

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19387

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAをターゲットとした新しい心不全治療の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutics targeting mitochondria DNA

研究代表者

藤野 剛雄(fujino, takeo)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10721904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、mtDNAが、抗リモデリング効果を発揮する機序の解明を目的とした。Twinkle過剰発現マウス、Tfam過剰発現マウスを用いて、容量負荷モデルを作成した。TwinkleとTfamはそれぞれ異なる機序でmtDNAのコピー数を増加させたが、いずれも左室リモデリングは抑制され、ミトコンドリア酸化ストレス(ROS)は減少した。mtDNAの酸化状態はむしろ増加していたことなどから、mtDNAそのものがミトコンドリア内のROS制御因子として機能していることを明らかにした。また圧負荷モデルにおいても、mtDNAがMMP産生を制御し、心筋の繊維化を抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the mechanism of anti-remodeling effect by mtDNA. We generated volume overload model mice in Twinkle helicase overexpression mice (TW mice) and Tfam overexpression mice (TF mice). TW mice and TF mice increased mtDNA copy number by different mechanism respectively, furthermore each mice suppressed left ventricular remodeling and repressed mitochondrial oxidative stress. However, because oxidative stress were induced in mtDNA, that mtDNA can function as ROS regulatory factor in mitochondria. Furthermore, it was also identified that pressure overload model mice in TW mice and TF mice led to reduction in fibrogenesis and suppression of MMP generation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア 心不全 心筋リモデリング

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全の治療の進歩は目覚ましく、 β 遮断薬をはじめとする内科的治療、デバイスを用いた治療、心臓移植に至るまで、心不全の各病期における治療法は体系的に整備されつつある。しかし最適な内科的治療にもかかわらず心不全が進行し、治療抵抗性の難治性心不全を呈する患者も多い。重症心不全患者に対する新たな内科的治療の開発は強く求められている。

我々は、マウスの慢性心不全モデルにおいて心筋細胞のミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数が減少している事を報告した (Circ Res 88: 529-35, 2001)。慢性心不全においてはミトコンドリア電子伝達系からの活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) が増加し、mtDNA コピー数を減少させ、それがミトコンドリア機能不全を助長するという悪循環を形成し、心不全の進展に関与する (図 1)。

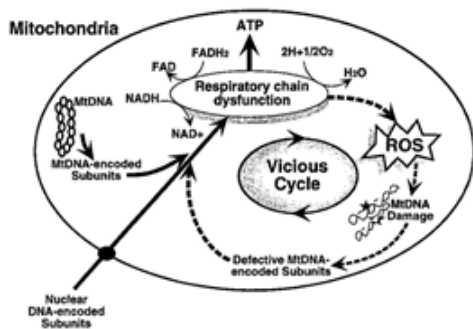


図 1. Circ Res 88: 529-35, 2001.

ミトコンドリア転写因子 A (mitochondrial transcriptional factor A, TFAM) はミトコンドリアマトリックスに豊富に存在し mtDNA と結合し安定化させる蛋白質であり、TFAM の過剰発現マウスでは心筋梗塞後心不全モデルにおける mtDNA コピー数低下が抑制され、心機能低下の抑制、生存率の著明な改善が示された (図 2)。TFAM とは異なる機序で mtDNA コピー数を増加させる Twinkle 蛋白を過剰発現したマウスでも心筋の病的リモデリングの抑制が見られたことから (PLoS One 8: e67642, 2013.)、この心筋保護効果は mtDNA コピー数の増加を介したものであると考えられる。臨床的にも TFAM および mtDNA コピー数を増加させることで心不全の進展を抑制し心不全死を減少させることが期待され、私はリコンビナントヒト TFAM を作成し、心筋細胞に投与することで心筋細胞のミトコンドリアに取り込まれることを証明した。同様の結果は他の研究グループからも報告された (Mitochondrion 9: 196-203, 2009)。さらに私は、取り込まれたリコンビナントヒト TFAM が mtDNA コピー数を増加させ、アンジオテンシン II (AngII) 刺激

による nuclear factor of activated T cells (MFAT)活性化という心筋細胞の病的リモデリングシグナルを抑制する事を証明した (Mitochondrion 12: 449-58, 2012.)。

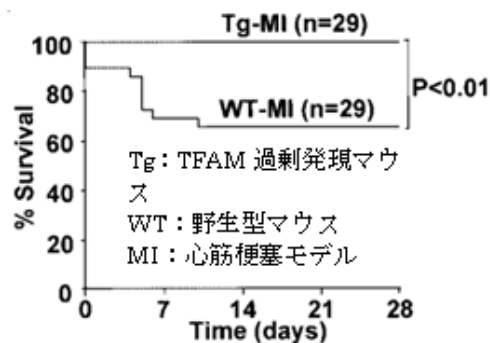


図 2. Circulation 112: 683-90, 2005.

2. 研究の目的

以上の背景より、リコンビナント TFAM 蛋白を用いて mtDNA コピー数を増加させる方法が、臨床的に心不全改善に有用である事が期待されている。しかし、この新たな治療を臨床に応用する上では課題が残されている。一つは、mtDNA コピー数増加が心筋の病的リモデリングを抑制する機序が不明であることである。ミトコンドリアは不全心筋における ROS の主な発生源であり (Circ Res 85: 357-63, 1999)、また ROS は様々な心筋リモデリングシグナルに関与することが明らかであるので、mtDNA コピー数増加は ROS に関連した病的リモデリングシグナルを抑制すると推測されるが、それを明らかにした研究は存在しない。

もう一つは、どのような病態に対して mtDNA コピー数をターゲットとした治療が有効かが不明であることである。我々の検討でも mtDNA コピー数の増加は心筋梗塞後および容量負荷に伴う心不全モデルには有効であった。一方、圧負荷に伴う心筋肥大は抑制しないものの、その後生じる心収縮能低下および心筋線維化は抑制されていた (PLoS One 8: e67642, 2013.)。臨床における慢性心不全はその原疾患、重症度、病態は幅広く、また罹患患者の年齢、性別、合併疾患なども多彩で、どのような病態が mtDNA コピー数の減少と関与しているかは報告が無い。これを明らかにする事で、mtDNA コピー数をターゲットとした治療がどのような患者に有効であるかを知ることが考えられる。

本研究では、mtDNA コピー数をターゲットとした新しい治療の実現に向け、上記の二点を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mtDNA コピー数増加による心筋の病的リモデリング抑制の機序の解明

生仔ラット単離心筋細胞に TFAM を過剰発現させ、mtDNA コピー数を増加させる。アンジオテンシン II など病的リモデリングシグナ

ルを模擬した刺激を与え、細胞内の ROS や NFAT 活性の評価を分子生物学的手法を用いて行う。

また、mtDNA コピー数増加が異なる機序で生じる 2 種のマウス (TFAM 過剰発現マウス) および Twinkle (mtDNA ヘリカーゼ) 過剰発現マウスを用いる。これらのマウスに対して、圧負荷モデルおよび容量負荷モデルを作成する。

(2) mtDNA コピー数をターゲットとした治療が有効な病態の解明

心筋生検もしくは手術で得た心不全患者の心筋検体から蛋白および DNA を抽出し、ウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法により TFAM と mtDNA コピー数の定量を行う。それらを臨床データと照らし合わせ、ロジスティック解析にて mtDNA コピー数の減少と相関する因子を抽出する。臨床データから mtDNA コピー数が減少する病態を予測可能なスコアリングシステムを構築する。

4. 研究成果

(1) mtDNA コピー数増加による心筋の病的リモデリング抑制の機序の解明

MtDNA のコピー数増加が活性酸素を消去し、心筋リモデリングを抑制することを明らかにするために、mtDNA の転写因子である TFAM 以外の機序で mtDNA コピー数を増加させる因子を選んだ。具体的には mtDNA のヘリカーゼである Twinkle 過剰発現マウスおよびミトコンドリア転写因子 A (Tfam) 過剰発現マウスに、容量負荷モデルを作成した。また、仔ラット心筋細胞に、Tfam を過剰発現させることで、mtDNA が増加した心筋細胞を用いた。Twinkle と Tfam は全く異なる機序で mtDNA のコピー数を増加させたが (図 3)、いずれにおいても容量負荷モデルの左室リモデリングは抑制され (図 4)、ミトコンドリアにおける酸化ストレスは減少した。また、mtDNA が増加した状態では、AngII 刺激において NFAT の活性化が抑制されていた。

一方で、単離した mtDNA から mtDNA の酸化状態について、8-oxoG を用いて評価すると、mtDNA の酸化はむしろ mtDNA 過剰状態にて亢進していることが明らかとなった。

以上のことから、in vivo においても in vitro においても、酸化ストレス産生状態における mtDNA は、抗酸化的に作用することが明らかとなった。

結論として、mtDNA そのものがミトコンドリア内の酸化ストレス制御因子として機能していることを明らかにした。

また Twinkle の過剰発現マウスに圧負荷モデルを作成したところ、mtDNA が MMP 産生を制御し、心筋の繊維化を抑制することを示した (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 311:H509-19, 2016)。

これらの結果から、機械的負荷において、

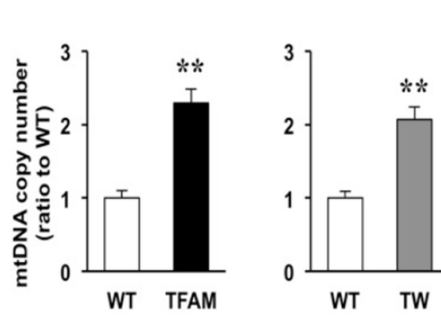


図3. TFAM およびTWマウスのmtDNAコピー数

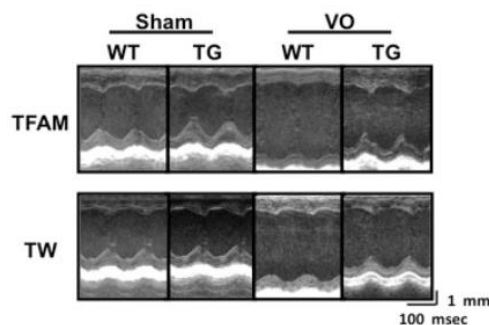


図4. TFAM およびTWマウスの容量負荷モデルの左室リモデリングの抑制

mtDNA は、ミトコンドリア内のレドックスを制御し、そのリモデリングシグナルの発現調節を行っていることを明らかにした。

(2) mtDNA コピー数をターゲットとした治療が有効な病態の解明

病態の解明については、九州大学病院において「心筋症の重症度に関与する種々の因子および組織学的検討による新たな発症増悪機転究明に関する研究」というヒトゲノム研究を新倫理指針にのっとり、現在も進行中である。このヒトゲノム研究を今後も続け、mtDNA コピー数が心不全患者においてどのような傾向であるのかを解明したのちに、治療方法に対する研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Inoue T, Ikeda M, Ide T, **Fujino T**, Matsuo Y, Arai S, Saku K, Sunagawa K. Twinkle overexpression prevents cardiac rupture after myocardial infarction by alleviating impaired mitochondrial biogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 311(3):H509-19. 2016.

Ikeda M, Ide T, **Fujino T**, Arai S, Saku K, Kakino T, Tyynismaa H, Yamasaki T, Yamada K, Kang D, Suomalainen A, Sunagawa K. Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. PLoS One. 10(3):e0119687. 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 剛雄 (Fujino Takeo)

九州大学大学院医学研究院重症心肺心不全

講座・助教

研究者番号：10721904