

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893211

研究課題名(和文)ミトコンドリアダイナミクスを標的とした心臓老化に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new strategy for treatment of cardiac senescence by targeting mitochondrial dynamics

研究代表者

池田 義之 (IKEDA, YOSHIYUKI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任講師

研究者番号：00573023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは絶えず細胞環境に応じてFissionとFusionを繰り返して形態を変化させるミトコンドリアダイナミクスを有している。本研究の目的は、ミトコンドリアダイナミクスが心臓の老化の原因となっているかを明らかにすることである。心筋においてミトコンドリアのFissionを抑制すると、ミトコンドリア形態がFusionに傾き、オートファジーの低下に伴うミトコンドリアの質管理機構の抑制から異常ミトコンドリアの蓄積を来し、その結果心機能低下・心臓の老化を惹起した。本研究の結果から、ミトコンドリアダイナミクスが心臓老化の治療ターゲットとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are dynamic organelles that constantly undergo fusion and fission to adapt to changes in the cellular environment. We investigated the role of Dynamin-related protein 1 (Drp1), a GTPase that mediates mitochondrial fission in mediating cardiac senescence. Drp1 downregulation induced mitochondrial fusion, accumulation of damaged mitochondria, increased apoptosis and cardiac dysfunction in vivo and in vitro. Drp1 downregulation also suppressed autophagy. Disruption of mitochondrial fission inhibits mitochondrial autophagy, and causes mitochondrial dysfunction, thereby promoting cardiac senescence and dysfunction. These results suggest that mitochondrial dynamics may be the target for the treatment of cardiac senescence.

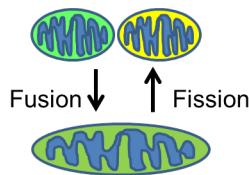
研究分野：老化

キーワード：老化 オートファジー ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

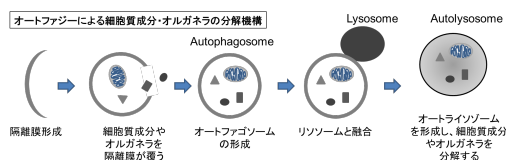
加齢に伴い、ミトコンドリアにおけるエネルギー (ATP) 産生能の低下や、副産物である活性酸素の産生が増加し、心臓の老化や心疾患発生の原因となっている (Dutta Det al., *Circ Res.* 2012;110(8):1125-38.)。ただし、老化に伴うミトコンドリア機能障害の詳細なメカニズムについては、十分な検討がなされていない。

ミトコンドリアは、細胞環境に応じて別のミトコンドリアと融合する (Fusion) ことや、逆に分離する (Fission) ことで、その形態を変化させるミトコンドリアダイナミクスを有する (Liesa M. et al, *Cell Metab.* 2013;17(4):491-506.)。



心臓では、老化に伴いミトコンドリア形態が Fusion に傾くことが知られているが (Marzetti E. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(4):H459-76.)、この Fusion がミトコンドリアの加齢性機能低下の原因なのか、加齢に対する代償機構なのかは不明である。

オートファジーは、古くなった細胞質成分やオルガネラをオートファゴソーム (Autophagosome) で隔離し、引き続きリソソームと結合する (オートライソゾーム Autolysosome の形成) ことで、内容物を分解除去する細胞内機構である (Klionsky DJ. et al., *Science* 2000; 290:1717-21)。



ミトコンドリアもまた、オートファジーによる除去を介して質的管理を受けているが、こうしたオートファジーによるミトコンドリアの除去機構の加齢性変化については、十分な検討が行われていない。

以上のような学術的背景を踏まえ、加齢に伴うミトコンドリアの Fusion 増加は、オートファジーによる老化ミトコンドリアの排除機能の抑制を介して、機能が低下したミトコンドリアの蓄積を促進させ、アポトーシスや酸化ストレスの増大から、結果心臓の加齢性変化・心疾患発生の増加をもたらしているとの仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓の老化の原因を検討し、治療ターゲットを明らかにすることである。心臓はミトコンドリアによるエネルギー産生の依存度が高いことから、ミトコンドリア

の老化を抑制することが、心臓の老化防止につながる可能性がある。ミトコンドリアが加齢に伴い形態を変化させることに着目し、ミトコンドリア形態の加齢性変化が、オートファジーによるミトコンドリアの質管理機構を抑制し、老化したミトコンドリアの蓄積からその機能低下 (老化) を惹起し、結果心臓の老化を来しているのではないかとこの仮説を立証する。

3. 研究の方法

(1) 正常マウスを使用し、老化に伴うミトコンドリアダイナミクスの変化が、オートファジーやミトコンドリアの加齢性機能障害に及ぼす影響について、心エコー図法・電子顕微鏡・組織化学染色法・生化学的手法を用いて検討を行う。

心エコー図法による心機能の経年的変化の評価：心エコー図法を用いて、左室収縮末期径、左室拡張末期径、左室駆出率、左室壁厚を計測。心機能の経年的変化を検討する。

組織染色による、経年的な組織学的変化の検討：各月齢で採取した心臓組織サンプルを用いて Wheat germ agglutinin (WGA) 染色・Picric Acid Sirius Red (PASR) 染色・TUNEL 染色・Senescence associated Gal (SA-Gal) 染色を行い、心筋細胞のサイズ・心筋線維化・アポトーシスおよび心臓老化度の経年的変化を評価する。

電子顕微鏡による、ミトコンドリア形態の経年的変化の評価：これまでの報告では、老化に伴い心臓のミトコンドリア形態は Fusion に傾くことが知られているが (Marzetti E. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(4):H459-76.)、本研究においても、電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態を観察し、ミトコンドリアの長径や面積を計測することで、ミトコンドリアの形態が経年的に Fusion に傾くことを確認する。

ミトコンドリア機能や酸化ストレスの経年的変化の評価：心筋からミトコンドリアを単離し、ATP 産生能や complex assay によるミトコンドリア機能を評価。また、過酸化水素産生能評価による、酸化ストレスの経年変化も検討する。

生化学的手法による、オートファジーの経年的変化の評価：各月齢で採取した心臓組織サンプルからタンパク質や mRNA を抽出し、Western blot 法や Real-time PCR 法を用いて LC3 や p62 等のオートファジー関連因子の発現を計測することで、オートファジーの経年的変化を検討する。

(2) ミトコンドリアの Fusion 化が、ミトコンドリア機能および心臓の老化に及ぼす影響について、ミトコンドリアの加齢性形態変化を模倣したマウス (心筋ミトコンドリアを Fusion に傾かせるような、心筋特異的 Drp1 KO マウス) を用いて検討する。Drp1 は GTPase の一種であり、ミトコンドリアの

Fission に必須の因子である (Otera H, et al. J Biochem. 2011;149:241-251) 。この Drp1 をノックアウトすることで、ミトコンドリアの形態を Fusion に傾かせる。Drp1 flox マウスに MHC-MerCreMer Tg マウスが交配されたマウスを使用し、さらにタモキシフェンを連日 5 日間投与する。こうして心筋特異的に Drp1 がノックアウトされたマウス (Drp1-CKO) を作成する。この Drp1-CKO を使用し、以下の実験を行う。

心エコー図法による心機能評価。

WGA・PASR・TUNEL・SA-Gal 染色を行い、Drp1 KO による心臓の組織学的変化 (心筋細胞肥大・線維化・アポトーシス・老化の促進) を評価する。

生化学的手法による、オートファジーの評価。

(3) Short Hairpin RNA アデノウイルスを感染させ Drp1 をノックダウンした培養心筋細胞を用いて、以下の実験を行う。

電子顕微鏡や蛍光組織化学染色によるミトコンドリア形態の評価、TUNEL 染色によるアポトーシスや、ミトコンドリア cell viability を評価する。

ATP 産生能、swelling assay、JC-1 染色によるミトコンドリア機能の評価を行う。

LC3 や p62 に対する Western blot や、LC3 の蛍光組織化学染色によるオートファジーの評価を行う。

4. 研究成果

(1) 正常マウス (C57BL6) を用いた実験により、以下の点を明らかにした。

加齢に伴い、心収縮機能は低下し、左室壁は肥厚し、左室内腔は拡大、心重量は増加、心筋細胞は膨化し、アポトーシスの増加を認めた。

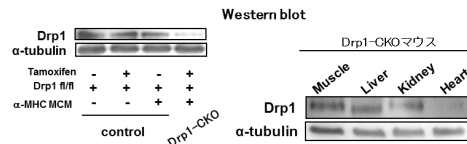
心臓からミトコンドリアを単離して行った検査において、ATP 産生能や complex assay によるミトコンドリア機能は低下し、過酸化水素産生能の評価によるミトコンドリア由来の酸化ストレスは増大した。

ミトコンドリアの Fission に必須な GTPase である Drp1 は、その活性型であるセリン 616 リン酸化型 Drp1 (Ser616p-Drp1) 発現が加齢に伴い減少した。

電子顕微鏡評価により、加齢に伴いミトコンドリアダイナミクスが Fusion に傾くことが確認された。

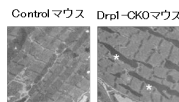
LC3 や p62 に関する Western blot による評価により、オートファジーが加齢に伴い抑制されていた。

(2) ミトコンドリアダイナミクスを人為的に Fusion に傾けた際の心臓老化や心機能がどのような影響を受けるかを検討した。ミトコンドリアの Fission に必須である Drp1 を心筋特異的にノックアウトしたマウス (Drp1-CKO) を作成した。Drp1-CKO においては、期待通りミトコンドリアは Fusion に傾いていた。



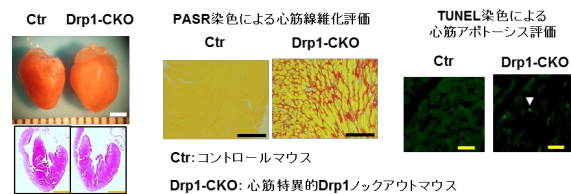
Drp1-CKOマウスにおいて、心筋特異的にDrp1がKOされている

心筋組織電子顕微鏡像



* Fusionを起こしたミトコンドリア

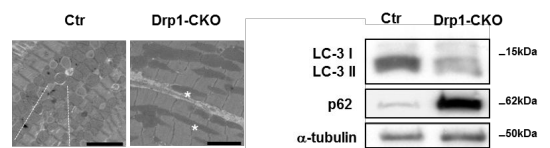
心臓のミトコンドリア機能は、コントロールと比較し Drp1-CKO において低下していた。Drp1-CKO はコントロールマウスと比較し、心臓は肥大し心腔も拡大し、心筋の線維化が多いという老化の表現型を示した。心エコー評価により、Drp1-CKO では心機能も有意に低下していた。以上の結果は、ミトコンドリアの Fusion 化がミトコンドリア機能障害を介して心臓の老化・機能障害を来すことを示唆するものであった。



Ctrl: コントロールマウス

Drp1-CKO: 心筋特異的Drp1ノックアウトマウス

さらにオートファジーに関する評価を行った。Drp1-CKO はコントロールマウスと比較し、LC3II/LC3I 比は低下し、p62 は増加し、オートファジーが抑制されていた。電子顕微鏡による評価では、コントロールマウスではミトコンドリアを内包したオートファゴソーム像が認められたものの、Drp1-CKO では同様の所見は認められなかった。



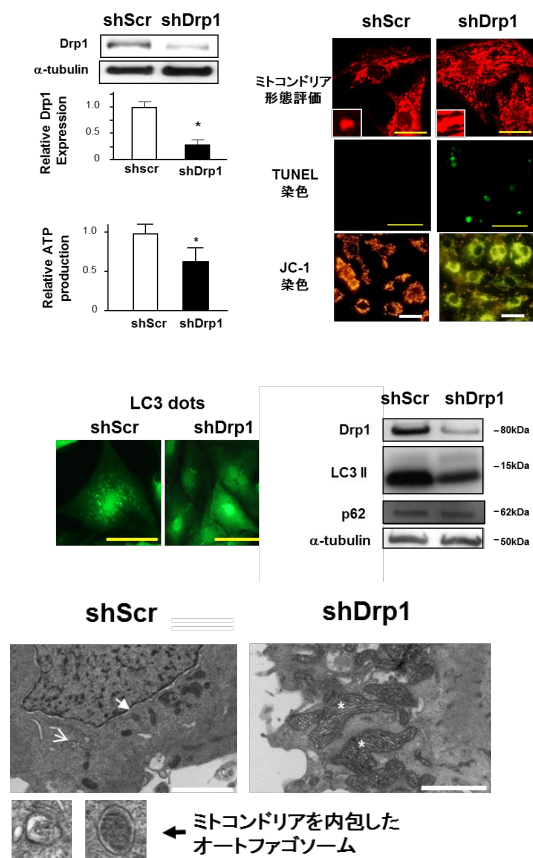
Ctrl: コントロールマウス

Drp1-CKO: 心筋特異的Drp1ノックアウトマウス

これらの結果は、ミトコンドリアの Fusion 化が、心筋におけるオートファジーを低下させ、オートファジーによる異常ミトコンドリアの排除機構を抑制していることを示唆していた。

Drp1 short hairpin RNA アデノウイルスを感染させることで Drp1 をノックダウンさせた培養心筋細胞では、short hairpin scramble RNA アデノウイルスを感染させたコントロール心筋細胞と比較し、ミトコンドリアは Fusion に傾き、Fission が抑制されていた。この Drp1 ノックダウン培養心筋細胞では、ミトコンドリア機能が低下しており、アポトーシスが増加し、細胞死が増大していた。さらに Western blot 法を用いた検討では、

LC3II/LC3I 比や p62 発現の評価によるオートファジーが、Drp1 ノックダウンにより低下していた。電子顕微鏡による評価では、ミトコンドリアを内包したオートファゴソーム像が Drp1 ノックダウンにより減少していた。これらの結果は、Drp1-CKO マウス実験 (in vivo) と一致したものであった。



以上、(1)(2)(3) の評価結果により、加齢に伴い心筋のミトコンドリアは Fusion に傾き、Fission は低下した。こうした変化は、老化ミトコンドリアのオートファジーによる排除機能の抑制をもたらし、機能低下したミトコンドリアの蓄積を促進させ、アポトーシスや酸化ストレスの増大から、結果心臓の加齢性変化・心疾患発生の増加をもたらしていることが示唆された。

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 5 件)

- (1) Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and Autophagy in the Heart. *Circ Res.* 2016 13;118(10):1563-76. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307474.
- (2) Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, et al. Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. *Circulation.* 2016

29;133(13):1249-63. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502

- (3) Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, et al. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ Res.* 2015;116(2):264-78. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303356.
- (4) Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, et al. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:116-22. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.019.
- (5) Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, et al. New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:210934. doi: 10.1155/2014/210934.

[学会発表](計 5 件)

- (1) Ikeda Y. American Heart Association (AHA) Scientific Session. 2014 年 11 月, アメリカ, Mitochondrial Fission Plays a Crucial Role in Cardiomyocyte Adaptation to Energy Stress via Mitophagy.
- (2) Ikeda Y. American Heart Association (AHA) Scientific Session. 2014 年 11 月, アメリカ, Prolonged Inhibition of Mitochondrial Fission Enhances Myocardial Injury in Response to Ischemia/Reperfusion.
- (3) 池田義之. 第 79 回 日本循環器学会総会・学術集会 2015 年 4 月, 大阪, Mitochondrial Fission Pays an Essential Role to Induce Stress Resistance in Response to Cardiac Ischemia/Reperfusion via Mitochondrial Autophagy.
- (4) 池田義之. 第 79 回 日本循環器学会総会・学術集会 2015 年 4 月, 大阪, Cardiac Specific Disruption of Dynamin Related Protein-1 Develops Cardiac Dysfunction via Inhibition of Autophagy.
- (5) 池田義之. 第 51 回 高血圧関連疾患モデル学会 2015 年 10 月, 大阪, 心臓老化とマイトファジー (シンポジウム、招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿児島大学医歯学総合研究科
心臓血管・高血圧内科学 (特任講師)
池田義之 (YOSHIYUKI IKEDA)
研究者番号: 573023