

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19485

研究課題名（和文）Mieapによる心筋細胞ミトコンドリア品質管理を介した新規心不全治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel therapy for heart failure via mitochondria quality control by Mieap in cardiomyocytes

研究代表者

筒井 裕之（Tsutsui, Hiroyuki）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70264017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：梗塞後不全心筋の心機能低下にMieapのタンパクレベルでの増加を伴っていた。免疫染色において心筋細胞のMieapはミトコンドリアと共染色され、Mieapはミトコンドリアに局在することが示唆された。さらに、培養心筋細胞においてMieapをノックアウトすると過酸化水素投与による細胞死が増加した。Mieapノックアウトマウスでは心筋梗塞後の死亡率が野生型マウスに比べて増加した。また、心拡大が進行し、心肥大が進行し、心機能低下が助長され、肺重量、心重量が増加した。Mieapはミトコンドリアタンパクとして心筋リモデリングの進展を促進する酸化ストレスに対して心筋保護的な作用をしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は高いエネルギー要求性からミトコンドリアが豊富であり、その機能維持にはミトコンドリア品質管理が重要である。しかし、心筋細胞におけるミトコンドリアの制御・処理機構の全容は解明されていない。Mieapはミトコンドリアの破壊を伴わずにミトコンドリア品質を制御しており、心臓に多量に発現することから心血管系において重要な役割をになっている可能性がある。本研究は心筋細胞におけるミトコンドリア品質管理機構を新たな視点から解明しようとするものであり極めて挑戦的である。さらに薬剤開発による新たな心不全の予防・治療法の開発を目指すという点において先駆的研究である。

研究成果の概要（英文）：Impairment of cardiac function was accompanied by an increase in the protein level of Mieap in post-infarct failing myocardium. Mieap was co-stained with mitochondria in cultured cardiomyocytes by immunostaining, suggesting that Mieap is localized in mitochondria. Furthermore, knockout of Mieap increased hydrogen peroxide-induced cell death in cultured cardiomyocytes. Mieap knockout mice had increased mortality after myocardial infarction compared to wild-type mice. In addition, cardiomegaly progressed, cardiac hypertrophy progressed, cardiac function deterioration was accelerated, and lung weight and heart weight increased. These findings indicated that Mieap, as a mitochondrial protein, has cardioprotective action against oxidative stress, which promotes the progress of myocardial remodeling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる心疾患の終末像である心不全の重症例の生命予後は極めて不良であり、2年生存率は約50%と悪性腫瘍に匹敵する。生活習慣の欧米化と人口の高齢化に伴い心不全患者数は増加しており、わが国では2030年には130万人に達すると推計され、「心不全パンデミック」として全世界においても医学的・医療経済的な大きな問題である。心不全の病態解明と新たな治療戦略の開発は循環器領域において最も重要な研究課題である。心不全は心臓の中心的な構成要素である心筋細胞のミトコンドリア機能の破綻により生じる。不全心では酸化ストレスによりミトコンドリアへ不良蛋白が蓄積し、ミトコンドリアのエネルギー代謝異常、酸化ストレス、Ca<sup>2+</sup>ハンドリング異常を引き起こす。近年、p53誘導蛋白 Mitochondria-eating protein(Mieap)がミトコンドリア内にリソソーム様オルガネラを誘導し異常タンパクを分解する Mieap-induced Accumulation of Lysosome-like organelles with Mitochondria (MALM)という現象を引き起こし、ミトコンドリア品質管理において重要な役割を果たすことが報告された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、『MieapによるMALMが心筋細胞のミトコンドリア品質管理に関与する』という仮説を検証するとともに『Mieap制御の分子基盤を解明し、Mieap-MALM系の活性化によるミトコンドリア機能保持というパラダイムに基づく新たな心不全の予防・治療法の開発』を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### 1. 心筋細胞における Mieap・MALM の機能解析

Short-hairpin アデノウイルス(sh-Ad)でラット培養心筋細胞の Mieap をノックダウンし、以下の項目を解析する。

1)MALMの評価:ミトコンドリア内部の液滴構造物の評価(電子顕微鏡)、ミトコンドリアと Mieap リソソーム様オルガネラ(LAMP1, CathepsinD or LysoTracker)との共局在(電子顕微鏡免疫染色、蛍光免疫二重染色、ウェスタンブロット(WB)法) 2)ミトコンドリア機能評価:ミトコンドリア呼吸能(O<sub>2</sub> flux analyzer)、ATP産生(生化学法)、酸化ストレス(Mitoxox, Amplex Red)、Ca<sup>2+</sup>代謝(XRhod1-AM)、生合成マーカー(PGC-1 $\alpha$ ) 3)心筋細胞障害評価:アポトーシス(cleaved caspase3:WB法、TUNEL染色)、心筋細胞肥大(ANF:RT-PCR法、細胞面積:免疫染色法)、炎症(炎症細胞浸潤・サイトカイン)、さらにアンジオテンシンII投与による心筋細胞障害モデルでも上記を検証する。

### 2. 心臓における Mieap・MALM の役割の解明

全身および心筋特異的 Mieap ノックアウト(KO)マウスにおいて以下の項目および上記1.1)~3)を評価する。

1)心臓構築・機能:生存率、心エコー(左室径・駆出率・壁肥厚)、血行動態(大動脈圧、左室圧、収縮・拡張機能指標)、臓器重量(心臓、肺、肝臓、腎臓) 2)心筋組織学的評価:心筋細胞肥大(WGA染色)、間質線維化(MT染色) また、CRISPR-Cas9システムで心筋特異的 Mieap KOマウスを作成し、同様の項目を評価する。

### 3. 心筋障害・心不全における Mieap・MALM の役割の解明

野生型マウス、Mieap 遺伝子欠損マウスに冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全モデルと横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成し、4週後に上記1.1)~3)および2.1)~2)を評価する。

#### 4. 研究成果

梗塞後不全心筋の心機能低下に Mieap のタンパクレベルでの増加を伴っていた。免疫染色において心筋細胞の Mieap はミトコンドリアと共染色され、Mieap はミトコンドリアに局在することが示唆された。さらに、培養心筋細胞において Mieap をノックアウトすると過酸化水素投与による細胞死が増加した。Mieap ノックアウトマウスでは心筋梗塞後の死亡率が野生型マウスに比べて増加した。また、心拡大が進行し、心肥大が進行し、心機能低下が助長され、肺重量、心重量が増加した。Mieap はミトコンドリアタンパクとして心筋リモデリングの進展を促進する酸化ストレスに対して心筋保護的な作用をしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikita A, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Nishimura R, Tadokoro T, Enzan N, Yamamoto T, Sada M, Tsutsui Y, Miyake R, Ikeda M, Ide T, Kinugawa S, Tsutsui H.	4. 巻 24
2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103517	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 -

〔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
研究分担者	松島 将士  (Matsushima Shoji)  (80552869)	九州大学・医学研究院・助教    (17102)	

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