

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08448

研究課題名（和文）リソソーム機能異常による心不全発症機構の解明

研究課題名（英文）The Molecular Mechanism of Heart Failure Caused by Lysosomal Dysfunction

研究代表者

山口 修（Yamaguchi, Osamu）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90467580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では心不全病態モデルとして新たにo-リングを用いた簡便かつ安定的な圧負荷モデルを開発し、論文報告した（Sci Rep. 2022;12(1):85）。このモデルでは横行大動脈にo-リングを用いることで、従来の方法に比べて安定的な心肥大誘導並びに心不全誘導を行えるものであり、海外を含めた多くの研究機関から問い合わせを受けるなどインパクトは大きかった。オートファジー抑制因子Rubiconの心不全発症における機能解析を終了し、論文報告を行った（Sci Rep. 2022;12(1):41）。Rubiconはベータ受容体の分解機構に関わり心保護的に機能していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全病態モデルとして新たなモデルを開発し、論文報告した（Sci Rep. 2022;12(1):85）。このモデルは従来の方法に比べて安定的な心肥大誘導並びに心不全誘導を行えるものであり、海外を含めた多くの研究機関から問い合わせを受けるなど大きなインパクトを与えた。また 受容体の分解やリサイクリングに関わる分子機構を解明し、論文報告を行った（Sci Rep. 2022;12(1):41）。これまでも心不全における 受容体の発現量変化は大きな問題であったが、その機構を明らかにしたことで新規の分子治療標的として今後の薬剤開発にあたってのキーとなる可能性をもたらした。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we developed a simple and stable pressure-load model using an o-ring as a new heart failure pathological model, and reported it in a paper (Sci Rep. 2022;12(1):85). This model, using an o-ring in the transverse aorta, can induce cardiac hypertrophy and heart failure more stably than the conventional method, and has received inquiries from many research institutions, including those overseas. We have completed functional analysis of the autophagy suppressor Rubicon in the pathogenesis of heart failure (Sci Rep. 2022;12(1):41) and reported in a paper that Rubicon is involved in the degradation mechanism of beta receptors and functions in a cardioprotective manner.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 分解 オートファジー リソソーム

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は他の慢性疾患と比しても極めて生命予後が不良であり、5年生存率はがんよりも低い約50%とされている。遮断薬やRAS系阻害薬、新たに開発されたARNIやSGLT2阻害薬を含めた既存の治療方法をもってしても、未だに十分な予後改善が望めるようになったとは言い難い。ヒトの心不全病態形成に関わる分子機構が未だに解明されておらず、がん治療薬のような分子標的薬が存在しないことが主たる理由と考えられる。

オートファジーは酵母から哺乳類まで真核細胞において広く保存された普遍的細胞内分解機構であり、分解基質はオートファゴソームによって隔離された後にリソソームとの融合によって分解される。私たちはこれまで、心臓・心筋細胞内におけるオートファジー性分解の機能解析を行い多くの重要な論文を発表してきた(Nature Med. 2007, Autophagy 2010, Nature 2012, JBC2013, Nature Commun. 2015, PLoS One 2016, Cell Reports 2019, JACC Basic Transl Sci. 2019)。中でも血行動態負荷によって誘導されるオートファジーが心保護機能を発揮するという報告(Nature Med. 2007)は、臓器におけるストレス誘導性オートファジーの機能に関する世界最初の報告であり、極めて高く評価されてきた。その後の国内外の研究成果により、適切な誘導性オートファジーが心保護作用を有するとの私たちが提唱したコンセプトは世界共通認識である。

ヒト心不全臨床病理標本を用いた私たちの予備的検討においては、心不全重症度とオートファゴソーム形成が逆相関していた。すなわち、ヒトの心不全病態においては、重症例ではオートファジー性分解が不十分であるがゆえ心保護機能を十分に果たせなくなっていると考えられる。消化器疾患や脳神経疾患の一部では、オートファジー関連分子の変異が疾患の原因として報告されている。しかしながら、未だにオートファジーコア蛋白質変異とヒト心不全の関連については全く報告がなかった。私たちは、リソソーム酵素の一つであるDNaseIIの発現量低下によって、オートファジー性ミトコンドリア分解の完遂が阻害されると、心不全が誘導されることを報告した(Nature 485:251-5,2012)。また、予備的検討として左室駆出率の低下した心不全患者の60%において、ミトコンドリアDNAがリソソーム内に蓄積していることを見いだした。細菌やウイルスなど病原体由来のRNA、DNAなどの核酸は自然免疫系受容体Toll-like receptor (TLRs)によって認識され、エンドソーム膜上に存在するTLR3、TLR7、TLR8、TLR9がその役割を担っている。ミトコンドリアDNAもTLR9を介した心筋炎症と心不全を誘導すること、TLRsのシグナル経路は心不全の新規治療薬ターゲットの一つである可能性を報告してきた。これらの成果を受けて、ヒト心不全はオートファジー遺伝子自体ではなく、オートファジー分解に関わるリソソーム機能の異常によって誘導される、すなわち『リソソーム機能不全がオートファジー性分解不全を介して心不全発症に関与するのではないか』との仮説を立てた。本研究では、血行動態ストレスがリソソーム機能を介して心臓オートファジーに及ぼす影響の解明と、リソソーム内水解酵素の動態を明らかにする。本研究により、心不全患者におけるオートファジー不全の原因が明らかとなり、心不全病態解明に直結すると期待される。

2. 研究の目的

従来のオートファジー研究は、その必須因子が直接関わる分子機構を対象として遺伝子改変動物などの解析を中心に展開されてきた。その結果、オートファジー自体の重要性は十分に解明されたものの、ヒト心不全病態におけるオートファジーの研究は未だ十分とは言えない。本研究では、オートファゴソームの形成過程やその制御機構に注目するのではなく、ヒト心不全において得られた知見に基づきリソソームに着目した研究である点が特徴である。心不全患者において、リソソームがオートファジー性分解を介して、病態形成へどのような役割を果たしているかを明らかにすることが目的である。本研究は、最終的には心不全の新規治療分子標的解明への発展への礎たるものである。本研究は特異的治療戦略が未だに存在しない心不全治療に対する臨床応用という出口に繋げることを意識しており、心不全の新たな治療法の開発に繋がることを期待され、臨床的重要性も高い。また、オートファジー不全が病態形成に関わっていると考えられるヒト疾患は多岐に渡ることから、本研究成果には発展性が見込まれる。

3. 研究の方法

(1)新規心不全病態モデルの開発

マウスを用いた安定的かつ簡便な圧負荷心肥大・心不全モデルの新規開発を実施した。

(2)オートファジー関連因子Rubiconが受容体分解と心不全に及ぼす影響の解明

心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスの作成と解析

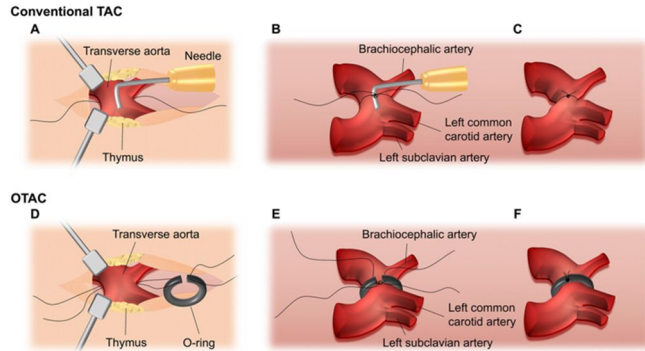
(3) リソソーム内ミトコンドリア DNA 分解酵素 DNase2 の発現量調節機構の解明
心不全発症に関わるリソソーム内酵素 DNase2 発現制御機構についての網羅的解析

(4) 心不全時発症進展に関わる新規制御因子の網羅的探索
マウス圧負荷心肥大・心不全モデルを用いた遺伝子発現変化の網羅的検索と 1 細胞 RNA-seq 解析ならびに空間的発現解析

4. 研究成果

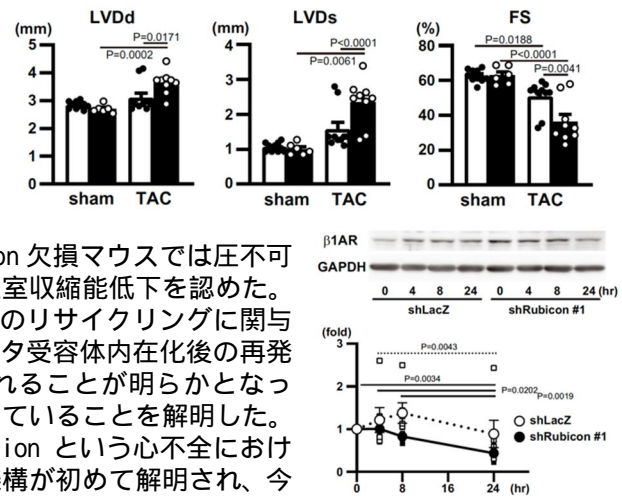
(1) 新規心不全病態モデルの開発

心不全病態モデルとして新たに o-リングを用いた簡便かつ安定的な圧負荷モデルを開発し、論文報告した (Sci Rep. 2022;12(1):85)。このモデルでは横行大動脈に o-リングを用いることで、従来の方法に比べて安定的な心肥大誘導並びに心不全誘導を行えるものであり、海外を含めた多くの研究機関から問い合わせを受けるなどインパクトは大きかった。本モデルを用いることにより、再現性の高い心肥大と心不全サンプルを採取することが可能となり、後述する網羅的探索研究実施に直結する結果となった。



(2) オートファジー関連因子 Rubicon が 受容体分解と心不全に及ぼす影響の解明

心不全病態形成におけるオートファジーの心保護的機能を報告してきた。一部の神経変性疾患においてオートファジーコアタンパク質の変異の関与が報告されたが (2021 NEJM)、ヒト心不全発症における直接的関与については未だに報告がない。オートファジー抑制因子 Rubicon の心不全発症における機能解析を終了し論文報告した (Sci Rep. 2022;12(1):41)。Rubicon 欠損マウスでは圧不可により、対照群に比し有意な左室拡大と左室収縮能低下を認めた。Rubicon は心負荷時におけるベータ受容体のリサイクリングに関与しており、同欠損によって圧負荷後のベータ受容体内在化後の再発現が抑制され、結果的に心不全が誘導されることが明らかとなった。すなわち Rubicon は心保護的に機能していることを解明した。この研究により、受容体の downregulation という心不全における非常に重要な細胞内現象に関わる分子機構が初めて解明され、今後の心不全治療に大いに役立つものと考えられる。

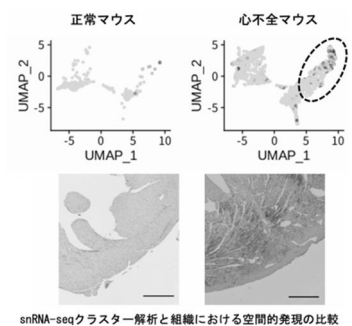


(3) リソソーム内ミトコンドリア DNA 分解酵素 DNase2 の発現量調節機構の解明

タンパク質の発現調節においても重要とされる mRNA 段階での発現調節機構はよく知られている。この段階における調節に関わる因子のライブラリを用いた網羅的解析を実施し、候補分子を 2 つに絞り込んだ。in vitro 解析は完了し、in vivo について本分子による DNase2 発現抑制ならびに心不全病態に関する解析を実施する。

(4) 心不全時発症進展に関わる新規制御因子の網羅的探索

o-リングを用いた新たな心肥大および心不全病態モデル動物組織を用いて、リソソーム関連因子を含めた遺伝子発現について RNA-seq 網羅的解析を実施し、心肥大から心不全への移行に際して TFEB を含めた遺伝子発現の変動を明らかにした。また同解析データを用いて、オートファジーおよびミトコンドリア特異的オートファジーに関するパスウェイ解析も実施した。さらに 1 細胞解析と空間発現解析を実施し、これらの遺伝子発現に特徴されるクラスターの同定と空間的発現の比較検討を実施し、これまで機能未知とされてきた因子の関与を明らかにした。



snRNA-seq クラスター解析と組織における空間的発現の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakao Y, Aono J, Hamaguchi M, Takahashi K, Sakaue T, Inoue K, Ikeda S, Yamaguchi O	4. 巻 12
2. 論文標題 O-ring-induced transverse aortic constriction (OTAC) is a new simple method to develop cardiac hypertrophy and heart failure in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04096-9.	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 -

1. 著者名 Akazawa Y, Taneike M, Ueda H, Kitazume-Taneike R, Murakawa T, Sugihara R, Yorifuji H, Nishida H, Mine K, Hioki A, Omiya S, Nakayama H, Yamaguchi O, Yoshimori T, Sakata Y, Otsu K	4. 巻 12
2. 論文標題 Rubicon-regulated beta-1 adrenergic receptor recycling protects the heart from pressure overload	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03920-6.	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口修
2. 発表標題 心筋におけるミトコンドリア分解と心不全発症の関わり
3. 学会等名 日本心不全学会（招待講演）
4. 発表年 2022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	青野 潤 (Aono Jun) (70512169)	愛媛大学・医学部附属病院・医員 (16301)	

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
---------	---------