

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22902

研究課題名（和文）心不全におけるERADによるミトコンドリア機能制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanisms of mitochondria regulation by ERAD in failing heart and its therapeutic application.

研究代表者

池田 宗一郎 (Ikeda, Soichiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00885410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞後の不全心筋においてHERPUD1が増加し、心筋細胞に対する過酸化水素刺激でもHERPUD1が増加した。HERPUD1のノックアウトでは心筋梗塞後の心機能低下が増悪した。アデノウイルスを用いたHERPUD1の過剰発現ではミトコンドリア機能低下を抑制し、細胞死を軽減させることが明らかとなった。HERPUD1は心筋梗塞後の不全心筋においてミトコンドリア機能低下および心筋細胞死を軽減することで、心筋保護的に機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は心筋細胞における小胞体およびミトコンドリア制御機構を明らかにすることで、心不全の新たな病態機序を明らかにし、加えて新たな新規治療法の開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In failing heart after myocardial infarction, HERPUD1 protein levels were increased. HERPUD1 was also increased in cardiomyocytes treated with H₂O₂. Homozygous HERPUD1 knockout mice exacerbated cardiac dysfunction after myocardial infarction. Overexpression of HERPUD1 by adenovirus ameliorated mitochondria dysfunction and cell death in cardiomyocytes treated with H₂O₂. HERPUD1 may have a protective role in failing heart after myocardial infarction by attenuating mitochondria dysfunction and cardiomyocytes death.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 小胞体 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

わが国における心不全患者は増加しており、2030年には130万人に達する。薬物治療・非薬物治療の進歩により心不全の予後は改善してきたが、重症心不全例の2年生存率は50%程度と未だ予後不良であり、心不全への新たな治療戦略が求められている。心不全において神経体液調節性因子に対する治療は確立しているが、細胞内小器官(オルガネラ)をターゲットとした治療戦略は皆無である。心筋リモデリングはERストレスおよびミトコンドリア機能異常により引き起こされる心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化を特徴とする。近年、ミトコンドリアとER間のオルガネラ相互作用が細胞機能維持において重要であることが明らかとなってきた。また、ERストレスにおいて小胞体関連分解(ER-associated degradation: ERAD)が注目されている。ERADはERストレスや酸化ストレスなどにより活性化され異常タンパク質を小胞体から細胞質へ逆輸送してユビキチン化により分解することでERストレスを軽減する極めて重要な機構である。また、homocysteine-responsive ER resident ubiquitin-like domain 1 (HERPUD1)はERADの構成因子としてその機能維持に必須であることが知られている(図1)。最近、ERADは不良タンパクのみならずバズプレッシンやPI3 kinaseをユビキチン化して分解することで、分泌小胞やミトコンドリアのCa取り込みの制御に関与することが報告された(J Clin Invest. 2017)。ERADは不全心筋のオルガネラ機能において重要な役割を果たしている可能性がある。

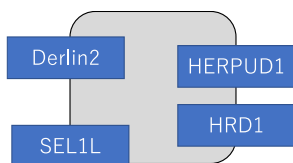


図1 ERAD複合体

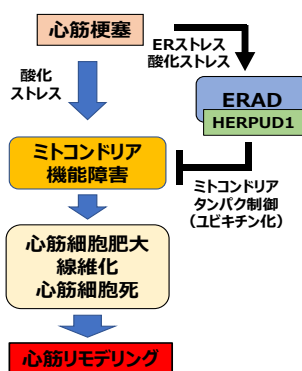


図2 本研究の仮説

2. 研究の目的

本研究の目的は、『心不全においてERADがミトコンドリア機能を制御する』という仮説(図2)を検証するとともに、『ERADによるミトコンドリア機能保持』という独自のパラダイムによる心不全の心筋治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

HERPUD1・ERADの意義および作用機序を解明するために以下の項目を評価する(図3)。

1. 心筋リモデリングにおけるERADおよびミトコンドリア機能評価

マウスの左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成後1, 3, 7, 14, 28日に下記①-⑥を評価することで、心筋リモデリングにおけるERAD・HERPUD1と心筋細胞死との関連を明らかにする。

- ①心不全重症度評価：死亡率、心エコー(左室径、左室駆出率など)、体重、臓器重量(心臓、肺)
 - ②心筋組織学的重症度：心筋細胞肥大(WGA染色)、間質線維化(MT染色)、アポトーシス(TUNEL染色)
 - ③心筋組織酸化ストレスレベル：4HNE(ウェスタンブロット(WB法))、TBARS
 - ④ERストレス・ERAD・HERPUD1評価：タンパクユビキチン化、CHOP, Bip, Xbp1, HERPUD1発現(RT-PCR, WB法)
 - ⑤ミトコンドリア機能評価：呼吸能(Flux-analyzer)、複合体系形成(BN page)、ATP content(生化学assay)
 - ⑥心筋細胞死：cleaved caspase-3(WB法)、Celltiter blue assay
- また新生仔ラット培養心筋細胞を用いてH2O2投与下(100 μM, 24h)に上記③~⑥を評価する。

2. 心筋リモデリングにおけるHERPUD1の役割の解明

心筋細胞に対して過酸素水素投与を投与し、HERPUD1のsiRNAを用いた機能解析を行う。上記③~⑥の評価を行う。また、我々が作成したHERPUD1ノックアウトマウスは心臓の形態および機能には異常を認めないが、心筋梗塞を作成し28日後に上記1.①~⑥を評価し、心不全におけるHERPUD1の意義を解明する。

3. 心筋リモデリングにおけるERADおよびミトコンドリア機能評価

新生仔ラット培養心筋細胞にアデノウイルスでHERPUD1を過剰発現しH2O2投与下(100 μM, 24h)に上記1.③~⑥を評価する。

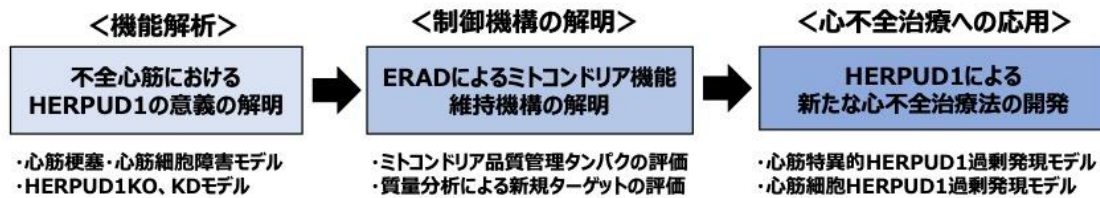


図3 研究計画

4. 研究成果

(1) 梗塞後心筋で HERPUD1 の発現が増加した

左冠動脈結紮モデルにおいて HERPUD1 の発現は Day3 で有意に増加し、day28 にかけてベースラインまで低下することが明らかとなった(図 4)。心筋細胞に対する過酸化水素投与でも同様に HERPUD1 のタンパク量が増加した。

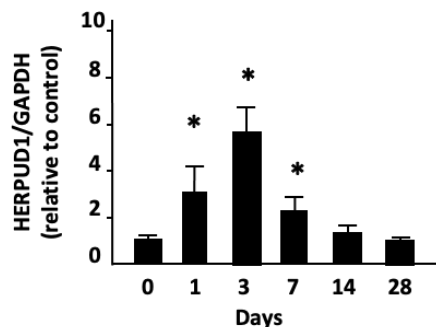


図4 梗塞後心筋での HERPUD1 の発現

(2) HERPUD1 のノックアウトは心筋梗塞後リモデリングを増悪した

HERPUD1 のノックアウトは心筋梗塞後非梗塞部心筋で左室駆出率の低下および左室拡大を増悪し、心筋重量を増悪した(図 5)。同様に siRNA を用いた HERPUD1 のノックダウンは過酸化水素投与による心筋細胞死を増悪した。

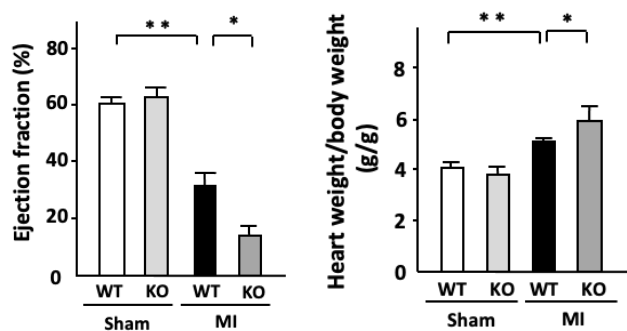


図5 HERPUD1 のノックアウトによる左室駆出率および心筋重量

(3) HERPUD1 の過剰発現は過酸化水素による心筋細胞死を抑制した

HERPUD1 の過剰発現は過酸化水素による心筋細胞死を抑制した(図 6)。また、HERPUD1 の過剰発現は過酸化水素によるミトコンドリア機能低下を抑制した。

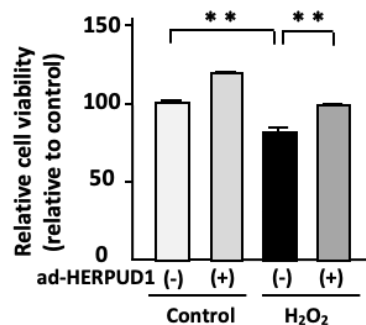


図6 HERPUD1 の過剰発現による心筋細胞死

(4)まとめ

上記より HERPUD1 は梗塞後心筋の非梗塞部において発現が増加しており、ミトコンドリア機能低下の抑制や心筋細胞死を抑制することで心筋リモデリングに対して保護的に作用することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishikita Akihito, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Nishimura Ryohei, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Kinugawa Shintaro, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103517 ~ 103517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103517	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Sato Midori, Abe Ko, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Excessive Hypoxia Inducible Factor 1 Expression Induces Cardiac Rupture via p53 Dependent Apoptosis After Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.020895	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Abe Ko, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Heart Rate Reduction with Ivabradine Prevents Cardiac Rupture after Myocardial Infarction in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiovascular Drugs and Therapy	6. 最初と最後の頁 257 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10557-020-07123-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 宗一郎
2. 発表標題 Downregulation of HERPUD1 exacerbates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte death
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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