

令和元年6月21日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15464

研究課題名(和文) 活性イオウによる心筋ミトコンドリアの品質管理と環境ストレス適応機構

研究課題名(英文) Adaptation to Environmental stress and quality control of myocardial mitochondria by reactive sulfur species

研究代表者

西村 明幸 (Nishimura, Akiyuki)

九州大学・薬学研究院・講師

研究者番号：00457152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋ミトコンドリアの品質異常(過剰分裂)が心臓の恒常性破綻の引き金になっていることを見出した。分裂促進Gタンパク質Drp1の活性化因子としてFilamin Aを同定し、病態時特異的に形成されるDrp1-Filamin-Actin複合体がミトコンドリア異常分裂を介して心機能を低下させることを明らかにした。さらに活性イオウによるDrp1のポリイオウ化修飾がFilaminとの相互作用を負に制御すること、環境親電子物質によりDrp1の脱イオウ化が促進されることでミトコンドリアの異常分裂さらには心不全のリスク上昇につながる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患による死亡者数は年間約20万に上がり、これはがんに次ぐ死因となっている。心不全患者の5年生存率は未だ50%であり、新しいコンセプトに基づいた薬の開発が必要とされている。我々は心筋ミトコンドリアの品質異常が心機能低下の引き金になることを見出し、ミトコンドリアの品質を改善する既承認薬シルニジピンを同定した。さらに、シルニジピンは環境化学物質曝露による心疾患リスク上昇に対しても改善効果を示すことをマウス動物実験モデルから明らかにした。これらの成果はミトコンドリア機能保護という新しいコンセプトに基づいた心不全治療薬開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that abnormal quality control (hyperfission) of cardiac mitochondria triggered the disruption of cardiac homeostasis. We identified that filamin A act as a guanine nucleotide exchange factor for Drp1, mitochondrial fission-accelerating factor. Pathological interaction of Drp1-filamin-actin at mitochondrial fission induced mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence, resulting in cardiac dysfunctions. Reactive sulfur-dependent polysulfidation of Drp1 negatively regulated the interaction with filamin A, and environmental electrophiles such as a methylmercury promoted depolysulfidation and activation of Drp1. Depolysulfidation of Drp1 by electrophiles increased cardiac fragility to mechanical load through filamin-dependent mitochondrial hyperfission.

研究分野：生理化学

キーワード：レドックス 心臓リモデリング ミトコンドリア品質 活性イオウ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

心臓は様々な外的ストレスに対して適応する柔軟性と頑健性を持ち合わせた組織である。しかしながら、慢性的なストレスが加わり続けると組織機能が徐々に破綻していき、心不全へと至るリスクが上昇する。近年、様々な環境因子の複合曝露（Exposome）による生体レドックス動態の変化が疾患リスクを規定する要因になると提起されている。環境化学物質の多くは電子を好む親電子物質として作用する。水俣病の原因物質であるメチル水銀に神経毒性を発症する閾値用量よりも50倍も低い濃度で曝露されたヒトは心筋梗塞発症リスクが2.5倍増加するとの疫学調査結果が報告されている。申請者は神経毒性を発症しない低濃度のメチル水銀に曝露したマウスの心疾患リスクを調べ、1) メチル水銀曝露マウスの心機能は一見普通であるが、圧負荷刺激に対して顕著に脆弱になる、2) メチル水銀曝露マウスの心筋ミトコンドリアは異常分裂をしていることを見出した。これらのことから、親電子物質による心筋ミトコンドリア異常が心疾患リスク上昇につながると予想された。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリア過剰分裂を介した心筋細胞の早期老化機構。心筋細胞の老化現象は加齢に加え、様々な心疾患時に確認されており、心筋細胞の機能低下を引き起こす一因と考えられている。しかしながら心筋細胞老化を誘導する分子メカニズムについては詳しくわかっていない。一方、エネルギー産生器官であるミトコンドリアは、分裂と融合を繰り返しながら自身の形態をダイナミックに変化させる。この動的形態変化はミトコンドリアの品質管理に重要であり、その異常は心疾患を含む様々な疾患に関連すると示唆されている。本研究課題では、心筋ミトコンドリア分裂の制御機構解析を通じて心筋ミトコンドリア異常による心筋早期老化機構を解明することで、心臓の恒常性破綻機構について理解することを目的とした。

(2) 環境親電子物質による心疾患リスク上昇機構。環境親電子物質であるメチル水銀を神経毒性が起らない低濃度でマウスに曝露したところ心疾患リスクが増加することが明らかとなった。この時、心筋ミトコンドリアの異常分裂が確認されたことからミトコンドリア品質異常が心疾患リスク上昇につながると予想された。そこで本研究では、環境親電子物質により心筋ミトコンドリア品質が変化するメカニズムをミトコンドリア分裂促進因子 dynamin-related protein 1 (Drp1) のレドックス修飾の観点から解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

・心筋梗塞処置マウスの心機能解析

6週齢の C57BL/6J マウスを三種混合麻酔下で外科的に冠動脈を結索することで心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞1週間後に浸透圧ポンプを用いて薬剤を投与し、心エコー装置を用いて経時的に心機能を測定した。

・メチル水銀曝露マウスの心機能解析

5週齢の C57BL/6J マウスに 10 ppm の水銀を含む水を自由飲水により1週間投与した。一部のマウスから心臓を摘出し、電子顕微鏡解析や組織切片解析用にサンプルを調整した。その後、三種混合麻酔下で大動脈を 27G ニードル幅に結索する大動脈狭窄術を用いて圧負荷刺激を行った。その後、心エコー装置を用いて経時的に心機能を測定した。

・Drp1 の機能解析

Drp1 の GTP 結合能は GTP-agarose を用いた pull-down 法により評価した。Drp1 リン酸化は S616 と S637 それぞれのリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロット方で評価した。Drp1 ポリイオウ化は CN-biotin を用いた biotin-switch 法により評価した。

・ミトコンドリア形態解析

ミトコンドリアは mitotracker green、もしくは ATP 合成酵素βサブユニットの免疫染色により可視化した。画像解析により細胞あたりの平均ミトコンドリア長を測定し、その長さから細胞のミトコンドリア状態を Vesicle、Intermediate、Tubule の3つに分類した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア過剰分裂を介した心筋細胞老化

心筋梗塞処置4週後に確認される心筋細胞老化がどのようなメカニズムを介して起こっているのかを検証するために、心筋梗塞後1週での心筋形態の解析を行った。その結果、梗塞部周辺領域で心筋ミトコンドリアの過剰分裂を確認した。この時、Drp1 の活性化と共に、低酸素ストレスマーカーである H₂O₂、HIF1 α の発現上昇が確認できた (図 1A, B)。そこで、低酸素ストレスがミトコンドリアの過剰分裂を誘導するかについて検討したところ、1%低酸素刺激により Drp1 活性化、ミトコンドリア過剰分裂が誘導された (図 1C, D)。心筋細胞老化が確認できる心筋梗

塞4週の時点では低酸素ストレスマーカーの発現は定常レベルにまで戻っていることから、低酸素再酸素化刺激を行ったところ、心筋細胞老化が顕著に誘導された(図1E)。以上の結果から、心筋梗塞初期に起こる低酸素誘導性のDrp1活性化(ミトコンドリア分裂)が心筋細胞老化の引き金になることを明らかにした。

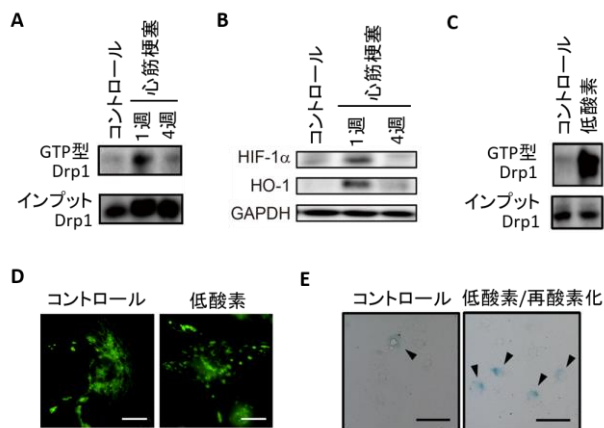


図1 低酸素刺激によるミトコンドリア過剰分裂と心筋細胞老化 (A, B) 心筋梗塞処置マウスの心臓におけるDrp1活性化(A)、低酸素ストレスマーカーの発現(B)。 (C, D) 低酸素刺激による心筋細胞のDrp1活性化(C)、ミトコンドリア形態変化(D)。 (E) 低酸素/再酸素化刺激による心筋細胞老化。矢印はSA-β-gal陽性の老化細胞を示す。

(2) 病態時特異的な Drp1-filamin 相互作用によるミトコンドリア分裂制御

低酸素刺激依存的に Drp1 が活性化されるメカニズムについて検討を行い、低酸素刺激依存的に Drp1 と相互作用する新規分子としてアクチン結合蛋白質 filamin を同定した。両者は低酸素刺激条件下でドット状に共局在し、細胞分画実験からミトコンドリア画分で相互作用していることが明らかとなった。次に相互作用ドメインについて検証を行った。Drp1 はN末からGTPase, MID, Var, GED ドメインによって構成される。このうちGTPaseドメインが filamin との相互作用部位であることが分かった。一方、filamin はN末のアクチン結合ドメインと24個のIgGドメインから構成されている。このうち、IgG16-23 から成るRod-2領域がDrp1との相互作用部位であることが分かった。Drp1はfilaminと相互作用することで活性が上昇した。そのメカニズムについて検証を行い、filaminはDrp1に対してGEF(guanine nucleotide exchange factor)活性を有することが分かった。

Drp1-filamin 相互作用が低酸素誘導性ミトコンドリア分裂に与える影響について検討を行った。まず filamin 発現抑制の効果について調べたところ、filamin 発現抑制により低酸素誘導性ミトコンドリア分裂および再酸素化刺激による心筋細胞老化は抑制されることが明らかとなった。さらに Drp1 の局在について調べたところ、Drp1 は低酸素刺激依存的にミトコンドリア断片上でドットを形成するが、filamin を発現抑制することでドット形成が抑制された。

(3) Drp1-filamin 相互作用を抑制する既承認薬シルニジピンの同定と心機能改善効果

低酸素誘導性ミトコンドリア分裂を抑制する化合物を既承認薬の中から探索し、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の1つであるシルニジピンを同定した(図2A)。他のジヒドロピリジン系化合物ではミトコンドリア分裂の抑制効果は確認されなかった。シルニジピンは低酸素誘導性の Drp1-filamin 相互作用を抑制することが明らかとなった。シルニジピンによる Drp1-filamin 相互作用の抑制が心不全の改善につながるかをマウスモデルで検証した。臨床現場では心機能が低下してから治療薬が処方されることを考慮して、心筋梗塞後1週間たち、心機能が十分低下した状態からシルニジピンを投与した。その結果、シルニジピン投与後2~3週間かけて心拍出量が徐々に回復することが分かった(図2B)。一方、対照群として使用したアムロジピン投与では心機能の回復は見られなかった。シルニジピン投与マウスでは、梗塞部周辺領域でのミトコンドリア過剰分裂および心筋老化が有意に減少し、左室リモデリングも抑制されていた。以上の結果より、シルニジピンが Drp1-filamin 相互作用を抑制することで心筋早期老化を抑制し、心機能低下を改善させることをマウスで実証した。

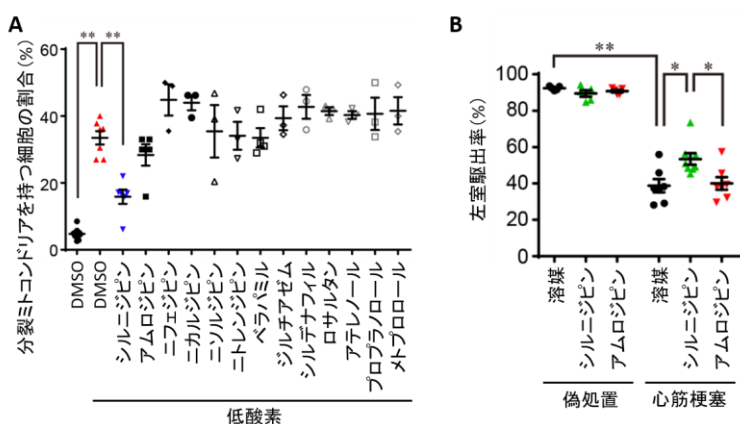


図2 シルニジピンの同定と心機能改善効果

(A) 低酸素誘導性のミトコンドリア分裂を抑制する既承認薬シルニジピンの同定。(B) シルニジピンによる心機能改善効果。心筋梗塞後1週間時点からシルニジピンもしくはアムロジピンを投与し、3週後の心機能を評価した。

(4) 環境親電子物質による Drp1 のレドックス修飾

メチル水銀曝露による心筋ミトコンドリアの過剰分裂が Drp1 に与える影響について検討を行ったところ、Drp1 の活性化が促進されることが明らかとなった。一方、ミトコンドリア融合

促進因子群 (Mfn1, Mfn2, Opa1) の発現に変化は見られなかった。メチル水銀による Drp1 活性化機構として注目したのが Drp1 の翻訳後修飾である。Drp1 は高いレドックス感受性を持っており、その中心となるのがシステイン 624 番で S-ニトロシル化やスルフェニル化を受けることが報告されている。我々は親電子物質の新たな消去系としてシステインの過イオウ付加体 (活性イオウ) に着目して来た。過イオウ付加はシステインやグルタチオンの低分子のチオール基だけでなくタンパク質にも起こることが知られており、このタンパク質のポリイオウ化修飾は新たな翻訳後修飾として注目されている。我々は Drp1 のポリイオウ化修飾について検討を行い、Drp1 は Cys624 がポリイオウ化修飾されることで自身の活性を負に制御していることを見出した。そしてメチル水銀は Cys624 のポリイオウ鎖からイオウを引き抜くこと (脱イオウ化) によって Drp1 の活性化を誘導することが明らかとなった。Cys624 をセリンに置換すると Drp1 の脱イオウ化ミミック体として Drp1 の活性が恒常的に高まっていた。一方、Cys624 を bulky なアミノ酸であるトリプトファンに置換するとメチル水銀による活性化が見られず、ポリイオウ化ミミックのドミナントネガティブ体になることが明らかとなった。

(5) Drp1 ポリイオウ化修飾による Drp1-filamin 相互作用の制御

Drp1 のポリイオウ化-脱イオウ化サイクルによって活性が調節されるメカニズムとして filamin との相互作用に着目した。Drp1-filamin との相互作用はメチル水銀刺激依存的に上昇した。一方、Drp1 C624W ではメチル水銀依存的な filamin との相互作用が見られなかった。また、Drp1-filamin 相互作用を抑制するシルニジピン処置、さらには filamin 発現抑制によりメチル水銀誘導性のミトコンドリア分裂が抑制されたことから、Drp1 のポリイオウ化サイクルは filamin との相互作用調節を介して自身の活性を制御していることが明らかとなった。

(6) メチル水銀による心疾患リスクにおける Drp1 レドックス修飾の役割

メチル水銀曝露マウスでの圧負荷刺激脆弱性に Drp1 のポリイオウ化修飾が関与しているかを明らかにするために、メチル水銀曝露マウスに活性イオウを投与した。その結果、メチル水銀曝露マウスの心臓で見られる Drp1 の脱イオウ化および活性化は活性イオウの投与により抑制された (図 3A)。これと一致するように活性イオウ投与により、メチル水銀曝露マウスの圧負荷脆弱性は改善された (図 3B)。

ヒト iPS 心筋細胞を用いてメチル水銀曝露による物理刺激脆弱性について評価を行った。メチル水銀に曝露した iPS 心筋細胞は物理刺激に対して顕著に脆弱になることが明らかとなった。活性イオウを投与すると物理刺激脆弱性は改善された。また、シルニジピンで Drp1-filamin 相互作用を抑制したり、Drp1 のポリイオウ化ミミック体 C624W を導入しても物理刺激脆弱性が改善されたことから (図 3C)、メチル水銀による Drp1 脱イオウ化を介したミトコンドリア品質異常が心筋細胞の物理刺激脆弱性に関与することが明らかとなった。

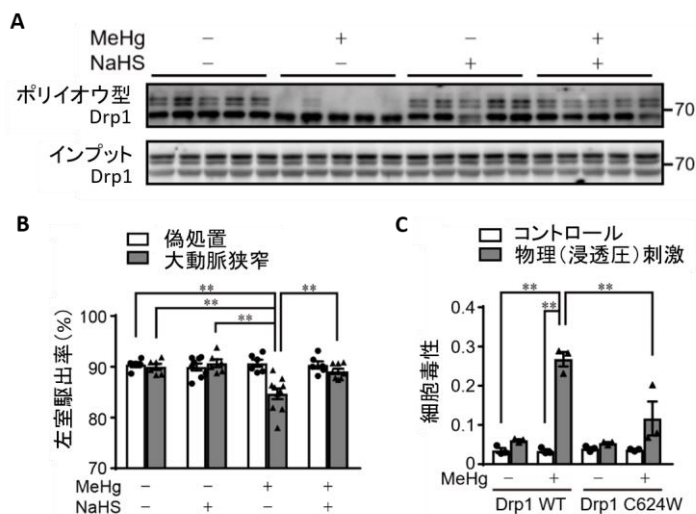


図3 活性イオウによるDrp1の脱イオウ化抑制と心疾患リスク改善効果 (A) 活性イオウ (NaHS) 投与マウスの心臓におけるDrp1のポリイオウ化。 (B) メチル水銀曝露マウスの圧負荷刺激脆弱性と活性イオウによる改善効果。 (C) メチル水銀曝露iPS心筋細胞の物理刺激脆弱性とDrp1ポリイオウ化ミミック体 (C624W) による改善効果。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. **Nishimura A.**, Shimoda K., Tanaka T., Toyama T., Nishiyama K., Shinkai Y., Numaga-Tomita T., Yamazaki D., Kanda Y., Akaike T., Kumagai Y., Nishida M. "Depolysulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload" *Science Signal*. Accepted (2019)
2. Nishiyama K., Numaga-Tomita T., Fujimoto Y., Tanaka T., Toyama T., **Nishimura A.**, Yamashita T., Matsunaga N., Koyanagi S., Azuma YT., Ibuki Y., Uchida K., Ohdo S., Nishida M. "Ibuprofen attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3-Nox2 protein complex" *Br. J. Pharmacol.* Accepted (2019)

3. Sudi SB., Tanaka T., Oda S., Nishiyama K., **Nishimura A.**, Sunggip C., Mangmool S., Numaga-Tomita T., Nishida M. “TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy” *Sci. Rep.* Accepted (2019)
4. Numaga-Tomita T., Shimauchi T., Oda S., Tanaka T., Nishiyama K., **Nishimura A.**, Birnbaumer L., Mori, Y., Nishida M. “TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential-dependent coupling with PTEN” *FASEB J.* In-press (2019)
5. **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.* 11, eaat5185 (2018) doi: 10.1126/scisignal.aat5185.
6. 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.* 138, 184 (2018) doi: 10.1016/j.jphs.2018.09.007.
7. Sunggip C., Shimoda K., Oda S., Tanaka T., Nishiyama K., Mangmool S., **Nishimura A.**, Numaga-Tomita T. and Nishida M. “TRPC5-eNOS axis negatively regulates ATP-induced cardiomyocyte hypertrophy” *Front. Pharmacol.* 9, 523 (2018) doi: 10.3389/fphar.2018.00523.
8. Akaike T., Ida T., Wei F-Y., Nishida M., Kumagai Y., Alam M.M., 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. “CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics” *Nature Commun.* 8, 1177 (2017) doi: 10.1038/s41467-017-01311-y.
9. Oda S., Numaga-Tomita T., Kitajima N., Toyama T., Harada E., Shimauchi T., **Nishimura A.**, Ishikawa T., Kumagai Y., Birnbaumer L. and Nishida M. “TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex leading to attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice” *Sci. Rep.* 8, 7511 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-07903-4.
10. 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. and Nishida M. “TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy” *JCI Insight* 2, e93358 (2017) doi: 10.1172/jci.insight.93358.
11. Phosri S., Arieyawong A., Bunrukchai K., Parichatikanond W., **Nishimura A.**, Nishida M. and Mangmool S. “Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and α -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway” *Front. Pharmacol.* 8, 428 (2017) doi: 10.3389/fphar.2017.00428.

[学会発表] (計 10 件)

1. **西村明幸**、田中智弘、下田翔、富田拓郎、西田基宏、Drp1-Filamin A 複合体によるミトコンドリア過剰分裂を介した心筋細胞の早期老化機構、第 35 回日本薬学会九州支部大会、2018. 11.
2. **西村明幸**、西山和宏、田中 智弘、富田拓郎、西田基宏、メチル水銀による心毒性と活性イオウ分子種による制御、メタルバイオサイエンス研究会 2018, 2018. 11.
3. **西村明幸**、島内司、田中智弘、下田翔、富田 拓郎、西田基宏、ミトコンドリアーアクチン細胞骨格連携による心筋細胞の早期老化機構、心血管膜輸送研究会 2018, 2018. 11.
4. **西村明幸**、田中智弘、富田拓郎、西田基宏、親電子物質と活性イオウによる心筋ミトコンドリアの品質管理、第 91 回日本生化学会大会、2018. 09.
5. **西村明幸**、島内司、田中智弘、富田拓郎、西田基宏、Drp1-Filamin A 相互作用による心筋ミトコンドリアの品質管理機構、第 71 回日本酸化ストレス学会/第 18 回日本 NO 学会合同学術集会、2018. 05.
6. **西村明幸**、田中智弘、富田拓郎、西田基宏、メチル水銀による心毒性と活性イオウ分子種による制御、日本薬学会 第 138 年会、2018. 03.
7. **西村明幸**、田中智弘、西山和宏、西田基宏、活性イオウによるミトコンドリア品質管理、日本薬学会 第 138 年会、2018. 03.
8. **西村明幸**、Caroline Sunggip、富田拓郎、西田基宏、加齢に伴う AT1R-P2Y6R 複合体によるアンジオテンシン II 誘発性高血圧の制御、生命科学系学会合同年次大会、2017. 12.
9. **西村明幸**、富田拓郎、西田基宏、メチル水銀による心筋ミトコンドリア品質管理の分子機構、メチル水銀研究会、2017. 12.
10. **西村明幸**、島内司、富田拓郎、西田基宏、Drp1-細胞骨格の相互作用による心筋ミトコンドリアの品質管理、オルガネラ研究会、2017. 06.

[図書] (計 1 件)

1. 西田基宏、**西村明幸**、下田翔、活性イオウによるミトコンドリア機能制御、実験医学 増刊、2018. 03.

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。