

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09581

研究課題名(和文)ミトコンドリア蛋白輸送機構の心筋リモデリングにおける意義の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Role of mitochondrial import machinery in cardiac remodeling and its application for treatment

研究代表者

松島 将士 (Shouji, Matsushima)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80552869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心筋リモデリングにおけるTom/Tim複合体の役割を解明することを目的とした。梗塞後不全心筋においてTim44が減少し、それに伴いミトコンドリアSODの低下とタンパクカルボニル化の増加を認めた。Tim44の過剰発現マウスでは左室拡大および心機能低下が軽減し、ミトコンドリアSODの増加およびタンパクカルボニル化の低下を認めた。一方でTim44のノックアウトマウスでは左室拡大および心機能低下が増悪し、ミトコンドリアSODが低下しタンパクカルボニル化が増加した。Tim44はミトコンドリアSODの取り込みを制御することで心筋リモデリングに保護的に機能していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により心筋リモデリングの病態理解が進むのみならず、ミトコンドリア取り込み機能の役割が明らかになり、新たな心不全治療戦略に発展する可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the role of Tom/Tim complex in cardiac remodeling. In post-infarcted hearts, Tim44 protein levels were decreased. Overexpression of Tim44 attenuated left ventricular dilatation and dysfunction, increased mitochondrial SOD, and decreased protein carbonylation. In contrast, Tim44 knockout demonstrated the opposite effects. These data indicate that Tim44 plays a protective role in cardiac remodeling by increasing import of SOD into mitochondria.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 ミトコンドリア 蛋白取込 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

薬物療法・非薬物療法の進歩によって心不全の予後は改善してきたが、慢性心不全の5年生存率が70%、重症心不全の2年生存率は50%程度といまだ予後不良である。我が国における心不全患者数は高齢化に伴い毎年新たに約10-20万人ずつ増加し、2030年には130万人に達すると推計されており、心筋リモデリング、心不全の病態解明と新たな治療戦略の開発は重要な研究課題である。**心不全・心筋リモデリングの形成・進展に、心筋細胞におけるミトコンドリア機能障害が中心的な役割を果たしている**ことが明らかにされてきた。しかしながら、ミトコンドリア機能制御による心不全治療はいまだに確立されていない。

ミトコンドリアの機能はエネルギー産生のみでなく、アミノ酸・脂質代謝、ヘム合成、細胞内シグナル伝達と多岐にわたる。ミトコンドリア内に約1500の蛋白が存在するが、その99%は核DNAにコードされている。Tom複合体はミトコンドリア外膜に存在する膜蛋白複合体であり、Tom20、Tom22、Tom70が受容体、Tom40がチャネルとして機能し、核DNAにコードされたミトコンドリア蛋白の細胞質からミトコンドリア内への輸送を制御している。近年、Tom複合体による蛋白輸送メカニズムが明らかとなり、Tom20、Tom22はプレ蛋白を認識しTom40を介してマトリックスへ輸送すること、Tom70はミトコンドリア局在シグナルを有する蛋白質をミトコンドリア内膜に輸送することが報告されている(Nat Rev 2010)(**図1**)。さらにTom複合体はミトコンドリア内での蛋白のソーティングにも関与しており、その欠損はミトコンドリア蛋白のミスフォールディングをひきおこし(Cell 2013)、ミトコンドリア形態や酸化ストレスの産生と関連することも知られている(Nat Rev 2010)。つまり、Tom複合体によるミトコンドリア蛋白輸送機構はミトコンドリア機能維持、細胞機能維持において極めて重要な役割を果たしている。このような知見は、**Tom複合体機能低下によるミトコンドリア蛋白輸送の障害が、ミトコンドリア機能障害を引き起こし心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する可能性を支持する**ものである。さらに、**Tom複合体安定化によりミトコンドリア蛋白輸送が正常化されることによりミトコンドリア機能およびエネルギー代謝を維持し、心不全の病態を改善できる**ことが期待される。

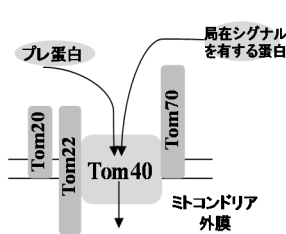


図1 Tom複合体構造と蛋白輸送

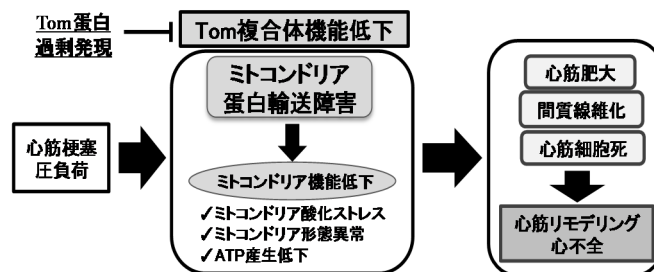


図2 Tom複合体によるミトコンドリア機能調節と心筋リモデリングにおける役割(仮説)

2. 研究の目的

あらゆる心疾患の終末像である心不全の病態基盤は心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであり、この心筋リモデリングの発症・進展にミトコンドリア機能障害が深く関与している。Tom複合体はミトコンドリア外膜に存在する膜蛋白複合体であるが、ミトコンドリアへの蛋白輸送を制御し、ミトコンドリア機能維持、細胞機能維持において極めて重要な役割を担っている。本研究の目的は、**Tom複合体機能低下に起因したミトコンドリア蛋白輸送異常によるミトコンドリア機能制御の破綻が心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する**という仮説を検証するとともに、**Tom複合体の安定化によるミトコンドリア機能の保持という独自のパラダイムに基づく新たな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

平成29年度の計画

1. 心不全形成過程におけるTom複合体機能およびミトコンドリア機能の解析

心不全マウスモデルを用いて、Tom複合体の蛋白発現とミトコンドリア機能障害、心筋リモデリング・心不全重症度との関連について検討する。また、Tom複合体異常に伴いエネルギー代謝

に関わるミトコンドリア蛋白量が変化するかを解析する。

1)心不全モデルマウスの作成:左冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全モデルマウスと横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルマウスを使用する。これらの心不全モデルは我々の研究グループで確立している。(研究業績 No.2,3,19,23,29,31,34-36)

2)心筋リモデリング・心不全重症度の評価:心不全重症度:死亡率、心エコー、血行動態測定、心臓および肺重量測定 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)心筋 Tom 複合体蛋白の評価: Tom20、Tom22、Tom40、Tom70 の蛋白発現(ウエスタンブロット(WB)法) 遺伝子発現(RT-PCR法) 蛋白複合体形成(BN-PAGE法、免疫沈降(IP)法)

4)心筋ミトコンドリア機能の評価: Citrate synthase(CS)活性 ミトコンドリア複合体(COX)活性 ミトコンドリア DNA コピー数 心筋組織 ATP content (生化学的アッセイ) 心筋組織酸化ストレスレベル: 1)ミトコンドリア分画におけるスーパーオキシド(Mitoxon) 2)透過性処理した組織およびミトコンドリア分画における H₂O₂(Amplex Red) ミトコンドリア形態:電子顕微鏡によるミトコンドリア形態およびミトコンドリア形態制御蛋白(Drp-1、Fis1、Opa1、Mitofusion1/2)の発現、Drp-1のリン酸化)

5)ミトコンドリア蛋白輸送関連因子の解析:蛋白輸送シャペロンである Heat shock protein(HSP)を解析する HSP40、HSP60、HSP70、mtHSP70の蛋白発現(WB法) 局在(免疫染色法)

6)エネルギー代謝関連ミトコンドリア蛋白の発現量の評価: クエン酸回路関連蛋白(Aconitase) 脂肪酸酸化関連蛋白(Acetyl-CoA synthetase) 電子伝達系関連蛋白(COX)

2.心筋細胞障害モデルにおける Tom 複合体機能およびミトコンドリア機能の解析

心不全の病態に深く関与している神経体液性因子、細胞障害因子による影響を培養心筋細胞を用いて評価する。

1)培養心筋細胞障害モデルでの検討

アンジオテンシン II、受容体刺激薬、過酸化水素や TNF を培養心筋細胞に添加し、細胞障害モデルを作成し(1.3-6)と同様の項目を評価する。また、アポトーシスを cleaved PARP、cleaved caspase-3(WB法) TUNEL染色にて評価する。

2)心筋細胞障害モデルのミトコンドリア機能における Tom 複合体の役割の検討

上記1)で Tom 蛋白の発現およびミトコンドリア機能に変化があった場合、Short hairpin(sh)-adenovirus(Ad)を用いて、変化した Tom 蛋白をノックダウンした心筋細胞におけるミトコンドリア機能を2.1)と同様の方法で評価する。

3.Tom 複合体異常によるミトコンドリア蛋白変化の網羅的・定量的解析

Tom 蛋白異常により引き起こされるミトコンドリア蛋白の変化をプロテオミクスにて網羅的・定量的に解析する。sh-Adにより、上記1)の3)にて変化した Tom 蛋白をノックダウンした培養心筋細胞のミトコンドリア分画を単離し、質量分析を用いたプロテオミクス解析を行い、Tom 蛋白異常に起因して輸送が障害されるミトコンドリア蛋白を同定する。同定された蛋白を TCA サイクルに関する蛋白群、脂質酸化に関する蛋白群、電子伝達系に関する蛋白群、酸化ストレスに関する蛋白群、ミトコンドリア膜構成蛋白群など蛋白機能別に評価することで、Tom 蛋白がミトコンドリア蛋白輸送に与える影響を検討する。

4.心筋細胞障害モデルにおける Tom 複合体相互作用の解析

心筋細胞障害モデルにおいて Tom 複合体の相互作用を BN-PAGE法、IP法にて解析する。Tom 複合体相互作用の低下がミトコンドリア蛋白輸送機能に影響するか検討する。

平成 30 年度以降の研究計画

1.Tom 複合体を介したミトコンドリア蛋白輸送機構のミトコンドリア機能および心筋リモデリングに対する役割の検討

心不全において複数の Tom 蛋白が変化した場合、H29 年度 2.2)でミトコンドリア機能低下をきたした Tom 蛋白の心筋特異的ノックアウトマウスを用いて心不全モデルを作成し、ミトコンドリア蛋白輸送機構のミトコンドリア機能と心筋リモデリングにおける意義を検討する。

1)心臓特異的 Tom 蛋白ノックアウトマウスの作成

CRISPR-Cas9 システムを用いて、心臓特異的 Tom 蛋白ノックアウトマウスを作成し、心筋梗塞、圧負荷による心筋リモデリング、心不全モデルを作成する。

2)心臓特異的 Tom 蛋白ノックアウトマウスにおけるミトコンドリア蛋白の解析

ノックアウトマウスの心筋ミトコンドリア分画を用いて、プロテオミクス解析で変化したミトコンドリア蛋白の発現量を WB 法にて評価する。

3)心臓特異的 Tom 蛋白ノックアウトマウスにおけるミトコンドリア機能、心不全重症度評価

心筋特異的 Tom 蛋白ノックアウトマウスにおいて、ミトコンドリア機能障害、心不全重症度を H29 年の 1.2)4)5)と同様の方法で評価する。

2.Tom 複合体安定化によるミトコンドリア蛋白輸送機構およびミトコンドリア機能保持による心不全治療効果の検討

心筋特異的 Tom 蛋白過剰発現マウスがミトコンドリア蛋白輸送機構、ミトコンドリア機能を保持し、心筋リモデリング・心不全を改善するかを検討する。αMHC-promotor を用いて心筋特異的 Tom 蛋白過剰発現マウス作成し、上記2) 3)と同様にミトコンドリア蛋白、ミトコンドリア機能、心筋リモデリングを評価する。

3. 新たな心不全治療ターゲットとしてのミトコンドリア蛋白の解析

心筋細胞障害モデルにおいて、プロテオミックスで減少を認めたミトコンドリア蛋白をノックダウンもしくは過剰発現し、ミトコンドリア蛋白の適正化によりミトコンドリア機能障害、アポトーシスが改善するかを検証し、心不全治療の新たなターゲットとなりうるミトコンドリア蛋白を模索する。

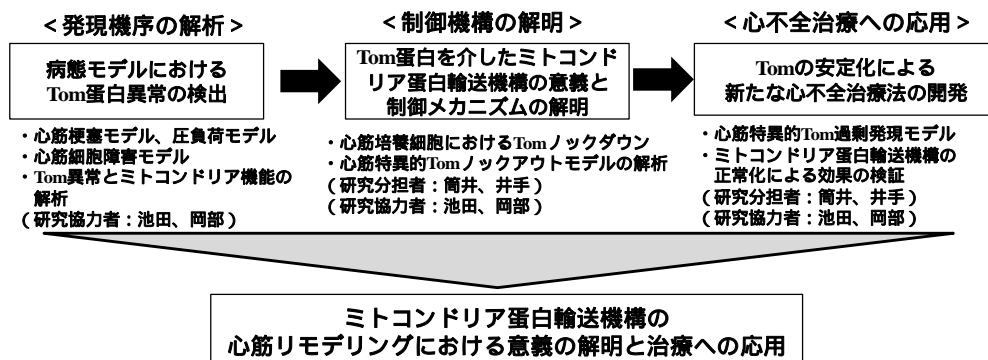


図3 研究計画と研究体制

4. 研究成果

本研究では心筋リモデリングにおける Tom/Tim 複合体の役割を解明することを目的とした。梗塞後不全心筋において Tim44 が減少し、それに伴いミトコンドリア SOD の低下とタンパクカルボニル化の増加を認めた。Tim44 の過剰発現マウスでは左室拡大および心機能低下が軽減し、ミトコンドリア SOD の増加およびタンパクカルボニル化の低下を認めた。一方で Tim44 のノックアウトマウスでは左室拡大および心機能低下が増悪し、ミトコンドリア SOD が低下しタンパクカルボニル化が増加した。Tim44 はミトコンドリア SOD の取り込みを制御することで心筋リモデリングに保護的に機能していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakada Y, Kawakami R, Matsushima S, Ide T, Kanaoka K, Ueda T, Ishihara S, Nishida T, Onoue K, Soeda T, Okayama S, Watanabe M, Okura H, Tsuchihashi-Makaya M, Tsutsui H, Saito Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Simple Risk Score to Predict Survival in Acute Decompensated Heart Failure - A2B Score.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 1019-1024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furihata T, Takada S, Maekawa S, Mizushima W, Watanabe M, Takahashi H, Fukushima A, Tsuda M, Matsumoto J, Kakutani N, Yokota T, Otsuka Y, Matsushima S, Matsumoto M, Nakayama K, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Sabe H, Hatakeyama S, Tsutsui H, Kinugawa S	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulates Mitochondrial Iron Homeostasis Interacting with Transferrin Receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1101/330084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomomi Ide, Hidetaka Kaku, Shouji Matsushima, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 3
2. 論文標題 Clinical Lessons Learned From Heart Failure Registries in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fukuoka Acta Med.	6. 最初と最後の頁 45-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Takada S, Omokawa M, Kadoguchi T, Takahashi M, Fukushima A, Matsushima S, Yamato M, Okita K, Tsutsui H	4. 巻 4
2. 論文標題 Pioglitazone improves whole-body aerobic capacity and skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 535-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.12606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Matsushima S
2. 発表標題 Mitochondrial redox regulation in cardiac remodeling
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the ISHR Japanese Section (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsushima S, Ishikita Akihito, Tsutsui H
2. 発表標題 The role of hexosamine biosynthetic pathway and O' GlcNAcylation in cardiac hypertrophy
3. 学会等名 The 9th Asian Pacific Congress of Heart Failure (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島将士
2. 発表標題 Fyn Regulates Subcellular Redox Signaling in Cardiac Remodeling
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島将士
2. 発表標題 yrosine kinase FYN is a novel regulator of NADPH oxidase4 in cardiac remodeling
3. 学会等名 第21回日本心不全学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松島 将士	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本臨床	5. 総ページ数 500
3. 書名 心不全-最新の基礎・臨床研究の進歩-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	筒井 裕之 (Tsutsui Hiroyuki) (70264017)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究 分担者	井手 友美 (Ide Tommy) (90380625)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	