

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号： 34306
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 平成 21 年度～ 平成 23 年度
 課題番号： 21590942
 研究課題名（和文） 心疾患におけるミトファジーの病態生理学的意義の検討、および治療への応用
 研究課題名（英文） Role of mitophagy in cardiac failure and possibility of application to treatment
 研究代表者
 小原 幸 (KOBARA MIYUKI)
 京都薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号： 80275198

研究成果の概要（和文）：培養心筋細胞において各種心不全関連心筋障害因子の中で、代謝障害刺激や angiotensin II がミトコンドリア由来活性酸素産生を増強し、ミトファジーを誘導させた。また、分子標的抗ガン薬であるイマチニブもミトファジーを誘導していた。イマチニブ誘導心不全、及び虚血性心不全モデルにおける検討で、ミトファジー/オートファジー阻害は心筋障害を増強し、心機能低下につながり、ミトファジーは心筋保護的に働くことを見出した。

研究成果の概要（英文）： Among heart failure-related factors, metabolic inhibition and angiotensin II induce mitophagy via mitochondrial superoxide production, and imatinib, a therapeutic agent for chronic myelogenous leukemia, also induce mitophagy. The inhibition of mitophagy/autophagy exacerbates myocardial injury and cardiac dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋細胞、ミトファジー、心不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全は、さまざまな心疾患の終末像であり、心不全患者の予後改善は重要なテーマである。不全心において自己再生能力の低い心筋細胞の死は、収縮能の低下につながり心不全の病態進展に多大な関与をする。

(2) オートファジーとは自食作用の意で、真核生物が飢餓の際に細胞内小器官をアミノ酸レベルにまで分解、再利用し細胞死を防ぐ機構であるが、ある種の疾患においてはオートファジー性細胞死が認められると報告さ

れている。また近年不全心筋においてもその存在が報告されている。

(3) オートファジーは細胞内小器官を無差別に分解・再利用する系であるが、最近ミトコンドリアを特異的にターゲットとする特異的オートファジーが見出され、ミトファジーと呼ばれている。ミトファジーの概念は最近報告されたもので、その制御に関する報告はほとんどなく、心不全における病態生理学的意義につき今回検討した。

2. 研究の目的

- (1) 新生仔ラット/マウス培養心筋細胞を用いて、不全心筋に障害性に働く神経体液性因子や物理的刺激(虚血、サイトカイン刺激、酸化障害、心毒性の報告されている抗がん剤等)が誘導するミトコンドリア障害の程度、及びミトファジーの出現の程度を検討する。
- (2) ミトファジーが細胞保護的あるいは障害的、いずれに働くかを検討するため、オートファジー阻害薬である 3 methyl adenine (3MA)、ミトファジー阻害薬であるクロロキンを用い、その心筋障害への寄与度を検討する。
- (3) さらにミトファジーを誘導し得た因子より、その誘導及び抑制に関与する細胞内シグナルを検索する。
- (4) *in vitro* での検討結果をもとにミトファジー誘導が予測される *in vivo* 心不全モデル(心筋梗塞モデル、圧負荷心肥大・心不全モデル、薬剤誘発性心筋症モデル)を用いて、心臓でのミトファジー出現の有無、及びその程度を検証する。さらにミトファジーを特異的に引き起こすモデルにおいてミトファジーを抑制し、ミトファジーの心不全における役割を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 新生仔 Wistar ラット/C57/b16 マウス心筋細胞を培養した。神経体液性因子として angiotensin II (1 - 100 nmol/L)、endothelin (10-1000 pmol/L)、TNF α (10 ng/mL) を投与し、オートファジーの誘導を LC3-II、及び cathepsin D 発現で検討した。
- (2) 心筋障害性抗腫瘍薬であるイマチニブ (1-10 μ mol/L)、虚血を模した代謝障害(グルコース未含有、O₂ 1%) 刺激も行い検討した。
- (3) 各刺激下におけるミトコンドリア障害をミトコンドリア ROS 産生 (MitoSOX Red)、ミトコンドリア膜電位指示薬 (JC1) を用いて検討した。
- (4) オートファゴソームを示す LC3-II、ROS 産生ミトコンドリアを示す MitoSOX Red、リソソームを示す LysoTracker を染色し、colocalize によりミトファジーを検出した。さらにミトファジーの指標とされる Parkin の発現も Western blot で検討した。
- (5) *in vivo* 心不全モデルによる検討として、C57/b16 マウスを用い、イマチニブ心不全モデル、及び心筋梗塞モデルを作成した。オートファジー阻害薬 (3MA)、ミトファジー阻害薬 (クロロキン) 投与による心筋障害・心機能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) ① angiotensin II 及び endothelin は時間、及び濃度依存性に LC3-II 発現、及び cathepsin D 発現を増強させた。一方 TNF α

はむしろ LC3-II 発現を減弱させる傾向にあった。

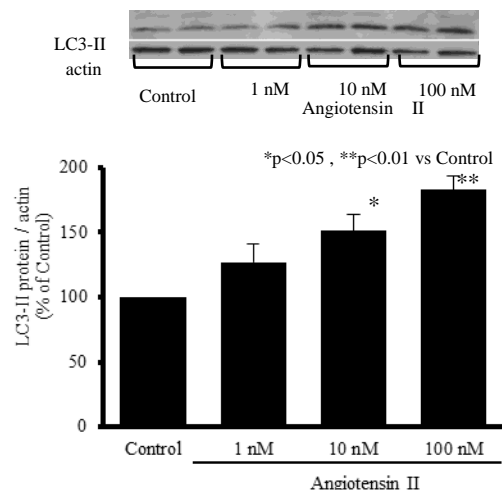


図1 angiotensinII による心筋オートファジー誘導

- ② オートファジー誘導に ROS が関与するという既報を参考に、LC3-II 発現に対する各種 ROS 産生源の阻害薬の影響を検討した (NADPH oxidase 阻害薬: apocynin、ミトコンドリア ROS 阻害薬: butylated hydroxyanisole (BHA)、xanthin oxidase 阻害薬: アロプリノール)。Angiotensin II による LC3-II 発現増強は apocynin 及び BHA で、endothelin による LC3-II 発現は apocynin のみで抑制された。

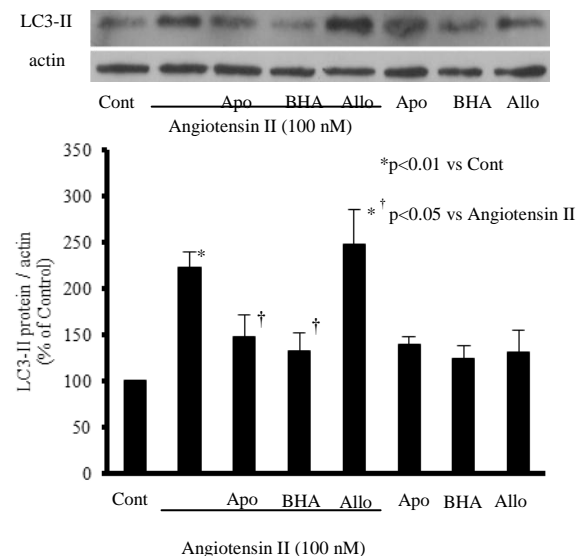


図2 angiotensinII 誘導性 LC3-II 発現に対する、ROS 産生阻害薬の影響

- ③ さらに angiotensin II はミトコンドリア ROS 産生を増強し、この反応は NADPH oxidase 依存性であることが確認された。

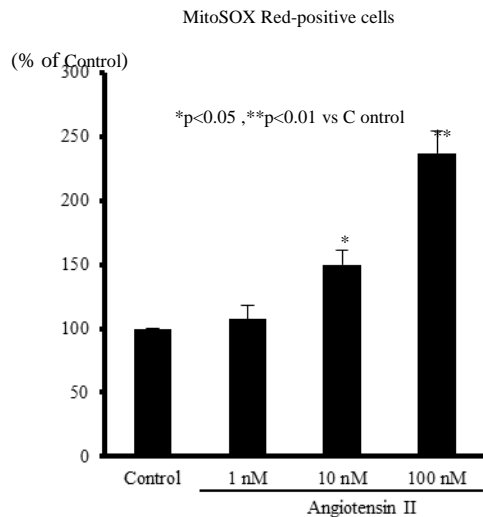


図3 angiotensin II によるミトコンドリア ROS 産生

④Angiotensin II による ROS 産生ミトコンドリアと LC3-II、あるいは LysoTracker Green との colocalize が認められ、Mitophagy を誘導していると考えられた。

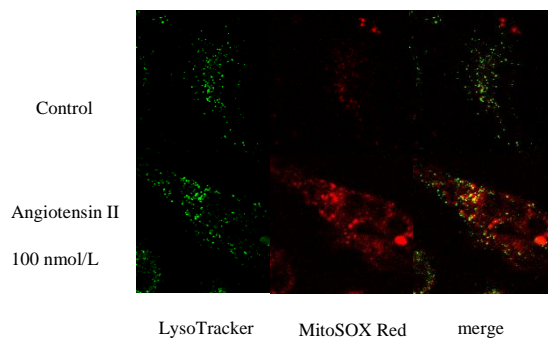


図4 Angiotensin II 誘導性 ROS 産生ミトコンドリアとリソソームの発現部位

(2) ① イマチニブも LC3-II、cathepsin D 発現を増強させた。細胞内 ROS 産生増加も来し、ROS 産生源としてミトコンドリアが主であることを見出した。しかし、各種 ROS 産生阻害薬による LC3-II 発現への影響は、有意ではなかった。

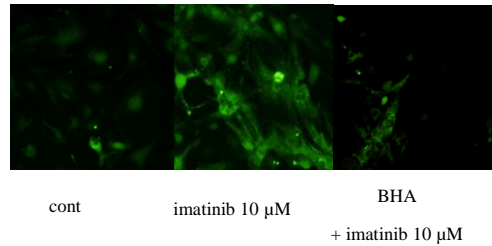
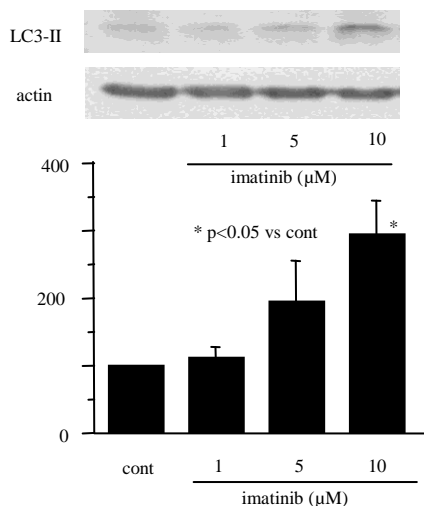


図5 イマチニブによる LC3-II 発現増強及び細胞内 ROS 産生

② MitoSOX Red と LC3 との colocalize を一部に認めた。さらに、Parkin 発現は imatinib 刺激により増強しており、一部 mitophagy を誘導していると考えられた。

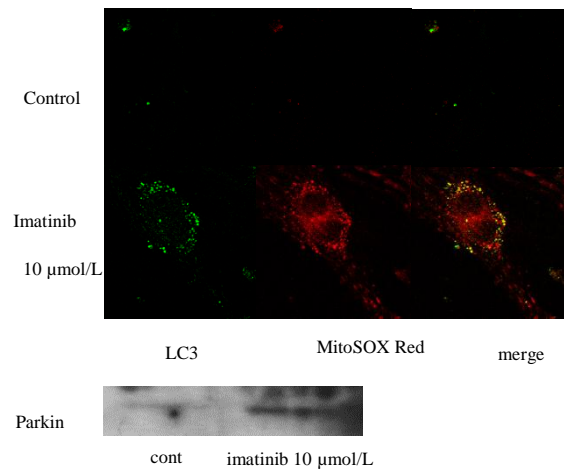


図6 イマチニブ誘導性 ROS 産生ミトコンドリアとオートファゴソーム発現部位及び Parkin 発現

(3) 代謝障害も同様に LC3-II 発現を増強し、ミトファジーに伴い増加する BNIP3 の増加を伴った。また、この現象はミトコンドリア由来 ROS の阻害、p53・Tigar の阻害により減弱を来し、虚血により増強が報告されているこれらシグナル経路がミトファジー誘導に関与していることを見出した。

(4) ① イマチニブ慢性投与マウスを作製し、心機能低下、心筋細胞アポトーシス、及び LC3-II 発現増強を確認した。このモデルに 3MA を併用投与したところ、心機能のさらなる悪化及びアポトーシスの増加が認められた。

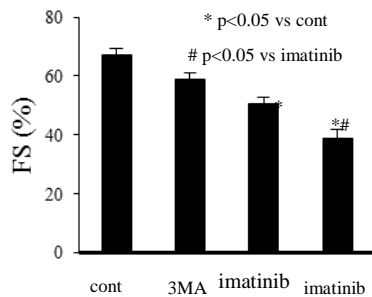


図7 オートファジー/ミト^{+3MA}ファジー阻害による心機能に対する影響。

② 左冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作成し、心機能低下、LC3-II・BNIP3 発現増強を確認した。In vitro の結果を受け p53 ノックアウトマウスに虚血を行うと、ミトファジー増強を介して心保護に働き、クロロキンを作用させると、保護作用が消失することが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Noda K, Kobara M, et.al. Additive amelioration of oxidative stress and cardiac function by combined mineralocorticoid and angiotensin receptor blockers in post-infarct failing hearts. J Cardiovasc Pharmacol. 2012 in press. 査読あり
- 2) Hoshino A, Matoba S, et.al. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. J Mol Cell Cardiol. 2012 ;52:175-84. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.10.008 査読あり
- 3) Kobara M, Noda K, et.al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. Cardiovasc Res. 2010;87:424-30. DOI: 10.1093/cvr/cvq078 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Kobara M, Tsujimoto S, et.al. Angiotensin II Induces Autophagy in Cardiac Myocytes via Reactive Oxygen Species Production. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2012年3月16日、福岡。
- 2) Kobara M, Tsujimoto S, et.al. Role of Autophagy in Imatinib-Mediated Cardiac Toxicity. 第28回 ISHR 日本部会総会。2011年12月3日、東京。

- 3) Kobara M, Noda K, et.al. Eicosapentaenoic Acid Preserves Mitochondrial Fusion Protein OPA-1 and Oxidative Phosphorylation in Failing Myocardium after Myocardial Infarction. Scientific Session 2011, American Heart Association, 2011年11月14日、Orlando, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 幸 (KOBARA MIYUKI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80275198

(2) 研究分担者

的場 聖明 (MATOBA SATOAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：10305576

(3) 連携研究者

()

研究者番号：