

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04815

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

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of mitochondrial iron contents by mitoMEET in cardiac remodeling

研究代表者

筒井 裕之(TSUTSUI, HIROYUKI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70264017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：心筋特異的mitoNEETノックアウト(KO)マウスを作成し、mitoNEETによるミトコンドリア鉄代謝制御のメカニズム解析を行った。mitoNEET-KOマウスの心筋におけるミトコンドリア鉄量は野生型マウスに比べて増加しており、mitochondrial ferritinの上昇の増加を伴っていた。
さらにmitoNEETと結合する新規蛋白としてadenin nucleotide translocator (ANT)を同定した。mPTP開口阻害薬であるシクロスポリンAによりミトコンドリア鉄量が減少したことから、mitoNEETとANTが協調してミトコンドリア鉄量を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated mitoNEET knockout mice and investigated regulatory mechanisms of mitochondrial iron by mitoNEET. Mitochondrial iron contents and ferritin levels in the heart were increased in mitoNEET-KO mice compared with wild-type mice.
We detected adenine nucleotide translocator (ANT) as a novel protein binding to mitoNEET. Administration of cyclosporin A, an inhibitor of mitochondrial permeability transition pore opening, decreased mitochondrial iron contents, indicating that mitoNEET and ANT coordinately regulate mitochondrial iron contents.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 心筋リモデリング ミトコンドリア 鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

薬物療法・非薬物療法の進歩によって、心不全患者の予後は格段に改善してきたが、心不全重症例の生命予後は未だに不良であり、患者は増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心不全の病態形成に關与する心筋リモデリングの機序の解明とそれに基づく新たな治療法の開発は重要な研究課題である。

mitoNEET は、ミトコンドリア外膜に存在する膜貫通型タンパクであるが、生体内で心臓に最も強く発現している。最近、mitoNEET が鉄イオンあるいは鉄-硫黄クラスター (iron-sulfur cluster; ISC) のミトコンドリア内への取り込みを制御していることがあきらかとなり (Nat Med 2012)、ミトコンドリア機能を制御する新たな膜タンパクとして注目されている。さらに、mitoNEET 自身、鉄-硫黄クラスター構造を有しているが、活性酸素が存在すると鉄-硫黄クラスターが放出されて不安定化することや (J Biol Chem 2012)、mitoNEET の機能低下はミトコンドリアにおいて鉄過剰および酸化ストレスを引き起こすことも報告されている。また、ミトコンドリア鉄代謝の制御には、mitochondrial ferritin (鉄運搬)、mitoferrin2 (鉄取り込み)、ABCB8 (鉄搬出) や frataxin (ISC 合成)、ABCB7 (ISC 搬出) など、ミトコンドリア内に存在する数多くの制御タンパクが關与していることも知られるようになり、その分子基盤の解明が進んでいる。このような成績は、mitoNEET が、ミトコンドリア鉄代謝や電子伝達機能の調節を介してミトコンドリア機能制御に重要な役割をはたし、その障害は心筋リモデリング・心不全の形成・進展に關与する可能性を支持するものである。さらに、mitoNEET 機能の安定化によりミトコンドリア機能を保持し、心不全の病態を予防・改善できると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋リモデリング・心不全の病態形成・進展における mitoNEET の役割を明らかにするとともに、mitoNEET の安定化・機能保持という独自のパラダイムに基づく新たな心筋リモデリング・心不全の予防・治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

mitoNEET の心筋リモデリングおよびミトコンドリア鉄代謝・機能障害に対する効果について心筋特異的 mitoNEET 遺伝子欠損マウスを用いて検討する

1) 心筋特異的 mitoNEET -flox マウスに、

MHC-Cre 発現マウスを交配し、心筋特異的 mitoNEET 遺伝子欠損マウスを作成する。

2) 以下の方法にて、心筋特異的 mitoNEET 欠損マウスの心筋リモデリングおよび心筋ミトコンドリア鉄代謝・機能を解析する。

すなわち心筋ミトコンドリアにおける mitoNEET の機能低下により、ミトコンドリア鉄過剰およびミトコンドリア機能障害・酸化ストレスが引き起こされ、心筋リモデリング・心不全を呈するかどうか検証する。

mitoNEET 蛋白の発現 (ウエスタンブロット法)

ミトコンドリア鉄代謝の評価

ミトコンドリアを単離し、以下を測定しミトコンドリア鉄代謝を評価する。

・鉄含量 (RPA 蛍光法、ELISA 法)

・ミトコンドリア鉄代謝関連タンパク (ウエスタンブロット法)

Mitochondrial ferritin (ミトコンドリア鉄運搬)、mitoferrin2 (鉄取り込み)、ABCB8 (鉄搬出) frataxin (ISC 合成)、ABCB7 (ISC 搬出)

ミトコンドリア機能の評価

・電子伝達系複合体の酵素活性

・ミトコンドリア呼吸能 (state 3、state 4、RC1)

・TCA サイクル酵素活性 (クエン酸合成酵素、アコニターゼ)

・ミトコンドリア膜電位 (JC-1 染色)

・タンパク質分解: タンパクユビキチン化、ユビキチンリガーゼ MuRF-1・MAFbx (ウエスタンブロット法)

・アポトーシス (TUNEL 染色)、Caspase-3 (ウエスタンブロット法) 4) ミトコンドリア酸化ストレスの評価 心筋細胞内活性酸素の測定 (Amplex red 法、ルシフェラーゼアッセイ)

3) mito-NEET と相互作用する蛋白を免疫沈降法および Mass spectrometry を用いて同定する。また、mito-NEET との相互作用する部位の特定のために、ジギトニン処理 (濃度勾配によるタンパク同定法) による局在解析を行う。

4) 野生型および mitoNEET-KO マウスの加齢における鉄代謝、ミトコンドリア機能を評価する。さらに、心エコーを用いて鉄代謝、ミトコンドリア機能変化が心機能に与える影響を評価する。

4. 研究成果

心筋特異的 mitoNEET ノックアウト (mitoNEET-KO) マウスを作成し、mitoNEET によるミトコンドリア鉄代謝制御のメカニズム解析を行った。mitoNEET-KO マウスの心筋におけるミトコンドリア鉄量は野生型マウスに比べて増加しており、mitochondrial ferritin の上昇の増加を伴っていた。一方、鉄代謝関連因子である NFRN2、FXN、ABCB7、ABCB8、TfRm、IRP1、IRP2 の蛋白レベルは変化を認めなかった。これらの所見から mitoNEET は既存の鉄代謝関連蛋白を介さずにミトコンドリア鉄代謝を制御している可能性が示唆された。また、mitoNEET-KO マウスは6か月齢においてミトコンドリアのクリステ構

造の破壊、ミトコンドリアの膨化といった構造異常をきたしており、それに伴ってミトコンドリア呼吸能の低下を認めた。また、mitoNEET 蛋白質量はミトコンドリア呼吸能と正の相関を示した。さらに、ミトコンドリア呼吸能の低下に伴ってミトコンドリアの H₂O₂ 量が増加していた。

さらに Mass spectrometry を用いた解析により、mitoNEET と結合する新規蛋白として transferrin receptor (TfR) と adenin nucleotide translocator(ANT)を同定した。mitoNEET とこれらの蛋白の結合は免疫沈降法にて in vivo で確認された。ジギトニンの濃度勾配を用いた解析では mitoNEET と TfR はミトコンドリア外膜にて結合すること明らかとなった。Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) 開口阻害薬であるシクロスポリン A によりミトコンドリア鉄量が減少したことから、mitoNEET と ANT が協調してミトコンドリア鉄量を制御している可能性が示唆された。

また、野生型マウスでは加齢により心筋における mitoNEET 発現量が低下し、ミトコンドリア鉄量が増加した。mitoNEET-KO マウスは野生型に比べてミトコンドリア鉄量がさらに増加しており、ミトコンドリア H2O2 の増加、呼吸能および reserve capacity の低下を認めた。また、心エコーによる評価において、mitoNEET-KO マウスは左室拡張末期径が拡大し、左室駆出率が低下していた。老化においても心臓において mitoNEET によるミトコンドリア鉄制御が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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 5 件)

1) Furihata T, Kinugawa S, Takada S, Fukushima A, Takahashi M, Homma T, Masaki Y, Tsuda M, Matsumoto J, Mizushima W, Matsushima S, Yokota T, Tsutsui H. The experimental model of transition from compensated cardiac hypertrophy to failure created by transverse aortic constriction in mice. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2016;11:24-28. 査読有

2) Matsushima S, Kuroda J, Zhai P, Liu T, Ikeda S, Nagarajan N, Oka S, Yokota T, Kinugawa S, Hsu CP, Li H, Tsutsui H, Sadoshima J. Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 2016 ;126(9):3403-16. 査読有

3) Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba

I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Tsutsui H, Hatakeyama S. The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 ;100:43-53. 査読有

4) Arai S, Ikeda M, Ide T, Matsuo Y, Fujino T, Hirano K, Sunagawa K, Tsutsui H. Functional loss of DHR57C induces intracellular Ca²⁺ overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017 ;312(1):C29-C39. 査読有

5) Tenma T, Mitsuyama H, Watanabe M, Kakutani N, Otsuka Y, Mizukami K, Kamada R, Takahashi M, Takada S, Sabe H, Tsutsui H, Yokoshiki H. Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Activation Deteriorates Hypoxic Ventricular Arrhythmias via CaMKII in Cardiac Hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* In press. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1) Furihata T, Takada S, Fukushima A, Tsuda M, Matsumoto J, Yokota T, Kinugawa S. mitoNEET regulates mitochondrial iron contents in the heart. 第 20 回日本心不全学会. 2016.10.9 (Sapporo)

2) Maekawa S, Furihata T, Takada S, Fukushima A, Tsuda M, Matsumoto J, Yokota T, Kinugawa S. mitoNEET regulates mitochondrial iron contents in the heart. The 33rd Annual Meeting of the International Society for Heart Research, Japanese Section. 2016.12.17 (Tokyo)

3) Furihata T, Takada S, Mizushima W, Maekawa S, Fukushima A, Tsuda M, Matsumoto J, Kakutani N, Yokota T, Kinugawa S. mitoNEET Regulates Mitochondrial Iron Homeostasis Interacting With Transferrin Receptor. American Heart Association Annual Meeting of Scientific Session. 2017.11.13 (Ahaheim, USA)

4) Furihata T, Takada S, Mizushima W, Maekawa S, Fukushima A, Tsuda M, Matsumoto J, Kakutani N, Yokota T, Kinugawa S. mitoNEET Regulates Mitochondrial Iron Homeostasis Interacting With Transferrin Receptor. 第 1 回日本循環器学会基礎研究フォーラム. 2018.1.6 (Tokyo)

[図書] (計 3 件)

1) 筒井裕之、南江堂、循環器疾患の最新の治療、2016

2) 筒井裕之、医学書院、今日の治療指針、2017

2) 筒井裕之、南江堂、循環器疾患の最新の治療、2018

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
九州大学循環器内科
<https://www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井裕之 (TSUTSUI, Hiroyuki)
九州大学大学院医学研究院
循環器内科学・教授
研究者番号：70264017

(2) 研究分担者

絹川 真太郎 (KINUGWA, Shintaro)
北海道大学大学院医学研究科
循環病態内科学・講師
研究者番号：60399871

松島将士 (MATSUSHIMA, Shoji)
九州大学病院循環器内科・助教
研究者番号：80552869

井手友美 (IDE, Tomomi)
九州大学大学院医学研究院
循環器内科学・准教授
研究者番号：80552869

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

降旗高明 (FURIHATA, Takaaki)

池田昌隆 (IKEDA, Masataka)