

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893005

研究課題名(和文)心筋リモデリングにおけるNox4によるミトコンドリア機能制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Regulating mechanism of mitochondrial function by Nox4 in cardiac remodeling

研究代表者

松島 将士(Shouji, Matsushima)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80552869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞となったマウスの非梗塞部では心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシスの亢進を認め、心筋リモデリングが進行しており、同部位のミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリアサイズが減少し、ミトコンドリア数は増加していた。非梗塞部において、ミトコンドリア形態制御蛋白であるMitofusion 1の発現量およびDrp-1のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。Mitofusion 1は心筋梗塞となったマウスにおいて正常のマウスより高い傾向であった。また、Drp-1を抑制するリン酸化に関してはwestern blot法にて増加していた。

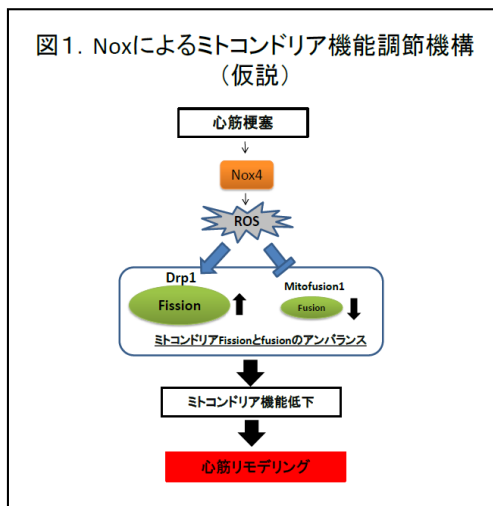
研究成果の概要(英文)：Cardiomyocyte hypertrophy, interstitial fibrosis, and apoptosis in the non-infarct region of the hearts in mice after myocardial infarction (MI) were increased, which accompanied by a decrease in size of mitochondria and an increase in number of mitochondria. Protein level of mitofusion 1 was tended to be increased in non-infarct region of MI mouse hearts compared to sham-operated mouse hearts. In addition, phosphorylation of Drp-1, inhibitory form of Drp-1, was increased in non-infarct region of MI mouse hearts.

研究分野：循環器内科

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 NADPH oxidase

1. 研究開始当初の背景

近年、心不全の病態基盤である心筋リモデリングの形成・進展に、心筋組織における酸化ストレス(ROS)の増加とミトコンドリア機能障害が関与することがあきらかにされてきた。しかし、ROS制御による心不全治療は確立されていない。最近、心筋細胞における主要な ROS 産生源として NADPH oxidase 4 (Nox4)が重要であることが報告された。また、ミトコンドリア分裂・融合は老化したミトコンドリアの処理に関連しており、ミトコンドリアの機能維持、品質管理に重要な役割をはたしていることが知られるようになった。ミトコンドリアの分裂はミトコンドリア DNA 保持に、ミトコンドリアの融合は老化に対するミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たしている。つまり、このミトコンドリアの分裂と融合のバランスがミトコンドリア機能維持やミトコンドリアの品質管理に重要と考えられる。Nox4 は心筋障害の形成過程において心筋細胞アポトーシスや肥大にミトコンドリア機能障害を介して関与しているが、心筋リモデリングを引き起こす詳細な分子機序は明らかではない。ROS はミトコンドリアの分裂を刺激することから ROS がミトコンドリア分裂・融合を介したミトコンドリア機能維持へ関与していることが示唆されている。不全心においてはミトコンドリア融合が低下していることが知られている。このような背景から申請者は Nox4 由来の ROS の増加によるミトコンドリア分裂・融合のバランスの破綻がミトコンドリア機能低下によるエネルギー代謝異常を引き起こし、心筋リモデリングの形成・進展に関与するという仮説を検証する本研究を計画立案するにいたった。(図1)



2. 研究の目的

心不全の病態基盤である心筋リモデリングの発症・進展に NADPH oxidase (Nox) 由来の酸化ストレス (活性酸素種 Reactive oxygen species; ROS) の増加が関与する。本研究の目的は、Nox4 由来の ROS の増加によるミトコンドリア分裂・融合のバランスの破綻がミトコンドリア機能低下を引き起こし、心筋リモデリングに関与するという仮説を検証するとともに、Nox4 活性制御による心

筋内 ROS の最適化という独自の概念に基づく新たな心筋リモデリング・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

リモデリングに陥った不全心筋においてミトコンドリア分裂・融合バランスの破綻およびミトコンドリア機能異常がみとめられるかを明らかにする。左冠動脈結紮により心筋梗塞作成後 28 日間飼育し、下記(1)-(4)を評価した。

(1)心不全重症度評価

心エコー法による左室径、左室駆出率計測
ミラーカテーターによる大動脈圧、左室内圧測定

臓器重量測定：心重量、肺重量

(2)心筋組織学的評価

- ・心筋細胞肥大
- ・間質線維化
- ・アポトーシス

(3)ミトコンドリア分裂・融合の形態評価(電子顕微鏡)

(4)ミトコンドリア形態規定蛋白評価

- ・分裂促進因子 Drp1、Fis の蛋白量 (ウェスタンブロット法)
- ・融合促進因子 Mitofusion1、Mitofusin2、OPA1 の蛋白量 (ウェスタンブロット法)
- ・Drp1 リン酸化の評価 (ウェスタンブロット法)

4. 研究成果

(1)心不全モデルの作成

心筋梗塞 (MI) マウスは偽手術 (sham) マウスに比べ心エコー上、左室内腔は拡大し、左室駆出率は低下していた (表 1) (*P<0.05)

	Sham	MI
Echocardiographic data	n=5	n=15
HR(bpm)	497±11	517±8
LV EDD(mm)	3.1±0.2	5.4±0.2*
LV ESD(mm)	1.8±0.1	4.8±0.2*
Fractional shortning(%)	43.4±1.4	12.3±2.0
Anterior wall thickness(mm)	0.81±0.01	0.34±0.04*
Posterior wall thickness(mm)	0.77±0.02	0.85±0.03*

また非梗塞部の左室壁厚は肥厚を認めた。心重量/体重比、肺重量/体重比は MI マウスにて sham マウスに比べ増加しており、心不全状態となっていることが確認できた (表 2) (*P<0.05)

表2. 臓器重量

	Sham	MI
Organ weights	n=5	n=15
B.W.(g)	24.7±0.3	26.7±0.4*
ΔB.W.(g)	2.1±0.3	3.0±0.2
HW(mg)	115.1±3.9	159.5±5.6*
HW/BW(mg/g)	4.7±0.1	5.9±0.1*
LVW(mg)	79.7±3.6	102.3±2.2*
LVW/BW(mg/g)	3.2±0.1	3.8±0.1*
Lung(mg)	145.1±9.4	164.7±9.3
Lung/BW(mg/g)	5.9±0.3	6.1±0.2

(2)心筋リモデリングの評価

MI 群では非梗塞部の心筋肥大、間質線維化、アポトーシスの亢進を認め、心筋リモデリングが進行していた。

(3)ミトコンドリア形態の評価

筋梗塞後の非梗塞部心筋細胞におけるミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリアサイズが減少し、ミトコンドリア数は増加していた(図2、3)。

図2. 電子顕微鏡

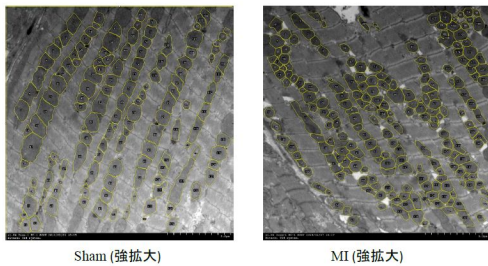
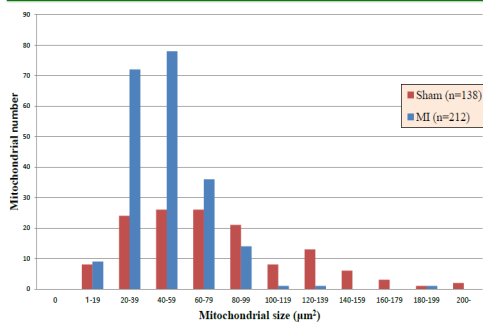


図3. ミトコンドリアサイズと数



(4)ミトコンドリアダイナミックス制御蛋白の評価

次に、非梗塞部における Drp1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルと Western blot 方にて評価した。Drp-1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルはいずれも MI と sham マウスにおいて有意な差を認めなかったが、Mitofusion1 は MI マウスにおいて高い傾向であった(約1.4倍、P=0.1)。

さらに、心筋梗塞後の心筋におけるミトコンドリア形態制御因子である OPA1、Fis1 の蛋白レベルを western blot 法にて評価したところ MI 群で sham 群に比べて有意差はなかった。一方、Drp1 はリン酸化で制御されているが、Drp-1 を抑制するリン酸化に関しては western blot 法にて低下していた。

(5)酸化ストレス関連蛋白

心筋梗塞後の非梗塞部における Nox4 の蛋白発現は sham マウスに比べて低下していた。

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2件)

1. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med.* 2014 ;24(5): 202-205, doi:10.1016/j.tcm.2014.03.003. 査読有
2. Yu Q, Lee CF, Wang W, Karamanlidis G, Kuroda J, Matsushima S, Sadoshima J, Tian R. Elimination of NADPH oxidase activity promotes reductive stress and sensitizes the heart to ischemic injury. *J Am Heart Assoc.* 2014 Jan 27;3(1):e000555. doi:10.1161/JAHA.113.000555. 査読有

[学会発表](計4件)

1. 松島 将土:“心血管疾患における NADPH oxidase 4 の役割” 第8回 The Heart 研究会(2015年3月7日、東京都、丸ビルホールカンファレンススクエア)
2. Matsushima S: “Fyn is a Sensor and Regulator of Nox4-derived ROS in the Heart” The 85th Annual Scientific

Meeting of the American Heart Association, Melvin Marcus Young Investigator Award session (2014, 11, 17 Chicago, USA)

3. Matsushima S: "The role of Nox4 in mediating cardiac hypertrophy and heart failure" Leducq annual meeting (2014, 11, 16 Chicago, USA)
4. Matsushima S: "Fyn plays a critical role in regulating apoptosis of cardiac myocyte in heart failure through tyrosine phosphorylation in Nox4" The 17th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, YIA session, (2013, 11, 29 Omiya, Saitama, Japan)

〔図書〕(計2件)

1. 松島 将士、筒井裕之:「心不全における酸化ストレスの役割」:臨床心不全のいちばん大事なところ(佐藤幸人編),メディカ出版,64-68ページ,2014年
2. 松島 将士、筒井裕之:「心筋・ミトコンドリアと酸化ストレス」-活性酸素-基礎から病態解明・制御まで-:医学のあゆみ,医歯薬出版株式会社,第247巻第9号879-884ページ,2013年

ホームページ等

<http://cvhp.med.hokudai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松島 将士 (MATSUSHIMA, Shoji)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 80552869

(3)連携研究者

筒井 裕之 (TSUTSUI, Hiroyuki)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70264017

絹川 真太郎 (KINUKAWA, Shintaro)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60399871

(4)研究協力者

松本 純一 (MATSUMOTO, Junichi)
北海道大学・大学院医学研究科・大学院生