

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790773

研究課題名(和文) TIGARを介する心筋エネルギー代謝フレキシビリティとApoptosis制御

研究課題名(英文) TIGAR control myocardial energy metabolism flexibility and Apoptosis.

研究代表者

三田 雄一郎(Mita, Yuichiro)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号：70609122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全ではエネルギー代謝の変化が起きていることはよく知られているが、そのメカニズムは詳しくわかっていない。そこで、p53のターゲットの一つである解糖系制御因子のTIGARと心不全の関連についてTACモデルを用いて検討した。その結果、TAC処理後4週でWTマウスでは心機能の低下が認められたが、TIGAR KOマウスでは心機能の低下が抑えられた。また、TIGAR KOマウスにおいては心不全に伴う線維化・アポトーシスの減少がみられた。心機能の改善には解糖系の亢進が関与していたがオートファジーの関与は認められなかった。このことから、解糖系の維持が心不全治療の重要なターゲットであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In spite of the metabolic alterations in heart failure (HF), only recently have the mechanisms underlying these changes been identified. TIGAR reduces glycolysis, but its role on HF is unclear. To investigate the role of TIGAR, we performed TAC-operation. After 4 weeks of TAC, LV function in WT mice was decrease, but not seen in TIGAR KO mice. Next, we used TIGAR conditional KO mouse and a tamoxifen inducible KO mouse. 4 weeks after TAC, LV contraction was preserved in tamoxifen pretreated TIGARflox/flox;MerCreMer with low grade fibrosis. TIGARflox/flox;MerCreMer+ exhibited up-regulation of glucose utilization, high energy phosphate(HEP), and autophagic flux. To evaluate on late phase HF, we treated with tamoxifen 2 weeks after TAC, followed by analysis at 8 weeks. LV dysfunction was also reduced in tamoxifen mid-treated TIGARflox/flox;MerCreMer+. TIGAR attenuates adaptive response in HF. Inhibition of TIGAR improved HEP and protected from HF even after the onset of heart failure.

研究分野：代謝

キーワード：心不全 エネルギー代謝 TAC TIGAR

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は心臓病の終末像であり、その予後は治療法の進歩により改善してきているが、5年生存率は約50%と低いままである。心不全患者の数は増え続けており、既存の薬剤による細胞保護メカニズムを上回る治療法の確立求められている。

これまでに心不全に対して予後改善効果を示した薬物(ACE阻害薬、遮断薬、アンギオテンシンII受容体拮抗薬)は、いずれも前負荷、後負荷、心拍数の減少効果などにより心筋酸素消費量減少作用を有しており、心不全治療のターゲットとしてエネルギー代謝の改善を行うことが重要であることを示唆している。

p53によって転写調整を受ける遺伝子であるTp53 Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) は糖代謝とApoptosisの抑制因子として報告された。その後Kimataらにより低酸素状態の心筋においてTIGARは糖代謝を抑制し、apoptosisを減少させ、心筋の生存に重要な因子であるという事が報告された。

(Am J Physiol Heart Circ Physiol.

2010;299:1908) これまでにp53が関与するエネルギー代謝メカニズムとしてはMatobaらによってp53がSCO2を介してミトコンドリアにおける呼吸機能の制御を行う事(Science 2006;312:1650)が報告されておりp53がapoptosisやROSの制御だけでなく、代謝の調整を行う事によっても細胞の生死を制御していることが示している。

これらの結果は、TIGARを制御することはエネルギー代謝の改善と同時にapoptosisの抑制という二つの心不全治療メカニズムを同時に働かせることができる可能性があり、新たな治療法の発見につながると考えられ

## 2. 研究の目的

心筋発生及び心不全におけるTIGARの役割を解明し、TIGARをtargetとする治療が心不全時のエネルギー代謝の改善及び

apoptosisの抑制という二つの心不全治療メカニズム介して心不全の改善を行うことができる可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

TIGAR<sup>-/-</sup>マウス及びWTマウスにTransverse aortic constriction (TAC)を行い、肥大心不全モデルマウスを作製した。TAC後4週及び8週で心機能検査を行った後に心臓を摘出し、免疫染色・ウエスタンブロット・real time PCR等により心不全及びエネルギー状態の評価を行った。次にタモキシフェン誘導性心筋特異的TIGAR<sup>-/-</sup>マウスを作成し、全身TIGAR<sup>-/-</sup>と同様にTACを行い心不全の評価などを行った

TIGARと幹細胞との関係は心筋への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞p19細胞をDMSOを用いて心筋へ分化させ、二日ごとにRNAを回収し、real time PCRによって未分化マーカー・心筋分化マーカーの評価を行った。

## 4. 研究成果

WTマウスにTAC処理を行うと、心機能の低下がみられ、組織レベルでは時間依存的にp53の発現量の増加がみられた。さらに、p53の発現増加に伴ってTIGARのmRNA・タンパク質の発現量が増加した。

TIGAR KOマウスにおいてもTAC処理を行うことによって心機能の低下が認められたが、心不全の指標である心体重比・BNPレベルはWTマウスに比べ優位に改善した。

TAC後8週で心臓を摘出し、線維化の評価を行った。その結果、マッソントリクローム染色陽性エリアの減少がみられ、コラーゲン1a1, CTGF mRNAの発現量もTIGAR<sup>-/-</sup>マウスにおいて減少していた。

TACによって引き起こされる心不全によって、心臓ではATPやPCrなどのエネルギー物質の減少が引き起こされる。しかし、TIGAR<sup>-/-</sup>マウスではATPやPCrの減少は起こらず、TAC処理

8週間後においても高いエネルギー状態が保たれていることが分かった。放射性同位元素を用いた解析により、TAC処理後のTIGAR<sup>-/-</sup>マウスにおける脂質の使用量はWTマウスと同様に減少していた。それに対し、グルコースの使用量が増加し、解糖系が活性化していた。このことから、TIGAR<sup>-/-</sup>マウスにおけるTAC処理後もATPレベルが維持されているのは、解糖系の亢進による結果だということが分かった(図1)。

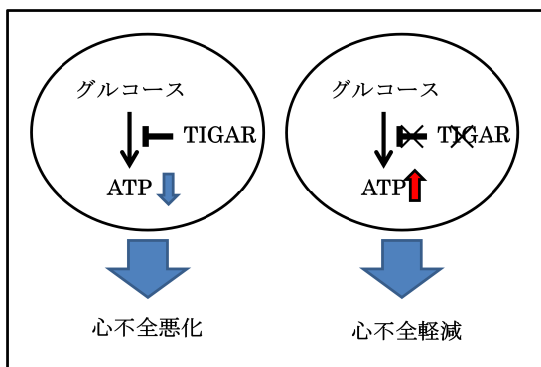


図 1

より詳細なメカニズムの検討を行うため、タモキシフェン誘導性心筋特異的TIGAR<sup>-/-</sup>マウスを作製した。TAC処理後4週にタモキシフェンを投与し、後期心不全時のエネルギー状態の改善を行った。その結果、全身TIGAR<sup>-/-</sup>マウスにTAC処理を施した場合と同様に心機能の改善が認められ、心筋におけるTIGARの発現が心不全の進行に影響を与えている可能性が示唆された。

それに対して、TIGARによって制御されるautophagyをクロロキンで抑制した場合はWTマウスとTIGAR KOマウスでTAC処理後の心機能に差は認められず、TIGAR KOマウスにおける心不全の抑制にautophagyは関与していなかった。

これらの事から心不全の治療にはエネルギー状態の改善、特に心臓におけるグルコースから始まる解糖系の活性化が重要であり、治療のターゲットとして有用であると考えられる。(図1)

最後に、新規の心不全の治療法として心筋幹細胞移植が考案されている。そこで、心筋幹細胞におけるTIGARの影響を解析した。心筋幹

細胞の解析を行うにあたり、心筋発生のどの段階からTIGARの発現がみられるかの検討を行った。その結果、未分化マーカーの減少とともに心筋分化マーカーであるβ-MHCの発現がみられた。TIGARの発現量は分化初期のday2で上昇がみられ、day4以降ではday0とほぼ同じレベルの発現量であった。そのため、TIGARは幹細胞から心筋への分化のごく初期に関与している可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計4件)

1. Katamura M, Mita Y, Matoba S, et al. Curcumin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inducing autophagy via the regulation of JNK phosphorylation. *J Clin Exp Cardiol. In press*. 査読有り  
doi: 10.4172/2155-9880.1000337
2. Nakaoka M, Mita Y, Matoba S et al. Alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 456(1):250-6. 査読有り  
doi: 10.1016/j.bbrc.
3. Saito Y, Mita Y, Noguchi N, et al. Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brains. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(7):714-28 2014. 査読有り  
doi: 10.1097/NEN.0000000000000087.
4. Hoshino A\*, Mita Y\*, Matoba S, et al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial

dysfunction in the mouse heart. *Nat Commun.* 2013;4:2308. 査読有り  
doi:10.1038/ncomms3308.

**\*Hoshino A and Mita Y are equally contributed**

5. Hoshino A, **Mita Y**, Matoba S, *et al.*  
p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(1):175-84. 査読有り  
doi:10.1016/j.yjmcc.2011.10.008.

6. Nakamura H, Matoba S, **Mita Y** *et al.*  
p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus caused by excessive mitochondrial respiration-mediated reactive oxygen species generation and lipid accumulation. *Circ Heart Fail.* 2012; 5(1):106-15. 査読有り  
doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.961565.

[学会発表] (計 14 件)

1. **三田雄一郎**、斎藤芳郎、野口範子 セレノプロテイン P の発現・分泌に与える過酸化水素および抗酸化物質の影響。第 26 回ビタミン E 研究会 2015 年 1 月 9-10 日 東京
2. **三田雄一郎**、斎藤芳郎、野口範子 糖尿病関連タンパク質 Selenoprotein P の発現制御機構の解析 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 2014 年 9 月 4-5 日 京都
3. 檀 拓磨, 斎藤 芳郎, **三田雄一郎**, 野口範子 *et al.* パーキンソン病モデルマウス脳内における DJ-1 の酸化. 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 2014 年 9 月 4-5 日 京都

4. **Y Mita**, Y saito, N Noguchi. The cellular uptake of SeP is inhibited by SeP specific antibodies. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRI2014), 23 March 2014 Kyoto

5. Y Okawa, E Iwai-Kanai, **Y Mita**, S Matoba, *et al.* Tigar (tp53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator) Decreases Glycogenic Energy Metabolism and Deteriorates Left Ventricular Function in Pressure Overload-induced Heart Failure Model. American Heart Association Scientific Sessions 2013, November 16-19. 2013 Dallas USA

6. **Y Mita**, E Iwai-Kanai, S Matoba, *et al.* Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) Reduced Doxorubicin Induced Cardiotoxicity by Stabilizing MDM2-p53 Interaction" 第 29 回 ISHR 日本部会総会. 2012 年 10 月 26-27 日. 福岡

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称: 2 型糖尿病の治療及び / 又は予防薬  
発明者: 斎藤芳郎, **三田雄一郎**, 中山華穂, 野口範子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-165695

出願年月日: 2014/8/18

国内外の別: 国内

名称: 2 型糖尿病の治療及び / 又は予防薬  
発明者: 斎藤芳郎, 吉岡佑弥, 中山華穂, 西藤有希奈, **三田雄一郎**, 野口範子

権利者:同上

種類:特許

番号:2013-175612

出願年月日:2013/08/27

国内外の別:国内

取得状況(計 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

同志社大学 生命医科学部 システム生命科学  
研究室

[http://systemlifescience.wix.com/system-lif  
e-science](http://systemlifescience.wix.com/system-lif<br/>e-science)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三田雄一郎 (Yuichiro Mita)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号:70609122