

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19024

研究課題名(和文) 心筋ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送異常に基づく心不全発症機序の解明研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of heart failure based on abnormal Ca<sup>2+</sup> transport in myocardial mitochondria

研究代表者

田頭 秀章 (Hideaki, Tagashira)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：90735028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞の生と死両方の制御に重要な役割を担っている。我々は、ミトコンドリアマトリックスへのCa<sup>2+</sup>取り込みを制御するミトコンドリア内膜Ca<sup>2+</sup>ユニporter (MCU) およびCa<sup>2+</sup>排泄を制御するミトコンドリア内膜Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体 (NCLX) の遺伝子欠損・臓器特異的高発現マウスを作出し、心筋ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送異常による心不全発症のメカニズムについて検討を行った。その結果、ミトコンドリアにおけるCa<sup>2+</sup>濃度維持機構の崩壊が、心不全の発症・進展に密接に関わっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MCU (Ca<sup>2+</sup>流入系) とNCLX (Ca<sup>2+</sup>排出系) のミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送体遺伝子の欠損マウスを、本研究室独自に作製・解析し、心肥大・心不全発症機序におけるミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送異常の関与をin vivoで証明した。現在使用されている心筋保護薬は、QOLの改善や医療費削減の観点から有用性が十分とは言えないのが現状である。本研究成果は、ミトコンドリアを標的とした新規心臓保護薬の開発に向けた新しいエビデンスとなりうる重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play an important role in regulating cell survival and death. We recently created a gene-deficient/tissue-specific overexpressing mice for the inner mitochondrial membrane calcium uniporter (MCU), which regulates Ca<sup>2+</sup> uptake into mitochondria matrix, and the inner mitochondrial membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCLX), which regulates Ca<sup>2+</sup> excretion. Using these genetic modified mice, we investigated the mechanism of heart failure due to abnormal Ca<sup>2+</sup> transport in myocardial mitochondria. As a result, we found that the disruption of maintenance of Ca<sup>2+</sup> concentration in mitochondria is closely involved in the onset and progression of heart failure.

研究分野：循環器薬理

キーワード：ミトコンドリア カルシウムシグナル 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

日本における死亡要因の三大疾患として、悪性腫瘍、脳梗塞、心血管疾患が挙げられる。本邦において、慢性心不全患者数は100万を超えると推定され、高齢化に伴い、その数は増加することが予想されている。心不全患者の予後は悪く、QOLの改善や医療費削減の観点から、より優れた治療薬の開発が求められる。申請者は、これまでに、圧負荷心不全モデルマウスおよびその培養心筋細胞を用いて、心不全の病態時に  $\sigma$ -1 受容体/IP<sub>3</sub> 受容体を介した筋小胞体からミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 輸送が障害されていることを明らかにしてきた。

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー源となる ATP を産生するとともに、アポトーシスの制御、活性酸素種 (ROS) の生成および Ca<sup>2+</sup> の貯蔵庫など、多様な機能を担うオルガネラである。心臓において、ATP 産生と細胞内 Ca<sup>2+</sup> 制御はポンプ機能の維持に必須であり、ROS 生成は心不全の病態形成に密接に関与している。したがって、ミトコンドリアは注目すべき心臓病の創薬標的であるといえる。近年、ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 輸送体の分子実体に関する研究が急速に進展しており、ミトコンドリアマトリックスに Ca<sup>2+</sup> を輸送するミトコンドリア内膜 Ca<sup>2+</sup> ユニporter (MCU) が同定された (Nature. 476:336-340, 2011)。MCU をノックダウンあるいは過剰発現することにより、ミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 輸送が各組織の機能維持機構にどのような影響を与えるか解析可能になった。その後、MCU を介したミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup> 輸送を促進する mitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1) や Ca<sup>2+</sup> 輸送を抑制する mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake 1/2 (MICU1/2) が同定された。MCU の機能調節を介したミトコンドリアマトリックスへの Ca<sup>2+</sup> 輸送に関する研究は、国内にとどまらず世界中で注目されている。他方、ミトコンドリアにはミトコンドリア内膜 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換体 (NCLX) が発現しており、主要なミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 排出系としてミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 制御に深く関わることが報告されている (PNAS. 107:436-441, 2010)。しかし、心血管病の病態機序におけるミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 輸送体の病態生理学的役割は未だ明確になっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、心筋ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 輸送異常に基づく心血管病発症機序の解明を目的として、「心血管機能の正常な維持にはミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 輸送における MCU (Ca<sup>2+</sup> 流入系) と NCLX (Ca<sup>2+</sup> 排泄系) の制御バランスが重要であり、心肥大・心不全病態時にはそれが破綻している」という作業仮説を立て、各種遺伝子改変マウスを作製し、*in vivo* 病態モデル実験により検証することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリア内膜 Ca<sup>2+</sup> 輸送体の各種遺伝子改変マウスの作製

NCLX および MCU の遺伝子欠損マウスは、常法に従って、それぞれ exon 1,2 および exon 5,6 を標的として、ES 細胞の相同組換えにより、それぞれの遺伝子欠損マウスを得た。NCLX ホモ欠損マウスは、成獣まで正常に成長することを確認した。一方、MCU ホモ欠損マウスは胎生致死のため、実験には MCU ヘテロ欠損マウスを用いた。MCU ヘテロ欠損マウスは、成獣まで正常に成長した。さらに、心筋  $\alpha$ MHC プロモーターの下流にミトコンドリア内膜 Ca<sup>2+</sup> 輸送体の cDNA を挿入した発現コンストラクトを作成し、受精卵への導入により、心筋特異的ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> 輸送体高発現マウスを作出した。

### (2) 血圧、心拍数および心エコーによる心機能解析

マウスの収縮期血圧および心拍数を、tail-cuff 法により無麻酔下で非観血的に測定した。心エコーによる心機能の測定では、マウスにケタミン (50 mg/kg, i.p.) /キシラジン (5 mg/kg, i.p.) 麻酔を施した後、超音波診断装置を用いて心エコー解析 (M モード) を実施し、心収縮機能の指標として左室駆出率 (EF) および左室内径短縮率 (FS) を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) NCLX 欠損マウスの心血管機能および心肥大・心不全モデル実験

作製した NCLX ホモ欠損マウスは、心臓、血管および腎臓において NCLX 遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていた。NCLX ホモ欠損マウスの体重は、野生型と比較して差異はみられなかった。NCLX ホモ欠損マウスの無麻酔下での収縮期血圧および心拍数は、野生型マウスと同程度であった。また、心肥大の指標となる心重量/体重比も両マウスではほぼ同じであり、心臓の形態変化は観察されなかった。さらに、超音波診断装置を用いて M モード心エコー法により心機能を測定したが、EF および FS とともに両マウス間で有意な差はなく、NCLX ホモ欠損マウスの心機能に異常は認められなかった。

次に、NCLX の心血管病発症における病態生理学的役割を解析する目的で、NCLX ホモ欠損マウスに対して、圧負荷による心肥大・心不全モデル実験を実施したところ、NCLX ホモ欠損マウスでは野生型マウスと比較して心肥大・心不全の病態形成が軽減されることを見出した。この結果は、心不全の発症・進展に NCLX が関与している可能性を示唆している。

### (2) MCU ヘテロ欠損マウスの心血管機能および心肥大・心不全モデル実験

MCU ヘテロ欠損マウスの心臓では、MCU 発現が約 50%まで抑制されていた（一方、MCU ホモ欠損マウスは胎生致死であった）。MCU ヘテロ欠損マウスの体重は野生型と比較してほとんど差異はなかった。また、心重量/体重比は両マウスで同程度であり、心肥大などの形態変化は見られなかった。

次に、MCU の心血管病発症における病態生理学的役割を解析する目的で、MCU ヘテロ欠損マウスに対して、圧負荷による心肥大・心不全モデル実験を実施したところ、MCU ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスとほぼ同等の心肥大・心不全の病態形成が観察された。そこで現在、MCU ホモ欠損マウスを作出する目的で、他者の論文を参考にして、遺伝子背景のマウス系統種を C57BL/6 から BDF1 へ変更する交配操作を行っている。今後、MCU ホモ欠損マウスの作出に成功すれば、圧負荷による心肥大・心不全モデル実験を実施して、MCU の心不全の発症・進展における役割を明確にしたいと考えている。

### （3）心筋特異的ミトコンドリア $Ca^{2+}$ 輸送体高発現マウスの心血管機能および心肥大・心不全モデル実験

上記のミトコンドリア  $Ca^{2+}$  輸送体欠損マウスの実験結果をさらに検証する目的で、心筋特異的ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  輸送体高発現マウスの作製に着手した。現在までの予備的検討において、血圧、心拍数、体重は野生型と比較してほとんど差異はなかったが、心重量/体重比が増大することを見出した。この結果は、ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  輸送体の発現増加が心肥大に関係する可能性を示唆している。今後は、圧負荷による心肥大・心不全モデル実験を実施して、心不全の発症・進展における役割をさらに明確にしたいと考えている。

以上、本研究の結果から、心筋ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  制御に関与するミトコンドリア内膜  $Ca^{2+}$  輸送体は、心肥大・心不全病態の発症・進展に寄与していることが考えられた。本研究結果は、さらにミトコンドリア内膜  $Ca^{2+}$  輸送体が心不全の創薬標的となり得ることを示唆している。今後、本研究で作製した各種遺伝子改変マウスを用いて、心肥大・心不全の分子機序におけるミトコンドリア  $Ca^{2+}$  輸送体の役割について、*in vivo* & *in vitro* 実験により詳細に解析して行きたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 岩本隆宏, 田頭秀章, 喜多紗斗美	4. 巻 271
2. 論文標題 Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換輸送体の構造・機能の解明から治療への応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 42-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Moriguchi S, Kita S, Yabuki Y, Inagaki R, Izumi H, Sasaki Y, Tagashira H, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Fukunaga K.	4. 巻 55 (5)
2. 論文標題 Reduced CaM Kinase II and CaM Kinase IV Activities Underlie Cognitive Deficits in NCKX2 Heterozygous Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 3889-3900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-017-0596-1	査読の有無 有
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 Tagashira H, Nagata A, Kita S, Suzuki S, Iwasaki A, Iwamoto T.	4. 巻 45 (1)
2. 論文標題 Calcium Signaling Abnormality in Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Bull Fukuoka Univ.	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 Moriguchi S, Ishizuka T, Yabuki Y, Shioda N, Sasaki Y, Tagashira H, Yawo H, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, Fukunaga K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Blockade of the KATP channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/mp.2016.187	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 Shinoda Y, Tagashira H, Bhuiyan MS, Hasegawa H, Kanai H, Zhang C, Han F, Fukunaga K.	4. 巻 11(10)
2. 論文標題 Corticosteroids Mediate Heart Failure-Induced Depression through Reduced $\beta$ 1-Receptor Expression.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0163992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0163992. eCollection 2016.	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 Shinoda Y, Tagashira H, Bhuiyan MS, Hasegawa H, Kanai H, Fukunaga K.	4. 巻 131(3)
2. 論文標題 Haloperidol aggravates transverse aortic constriction-induced heart failure via mitochondrial dysfunction.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 172-183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2016.05.012.	査読の有無 有
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19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 田頭秀章、永田旭、喜多知、阿部弘太郎、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋NCX1を介したCa <sup>2+</sup> シグナル異常は低酸素誘発性肺高血圧の発症に関与する
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Tomo Kita, Tomohiro Numata, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Development of a new model mouse for Mg metabolism disorder targeted for functional suppressing TRPM7
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kita, Akinori Iwasaki, Kohtaro Abe, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 is involved in the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Sari Suzuki, Kohtaro Abe, Akinori Iwasaki, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Vascular smooth muscle NCX1 is involved in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田頭秀章、永田旭、喜多紗斗美、鈴木沙理、阿部弘太郎、岩崎昭憲、岩本隆宏
2. 発表標題 血管平滑筋1型Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換体 (NCX1) を介した肺高血圧発症機序の解明
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kita, Sari Suzuki, Kohtaro Abe, Akinori Iwasaki, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 Role of vascular smooth muscle NCX1 in the development of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第49回生理研国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kita, Sari Suzuki, Kohtaro Abe, Akinori Iwasaki, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 The role of vascular smooth muscle NCX1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田頭秀章、永田旭、喜多紗斗美、鈴木沙理、阿部弘太郎、岩崎昭憲、岩本隆宏
2. 発表標題 肺高血圧発症における血管平滑筋NCX1の病態学的意義の解明
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田頭秀章、鈴木沙理、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 臓器特異的遺伝子改変マウスを用いた心血管Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> 交換体の機能解析
3. 学会等名 第70回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Yusuke Gotoh, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 Transgenic mice overexpressing dominant negative TRPM7 mutant are useful tools for studying magnesium disorders.
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Yusuke Gotoh, Takahiro Iwamoto.
2. 発表標題 Physiological roles of NCX1 and NCX2 isoforms in urine formation and electrolyte excretion.
3. 学会等名 Biophysical Society 61st Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----