

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15892

研究課題名（和文）心不全発症機転としての低酸素応答を介したミトコンドリア機能不全の分子機序解明

研究課題名（英文）Investigation for the role of hypoxic responses in mitochondrial dysfunction in heart failure

研究代表者

池田 昌隆（IKEDA, MASATAKA）

九州大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：10567382

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）：本研究では、first-in-classのプロリン水酸化酵素阻害剤である roxadustat の心筋細胞における酸素消費量と虚血再灌流傷害マウスモデルにおける梗塞サイズに対する抑制効果を検証した。心筋細胞に roxadustat を添加したところ、ミトコンドリアにおける酸素消費量および低酸素・再酸素化刺激による細胞死は抑制された。さらに roxadustat の事前投与により、虚血再灌流モデルにおける梗塞サイズは有意に減少した。Roxadustat はミトコンドリアにおける酸素消費量の抑制を介した虚血耐性により虚血性心疾患の新たな治療戦略となり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素誘導因子（Hif）を分解するプロリン水酸化酵素の阻害により腎性貧血を治療することを目的として開発された first-in-class の薬剤である roxadustat を用いることで、薬理的に酸素代謝を抑制し、虚血耐性を誘導し得ることを明らかにした。本機序を利用することで、虚血性心疾患のみならず、心臓外科手術時（体外循環中）や臓器移植の際の臓器保護への応用も検討されることから、本薬剤の幅広い臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the suppressive effect of hypoxia-inducible factor-1 (Hif-1) using roxadustat, which is a first-in-class prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD) inhibitor, on an oxygen consumption in cardiomyocytes and infarct size in a murine ischemic/reperfusion model. The treatment with roxadustat in isolated cardiomyocytes significantly lowers an oxygen consumption in mitochondria, and suppressed cell death induced by hypoxia/reoxygenation. Notably, the pretreatment with roxadustat markedly suppressed infarct size in a murine ischemia reperfusion model. Roxadustat will be a new therapeutic strategy against ischemic heart disease by lowering an oxygen consumption and thereby producing an ischemic tolerance.

研究分野：循環器内科学

キーワード：虚血性心臓病 虚血再灌流傷害 低酸素誘導因子 Hif-1 ミトコンドリア 酸素消費量

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は絶え間なく拍動する臓器であり、血液を全身に送り出すポンプとして機能する。そのため心臓に要求される仕事量は膨大であり、心臓は生体内においてエネルギーの消費量が最も多い臓器の一つである。

心筋細胞におけるエネルギー代謝において、そのエネルギー通貨として機能する adenosine triphosphate (ATP) は主にミトコンドリアの電子伝達系において、酸素を利用することで合成される(好気性代謝)。一方で、生体は低酸素時には適応反応として積極的に好気性代謝から嫌気性代謝へと酸素代謝をシフトすることにより酸素需要量を減少させ、細胞保護および臓器保護を果たす。

これらの一連の低酸素応答において中心的な役割を果たす分子が低酸素誘導因子(Hif-1 α)である。Hif-1 α は常酸素環境下においてはプロリル水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain containing protein: PHD) により酸素を利用することで水酸化修飾を受け、Hif-1 α の水酸化修飾は蛋白分解シグナルとして作用し、速やかに分解される。一方で、低酸素環境下では水酸化修飾がなされないことによって細胞内に蓄積し、核内移行の後に転写因子として様々な遺伝子発現を調整し、低酸素応答と総称される様々な反応を誘導する。しかしながら、心血管病の病態進展における低酸素応答の役割は未だ十分には明らかにされておらず、また低酸素応答を利用した心血管病の治療戦略は未だに示されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、Hif-1 α の酸素代謝に対する作用を解析することで心血管病の病態生理を明らかにし、さらに first-in-class の新規 PHD 阻害剤である roxadustat を用いて Hif-1 α を中心とした低酸素応答を利用し、心血管病、特に虚血性心疾患に対する新たな治療法の開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 単離培養心筋細胞における検討

ラット新生仔単離培養心筋細胞 first-in-class の PHD 阻害剤である roxadustat を添加し、Hif-1 α および Hif-1 α によって転写制御を受ける遺伝子発現を western blot (WB) 法および quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 法により検討した。単離培養心筋細胞において roxadustat 添加による酸素消費量 (OCR: oxygen consumption rate) および細胞内 pH (ECAR: extracellular acidification rate) を Flux analyzer を用いて測定することにより酸素代謝への影響をリアルタイムに検討した。Roxadustat 添加が低酸素再酸素化刺激 (1%低酸素刺激 4 時間 + 常酸素培養 1 時間) によって誘導される細胞死に与える影響について Calcein-AM を用いて細胞生存率評価を行った。

(2) 心血管病病態モデルにおける検討

慢性心不全モデルにおける不全心筋における Hif-1 α の発現量を WB 法にて検討した。Roxadustat 投与による心筋組織での Hif-1 α および Hif-1 α によって制御される遺伝子発現 (*Ddit4*, *NDUFA4L2*) および蛋白発現 (PKM2, REDD1) をそれぞれ qRT-PCR 法および WB 法にて検討した。Roxadustat を 4 時間前に単回投与 (25 mg/kg) し、虚血再灌流モデル (45 分虚血、6 時間再灌流) を作成した。再灌流 6 時間後の TTC/Evans Blue による二重染色により梗塞サイズを解析し、血漿中の心筋逸脱酵素 (クレアチニンキナーゼ) を測定することで虚血による心筋傷害を検討した。

4. 研究成果

(1) 単離培養心筋細胞における roxadustat の影響

Roxadustat は Hif-1 α を増加させる。単離培養心筋細胞に Roxadustat (25 μ M) を添加したところ、4 時間後に著明な Hif-1 α の上昇とともに Hif-1 α に転写制御を受ける既知の蛋白 (REDD1) が増加していること、さらに siRNA を用いた Hif-1 の silencing では Hif-1 および REDD1 の増加が消失していることを確認した (図 1)。

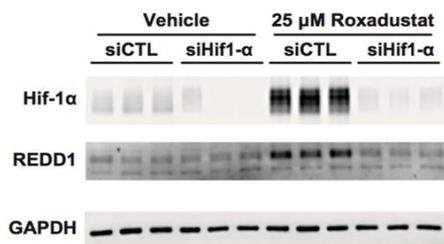


図1. 単離心筋細胞におけるroxadustat添加 (25 μ M)

Roxadustat 添加により好気性から嫌気性代謝への酸素代謝のシフトが誘導される Flux Analyzer Xp (Agilent 社)を用いて、リアルタイムに roxadustat (RXD) 添加の酸

素代謝への影響を検討した。Roxadustat 添加 2 時間後より心筋細胞の酸素消費量 (OCR) の低下が確認され、4 時間後には最大約 30% 程度の OCR の低下を認めた。一方で、嫌気性代謝を反映する ECAR については添加直後より上昇を認め、4 時間後には約 50% 程度増加した (図 2)。これらの結果から、PHD 阻害剤は好気性代謝を低下させる一方で、嫌気性代謝を亢進させることにより、酸素代謝を薬理的にシフトし得ることが示された。

さらに、Hif-1 α に対する siRNA を用いて silencing しておくことにより PHD 阻害剤に伴う ECAR の上昇は完全に消失した。PHD 阻害剤による OCR の低下については、OCR の初期値に明らかな違いが認められた一方で、roxadustat 添加による低下を同様に認めた。以上のことから、PHD 阻害剤は Hif-1 α 非依存性に OCR (好気性代謝) を低下させ、Hif-1 α 依存性に ECAR (嫌気性代謝) を上昇させることが明らかとなった。ただし、即時応答としての OCR 低下には Hif-1 α は寄与していないものの、Hif-1 α の silencing ではベース時の OCR が明らかに上昇していることから、定常状態においては Hif-1 α も OCR の制御に寄与していることが示された (図 2, Statistical significance was determined using one-way ANOVA with a post-hoc Tukey HSD test or Dunnett's test. *P<0.05, **P<0.01)。

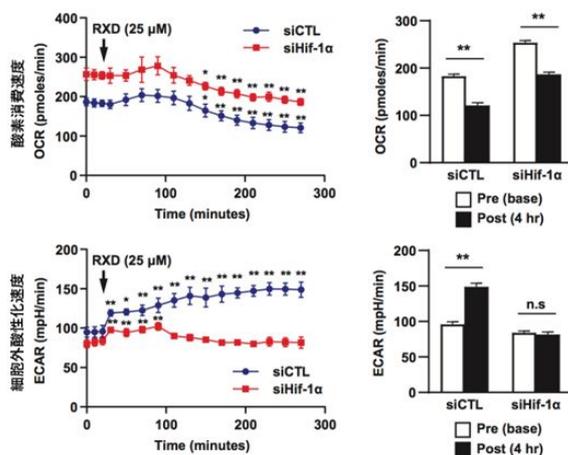


図2. roxadustat添加 (25 μ M)による酸素代謝の変容

Roxadustat (RXD) 添加は低酸素再酸素化による心筋細胞死を抑制した

好気性から嫌気性代謝への酸素代謝の変容は酸素消費量を低下させ、低酸素による細胞傷害から保護的に作用することが期待された。実際に低酸素刺激 4 時間前に roxadustat を添加した上で、1%低酸素 4 時間後に 1 時間の再酸素化刺激を加えたところ、誘導される細胞死が roxadustat 事前添加群において有意に細胞死が抑制された (図 3, Statistical significance was determined using one-way ANOVA with a post-hoc Tukey HSD test or Dunnett's test. *P<0.05)。

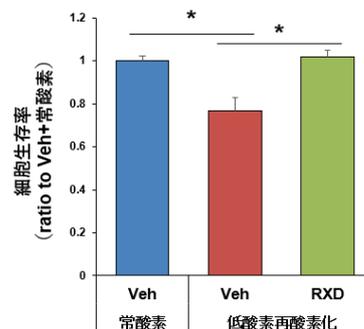


図3. 低酸素再酸素化刺激による細胞死への Roxadustat添加 (25 μ M)による保護効果

(2) 心血管病病態モデルにおける検討

慢性心不全の不全心筋では Hif-1 α が増加していた

心不全の不全心筋においては、ミトコンドリア機能 (酸素消費量、ATP 産生能) が低下し、嫌気性代謝にシフトしていることが示されており、慢性心不全の病態形成に強く関与していることが報告されている。変異型トロポニン T 拡張型心筋症モデル、圧負荷心不全モデル、心筋梗塞後心不全モデルの不全心筋を解析したところ、これらの心筋組織において著明に Hif-1 α が増加していることが確認された。

今回の検討により明らかとなった細胞実験における Hif-1 α の酸素代謝への影響を踏まえると、心不全の病態形成における好気性代謝 (ミトコンドリア呼吸) の抑制および嫌気性代謝の亢進に Hif-1 α が寄与しており、慢性心不全の病態形成の重要な分子であることが示唆された。

Roxadustat 投与により心筋組織の Hif-1 α は増加し、制御遺伝子の発現が亢進した

Hif-1 α の発現は慢性心不全においてはミトコンドリア機能を低下させることでエネルギー欠乏状態へ誘導する因子として機能している一方で、急性の虚血傷害については細胞実験に示されるように酸素需要量を抑制し、低酸素ストレスに対する耐性を獲得していることが示唆され、治療への応用が可能と考えた。Roxadustat をマウスに単回投与したところ、3-4 時間後をピークに Hif-1 α および制御遺伝子群 (*Ddit4/NDUFA4L2*) および蛋白 (PKM2/REDD1) の発現上昇を認めた (図 4, Statistical significance was determined using Student's t-test. *P<0.05, **P<0.01)。

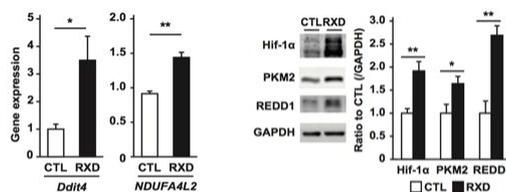


図4. Roxadustat単回投与 (25 mg/kg) による心筋組織の遺伝子 (左図)・蛋白発現変化 (右図)

Roxadustat の事前投与は、虚血再灌流傷害における梗塞巣を縮小した
 上記検討を踏まえ、roxadustat 投与 4 時間後に虚血再灌流モデルを作成し、再灌流後 6
 時間後に梗塞巣と心筋逸脱酵素として血漿のクレアチンキナーゼの解析を行った。
 Roxadustat 投与群において梗塞巣は著明に縮小し (図 4 左中図, Statistical significance
 was determined using Student's t-test. *P<0.05) 血漿中のクレアチンキナーゼは有
 意に低下した (図 4 右図, Statistical significance was determined using Student's t-test.
 *P<0.05) 。

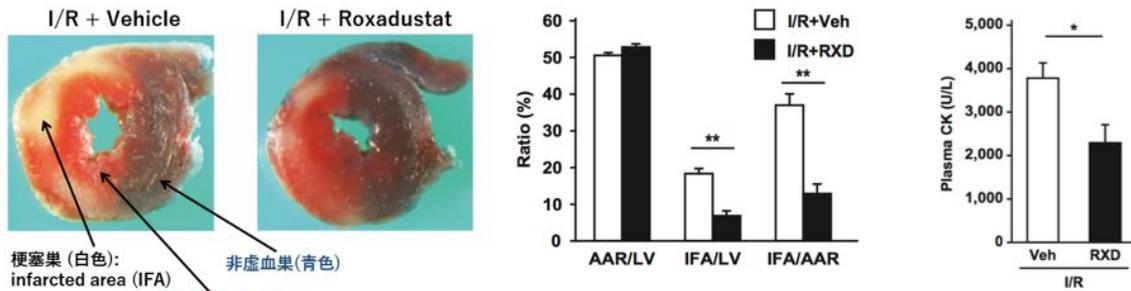


図5. Roxadustatの虚血再灌流傷害に対する保護効果

以上より、1) PHD 阻害により Hif-1 α 依存性・非依存性に OCR に表される好気性代謝が低下し、ECAR に表される嫌気性代謝が亢進すること、2) 慢性心不全のような慢性疾患においては相対的なエネルギー不足を助長し得ることから、Hif-1 は慢性心不全の病態形成に寄与している可能性があること、3) 一方で PHD 阻害剤を用いた薬理的な酸素代謝制御は、虚血再灌流傷害のような虚血性心疾患においては保護的に作用すること、が明らかとなった。特に3) については、虚血性心疾患のみならず、心臓手術の際の体外循環中の心筋保護や臓器移植の際の臓器保護にも応用し得ることが期待される¹⁾。

< 引用文献 >

1. Deguchi H, Ikeda M, Ide T, Tadokoro T, Ikeda S, Okabe K, Ishikita A, Saku K, Matsushima S, Tsutsui H. Roxadustat markedly reduces myocardial ischemia reperfusion injury in mice. *Circ J* 84 (6): 1028-1033, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 3件）

1. 著者名 Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Shun Furusawa, Kosei Ishimaru, Tomonori Tadokoro, Hiroko Deguchi Miyamoto, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Ko Abe, Shouji Matsushima, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 -
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 -
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 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 Hiroko Deguchi, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Tomonori Tadokoro, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Keita Saku, Shouji Matsushima, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 84
2. 論文標題 Roxadustat Markedly Reduces Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1028-1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1039.	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 Tomonori Tadokoro, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Hiroko Deguchi, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Shouji Matsushima, Tomoko Koumura, Ken-ichi Yamada, Hirotaka Imai, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 5
2. 論文標題 Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI insight	6. 最初と最後の頁 e132747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.132747.	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 Kosuke Okabe, Shouji Matsushima, Soichiro Ikeda, Masataka Ikeda, Akihito Ishikita, Tomonori Tadokoro, Nobuyuki Enzan, Taishi Yamamoto, Masashi Sada, Hiroko Deguchi, Keisuke Shinohara, Tomomi Ide, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 75
2. 論文標題 DPP (Dipeptidyl Peptidase)-4 Inhibitor Attenuates Ang II (Angiotensin II)-Induced Cardiac Hypertrophy via GLP (Glucagon-Like Peptide)-1 Dependent Suppression of Nox (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) 4-HDAC (Histone Deacetylase) 4 Pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 991-1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14400	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 Soichiro Ikeda, Shouji Matsushima, Kosuke Okabe, Masataka Ikeda, Akihito Ishikita, Tomonori Tadokoro, Nobuyuki Enzan, Masashi Sada, Hiroko Deguchi, Sachio Morimoto, Tomomi Ide, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 9
2. 論文標題 Blockade of L-type Ca ²⁺ channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF- κ B pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SCIENTIFIC REPORTS	6. 最初と最後の頁 9850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46367-6.	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田昌隆、井手友美、松島将士、田所知命、出口裕子、池田宗一郎、岡部浩祐、石北陽仁、筒井裕之
2. 発表標題 Ivabradineによる心拍数抑制は心筋梗塞境界部のHif-1 -p53の抑制を介して梗塞後新破裂を予防する
3. 学会等名 第126回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Tadokoro, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Hiroko Deguchi, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Shouji Matsushima, Tomoko Koumura, Ken-ichi Yamada, Hirotaka Imai, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Ferrptosis is the predominant regulated cell death in doxorubicin-induced cardiomyopathy (DIC)
3. 学会等名 第23回日本心不全学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出口裕子、池田昌隆、井手友美、田所知命、松島将士、池田宗一郎、岡部浩祐、石北陽仁、山本泰史、円山信之、佐田政司、筒井裕之
2. 発表標題 新規PHD阻害剤であるRoxadustatはマウスにおける心筋虚血再灌流傷害を軽減する
3. 学会等名 第127回日本循環器学会九州地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Shouji Matsushima, Tomonori Tadokoro, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Excessive Hif-1 induces cardiac rupture after myocardial infarction through p53-induced apoptosis
3. 学会等名 第35回 国際心臓研究会 (ISHR) 日本部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonori Tadokoro, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Shouji Matsushima, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Ferroptosis plays a major role in the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy
3. 学会等名 第35回 国際心臓研究会 (ISHR) 日本部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Shouji Matsushima, Tomonori Tadokoro, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Excessive Hif-1 induces cardiac rupture after myocardial infarction through p53-induced apoptosis
3. 学会等名 第83回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Tadokoro, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Shouji Matsushima, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Ferroptosis plays a major role in the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy
3. 学会等名 第83回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学循環器内科研究グループ、心不全 https://www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp/research/heart-failure/ 九州大学 循環器内科 https://www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp/

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