

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04764

研究課題名(和文) 抗老化に繋がるミトコンドリアストレス応答機構解明と診断分子の探索、有効性

研究課題名(英文) Elucidation of mitochondrial stress response mechanism leading to anti aging and searching for diagnostic molecule, efficacy

研究代表者

内海 健 (Uchiumi, Takeshi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80253798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：カロリー制限、運動は長寿、アンチメタボリックに繋がるといわれているが、詳細な分子機構、指標となる分子の同定はなされていない。軽度ミトコンドリアストレスによる細胞、生体の適応応答が分泌蛋白の誘導を介してミトコンドリアの機能修復のみならず全身の病態改善に繋がるとの仮説を提唱し検証した。我々はミトコンドリアたんぱくp32のノックアウトマウスの解析を通じて軽度ミトコンドリアストレスがERストレスを惹起していること、それには転写因子 ATF4が関与することを見出した。軽度ミトコンドリアストレスは逆に適応応答を惹起し分泌蛋白を介して全身状態を改善させることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Calorie restriction, exercise therapy is said to lead to longevity and anti-metabolic, but detailed molecular mechanisms and indicators have not been identified. We verified the hypothesis that adaptive responses of cells and mild mitochondrial stress due to mild mitochondrial stress lead to improvement not only of function restoration of mitochondria but also systemic pathology through secretory protein induction. We analyzed mitochondrial protein p32 knockout mice and found that mild mitochondrial stress caused ER stress. We also found that the transcription factor ATF4 is involved in this pathway. Mild mitochondrial stress conversely provoked an adaptive response and was expected to improve the general condition through secretory proteins.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ミトコンドリア 老化 stress応答 代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 長寿、アンチメタボリックは人類の夢の一つであり、そのメカニズムは諸説あるが、具体的な機構は明らかでない。さらに、指標となる物質の同定やメカニズムに基づく創薬研究は進んでいない。カロリー制限、運動療法により長寿、健康な体を得られることは線虫や、マウス、チンパンジーの研究から広く認知され、その制御にミトコンドリアが関与することは知られている。このため長寿、アンチメタボリックの指標となる蛋白、ペプチド、代謝物 (Metabolite) の探索は重要である。

(2) 我々はミトコンドリア DNA の維持分子 TFAM のトランスジェニックマウス (TFAM Tg) においては当初の予測とは異なりミトコンドリア DNA の転写、翻訳の軽度低下がみとめられ、結果として軽度酸化的リン酸化能の低下が認められた。ミトコンドリア病マウスのような高度障害ではなく、所謂軽度ミトコンドリアストレスマウスモデルである。さらに TFAM Tg マウスでは主に骨格筋、心筋に TFAM が発現しており、脳での発現は認められていない。にも拘らず、この TFAM Tg マウスとの交配実験でアルツハイマー病モデルマウス及び、脊髄側索硬化症モデルマウスの症状を劇的に改善した。さらに心血管結紮モデル、総頸動脈結紮モデルマウスの病状をも劇的に改善させたとの報告もある。しかしながら、骨格筋、心筋の軽度ミトコンドリア障害がどうして神経変性疾患までも改善させたのか不明であった。

## 2. 研究の目的

1) 本研究では軽度ミトコンドリアストレスによる適応応答 (Adaptive response) が長寿、アンチメタボリックに繋がるとの仮説を提唱し、さらにミトコンドリアストレス指標となる代謝物、分泌蛋白の探索を目的とする。研究代表者が保持するモデルマウスを用いこの指標となる分子の探索と検証を行い、ヒ

ト疾患 (代謝性疾患、神経変性疾患) への応用につなげていくことを目的とする。

(2) 線虫の研究からミトコンドリア翻訳障害によるミトコンドリアストレスは長寿に結びつくこと、そのメカニズムとして FGF21, IGFbp7 などの発現、分泌亢進により全身状態が改善されることが示され、その発現分子機構を明らかにすることを目的とする。

(3) さらに我々が作成した p32 心筋、脳特異的 K0 マウスにおいても同様の機構 (Adaptive response、分泌蛋白合成) が働いていることを確認していく。心筋特異的 p32 ノックアウトマウスは、軽度のミトコンドリアストレスを引き起こし、拡張型心筋症を引き起こすがその後増悪することなく生存する。この p32 心筋特異的 K0 マウスはストレスに対する適応応答 (ER stress) を惹起し FGF21 の顕著な発現亢進を認めている。このモデルマウスの分子機構を探ることでミトコンドリアストレス指標をより明確化できると考える。

## 3. 研究の方法

「軽度ミトコンドリアストレスが適応応答を惹起しストレスを改善するだけでなく、分泌蛋白の発現誘導を介して全身状態の改善、長寿、抗メタボリックにつながる」の仮説検証及びミトコンドリアストレス、指標蛋白を探索した。具体的には

ミトコンドリアストレスの指標、検査指標となる代謝物、遺伝子発現探索

ミトコンドリアストレス応答遺伝子 FGF21, GDF15 の発現様式

ミトコンドリア翻訳障害がストレス応答の原因になりうるか? 創薬としての抗生剤の可能性

ミトコンドリアから核へのシグナル分子、機構の全解明を目指す

我々が所持するマウスモデル血清中、組織中における代謝物の探索、定量を比較検討する。

培養細胞を用いた系でもミトコンドリア翻訳阻害剤投与により細胞内、分泌中のペプチド、代謝物の同定、定量を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ミトコンドリアストレスの指標の検討  
ミトコンドリア翻訳阻害によるストレスでは異常タンパクが蓄積することでそのシグナルが伝達されると考えられている。ミトコンドリア翻訳阻害の抗生剤を投与することでミトコンドリアストレスが惹起されること、その転写因子は ATF4 であることを見出した。さらに ATF4 をノックダウンすることでこれらの下流の遺伝子発現が抑制されることを見出している。下流遺伝子には FGF21, GDF15 及び Integrated stress response に関与する遺伝子が多数存在することを見出した。

(2) ミトコンドリアストレス応答遺伝子 (分泌蛋白の網羅的探索と検査指標としての FGF21, GDF15) の解明を行った。我々が所持する p32 心筋特異的 KO マウスは筋肉、心筋に軽度ミトコンドリアストレスを生じさせ、適応応答によりマウスの寿命を改善する可能性を見出した。これには新たに Serin-glycin 系の酵素遺伝子の発現誘導を認められた。

(3) ミトコンドリア翻訳阻害がストレス応答の原因になりうるかを創薬としての抗生剤の有用性を探った。抗生剤は癌の幹細胞様変化をきたした腫瘍細胞にも効果があることを見出した。がん幹細胞様細胞ではミトコンドリア機能が亢進し MAM 形成も亢進している。この癌幹細胞様細胞にはミトコンドリア翻訳阻害剤である抗生剤がより効果的であることを見出した。(Matsumoto 2017)

(4) ミトコンドリアから核へのシグナル分子、機構の全解明を目指し、ミトコンドリア内蛋白合成障害による ペプチドの蓄積がシグナルの一つとして考えられている。核へのシグナルとしては ER ストレスシグナル

が重要であることを見出した。

(5) p32 心筋特異的ノックアウトマウスは、生後 2 か月齢の解析から、心エコーにより軽度拡張型心筋症を呈していた。心不全のマーカーの発現増加、心筋における線維化の亢進等、拡張型心筋症を早期に発症していた。さらに長期の観察から拡張型心筋症の病状は徐々に悪化し、約 400 日で死亡した。また、P32 心筋特異的 KO マウスでは AMPK のリン酸化の亢進、下流の S6Kinase のリン酸化の低下、4E-BP1 の恒常的リン酸化の亢進を認め、細胞質における翻訳の低下が示唆された。

(6) 心筋、脳特異的 p32 ノックアウトマウスでも、ミトコンドリア翻訳異常、OXPHOS 活性低下、ミトコンドリア形態異常、ミトコンドリア病マーカー (FGF21, GDF15) の増加、ER ストレス応答の惹起、mTOR 系のシグナル伝達阻害、尿素回路の異常などであった。臓器ごとに異なる表現型としては、p32 ノックアウト脳組織では脂肪酸酸化異常、p32 ノックアウト心臓組織ではミトコンドリア UPR (unfolded protein response) の増加、であった。また、p32 神経特異的ノックアウトマウスは、生後 4 週齢から体重が減少し始め、振戦を起こし、大脳白質脳症を呈して、約 8 週齢で死亡した。p32 心筋特異的ノックアウトマウスは、生後 3 か月から拡張型心筋症を呈したが、400 日目までは生存したことを見出した。

#### 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 10 件)

Amamoto R, Uchiyama T, Yagi M, Monji K, Song Y, Oda Y, *et al.* The Expression of Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase Is Downregulated as Prostate Cancer Progression. J Cancer 2016;7:50-9:10.7150/jca.13207

査読有

Fang J, Yamaza H, Uchiumi T, Hoshino Y, Masuda K, Hirofuji Y, *et al.*

Dihydroorotate dehydrogenase depletion hampers mitochondrial function and osteogenic differentiation in osteoblasts. *Eur J Oral Sci* 2016;**124**:241-5:10.1111/eos.12270

査読有

Monji K, Uchiumi T, Hoshizawa S, Yagi M, Matsumoto T, Setoyama D, *et al.* Serum depletion induced cancer stem cell-like phenotype due to nitric oxide synthesis in oncogenic HRas transformed cells.

*Oncotarget*

2016;**7**:75221-34:10.18632/oncotarget.12117

査読有

Feichtinger RG, Olahova M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, *et al.* Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies. *Am J Hum Genet* 2017 ;**101**:525-38:10.1016/j.ajhg.2017.08.015

査読有

Matsumoto T, Uchiumi T, Monji K, Yagi M, Setoyama D, Amamoto R, *et al.*

Doxycycline induces apoptosis via ER stress selectively to cells with a cancer stem cell-like properties: importance of stem cell plasticity.

*Oncogenesis*

2017;**6**:397:10.1038/s41389-017-0009-3

査読有

Matsushima Y, Hirofuji Y, Aihara M, Yue S, Uchiumi T, Kaguni LS, *et al.*

Drosophila protease ClpXP specifically degrades DmLRPPRC1 controlling

mitochondrial mRNA and translation. *Sci Rep* 2017;

**7**:8315:10.1038/s41598-017-08088-6

査読有

Saito T, Uchiumi T, Yagi M, Amamoto R, Setoyama D, Matsushima Y, *et al.*

Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses. *Cardiovasc Res*

2017;**113**:1173-85:10.1093/cvr/cvx095

査読有

Sasaki K, Gotoh K, Miake S, Setoyama D, Yagi M, Igami K, Uchiumi T, *et al.* p32

is Required for Appropriate Interleukin-6 Production Upon LPS Stimulation and Protects Mice from Endotoxin Shock. *EBioMedicine*

2017;**20**:161-72:10.1016/j.ebiom.2017.05.018

査読有

Uchiumi T, Kang D. Mitochondrial nucleic acid binding proteins associated with diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2017;**22**:168-79

査読有

Yagi M, Uchiumi T, Sagata N, Setoyama D, Amamoto R, Matsushima Y, *et al.*

Neural-specific deletion of mitochondrial p32/C1qbp leads to leukoencephalopathy due to undifferentiated oligodendrocyte and axon degeneration. *Sci Rep*

2017;**7**:15131:

10.1038/s41598-017-15414-5

査読有

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 14 件)

内海健、門司恵介、康東天 : Ras 依存的発

がんにおけるミトコンドリア形態と呼吸能の変化

第3回がん代謝研究会：2015

内海健、門司恵介、塩田真己、横溝晃：ミトコンドリア蛋白質 p32 の RAS 依存性発がん形質転換への関与：第 74 回日本癌学会 2015

内海健、八木美佳子、康東天：ミトコンドリアタンパク p32 の脳特異的ノックアウトマウスの分子基盤と新規診断マーカーの探索 第 55 回日本臨床化学会：2015

内海健、康東天：変異型 Ras 依存的ガンは血清除去によりミトコンドリア機能が変化する

第 62 回臨床検査医学会 2015

内海健、八木美佳子、康東天：白質脳症を示す神経特異的 C1qbp/p32 ノックアウトマウスの遺伝子発現、メタボローム解析：分子生物学会 2015

Takeshi Uchiumi Dongchon Kang：Cancer stem cell like phenotype induced by serum starvation in Eas transformed MEF cells due to Nitric oxide：The 9th international conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide 2016

内海健：変異型 Ras 依存的ガンは血清除去によりがん幹細胞様変化を示す：第 20 回日本癌分子標的治療学会 2016

Takeshi Uchiumi、Mikako Yagi、Dongchon Kang：Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses：第 16 回ミトコンドリア学会 2016

内海健、康東天：血清除去による NO (Nitric Oxide) 産生はがん幹細胞様変化を示す：日本臨床検査自動化学会 48 回大会 2016

内海健、康東天：ミトコンドリアタンパ

ク p32 の心筋特異的ノックアウトマウスの分子基盤とマーカー探索：臨床化学会，2016

内海健、康東天：ミトコンドリア病に関連する p32 の脳特異的ノックアウトマウスの分子基盤とマーカーの探索：第 63 回臨床検査医学会 2016.

内海健、康東天：がん幹細胞は環境に応じた可塑性を示し抗生剤によるがん治療の分子機序：第 49 回日本臨床検査自動化学会，2017

内海健、康東天：前立腺がん細胞株は sphere assay により癌幹細胞様変化をきたしドキシサイクリンの有効性の検証：第 64 回 日本臨床検査医学学術集会，2017

内海健、八木美佳子、康東天：ミトコンドリアシャペロン蛋白 p32 の変異解析と心筋特異的 p32KO マウス機能解析：第 17 回日本ミトコンドリア学会，京都 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.cclm2.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海健 (UCHIUMI Takeshi)

九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80253798

(2)研究分担者

松島雄一 (MATSUSHIMA Yuichi)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：20571342

瀬戸山大樹 (SETOYAMA Daiki)  
九州大学・医学研究院・助教  
研究者番号：30550850

(3)連携研究者

八木美佳子 (YAGI Mikako)  
九州大学・大学病院・学術研究員  
研究者番号：70536135

(4)研究協力者

( )