

令和元年5月31日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0013

研究課題名(和文) 環境因子によるミトコンドリア機能変化を介する新しい老化モデル

研究課題名(英文) A novel model for causing senescence via mitochondrial dysfunction by environmental factors

研究代表者

西田 基宏 (Nishida, Motohiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・教授)

研究者番号：90342641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは分裂・融合を繰り返すダイナミックな小器官であり、その品質管理は健康維持にとって極めて重要である。本研究では、環境因子がミトコンドリア品質管理およびそれに伴う早期老化に与える影響をレドックス制御の視点から明らかにし、老化抑制につながる新たな治療薬を同定することを目的とした。我々は、Drp1タンパク質がポリオウ鎖を形成しており、環境化学物質によるポリオウ鎖のイオウ枯渇がDrp1活性化の引き金となること、それによりミトコンドリア過剰分裂を介した心筋早期老化が誘導され、結果的に種々の血行力学的負荷に対して脆弱になることをマウスで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質に含まれるCysポリオウ鎖が環境親電子物質の代謝・消去を担う内因性求核物質の実体となり、環境親電子物質曝露の蓄積がミトコンドリア過剰分裂を介して心筋早期老化を誘導するという新たな機構を解明したこと、さらにこれを選択的に抑制する既承認薬シルニジピンが慢性心不全を改善させるという知見をマウスで得たことは基礎・臨床の両面において意義深い。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are dynamic organelle that can change its structure and morphology by repeating fission and fusion cycle, and its quality control is essential for maintenance of body health. In this study, we aimed to reveal the influence of environmental factors on mitochondrial quality and early senescence in view of redox signaling, and identify a novel anti-aging drug. We found that dynamin-related protein 1 (Drp1), a mitochondrial fission-promoting protein, forms polysulfide (Cys-SSH) in protein and depolysulfidation of Drp1 by environmental electrophiles triggered Drp1 activation, which led to mitochondrial fission-mediated myocardial early senescence, resulting in causing cardiac vulnerability against hemodynamic load in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：ミトコンドリア 老化 心臓 環境因子 レドックス イオウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の老化は、加齢に伴う様々な疾患病態に密接に関わっており、高齢者の生活の質に大きな影響を与えることから、老化の予防、治療法の開発は高齢化社会において重要な課題と考えられる。近年、細胞の老化のメカニズムとして外因的・内因的にもたらされる酸化ストレスや、ミトコンドリアの機能不全などが関わることが分かってきたが、環境因子が老化及ぼす影響や詳細な老化の分子機構については依然として不明な点が多く残されている。

応募者は、酸化ストレス制御に重要な役割を果たす内因性の親電子性シグナル分子として 8-ニトロ-cGMP を発見し、その病態生理的役割を明らかにした (Nature Chem Biol, 2007, 2012)。さらに最近、酸化ストレスの新規制御因子としてシステインパルスフィドなどの活性イオウ分子種を同定した (PNAS, 2014)。また、ごく最近 8-ニトロ-cGMP と活性イオウ分子がミトコンドリア機能に重要な役割を果たすことを見いだした。本研究では、環境因子による細胞老化の分子メカニズム解明のために、内因性親電子シグナル分子 8-ニトロ-cGMP と活性イオウ分子種により制御されるミトコンドリア新生の分子機構を明らかにするとともに、このミトコンドリア機能制御系への環境中の親電子物質が与える影響を明らかにする。解明した新規ミトコンドリア新生分子機構の知見をもとに、ミトコンドリア新生を促進する化合物を探索し、抗老化薬剤の開発を目指した研究を推進する。

2. 研究の目的

本研究では、生体の恒常性維持に関わる親電子シグナル系の環境親電子物質による攪乱というユニークな観点から、環境因子と老化の関係の解明を目指した。ミトコンドリア新生の分子メカニズムの解明および細胞老化とミトコンドリア機能との関連の解明に大きく寄与する画期的な知見を得ることが予想されるとともに、従来とは異なる全く新しい作用機序を持った新規抗老化薬剤の開発が期待される。本研究の成果は、環境保全や生活習慣といった衛生学的な老化予防の提案に資するとともに、医学的には新たな老化の予防法、新規治療法、治療剤の開発に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 環境親電子物質による細胞老化およびミトコンドリア新生への影響の解析

各種培養細胞を用いて環境親電子物質が細胞老化およびミトコンドリア新生へ与える影響を調べる。培養細胞 (マウス心線維芽細胞、心筋細胞、ヒト肺上皮 A549 細胞、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞など) を各種濃度の環境親電子性化学物質 (メチル水銀、ホルムアルデヒドなどの環境汚染物質) で処理をし、細胞老化およびミトコンドリア機能 (新生) を解析する。細胞老化は応募者の既報の方法に従い解析する。ミトコンドリア新生は、ミトコンドリアの形態およびミトコンドリア DNA 量の変化をもとに解析する。さらに、メチル水銀を投与したマウス組織についても同様の解析を行い in vivo での作用を検証する。

(2) 8-ニトロ-cGMP によるミトコンドリア新生の分子機構の解析

生理的な親電子シグナルである 8-ニトロ-cGMP のミトコンドリア新生制御メカニズムとして、Drp1 の活性化を調べる。Drp1 活性化は、ミトコンドリア上での Drp1 の局在変化、および多量体化を指標として調べる。さらに、環境親電子物質が Drp1 活性化に与える影響を調べる。

(3) 環境親電子物質による生体内活性イオウ分子動態への影響の解析

活性イオウ分子と 8-ニトロ-cGMP は生体内で連関してシグナル制御に関わっている。メチル水銀などで処理をした培養細胞の活性イオウ分子動態を質量分析法および蛍光プローブにより解析し、ミトコンドリア新生との関連を明らかにする。また、メチル水銀を投与したマウス組織についても同様の解析を行い in vivo での作用を検証する。

(4) ミトコンドリア品質維持を機序とする新規抗老化薬剤のスクリーニング

Drp1 の活性化を指標として、ケミカルライブラリーからミトコンドリア新生を促進する化合物を探索する。スクリーニングをした薬剤の中から抗老化に役立つ新規薬剤の開発を目指す。

4. 研究成果

ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 Drp1 の活性調節に、C 端の hypervariable region にあるシステイン (Cys624) のポリイオウ鎖 (Cys624-SS_(n)H) が深く関与していることを見出した (Science Signaling, revised)。具体的には、神経毒性を起こさない微量のメチル水銀 (MeHg) を投与したマウスの心臓において、ミトコンドリアが著しく分裂していること、Drp1 の GTP 結合活性が増大していることを見出した。Drp1 の Cys624-SS_(n)H はポリイオウ鎖を形成している状態では活性が低く保たれており、MeHg 曝露によりこのポリイオウ鎖からイオウが奪い取られることで Drp1 活性が増加することを明らかにした。Drp1 のポリイオウ鎖は、ミトコンドリア Cystinyl tRNA 合成酵素 (CARS2) が CysSH を基質に CysSSH を生成することで翻訳時に Drp1 タンパク中に取り込まれること、CARS2 欠損 HEK293T 細胞株において著しい Drp1 の活性化とミトコンドリア過剰分裂が起こることも明らかにした (Nature Commun., 2017)。さらに、心筋梗塞後の梗塞周辺領域における心筋ミトコンドリア過剰分裂が心筋の早期老化 (機能低下) に関与することもマウスで明らかにし、これを抑制する既承認薬 (シルニジピン: ジヒドロピリジン系 L/N 型 Ca²⁺チャネル拮抗薬) が Drp1 の脱イオウ化によるミトコンドリア過剰分裂を阻害し、心筋梗塞後の心不全を回復させる効果をもつこともマウスで実証した (Science Signal., 2018)。

以上の結果より、環境化学物質による Drp1 タンパク質ポリオウ鎖のイオウ枯渇がミトコンドリア過剰分裂（品質低下）を招き、心筋の早期老化を誘導することでストレス抵抗性を減弱させることが示された。また、これを阻害する既承認薬シルニジピンが心不全をはじめとする心血管リスクの軽減に貢献しうる可能性も示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計31件)

1. Tanaka T, Nishimura A, Nishiyama K, Goto T, Numaga-Tomita T, **Nishida M**. Mitochondrial dynamics in exercise physiology. *Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol.* 2019 Feb 1. (2019) doi: 10.1007/s00424-019-02258-3. (査読有)
2. Ihara H, Kakihana Y, Yamakage A, Kai K, Shibata T, **Nishida M**, Yamada KI, Uchida K. 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products. *J. Biol. Chem.* 294(4):1279-1289. pii: jbc.RA118.006111. (2019) doi: 10.1074/jbc.RA118.006111. (査読有)
3. Nishimura A, Shimauchi T, Tanaka T, Shimoda K, Toyama T, Kitajima N, Ishikawa T, Shindo N, Numaga-Tomita T, Yasuda S, Sato Y, Kuwahara K, Kumagai Y, **Akaike T**, Ide T, Ojida A, Mori Y, **Nishida M**. Hypoxia-induced interaction of filamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence. *Science Signal.* Nov 13;11(556). pii: eaat5185. (2018)doi: 10.1126/scisignal.aat5185. (査読有)
4. Parichatikanond W, Nishimura A, **Nishida M**, Mangmool S. Prolonged stimulation of β 2-adrenergic receptor with β 2-agonists impairs insulin actions in H9c2 cells. *J. Pharmacol. Sci.* Nov;138(3):184-191. (2018) doi: 10.1016/j.jphs.2018.09.007. (査読有)
5. Sunggip C, Shimoda K, Oda S, Tanaka T, Nishiyama K, Mangmool S, Nishimura A, Numaga-Tomita A, **Nishida M**. TRPC5-eNOS axis negatively regulates ATP-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Front. Pharmacol.* May 22;9:523. (2018). doi: 10.3389/fphar.2018.00523. (査読有)
6. Masuda K, Tsutsuki H, Kasamatsu S, Ida T, Takata T, Sugiura K, **Nishida M**, Watanabe Y, Sawa T, **Akaike T**, Ihara H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 15;495(3):2165-2170 (2018). doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.088. (査読有)
7. Sawa T, Ono K, Tsutsuki H, Zhang T, Ida T, **Nishida M**, **Akaike T**. Reactive Cysteine Persulphides: Occurrence, Biosynthesis, Antioxidant Activity, Methodologies, and Bacterial Persulphide Signalling. *Adv Microb Physiol.* 72:1-28. (2018)doi: 10.1016/bs.ampbs.2018.01.002. (査読有)
8. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Hamid HA, Jung M, Matsunaga T, **Fujii S**, Sawa T, **Nishida M**, Kumagai Y, **Akaike T**. Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. *Chem. Res. Toxicol.* Sep 18;30(9):1673-1684 (2017). doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120. (査読有)
9. Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Ito T, Nishimura A, Matsukane R, Oda S, Hoka S, Ide T, Koitabashi N, Uchida K, Sumimoto H, Mori Y, **Nishida M**. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight.* Aug 3;2(15). pii: 93358 (2017). doi: 10.1172/jci.insight.93358. (査読有)
10. Oda S, Numaga-Tomita T, Kitajima N, Toyama T, Harada E, Shimauchi T, Nishimura A, Ishikawa T, Kumagai Y, Birnbaumer L, **Nishida M**. TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex

- leading to attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice. *Sci. Rep.* Aug 8;7(1):7511 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-07903-4. (査読有)
11. Phosri S, Arieayawong A, Boonrukchai K, Parichatikanond W, Nishimura A, **Nishida M**, Mangmool S. Stimulation of adenosine A_{2B} receptor inhibits endothelin-1-induced cardiac fibroblast proliferation and α -smooth muscle actin synthesis through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-signaling pathway. *Front. Pharmacol.* Jun 30;8:428 (2017). doi: 10.3389/fphar.2017.00428. (査読有)
 12. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, **Nishida M**, Kato T, Fukushima H, Yamashita JK, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J Am Heart Assoc.* Feb 10;6(2), pii: e003601 (2017). doi: 10.1161/JAHA.116.003601. (査読有)
 13. Yamaguchi Y, Iribe G, Kaneko T, Takahashi K, Numaga-Tomita T, **Nishida M**, Birnbaumer L, Naruse K. TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca²⁺ concentration in mouse cardiomyocytes. *J. Physiol. Sci.* 68(2):153-164 (2017). doi: 10.1007/s12576-016-0519-3. (査読有)
 14. Guan Y., Nakano D., Zhang Y., Li L., Liu W., **Nishida M**., Kuwabara T., Morishita A., Hitomi H., Mori K., Mukoyama M., Masaki T., Hirano K. and Nishiyama A. A protease-activated receptor-1 antagonist protects against podocyte injury in a mouse model of nephropathy. *J. Pharmacol. Sci.* pii: S1347-8613(17)30128-7 (2017). doi: 10.1016/j.jphs.2017.09.002. (査読有)
 15. **Akaike T**, Ida T, Wei F-Y, **Nishida M**, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, **Fujii S**, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.* 8(1):1177 (2017). doi: 10.1038/s41467-017-01311-y. (査読有)
 16. **Nishida M***, Nishimura A, Matsunaga T, Motohashi H, Kasamatsu S, **Akaike T***. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. *Free Radic Biol Med.* 109, 132-140, (2017). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024. (査読有)
 17. Unoki T, Abiko Y, Toyama T, Uehara T, Tsuboi K, **Nishida M**, Kaji T, Kumagai Y. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci Rep.* Jun 30;6:28944 (2016). doi: 10.1038/srep28944. (査読有)
 18. Numaga-Tomita T, **Nishida M***, Putney JW Jr. and Mori Y*. TRPC3 amplifies B cell receptor-induced ERK signaling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *Biochem J.* Jan 15;473(2):201-10 (2016). doi: 10.1042/BJ20150596. (*corresponding author) (査読有)
 19. Mangmool S, Denkaew T, Phosri S, Pinthong D, Parichatikanond W, Shimauchi T, **Nishida M**. Sustained β AR stimulation mediates cardiac insulin resistance in a PKA-dependent manner. *Mol Endocrinol.* 30(1), 118-132 (2016). doi: 10.1210/me.2015-1201. (査読有)
 20. Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, **Nishida M**, Hu Y, Inoue R, Nagata R, Mori Y. Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. *Mol Pharmacol.* 89(3), 348-63 (2016). doi:

10.1124/mol.115.102863. (査読有)

21. Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems J-M, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, **Nishida M***. The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. *Science Signal*. 9(411), ra7 (2016). doi: 10.1126/scisignal.aac9187. (査読有)
22. Hagimori M, Murakami T, Shimizu K, **Nishida M**, Ohshima T, Mukai T. Synthesis of radioiodinated probes to evaluate the biodistribution of a potent TRPC3 inhibitor. *Med. Chem. Comm.* 7(5), 1003-1006 (2016). DOI: 10.1039/c6md00023a. (査読有)
23. Kitajima N., Numaga-Tomita T., Watanabe M., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and **Nishida M***. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci. Rep.* 6, 37001 (2016). doi: 10.1038/srep37001. (査読有)
24. Numaga-Tomita T., Kitajima N., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and **Nishida M***. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 39383 (2016). doi: 10.1038/srep39383. (査読有)
25. **Fujii S**, Sawa T, **Nishida M**, Ihara H, Ida T, **Motohashi H**, **Akaike T**. Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides. *Arch Biochem Biophys.* 595, 140-146, (2016). doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008. (査読有)
26. **Nishida M**, Kumagai Y, Ihara H, **Fujii S**, **Motohashi H**, **Akaike T**. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nutr.* 58(2), 91-98, (2016).doi: 10.3164/jcbn.15-111. (査読有)
27. 西村明幸、**西田基宏** (2018) 活性イオウによる心筋早期老化制御 DOJIN NEWS 165: 1-5.(査読無)
28. **西田基宏**、西村明幸、西山和宏、田中智弘 (2018) 活性イオウによるミトコンドリア品質管理と心疾患リスク制御 硫酸と工業 71(5): 65-72.(査読無)
29. **西田基宏**、西村明幸、下田翔 (2018) 活性イオウによるミトコンドリア機能制御 実験医学 36(5): 663-668. (査読無)
30. 宮本理人、**西田基宏** (2018) 食事、運動、睡眠～生活習慣から薬物治療と創薬を考える～. YAKUGAKU ZASSHI(特集号前書き) 138(10): 1255-1256.(査読無)
31. **西田基宏**、西村明幸、西山和宏 (2018) 心臓リモデリングを制御するGタンパク質/受容体シグナリング 日本臨牀増刊「心不全(第2版) 上巻 - 最新の基礎・臨床研究の進歩 - 」76(9). (査読無)

〔学会発表〕(計 102 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：ベンゾイソオキサゾール化合物

発明者：永田龍、森泰生、西田基宏、森誠之、富田拓郎

権利者：大阪大学、京都大学、自然科学研究機構

種類：特許

番号：特願 2018 - 086929
出願年：2018 年 4 月 27 日
国内外の別： 国内

名称：Drp1 重合阻害剤
発明者：西田基宏、石川達也
権利者：自然科学研究機構
種類：特許
番号：特願 2016 - 560298
出願年：2015 年 11 月 20 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.nips.ac.jp/circulation/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：赤池 孝章

ローマ字氏名：Takaaki Akaike

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：2 0 2 3 1 7 9 8

研究分担者氏名：本橋 ほづみ

ローマ字氏名：Hozumi Motohashi

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：0 0 2 8 2 3 5 1

研究分担者氏名：藤井 重元

ローマ字氏名：Shigemoto Fujii

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：大学院非常勤講師

研究者番号(8桁)：0 0 3 2 5 3 3 3

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西村 明幸

ローマ字氏名：Akiyuki Nishimura

研究協力者氏名：田中 智弘

ローマ字氏名：Tomohiro Tanaka

研究協力者氏名：西山 和宏

ローマ字氏名：Kazuhiro Nishiyama