

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16026

研究課題名(和文)心筋リモデリングの病態基盤および新規治療ターゲットとしてのTim44の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanisms of mitochondrial function in failing heart by Tim44 and its therapeutic application.

研究代表者

池田 宗一郎(Ikeda, Soichiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00885410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後の不全心筋においてTim44が減少し、心筋細胞に対する過酸化水素刺激でもTim44が減少した。Tim44のheterozygous KOではベースラインでの心機能は変化しなかったが心筋梗塞後の心機能低下が増悪した。アデノウイルスを用いたTim44の過剰発現は過酸化水素による心筋細胞死を軽減させることが明らかとなった。Tim44の減少は心筋梗塞後の不全心筋において心筋細胞死に関連している可能性が示唆され、Tim44の過剰発現は心筋細胞死を軽減させることで心筋保護的に機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は不全心おけるミトコンドリア機能障害の機序解明やTim44の役割の解明を行うことで心不全および心筋リモデリングの病態基盤の解明を明らかにするとともに、機序解明により新規治療法の開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In failing hearts after myocardial infarction (MI), Tim44 was decreased compared to sham-operated mice. In cardiomyocytes, Tim44 was decreased by administration of H₂O₂. Heterozygous Tim44 knockout (KO) mice did not show cardiac dysfunction at baseline. After MI, heterozygous Tim44 KO mice exhibited cardiac dysfunction compared with WT mice. Overexpression of Tim44 in cardiomyocytes ameliorated H₂O₂-induced cell death in cardiomyocytes. These results suggest that, in failing hearts after MI, the decrease in Tim44 is related to cardiomyocytes death and cardiac dysfunction and overexpression of Tim44 prevents cardiac dysfunction by attenuating cardiomyocytes death.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 心筋リモデリング ミトコンドリア 酸化ストレス 細胞死

1. 研究開始当初の背景

我が国における心不全患者は毎年約 30 万人ずつ増加しており、日本の高齢化に伴いさらに増加することが予想される。これまで薬物治療・非薬物治療の進歩によって心不全の予後は改善してきた。しかし、慢性心不全の最重症であるステージ D の 1 年後の死亡率は 50-60%となっており、未だに予後不良であり、新規治療法の開発が求められている。心不全において神経体液調節性因子に対する治療は確立しているが、ミトコンドリアなどの細胞内小器官(オルガネラ)をターゲットとした治療戦略は皆無である。近年、心筋リモデリングの発症・進展にミトコンドリア機能障害が関与することが明らかにされている。近年、ミトコンドリアタンパク取り込み機構がミトコンドリア機能維持に重要であることが明らかとなってきた。ミトコンドリアには 1500 を超えるタンパク質が存在するが、ミトコンドリア DNA はわずか 13 タンパクしかコードしていない。ミトコンドリアタンパクの 99%は核 DNA から合成されミトコンドリア内へ輸送される。タンパクはミトコンドリア膜に局在する TOM 複合体、TIM 複合体、PAM 複合体を通過しミトコンドリア内に取り込まれる(図 1)。Tim44 は腎疾患や悪性腫瘍においても重要な役割を果たすこと知られている。このような背景から『Tim44 によるミトコンドリア機能異常が心筋リモデリングの発症・進展に関与する』という仮説を検証する本研究を立案するに至った(図 2)。

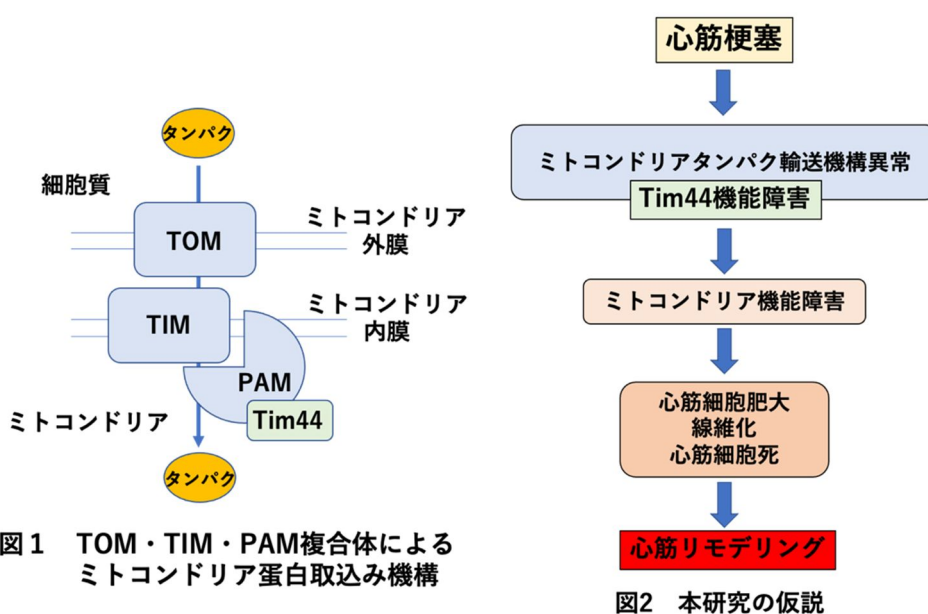


図1 TOM・TIM・PAM複合体によるミトコンドリア蛋白取込み機構

図2 本研究の仮説

2. 研究の目的

本研究の目的は、『心不全の病態形成に Tim44 によるミトコンドリア機能制御異常が関与する』という仮説を検証するとともに『Tim44 の制御によるミトコンドリア機能をターゲットとした心不全治療』という独自のパラダイムによる心不全の治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法 (図 3)

(1)心筋リモデリングにおける Tim44 およびミトコンドリア機能評価

マウスの左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成後 1、3、7、14、28 日に下記 - を評価することで、心筋リモデリングにおける Tim44、ミトコンドリア機能、心筋細胞死との関連を明らかにする。

心不全重症度評価：死亡率、心エコー(左室径、左室駆出率など)、体重、臓器重量(心臓、肺)

心筋組織学的重症度：心筋細胞肥大(WGA 染色)、間質線維化(MT 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色)、細胞障害(HE 染色)

心筋組織酸化ストレスレベル：4HNE・カルボニル化タンパク (ウェスタンブロット(WB 法))、TBARS

Tim44 評価：Tim44 の発現 (RT-PCR 法、WB 法)

ミトコンドリア機能評価：呼吸能 (Flux-analyzer)、複合体系形成(Blue-native page 法)、ATP content(生化学 assay)、ミトコンドリア電子伝達系の活性評価

心筋細胞死:cleaved caspase-3 (WB 法) Celltiter blue assay

(2)心筋細胞障害モデルにおける Tim44 およびミトコンドリア機能評価

新生仔ラット培養心筋細胞に H2O2 (100mM, 24h)を投与し、上記 1. ~ と同様の項目を評価する。

(3)心筋リモデリングにおける Tim44 の役割の解明

我々が作成した homozygous Tim44 ノックアウト (K0) マウスは胎生致死であった。一方、heterozygous Tim44K0 マウスは Tim44 のタンパク発現が野生型に比べて半減していたが、心臓の形態および機能には異常を認めなかった。この heterozygous K0 マウスに対して心筋梗塞を作成し 28 日後に上記 1. ~ を評価し、心不全における Tim44 の役割を解明する。

(4)心筋リモデリングにおける Tim44 の役割の解明

上記 2 の H202 による心筋障害モデルにおいて siRNA による Tim44 のノックダウンを行い、上記 1. - を評価する。

(5)心筋リモデリングにおける Tim44 によるミトコンドリア制御機構の解明

不全心筋において Tim44 によりミトコンドリア取込みが制御される因子を同定する。

(6)Tim44 過剰発現による心筋細胞障害およびミトコンドリア機能障害抑制効果の検証

心筋細胞において adenovirus を用いて心筋細胞に Tim44 を過剰発現し、酸化ストレス、ミトコンドリア機能および心筋細胞死を評価する。

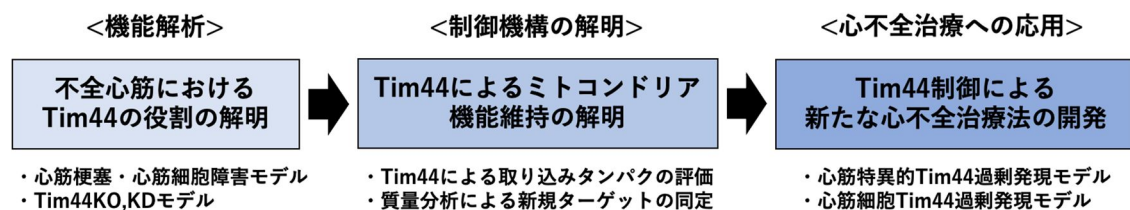


図3 研究計画

4. 研究成果

(1)梗塞後心筋で Tim44 の発現が減少した

左冠動脈結紮モデルにおいて Day28 において Tim44 の発現は有意に減少した (図 4)。また、心筋細胞に対する過酸化水素投与でも同様に Tim44 のタンパク量が減少した。

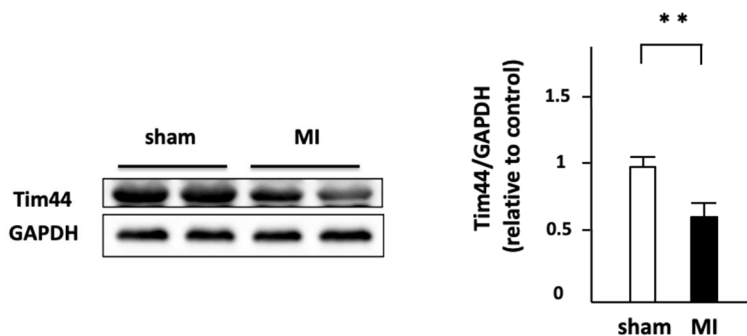


図 4 梗塞後心筋での Tim44 の発現 (**p<0.01)

(2)Tim44 のノックアウトは心筋梗塞後リモデリングを増悪した

Tim44 のノックアウトは心筋梗塞後非梗塞部心筋で左室駆出率の低下および左室拡大を増悪し、心筋重量を増悪した(図 5)。同様に siRNA を用いた Tim44 のノックダウンは過酸化水素投与による心筋細胞死を増悪した。

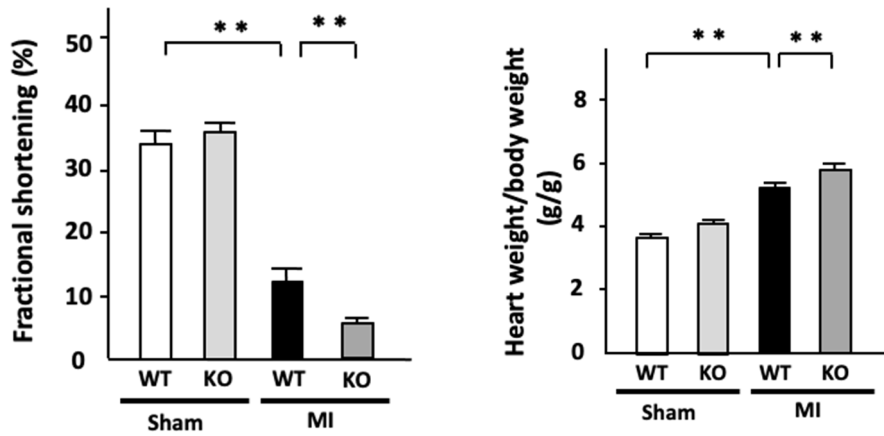


図5 Tim44 のノックアウトによる左室駆出率および心筋重量(**p<0.01)

(3)Tim44 の過剰発現は過酸化水素による心筋細胞死を抑制した
 アデノ随伴ウイルスを用いた Tim44 の過剰発現は心筋梗塞後の心筋リモデリングを軽減した(図6)。同様に Tim44 の過剰発現は心筋細胞において心筋細胞死を減少した。

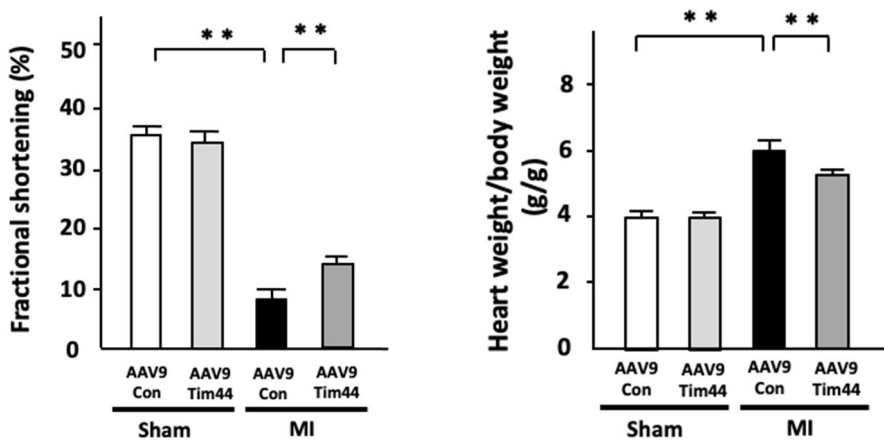


図6 Tim44 の過剰発現による左室駆出率および心筋重量(**p<0.01)

(4)まとめ

上記より Tim44 は梗塞後心筋の非梗塞部において発現が減少していた。Tim44 は梗塞後心筋において心筋細胞死を増悪することで心筋リモデリング増悪に与与する可能性が考えられた。またアデノ随伴ウイルスによる Tim44 過剰発現は心筋細胞死を抑制することで心筋リモデリング増悪を軽減し、Tim44 は梗塞後心筋において新規治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Ishikita Akihito, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Nishimura Ryohei, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Kinugawa Shintaro, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103517 ~ 103517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103517	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 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Sato Midori, Abe Ko, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Excessive Hypoxia Inducible Factor 1 Expression Induces Cardiac Rupture via p53 Dependent Apoptosis After Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.020895	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 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Abe Ko, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 36
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 257 ~ 262
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 Enzan Nobuyuki, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Yamamoto Taishi, ...Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 132
2. 論文標題 ZBP1 Protects Against mtDNA-Induced Myocardial Inflammation in Failing Hearts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 1110 ~ 1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.122.322227	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 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Sada Masashi, Abe Ko, Sato Midori, Hanada Akiko, Arai Shinobu, Ohtani Kisho, Nonami Atsushi, Mizuno Shinichi, Morimoto Sachio, Motohashi Shinichiro, Akashi Koichi, Taniguchi Masaru, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Immunomodulatory Cell Therapy Using GalCer-Pulsed Dendritic Cells Ameliorates Heart Failure in a Murine Dilated Cardiomyopathy Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation: Heart Failure	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.122.009366	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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