

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790733

研究課題名（和文）心不全におけるミトコンドリアDNAの細胞内分子機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the underlying molecular mechanisms of mitochondrial DNA and hear failure

研究代表者

井手 友美（IDE TOMOMI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90380625

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1) ミトコンドリア DNA のコピー数の制御が重要であるのか否かについて明らかにし、2) ミトコンドリア DNA のコピー数の変化が細胞内ストレスに対してどのようなネットワークで核への情報伝達が可能となるのか、さらには、3) ミトコンドリア DNA を後天的に増加させる方法の確立を目的とした。

まず、ミトコンドリア DNA コピー数の制御が重要であることの証明のために、Twinkle 過剰発現マウスを用いて、リモデリング抑制されているかどうかを検証した。ミトコンドリア DNA ヘリカーゼである Twinkle の過剰発現により、心筋梗塞後のリモデリングが抑制され、TFAM 過剰発現と同様に心筋梗塞後生存率が著しく改善した。しかし、これらのマウス心筋のミトコンドリア DNA の転写、および複製は TFAM マウスで抑制されていたのに対し、Twinkle マウスでは、転写複製が増加していることが明らかとなった。これらの結果から、心筋の抗リモデリング作用に関するものは、ミトコンドリア DNA の量であることが示された。さらに申請者は、ラット心筋細胞にリコンビナント Tfam を投与することで、直接細胞内特にミトコンドリアに取り込まれ、その結果、ミトコンドリア DNA が増加することを明らかにした。一方、アンジオテンシン II およびエンドセリン-1 の刺激に対する NFAT の活性化の測定系によって、肥大シグナルを仔ラット心筋細胞に付加することにより、NFAT が活性化すること、TFAM 導入によりミトコンドリア DNA を増加（～1.8 倍）した状態では、これらの NFAT 活性化がほぼ完全に抑制され、その下流である MCIP の発現も低下、さらにファロイジン染色により細胞肥大も抑制されることが示された。以上の結果から、TFAM 導入によるミトコンドリア DNA の増加は、肥大シグナルに対する NFAT の活性化を抑制することで抗リモデリング効果を発揮していることが明らかとなり、リコンビナント TFAM は今後新たな心不全治療手段として可能性を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we aimed to the three points;

- 1) To determine whether mitochondrial DNA copy number is a direct factor for the regulation of remodeling after myocardial infarction.
- 2) To clarify the underlying mechanisms how the copy number of mitochondrial DNA regulate intercellular remodeling signal induced by Angiotensin II or endotheline-1.

3) To establish a method to increase mitochondrial DNA.

First of all, it was verified whether the cardiac remodeling is ameliorated by using Twinkle overexpression to determine the role of mitochondria DNA. Overexpression of Twinkle, a mitochondrial DNA helicase, suppressed cardiac remodeling after myocardial infarction as well as Tfam transgenic mice. As a result, the survival rate of mice after infarction was dramatically improved just as observed in Tfam mice. However, the transcription and replication of mitochondria DNA is decreased in Tfam transgenic mice whereas increased in Twinkle transgenic mice. From those data, we speculated the importance and the impact of mitochondria DNA copy number as a protector against cardiac remodeling. In order to establish a method to increase mitochondria DNA by exogenously administered Tfam, we prepared recombinant human TFAM protein by GST fusion gene purification protocol. Recombinant TFAM was recruited into mitochondria of cardiac myocytes, and there were no morphological changes in mitochondria observed by electron microscopy.

A treatment with TFAM dose-dependently increased the mtDNA copy number maximum about 2-folds, and inhibited mitochondrial reactive oxygen species generation.

Next, we examined Tfam and increased mitochondria DNA on the intracellular signaling for pathological cardiac hypertrophy and remodeling.

Next we investigated the effects of TFAM on the nuclear factor of activated T cell (NFAT) signaling, which is a major transcriptional factor regulating pathological hypertrophy and remodeling. TFAM inhibited NFAT nuclear translocation induced by angiotensin II (AngII) and endothelin 1 (ET-1) significantly. TFAM also suppressed AngII and ET-1-induced NFAT transcriptional activity and NFAT-dependent gene expression. Finally TFAM inhibited subsequent morphological hypertrophy of cardiac myocytes induced by AngII and ET-1. In addition, intravenously administered recombinant TFAM was recruited into the myocardium in mice, and increased the myocardial mtDNA copy number about 1.8-folds. **Conclusion:** Recombinant TFAM increases the mtDNA copy number, and attenuates AngII and ET-1-induced hypertrophy of cardiac myocytes via inhibiting NFAT signaling. Recombinant TFAM might be useful as a novel therapeutic strategy for cardiac hypertrophy and failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科学

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：ミトコンドリア リモデリング NFAT 心不全 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

種々の治療法の開発・発展によって、慢性

心不全の予後は改善してきている。しかしながら、重症例の予後は未だに不良であり、患者の高齢化、急性期治療の発達により、その

罹患率は増加の一途をたどっている。患者の多くは心不全増悪による入院を反復し、QOLは著しく障害され、最終的には死に至り、医療経済においても今後負担が増え続けることが予想される。心不全の病態形成に関与する心筋リモデリングの基盤的な分子機序のさらなる解明とそれに基づく新たな治療法の開発は、重要な研究課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、下記の3点を主たる目的とする。

- 1) ミトコンドリア DNA のコピー数の制御が重要であるのか否かについて明らかにする。
- 2) ミトコンドリア DNA のコピー数の変化が細胞内ストレスに対してどのようなネットワークで核への情報伝達が可能となり、抗リモデリングに作用するのかを明らかにする。
- 3) ミトコンドリア DNA を後天的に増加させる方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) Twinkle の過剰発現による心筋リモデリングの解析

マウスは心筋梗塞後4週間経過したのちに、生存率を解析し、生存していたマウスについては、心エコー、圧データおよび組織像について観察を行った。

(2) リコンビナント Tfam タンパクの精製
GST でラベルした immature および mature form Tfam を精製した。

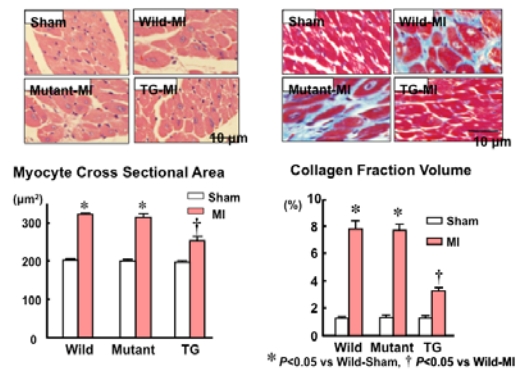
(3) 心筋細胞ミトコンドリア DNA の細胞内ネットワーク応答の解析

培養ラット心筋細胞への Tfam 導入による mtDNA 増加によって、Angiotensin II (Ang-II) および Endothelin-1 (ET-1) に対す

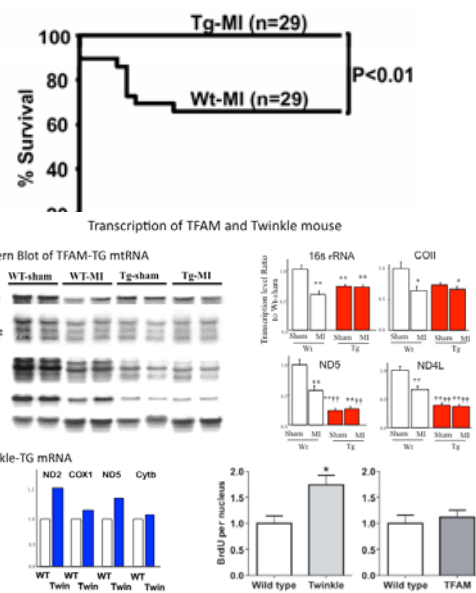
る細胞内応答について明らかにした。

4. 研究成果

(1) Twinkle 過剰発現マウスにおける心筋梗塞後リモデリング評価



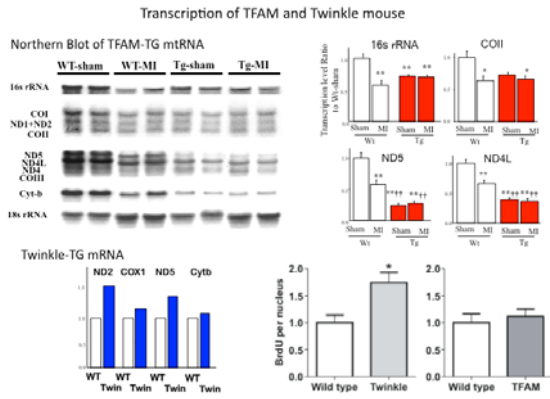
Twinkle 過剰発現マウスに、心筋梗塞を作成したところ、心筋組織において心筋細胞の肥大および間質の繊維化は有意に抑制され、(上図) その予後は、Tfam マウス同様に劇的に改善した (下図)



Twinkle および Tfam の過剰発現マウスにおける心筋での mtDNA の転写は、Twinkle で増加し、Tfam では、不変~やや減少していた。

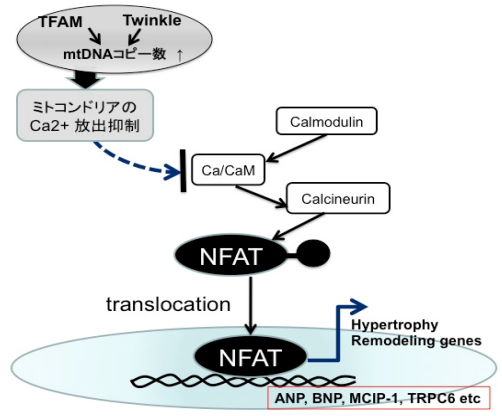
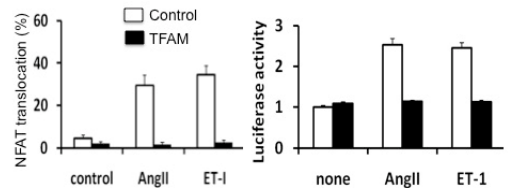
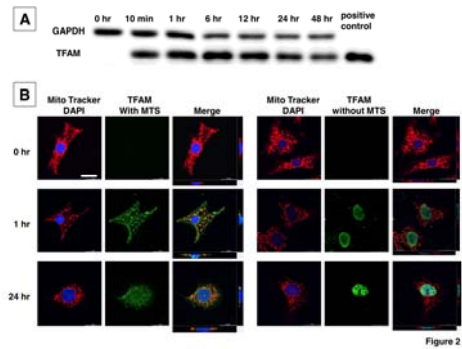
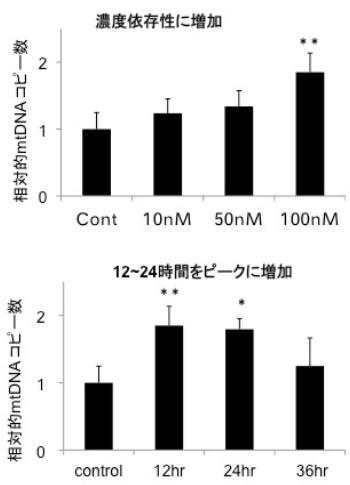
(次図)

これらの結果より、Tfam と Twinkle は、全く異なる機序により mtDNA を増加しているが、その表現系である抗リモデリング作用は共通していることが示された。



(2) リコンビナント Tfam による細胞内のリモデリングシグナルへの影響

リコンビナント Tfam を作成し、心筋細胞培養液に添加したところ、細胞内（一部はミト



コンドリア) 内に局在し、12-24 時間をピークに mtDNA コピー数の増加を認めた。

さらに、それらは、上図に示すように、Ang-II および ET-1 による NFAT の活性化を抑制することが明らかとなり、mtDNA の増加が、細胞内肥大およびリモデリングのシグナルに関与していることが示された。

また、今後は、さらにリコンビナント Tfam の実用化にむけた研究が必要である。

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 2 件)

1. Yikallio E, Tyyismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A: High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. Hum Mol Genom, 16: 2695-2705, 2010
2. Yikallio E, Ylikallio E, Page JL, Xu X, Lampinen M, Bepler G, Ide T,

Tynysmaa H, Weiss RS, Suomalainen A: Ribonucleotide reductase is not limiting for mitochondrial DNA copy number in mice. *Nucleic Acids Res* 38; 8208-8218, 2010

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Ide T,
Mitochondrial DNA and cellular homeostasis in failing myocardium
第 14 回日本心不全学会学術集会 2010 年 10 月 7 日-9 日 東京
(シンポジウム)
2. Ide T, Ando M, Tsutsumi T, Sunagawa K:
Vagal nerve stimulation as a strategy for cardiovascular disease
The Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka Sep 23-25, 2010 (Symposium)
3. 井手友美 :
心不全におけるミトコンドリアの役割
第 18 回北海道カルディアックセミナー
札幌グランドホテル
2010 年 10 月 23 日 (特別講演)
4. Ide T
The role of mitochondrial transcriptional factor A in mtDNA and in mice
7th ASMRM (Asian symposium of Mitochondrial Research and Medicine) and 10th J-mit (Japanese Mitochondrial Research and Medicine), Fukuoka, December 16 (Thu)-18(Sat), 2010 (Symposium)

〔図書〕 (計 4 件)

1. 井手友美 筒井裕之 ミトコンドリア異常による心不全 医学のあゆみ (第 5 土曜特集) 心不全 研究と臨床の最前線 392-396, 2010
2. 井手友美 心筋リモデリング 循環器臨床サピア 7. CKD と心血管病を理解する 中山書店 115-119, 2010
3. 井手友美 筒井裕之 老化と酸化ストレス 脳心血管抗加齢研究会機関誌「Anti-aging Science」メディカルレビュー社 Vol.2 (1) ;158-160 メディカルビュー社, 2010
4. 井手友美 Expertise: ミトコンドリアと酸化ストレス Heart View 10 月号, 2010
6. 研究組織
(1) 研究代表者
井手友美 (IDE TOMOMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 9 0 3 8 0 6 2 5