

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08581

研究課題名(和文) 生体内代謝イメージング法の確立と代謝改善を介した革新的心不全創薬へ向けた基盤研究

研究課題名(英文) Establishment of in vivo imaging and research for novel heart failure therapy targeting metabolism

研究代表者

木岡 秀隆 (Kioka, Hidetaka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70642099

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)：本研究では、1)新しい代謝イメージング法の確立、2)ATP産生増加により心不全を改善させる治療戦略の概念実証、3)エネルギー代謝に基づく心不全層別化を目標とした。MRIを用いてクレアチン(Cr)のイメージングを確立した。Crが豊富な骨格筋、精巣での画像化を行ったが、今後心臓でのイメージングに繋がる技術開発である。また、ミトコンドリアでのATP産生を増強させる分子G0s2に着目し、G0s2強制発現させたゼブラフィッシュが、低酸素下においてもATP産生を保持することで心機能を維持することを示した。最後に心臓核医学検査によりミトコンドリア機能を評価し、心筋症の治療反応性予測に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓はエネルギーを大量に消費する臓器であり、エネルギー不足は心機能低下、つまり心不全に繋がると考えられる。本研究では、エネルギー状態の評価方法、エネルギー状態を改善させる治療法の有用性検証、そしてエネルギー状態が予後に与える影響について研究を行った。心不全の原因はさまざまであり、個々の病態に基づいた個別化医療が求められるが、本研究で開発した画像による評価法は個別化医療へ向けた層別化に有用と期待される。またエネルギー状態を改善させることで心機能の改善を狙った新たな心不全治療薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed 1)to establish in vivo imaging system for the evaluation of metabolism, 2)to obtain the proof of concept in heart failure therapy targeting energy metabolism, and 3)to categorize patients with heart failure according to the energy status. We successfully established Cr-CEST-MRI that can visualize creatine (Cr) concentration in tissues such as muscle and testis. This imaging technique can be applied to heart in near future. We focused on a protein G0s2 that enhances mitochondrial ATP production. We generated G0s2 transgenic (TG) zebrafish and demonstrated that TG fish showed ischemic tolerance with maintaining ATP production even under hypoxia. Finally, we demonstrated that nuclear imaging of cardiac mitochondrial function using Tc-MIBI can predict the response to heart failure therapy in patients with cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：エネルギー代謝 イメージング 心不全

1. 研究開始当初の背景

心臓は常に自律拍動をするため他臓器に比して莫大な ATP を産生し、消費している。強心薬は、ATP 消費を増大させることから期待とは裏腹に心不全の予後を悪化させる。一方で 遮断薬や ACE 阻害薬等は心拍数減少、後負荷軽減を介して ATP 消費を減少させ、エネルギーバランスを改善させることで予後改善させると考えられている。しかしながら ATP 消費の抑制のみでは心不全の予後を十分に改善することは出来ておらず、積極的に ATP 産生を増強させる薬剤の開発は革新的治療法となることが期待される。研究代表者らは、低酸素時に ATP 合成酵素に直接結合する因子を検索した結果、ミトコンドリアでの ATP 産生を増強させる蛋白質 G0s2 を同定した(Kioka et al. PNAS 2014;111(1):273, Hayashi, Kioka et al. 2015;112(5):1553)。G0s2 は創薬標的になると考えられた。創薬に向けて、生体内でのエネルギー評価法の確立は必須である。どれだけ迅速に組織サンプルの処理を行ったとしても血流途絶後には代謝産物は秒単位で急速に変化し、生体内での状態を正確に評価することが不可能である。したがって心臓エネルギー代謝を進めるためには生きたまま、リアルタイムで代謝を評価する系の構築が必須である。研究代表者らは ATP 感受性蛍光プローブを用いることで体が透明なゼブラフィッシュ稚魚心臓での ATP 可視化に成功したが、MRI を用いた代謝分子クレアチンの分子イメージング法 (Cr-CEST-MRI) 確立を目指すことにした。また、心不全やその原因となる心筋症は原因がさまざまであり、現在画一的に用いられている治療薬に限界がある事は明らかである。心不全、心筋症の一定部分はエネルギー不全が原因になっていると想定されるものの、エネルギー状態の評価法として広く用いられている評価法は無い。虚血性心疾患の診断目的で臨床利用されている Tc-MIBI 心筋シンチは、その心筋細胞への取り込み機序からミトコンドリア機能 (ミトコンドリア膜電位) を評価していると考えられるが、心筋虚血イメージングとしてのみ用いられており、十分に活用されているとは言えない。

2. 研究の目的

生体内代謝イメージング法の確立と代謝改善を介した革新的心不全創薬へ向けて以下に取り組んだ。

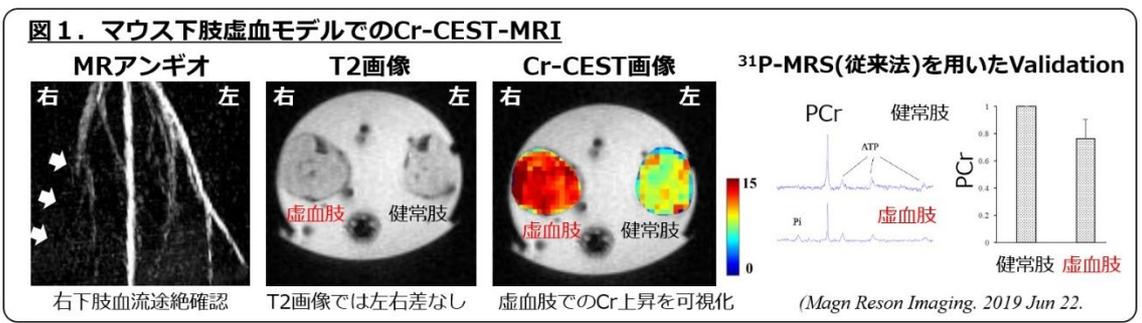
- I. 新規生体内代謝イメージング法の確立
- II. ATP 産生増強薬の in vivo POC 獲得
- III. エネルギー代謝に基づく心不全病態の層別化

3. 研究の方法

- I. 新規生体内代謝イメージング法の確立
 - 下肢虚血モデル、及び生体内で Cr が豊富な精巣を対象臓器として Cr-CEST-MRI の確立を目指した。妥当性は ³¹P-MRS により検証した。
- II. ATP 産生増強薬の in vivo POC 獲得
 - G0s2 発現量増加が心保護効果をもたらすかどうかを、G0s2 を心臓特異的に強制発現させたゼブラフィッシュモデルを用いて検証する。
 - また G0s2 発現を増強させる化合物のスクリーニングを培養細胞スクリーニング系で行い、まずは細胞実験により虚血に対する細胞死を抑制するかどうかを調べる。
- III. エネルギー代謝に基づく心不全病態の層別化
 - SPECT 用血流トレーサーとしてすでに臨床応用されている Tc-MIBI を用いてミトコンドリア機能に基づく心不全の層別化を行う。既存の心不全治療に対する治療反応性との関係を調べた。

4. 研究成果

- I. 新規生体内代謝イメージング法の確立
 - 下肢虚血モデルを用いて、Cr-CEST-MRI による Cr 分子イメージングを報告した (Magn Reson Imaging. 2019 Jun 22. doi: 10.1002/jmri.26844.)。右下肢を結紮し、MR アンギオ (MRA) にて右下肢血流の途絶を確認し、T2 強調画像では右下肢の変化は見られなかったが、Cr-CEST 画像において右下肢での Cr 増加を画像化することに成功した (図 1)。MRS においては Cr 低

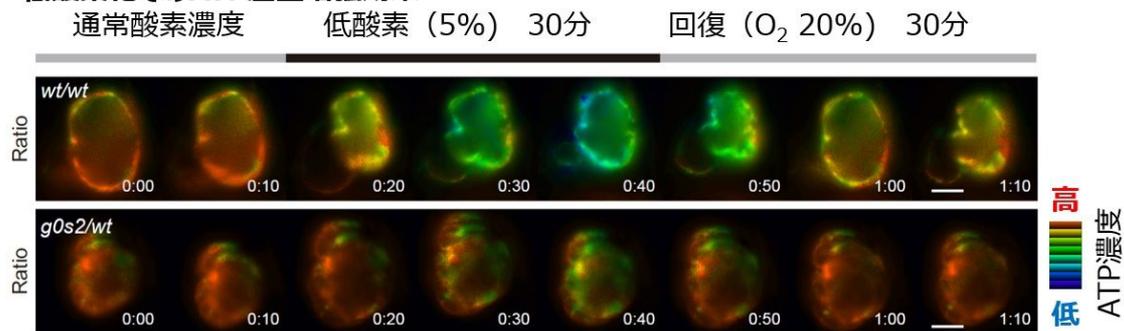


下に対応した PCr の上昇を認めることを確認し、Cr-CEST-MRI のバリデーションにも成功した。
 また、精巣虚血モデル、精巣放射線照射モデルを用いて、Cr-CEST-MRI の有用性を報告した (*J Magn Reson Imaging*. 2020 Dec 17, *J Magn Reson Imaging*. 2021 Nov;54(5):1457-1465.)。心臓を対象とした Cr-CEST-MRI にも取り組んでいるが、特にマウスにおいては心臓の心拍数がヒトと比べて 10 倍近く早く、motion artifact の克服には現在のところ至っていない。しかし、今後解析ソフトの改善、ヒトあるいは心拍数がヒトに近い動物モデルを用いた撮像により克服できることが期待され今後の課題である。

II. ATP 産生増強薬の in vivo POC 獲得

ゼブラフィッシュにおいて G0s2 の強制発現が虚血耐性をもたらすという in vivo POC 獲得を狙った。ATP 感受性蛍光プローブを心臓に発現させた in vivo ATP imaging system を用いて検討したところ G0s2 は ATP 濃度を上昇させ、低酸素下における心機能の低下を回復させたことを報告した (*FASEB J* 2020;34:2041-2054)。

図2. ゼブラフィッシュ心臓でのATPイメージングとG0s2強制発現 (g0s2/wt)による低酸素化でのATP産生増強効果



FASEB J 2020;34:2041-2054

G0s2のタンパク質量はユビキチンプロテアソーム系でのタンパク分解により制御されているという基礎データに基づき(*J Biol Chem*. 2019 Oct 4;294(40):14562-14573.)、G0s2 タンパク分解抑制する化合物の探索を目指した。G0s2 に GFP タグを融合した細胞アッセイ系を構築し、肺コンテンツイメージングシステムを用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。細胞実験において化合物が G0s2 の発現を上昇させ、低酸素化においても ATP 産生を増強し、細胞生存率を向上させる化合物を同定出来た (未発表)。今後エネルギー状態を改善させる新規創薬開発に向けて化合物を用いた in vivo POC 獲得を狙う。

III. エネルギー代謝に基づく心不全病態の層別化

53 例の拡張型心筋症について Tc-MIBI 心筋シンチによるミトコンドリア機能評価が心不全患者の治療反応性予測に有用であることを報告した (*Ann Nucl Med*. 2021 May 18. doi: 10.1007/s12149-021-01625-4.)。研究代表者らが拡張型心筋症の原因遺伝子として同定した BAG5 遺伝子の遺伝的欠損による心筋症 (*Sci Transl Med*. 2022;14(628):eabf3274) は、筋小胞体でのカルシウムハンドリング異常を起因として発症する。意外なことに撮像し得た BAG5 欠損心筋症全例で側壁での Tc-MIBI 取り込み欠損を認めた。この結果から Tc-MIBI 心筋シンチの欠損部位、及び洗い出し率により、拡張型心筋症の分子病態に基づいた層別化が可能である可能性が考えらる。現在画像データの定量化に取り組んでおり、今後個別化医療に向けて Tc-MIBI 心筋シンチが心筋症層別化活用出来ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10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 Hakui Hideyuki, Kioka Hidetaka, Miyashita Yohei, Nishimura Shunsuke, Matsuoka Ken, Kato Hisakazu, Tsukamoto Osamu, Kuramoto Yuki, Takuwa Ayako, Takahashi Yusuke, Saito Shigeyoshi, Ohta Kunito, Asanuma Hiroshi, Fu Hai Ying, (3人略), Sawa Yoshiki, Kitakaze Masafumi, Takashima Seiji, Sakata Yasushi, Asano Yoshihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in the co-chaperone protein BAG5 cause dilated cardiomyopathy requiring heart transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	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) 10.1126/scitranslmed.abf3274	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 Takahashi Yusuke, Kioka Hidetaka, Fukuhara Shinichiro, Kuribayashi Sohei, Saito Shigeyoshi, Asano Yoshihiro, Takashima Seiji, Yoshioka Yoshichika, Sakata Yasushi	4. 巻 54
2. 論文標題 Visualization of Spatial Distribution of Spermatogenesis in Mouse Testes Using Creatine Chemical Exchange Saturation Transfer Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmri.27734	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 Kiyose Yuji, Shiraki Tatsuya, Mizote Isamu, Nakamura Daisuke, Tsukamoto Yasumasa, Yokoi Kensuke, Kioka Hidetaka, Ohtani Tomohito, Hikoso Shungo, Minami Shigeru, Sakata Yasushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Dynamic Nature of Nodular Calcification in Cardiac Allograft Vasculopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: Cardiovascular Interventions	6. 最初と最後の頁 1378 ~ 1380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcin.2021.03.042	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 Chimura Misato, Ohtani Tomohito, Sera Fusako, Nakamoto Kei, Konishi Shozo, Miyawaki Hiroshi, Kajitani Kenji, Higuchi Rie, Kioka Hidetaka, Hikoso Shungo, Tomiyama Noriyuki, Sakata Yasushi	4. 巻 35
2. 論文標題 Focal severe decrease in myocardial technetium-99 m sestamibi uptake indicates ventricular irreversibility in patients with dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 881 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-021-01625-4	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 Miyashita Yohei, Tsukamoto Osamu, Matsuoka Ken,) (8人略)、Okamoto Chisato, Kioka Hidetaka, Oya Ryohei, Shinomiya Haruki, Hakui Hideyuki, Shintani Yasunori, Kato Hisakazu, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Asano Yoshihiro, Takashima Seiji	4. 巻 35
2. 論文標題 The CR9 element is a novel mechanical load responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202002111RR	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 Tsuru Hirofumi, Ishida Hidekazu, Narita Jun, Ishii Ryo, Suginobe Hidehiro, Ishii Yoichiro, Wang Renjie, Kogaki Shigetoyo, Taira Masaki, Ueno Takayoshi, Miyashita Yohei, Kioka Hidetaka, Asano Yoshihiro, Sawa Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Cardiac Fibroblasts Play Pathogenic Roles in Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 677 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-1008	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 Takahashi Yusuke, Kioka Hidetaka, Saito Shigeyoshi, Fukuhara Shinichiro, Asano Yoshihiro, Takashima Seiji, Yoshioka Yoshichika, Sakata Yasushi	4. 巻 53
2. 論文標題 Accurate Estimation of the Duration of Testicular Ischemia Using Creatine Chemical Exchange Saturation Transfer (CrCEST) Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 1559 ~ 1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmri.27456	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 Yashirogi Shohei, Nagao Takemasa, Nishida Yuya, Takahashi Yusuke, Qaqorh Tasneem, Yazawa Issei, Katayama Toru, Kioka Hidetaka, Matsui Tsubasa S, Saito Shigeyoshi, Masumura Yuki, Tsukamoto Osamu, Kato Hisakazu, Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Yashiro Kenta, Yamazaki Satoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 22
2. 論文標題 AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP 170	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050949	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 Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Fujita Takeshi, Asano Yoshihiro, Shintani Yasunori, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Imamura Hiromi, Kogo Mikihiro, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 In vivo real time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901686R	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 Nagao Takemasa, Shintani Yasunori, Hayashi Takaharu, Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Nishida Yuya, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Yashirogi Shohei, Yazawa Issei, Asano Yoshihiro, Shinzawa Itoh Kyoko, Imamura Hiromi, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Goto Yu ichi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	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 Kamikubo Kenta, Kato Hisakazu, Kioka Hidetaka, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Nishida Yuya, Asano Yoshihiro, Imamura Hiromi, Kawahara Hiroyuki, Shintani Yasunori, Takashima Seiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14562 ~ 14573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008544	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 Takahashi Yusuke, Saito Shigeyoshi, Kioka Hidetaka, Araki Rikita, Asano Yoshihiro, Takashima Seiji, Sakata Yasushi, Yoshioka Yoshichika	4. 巻 51
2. 論文標題 Mouse skeletal muscle creatine chemical exchange saturation transfer (CrCEST) imaging at 11.7T MRI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 563 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmri.26844	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木岡 秀隆
2. 発表標題 Oxidative Phosphorylation as a Therapeutic Target for Heart Failure
3. 学会等名 第37回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木岡 秀隆
2. 発表標題 Excitation-Contraction Coupling and Membrane Structure in the Heart
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木岡 秀隆
2. 発表標題 Establishment of in vivo ATP Imaging System in Beating Heart and Development of Novel Drug Therapy to Increase Mitochondrial ATP production
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木岡 秀隆
2. 発表標題 Visualization of ATP dynamics and protection against hypoxia in the heart
3. 学会等名 BCVR
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 佑典, 齋藤 茂芳, 木岡 秀隆, 荒木 力太, 高島 成二, 坂田 泰史, 吉岡 芳親
2. 発表標題 11.7T-MRI装置を用いたマウス下肢骨格筋CrCESTイメージングの確立
3. 学会等名 第47回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Cr-CEST-MRIを用いた精巣機能の部位別診断法	発明者 木岡秀隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-201814	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 病態分子探索グループ http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=56</p>

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