

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02913

研究課題名（和文）ミトコンドリア分解制御機構の解明と心不全創薬への応用

研究課題名（英文）Elucidation of mitochondrial degradation mechanisms and their application to drug development for heart failure

研究代表者

大津 欣也（Kinya, Otsu）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・理事長

研究者番号：20294051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ミトコンドリアの品質維持を担うマイトファジーやミトコンドリアDNAのメチル化制御機構及びそれに続く炎症を制御し、心不全治療に結び付けるべく、それらの分子機構を解明することを目的とした。我々が同定したBcl2-L-13が圧負荷心においてもマイトファジー及びミトコンドリア分裂を制御し、心臓のストレス応答に重要であることを示した他、ミトコンドリアDNAのメチル化制御機構については、圧負荷心におけるメチル化の変化を検出することに成功した。ミトコンドリアDNA分解不全に対しては、DNA分解酵素を抑制するmicroRNAを同定し、心不全モデルマウスへのオリゴDNA製剤投与実験を行うに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア分解不全により、心筋細胞内にミトコンドリア(mt)DNAが蓄積することで炎症が惹起され、心不全発症につながると考えられている。本研究では、圧負荷心において障害ミトコンドリア分解に関わるBcl2-L-13が恒常性維持に重要であることや、mtDNAのメチル化に変化がおこることを示し、心不全治療の標的になりうる可能性を示した。また、DNA分解酵素を負に制御するmicroRNAを、DNAオリゴ製剤の標的として投与実験を行い、基礎的データを取得できた。これらは、ミトコンドリア分解のメカニズム解明という学術的意義のみでなく、今後、新規心不全治療薬を開発するうえで非常に有意義な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of mitophagy which is responsible for mitochondrial quality control, the methylation control mechanism of mitochondrial DNA, and subsequent inflammation, in order to develop the novel treatment of heart failure. We demonstrated that Bcl2-L-13 mediates mitophagy and mitochondrial fission under pressure overload in the heart, indicating its importance in the cardiac stress response. In addition, we successfully detected changes in methylation in pressure-overloaded hearts, concerning the methylation control mechanism of mitochondrial DNA. In terms of mitochondrial DNA degradation, we identified microRNAs that suppress a DNA-degrading enzyme and conducted experiments involving oligo DNA administration to heart failure model mice.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア 心不全 炎症 DNA分解 マイトファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では心不全による死者数は増加の一途であり、新規治療法や治療薬の開発が求められるが、心不全発症進展機構には未だ不明な点が多く、新規治療標的となる分子機構の解明が期待される。心不全を含めた、神経変性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患、動脈硬化症、癌など、慢性疾患の発症において、無菌性炎症が重要な役割を果たすと考えられている。心不全患者において、感染などの顕性炎症の合併の有無に関わらず、IL-6、TNF、IL-1 に代表される炎症誘導性サイトカインの血中濃度上昇が報告されている。また心不全モデル動物を用いた研究によって、炎症性サイトカインが心不全の発症進展に寄与していることが明らかになり、炎症誘導性サイトカインの心不全における病態生理学的意義が認識されるようになった。そこで、抗 TNF 抗体や抗 IL-1 抗体を用いた心不全に対する多施設臨床試験が実施されたが、予後を改善させるに至らなかった。これらの結果は、非常に複雑な疾患群である心不全では、炎症カスケードの下流を標的とした治療は十分ではないことを示唆している。

ミトコンドリアは原核生物を由来とした、ATP を産生する重要な細胞内小器官である。しかし、様々なストレスにより異常を来したミトコンドリアは ATP 産生を低下させるのみならず、活性酸素種 (ROS) を産生し、DNA やタンパク質に傷害を与え、細胞の構造や機能に異常を来す。そのため、ミトコンドリアの品質管理は正常な細胞機能の維持に不可欠である。ミトコンドリアの品質管理に関与する細胞内分解システムの 1 つがオートファジーである。オートファジーでは、細胞内容物や細胞内小器官が脂質二重膜で構成されるオートファゴソームにより隔離される。オートファゴソームはリソソームと融合し、内包物は酸性リソソーム酵素によって分解される。以前我々は、圧負荷条件下の心臓においてオートファジーが障害を受けたミトコンドリアを排除することにより心筋細胞死を防ぎ、ミトコンドリアや心筋細胞の構造や機能、さらには心臓組織の恒常性を維持することを報告した (Nat. Med. 2007)。ミトコンドリアは独自の DNA、ミトコンドリア DNA を内包している。核 DNA は DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) により CpG 配列にメチル基が付加されることによって修飾され、転写活性が調節されているが、ミトコンドリア DNA の CpG 配列は細菌の DNA と同様、ほとんどがメチル化されていない。この違いにより、免疫系細胞は細菌 DNA やミトコンドリア DNA が侵入した場合にその非メチル化 CpG 配列を Toll 様受容体 (TLR) 9 によって認識し、炎症誘導性サイトカインを産生する。我々は、心筋細胞内のオートファジーによるミトコンドリアの分解過程において、ミトコンドリア DNA がオートリソソーム内で DNaseII によって十分に分解されずに残存し蓄積した後、TLR9 によって認識されることで自然免疫経路が活性化され、無菌性心筋炎とそれに引き続く心不全が誘導されることを明らかにした (Nature 2012, JACC:BTS 2019)。

ミトコンドリア選択的オートファジーはマイトファジーと呼ばれる。マイトファジーに関連する分子として PINK1、Parkin が知られているが、Parkin ノックアウトマウスは軽微な表現型しか示さず、Parkin を発現しない HeLa 細胞でもマイトファジーは検出される。そこで、他のマイトファジー関連分子が存在すると考え、酵母においてマイトファジーに必須分子である Atg32 の分子的特徴を手がかりに *in silico* で検索し、哺乳類細胞における機能性ホモログとして Bcl2-L-13 を同定した (Nat. Commun. 2015)。また、マイトファジーのみならずミトコンドリアの断片化にも重要な役割を果たしていることを解明した。

DNA のメチル化によるタンパク質の発現調節については最近研究が進められている。核 DNA におけるメチル化は転写抑制に、非メチル化は転写促進に関連していることが明らかになっている。その反面、ミトコンドリア DNA のメチル化に関する研究は十分になされておらず、ストレス下での心臓におけるミトコンドリア DNA メチル化の役割を示す報告はない。また、我々はすでに、DNaseII の心臓特異的強制発現によるミトコンドリア DNA 分解促進マウスにおいて、圧負荷誘導性心不全モデルにおける表現型が改善されることを見出している (未発表) ほか、DNaseII の発現調節に関わる microRNA を新たに同定した (未発表)。そこで本研究課題においては、心不全発症における無菌性炎症の起源となるミトコンドリアに注目し、ミトコンドリアおよびミトコンドリア DNA の分解、ならびにミトコンドリア DNA のメチル化制御など、炎症カスケードの上流を標的とした分子機構解明によって、心不全における無菌性炎症を根本から制御し、心不全の発症進展を抑制できるか、という問いを検証する。

2. 研究の目的

本研究では心臓におけるミトコンドリアの分解機構およびミトコンドリア DNA のメチル化制御機構を解明することにより、心臓におけるミトコンドリアへの介入による無菌性炎症の抑制的制御が心不全の発症進展を抑制する可能性について検討することを目的とする。最終的には心不全に対する新規治療分子標的の解明に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 心不全発症進展におけるマイトファジーの役割の検討

Bcl2-L-13 の全身ノックアウトマウスを作製し、さらに圧負荷誘導性心不全モデルを用いて、その表現型を評価する。

上記のモデルマウスの心臓におけるミトコンドリアの形態や機能について詳細に解析する。また、オートファジー活性、特にマイトファジー活性について評価する。

(2) ミトコンドリア DNA メチル化の心不全への関与の検討

複数の心臓病態モデル(圧負荷におけるリモデリング(心肥大期、心不全期)中のミトコンドリア DNA メチル化の変化を評価する。

ミトコンドリア局在性 DNMT1 ノックアウトマウスを作製し、ミトコンドリア DNA のメチル化を評価する。さらに心臓圧負荷モデルを作製し、心臓におけるミトコンドリア DNA のメチル化およびその表現型を評価する。

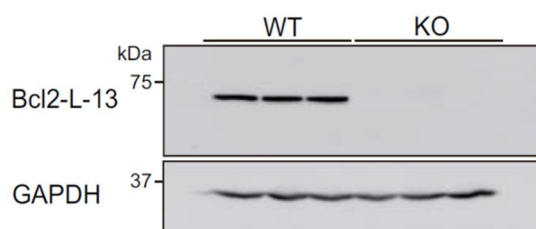
(3) DNaseII によるミトコンドリア DNA 分解促進による心不全抑制効果の検討

DNaseII の発現を抑制する microRNA に対する anti-microRNA を発現する AAV や LNA オリゴを用いて、心不全病態モデル動物におけるミトコンドリア DNA 量や、炎症・心機能など治療効果の評価を行う。

4. 研究成果

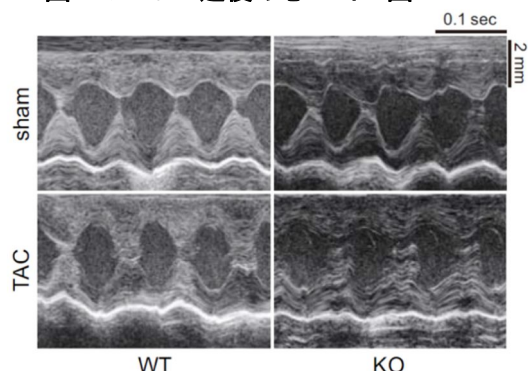
(1) 心不全発症進展におけるマイトファジーの役割の検討 *Bcl2/13* flox マウスと β -Actin プロモーター下に *Cre* recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配し、*Bcl2-L-13* 全身ノックアウトマウスを作製した。*Bcl2-L-13* のタンパク質は完全に消失していた(図1)。10週齢のマウスでは、心機能の低下は認めなかったため、横行大動脈結紮(TAC)による圧負荷ストレスにおける *Bcl2-L-13* の機能を見ることとした。TAC 4 週後に心エコーを施行したところ、野生型マウスでは心肥大を示すものの左室短縮率(FS)は保たれていたのに対し、*Bcl2-L-13* ノックアウトマウスでは、FS の有意な低下が見られた(図2)。表現型に至るメカニズムを解析するために、*Bcl2-L-13* の既知の機能であるミトコンドリア分裂及びマイトファジー誘導につき検討を行った。ミトコンドリア形態の評価については、電子顕微鏡での観察で各サンプルにつき少なくとも 500 個のミトコンドリアを測定した。その結果、野生型マウスでは、TAC により短いミトコンドリアの割合が増加するのに対し、ノックアウトマウスでは長いミトコンドリアの割合が増加しており、*Bcl2-L-13* の欠失によりミトコンドリア分裂が抑制されたと考えられた(図3)。また、TAC により惹起されたマイトファジーを蛍光免疫染色で評価した。抗 ATP synthase 抗体でミトコンドリアを染色し、抗 LC3B 抗体でオートファゴソームを染色することで、共局在点をマイトファジーとして計数した。野生型マウスでは、TAC により有意なマイトファジーの増加が見られたが、ノックアウトマウスでは、増加は見られず、マイトファジーが抑制されていると考えられた(図4)。さらに、心筋抽出液中の ATP 濃度を測定したところ、ノックアウトマウスでは、TAC により ATP レベルの有意な低下が見られた。これらの結果より、*Bcl2/13* ノックアウトマウスでは、ミトコンドリア分裂及びマイトファジーが抑制されたことにより、障害ミトコンドリアが蓄積し、ATP 産生が低下したことで心機能低下を生じたことが示唆された。この結果は、*Bcl2-L-13* が圧負荷に対するストレス応答に重要な働きをしていることを示している。

図1 . Western blotting による *Bcl2-L-13* ノックアウトの確認



WT; *Bcl2/13*^{+/+}
KO; *Bcl2/13*^{-/-}

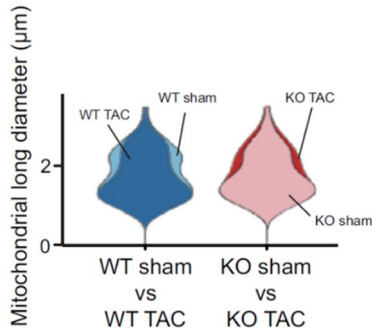
図2 . TAC 4 週後の心エコー図



TAC 4 週後の代表的な M モード心エコー所見を示す。

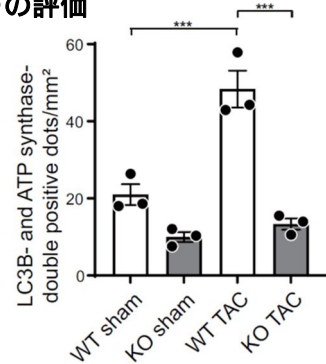
WT; *Bcl2/13*^{+/+}、KO; *Bcl2/13*^{-/-}

図3 . TAC 5日後の心筋細胞におけるミトコンドリア径の電子顕微鏡による評価



電子顕微鏡で評価したミトコンドリア径の分布をバイオリンプロットで示した。

図4 . 蛍光免疫組織染色によるミトファジーの評価



TAC5日後の左室切片を蛍光免疫染色し、単位面積あたりのミトファジーを測定した。*** $P < 0.001$

(2) ミトコンドリア DNA メチル化の心不全への関与の検討

まず、DNA メチル化の評価法として golden standard である Bisulfite sequence 法でマウス心不全モデルのミトコンドリア DNA (mtDNA) メチル化を評価した。mtDNA に 287 か所存在する CpG 配列のうち 30 か所を評価に用いた。マウスサンプルとしては、偽手術群の他、肥大心のサンプルとして TAC1 週間後の左室サンプルを、不全心のサンプルとして TAC4 週間後の左室サンプルを用いた。しかしながら、全サンプル間で mtDNA メチル化の頻度に有意な差は認めなかった。評価するメチル化の個所が少ないことが、有意な差を得られない原因と考え、次に次世代シーケンシングを用いた mtDNA メチル化の評価を行うこととした。次世代シーケンシングを用いることによって、287 か所中 271 か所 (94.4%) のメチル化を評価することが可能であった。TAC 1 週間後、TAC 4 週間後の左室サンプルを評価したが、偽手術群との間に有意な差を認めなかった。そこで、表現型が強調される可能性を考えて、mtDNA メチル化に関与するミトコンドリア局在性 DNMT1 ノックアウトマウスを作製し、圧負荷に対する mtDNA メチル化の変化を検討した。しかし、TAC2 週後に評価した mtDNA メチル化の割合は野生型マウスと DNMT1 ノックアウトマウスの間で有意差を認めなかった (図5)。

図5 . DNMT1 ノックアウトマウスにおける TAC 後心の次世代シーケンシングを用いた mtDNA メチル化の評価

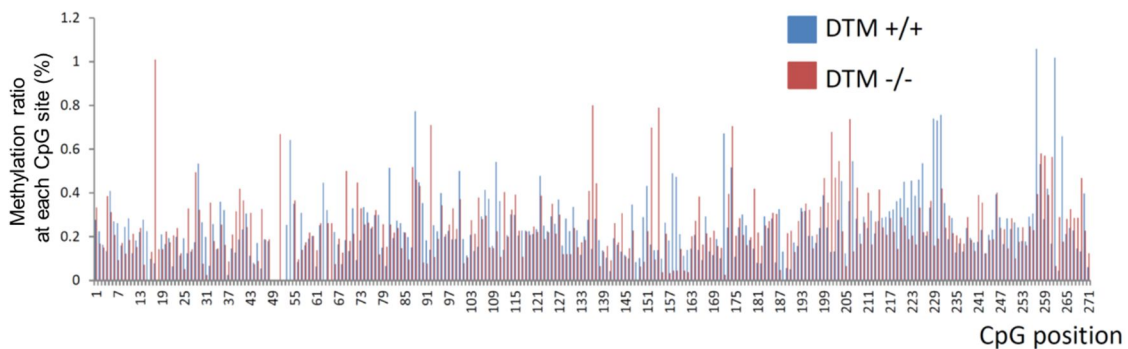
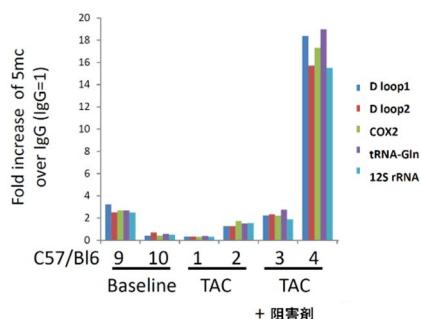


図6 . Me-DIP による TAC 心における mtDNA メチル化の評価



IgG で沈降したサンプルの値を 1 とし、mtDNA 抗体により沈降したサンプルでのメチル化の値を示した。2 か所の D loop、COX2、tRNA-Gln、12S rRNA それぞれにおけるメチル化の程度を示す。

これらの結果のように、種々の刺激を用いても mtDNA メチル化の変化を同定できない原因としてミトコンドリア DNA の分解を考えた。そこで、細胞内分解系の阻害剤を投与したうえで TAC によるミトコンドリア DNA メチル化の評価を行った。mtDNA メチル化の評価にはメチル化 DNA 免疫沈降法 (Me-DIP) を用いた。その結果、TAC による mtDNA メチル化の増加を認めた (図 6)。以上の結果より、mtDNA メチル化の評価には、その分解抑制が重要である可能性が示唆された。今後、DNA 分解酵素のノックアウトマウスを用いることにより、検出効率を上げることを検討している。

(3) DNaseII によるミトコンドリア DNA 分解促進による心不全抑制効果の検討

我々は、以前の検討におけるスクリーニングで、DNaseII の発現を抑制する microRNA を複数同定した。また、DNaseII は TAC 後に心不全を呈すると発現が低下することを見出している。そこで、DNaseII 発現を低下させる microRNA の抑制により DNaseII の発現を上昇させることができれば、心不全を抑制できると考えた。同定した microRNA-X に対する anti-miR を産生する AAV を作製し、圧負荷誘導性心不全モデルマウスに投与することとした。しかしながら、AAV では心不全の抑制効果は見られず、また miRNA の抑制効果も認めなかった。心筋細胞へのデリバリーの問題や、炎症を逆に惹起する可能性などを考えてターゲットへの高親和性・体内での高安定性・低毒性を兼ね備えた LNA を用いることとした。再度マウス心不全モデルに投与するも、やはり心不全の抑制効果は認めなかった。今後は、別の候補である microRNA-Y に対する anti-miR を作製して同様の実験を行い、LNA による新たな心不全治療の開発に結び付けていく。

今回の研究成果により、Bcl2-L-13 によるミトコンドリアダイナミクスの制御が圧負荷に対する心機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、mtDNA のメチル化についても、ストレスによるメチル化の変化を同定する道筋をつけることができた。これらの結果は、今後ミトコンドリア分解不全から炎症の惹起及び心不全につながるカスケードを抑制する新たな治療に結び付く重要なものであると考えられる。また、LNA オリゴ投与による心不全治療への取り組みにも引き続き力を注いでいこうと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akazawa Yasuhiro, Taneike Manabu, Ueda Hiromichi, Kitazume-Taneike Rika, Murakawa Tomokazu, Sugihara Ryuta, Yorifuji Hiroki, Nishida Hiroki, Mine Kentaro, Hioki Ayana, Omiya Shigemiki, Nakayama Hiroyuki, Yamaguchi Osamu, Yoshimori Tamotsu, Sakata Yasushi, Otsu Kinya	4. 巻 12
2. 論文標題 Rubicon-regulated beta-1 adrenergic receptor recycling protects the heart from pressure overload	5. 発行年 2022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/s41598-021-03920-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Abe Hajime, Tanada Yohei, Omiya Shigemiki, Podaru Mihai-Nicolae, Murakawa Tomokazu, Ito Jumpei, Shah Ajay M., Conway Simon J., Ono Masahiro, Otsu Kinya	4. 巻 14
2. 論文標題 NF- B activation in cardiac fibroblasts results in the recruitment of inflammatory Ly6Chi monocytes in pressure-overloaded hearts ^{hi} monocytes in pressure-overloaded hearts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Signaling	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） 10.1126/scisignal.abe4932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugihara R, Taneike M, Murakawa T, Tamai T, Ueda H, Kitazume-Taneike R, Oka T, Akazawa Y, Nishida H, Mine K, Hioki A, Omi J, Omiya S, Aoki J, Ikeda K, Nishida K, Arita M, Yamaguchi O, Sakata Y, Otsu K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Lysophosphatidylserine induces necrosis in pressure overloaded male mouse hearts via G protein coupled receptor 34	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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/s41467-023-40201-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大津 欣也
2. 発表標題 Cardiac inflammation and degradation systems
3. 学会等名 第26回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大津 欣也
2. 発表標題 心臓炎症と細胞内分解システム
3. 学会等名 第27回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大津欣也
2. 発表標題 Mitochondrial Degradation and Cardiac Inflammation
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	種池 学 (Taneike Manabu) (30609756)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	山口 修 (Yamaguchi Osamu) (90467580)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授 (14401)	

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