

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659334

研究課題名(和文)正しい心筋梗塞評価法の確立

研究課題名(英文)A correct assessment of myocardial infarction

研究代表者

新谷 香(石田香)(Shintani-Ishida, Kaori)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50345047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム依存的プロテアーゼであるカルパインが心筋細胞のミトコンドリアにも存在し、虚血再灌流時に活性化することを見出した。活性化したミトコンドリアのカルパインはミトコンドリア呼吸鎖のComplex Iのサブユニットを限定分解し、Complex Iを不活性化することにより、mitochondria permeability transition pore (mPTP)を開口し、心筋梗塞進展に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is involved in ischemia-reperfusion injury. Isoforms of Ca<sup>2+</sup>-activated cysteine proteases, calpains, are implicated in the development of myocardial infarction in ischemia-reperfusion. We demonstrated for the first time the presence of mitochondrial calpain, and the contribution to Complex I inactivation and mPTP opening after postischemic reperfusion in heart.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：心筋梗塞 ミトコンドリア カルパイン mPTP

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は心筋細胞の膜破綻によるネクロシス(壊死)と考えられるが、その評価はミトコンドリア呼吸鎖酵素の活性低下を反映した TTC 染色で行われる。一方、心筋の過収縮(収縮帯)が膜破綻の原因と信じられてきた。私達は虚血再灌流モデルを用い、筋小胞体のカルシウム(Ca<sup>2+</sup>)取り込み促進処置により、再灌流時の細胞質Ca<sup>2+</sup>過剰が改善され、収縮帯領域が狭小化するのに、TTC 染色陰性の梗塞領域が拡大する現象を見出した。これらの知見は、心筋梗塞がミトコンドリア呼吸障害と膜破綻のいずれに起因するか、過収縮が膜破綻や梗塞進展に寄与するか等、心筋梗塞の診断・評価・研究に使われてきた方法・概念・に疑問を投げかけた。

### 2. 研究の目的

本研究は上述の疑問について再検討し、心筋梗塞の評価法・概念を刷新することを目指す。

具体的には、

(1) 細胞骨格分解による膜破綻、ミトコンドリア障害(TTC 染色陰性)のいずれが心筋梗塞を惹起するのかを明らかにし、各々の関係と定義を明確にする。

(2) 近年、肝細胞等においてCa<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼであるカルパインがミトコンドリアにも存在し、ミトコンドリア障害に関与するという報告がなされた。カルパインが膜破綻、ミトコンドリア障害のいずれに関与し、心筋梗塞進展に寄与するのか検討する。

(3) 心筋梗塞の正しい組織学的評価法を提案する。

### 3. 研究の方法

虚血再灌流モデルの作製：深麻酔下で8週齢のSDラット雄の左冠状動脈を結紮し、30分後再灌流した。

TTC 染色：1% エバンスブルーを右心房に注射後心臓を採取し、心臓スライスに1% 2,3,5-tetraphenyltetrazolium chloride (TTC) に浸け、37℃で10分間インキュベートした。

ミトコンドリア単離：BioVision社のMitochondria isolation kitを用いた。

ザイモグラフィ：カルパイン基質として0.45 mg/ml FITC-カゼインを含む10% アクリルアミドゲルでミトコンドリアライセートを分離後、5 mM CaCl<sub>2</sub>存在下で反応させた。

ウェスタンブロッティング：単離ミトコンドリアをLaemmli サンプルバッファーで

溶解後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、ニトロセルロース膜に転写して、抗原抗体反応により目的のタンパク質を検出した。

mPTP 開口の評価：ミトコンドリアの膨化を520 nmの吸光度低下によりモニターすることにより、mPTP 開口を評価した。

カルパイン活性測定：単離ミトコンドリアに細胞膜透過性のカルパイン基質である10 μM t-BOC-LM-CMACを添加し、分解により産生される蛍光をプレートリーダーにより測定した。

Complex I 活性測定：単離ミトコンドリアを130 μM NADH, 65 μM コビキノン存在下でインキュベートしてNADHの酸化を340 nmの吸光度でモニターした。Complex I 阻害剤である2 μg/ml rotenone 添加により阻害されるNADH酸化をComplex I 活性として評価した。

### 4. 研究成果

ミトコンドリアのマトリクス画分に m-カルパインが存在することを心筋で初めて証明した(図1)。

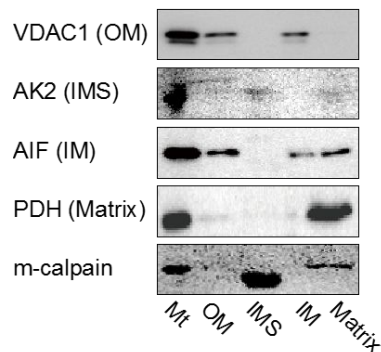


図1 ラット心筋細胞由来ミトコンドリアにおける m-カルパインの局在

VDAC：ミトコンドリア外膜(OM)の局在マーカー、AK2：膜間空間(IMS)マーカー、AIF：内膜(IM)マーカー、PDH：マトリクス(Matrix)マーカー

ミトコンドリアカルパインは単離ミトコンドリアへのCa<sup>2+</sup>添加や虚血再灌流後の心臓から単離したミトコンドリア内において活性化されていた(図2)。

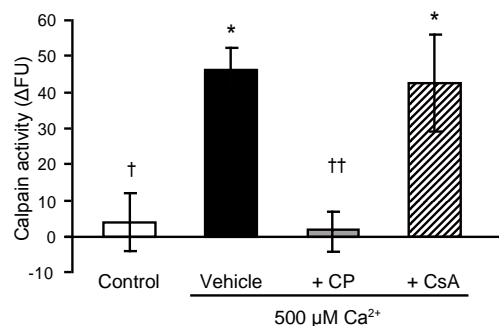


図2 単離ミトコンドリアにおける  $\text{Ca}^{2+}$  添加による calpain 活性化

$\text{Ca}^{2+}$  添加によるカルパイン活性の上昇は、カルパイン阻害剤カルペプチン (CP) により抑制されたが、mPTP ブロッカーであるシクロスポリン (CsA) は抑制しなかった。

活性化したミトコンドリアカルパインはミトコンドリア呼吸鎖の Complex I のサブユニットである ND6 を限定分解し、Complex I を不活性化した (図3)。ミトコンドリア permeability transition pore (mPTP) はミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷などにより開口すると、低分子物質を漏出し、ミトコンドリア膜電位の低下やミトコンドリアの膨化からミトコンドリア外膜の破綻を引き起こす。近年、mPTP が心筋梗塞進展に深く関与することが明らかになっている。また、Complex I の不活性化が mPTP 開口を引き起こすことも知られている。そこで、カルパイン阻害剤の  $\text{Ca}^{2+}$  添加あるいは虚血再灌流による mPTP 開口に対する影響を調べたところ、カルパイン阻害剤は mPTP 開口を阻害した。これらの結果は細胞質カルパインのみならずミトコンドリアも心筋梗塞進展に重要な役割を果たしていることを示唆しており、心筋梗塞を評価する上で考慮すべき分子であることを意味している。

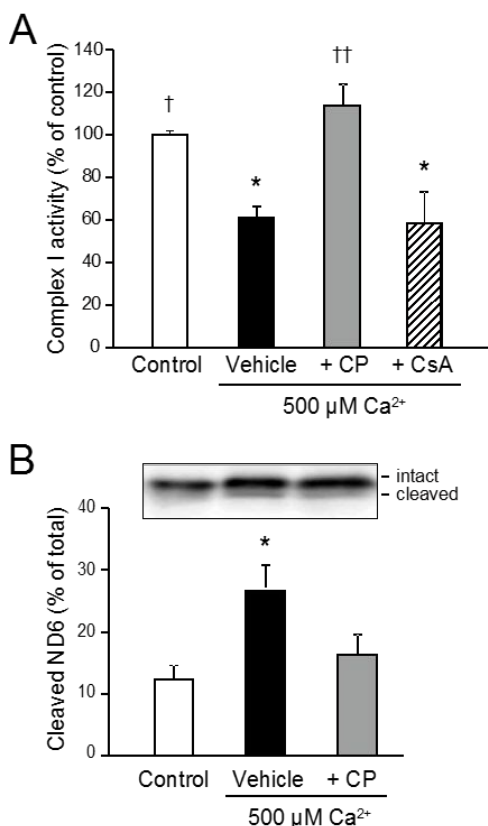


図3 単離ミトコンドリアにおける  $\text{Ca}^{2+}$  添加により活性化したカルパインによる Complex I 不活性化 (パネルA) と ND6 の限定分解 (パネルB)

(パネルA)  $\text{Ca}^{2+}$  添加によって Complex I の活性が低下したが、カルペプチン (CP) により回復した。一方、シクロスポリン A (CsA) では効果がなかった。

(パネルB)  $\text{Ca}^{2+}$  添加によって ND6 が限定分解されたが、CP は限定分解を抑制した。

今後、ミトコンドリアカルパイン特異的阻害剤ペプチド等を用いて、細胞質カルパインによる細胞骨格破綻とミトコンドリアカルパインによるミトコンドリア障害のいずれが心筋梗塞進展に重要であるのか、相互作用が存在するのか等について明らかにできれば、カルパインが新しい心筋梗塞評価法のターゲット分子となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

1. (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 7 件)

1. Shintani-Ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K. MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome destabilization in rats. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842, 691-700. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.01.013. (査読有)
2. Ishii Y, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Connexin-43 hemichannels contribute to the propagation of  $\mu$ -calpain-mediated neuronal death in a cortical ablation injury model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 441, 457-462. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.091. (査読有)
3. Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida K. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in normal and steatotic human livers. *Hepatol Res*. 2013; [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/hepr.12183. (査読有)
4. Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura

S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I, Yoshida K. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832: 1159-1166. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.02.014. (査読有)

5. Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 53: 233-239. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.05.012. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

1. 坂幹樹, 新谷香, 山口晃志, 林田眞喜子, 大野曜吉, 吉田 謙一. MDMA 及びその活性代謝物 (DHMA, DHA) の LC-MS/MS を用いた同時定量分析. 第 82 回日本法医学会学術関東地方集会 2013 年 10 月 19 日はまぎんホールヴィアマーレ (横浜)
2. 黒田亮平, 新谷香, 永井恒志, 前田秀将, 吉田謙一. 2 受容体シグナルとストレスによる心収縮不全の関連. 第 97 次日本法医学会学術全国集会. 2013 年 6 月 26 日~28 日 ロイトン札幌 (札幌).
3. 前田秀将, 永井恒志, 山口るつ子, 加島淳平, 新谷香, 吉田謙一. Heart failure induced by intermittent hypoxia in rat fed high-fat diet. 第 97 次日本法医学会学術全国集会. 2013 年 6 月 26 日~28 日 ロイトン札幌 (札幌).
4. Shintani-Ishida K, Yoshida K. Mitochondrial calpains contribute to opening of mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion. 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月 15 日(金~17 日) パシフィコ横浜 (横浜).
5. 奈良明奈, 永井恒志, 加島淳平, 前田秀将, 黒田亮平, Lisa Wingenfeld, 新谷香, 吉田謙一. 睡眠時無呼吸症候群・糖尿病合併モデルラットにおける心機能低下. 第 81 回日本法医学会学術関東地方会. 2012 年 10 月 20 日 高崎シティーギャラリー (高崎).
6. 新谷香, 坂幹樹, 石井康博, 中嶋信, 吉田謙一. MDMA は eNOS 活性化を介して酸化ストレスによる心機能低下を惹起する. 第 96 次日本法医学会学術全国集会. 2012 年 6 月 7 日~9 日 アクトシティー浜松 (浜松).

7. 前田秀将, 永井恒志, 新谷香, Lisa Wingenfeld, 吉田謙一. Intermittent hypoxia induces autophagy to prevent heart failure in rats. 第 96 次日本法医学会学術全国集会. 2012 年 6 月 7 日~9 日 アクトシティー浜松 (浜松).
8. 黒田亮平, 前田秀将, 永井恒志, 新谷香, 吉田謙一. Immobilization stress causes the transient cardiac contractile deficiency in rat. 第 96 次日本法医学会学術全国集会. 2012 年 6 月 7 日~9 日 アクトシティー浜松 (浜松).

[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  
新谷 香 (石田香) (SHINTANI-ISHIDA, Kaori)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 50345047
  - (2) 連携研究者  
吉田 謙一 (YOSHIDA, Ken-ichi)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40166947