

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16527

研究課題名（和文）ミトコンドリア動態に着目した心臓の生理的・病的老化の共通基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Common Basis of Physiological and Pathological Aging of the Heart Focusing on Mitochondrial Dynamics

研究代表者

徳山 剛士（Tokuyama, Takeshi）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30808093

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）：ミトコンドリアは分裂と融合を通じて形態を調節し、生命の機能を支えている。過剰なミトコンドリア分裂はミトコンドリアの機能障害を引き起こし、細胞を損傷する。本研究は、ミトコンドリア内ユビキチンリガーゼMITOLが、ミトコンドリア分裂因子Drp1の分解を促進して形態を制御することを明らかにした。MITOLを心筋特異的に欠損させたマウスでは、心臓老化の徴候が見られた。また、MITOLの発現低下による細胞の老化は、Drp1の阻害で回復した。これらの結果から、MITOLの機能低下がミトコンドリアの形態異常を引き起こし老化を促進する可能性が示され、ミトコンドリアの形態調節と老化メカニズムに新たな洞察を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会の到来により加齢性疾患の根治が大きな問題となっている。哺乳類の老化の基本メカニズムは未だ不明瞭なところが多く、これらを生物学的根拠に基づいて明らかにし、老化回避の方策を開発することが必要である。本研究では「生理的老化」と「病的老化」の双方において、新しくミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLの機能低下がその上流に存在することを示した。また、ミトコンドリア形態調節がこれらの老化基盤を作ることを明らかにした。この成果は、新規にMITOLという分子が形態調節を通じて組織老化に関与すること、ミトコンドリアの形態異常は老化の病態基盤である可能性を示唆することに繋がり有益な知見となりうる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria regulate their shape through fission and fusion, and excessive fission can cause dysfunction and cell damage. This study explores how MITOL, a mitochondrial ubiquitin ligase, controls mitochondrial morphology by degrading the fission factor Drp1. Using mice with MITOL deletion in cardiomyocytes, we observed phenotypes of cardiac aging. Additionally, Drp1 inhibition alleviated cellular senescence related to MITOL reduction. These results suggest that impaired MITOL function can lead to abnormal mitochondrial morphology and accelerated aging, shedding light on the mechanisms behind mitochondrial morphology and aging.

研究分野：病態生理学

キーワード：ミトコンドリアダイナミクス 老化 心筋梗塞 MITOL / MARCH5 Drp1 遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会において、加齢性疾患の解決が急務となっている。これに取り組むために、哺乳類の個体レベルにおいて老化の根本的メカニズムを明らかにし、それに基づく老化対策を開発することが求められている。老化は、自然経過による「生理的老化」と病気による「病的老化」に大別される。これらは明確に区別されないが、類似の現れが見られ、共通の分子メカニズムが存在する可能性がある。ミトコンドリアの活性酸素による DNA やタンパク質の酸化損傷は老化の原因のひとつとされており、これを「細胞傷害説」としているが、哺乳動物におけるこのメカニズムの詳細な理解は未だ不十分である。近年、ミトコンドリアが融合と分裂を繰り返し、細胞内で積極的に動きながら、ATP の生成などの機能を維持していることが報告されている。しかし、組織レベルでのミトコンドリアの動きがどれほど重要なのかは、ほとんど理解されていない。これら不十分な知見にも関わらず、ミトコンドリアの生理学的意義についての議論が増えており、細胞と個体の間で多くの矛盾が浮かび上がっている。本研究は、組織レベルでミトコンドリアの動きが老化の制御にどのように重要であるかを解明し、この問題に取り組む。

MITOL/MARCH5 はミトコンドリアに特異的なユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリアの機能を維持するための重要な分子である。ミトコンドリアの動きは融合と分裂のバランスによって制御されるが、MITOL はミトコンドリアの分裂因子 Drp1 を分解し、酸化損傷を引き起こす過剰な分裂を防いでいる。MITOL の機能低下により、ミトコンドリアは異常に分裂し、機能異常を引き起こす。これまで、細胞レベルでの MITOL の機能に関して多くの研究が報告されているが、組織内での MITOL の生理的意義は依然として不明である。本研究では心臓組織に焦点を当て、MITOL 欠損を持つマウスを用いて研究を行った。

心不全は世界的に主要な死因であり、加齢に関連する疾患の一部である。心臓の老化は心不全の発症や悪化の根本原因であるため、心臓の生理的および病的な老化を解明することは、治療戦略の開発につながり、健康寿命の延長に寄与する可能性がある。さらに、心臓だけでなく、多くの加齢性疾患ではミトコンドリアの機能不全が密接に関与していることが知られている。従って、MITOL がミトコンドリアの動きを制御する機能と、それが加齢性疾患、特に心不全に及ぼす影響を理解することは極めて重要である。

2. 研究の目的

我々の研究室で発見されたユビキチンリガーゼである MITOL の役割を、細胞および組織レベルで詳細に解析することで、MITOL とミトコンドリア動態が組織老化においてどのような重要性を持っているのかを探る。さらに、心臓老化のメカニズムを解き明かすために、生理的な老化と病的な老化の過程で MITOL の働きや動きがどのように変化するのかを調査し、心臓老化を主導するミトコンドリア動態の役割とその背後にある分子メカニズムを特定する。これらの知見は、臓器の老化を抑制し、加齢に伴う疾患の予防に向けた新しい戦略を開発するための基盤となることを期待される。

3. 研究の方法

独自に開発した心臓特異的 MITOL 欠損マウスを使用し、MITOL の心機能に対する重要性を調査する(図1)。組織学から生理学まで多角的に評価する。また基質として考えられている Drp1 の阻害や活性変異体を使用して、MITOL と Drp1 の相互作用が心機能維持に重要であることを検証する。また、心筋梗塞が引き起こす心臓の病的老化に注目し、心筋梗塞の状況下での MITOL の役割とミトコンドリアの動態との相互関係を調査する。

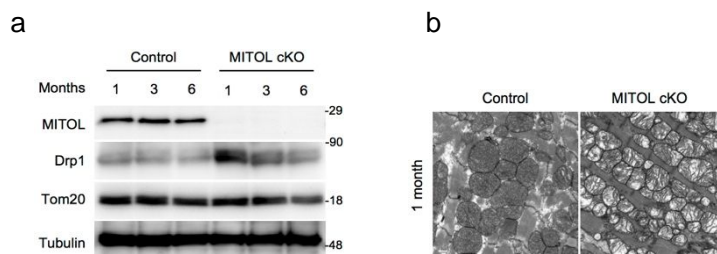


図1 心臓特異的 MITOL 欠損マウスにおける Drp1 の蓄積とミトコンドリアの形態異常

a: MITOL 欠損による心臓におけるミトコンドリア分裂因子 Drp1 の蓄積

b: MITOL 欠損によるミトコンドリアの形態異常 (電子顕微鏡観察)

4. 研究成果

① MITOL の欠損は心臓老化を亢進させる。

心筋特異的 MITOL 欠損マウスの心臓を解析したところ、心筋組織のミトコンドリアは呼吸活性が大幅に低下し、エネルギー生成が著しく減少していた。ミトコンドリアでの酸化タンパク質が増加し、活性酸素による損傷が増していることから、これが心筋老化を引き起こしている可能性を考えた。老化の指標である β -ガラクトシダーゼの染色を実施した結果、染色領域が増加しており（図 2a）、リポフスチンの広範な蓄積（図 2b）と線維化の進行（図 2c）も確認されました。このマウスは結果として心不全を発症し（図 2d）、6 ヶ月から 10 ヶ月の間に全て死亡した。

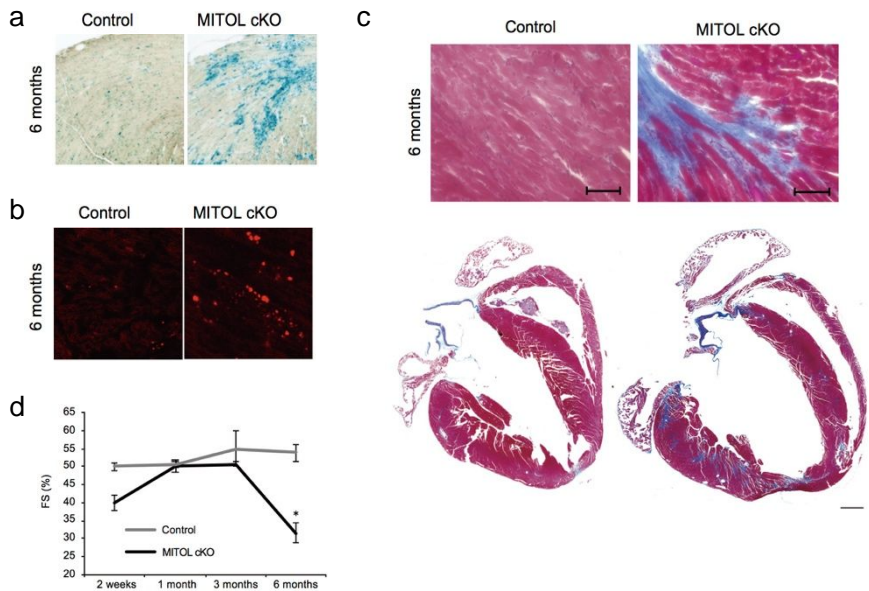


図 2 心筋特異的 MITOL 欠損による心臓老化の亢進と心不全の発症

a: MITOL 欠損による β -ガラクトシダーゼ（老化マーカー）染色領域の拡大

b: MITOL 欠損によるリポフスチンの沈着

c: MITOL 欠損による線維化の亢進（マッソントリクローム染色：コラーゲン結合組織繊維を検出）

d: MITOL 欠損による心不全の発症（FS%：左室内径短縮率%）

② Drp1 の阻害により MITOL 欠損による心不全が軽減する

ミトコンドリアの形態変化が Drp1 の蓄積によるものである可能性を検証するため、Drp1 の阻害剤 Mdivi-1 を投与した。結果、Drp1 のミトコンドリアへの移行が抑制され（図 3a）、 β -ガラクトシダーゼの染色領域（図 3b）と線維化領域（図 3c）が減少した。これらの結果から、Drp1 によるミトコンドリア形態の変化が心臓の老化を引き起こすことが示唆されました。したがって、MITOL が Drp1 を調節することで心臓の老化を抑え、MITOL の減少が Drp1 の活性化を促進し、酸化ストレスの増加を通じて心臓の老化と心不全が引き起こされていると考えた。

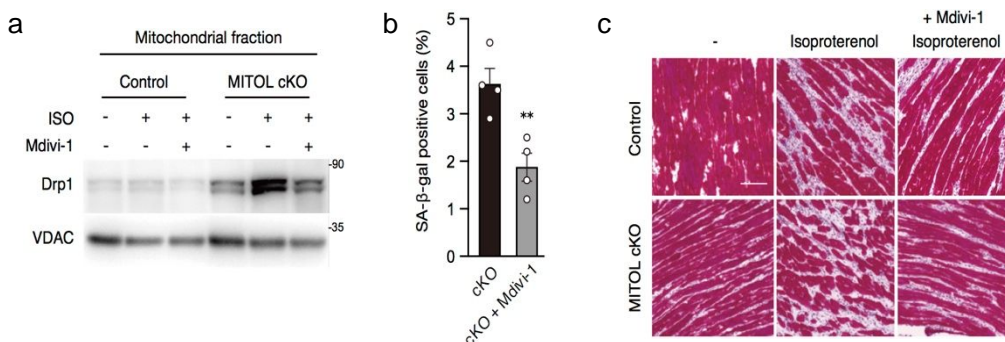


図 3 Drp1 阻害剤による心負荷 MITOL 欠損心筋の心臓老化の抑制および線維化領域減少

a: MITOL 欠損心筋においてイソプロテレノール心負荷誘導による Drp1 のミトコンドリア移行は、Drp1 阻害剤 Mdivi-1 の腹腔投与により有意に抑制される。

b, c: MITOL 欠損心筋において Drp1 阻害剤 Mdivi-1 の投与により心負荷誘導型の心臓老化（B, β -ガラクトシダーゼ染色）および線維化の亢進は有意に抑制される（C, マッソントリクローム染色）

③ 心筋梗塞心臓の梗塞部周辺領域において MITOL は発現低下している

心筋梗塞モデルのラットや心不全患者の心臓で、MITOL の大幅な減少が確認された (図 4)。これに基づき、心筋梗塞モデルラットに MITOL 遺伝子を導入する実験を行い、遺伝子治療を行った。MITOL 遺伝子を含むアデノ随伴ウイルスを用いて、心筋に MITOL の発現を増加させたところ、心筋梗塞の症状が著しく改善された (図 5)。これらの結果から、MITOL が Drp1 の調節を通じて虚血によるストレスから心筋細胞を守り、MITOL の減少が心筋梗塞に伴う心機能の障害と深く関連していることが示された。

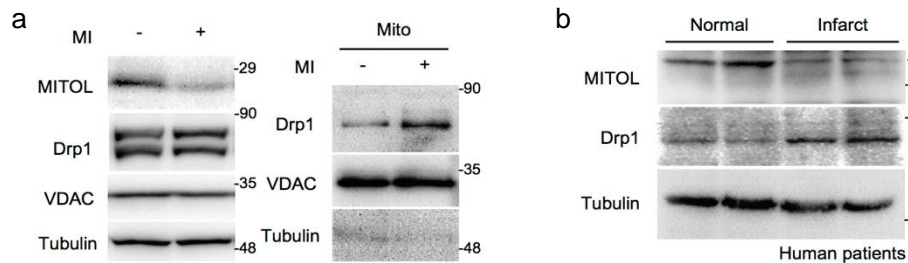


図 4 虚血ストレスによる MITOL 発現の低下

a: ラットの心筋梗塞モデルにおける MITOL の発現低下と Drp1 の増加。コントロールラットは sham 手術したもの。
b: ヒトの心筋梗塞患者の心筋における MITOL の発現低下と Drp1 の増加。コントロールは心臓に疾患のない心臓のサンプル。心筋梗塞患者の心筋サンプルは非梗塞部領域のもの。患者の年齢は全て 60 代半ばのものを使用。

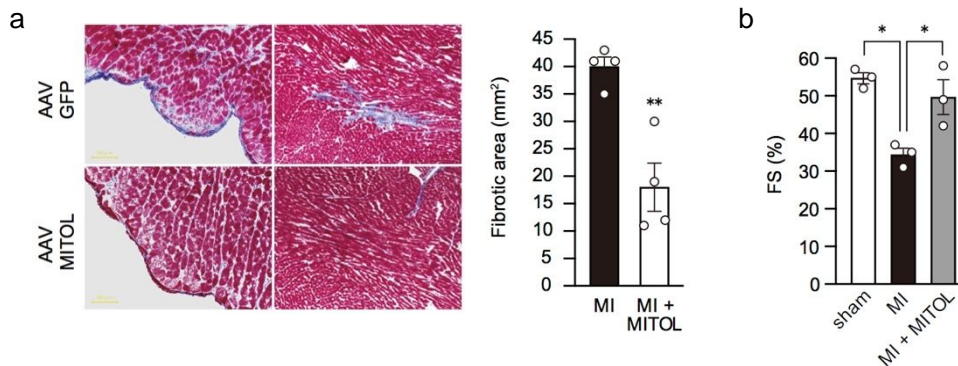


図 5 MITOL 遺伝子ベクターによる心筋梗塞の病態改善

a: 心筋梗塞モデルマウスの術後 2 日目にアデノ随伴ウイルスに MITOL ベクターを直接注入し、心筋特異的に MITOL の発現を増加させると繊維化が有意に抑制された。ウイルス注入後 14 日目にサンプルを調整し解析した。
b: MITOL 遺伝子ベクターにより心筋梗塞の誘導による心機能の低下も顕著に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiiba Isshin, Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Ito Naoki, Tokuyama Takeshi, Yamashita Shun Ichi, Kanki Tomotake, Komatsu Toru, Urano Yasuteru, Fujikawa Yuuta, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 22
2. 論文標題 MITOL promotes cell survival by degrading Parkin during mitophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201949097	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 Tokuyama Takeshi, Ahmed Razan Elfadil, Chanthra Nawin, Anzai Tatsuya, Uosaki Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Disease Modeling of Mitochondrial Cardiomyopathy Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 981 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10100981	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 Kitakata H, Endo J, Matsushima H, Yamamoto S, Ikura H, Hirai A, Koh S, Ichihara G, Hiraide T, Moriyama H, Shirakawa K, Goto S, Katsumata Y, Anzai A, Kataoka M, Tokuyama T, Ishido S, Yanagi S, Fukuda K, Sano M.	4. 巻 161
2. 論文標題 MITOL/MARCH5 determines the susceptibility of cardiomyocytes to doxorubicin-induced ferroptosis by regulating GSH homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.08.006	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 Takeshi T, Hideki U, Ayumu S, Gen N, Keisuke T, Shun N, Isshin S, Naoki I, Taku A, Satoshi M, Akiyuki N, Motohiro N, Ayumu K, Hirokazu H, Satoshi I, Takahiro Y, Takayuki S, Shingo T, Shintaro K, Ryoko I and Shigeru Y	4. 巻 in press
2. 論文標題 Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
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 Tokuyama Takeshi, Hirai Asei, Shiiba Isshin, Ito Naoki, Matsuno Keigo, Takeda Keisuke, Saito Kanata, Mii Koki, Matsushita Nobuko, Fukuda Toshifumi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial Dynamics Regulation in Skin Fibroblasts from Mitochondrial Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 450 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10030450	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 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Shiiba Isshin, Higashi Mizuho, Fukuda Toshifumi, Tokuyama Takeshi, Matsushita Nobuko, Nagano Seiichi, Araki Toshiyuki, Kaneko Mari, Shioi Go, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin- 3/AGAP3, in ELK1-dependent SRF activation at PML bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56559-9	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 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Ohno Nobuhiko, Ishido Satoshi, Aoki Motohide, Saitoh Yurika, Takada Takumi, Tokuyama Takeshi, Sugiura Ayumu, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 2
2. 論文標題 MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900308	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 Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Shiiba Isshin, Uda Aoi, Tokuyama Takeshi, Ito Naoki, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Ishido Satoshi, Iwawaki Takao, Uehara Takashi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress induced apoptosis by 1 ubiquitylation at ER ?mitochondria contact sites IRE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2018100999	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 徳山剛士
2. 発表標題 Protective roles of MITOL in ischemic heart disease and heart aging partly via Drp1 regulation
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] –&– The 19th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine[J-mit]（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 徳山 剛士, 安済 達也, 魚崎 英毅	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 -
3. 書名 小児内科	

1. 著者名 柳 茂	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 -
3. 書名 ミトコンドリアと疾患・老化	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------