

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591084

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAの抗リモデリング効果の機序解明と新たな治療方法の確立

研究課題名(英文)Anti-remodeling effect of mitochondrial DNA; A novel approach for the treatment of heart failure using recombinant TFAM

研究代表者

井手 友美 (Ide, Tomomi)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：90380625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア転写因子A(TFAM)の過剰発現マウスは心筋梗塞後のミトコンドリアDNA(mtDNA)コピー数の減少を抑制し、生存心筋の病的肥大を抑制し、生存率を改善させる。しかし、有効なmtDNAコピー数を増加させる方法は確立していない。我々は合成ヒトTFAM蛋白(rhTFAM)を精製し、培養心筋細胞に直接投与したところ、細胞内しかもミトコンドリアに速やかに取り込まれた。rhTFAMの投与によりmtDNAコピー数が増加し、病的心肥大の促進因子であるNFATシグナルの活性化が抑制された。さらにrhTFAMは心筋細胞肥大も抑制した。rhTFAMは、病的心筋肥大を抑制する治療薬となりうると考えられた

研究成果の概要(英文)：The overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) attenuates the decrease in mtDNA copy number after myocardial infarction, ameliorates pathological hypertrophy, and markedly improves survival. However, non-transgenic strategy to increase mtDNA for the treatment of pathological hypertrophy remains unknown. We produced recombinant human TFAM protein (rhTFAM). rhTFAM rapidly entered into mitochondria of cultured cardiac myocytes. rhTFAM increased mtDNA and abolished the activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT), which is well known to activate pathological hypertrophy. rhTFAM attenuated subsequent morphological hypertrophy of myocytes as well. rhTFAM would be an attractive molecule in attenuating cardiac pathological hypertrophy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：ミトコンドリア 活性酵素 心肥大

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であるが、その予後は不良であり、患者罹患率も増加している。近年、心不全の病態形成にはその分子基盤としてミトコンドリア機能不全があることが明らかとなった。心不全患者および心不全モデルマウスの心筋 mtDNA はともに低下し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の量的維持はミトコンドリア機能維持、細胞の恒常性の維持を可能とし、マウス心筋梗塞後リモデリングを抑制しその予後を著しく改善することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、mtDNA の量的維持が抗リモデリング効果を示す機序を解明し、mtDNA を後天的に増加させる手段を確立することで、新たな治療法の開発を目指す。

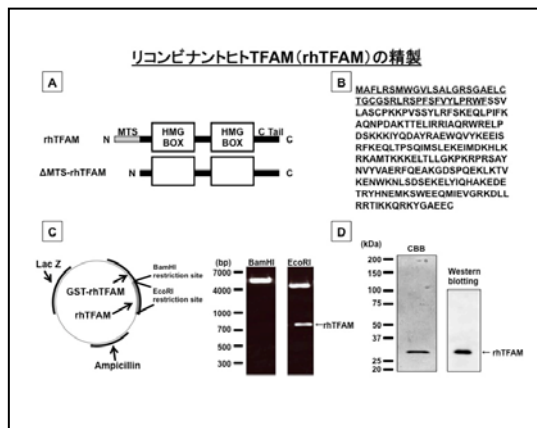
3. 研究の方法

- 1) リコンビナント TFAM の作成と mtDNA 増加系の確立：ミトコンドリア DNA を細胞内で増加させる手段として、リコンビナント TFAM を作成した。
- 2) mtDNA による NFAT の抑制および心肥大の抑制：Angiotensin II (AngII) および Endothelin-1 (ET-1) によって NFAT の活性化が生じることが知られている。そこで我々は、AngII または ET-1 による NFAT 活性化に対する mtDNA の影響を検討した。

4. 研究成果

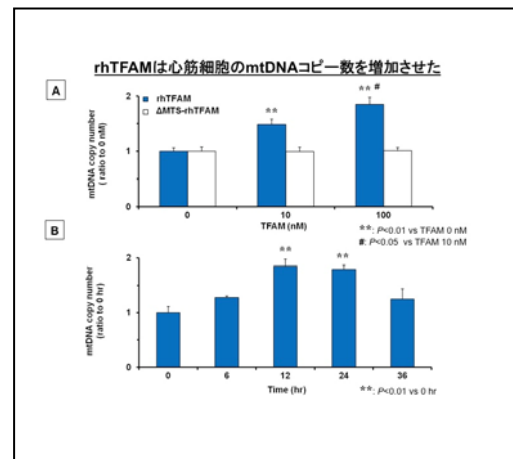
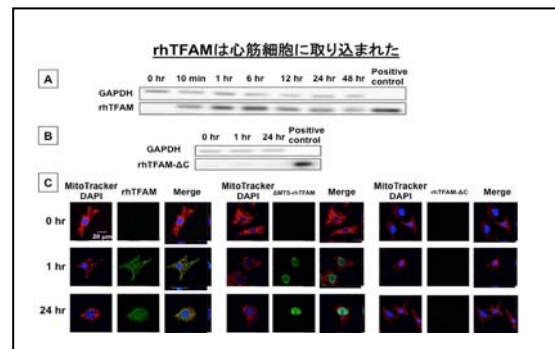
1) リコンビナント TFAM の作成と mtDNA 増加系の確立

我々はrhTFAM蛋白を作成し、それが治療手段として使用できるかを検証するため、まず細胞外からの投与で心筋細胞に取り込まれるかどうかを検討した。



rhTFAM (100 nM) を培養液中に添加したところ、10分以内にラット新生仔心室細胞に取り込まれ、48時間も細胞内に留まっていた。一方、rhTFAM-ΔCは細胞内への取り込みをほとんど確認できなかった。またz軸方向の解析を含めた共焦点顕微鏡での観察では、細胞外から投与したrhTFAMは1時間後も24時間後も

細胞質とミトコンドリアに局在していたが、ΔMTS-rhTFAMはほとんどが核に移行していた。これらの結果から、MTSは心筋細胞内でのリコンビナントTFAM蛋白の局在を決定するのに重要であると考えられる。rhTFAM-ΔCは細胞内に取り込まれないことから、TFAMのC末端にある何らかの配列が、TFAMの細胞内への取り込みに関与していると考えられた。さらに、今回の実験で用いた濃度 (100 nM) ではΔMTS-rhTFAMおよびrhTFAMが心筋細胞に明らかな細胞障害を認めないことを、細胞死の評価および培養上清中のLDH濃度の評価から確認した。



次に、このrhTFAM蛋白が細胞内で機能しているかを検証するため、rhTFAM投与後のミトコンドリア特性の変化を評価した。rhTFAMの投与により、濃度依存性 (0-100 nM) にmtDNA コピー数が増加した。mtDNA コピー数は、投与から12時間後に最大で約2倍となった。一方、ΔMTS-rhTFAMはmtDNA コピー数を増加させなかった。これらの結果はmtDNAに対する2つの異なるプライマーセットを用いてリアルタイムPCRで確認した。このことから、ミトコンドリアに取り込まれたrhTFAMが機能して直接mtDNA コピー数を増やしていることを明らかにした。さらに、空ベクターからの産物ではmtDNA コピー数が増加しないことから、コンピテントセルからのrhTFAM以外の産物がmtDNA 量を増加させている可能性を除外した。電子

顕微鏡による観察ではrhTFAMおよびΔMTS-rhTFAM (100 nM) の投与により、心筋細胞のミトコンドリアの形態および個数には明らかな変化は見られなかった。

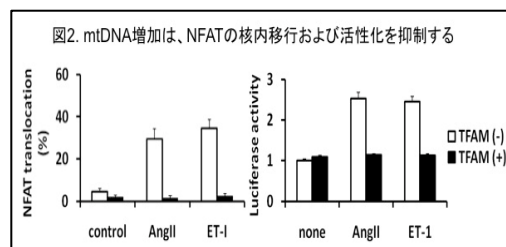
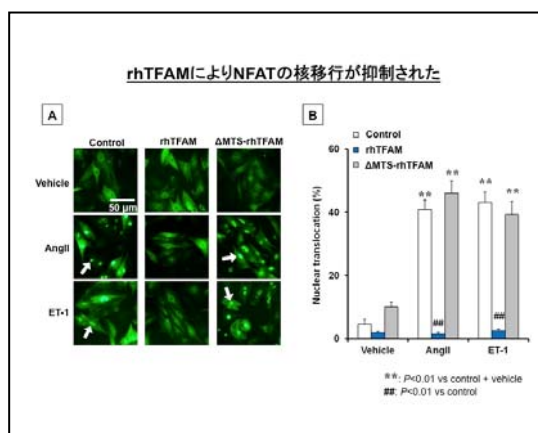
rhTFAMの取り込みおよび機能が心筋細胞だけの特徴であるかどうかを確認するため、RAW 264.7細胞を用いて同様の検討を行った。その結果、rhTFAMもΔMTS-rhTFAMもRAW 264.7細胞に取り込まれた。さらに、rhTFAMはRAW 264.7細胞においてもmtDNAコピー数を増加させたが、ΔMTS-rhTFAMは増加させなかった。つまりrhTFAMの取り込みおよび機能は心筋細胞の場合と同様であり、これらは心筋細胞の特徴ではなく、rhTFAM蛋白の特徴であることを明らかにした。rhTFAMによるミトコンドリア機能の変化を見るため、ミトコンドリア電子伝達系複合体の蛋白質の発現を調べた。rhTFAM (100 nM) はmtDNAにコードされた電子伝達系複合体IVの構成蛋白であるCOX IとCOX IIIの蛋白発現を増加させた。一方で、核DNAにコードされたNDUFA9 (複合体Iの構成蛋白) やSDHA (複合体IIの構成蛋白) は増加させなかった。rhTFAMはmtDNAコピー数を増加させ、おそらくその結果としてmtDNAにコードされた蛋白質を増加させるものの、核DNAにコードされた蛋白質には影響していないことが分かった。

2) リコンビナントTFAMによる肥大シグナル抑制効果の検証

TFAM過剰発現が*in vivo*で心筋梗塞後の病的肥大およびリモデリングを抑制していたので、今回の実験においてもrhTFAMが心筋細胞肥大およびリモデリングに関わるシグナルを抑制出来るかを検討した。Calcineurin/NFATシグナル経路は、病的肥大を促進する重要なシグナルであることが*in vitro*でも*in vivo*でも証明されている (McKinseyおよびKass, 2007; Molkentin, 2004; Vega 他, 2003)。Ca²⁺依存性serine/threonine脱リン酸化酵素であるcalcineurinによりNFATが脱リン酸化され、NFATの細胞質から核への移行が生じ、転写因子として多くの肥大に関わる遺伝子を活性化させる。さらに、これまでの研究ではNFATシグナルを抑制することで肥大およびそれに引き続く心不全の抑制が示されている (Sakata他, 2000; van Rooij他, 2004)。我々は、rhTFAMがNFATの活性化を抑制すると予想した。病的肥大における代表的な神経体液性因子であるAngIIおよびET-1にて心筋細胞を刺激した。まずrhTFAMがAngIIもしくはET-1によるNFATの核移行を抑制できるかどうか、GFP-NFAT融合蛋白を発現するアデノウイルスベクターを用いて検証した。rhTFAM (100 nM) の前投与により、AngII (100 nM) もしくはET-1 (100 nM) によるGFP-NFATの核移行が有意に抑制された。一方で、ΔMTS-rhTFAM (100

nM) ではその抑制が見られなかった。このことから、ミトコンドリアに移行したリコンビナントTFAMがAngIIもしくはET-1によるNFATの核移行を抑制したと考えられた。さらに、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討したNFATの転写活性は、AngII (100 nM) もしくはET-1 (100 nM) により約2.5倍上昇したが、この増加はrhTFAM (10 nM) の前投与により完全に抑制されていた (図6C)。NFATに制御されている遺伝子で、病的肥大のマーカーとして広く用いられているBNPのプロモーター活性もrhTFAM (10 nM) により抑制されていた。MCIP1遺伝子の発現もNFATにより制御されており、MCIP1はNFATのレポーター遺伝子として用いられている (Jin他, 2010)。MCIP1のmRNA発現は、rhTFAMの投与により刺激前状態で抑制されており、これはTFAM過剰発現マウスでも同様であった。これらの結果から、rhTFAMが心筋細胞において、AngIIもしくはET-1によるNFAT活性化を抑制していると結論した。

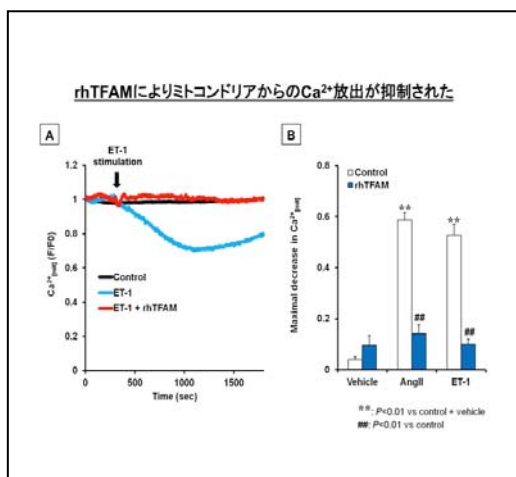
さらにrhTFAMが別の重要な肥大のシグナルであるMAPK p44/42 (ERK 1/2) (Aoki他, 2000; McKinseyおよびKass, 2007) に影響を与えているかを検証した。rhTFAM (100 nM) の前投与は、ET-1 (100 nM) 刺激によるMAPK p44/42のリン酸化レベルを変化させなかった。



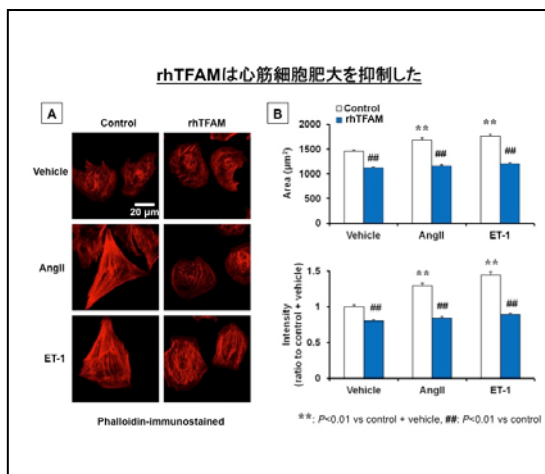
このことから、rhTFAMはMAPKシグナルによる肥大には関与していないと思われる。

NFATは細胞内のCa²⁺変動に依存し活性化されるので、rhTFAMがミトコンドリアからのCa²⁺の放出に関与している可能性を考えた。AngII (100 nM) やET-1 (100 nM) 刺激により、心筋細胞のミトコンドリア内Ca²⁺濃度は減少し、rhTFAM (10 nM) はその減少を有意に抑制して

いた。このことから、rhTFAMはAngIIもしくはET-1によるミトコンドリアから細胞質へのCa²⁺放出を抑制していると考えられた。



最後に、rhTFAMが形態的な心筋細胞の肥大を抑制しているかを検証した。rhTFAM (100



nM) の投与により、AngII (100 nM) もしくはET-1 (100 nM) の48時間刺激により生じる心筋細胞肥大が有意に抑制されていた。rhTFAMはAngIIやET-1による心筋細胞肥大を抑制することが明らかとなった。

結語

リコンビナント TFAM 蛋白の投与により心筋細胞でのNFATシグナルの活性化および病的な心筋肥大が抑制された。リコンビナント TFAM 蛋白は、心筋リモデリングおよび心不全の伸展に対する新たな治療法として期待される。

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 3 件)

- ① Fujino T, Ide T, Yoshida M, Onitsuka K, Tanaka A, Hata Y, Nishida M,

Takehara T, Kanemaru T, Kitajima N, Takazaki S, Kurose H, Kang D, Sunagawa K. Recombinant mitochondrial transcription factor A protein inhibits nuclear factor of activated T cells signaling and attenuates pathological hypertrophy of cardiac myocytes. *Mitochondrion* 12: 449-458, 2012.

- ② Onitsuka K, Ide T, Arai S, Hata Y, Murayama Y, Hosokawa K, Sakamoto T, Tobushi T, Sakamoto K, Fujino T, Sunagawa K. Cardiac phase-targeted dynamic load on left ventricle differentially regulates phase-sensitive gene expressions and pathway activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2013, 64C: 30-38.
- ③ Tanaka A, Ide T, Fujino T, Onitsuka K, Ikeda M, Takehara T, Hata Y, Ylikallio E, Tyynismaa H, Suomalainen A, Sunagawa K. The overexpression of Twinkle helicase ameliorates the progression of cardiac fibrosis and heart failure in pressure overload model in mice. *PLoS One.* 2013, 8:e67642.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Takeo Fujino, Yuko Hata, Takako Takehara, Ken Onitsuka, Tomoyuki Tobushi, Kazuo Sakamoto, Keita Saku, Takamori Kakino, Kenji Sunagawa : The increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling in Volume Overload Model 第29回国際心臓研究会日本部会総会 (平成24年10月26-27日、福岡)
- ② Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Kakino T, Sunagawa K. The Increase of Mitochondrial DNA

Copy Number Attenuates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Inhibits Pathological Remodeling in Cardiac Myocytes. 第29回国際心臓研究会日本部会総会（平成24年10月26-27日、福岡）

- ③ Ken Onitsuka, Tomomi Ide, Shinobu Arai, Yuko Hata, Takako Takehara, Yoshinori Murayama, Kazuo Sakamoto, Tomoyuki Tobushi, Takeo Fujino, Keita Saku, Masataka Ikeda, Takamori Kakino, Kenji Sunagawa Phase Targeted Dynamic Load of Left Ventricle Induces Distinct Phase Sensitive Gene Expressions and Pathway Activation 第29回国際心臓研究会日本部会総会（平成24年10月26-27日、福岡）
- ④ Masataka Ikeda,¹Tomomi Ide,¹Takeo Fujino,¹Ken Onitsuka,¹Tomoyuki Tobushi,¹Kazuo Sakamoto,¹Keita Saku,¹Takamori Kakino,³Henna Tyynismaa,²Hiroyuki Tsutsui,³Anu Suomalainen,¹Kenji Sunagawa The Increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling in Volume Overload Model *Circ J.* 77(Suppl I): 425, 2013 第77回日本循環器学会学術集会（平成25年3月15-17日、横浜）
- ⑤ Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Kakino T, Sunagawa K. Increased Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Excessive Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Inhibits NFAT Signaling in Cardiac Myocytes. *Circulation Journal* 2013; 77 (Suppl. I): I-952第77回日本循環器学会学術集会（平成25年3月15-17日、横浜）
- ⑥ Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Sunagawa K. The Overexpression of Mitochondrial Transcription Factor A Attenuates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Inhibits Pathological Remodeling in Cardiac Myocytes 日本心不全学会（平成25年10月）
Journal of Cardiac Failure 2012; 18 (10S): S170

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

研究代表者 井手友美

研究者番号：90380625