様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２９　日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１１２９

研究課題名（和文）心筋におけるミトコンドリアDNA分解制御機構の解明とその心不全治療への応用

研究課題名（英文）Clarification of the role of regulatory mechanism of mitochondria DNA in heart and the application to treatment of heart failure

研究代表者
彦惣　俊吾（Hikoso, Shungo）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：３０４２３１６４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアDNA分解の責任分子であるDNase IIに着目して検討をおこなった。DNase II活性調整機序については、mRNAの転写後調整機序が関与していることを見出したが、詳細を検討中である。DNase II活性増強による心不全治療効果の検討について、心筋特異的DNase II過剰発現マウスを作成し、その表現型について検討をおこなった。また、人の不全心筋における検討で、ヒトの心不全心筋におけるDNase II発現が低下傾向にあること、心不全の心筋においてリソソーム内の核酸蓄積と考えられる所見があることを見出した。さらに心不全患者由来iPS細胞を作製し、詳細を検討中である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of DNase II, which is a responsible molecule for degradation of mitochondrial DNA, in the pathogenesis of heart failure. As for the regulatory mechanism of DNase activity, we identified that the activity is regulated via post-translational mechanism, and now we are investigating the detail. As for the therapeutic implication of DNase II for heart failure, we created cardiac-specific DNase II transgenic mice, and evaluated the phenotype. In addition, we evaluated the role of DNase II in human heart failure pathophysiology using human cardiac tissue sample of heart failure patients, and found that the expression of DNase II in failing heart is decreased compared with non-failing heart. We also found that DNA is deposited in cardiomyocytes in patients with heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：DNase II

科学研究費助成事業　研究成果報告書

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、現存の治療法では5年生存率は約50%以下と癌と同様に極めて不良であり、しかも患者数は増加傾向にある。現在の治療法は薬物治療と非薬物治療に大別され、薬物療法は主にカテコラミンやレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系といった神経体液性因子を調整する薬剤が使用されているが、その治療効果は頭打ちであり、この 15 年以上、予後を改善しうる新規治療法が出現していない状況にあり、上記の患者数増加かつ予後不良という心不全のおかれている状況と併せて考えると、予後改善につながる新規治療法の創出は喫緊の課題である。

心臓に圧負荷や容量負荷などの血行力学的負荷が持続的にかかり続けると、次第に心収縮力の低下、心内腔の拡大を来たし、心不全状態となる。この過程にどのような分子機序が関与しているのかを明らかにし、それを治療ターゲットとすることで、心不全の発症抑制や進行予防を行うことが期待できる。これまでに、様々な研究において、心筋の慢性炎症が上記の過程に重要な役割を果たしていると考えられてきたが、その詳細な機序は不明であった。私は以前から、心不全における慢性炎症の役割およびその機序について研究をおこなってきた（Hikoso et al. Circ Res 2009;105:70-79、 Higuchi, Hikoso et al. J Biol Chem 2003；278:20770-20777、Hikoso et al, Circulation 2004;110 (17):2631-2637)。そして、最近、心筋において、オートファジーで十分に分解されなかった mtDNA が、Toll like receptor 9 を介して慢性炎症を惹起し、心不全を発症する原因となることを見出した（ Oka, Hikoso et al, Nature 2012:485:251-5)。さらにこの研究のなかで、心不全の心筋においては、mtDNA 分解の責任分子である DNase II の活性が、ストレスに適応している状態である心肥大期よりも低下していることを見出した（下図)。

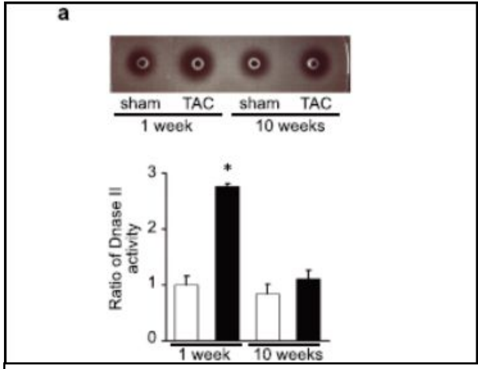

図 1. マウス圧負荷(TAC)心不全モデル心筋における DNase II 活性の変化
　心肥大期（TAC 後 1 週間）では DNase II 活性の亢進が認められるが、心不全期（TAC 後 10 週間）では活性が低下している。

すなわち、心筋でのストレス応答過程における DNase II の活性低下が、心筋の慢性炎症を介した心不全発症の鍵を握っており、その活性低下を抑制することもしくは人為的に活性を増強させることが心不全発症抑制に有効であることが示唆された。

２．研究の目的

本研究では、mtDNA 分解の責任分子である deoxyribonuclease II(DNase II)に着目し、心不全において DNase II の活性不足により mtDNA の分解不良が生じる機序を検討するとともに、これを制御する方法を考案し、DNase II 活性を維持することにより心筋の慢性炎症を抑制して心不全発症を防ぐ方法を開発する。また、この方法の心不全発症防止に関する Proof of Concept を得るため、マウス心不全モデルや心不全患者の疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞などを用いて検討をおこない、DNase II の創薬ターゲットとしての妥当性について明らかにする。

３．研究の方法

（１）　心不全における DNase II 活性低下の原因の解明
- 心肥大期、心不全期における DNase II の発現量の変化を、マウス圧負荷心不全モデルの心筋 mRNA およびタンパク量の定量により評価する。
- mRNA 量およびタンパク量の変化をもたらす機序について検討する。

（２）　DNase II 活性増強による心不全治療効果の検討

✓　以下の 2 種類の DNase II 発現トランスジェニックマウスを作製し、表現型を検討した。

✓ 心筋特異的プロモーターであるα Myosin Heavy Chain（αMHC)プロモーターの下流に DNase II 遺伝子を組み込んだトランスジーンを用いたトランスジェニックマウス

✓ CAG プロモーターの下流に loxP 配列で挟まれたスペーサー配列を持ちその下流に DNase II 遺伝子を組み込んだトランスジーンを有するトランスジェニックマウスとタモキシフェン誘導性に心筋特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配し、タモキシフェン誘導性に心筋特異的に DNase II を発現するトランスジェニックマウス

（３）　ヒトの心不全における DNase II 活性低下の意義の解明

✓　重症心不全患者の心筋組織を入手し、不全心筋における DNase II の発現状況について western blot 法にて検討をおこなった。また、重症心不全患者の心臓組

織を DNA 染色し、心不全の心筋におけるミトコンドリア DNA の蓄積の有無、程度の評価をおこなった。

- ✓ ある疾患を持つ患者の体細胞から iPS 細胞（疾患特異的 iPS 細胞）を作製しそこから目的の細胞種に分化させることにより、当該患者の遺伝的背景を保持したヒトの疾患モデル細胞を作製可能である。ヒトにおける心不全の発症過程における DNase II 活性低下の意義の解明のため、以下の検討をおこなう。
- ✓ 大阪大学医学部附属病院で診療を受けている心不全患者の血液を採取する。
- ✓ 血液から単核球を分離し、培養する。
- ✓ 培養した単核球に初期化因子（Oct3/4,SOX2, Klf4,c-Myc）を遺伝子導入し、 iPS 細胞を作製する。
- ✓ 樹立した iPS 細胞を心筋細胞に分化させ、表現型を検討するとともに、その際の DNase II 活性、mtDNA の蓄積について比較する

４．研究成果

① 心不全における DNase II 活性低下の原因の解明

- ・野生型マウスを用いて横行大動脈縮窄による圧負荷モデルを作製した。このモデルでは、圧負荷後１週間で心肥大を呈し、4 週間で心不全状態となる。
本モデルの心肥大期、心不全期の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で定量したところ、sham 手術群と比較して圧負荷群では、心肥大期には mRNA 量の増加を認めたが、心不全期には明らかな増加は認めなかった。
- ・同様にタンパク量について、同じくマウス圧負荷心不全モデルの心肥大期、心不全期の心筋からタンパク質を抽出し western blot 法で検討したところ、mRNA 量と同様に、sham 手術群と比較して圧負荷群では、心肥大期には DNase II タンパク量の増加を認めたが、心不全期には明らかな増加は認めなかった。
- ・以上より、心肥大期から心不全期にかけての DNase II の発現量低下が活性低下につながっていると考えられ、その原因は mRNA 量の変化に起因しているものと考えられた。
- ・続いて、mRNA 量の変化の機序を検討したところ、転写レベルではなく転写後の機序が関係していることが判明した。現在、詳細を検討中である（未発表）。

② DNase II 活性増強による心不全治療効果の検討

- ・心筋特異的プロモーターである α Myosin Heavy Chain（αMHC)プロモーターの下流に DNase II 遺伝子を組み込んだトランスジーンを構築し、マウス受精卵にインジェクションすることにより、個体を得た。体細胞ゲノムの解析により、トランスジーンがゲノムに組み込まれていることを確認し、交配により個体数を確保したうえで、心筋での DNase II の発現量を western blot で検討したところ、トランスジーンを持たない個体と比較して著明な DNase II の発現量増加を認めた。また、DNase II 活性を single radial enzyme diffusion 法で検討したところ、トランスジーンを持つ個体において DNase 活性が著明に増加していることを見出した。
定常状態の心機能を心エコー法で確認したところ、定常状態における心機能は、トランスジーンを持つ個体と持たない個体で有意な変化は認めなかった。
- ・「方法」に示した方法を用いて、タモキシフェン誘導性に心筋特異的に DNase II を発現するトランスジェニックマウスを作製した。タモキシフェンを投与することにより、心筋に DNase II が過剰発現することを見出した。上記と同様に定常状態の心機能を心エコー法で確認したところ、タモキシフェンで DNase II を過剰発現させたマウスとさせなかったマウスの間では、心機能に有意な変化を認めなかった。
- ・これらのマウスに、横行大動脈結紮による圧負荷モデルを作製し、現在表現型を検討しているところである。

③ ヒトの心不全における DNase II 活性低下の意義の解明

- ・ヒトの心不全心筋における DNase II 発現が低下傾向にあることを確認できた。また、同じく、ヒト左室収縮機能低下症例の心筋において、リソソーム内への核酸蓄積と考えられる所見を見出した。
- ・大阪大学医学部附属病院で診療を受けている若年発症の拡張型心筋症による心不全症例のゲノム解析から、既知の心筋症原因遺伝子変異を有する患者を 3 症例同定した。
- ・これらの患者のうち、まず 1 症例から同意を得て血液を採取し、初期化因子（Oct3/4,SOX2, Klf4,c-Myc）を搭載したセンダイウイルスベクターにより遺伝子導入をおこない、iPS 細胞様のコロニーを得た。
- ・当該コロニーの細胞の初期化因子の発現を確認し、iPS 細胞であることを確認した。
- ・iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導のため、条件検討を行った。まずは、健常人由来の iPS 細胞を用いて検討をおこない、beating する心筋細胞様細胞が得られたため、同様の条件で患者由来 iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導を行っているところである。

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３件）

1. Hara M, Hayashi K, Hikoso S, Sakata Y, Kitamura T.
   Different Impacts of Time From Collapse to First Cardiopulmonary Resuscitation on Outcomes After Witnessed Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Adults.
   Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2015;8(3):277-84.
2. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K.
   Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation.
   Nat Commun. 2015:6:7527.
3. Masuda M, Nakatani D, Hikoso S, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Kitamura T, Minamiguchi H, Okuyama Y, Uematsu M, Yamada T, Iwakura K, Hamasaki T, Sakata Y, Sato H, Nanto S, Hori M, Komuro I, Sakata Y; OACIS investigators
   Clinical Impact of Ventricular Tachycardia and/or Fibrillation During the Acute Phase of Acute Myocardial Infarction on In-Hospital and 5-Year Mortality Rates in the Percutaneous Coronary Intervention Era.
   Circ J. 2016;80(7):1539-47.

〔学会発表〕（計１件）

1. Hikoso S, Nakatani D, Suna S, Nakagawa A, Yasumura Y, Uematsu M, Yamada T, Dohi T, Kojima T, Matsumura Y, Sakata Y, OCVC Investigators
   The 81th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (Kanazawa, Japan, Mar 17-19, 2017)
   Big Data Clinical Research of Osaka CardioVascular Conference (OCVC)-Effort of PURSUIT-HFpEF registry

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者

彦惣　俊吾（HIKOSO, Shungo）
大阪大学大学院医学系研究科重症心不全内科治療学寄附講座　寄附講座准教授
研究者番号：30423164

(2)研究分担者

山口　修（YAMAGUCHI, Osamu）
大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学准教授
研究者番号：90467580