

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08110

研究課題名(和文) AMPデアミナーゼ活性制御機構の解明と糖尿病性心筋症治療への応用

研究課題名(英文) Mechanisms underlying regulation of AMP deaminase activity and its involvement in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy

研究代表者

丹野 雅也 (Tanno, Masaya)

札幌医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00398322

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)：糖尿病性心筋症において、mitochondria-associated ER membrane (MAM)におけるAMPデアミナーゼ (AMPD) の機能を検討した。左室心筋におけるMAM分画蛋白を解析し、AMPDの発現量は2型糖尿病ラットにおいて非糖尿病対照ラットと比較して有意に高いこと、心筋芽細胞株に過剰発現させたAMPDが細胞質およびMAMに局在しMAMの形成が促進されること、ミトコンドリアCa²⁺レベルを上昇させること、酸化ストレスによるミトコンドリア膜電位低下を助長することを見出した。これらの成績からMAMに局在するAMPDが糖尿病性心筋症の新たな治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性心筋症は、発症早期には左室拡張機能障害を呈し、左室収縮能の維持された心不全(HF-pEF)の主要な原因の一つである。その後、左室収縮能が低下した心不全(HF-rEF)へと進行する。HFpEFを呈する本症はその患者数の増加にも関わらず、現時点では根本的な治療は無く、破綻した血行動態の是正や過剰に貯留した体液の軽減を図る対症療法が中心となる。必然的に改善は一時的であり、再増悪を繰り返すことが多い。本研究で見出された、糖尿病性心筋症におけるAMPDによるMAMの過形成が関連するミトコンドリアのCa²⁺の過負荷は、糖尿病性心筋症における新たな治療標的になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated roles of AMP deaminase (AMPD) localized in the mitochondria-associated ER membrane (MAM) in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. By analyzing proteins contained in the MAM fraction in the left ventricular myocardium, AMPD was found to be localized in the MAM area more abundantly in type 2-diabetic rats with diabetic cardiomyopathy than in the MAM area of non-diabetic control rats. Furthermore, we found that AMPD overexpressed in H9c2 cells and primary cardiomyocytes reside in the MAM area, resulting in promoted MAM formation, increased mitochondrial Ca²⁺ level, decreased mitochondrial calcium retention capacity, augmented oxidative stress, all of which contributed to the reduction of mitochondrial membrane potential. These findings indicate that AMPD excessively localized in the MAM area is associated with the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy.

研究分野：心不全

キーワード：糖尿病性心筋症 AMPデアミナーゼ ミトコンドリア小胞体近接領域

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性心筋症は、冠動脈疾患や高血圧を原因としない糖尿病患者における心機能障害と定義され (J Am Coll Cardiol 2013, Eur Heart J 2013)、発症早期には拡張期能障害を呈する。本邦のレジトリ研究によると、左室収縮能が維持された心不全 (HF-pEF) による心不全入院患者の 30~40%に糖尿病が合併し (Circ J 2009, Eur Heart J 2008, Circ J 2018)、その臨床的重要性が示唆される。しかし、現時点では特異的治療法は無いため、我々はその開発を目指して研究に着手し以下の知見を得てきた。

(i) 肥満 2 型糖尿病モデルラットの OLETF (25-30 週齢) を用い、phenylephrine の持続静注による圧負荷 (200 mmHg) 前後において左室内圧-容積曲線を解析した。OLETF は圧負荷に伴い顕在化する左室拡張障害を有し、臨床的な HF-pEF と同様の病態を呈することが示された。

(ii) 間質線維化の程度、心筋弾性を規定する構造蛋白 Titin の発現レベルとリン酸化は OLETF と非糖尿病対照ラット LETO の間で差は無く、受動的な心筋拡張性には差がなかった。

(iii) 次に左室心筋組織を用いてメタボローム解析をおこなった。

[a] OLETF においては AMPD の活性亢進により、圧負荷下で ATP および adenine nucleotide pool (AMP+ADP+ATP) が減少していた。

[b] ATP レベルは Tau および LVEDP いずれとも有意な負の相関 ($R=-0.49$, $p=0.03$ および $R=-0.53$, $p=0.02$) を示し、ATP レベルの低下が拡張機能障害を惹起することが示唆された。次に AMPD3 の活性制御機構の解明を試みた。OLETF では AMPD3 蛋白の発現レベルが LETO より有意に高かった。ユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解および mRNA 発現レベルは OLETF と LETO で同等であった。そこで microRNA による転写後調節の関与を検討するため microRNA array を行ない、OLETF における miR-301b の発現低下が AMPD3 の発現レベル上昇に寄与することを見出した。これらの成績から、miR-301b を標的とした核酸医薬や、AMPD3 阻害薬が糖尿病性心筋症の新規治療として有効である可能性が考えられる。しかし AMPD は重要な生理機能を有するため、全細胞分画での画一的な抑制は有害現象を惹起する懸念がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では糖尿病性心筋症において AMPD3 の心筋細胞内局在、とくにミトコンドリア筋小胞体近接領域(MAM: mitochondria-associated membrane)に局在する AMPD3 の病態的意義に焦点を当て、詳細に検討する。MAM にはシグナル分子をはじめさまざまなタンパク質が局在し重要な生理機能を担う。その中でも MAM を介した小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} の輸送については多くの研究がなされ注目されている。ミトコンドリアにおける Ca^{2+} は ATP 産生に必須の酵素の活性化に必要である一方、 Ca^{2+} 過負荷はミトコンドリア透過性遷移孔の開孔を誘導し、膜電位の低下によるミトコンドリア呼吸能の低下や細胞死の原因となる。したがって MAM の機能適正化によるミトコンドリア Ca^{2+} レベルの制御は細胞の恒常性維持に極めて重要であり、実際に心機能障害を呈する 1 型糖尿病動物モデルの心筋において MAM 形成の亢進がミトコンドリア Ca^{2+} 過負荷に寄与することが報告されている

3. 研究の方法

MAM 分画蛋白を解析した予備実験では、左室心筋における AMPD3 発現量は MAM において、肥満インスリン抵抗性 2 型糖尿病モデルラットである OLETF で非糖尿病対照ラットである LETO よりも有意に高かった。

[a] 糖尿病心筋での MAM 形成促進有無の検討

OLETF と LETO の左室心筋の MAM 領域を以下により比較検討する。①透過電子顕微鏡で SR とミトコンドリアの接点として観察される MAM 領域を定量する。②SR (DsRed2-ER) とミトコンドリア (MitoTracker Green) の蛍光染色を行い、両染色陽性域を MAM 領域として定量評価する。

[b] AMPD3 が MAM 分画に局在する機序の検討

AMPD3 は 90-kDa の全長型と 78-kDa の N 末端切断型で存在する (J Mol Cell Cardiol 2018)。予備実験では細胞質分画では 90-kDa AMPD3 が、ミトコンドリア分画では 78-kDa AMPD3 が優位であり、MAM では両者が均等に局在していた。細胞質および MAM における 90-kDa AMPD3 の発現レベルは OLETF で LETO よりもそれぞれ 35%、60%増加していたが、78-kDa AMPD3 の発現レベルは MAM およびミトコンドリアのいずれにおいても OLETF と LETO で同等であった。したがって 90-kDa AMPD3 が OLETF における MAM 形成促進、MAM での Adenine nucleotide pool と ATP レベルの低下に重要な役割を果たす可能性が考えられる。90-kDa AMPD3 が MAM に局在する機序としては他の MAM 蛋白との相互作用が考えられる。そこで、MAM 分画蛋白を AMPD3 抗体で免疫沈降し、沈降物の二次元電気泳動で得られたスポットに含まれる蛋白を TOF/MS で同定する。

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

[c] AMPD 過剰発現が MAM 形成に及ぼす影響の検討

一次心筋細胞、心筋芽細胞株 (H9c2 細胞) において AMPD を過剰発現し、AMPD の局在ならびに MAM 領域を定量評価することで AMPD が MAM 領域に局在することと、MAM 形成促進の因果関係を確認する。

[d] MAM 形成促進が mitochondrial calcium retention capacity に及ぼす影響の検討

一次心筋細胞、心筋芽細胞株 (H9c2 細胞) において AMPD を過剰発現し、MAM 領域が拡大することが確認されれば、溶媒に Ca^{2+} を段階的に加え、経時的に溶媒の Ca^{2+} 濃度を測定することにより、ミトコンドリア透過性遷移孔開孔をもたらす閾値としての mitochondrial calcium retention capacity を測定する。

[e] MAM 形成促進が mitochondrial calcium retention capacity に及ぼす影響の検討

一次心筋細胞、心筋芽細胞株 (H9c2 細胞) において AMPD を過剰発現し、mitochondria 呼吸能を測定し、MAM 領域増大が呼吸能に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

本研究では MAM 分画蛋白を解析し、左室心筋 MAM 分画における AMPD の発現量は 2 型糖尿病ラットにおいて非糖尿病対照ラットと比較して有意に高いことを見出した。さらに H9c2 細胞、心筋細胞などに過剰発現させた AMPD が細胞質および MAM に局在することに加え、これらの細胞では MAM の形成が促進されること、ミトコンドリア Ca^{2+} レベルが上昇すること、酸化ストレスによるミトコンドリア 膜電位低下が助長されることを見出し発表した。これらの成績は AMPD が MAM 蛋白との相互作用により MAM 形成を促進し、ミトコンドリア Ca^{2+} 過負荷を介して心機能障害に寄与する可能性を示唆し、糖尿病性心筋症における新規治療標的となり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osanami A, Sato T, Toda Y, Shimizu M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ohwada W, Ogawa T, Miura T, Tanno M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Adenosine monophosphate deaminase in the endoplasmic reticulum-mitochondria interface promotes mitochondrial Ca ²⁺ overload in type 2 diabetes rat hearts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 560-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13982.	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 丹野 雅也, 長南 新太, 小川 俊史, 神津 英至	4. 巻 36
2. 論文標題 糖尿病性心筋症におけるAMPデアミナーゼの役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 762-767
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 丹野雅也	4. 巻 39
2. 論文標題 糖尿病性心筋症に対する新規治療開発 -AMPデアミナーゼおよびキサンチンオキシダーゼ阻害による拡張機能障害改善を目指して-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research Papers of The Suzuken Memorial Foundation	6. 最初と最後の頁 101-107
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 Igaki Y, Tanno M, Sato T, Kouzu H, Ogawa T, Osanami A, Yano T, Kuno A, Miki T, Nakamura T, Miura T.	4. 巻 154
2. 論文標題 Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.01.002.	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 丹野雅也、長瀬ちひろ、三浦哲嗣	4. 巻 25
2. 論文標題 糖尿病性心筋症を診断する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart View	6. 最初と最後の頁 2-7
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Toda Y, Miura T.
2. 発表標題 Upregulated AMP Deaminase in Mitochondria-associated ER Membranes in Diabetic Hearts Lowers the Threshold for Mitochondrial Permeability Transition.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanno M, Osanami A, Kouzu H, Ogawa T, Kuno A, Miura T.
2. 発表標題 Upregulated AMP Deaminase in Mitochondria-associated ER Membranes and Cytosol Distinctively Contributes to Pressure Overload-induced Cardiac Dysfunction in Diabetic Hearts.
3. 学会等名 日本循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹野雅也
2. 発表標題 糖尿病性心筋症の病態・治療の現状とこれから
3. 学会等名 日本糖尿病学会 糖尿病学の進歩 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T and Miura T.
2. 発表標題 AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes contributes to reduction of the threshold for mitochondrial permeability transition in type 2 diabetic hearts.
3. 学会等名 American Heart Association scientific session
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T and Miura T
2. 発表標題 AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes contributes to reduction of the threshold for mitochondrial permeability transition in type 2 diabetic hearts.
3. 学会等名 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T and Miura T
2. 発表標題 Upregulated AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes in diabetic hearts lowers the threshold for mitochondrial permeability transition.
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	久野 篤史 (Atsushi Kuno) (30468079)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	矢野 俊之 (Toshiyuki Yano) (40444913)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

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