また電子顕微鏡によるミトコンドリア超微形態の検討も行う。心筋エネルギー代謝の検討には、HPLC を用いて高エネルギーリン酸化合物を測定し、心筋内乳酸及びグリコーゲン含量の比色法による測定と酸素消費能から嫌氣的解糖と好氣的代謝の比を評価する。

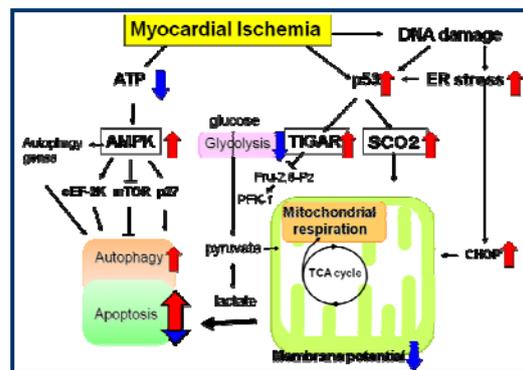
(2)p53 ノックアウトモデルを用いたミトコンドリア機能・定量研究および心筋エネルギー代謝の評価

申請者は、p53 ノックアウトマウスが、その野生型に比べ心筋細胞にアポトーシスが起こりにくく、アドリアマイシンによる心不全に対して耐性であることを報告しているが (Mol Cell Biochem 2005 273:25)、p53 野生型、ヘテロ接合体、ノックアウトマウスを用いて、心筋梗塞モデル、糖尿病モデルを作製し、その心筋ミトコンドリア機能解析を前述と同様に行う。

4. 研究成果

心筋の虚血急性期において、低酸素に対する応答として虚血部位の脂肪酸代謝が低下し解糖系亢進から、一時的に糖代謝が亢進する。しかし持続する虚血やDNA損傷のためp53が活性化し、SCO2, TIGARの誘導、AMPK活性化にも関わらず、糖代謝が低下し始める。その結果、ミトコンドリアの膜電位の低下によるアポトーシスが誘導され、増加する小胞体ストレスは、p53を介さない経路でもCHOPを介してアポトーシスを誘導する事がわかった。(図1)

SCO2 蛋白の生理的発現の手法の開発のために、薬剤誘発性 SCO2 蛋白を発現させるモデル、アデノウイルスによる心筋細胞への蛋白発現モデルを用いて心筋のミトコンドリア機能の変化を解析した。本研究では、マウスの心不全モデルを用いて p53 蛋白の下流の SCO2, TIGAR をノックアウトしたマウスを用いてその影響を検討し、AMPK 活性とアポトーシス・オートファジーの関連を証明した。(投稿準備中)

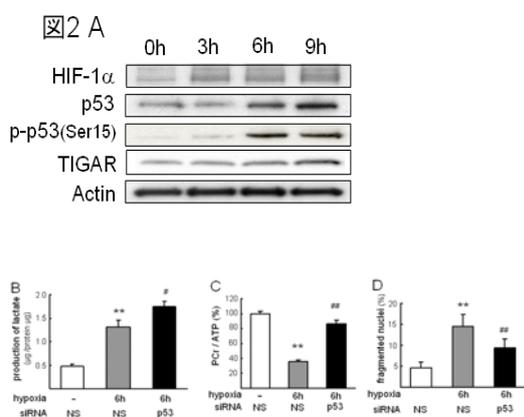


(図1) 虚血時 p53 活性後の代謝応答と細胞応答

引き続きその経路のシグナルの研究を開始し、p53 の上流に位置すると考えられる酸化ストレスや小胞体ストレスによる p53 の発現調節機構の関与も証明した (投稿準備中)。将来的展望として、薬剤の投与によりラット及びマウスの p53 の誘導、抑制に成功しており、心臓、骨格筋における p53 による代謝調節の全容解明と治療標的を決定できると考えている。

また、ラット新生仔培養心筋細胞を用いて低酸素刺激やアドリアマイシン投与で早期から p53 タンパクが誘導され、p53 の誘導に伴いその下流にあってミトコンドリア好気代謝に関わる SCO2、解糖系抑制に関わる TIGAR が発現することを発見した。また低酸素刺激において心筋細胞では解糖系が亢進しているが、p53 と TIGAR の

発現により解糖系が抑制されることを見出した。p53 抑制薬 (pifithrin- α) や p53, TIGAR の siRNA で p53 および TIGAR を抑制することで、低酸素下でのエネルギーソースとして重要となる解糖系がさらに亢進しており、心筋細胞内高エネルギーリン酸化合物が保たれていることを発見した。さらにこのときミトコンドリア膜電位が保たれており、アポトーシスによる細胞死が減少することを見出した (図 2A-D)。



これらの研究成果は American Heart Association Scientific Sessions 2007、Basic Cardiovascular Sciences Conference 2008、日本循環器学会総会 (2008 年度、2009 年度) などの学会にて発表しており、下記論文に報告している。

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 16 件)

- ① Shiraishi J, Matoba S et al. Pathogenesis of acute myocardial infarction in young male adults with or without obesity. **J Cardiol.** 49:13-21.2007.
- ② Ma W, Matoba S. et al. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. **J Bioenerg Biomembr.** 39:243-246. 2007
- ③ Tatsumi T, Matoba S et al. Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes

improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction.

Circ J 71:1199-1203.2007.

- ④ Shiraishi J, Matoba S et al. Obesity not associated with medium-term prognosis among Japanese male survivors hospitalized for acute myocardial infarction. **J Cardiol.** 50:93-100.2007.

- ⑤ Shiraishi J, Matoba S et al. In-hospital outcomes of primary percutaneous coronary interventions performed at hospitals with and without on-site coronary artery bypass graft surgery.

Circ J 71:1208-12.2007.

- ⑥ Matsui A, Matoba S et al. Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function.

Circulation 116:1041-51. 2007.

- ⑦ Kimata M, Matoba S. et al. p53 shifts the balance of energy source in cardiac myocytes. **Circulation** 2007;116:II_34-II_35.

- ⑧ Matoba S, Tatsumi T et al, TACT Follow-Up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (TACT Trial) in patients with chronic limb ischemia. **Am Heart J** 156:1010-1018. 2008.

- ⑨ Kimata M, Matoba S. et al. p53 is a new target to improve cardiac metabolism. **Circ Res.** 2008;103:e50-e50.

- ⑩ Takeda M, Matoba S. et al. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. **Hypertens Res.** 2007;30:427-437.

- ⑪ Shiraishi J, Matoba S et al. Effects of Hospital Volume of Primary Percutaneous Coronary Interventions on Angiographic Results and In-Hospital Outcomes for Acute Myocardial Infarction. **Circ J** 72:1041-1046. 2008.

- ⑫ Shiraishi J, Matoba S et al. Predictors of In-Hospital Outcome After Primary Percutaneous Coronary Intervention for Recurrent Myocardial Infarction. **Circ J** 72:1225-1229.

2008.

⑬ **的場聖明**、高橋知三郎、松原弘明
心血管難病に挑む再生医療
京都府立医科大学雑誌 117:10, p783-792,
2008

⑭ Matsunaga S, **Matoba S** et al.
Endothelium-targeted overexpression of
constitutively active FGF receptor induces
cardioprotection in mice myocardial infarction.
J Mol Cell Cardiol 46:663-673. 2009.

⑮ Noto Y, **Matoba S** et al. Cardiomyopathy in a
Japanese family with the Glu61Lys transthyretin
variant: a new phenotype.
Amyloid 2009 16:2:99-102

⑯ **Matoba S**, Matsubara H. Therapeutic
angiogenesis for peripheral artery diseases by
autologous bone marrow cell transplantation.
Curr Pharm Design 2009(in press)

[学会発表] (計 7 件)

① **Matoba S**, Kimata M, Tatsumi T,
Matsubara H, Hwang PM.
p53 regulates exercise capacity in mouse.

The 71st Annual Scientific Meeting of the
Japanese Circulation Society. (Kobe,
Japan)...(2007)

② Kimata M, **Matoba S**, Nakamura H,
Tatsumi T, Matsubara H.
p53 Shifts the Balance of Energy Source in
Cardiac Myocytes
American Heart Association Annual
Scientific Sessions 2007 (Orland Florida,
U.S.A)

③ **Matoba S**
p53: New Therapeutic Target for Heart
Failure
The 72nd Annual Scientific Meeting of the
Japanese Circulation Society. (Fukuoka,
Japan)...(2008)

④ Kimata M, **Matoba S**, Nakamura H,
Hoshino A, Nakaoka M, Hiraumi Y,
Iwai-Kanai E, Tatsumi T, Matsubara H.

p53 is a new target to improve cardiac
metabolism.

Basic Cardiovascular Sciences Conference
(Keystone, Colorado, U.S.A)
(2008)

⑤ p53 は嫌氣的解糖を抑制し低酸素による
心筋細胞のアポトーシスを増加させる
木股正樹、**的場聖明**、金井恵理、中村英夫
星野温、中岡幹彦、辰巳哲也、松原弘明
第 17 回日本アポトーシス研究会 学術集
会, 大津 2008

⑥ Kimata M, **Matoba S**, Iwai-kanai E,
Nakamura H Hoshino A Nakaoka M,
Hiraumi Y, Tatsumi T Matsubara H

Hypoxia-Induced p53 Deteriorates Cardiac
Energetics and Apoptotic Cell Death via
TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and
Apoptosis Regulator)

The 73rd Annual Scientific Meeting of the
Japanese Circulation Society. (Osaka,
Japan)...(2009)

⑦ Nakamura H, **Matoba S**, Iwai-kanai E,
Kimata M Hoshino A, Nakaoka M,
Hiraumi Y, Tatsumi T Matsubara H

p53 and SCO2 (Synthesis of Cytochrome c
Oxidase 2) Augments the Progression of
Diabetic Cardiomyopathy

The 73rd Annual Scientific Meeting of the
Japanese Circulation Society. (Osaka,
Japan)...(2009)

[その他]

表彰

平成 21 年 3 月 21 日 再生医科学賞
(臨床部門) 日本循環器学会

平成 21 年 4 月 14 日 文部科学大臣
表彰 科学技術賞 (開発部門)
文部科学省

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的場 聖明 (MATOBA SATOAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 10305576