

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689042

研究課題名(和文)ミトコンドリアを起点とする慢性炎症機序の解明と心不全治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of chronic inflammation originated from mitochondria, and the application for the treatment of heart failure

研究代表者

彦惣 俊吾 (Hikoso, Shungo)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授(常勤)

研究者番号：30423164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円、(間接経費) 5,760,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の発症要因として重要視されている心筋の無菌性慢性炎症の原因として、オートファジーにより十分に分解されなかったミトコンドリアDNAが重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、ミトコンドリアDNAの分解には、リソソーム酵素であるDNase IIが必須であること、分解されなかったミトコンドリアDNAはtoll like receptor-9(TLR9)を介して炎症性サイトカインの発現を増加させること、TLR9の阻害により圧負荷による心不全の発症が抑制されることを見出し、ミトコンドリアDNAによるTLR9の活性化をブロックすることが新しい心不全の治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that mitochondrial DNA plays an important role in the onset of chronic inflammation, which is regarded to cause heart failure. We observed that mitochondrial DNA results from inadequate degradation by autophagy, and the key molecule for mitochondrial DNA degradation is DNase II, a lysosomal enzyme. Resultant mitochondrial DNA in cardiomyocytes upregulates the expression of inflammatory cytokines mediated through toll like receptor 9 (TLR9). Inhibition of interaction between mitochondrial DNA and TLR9 suppressed the development of heart failure in response to pressure overload. These findings indicate that the inhibition of TLR9 activation by mitochondrial DNA may be the treatment of patients with heart failure.

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

様々な心疾患は心臓の負荷を増大させ、その結果、心臓は心肥大、心内腔の拡大、心収縮力低下を来し、最終的に心不全状態となる。心不全は重篤かつ近年増加傾向にある疾患であるが、その発症の分子メカニズムは依然として不明であり、新しい治療方法の開発は頭打ちとなっている。また、その状況を反映して、予後の改善についても頭打ちの状態である。その中で、近年、心不全の発症過程に、慢性炎症が関与していることが次第に明らかになってきたところであるが、しかしながら、炎症が生じる原因、その分子機序については全く不明であった。

私はこれまでに、心不全において内部構造の異常な変性していると考えられるミトコンドリアが増加していること、また心不全においては、その変性ミトコンドリアを分解するオートファジー系が亢進していることを見出した。ミトコンドリアは細菌などの病原体に特徴的な分子構造を有していることから、今回、心負荷にともなう変性ミトコンドリアの増加とその分解に伴うミトコンドリア構成成分の放出が、心不全の発症要因としての慢性炎症の原因となっている可能性を考え、検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、変性ミトコンドリアの分解による分解産物が心筋での慢性炎症の原因であることを実証し、その分解分子機序の解明と慢性炎症の制御による心不全治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

心筋慢性炎症へのミトコンドリア DNA の関与の検討

心不全発症過程でのミトコンドリア DNA の動態、ミトコンドリア DNA 分解機構の活性、TLR9 経路の活性について検討する。

(1) 心不全におけるミトコンドリア DNA、DNase II 活性、TLR9 経路活性と炎症反応の検討

野生型マウスに横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作製し表現型を検討する。

(2) ミトコンドリア DNA、TLR9 経路の炎症、心不全発症における役割の解明

ミトコンドリア DNA の蓄積が炎症の原因となること、それが TLR9 を介していることを示す。そのために、ミトコンドリア DNA 分解の責任分子である DNase II の心筋特異的欠損マウスの圧負荷に対する表現型を検討する。

ミトコンドリア分解機構の慢性炎症での役割の解明ならびに分解機構を調節する機構の同定

ミトコンドリア分解に関与する、オートファジー、DNase II の活性を調節する機構については全く不明であるため、

これを解明する。

慢性炎症制御による心不全治療の検討  
TLR9 を阻害するオリゴヌクレオチド(市販)の投与、DNase II を発現するアデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子治療などにより、心筋の慢性炎症を抑制し心不全発症を抑制できるかどうか検証する。

4. 研究成果

まず、心不全心筋においてミトコンドリア DNA が関与している可能性について、野生型マウスの圧負荷心不全モデルを用いて検討をおこなった。その結果、野生型マウスの心不全の心筋において、リソソーム内にミトコンドリア DNA の蓄積が観察された(図1)。

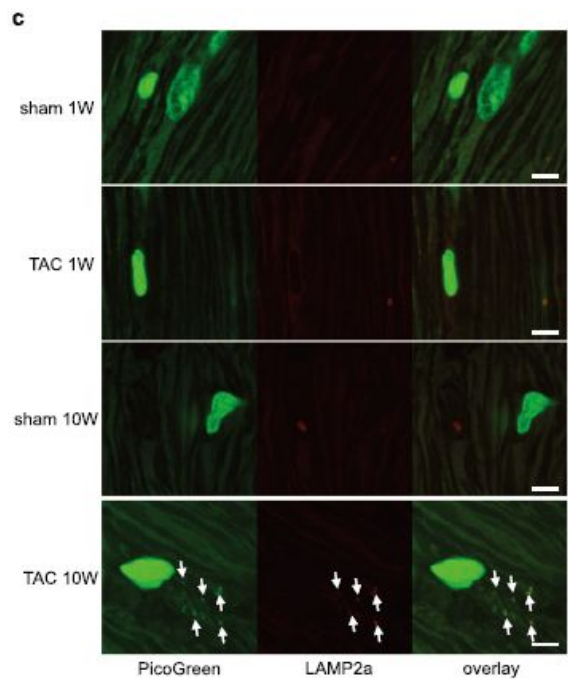
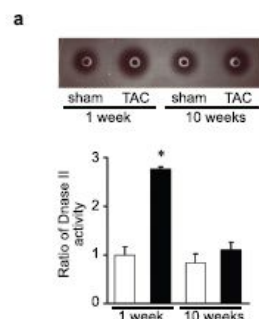


図 1

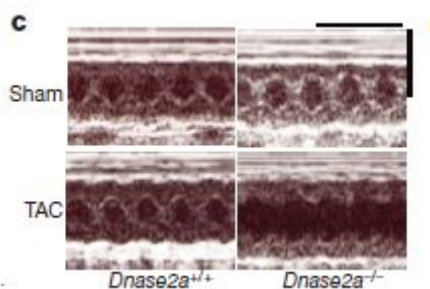
また、この蓄積に、ミトコンドリア DNA 分解の責任分子である DNase II が関与しているかどうかについて検討するため、心不全心筋における DNase II 活性を評価した。その結果、心肥大期にいったん増強した DNase II 活性が、心不全期においてベースラインレベルにまで低下することがわかった(図2)。

(図 2)



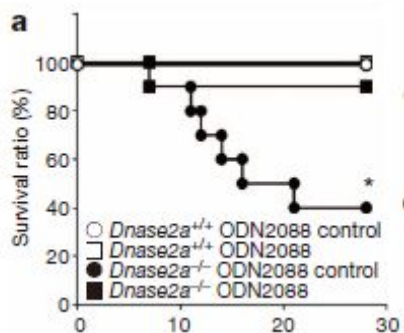
また、同じく TLR9 の活性について検討したところ、心不全期において TLR9 の下流のシグナル伝達分子が活性化していることがわかり、心不全の病態に TLR9 を介したシグナルが関係している可能性が示唆された。

ついで、これらの変化が心不全発症にどのように関与しているのかについて検討をおこなった。まず、DNase II の心筋特異的欠損マウスを用いて検討をおこなった。DNase II 欠損マウスでは、圧負荷により心筋にミトコンドリア DNA が蓄積し、炎症性サイトカインの発現上昇、炎症性細胞の浸潤を来し、容易に心不全を発症することが分かった (図 3)。



(図 3) 圧負荷後の心機能

すなわち、DNase II によるミトコンドリア DNA 分解が、心筋の圧負荷に対するストレス応答に必須であることが判明した。次に、DNase II 欠損マウスにおける圧負荷後の心筋の炎症が TLR9 を介したものでどうかについて検討した。DNase II 欠損マウスに圧負荷をかけて、TLR9 を阻害するオリゴヌクレオチドを投与したところ、心不全による死亡率の低下が認められた (図 4)。

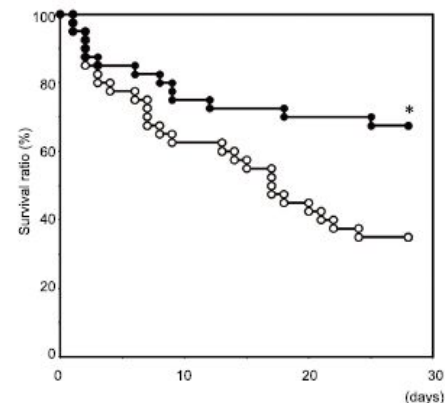


(図 4) TLR9 阻害による死亡率の改善効果

また、DNase II と TLR9 の二重欠損マウスにおいても、コントロールと比較して

炎症反応の低下、心不全の発症抑制が認められた。以上より、圧負荷後のストレス応答にミトコンドリア DNA TLR9 の経路が関与していることが明らかになった。

また、TLR9 の阻害が心不全発症抑制に有効である可能性を検討するため、TLR9 欠損マウスを用いて圧負荷をかけて表現型を検討したところ、野生型マウスと比較して心不全の発症が抑制されることが証明された。さらに、野生型マウスに圧負荷心不全モデルを作製し TLR9 を阻害するオリゴヌクレオチドを投与したところ、心不全の発症が有意に抑制されることが分かった (図 5)。



(図 5) 野生型マウス心不全モデルの TLR9 阻害による治療効果: 白丸はコントロールのオリゴヌクレオチド投与群、黒丸は TLR9 阻害オリゴヌクレオチド投与群

以上より、心不全発症過程における慢性炎症のメカニズムの一つとして、負荷により発生した変性ミトコンドリア由来と考えられるミトコンドリア DNA の分解不良にともなう蓄積が TLR9 を活性化するという機序が関与していることが考えられ、この経路の制御により心不全発症を抑制し得る可能性があることが明らかになった。

## 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 3 件)

1. Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K.

Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.

Nature. 2012;485(7397):251-5. Erratum in: Nature. 2012 Oct 11;490(7419):292.

2 . Tamai T, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Uno Y, Horie K, Nishida K, Sonenberg N, Shah AM, Takeda J, Komuro I, Otsu K.

Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain)-dependent mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation becomes indispensable for cardiac hypertrophic growth after early postnatal period.

Journal of Biological Chemistry. 2013;288(14):10176-87.

3 . Oyabu J, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Murakawa T, Yasui H, Ueda H, Nakayama H, Taneike M, Omiya S, Shah AM, Nishida K, Otsu K.

Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading. Biochem Biophys Res Commun. 2013; 441(4):787-92

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

彦惣 俊吾 (HIKOSO, Shungo)

大阪大学医学部附属病院・特任准教授(常勤)

研究者番号：30423164