

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08226

研究課題名(和文) ミトコンドリア品質管理機構から見た薬物の副作用・ミトコンドリア機能障害分子機構

研究課題名(英文) The molecular mechanism of drug induced mitochondrial dysfunction focused on mitochondrial quality control system

研究代表者

野村 亮介 (Nomura, Ryosuke)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90400358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗HIVウイルス薬アジドチミジン(以下AZT)の活性化体であるAZT三リン酸が短時間で蓄積するラット心筋の細胞モデルを樹立した。この細胞モデルを用いて、AZTの長期服用による致死的な心筋細胞障害が、AZT三リン酸蓄積によって引き起こされることがわかった。さらに、詳細な細胞障害の機序として、AZT三リン酸蓄積が、ミトコンドリアの品質管理機構を破綻させること、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の機能を低下させ活性酸素種が細胞内に増加させることにより、細胞のアポトーシスを誘導してしまうことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We established a cell model of rat embryonic myoblasts in which azidothymidine triphosphate (AZT-TP), active metabolites of AZT, that is anti-HIV (human immunodeficiency virus) drug accumulates in a short time. Using this cell model, it was found that lethal cardiac dysfunction due to long-term administration of AZT is caused by accumulation of AZT-TP. Furthermore, as a detailed mechanism of cytotoxicity, accumulation of AZT-TP causes impairment of the mitochondrial quality control system, damage of mitochondrial electron transport chain and increasing reactive oxygen species (ROS) production in the cell, that induce apoptosis and cell death.

研究分野：救急医学

キーワード：ミトコンドリア品質管理機構 ミトコンドリアダイナミクス 毒性薬理 活性酸素種 AZT

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞内でネットワーク構造を呈しており、常に分裂と融合を繰り返すこと(ミトコンドリアダイナミクス)で、その品質を保っている。このミトコンドリア品質管理機構とその制御は、細胞ひいては生体にとって非常に重要であり、その異常は様々な疾病、病態で報告されている。一方で、各種薬物が誘発する副作用である神経障害や心血管障害の分子機構におけるミトコンドリア品質管理機構の寄与に関する研究については未解明な点が多い。

2. 研究の目的

ヌクレオシド系ウイルス逆転写酵素阻害薬アジドチミジン(AZT)は、抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)薬として世界で初めて認可された薬剤であるが、長期服用により副作用として致命的な心筋障害を発症し、その原因がミトコンドリア機能障害であることが報告されている。薬物がミトコンドリア機能や品質管理機構に対して障害を与える点に着目し、薬物処理後の細胞におけるミトコンドリア機能、ミトコンドリアダイナミクスの変動について、細胞生物学的、薬理的、生化学的解析を行ない調査した。

3. 研究の方法

(1) 細胞系の樹立

細胞内でデオキシチミジンのリン酸化代謝反応を触媒する酵素 Thymidilate kinase (TMPK) は、デオキシチミジンアナログである AZT もリン酸化することで活性代謝物である AZT トリリン酸(以下 AZT-TP)の合成に寄与するが、AZT の化学構造上 TMPK の触媒反応が律速段階となり、短期間では細胞内には AZT 一リン酸(以下 AZT-MP)が蓄積し、AZT-TP の毒性評価ができなかった。設計された変異型 TMPK 酵素においては触媒活性が 250 倍に増加することがわかっている。この変異型ヒト TMPK 遺伝子をラット胎児心筋芽細胞 H9c2

に導入することで、活性化代謝物である AZT-TP の細胞内蓄積モデルを作成した。

(2) AZT 感受性の測定

変異型 TMPK 発現 H9c2 細胞(以下変異型 TMPK 細胞)と野生型 TMPK 発現細胞(以下野生型 TMPK 細胞)に AZT を添加し、AZT の各濃度ごとの細胞生存性の評価、アポトーシス誘導を評価した。

(3) ミトコンドリア形態の解析

レーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて、AZT 100 μ M 添加 48 時間後の各細胞のミトコンドリア形状を解析した。ミトコンドリアの面積、アスペクト比を定量した。

(4) ミトコンドリアダイナミクス関連分子の発現解析

各細胞に AZT を添加し、ミトコンドリアダイナミクス関連分子である Drp1 (Dynamin related protein 1)、Mff (mitochondrial fission factor)、Opa1 (optic atrophy 1) の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した。またタンパク発現をウェスタンブロット解析した。

(5) ミトコンドリア酸素消費率の測定

細胞に AZT を添加し、XF-24 細胞外フラックスアナライザーで酸素消費率を測定した。

(6) ミトコンドリア内膜電位の測定

細胞に AZT を添加し、JC-1 染色を行って、フローサイトメトリーで蛍光強度を解析し、ミトコンドリア内膜電位を測定した。

(7) 活性酸素種(ROS)産生の評価

細胞に AZT を添加し、ROS 検査試薬にて細胞を染色してフローサイトメトリーで蛍光強度を解析した。

(8) ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)開口アッセイ

ミトコンドリアの内膜と外膜との間には膜内外の物質を輸送するためのチャンネルとして、mPTP が存在する。ミトコンドリアが ROS などにより傷害されると mPTP が開口し、ミトコンドリア内膜電位の低下をきたす。内

膜電位の低下はミトコンドリア機能低下を表すとともに、アポトーシスによる細胞死を起こす引き金となる。mPTP アッセイ法により、AZT 添加による細胞内ミトコンドリアの mPTP 開口を確認した。

(9) 核 DNA とミトコンドリア DNA コピー数の定量

AZT-TP は、ウイルスの複製過程にて逆転写酵素に基質として取り込まれることで逆転写反応を阻害し、ウイルス増殖を抑制する。一方で、自身のミトコンドリア DNA の複製過程においても AZT-TP を取り込むことで、ミトコンドリア DNA 合成異常をきたし、ミトコンドリア DNA 量が減少する、と考えられている。AZT を添加した各細胞の総 DNA を分離して、ミトコンドリアにコードされているミトコンドリア呼吸鎖複合体タンパク (CO1, ND1) と核にコードされているミトコンドリア構成タンパク (PG2AS) を標的遺伝子として、そのコピー数を定量して、mtDNA/nDNA 比を算出した。

4. 研究成果

(1) TMPK 過剰発現 H9c2 細胞の樹立

組換えレンチウイルスを作製してラット胎児心筋芽細胞 H9c2 に感染させることで、野生型および変異型ヒト TMPK 遺伝子を細胞内に導入した。野生型および変異型ヒト TMPK タンパクの発現をそれぞれ確認できた。

(2) AZT 代謝物の分析

(1) で作製した細胞に 500 μ M の AZT を添加し、36 時間培養した。逆相高速液体クロマトグラフで細胞内 AZT 代謝物を測定すると、変異型 TMPK 細胞では AZT-TP が蓄積し、野生型 TMPK 細胞では、AZT-TP が蓄積した。

(3) AZT 活性化代謝物は細胞生存性を低下させる

種々の濃度の AZT を細胞に 4 日間添加すると、変異型 TMPK 細胞では、用量依存性に細胞生存性低下を示した。野生型 TMPK 細胞では、生存性低下を認めなかった。このことか

ら、AZT-TP は AZT-MP より毒性が強いことが示され、AZT 長期服用に伴う副作用は AZT-TP により起きることが考えられた。

(4) AZT はミトコンドリアの断片化を誘発する

各細胞に AZT 添加あるいは非添加による生細胞イメージングをレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて行った。AZT を添加した変異型 TMPK 細胞では、ミトコンドリアネットワークが断片化していた。ミトコンドリア面積は AZT を添加した変異型 TMPK 細胞において、添加しなかった群と比較して減少した。ミトコンドリアアスペクト比も同様に減少しており、野生型 TMPK 細胞では、いずれも認めなかった。このことから、AZT-TP の蓄積は、ミトコンドリアを断片化することが示された。

(5) ミトコンドリアダイナミクス制御因子の発現が AZT によって変動する

ミトコンドリアの分裂は機能低下したミトコンドリアをネットワークから排除することで、ネットワークの機能を維持する仕組みである。このミトコンドリアの分裂 (あるいは断片化) に関わる Drp1 は、AZT-TP の蓄積により遺伝子発現およびタンパク発現レベルで増加した。さらに、機能性タンパクである Drp1 の脱リン酸化体のミトコンドリア外膜へ局在が観察された。また、ミトコンドリア外膜での Drp1 受容体である Mff のタンパク発現レベルも増加した。一方、ミトコンドリア融合は、機能低下ミトコンドリアを健全なミトコンドリアネットワークに取り込むことで、その機能低下を補填する役割がある。ミトコンドリア融合に関わる Opa1 は AZT-TP の蓄積により、遺伝子およびタンパクレベルにていずれも発現の低下が認められた。以上から活性化 AZT 代謝物の蓄積はミトコンドリアの融合と分裂のサイクルを障害し、ネットワーク構造を破綻させることが示された。

(6) AZT 三リン酸の蓄積はミトコンドリア酸

素消費率を障害する

変異型 TMPK 細胞では、AZT 添加により有意な酸素消費率減少をきたした。AZT-TP がミトコンドリア呼吸鎖複合体に影響を及ぼし、ミトコンドリア呼吸能を障害することが示唆された。

(7) AZT は膜電位を低下させ、ROS 産生を増加させる

変異型 TMPK 細胞では AZT 添加により、ミトコンドリア内膜電位が低下し、ROS 産生増加を認めた。AZT-TP の蓄積は、ROS 産生を増加させ、この ROS がミトコンドリアを傷害すること、あるいはミトコンドリアを直接 AZT-TP が傷害することで、ROS が放出され、悪循環をきたす可能性が示唆された。

(8) AZT は mPTP 開口を増加させる

変異型 TMPK 細胞では、AZT 添加により mPTP 開口の増加を認めた。mPTP 開口によりミトコンドリア内膜電位は低下し、ミトコンドリア機能障害およびアポトーシスが誘導され、細胞死を引き起こすと考えられる。

(9) AZT はミトコンドリア DNA 量を変化させない

野生型および変異型 TMPK 細胞いずれも、AZT 添加に伴うミトコンドリア DNA コピー数に有意な減少がみられず、AZT-TP の蓄積は、少なくとも短期間ではミトコンドリア DNA 量に影響しないことが示唆された。

AZT は活性化体である AZT-TP が細胞内に蓄積するのに時間がかかるため、その毒性の評価がこれまで困難であった。AZT-MP から AZT ニリン酸の変換酵素である TMPK が律速段階となるため、細胞内には AZT-MP が蓄積し、その毒性も AZT-MP によるものであると考えられてきた。本研究により、AZT-TP の毒性が明らかになった。また、そのミトコンドリア障害の詳細な分子機序がミトコンドリアネットワークの断片化、品質管理機構の破綻によるものであることが明らかにされた。細胞

内 ROS 産生が増加していることから、ミトコンドリア呼吸鎖複合体への影響が示唆された。本細胞モデルは、短期間で評価が可能な薬剤誘発性ミトコンドリア機能障害モデルでもある。今後本実験系を用いて、各種薬剤のミトコンドリア毒性評価が可能となるほか、本細胞系を用いたミトコンドリア保護薬の開発、効能評価に有用となりうる。

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 1 件)

Nomura Ryosuke, Sato Takeya, Sato Yuka, Medin Jeffrey A. Kushimoto Shigeki, Yanagisawa Teruyuki. Azidothymidine-triphosphate impairs mitochondrial dynamics by disrupting the quality control system. *Redox Biology* 2017; 13, 407-417. 査読有

DOI : 10.1016/j.redox.2017.06.011

〔学会発表〕(計 5 件)

野村亮介他 AZT 誘発性ミトコンドリア断片化は Drp1 のミトコンドリア外膜結合により生じる、第 68 回日本薬理学会北部会、2017 年 9 月 16 日、山形テルサ(山形県山形市)

Nomura Ryosuke et al. AZT-induced mitochondrial dysfunction is caused by destabilization of mitochondrial electron transfer complex、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

野村亮介他 ミトコンドリア動的平衡制御分子の発現解析によるミトコンドリア形態異常の解明、第 67 回日本薬理学会北部会、2016 年 9 月 30 日、北海道大学学術交流会館、札幌市

Nomura Ryosuke et al. The

mechanisms of mitochondrial mass increase by AZT、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）

野村亮介他 Cyclosporin A による AZT 誘発性 mPTP 開口抑制効果は、Cyclophilin D 依存性である、第 66 回日本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日、富山国際会議場（富山県富山市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 亮介 (NOMURA, Ryosuke)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：90400358

(2) 研究分担者

佐藤 岳哉 (SATO, Takeya)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10312696

久志本 成樹 (KUSHIMOTO, Shigeki)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50195434

斎藤 将樹 (SAITO, Masaki)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50400271

柳澤 輝行 (YANAGISAWA, Teruyuki)
東北福祉大学・健康科学部・教授
研究者番号：90133941