

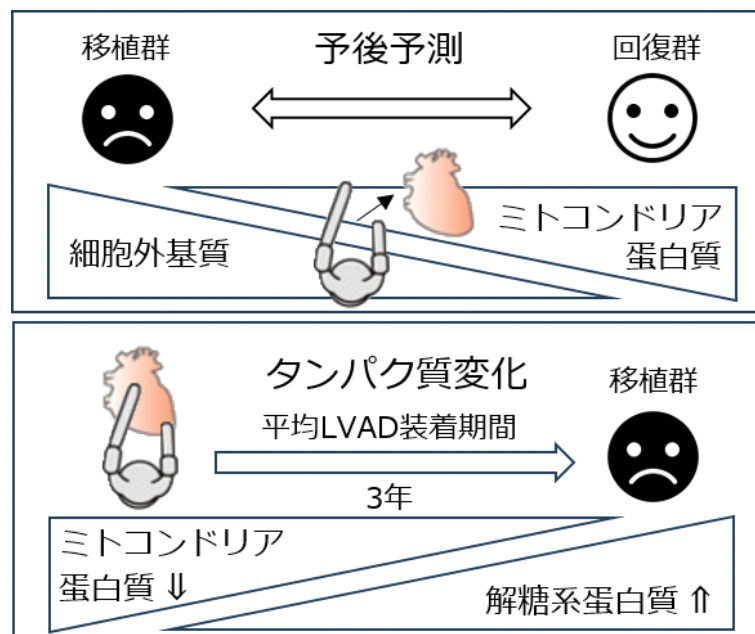
東京大学
日本医科大学

重症心不全患者の予後予測が可能に！？

——心臓プロテオーム解析による心不全予後予測タンパク質の同定——

発表のポイント

- ◆重症心不全患者の心臓のプロテオーム解析によって、ミトコンドリアと細胞外基質に関連するタンパク質が予後（心臓機能の回復）と関係することを見出しました。
- ◆心臓においてミトコンドリアタンパク質 IDH2 が多く、細胞外基質タンパク質 POSTN が少ないと、心臓機能が回復しやすいことを発見しました。
- ◆この知見に基づいて、左室補助人工心臓（LVAD）を装着する患者さんにおいて、心機能が回復する可能性を事前に予測できると期待されます。



本研究の概要図（心臓プロテオーム解析により心不全予後予測タンパク質が同定）

概要

東京大学大学院医学系研究科先端循環器医科学講座の野村征太郎特任准教授、同研究科システム薬理学の大出晃士講師、日本医科大学統御機構診断病理学の堂本裕加子准教授（2020年3月まで：東京大学大学院医学系研究科人体病理学）らによる研究グループは、重症心不全患者の心臓をプロテオーム解析（注1）し、左室補助人工心臓（LVAD）（注2）を装着した後に心臓機能が回復するかどうかを予測する因子を明らかにしました。さらにLVAD装着後に生じる心臓の状態変化に関わる因子を見出しました。

具体的には、LVAD装着後に心臓機能が回復する心不全患者さんの心臓では、ミトコンドリアタンパク質（中でもIDH2タンパク質）の量が多く、細胞外基質タンパク質（中でもPOSTNタン

パク質)の量が少ない、という特徴があることがわかりました(図1)。さらに、IDH2 および POSTN の量を LVAD 装着時に調べることによって、その患者さんの心臓機能が回復するかどうかを事前に予測できることがわかりました。また LVAD 装着後には、ミトコンドリアタンパク質は減少し、解糖系タンパク質は増加することがわかり、LVAD 装着に伴って心臓の代謝がミトコンドリア代謝から解糖系にシフトすることが示唆されました。

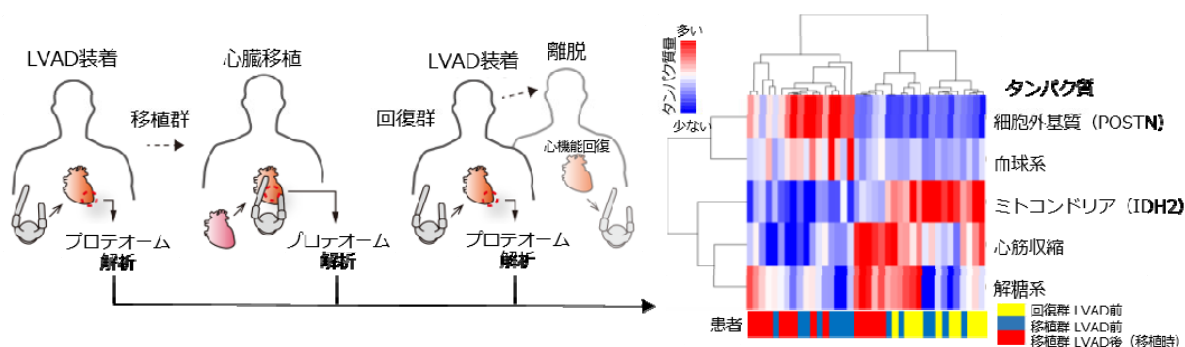


図 1. 研究概要の図

重症心不全患者のうち、移植群は LVAD 装着時と心臓移植時、回復群は LVAD 装着時に、心臓組織を採取してプロテオーム解析を実施しました。回復群の LVAD 装着時において、高いミトコンドリアタンパク質（特に IDH2）、低い細胞外基質タンパク質（特に POSTN）といった特徴があることを解明しました。

本研究の成果により、LVAD を装着する重症心不全患者において、心機能が回復する可能性を事前に予測できると期待され、プレジジョン・メディシンの発展に寄与する可能性が示されました。

発表内容

心不全とは、心臓の機能が低下し、息切れやむくみなどの症状を呈しながら進行性に悪化し、生命を脅かす疾患です。世界的にも主要な死因の一つであり、重症化して心機能の回復が困難と判断される場合には、左室補助人工心臓 (Left Ventricular Assist Device: LVAD) による循環補助が必要となります。LVAD は通常、心臓移植までの橋渡し (bridge to transplantation: BTT) として、あるいは最終的な治療手段として植え込まれます。一方で、LVAD 装着後に心機能が回復した患者では、離脱 (bridge to recovery: BTR) が可能な場合もあります。しかし、これまで、LVAD 装着後に患者の心機能が回復して離脱可能 (BTR) となるのか、それとも移植を要する (BTT) 経過を辿るのかを予測できる分子マーカーは同定されていませんでした。

研究チームは、東京大学医学部附属病院において左室補助人工心臓 (LVAD) 植込み術を受けた患者のうち、心臓移植に至った移植群 14 例 (男性 11 例、女性 3 例; 平均年齢 41.3 歳 [範囲 19-55 歳]) および LVAD 離脱が可能であった回復群 10 例 (男性 7 例、女性 3 例; 平均年齢 34 歳 [範囲 21-43 歳]) から、LVAD 植込み時の左室心尖部心筋組織を採取しました。移植群では、心臓移植時に摘出された心臓の左室自由壁からも追加の組織検体を採取し、合計 24 症例・38 検体を対象に、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) (注 3) によるプロテオーム解析を実施しました。本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を受けて実施されました (承認番号: 10162、G10032)。解析には、全症例の 8 割以上で共通して検出された 412 種類のタンパク質を用いました。

次に、上記の基準を満たした心筋中の 412 種類のタンパク質を用いて重み付き相関ネットワーク解析 (Weighted Gene Coexpression Network Analysis: WGCNA) (注 4) を行い、以下 4 つのタンパク質モジュール (M1-M4) を同定しました：

- M1 (ミトコンドリア関連、149 種類のタンパク質)
- M2 (細胞外マトリックス関連、100 種類のタンパク質)
- M3 (心筋収縮関連、33 種類のタンパク質)
- M4 (解糖系関連、23 種類のタンパク質)

これらのモジュールのタンパク質発現プロファイルを用いて階層的クラスタリングを実施したところ、回復群 (BTR) の LVAD 植込み時の特徴として、M1 (ミトコンドリア関連タンパク質) の発現が高く、M2 (細胞外マトリックス関連タンパク質) の発現が低いことが示されました (図 2A)。また、移植群 (BTT) において LVAD 装着中に M4 (解糖系関連タンパク質) の発現が上昇し、M1 (ミトコンドリア関連タンパク質) の発現が低下することが認められました (図 2B)。

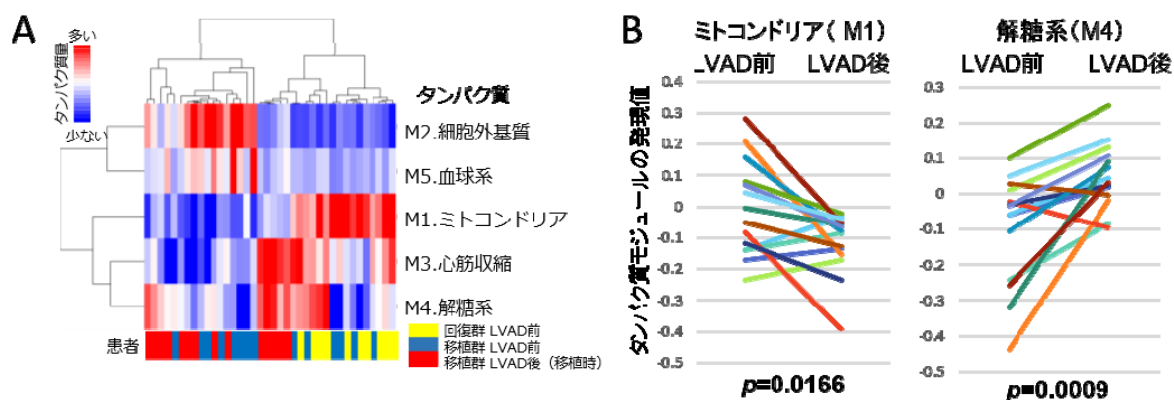


図 2. 心臓プロテオームの階層的クラスタリング解析および LVAD 装着前後で生じるタンパク質変化

A, 移植群の LVAD 装着前後および回復群の LVAD 装着前のサンプルのプロテオームデータを用いた階層的クラスタリング。重み付き相関ネットワーク解析 (WGCNA) により、4 つのモジュールが同定され、その発現量を用いて階層的クラスタリングで分類。

B, 各モジュールにおける移植群のタンパク質発現変化。Wilcoxon 符号付順位検定による統計解析で得られた p-value も記載されています。

主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) (注 5) の結果、主成分 1 (PC1) は LVAD 植え込み時点での移植群と回復群の識別に寄与し、主成分 2 (PC2) は移植群における LVAD 植え込み前後の変化に寄与することが示されました (図 3A)。各モジュールの発現量と主成分との相関係数を算出したところ (図 3B)、PC1 は M1 (ミトコンドリア関連タンパク質) および M3 (心筋収縮関連タンパク質) と正の相関を、M2 (細胞外基質関連タンパク質) と負の相関を示しました。一方、PC2 は M4 (解糖系関連タンパク質) と正の相関を示しました。さらに、LVAD 植え込み時の解析では、左室収縮末期径と M1 (ミトコンドリア関連タンパク質) との間に負の相関、心筋線維化と M4 (解糖系関連タンパク質) との間に負の相関、心筋線維化と M2 (細胞外基質関連タンパク質) との間に正の相関が認められました (図 3C)。

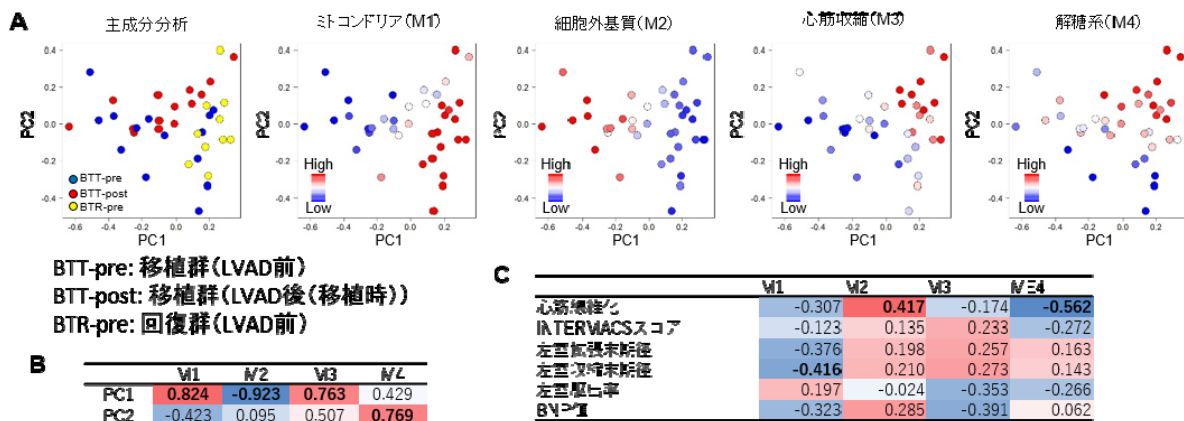


図 3. 主成分分析およびモジュールや臨床所見との関係性

- A, 主成分分析 (PCA)。左のプロットは、各サンプルを PC1 および PC2 のスコアに基づいてプロットしたもので、サンプルの由来 (BTT-pre、BTT-post、BTR-pre) によって色分けされています。M1 から M4 のプロットでは、PC1 および PC2 上の位置を保持したまま、各モジュールの発現値に基づいてサンプルがラベル付けされています。PCA の結果、PC1 は LVAD 植え込み時点における移植群と回復群の識別に寄与し、PC2 は移植群における LVAD 植え込み前後の変化を反映していることが示されました。
- B, PCA と各モジュールとの相関係数解析。
- C, LVAD 植え込み時点における各モジュールの発現と臨床病理学的データとの相関係数解析。

次に、ランダムフォレスト機械学習アルゴリズム (注 6) を用いて、移植群と回復群の識別に寄与するタンパク質を同定しました (図 4A)。その結果、特に、IDH2 (イソクエン酸デヒドロゲナーゼ [NADP(+)] ミトコンドリア型、ミトコンドリアタンパク質 (M1)) および POSTN (ペリオスチン、細胞外基質タンパク質 (M2)) が心機能回復に関与する最も重要なタンパク質として特定されました。モジュール発現プロファイルと同様に、回復群では IDH2 の発現が高く、POSTN の発現が低いことが確認されました (図 4B)。また臨床現場で用いられる予後予測指標として INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support) Cardiac Recovery Score (INTERMACS スコア, I-CARS) (注 7) があります (Wever-Pinzon 0 et al. Cardiac recovery during long-term left ventricular assist device support. J Am Coll Cardiol. 2016;68:15401553) (図 4C)。本研究では、同定した IDH2 および POSTN のタンパク量から IDH2/POSTN 比を算出し (図 4D)、ROC 曲線下面積 (AUC) の解析を行いました。その結果、INTERMACS スコアと比較しても、IDH2/POSTN 比が心機能回復を極めて高精度に予測できることが明らかになりました (図 4E)。

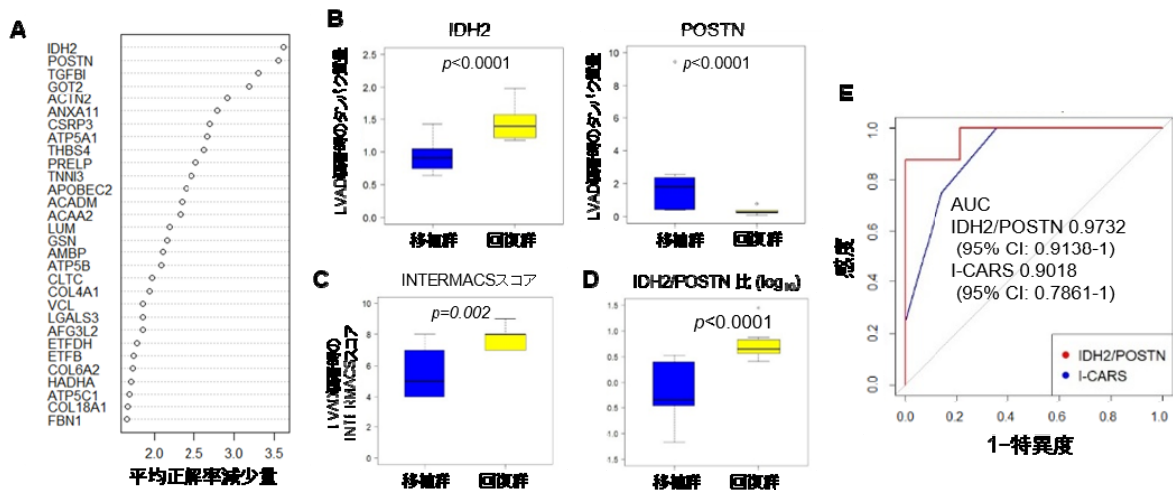


図 4. 機械学習アルゴリズムによる IDH2・POSTN の同定とそれを用いた予後予測

- A, ランダムフォレスト解析により選択された予後関連タンパク質。最も予後と関係するタンパク質から順番に掲載されている。
- B, LVAD 植込み時点における移植群 (n=14) および回復群 (n=10) での IDH2 および POSTN のタンパク質量の比較。
- C, LVAD 植込み時点の INTERMACS Cardiac Recovery Score (I-CARS)。
- D, LVAD 植込み時点における移植群および回復群での IDH2/POSTN 比の相対量。(B-D は Mann-Whitney の U 検定で統計的解析を実施)
- E, ROC 曲線下面積 (AUC) は IDH2/POSTN 比で 0.9732 (95%信頼区間 : 0.9138-1.000)、I-CARS で 0.9018 (95%信頼区間 : 0.7861-1 [DeLong 法]) でした。統計学的有意差は認められませんでした。ROC 曲線の形状から、IDH2/POSTN 比は I-CARS と比較して心機能回復予測能がより優れていることが示されました。

さらに、LVAD 装着に至った別の重症心不全コホートから心筋組織を収集し、IDH2 および POSTN に対する二重免疫蛍光染色を用いて定量解析を行いました (図 5A)。その結果、IDH2/POSTN 陽性領域の比率は 2 群間で有意に異なっており (図 5B)、免疫染色による解析においても、LVAD 後の心機能回復性を予測する指標として IDH2/POSTN 比が有効であることが確認されました。

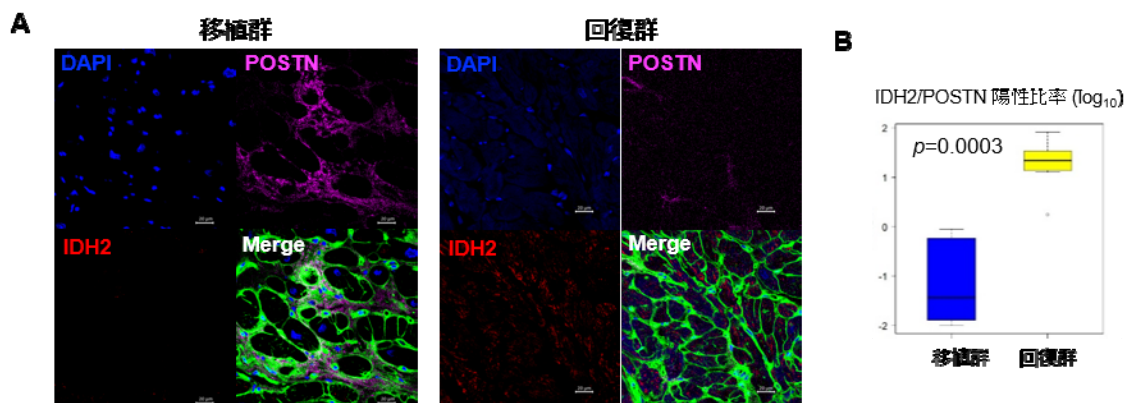


図 5. 別の心不全コホートを用いた免疫染色による IDH2/POSTN の予後予測能の再評価

- A, 抗 IDH2 抗体 (マウスモノクローナル抗体、倍率 200×、Abcam) および抗 POSTN 抗体 (ウサギモノクローナル抗体、倍率 200×、ab227049) による蛍光二重染色の代表的画像。別の重症心不全コホート (移植群 6

例、回復群 7 例) の LVAD 装着時の心筋組織を対象としました。免疫蛍光染色下で定量化した IDH2 (赤) および POSTN (ピンク) の陽性領域は、2 群間で有意な差を示しました。IDH2 は心筋細胞の細胞質に局在し、POSTN は間質の線維化領域に局在していました。

B, IDH2 および POSTN の陽性領域比は回復群で有意に高値を示しました (Mann-Whitney の U 検定、 $P=0.003$)。この強力な予後予測法は、カットオフ値 0 を用いることでサンプルを移植群と回復群の 2 群に明確に分類することができました。縦軸は \log_{10} スケールで表示されています。

本研究により、LVAD 装着後の心機能回復を規定する因子として IDH2 および POSTN が同定され、IDH2/POSTN 比が心機能回復性を高い精度で予測する新たな指標として特定されました。

IDH2 は、NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸) を産生し適切な酸化還元バランスを維持することで、ミトコンドリア抗酸化経路において中心的な役割を果たすことが知られています。ミトコンドリア機能障害は心不全におけるエネルギー供給と需要の不均衡に関連しており、その是正は心機能全体を改善する新たな治療アプローチとして注目されています。一方、POSTN は細胞外マトリックス形成における重要な役割を担うことが知られており、ミトコンドリアの減少および細胞外マトリックスの増加は心機能低下を反映する可能性があります。

また、移植群では LVAD 植え込み後に解糖系 (M4) 関連タンパク質の発現が増加していました。心不全になると、脂肪酸代謝の低下と解糖系の亢進を特徴とする「胎児型エネルギー代謝」へのシフトが生じると言われており、本研究の結果は、LVAD 装着後の心筋における代謝変化に伴ってプロテオーム全体が再構築されていることを示唆しています。

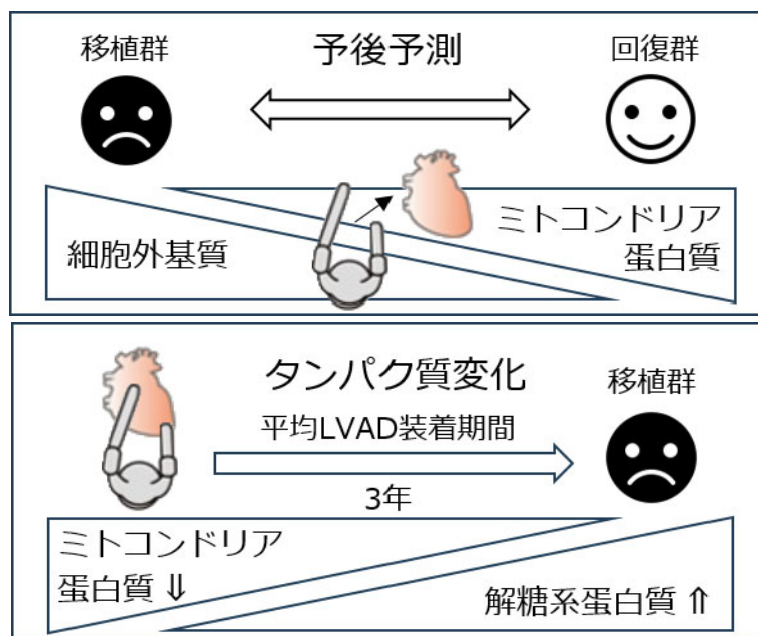


図 6. 本研究の概要図

重症心不全患者において LVAD 装着後に心臓機能が回復する人は、心臓においてミトコンドリアタンパク質が多く、細胞外基質タンパク質が少ない、ことがわかりました。これによって LVAD 装着時に心臓機能の回復を予測できる可能性があります。また LVAD 装着後にミトコンドリアタンパク質は減少し、解糖系タンパク質は増加することがわかりました。LVAD 装着に伴って心臓の代謝が変化していくことが示唆される結果と考えられます。

結論として、LVAD 植え込み前後の心筋プロテオーム解析により、有意なタンパク質変化が明らかとなり、心機能回復の潜在的マーカーが同定されました（図 6）。IDH2/POSTN 比は回復群の予測に有用であり、LVAD 補助下の心不全におけるプレシジョン・メディシンの発展に寄与する可能性が示されました。

○関連情報：

「プレスリリース①心筋 DNA 損傷を指標とした心不全患者の治療応答性や生命予後の高精度予測法を開発」（2023/11/7）

<https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/20231107.html>

「プレスリリース②心不全患者の予後や治療応答性を高精度で予測する手法を開発」（2019/9/26）

<https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/20190926.html>

発表者・研究者等情報

東京大学

大学院医学系研究科

人体病理学・病理診断学

堂本 裕加子 助教（2020 年 3 月まで）

現：日本医科大学 統御機構診断病理学 准教授

阿部 浩幸 講師

牛久 哲男 教授

兼：東京大学医学部附属病院 病理部 部長

深山 正久 教授（2019 年 3 月まで）

現：旭中央病院 旭テレパソロジーセンター センター長

現：東京大学名誉教授

システムズ薬理学

大出 晃士 講師

上田 泰己 教授

兼：久留米大学 分子生命科学研究所 個体システム生物学研究部門 教授

先端循環器医科学講座

野村 征太郎 特任准教授

兼：東京大学医学部附属病院 循環器内科

加藤 愛巳 特任助教

小室 一成 特任教授

兼：国際医療福祉大学 統括教授

心臓外科学

木下 修 講師（研究当時）

現：埼玉医科大学国際医療センター 心臓血管外科 准教授

小野 稔 教授

兼：東京大学医学部附属病院 心臓外科 科長

循環器内科学

山田 貴信 医学博士課程（研究当時）

コンピューター画像診断学／予防医学講座

藤田 寛奈 特任助教

医学部附属病院 循環器内科

網谷 英介 助教〔特任講師（病院）〕

サーモフィッシューサイエンティフィック

永島 良樹

論文情報

雑誌名：Circulation

題名：Proteomic signatures involved in cardiac recovery after mechanical unloading

著者名：Yukako Shintani-Domoto, Koji L. Ode, Seitaro Nomura*, Yoshiki Nagashima, Osamu Kinoshita, Manami Katoh, Takanobu Yamada, Eisuke Amiya, Kanna Fujita, Hiroyuki Abe, Tetsuo Ushiku, Issei Komuro, Minoru Ono, Hiroki R. Ueda, Masashi Fukayama* (*：責任著者)

DOI：10.1161/CIRCULATIONAHA.124.073093

URL：<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.124.073093>

研究助成

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 若手研究「質量分析法を用いた心不全の新規診断マーカーの同定」（代表：堂本裕加子）、基盤研究 A「複合的アプローチによる心臓システム構造の統合的理解とその制御」（代表：野村征太郎）、基盤研究 S「非分裂細胞である心筋細胞の DNA 損傷と老化による心不全発症機序の解明と応用」（代表：小室一成）、基盤研究 A「プレシジョン循環器治療学の創成」（代表：野村征太郎）、基盤研究 S「哺乳類生体リズム振動体の設計」（代表：上田泰己）、科学技術振興機構（JST）ERATO 上田生体時空間プロジェクト（代表：上田泰己）、創発的研究支援事業（FOREST）「心筋細胞の可塑性に着目した心不全の層別化と治療法の開発」（代表：野村征太郎）、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム（HFSP）（代表：上田泰己）、UTEC-UTokyo FSI Research Grant Program（代表：野村征太郎）、日本医療研究開発機構（AMED）ゲノム医療実現バイオバンク利活用プログラム（ゲノム医療実現推進プラットフォーム・先端ゲノム研究開発）「マルチオミックス連関による循環器疾患における次世代型精密医療の実現」（代表：小室一成）、難治性疾患実用化研究事業「オールジャパン拡張型心筋症ゲノムコホート研究によるゲノム医療の発展」（代表：野村征太郎）、「日本循環器研究コンソーシアムによる難治性心血管疾患のエビデンス創出」（代表：小室一成）、「オールジャパン心筋症ゲノムオミックスデジタルコホート研究」（代表：野村征太郎）、革新的先端研究開発支援事業「心臓ストレス応答における個体シングルセル四次元ダイナミクス」（代表：野村征太郎）、「ヒト心不全における心筋 DNA 損傷の病的意義の解明とその制御」（代表：小室一成）、再生医療実現拠点ネットワークプログラム「心筋細胞を標的とした遺伝子治療・変異修復治療による心臓疾患治療法の開発」（代表：野村征太郎）、生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）「先端的 1 細胞オミックス・エピトランスクリプトーム解析の支援と高度化」（代表：油谷浩幸）、循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「エピゲノム編集とシングルセル解析を統合した心不全の新規治療法開発」（代表：小室一成）、「心臓分泌性因子による心不全発症機序の解明と治療法開発」（代表：小室一成）、「心臓リハビリ模倣治療法の多面

的な開発」(代表：野村征太郎)、ゲノム医療実現バイオバンク利活用プログラム(次世代医療基盤を支えるゲノム・オミックス解析)「循環器疾患におけるシングルセルマルチオミックス層別化の実現」(代表：小室一成)、ゲノム研究を創薬等出口に繋げる研究開発プログラム「デジタルオミックスによる心不全ストレス応答の機序解明と精密医療」(代表：野村征太郎)、「心不全シングルセルゲノミクス創薬」(代表：小室一成)、先端国際共同研究推進プログラム(ASPIRE)「クロマチン分子病理学による精密医療の実現」(代表：白髭克彦)、「国際循環器デジタルオミックスコンソーシアムによる循環器システム構造の多様性の理解」(代表：小室一成)、ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点形成事業「大規模疾患コホート・アカデミア連携を基盤とするオミックス解析・サーベイランス体制の整備による新興感染症重症化リスク因子の探索」(代表：山梨裕司)、再生医療等実用化研究事業「iPS 心臓オルガノイドのシングルセル CRISPR スクリーニング創薬」(代表：野村征太郎)、文部科学省(MEXT)ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ(代表：堂本裕加子)の支援により実施されました。

用語解説

(注1) プロテオーム解析

細胞や組織に含まれるタンパク質の全体像(プロテオーム)を網羅的に解析する手法。タンパク質の種類や量、修飾の状態などを明らかにすることで、疾患の分子機構や生体内の動的变化を理解するのに用いられる。一般的に、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)(注3)などの高感度な分析技術を用いて行われる。

(注2) 左室補助人工心臓(Left Ventricular Assist Device: LVAD)

重症心不全患者の心臓の働きを補助するために体内に植え込まれる医療機器。心尖部に脱血管を、大動脈基部に送血管を装着し、左心室から全身への血液の拍出を機械的に補助し、心臓移植への橋渡しや、長期在宅補助人工心臓治療に用いられる。

(注3) 液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)

生体試料中のさまざまな化合物(タンパク質や代謝物など)を分離・検出・定量するための分析手法。液体クロマトグラフィーで成分を分離した後、質量分析装置によって分子の質量を高精度に測定することで、分子の種類や量を特定できる。

(注4) 重み付き相関ネットワーク解析(Weighted Gene Coexpression Network Analysis: WGCNA)

遺伝子やタンパク質の発現データをもとに、それらの相関関係をネットワークとして解析する方法。生物学的に関連する遺伝子群(モジュール)を抽出し、疾患や表現型と関連する分子ネットワークを明らかにするために用いられる。

(注5) 主成分分析(Principal Component Analysis: PCA)

多次元データを少数の「主成分」に要約し、データの主要な変動要因を可視化する統計的手法。多数の変数をもつオミックスデータなどにおいて、パターンや群間差を直感的に理解するために広く利用されている。

(注6) ランダムフォレスト機械学習アルゴリズム

多数の決定木 (decision tree) を組み合わせて予測や分類を行う機械学習手法。各決定木の結果を統合して最終的な予測を行うため、過学習が起こりにくく、高い予測精度を発揮するのが特徴。

(注7) INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support) Cardiac Recovery Score (INTERMACS スコア, I-CARS)

米国で運用されている左室補助人工心臓 (LVAD) 患者の登録データベース「INTERMACS」の解析から導かれた、心機能回復の可能性を予測するスコア。I-CARS は、患者背景や臨床指標に基づいて心回復の確率を数値化し、治療方針決定の参考に用いられる。

問合せ先

〈研究内容について〉

東京大学大学院医学系研究科 先端循環器医科学講座
特任准教授 野村 征太郎 (のむら せいたろう)

日本医科大学 統御機構診断病理学
准教授 堂本 裕加子 (どうもと ゆかこ)

〈機関窓口〉

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター
担当：渡部、小岩井
Tel：03-5800-9188 E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム
Tel：03-5841-3304 E-mail：ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

日本医科大学 事務局 学事部 庶務課
Tel：03-3822-2131 E-mail：nms-shomuka@nms.ac.jp