

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16080

研究課題名（和文）NADPHオキシダーゼ構成因子p22phoxを標的とした新規心不全治療への展開

研究課題名（英文）Development of novel heart failure treatment targeting NADPH oxidase component p22phox

研究代表者

中田 康紀（Nakada, Yasuki）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70812379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：活性酸素の主要な供給源となっているNADPHオキシダーゼ（NOX）とヘテロ二量体を形成しているp22phoxに関して研究を行った。ヒト心不全患者の心臓サンプルでは、健常者に比較し、有意にp22phoxの発現が亢進していることを認めた。また、心筋特異的p22phoxノックアウトマウスでは、心筋収縮・弛緩の中心的役割を果たしている心筋筋小胞体Ca²⁺-ATPase（SERCA2a）の発現量が低下しており、p22phoxはNOXの安定化だけでなく、SERCA2aの発現維持に関わ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

高齢化社会を迎えた日本において、心血管疾患による死亡は癌に次いで2番目に多く、そのなかでも心不全による死亡の割合が最も多くなっている。心不全患者に対する治療薬が日々開発されているものの、未だに予後不良な疾患のままであり、従来とは異なる視点から分子メカニズムを検討する必要がある。今回の研究では心不全におけるNADPHオキシダーゼファミリーの新たな機序の解明するものであり、新規の治療薬を開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We researched p22phox, which forms a heterodimer with NADPH oxidase (NOX), the main source of reactive oxygen species. We found that the expression of p22phox was significantly increased in heart samples from human heart failure patients compared to healthy subjects. In addition, cardiomyocyte-specific p22phox knockout mice showed reduced expression of myocardial sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2a), which plays a central role in cardiac contraction and relaxation, suggesting that p22phox is involved not only in stabilizing NOX but also in maintaining the expression of SERCA2a.

研究分野：循環器

キーワード：心不全 NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた日本において、心血管疾患による死亡は癌に次いで2番目に多く、そのなかでも「心不全」による死亡の割合が最も多くなっている。心不全患者に対する治療薬が様々開発されているものの、未だに予後不良な疾患のままであり、従来とは異なる視点から分子メカニズムを詳細に検討し、新規治療法の開発に取り組む必要がある。

心不全患者では、心筋虚血や交感神経緊張に伴うカテコラミンの上昇、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化などにより、心筋で活性酸素(reactive oxygen species: ROS)が発生している。不全心筋において発生したROSによる酸化ストレスは、心筋に肥大、アポトーシスを引き起こし、心不全の病態悪化につながっている。

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)オキシダーゼ(NOX)は、私たちの体におけるROSの主要な供給源となっている。申請者らはROSの産生に寄与するNOXの発現を調節するタンパクを探索し、NOXとヘテロ二量体を形成し、CYBA遺伝子によってコードされる22kDaの膜貫通タンパク質である「p22^{phox}」に注目した。CYBAには比較的多数の多型があり、冠動脈疾患や高血圧、虚血性脳血管疾患との関連が報告されている。しかしながら、心筋細胞におけるp22^{phox}の正確な役割は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

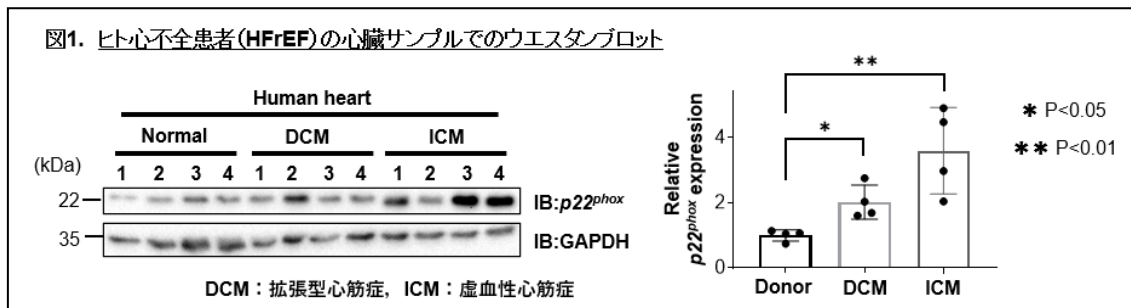
人体において、ROSの主要な供給源となっているNOX構成因子である内因性p22^{phox}の機能解明を行うことで、新たな心不全治療への展開を探る。

3. 研究の方法

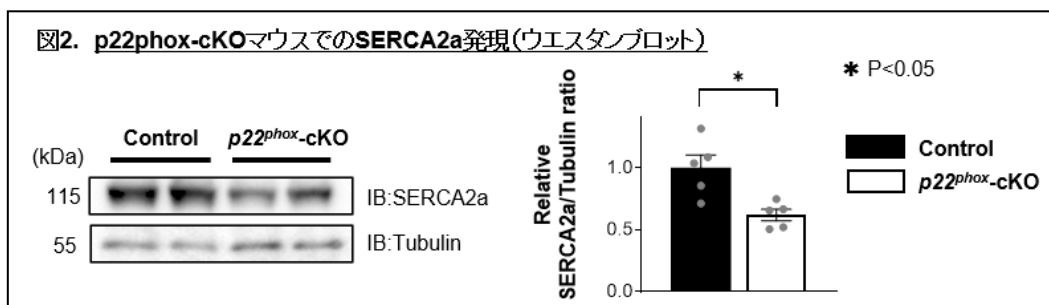
- ① ヒト心臓サンプルを用いて、健常者と心不全患者におけるp22^{phox}の発現を検討する。
- ② p22^{phox}ノックアウトマウスを用いて、内因性p22^{phox}の機能解明を行う。

4. 研究成果

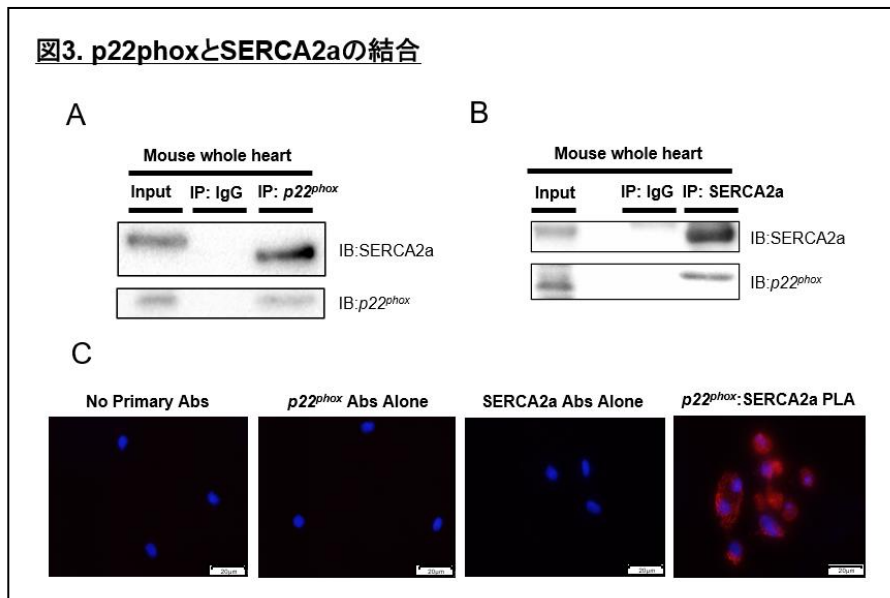
はじめに、ヒトの心臓サンプルでp22^{phox}の発現を確認したところ、心不全患者では健常者に比較して、p22^{phox}の発現が有意に増えており(図1)、マウスの心臓圧負荷モデルである胸部大動脈狭窄(TAC)後も同様にp22^{phox}の発現が有意に増えていた。



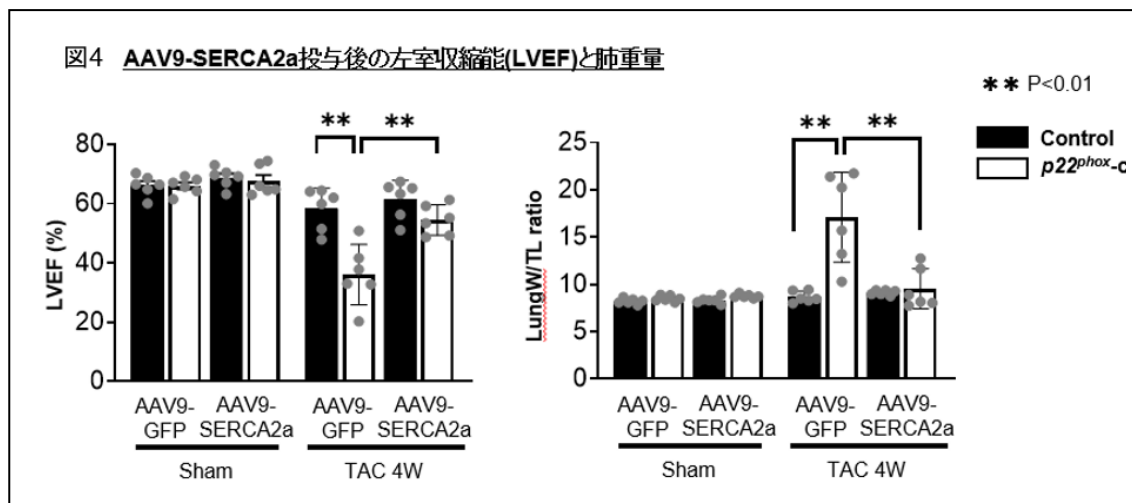
そこで、心臓特異的p22^{phox}ノックアウトマウス(p22^{phox}-cKO)を作成し、TACを施行したところ、p22^{phox}-cKOマウスではコントロールマウスと比較して、有意に心収縮能の低下を認め、肺重量も増加していた。このことから、心不全において、p22^{phox}は代償的に増加し、心保護的に働いていることが予想された。次に、質量分析でp22^{phox}と結合するタンパクを調べたところ、心筋筋小胞体Ca²⁺-ATPase(SERCA2a)が最も多い結果であった。そこで、p22^{phox}-cKOマウスのSERCA2aの発現量を調べたところ、興味深いことにコントロールマウスと比較してSERCA2aのmRNAの発現量に差を認めなかったが、SERCA2aのタンパク発現量は有意に減少していた(図2)。



さらに、p22phox と SERCA2a の相互作用について検討したところ、共免疫沈降実験において、抗 p22phox 抗体を用いた免疫沈降物で SERCA2a が検出された(図 3A)．逆に、抗 SERCA2a 抗体を用いた免疫沈降物では p22phox が検出され(図 3B)，p22phox と SERCA2a が物理的に相互作用していることが示唆された．この p22phox-SERCA2a の直接的な相互作用を、近接ライゲーショニアッセイ(PLA)を用いてさらに検証した．このアッセイは、40 ナノメートル以内の距離で相互作用するタンパク質のペアをラベル付けし、直接的なタンパク質間相互作用または複合体形成の強力な指標となる．抗 p22phox 抗体と抗 SERCA2a 抗体の両方が存在する場合のみ、心筋細胞の核周囲領域で赤色の強力な PLA シグナルが検出され、p22phox-SERCA2a 複合体が存在することが示された(図 3c)．



以上の結果より、p22^{phox} が SERCA2a に直接結合し、タンパク発現の維持に寄与していることが示唆された．そこで、p22^{phox}-cKO マウスの心機能低下に SERCA2a が関与しているかを確認するために AAV9-SERCA2a を用いて、p22^{phox}-cKO マウスに SERCA2a の補充を行った．その結果、TAC4 週間後において、p22^{phox}-cKO マウス+AAV9-SERCA2a では心収縮力が保たれる傾向があり、肺重量の増加も抑えられる結果であった(図 4)．



現在、p22phox が SERCA2a の酸化分解を防ぐ役割を担うデータが得られてきている．今後、p22phox が ROS の産生に関与するだけでなく、心筋細胞において SERCA2a の安定化に関わることを示し、心不全治療の新たなターゲットとなる可能性を探っていく．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田康紀
2. 発表標題 圧負荷におけるSERCA2aを介したp22phoxの心保護的な役割
3. 学会等名 第26回日本心不全学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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