

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17079

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNA蓄積が関与する心不全メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of heart failure involving mitochondrial DNA accumulation

研究代表者

上田 宏達 (Ueda, Hiromichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30865746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全において心筋細胞への蓄積がみとめられるミトコンドリアDNAの分解酵素であるDNaseIIに関し、その活性低下が遺伝子発現量低下に起因するところが明らかになった。この遺伝子発現はマイクロRNAによる調節を受けるとの仮説に基づき、その候補を同定し、さらにこれら候補がヒトの不全心筋組織において存在することが確認できた。microRNAを低下させ、DNaseIIの活性を増強することによる心不全予防効果を検討したが、その十分な効果を確認するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋症や心不全においても認められる炎症は病態形成において重要な役割を果たすが、本仮説(ミトコンドリアDNA蓄積に由来する無菌的な自然免疫応答がこの病態の一因である)に基づいたまったく新しい心不全治療戦略を検討した。ミトコンドリアDNA分解に関わる分子(DNaseII)の心臓での発現動態を理解しこれを制御することにより、心臓の炎症制御から心不全を予防することを目指し、動物モデルを用いて本仮説の検証をおこなった。

研究成果の概要(英文)：With regard to DNase II, an enzyme that degrades mitochondrial DNA, which is found to accumulate in cardiomyocytes in heart failure, it has been clarified that the decrease in activity is due to the decrease in gene expression level. Based on a hypothesis that the gene expression is regulated by some microRNAs, we identified the candidates and confirmed that these candidates exist in human myocardial tissue of heart failure. The prophylactic effect of heart failure by lowering microRNA and enhancing the activity of DNase II was studied, but it was not enough to confirm its sufficient effect.

研究分野：心不全

キーワード：ミトコンドリアDNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋炎などの炎症を直接の病態とする疾患だけでなく、心筋症や心不全においても炎症細胞の心筋組織浸潤が認められる症例が報告されており、炎症は心筋症や心不全の病態形成において重要な役割を果たすことが知られている。心不全を対象とした抗TNA α 抗体を用いた臨床試験では、心不全の予後改善は得られなかった。これには心不全で生じる炎症が、複数のサイトカインや炎症細胞が複合的に関与する病態であり、一つのサイトカインを標的とした治療が病態制御には不十分であったことが一因と考えられ、心不全における新たな心不全治療が求められる。

2. 研究の目的

本研究では心筋細胞において単一の炎症性サイトカインではなく、複数の炎症性サイトカイン上昇に関与する、ミトコンドリアDNA蓄積に由来する無菌的な自然免疫答に関わる分子機構の解明と、これへの介入がもたらす心不全治療効果を検証すること、具体的には心筋細胞に心不全期に蓄積するミトコンドリアDNA蓄積する病態機序の理解とその制御を通して、心臓の炎症を軽減する心不全治療を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 雄性C57BL/6Jマウスの横行大動脈縮窄(TAC)を施行すると、TAC1週間後には心機能低下は来たさず心臓重量が増加する「心肥大」を呈し、TAC4週間後には心機能低下が現れ「心不全」を呈することが明らかになった。肥大心および不全心を用いて、その破碎組織を用いて、ミトコンドリアDNA分解をになうDNase I I活性は活性測定法(SRED法)を用いて定量化した。また、同サンプルを用いて、RT-PCR法により、mRNA発現量を定量化した。

(2) DNase I Iの心不全に至る過程における発現動態を説明するため、心不全期においてDNase I IのmRNAを分解する機能を有するmiRNAの発現増加があるとの仮説をたて、miRNAのスクリーニングを行った。まずヒトのDNase I Iの3' UTR領域を蛍光タンパク質EGFPの下流に組み込んだプラスミドを作成した。ヒトmiRNAライブラリー(約3000種)の内それぞれを、このプラスミドとともに、HEK293A細胞に遺伝子導入を行った。この方法では、DNase I Iの3' UTRに結合するmiRNAは細胞内でmRNAを分解しEGFPの蛍光発現を減弱することから、この実験系を用いて網羅的にスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) DNase I I活性は心肥大期には増加が認められるが、心不全期には低下が認められた。mRNA発現量は肥大期には増加を認め、心不全期に低下を来すことから、その活性はmRNAレベルで制御されることが示唆された。

(2) 上記スクリーニング法を用いて抽出された候補のうち、マウスにおいても同定されているmiRNAであり、さらにマウス心において心肥大期ではmiRNAの増加がなく心不全期に増加が認められる2種類の候補を同定した。

(3) つぎに重症ヒト心不全サンプルを用いて、2種類のmiRNAの発現量およびDNase I I発現量をRT-PCRにより確認し、1種類のmiRNAは不全心において増加が認められるものの、一方はヒト心臓ではPCRによる増幅が得られなかった。また、不全心においてはDNase I Iの発現は非不全心に比し低下が認められることが明らかになった。

(4) ヒト心臓薄切切片に対し、蛍光免疫組織化学法を用いて染色した結果、RT-PCRで増幅が認められたmiRNAは心臓での局在が確認できたが、もう一方は局在が認められなかった。(3)の結果とあわせると、ヒト心臓組織には発現が認められないmiRNAであると判断した。

(5) 同定したmiRNAのIn vitroでのDNase I I抑制機能を確認するため、マウス筋芽細胞(C2C12細胞)にmiRNAを遺伝子導入すると、DNase I Iの抑制が認められた。

(6) 心筋細胞特異的にDNase I Iを強制発現する、遺伝子改変マウスを作成した。本遺伝子改変マウスの心臓にはDNase I Iの発現増強が認められ、SRED法においても活性の増強が認められた。また、スクロース分画法を用いて分画した心臓組織において、ミトコンドリ

ア分画においてDNase I Iが多く認められた。この遺伝子改変マウスに対しTACを施行し、4週後の表現形を確認した。遺伝子改変マウスは対照マウスに対し心重量、肺重量とも低値であった。また心臓組織において、炎症細胞の浸潤や線維化が少ないことが明らかになった。したがってDNase I Iの強制発現は心筋保護的作用を示すことが示唆された。

(7)心不全期にmiRNA同定したmiRNAに結合する遺伝子配列(Anti-miR配列)を2つ有する人工的核酸分子miR-decoyを設計し、これを心筋細胞に恒常的に強制発現させるAAV9(AAV9-miR-decoy)を作成し、InVivo実験で必要なコピー数を得ることができた。野生型マウスに対し術前にAAV9-miR-decoyを静脈内投与しmiR-decoyを心筋細胞に強制発現することで、TACに伴う心不全増悪抑制が認められるかを検討した。AAV投与時期や投与量を最適化したが、目的のmiRNAの十分な発現抑制が得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------