

令和 6 年 6 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16144

研究課題名（和文）T細胞Hexokinaseのミトコンドリアからの脱結合は圧負荷心不全を抑制するか

研究課題名（英文）Impact of Hexokinase dissociation from mitochondria in T cells on pressure overload induced heart failure

研究代表者

三浦 俊輔（Miura, Shunsuke）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90814442

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）：本研究では、T細胞のHexokinase 1(HK1)をミトコンドリアから脱結合させることがTh1細胞やTh17細胞の抑制を介し、圧負荷心不全進展を緩和させるか否かを明らかにすることを目的とした。微小管重合阻害薬であるノコダゾールはHK1をミトコンドリアから脱結合させ、Th1細胞におけるミトコンドリア呼吸を抑制し、IFN- $\gamma$ 等の炎症性サイトカインの産生も低下させた。大動脈縮窄手術による心不全モデルマウスにおいても、ノコダゾールの投与は、マウスの心臓及び縦郭リンパ節内のエフェクターT細胞の減少やCD4T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生の低下が観察され、心不全に伴う炎症を抑制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

HK1をミトコンドリアから脱重合させることは、ミトコンドリア代謝を変化させることにより、Th1細胞やTh17細胞からのサイトカイン産生を減少させ、圧負荷心不全進展を抑制することが示唆された。HK1をミトコンドリアから脱重合させる微小管重合阻害薬は、圧負荷心不全の進展を抑える可能性が考えられ、高血圧性心疾患や大動脈弁狭窄症等の後負荷が上昇し引き起こされる心不全に対する臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify whether uncoupling Hexokinase 1 (HK1) from mitochondria in T cells alleviates the progression of pressure overload-induced heart failure through the suppression of Th1 and Th17. The microtubule polymerization inhibitor, nocodazole, uncoupled HK1 from mitochondria, inhibited mitochondrial respiration in Th1 and Th17, and reduced the production of inflammatory cytokines. In the mouse model of heart failure induced by transverse aortic constriction surgery, administration of nocodazole reduced effector T cells in the heart and medial lymph nodes and decreased IFN- $\gamma$  production from CD4 T cells, suggesting that nocodazole may suppress inflammation associated with heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：T細胞 ミトコンドリア 心不全 Hexokinase

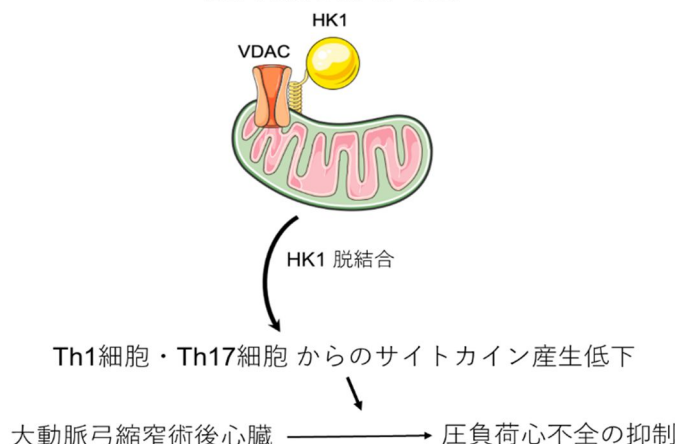
## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

圧負荷心不全の進展に T 細胞を介した免疫細胞の反応が強く関与している(Br J Pharmacol. 2016; 174: 3914-25. )。Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) と呼ばれる T 細胞共刺激分子の細胞外部分と IgG Fc 部分を結合させた融合蛋白 (CTLA-4Ig) であるアバタセプトは、圧負荷心不全の進行を抑制することが明らかにされており (Nat Commun. 2017; 8:14680. )、T 細胞を標的とした治療は有望であると考えられるが、心不全治療への臨床適用は未だされていない。ヘルパーT 細胞には様々なサブセットが存在するが、最近、ヘルパーT 細胞の中でも Th1 細胞や Th17 細胞が圧負荷心不全の進展に関与することが分かってきており (Sci Rep. 2017 ; 7: 15998. ) これらの細胞の働きを抑制することが心不全の抑制に重要であると考えられる。

HK1 は解糖系の酵素として働くだけでなく、Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) に結合することにより、ミトコンドリアの代謝も調整している。申請者が HK1 のミトコンドリア結合部位を欠損させたマウス (HK1 exon1 deletion マウス) を用い、in vitro で CD4 陽性 T 細胞の分化を調べたところ、このマウスでは野生型のマウスと比較し、Th17 細胞への分化が低下し、Th1 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が低下していた(図 1)。上記の背景より HK1 を VDAC から脱結合させることは Th1 細胞や Th17 細胞の分化やサイトカイン産生低下を介し、炎症を抑えると推測されるが、圧負荷心不全の進展を抑制させるか否かは明らかではない。

図2. 予想されるメカニズム



微小管重合阻害薬は、HK1 と競合的に VDAC に結合することにより、free tubulin を増加させることにより、HK1 をミトコンドリアから脱結合させることが知られているが(J Bioenerg Biomembr. 2008; 40: 163-170)、この薬が、Th1 細胞や Th17 細胞の働きを抑制するかは明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は T 細胞の HK1 をミトコンドリアから脱結合させることが圧負荷心不全の抑制に有効か否かを明らかにすることである。このことを明らかにするために、HK1 がミトコンドリアから脱結合することによる T 細胞の代謝の変化を明らかにするとともに、薬物学的な HK1 のミトコンドリアからの離脱が、大動脈弓縮窄術 (TAC) による圧負荷心不全に及ぼす影響を調査する。

### 3. 研究の方法

本研究では、T 細胞の HK1 をミトコンドリアから脱結合させることが Th1・Th17 細胞の抑制を介し、圧負荷心不全進展を緩和させるかどうかを明らかとし、HK1 をミトコンドリアから脱結合させる薬を圧負荷心不全に対する治療薬としての臨床応用に展開するための基礎となる研究を行う。これを明らかにするために、以下の実験を行う。

#### HK1 をミトコンドリアから脱結合させる薬物の検索

マウスの脾臓から単離した T 細胞に微小管重合阻害薬であるコルヒチンやノコダゾールを投与し、ミトコンドリア分画及び細胞質分画の HK1 の発現をウェスタンブロットにて評価する。

微小管重合阻害薬による CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生量の変化を調べる

マウスの脾臓から単離した CD4 陽性 T 細胞をサイトカイン添加培養液での培養により、

Th1 細胞・Th17 細胞に分化させ、微小管重合阻害薬が、IFN- $\gamma$  や IL-17, IL-22 等のサイトカイン産生を低下させるかを ELISA や qPCR により評価する。

微小管重合阻害薬投与による CD4 陽性 T 細胞の代謝の変化を調べる

マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞を CD3 及び CD28 抗体による刺激後に IL2 添加培養液で 2-3 日培養し、微小管重合阻害薬の添加の有無による酸素消費速度 (OCR) や細胞外酸化速度 (ECAR) を XF アッセイにより評価する。

微小管重合阻害薬による圧負荷心不全モデルマウスの心機能評価を行う

微小管重合阻害薬の TAC モデルマウスへの効果を確認するために、TAC-微小管重合阻害薬投与群、TAC-微小管重合阻害薬非投与群、sham-微小管重合阻害薬投与群、sham-微小管重合阻害薬非投与群の 4 群を作成し、心エコーによる機能評価を行う。

微小管重合阻害薬投与マウスにおける T 細胞機能の評価

上記 で作成したマウスの心筋内及び縦隔リンパ節内の免疫細胞、特にヘルパー T 細胞の数や T 細胞サブセット (Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞) の組成、T 細胞からのサイトカイン産生能について免疫染色、フローサイトメトリーを用いて評価する。

#### 4. 研究成果

##### 1) HK1 をミトコンドリアから脱結合させる薬物の検索

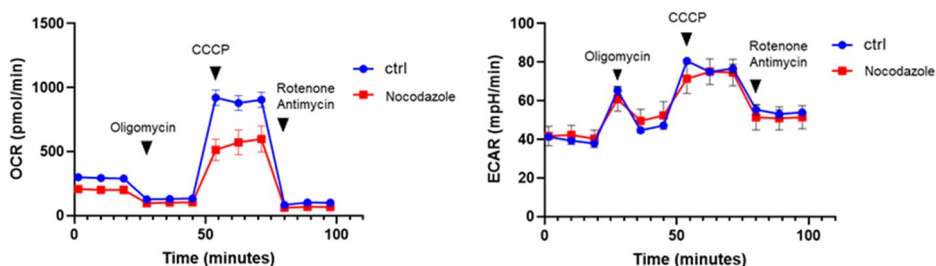
ノコダゾールは、ミトコンドリアに結合する HK1 の量を減少させた。一方コルヒチンを投与した場合は明らかなミトコンドリア分画内 HK1 の減少は認めなかった。そのため、以降の実験において HK1 をミトコンドリアから脱結合させる薬物として、ノコダゾールを使用した。

##### 2) ノコダゾールによる CD4 陽性 T 細胞からのサイトカイン産生量の変化を調べる

ノコダゾールが *in vitro* で分化させた Th1 細胞からの IFN- $\gamma$  分泌、Th17 細胞からの IL-17 分泌を減少させることを、ELISA で培養液中のサイトカイン量を定量することにより確認できた。これは qPCR による mRNA レベルの測定においても同様の結果だった。

##### 3) ノコダゾール投与による CD4 陽性 T 細胞の代謝の変化を調べる

ノコダゾール添加により、*in vitro* で分化された Th1 細胞の OCR は低下したが、ECAR には大きな違いは認められなかった。このことより、ノコダゾールによる HK1 のミトコンドリアからの脱結合は、解糖系には大きな影響を与えずに、ミトコンドリア呼吸を低下させることが示唆された。



##### 4) ノコダゾールによる圧負荷心不全モデルマウスの心機能評価を行う

TAC-ノコダゾール投与群、TAC-ノコダゾール非投与群、sham-ノコダゾール投与群、sham-ノコダゾール非投与群の 4 群を作成し、心エコーによる機能評価を行った。TAC による壁厚の増加や Fractional shortening の減少はノコダゾールの投与により緩和された。また、TAC による左室重量の増加もノコダゾール投与により抑制された。

#### 4) ノコダゾール投与マウスにおける T 細胞機能の評価

ノコダゾールの投与は TAC による心筋への CD3 陽性 T 細胞浸潤を抑制した。また、ノコダゾール投与群では、縦隔リンパ節内の CD3 陽性 T 細胞中 CD25 陽性 T 細胞の割合や IFN- $\gamma$  陽性細胞の割合が減少していた。この結果より、ノコダゾールは TAC に伴う T 細胞の活性化を抑制し、サイトカイン産生を減少させることが示唆された。

#### 今後の予定)

ノコダゾールの投与により、Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、Treg 細胞の割合がどのように変化するかどうかは今後検証が必要である。また、今回の実験ではマクロファージ等他の免疫細胞もノコダゾールの影響を受けていると考えられるため、HK1 をミトコンドリアから脱結合させることが知られている VDAC1 based peptide を過剰発現する CD4 T 細胞を作成し、同細胞を Rag 欠損マウス(成熟した T 細胞、B 細胞、NK 細胞を欠くマウス)に移植し、TAC における圧負荷心不全の進展を抑制させることができるか検討中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nishiura Kazuto, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Ichimura Shohei, Tomita Yusuke, Miura Shunsuke, Shimizu Takeshi, Sato Takamasa, Kaneshiro Takashi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yoshihisa Akiomi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 39
2. 論文標題 Prognostic Role of Circulating LTBP-2 in Patients With Dilated Cardiomyopathy: A Novel Biomarker Reflecting Extracellular Matrix LTBP-2 Accumulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 1436 ~ 1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjca.2023.05.015	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Shohei Ichimura, Tomofumi Misaka, Ryo Ogawara, Kazuto Nishiura, Tetsuya Tani, Yusuke Tomita, Yu Sato, Shunsuke Miura, Tetsuro Yokokawa, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Akiomi Yoshihisa, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps in heart tissue drive cardiac dysfunction and adverse outcomes in dilated cardiomyopathy
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuto Nishiura, Tetsuro Yokokawa, Tomofumi Misaka, Shunsuke Miura, Yusuke Tomita, Akihiko Sato, Masayoshi Oikawa, Koichi Sugimoto, Kazuhiko Nakazato, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Pexidartinib ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuto Nishiura, Tetsuro Yokokawa, Tomofumi Misaka, Shohei Ichimura, Yusuke Tomita, Shunsuke Miura, Takeshi Shimizu, Takamasa Sato, Takashi Kaneshiro, Masayoshi Oikawa, Akiomi Yoshihisa, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Plasma LTBP-2 is associated with myocardial LTBP-2 and poor prognosis in dilated cardiomyopathy
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tetsuya Tani, Masayoshi Oikawa, Himika Ohara, Daiki Yaegashi, Yu Sato, Tetsuro Yokokawa, Shunsuke Miura, Tomofumi Misaka, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Subclinical cardiac dysfunction in the patients treated with anthracycline-containing chemotherapy in the chronic phase
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shohei Ichimura, Tomofumi Misaka, Ryo Ogawara, Kazuto Nishiura, Tetsuya Tani, Yusuke Tomita, Yu Sato, Shunsuke Miura, Tetsuro Yokokawa, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Akiomi Yoshihisa, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Inhibition of neutrophil extracellular traps through PAD4 prevents cardiac dysfunction and failure in mice by preserving mitochondrial function of cardiomyocytes
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuto Nishiura, Tetsuro Yokokawa, Tomofumi Misaka, Shunsuke Miura, Yusuke Tomita, Akihiko Sato, Takeshi Shimizu, Masayoshi Oikawa, Koichi Sugimoto, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Role of perivascular macrophage infiltration in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市村祥平, 三阪智史, 小河原峻, 富田湧介, 三浦俊輔, 横川哲朗, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 義久精臣, 竹石恭知
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps in myocardial tissue associate with adverse outcomes in patients with heart failure through mitochondrial dysfunction of cardiomyocytes
3. 学会等名 第27回日本心不全学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------