

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04822

研究課題名(和文) ミトコンドリア分解を起点とした恒常性維持システムの解析と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Integrated analyses of mitochondria degradation system as a novel therapeutic target of heart failure

研究代表者

大津 欣也 (OTSU, Kinya)

大阪大学・先導的学際研究機構・招へい教授

研究者番号：20294051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア特異的オートファジーによるミトコンドリア分解(マイトファジー)を起点としたミトコンドリア恒常性維持システムを解析し、心不全治療への応用を目指した基礎的検討を行った。新規ミトコンドリア分裂、マイトファジー誘導分子BCL2L13を発見し、その機構解析を行った。またマイトファジーやオートファジーの過程に関わる因子FKBP8、TSC2、TLR9の遺伝子改変動物についても病態モデルを用いた解析を行い、その機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of damaged mitochondria is involved in the pathogenesis and progression of heart failure. However, the precise role and molecular mechanism is not elucidated. We identified BCL2L13 as a novel mitophagy receptor on outer mitochondrial membrane. BCL2L13 binds to LC3 through the WXXI motif and induces both mitochondrial fragmentation and mitophagy not only in HEK293 cells but in isolated rat neonatal cardiomyocytes. Furthermore, we generated and analyzed cardiac-specific deficient mice of BCL2L13, TSC2 and FKBP8, and we revealed cardio-protective role of TSC2 and FKBP8.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで心筋細胞におけるオートファジーについての研究を行い、血行動態負荷や老化に伴う心筋細胞内の変性ミトコンドリア増加に対し、オートファジーによるミトコンドリアクリアランス能が相対的に充分ではないため、変性ミトコンドリアが蓄積し、心不全を発症させることを報告した (Nakai et al. *Nature Medicine* 2007, Taneike et al. *Autophagy* 2010)。さらに、圧負荷心においてオートファジー性分解の不全による遺残ミトコンドリア DNA 蓄積が、無菌的心筋炎並びに心不全を惹起することを見いだした (Oka et al. *Nature* 2012)。すなわち mitophagy によるミトコンドリアの完全な分解除去が、心不全発症抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかしながら、酵母における Atg32 (Dev Cell 2009)、赤芽球における Nix (PNAS 2007)、神経細胞における Parkin (JBC 2009) など mitophagy 必須分子はこれまでいくつか報告されてきたものの、心筋細胞を含む一般的な mitophagy 分子機構は未だ不明である。以前、私は種々のストレスによるミトコンドリア膜透過性遷移と膜電位喪失は Cyclophilin D (CypD) 依存性 pore によって発生することを報告しており (Nakagawa et al. *Nature* 2005)、この膜電位喪失が mitophagy 誘導に繋がると考えられているが、その分子機構に関しては未だ明らかではない。また近年注目されているミトコンドリア fusion/fission による形態変化において、fission を起こしたミトコンドリアは mitophagy による分解を受けやすいとされているが、その意義や分子機構の全貌は不明である。

以上より、mitophagy を起点としたミトコンドリア恒常性維持システムの解明により、変性ミトコンドリア蓄積と心不全発症を制御可能との仮説を立てた。本研究では、mitophagy を中心にその制御機構の多面的解析による分子機構の理解を通して、新規心不全治療分子標的を明らかにすることを目指す。

## 2. 研究の目的

心不全症例では心筋細胞内のミトコンドリア形態異常を伴うことが多いが、その制御機構については不明な点が多い。我々はこれまで、心筋細胞におけるオートファジー性ミトコンドリア分解 (mitophagy) の重要性を報告してきた。本研究では、私たちが新たに見いだしたミトコンドリア fission および mitophagy 誘導因子である Bcl 関連蛋白質の解析を始めとし、mitophagy を起点としたミトコンドリア恒常性維持システムを多面的に解析し、心不全治療への応用を目指した基礎的検討を行う。本研究を通して心疾患におけるミトコンドリア形態異常の責任分子を同定することで、その介入による心不全治療の可能性を探究し、新たな心不全治療分子標

的の探索を目指す。

## 3. 研究の方法

心不全発症における心筋細胞 mitophagy の分子機構の解明

酵母では mitophagy 特異的必須分子である Atg32 が同定されているが (Dev Cell 2009)、哺乳類細胞における mitophagy 関連分子として血球細胞における Nix (PNAS 2007) や神経細胞における Parkin (JBC 2009) が報告されているのみである。心筋細胞を含めた一般的な mitophagy においては、LC3 結合分子である他の未知の分子がその役割を担っている事が示唆される。mitophagy 分子機構を明らかにするため、以下の検討を行った。

(1) Atg32 と類似構造を持つ蛋白質の解析  
マウスのミトコンドリア蛋白質データベースの中から Atg32 と類似構造 (一回膜貫通型蛋白質、LC3 と結合する WXXL (I) モチーフの存在など) を有する蛋白質を検索・抽出し、LC3 を bait とする酵母 two-hybrid 法を用いて、LC3 との結合の有無を評価する。

(2) 酵母 two-hybrid 法による網羅的解析  
マウス心臓 cDNA から酵母 two-hybrid 法に用いるライブラリを作製し、LC3 結合蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いて検索、同定する。

### (3) 同定分子の機能解析

上記検討に於いて同定した因子の過剰発現もしくは欠失による mitophagy への影響を単離培養心筋細胞において前項の検出系によって検討し、その機能を明らかにする。またミトコンドリア呼吸鎖機能や活性酸素種産生、細胞死への影響を検討する。

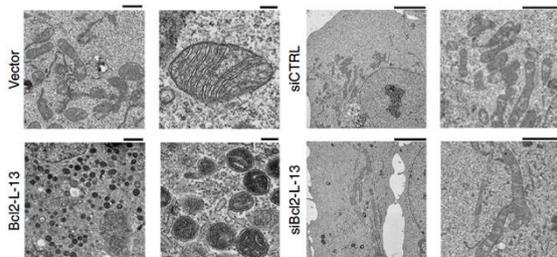
(4) mitophagy 関連分子への介入による心不全治療の検討

以上の結果を元に、心筋の mitophagy を増加させることにより心不全の進行を抑制できるかどうかを検討する。網羅的検索にて明らかにした心筋特異的 mitophagy 制御因子について、心筋特異的薬剤誘導性発現トランスジェニックマウス、心筋特異的欠損マウスを作製する。以上の遺伝子改変マウスを用いて圧負荷心不全モデル、心筋梗塞後心不全モデルを作製解析することにより、心不全における mitophagy の役割を明らかにし、治療へ効果を検討する。

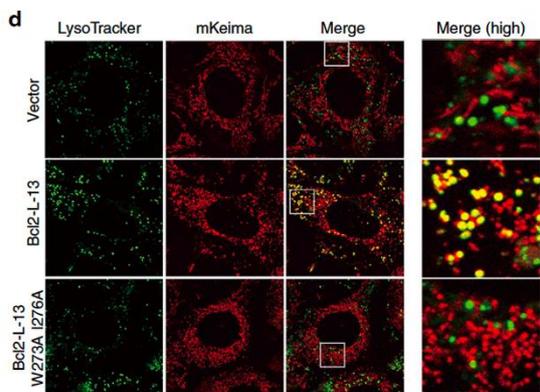
## 4. 研究成果

心不全症例では心筋細胞内のミトコンドリア形態異常を伴うことが多い。しかしながらその制御機構には不明な点が多い。心筋細胞内におけるミトコンドリアの融合・分裂やオートファジー性分解 (マイトファジー) に関わる新規因子の網羅的探索を行った。ミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジー必須分子として、酵母においては Atg32 が同定報告されているものの、哺乳類細胞における Atg32 の機能的ホモログは同定されていなかった。私たちは細胞死関連因子として知られる BCL2 関連蛋白質の一つであ

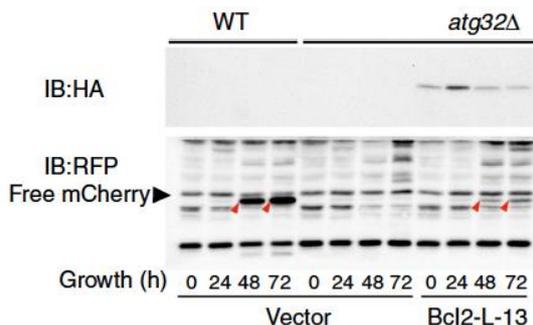
る BCL2L13 をマイトファジー関連因子の候補として発見同定した。BCL2L13 は Atg32 と同様にミトコンドリア外膜上に発現している膜一回貫通型タンパク質であり、WXXL/I モチーフを有する。下図の電子顕微鏡写真に示されるように、HEK293A 細胞において、BCL2L13 過剰発現によりミトコンドリアは分裂するが、逆に siRNA を用いたノックダウンによりミトコンドリア伸長が認められた。



この分裂誘導には BCL2L13 に存在する BH ドメインが関与しており、BH ドメイン欠失変異体ではミトコンドリア形態変化は誘導されなかった。さらに BCL2L13 は LIR モチーフを介してオートファジー関連蛋白質である LC3 と結合し、ミトコンドリア特異的オートファジーを誘導することを明らかにした。LIR モチーフの変異体 BCL2L13 はミトコンドリア分裂を誘導可能であったが、下図黄色色の mKeima (ミトコンドリア) と LysoTracker (リソソーム) の共局在で示されるマイトファジーは誘導されなかった。既報で示されたような、BCL2L13 によるアポトーシス性細胞死誘導能は本条件下では認められなかった。



また Atg32 欠損酵母はマイトファジー誘導能を喪失しているが、BCL2L13 強制発現により、マイトファジー誘導刺激によりマイトファジー分解産物である遊離 mCherry の出現

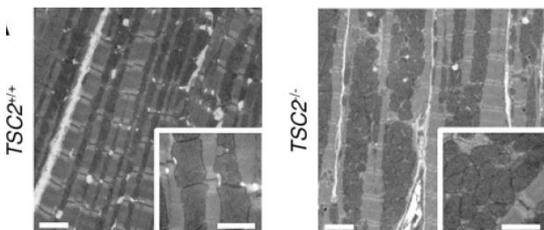


(赤矢印) が認められた。すなわち BCL2L13 は Atg32 の哺乳類細胞における機能的ホモログであることが明らかとなった。

以上の結果から、BCL2L13 はミトコンドリアの分裂を誘導するとともに、ミトコンドリア外膜上にて LC3 と結合することでマイトファジーレセプターとしての機能を果たすことが示された。すなわち酵母で Dnm1 および Atg32 の分子が果たしている役割の一つの分子で担っていた。(雑誌論文⑨⑩⑪)

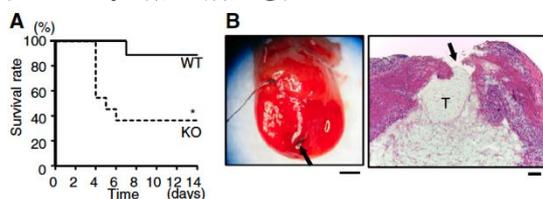
続いて、上記の検討にて同定した BCL2L13 の心筋細胞における評価を行った。BCL2L13 過剰発現アデノウイルスベクター及び BCL2L13 遺伝子抑制 shRNA 発現アデノウイルスベクターを初代培養新生仔ラット心筋細胞に感染させ、48 時間後に BCL2L13 の発現及びノックダウンについてウエスタンブロットにて評価した。心筋細胞においても継代培養細胞と同様に BCL2L13 の過剰発現によりミトコンドリアの fragmentation が誘導され、BCL2L13 のノックダウンによりミトコンドリアの伸長が観察された。この結果より BCL2L13 は心筋細胞においてもミトコンドリアダイナミクスに重要な役割を果たすことが示唆された。引き続き、BCL2L13 の過剰発現及び knockdown 下において、酸化ストレスや GPCR アゴニストなど種々のストレスに対する心筋細胞の応答性変化について検討を行う。さらに心臓組織における BCL2L13 の生理学的および病態的意義を評価するために、Cre-loxP システムを用いた心筋特異的遺伝子改変動物の作出を行った。targeting vector を作製し、相同組み換え体の ES 細胞をスクリーニングし、ES 細胞クローンのインジェクションにより、floxed allele を持つマウスを得た。本マウスを心筋特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配し、目的の遺伝子改変マウスを得た。

さらに我々はオートファジー制御機構に着目し、心筋細胞特異的 TSC2 欠損マウスを作成解析した。その結果 TSC2-mTORC1 を介したシグナル伝達機構が、心筋細胞のミトコンドリア品質や形態 (下図電子顕微鏡写真) に影響を及ぼすことで心機能維持に機能していることを明らかにした。(雑誌論文⑧)

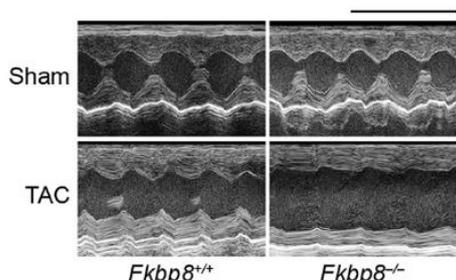


我々はマイトファジー後にミトコンドリア分解不全が起ると、自然免疫レセプターである TLR9 を介した炎症反応ならびに心不全が惹起されることを報告している。TLR9 欠損マウスを用いて、心筋梗塞後における TLR9 の機能解析を行った。その結果、TLR9 は心筋梗塞後の炎症反応に関与していないものの、

TLR9 欠損マウスでは野生型マウスと比し、有意に心筋梗塞後心破裂が惹起されることが明らかとなった (下図)。この分子機構として、TLR9 が心臓線維芽細胞の増殖と分化誘導を介して、心保護的に作用していることが示唆された。(雑誌論文⑥)



次にミトファジーのほ乳類機能的ホモログ候補として BCL2L13 と共に同定した FKBP8 についても、Cre-loxP システムによる心筋細胞特異的欠損マウスを作製・解析を行った。同マウスは横行大動脈縮窄圧不可刺激によって、下図の心臓超音波検査結果に示すとおり、対照群と比し容易に心機能低下と心不全状態に陥った。FKBP8 がストレス応答において、異常タンパク質集積を阻害することで、心臓保護的に機能していることを明らかにした。(雑誌論文②)



## 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 12 件)

① Mitochondrial DNA as an inflammatory mediator in cardiovascular diseases.

Nakayama H, Otsu K. Biochem J. 2018;475:839-852 (査読有)

② FKBP8 protects the heart from hemodynamic stress by preventing the accumulation of misfolded proteins and endoplasmic reticulum-associated apoptosis in mice. Misaka T, Murakawa T, Nishida K, Omori Y, Taneike M, Omiya S, Molenaar C, Uno Y, Yamaguchi O, Takeda J, Shah AM, Otsu K. J Mol Cell Cardiol. 2018;114:93-104 (査読有)

③ Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. Molkenstein JD, Bugg D, Ghearing N, Dorn LE, Kim P, Sargent MA, Gunaje J, Otsu K, Davis J. Circulation. 2017;136:549-561 (査読有)

④ Inflammation and metabolic cardiomyopathy. Nishida K, Otsu K. Cardiovasc Res. 2017;113:389-398 (査読有)

⑤ Sterile Inflammation and Degradation Systems in Heart Failure. Nishida K, Otsu K. Circ J. 2017;81:622-628 (査読有)

⑥ Toll-like receptor 9 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice independently of inflammation. Omiya S, Omori Y, Taneike M, Protti A, Yamaguchi O, Akira S, Shah AM, Nishida K, Otsu K. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;311:H1485-H1497 (査読有)

⑦ Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. Nakayama H, Nishida K, Otsu K. Circ Res. 2016;118:1577-92 (査読有)

⑧ mTOR Hyperactivation by Ablation of Tuberous Sclerosis Complex 2 in the Mouse Heart Induces Cardiac Dysfunction with the Increased Number of Small Mitochondria Mediated through the Down-Regulation of Autophagy. Taneike M, Nishida K, Omiya S, Zarrinpashneh E, Misaka T, Kitazume-Taneike R, Austin R, Takaoka M, Yamaguchi O, Gambello MJ, Shah AM, Otsu K. PLoS One. 2016;11:e0152628 (査読有)

⑨ Receptor-mediated mitophagy. Yamaguchi O, Murakawa T, Nishida K, Otsu K. J Mol Cell Cardiol. 2016;95:50-6 (査読有)

⑩ Autophagy during cardiac remodeling. Nishida K, Otsu K. J Mol Cell Cardiol. 2016;95:11-8 (査読有)

⑪ BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32. Otsu K, Murakawa T, Yamaguchi O. Autophagy. 2015;11:1932-3 (査読有)

⑫ Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikosho S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K. Nat Commun. 2015;6:7527 (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大津 欣也 (OTSU, Kinya)

大阪大学・先導の学際研究機構・招へい教授

研究者番号：20294051

### (2) 研究分担者

山口 修 (YAMAGUCHI, Osamu)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90467580

彦惣 俊吾 (HIKOSO, Shungo)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：30423164

### (4) 研究協力者

村川 智一 (MURAKAWA, Tomokazu)