

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19435

研究課題名(和文)心筋過伸展によるメカノストレスがミトコンドリア内膜破壊をきたす分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of inner mitochondrial collapsing in response to acute cardiac overstretch.

研究代表者

草刈 洋一郎 (Kusakari, Yoichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80338889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋過伸展でミトコンドリア内部が空砲化(内膜崩壊)する機序を調べた。ラット右室乳頭筋を用い、20%過伸展させ、電子顕微鏡観察を行った。条件を、1)過伸展解除、2)外液Ca濃度変化、3)ミトコンドリア膜に存在する小さな孔(mPTP)の開口阻害、と変化させ、それぞれ確認した。過伸展による内膜崩壊は数分で発症するが、過伸展解除しても内膜崩壊は抑制・回復はされなかった。外液Ca濃度に依存する可能性は低かった。mPTP開口阻害で、内膜崩壊が20%程度抑制される可能性が示唆された。これらの結果から、過伸展によるミトコンドリア内部崩壊はミトコンドリア膜を介したCa流入が一つの原因であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで経験的に知られていた心筋過伸展の分子メカニズムの一部を解明した。今後は病態時心筋の過伸展による影響を検討する。このことは、心不全の発症メカニズムを探る貴重なデータになると確信している。過伸展による微細形態構造変化への影響は未知な部分が多いため、今後の研究で心不全治療や抑制を来す、新たなターゲットとなる分子機構や創薬に繋がると思われる。心移植になる前の予防にも重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed acute overstretch on cardiac papillary muscle to investigate the mechanisms in morphological changes in mitochondria. We overstretched right ventricle papillary muscle within 2 seconds. We analyzed the morphological changes using a Transmission electron microscopy (TEM). In TEM study, inner mitochondrial empty space was found after overstretch, indicating that inner mitochondria cristae were susceptible to deterioration. We investigated the effect of 1) overstretch release, 2) changes in Ca concentrations and 3) inhibiting mPTP (mitochondrial permeability transition pore) on acute overstretch. Releasing overstretch and changes in Ca concentration did not alter the inner mitochondrial collapsing. The inner mitochondrial collapsing was 20% reduced by inhibiting mPTP. It indicates that the mitochondrial collapsing was partly due to by Ca entering to mitochondrial inner space through mPTP.

研究分野：心筋の病態生理学

キーワード：ミトコンドリア 心筋 張力 過伸展

1. 研究開始当初の背景

心筋過伸展による張力減弱の原因を組織レベルで検討する過程で、応募者らは、心臓への過度な伸展ストレスは、わずか数分単位でミトコンドリアの内部崩壊を誘発することを発見し、内部崩壊によって損傷したミトコンドリアはかなり早いタイミングで貪食され、修復起点が短時間で起動される仮説が支持されることを見出している。このことは生体において、短時間でミトコンドリアをスクラップアンドビルド(破壊と修復)させることで品質管理している、という未知の学術基盤を創造する。本研究は、これまで常識とされていた、臓器損傷は機能発現細胞の損傷により発現する、という概念を根本的に覆し、病態起源が機能発現細胞に存在するミトコンドリアの破壊・修復に依存し得る、という新規病態メカニズムの提唱とその解明を推進することになる。本研究における最大の特徴は、短時間で起こるミトコンドリアのストレスへの脆弱性・復元性を確認し、その分子メカニズム(特に短時間で発動するメカニズム)を明らかにすることである。ミトコンドリアの分裂・融合に関する詳細な分子機構、ミトコンドリアのイメージングを用いた変性動態の解明は、神経系疾患を中心に精力的な研究が近年多く報告されている。一方で、ストレスとミトコンドリアの修復過程を示す形態変化については、報告はほとんどない、特にわずか数分単位で発動するミトコンドリア破壊・修復に関してはまったく報告がない。

過度のストレスは、わずか数分単位でミトコンドリア破壊が起こす壊れた異常ミトコンドリアが、ほぼ即座にライソゾームに食されるという新しい仮説を契機に、

短時間で発動する修復起点の詳細な分子メカニズム

過度のストレスに伴うミトコンドリア 筋小胞体接触領域の変化

ミトコンドリア内膜破壊・修復と ATP 産生能・ROS 産生・イオン動態・機能変化

以上のことを探索していく。

2. 研究の目的

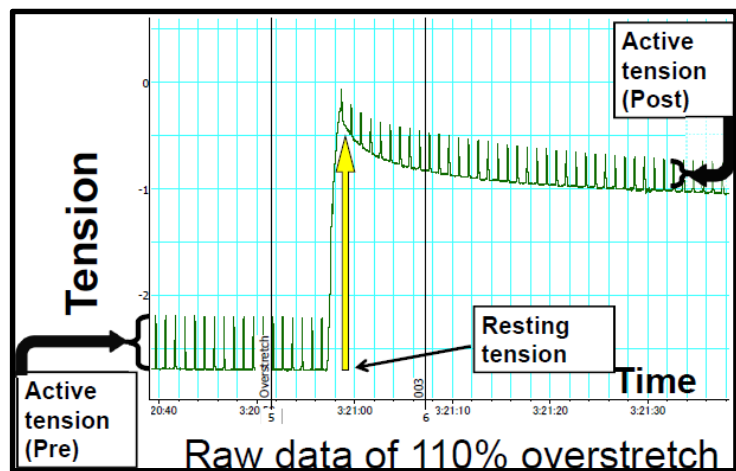
短時間での定量的・定時的なストレスと、短時間で発動するミトコンドリアの破壊・修復に伴う機能変化との関係性を評価することで、本研究は、これまでほとんど検討されてこなかった、病態起源が機能発現細胞に存在するミトコンドリアの破壊・修復に依存し得る、という新規病態メカニズムの提唱とその解明を推進することを目的とする。さらに心筋過伸展で生ずるミトコンドリア内部破壊の分子メカニズムを明らかにするとともに、収縮への波及効果を確認する。



3. 研究の方法

ラット右室乳頭筋を採取し、最大張力を発生する筋長(Lmax)まで伸展する。

伸展後、Lmax から 10%もしくは 20%過伸展を 2 秒以内に行い、張力変化を測定する。そのままの過伸展状態でグルタルアルデヒド固定にて標本作成し、電子顕微鏡観察を行う。また、過伸展解除も実施し、過伸展解除後のミトコンドリア内部構造も明らかにする。過伸展時に起こり得る Ca 過負荷の可能性を考え、外液 Ca 濃度を変化させた実験を行う(1mM, 2mM, 8mM)。ならびに過伸展時にミトコンドリア膜に存在する小さな孔(mPTP)の開港阻害をシクロスポリンで実施し、その後のミトコンドリア内部崩壊の変化を確認する。



4. 研究成果

過伸展で発症するミトコンドリア内部崩壊は、非常に短い時間で起こることが示唆された。さらに過伸展 5 分後に過伸展解除しても、ミトコンドリア内部崩壊は治癒されていないことも示唆された。一方で、外液 Ca 濃度を変化させ、過伸展を行ったところ、生体内の Ca 濃度に比較的近い 2mM が一番張力保持されていたが、ミトコンドリア内部崩壊は外液 Ca 濃度に依存しない可能性が示唆された。シクロスポリン投与では、ミトコンドリア内部崩壊が 20%程度の抑制される可能性が示唆された。これらの結果から、過伸展によるミトコンドリア内部崩壊はミトコンドリア膜を介した Ca 流入が一つの原因であることが考えられた。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

我々は更に、生体内で起こり得る様々な過度のストレスを動物モデルの心臓に与えて、その際に起きる機能変化とミトコンドリアの形態関係を評価し、短時間で始まるミトコンドリア破壊と、ほぼ同時に起動する可能性がある修復メカニズムを詳細に解明し、**ミトコンドリアはおそらくかなりの短時間でスクラップアンドビルド(破壊と修復)させることで品質管理している**、という新規概念を提唱する確信を得た。

具体的には、ラット肺動脈狭窄を30秒間施行し、その後狭窄を開放した。本研究室で施行したミラーカテーターによるラット右室における容量-圧曲線を右上図に示す。肺動脈絞扼時、横軸の容量と縦軸の圧が増加していることが示されている。この状態を30秒間保持し、その後狭窄を開放する。30分後、機能評価を行った。圧-容量曲線でも明らかのように、ループは狭窄前と同程度のループを描いた。このことは、機能的には十分に回復したことを示す。一方で、形態評価を施行したところ、右下図のようにミトコンドリア破壊が起きていることが確認され、破壊が起きたミトコンドリアが貪食された画像を得ることができた。

現在、ミトコンドリアの内部構造(クリステ)を維持する薬を事前投薬すること、ならびに乳頭筋で確認されたシクロスポリン投与での結果の解析を進めている。

当初の仮説と異なり、ミトコンドリアの形態変化が必ずしも機能変化と相関していない結果となっている。今後は、ATP産生にも着目し、機能変化と併せて解析することで、形態変化と機能変化とエネルギー変化の3要素を含めた病態解析の予想を可能とする計画を検討している。

次のステップとして、

○**内膜破壊とミトコンドリア機能の関連性の探索:**

ミトコンドリア内膜破壊に伴う、ATP産生量の変化の解析。

○**局所性の探索:**

ミトコンドリアの破壊・修復がどこの部分から始まっているかの探索。

特に小胞体とミトコンドリアとの接触部位[mitochondria-associated ER membrane (MAM)]に焦点を当てる。

○**微細形態変化の3次元構築によるメカニズムの探索:**

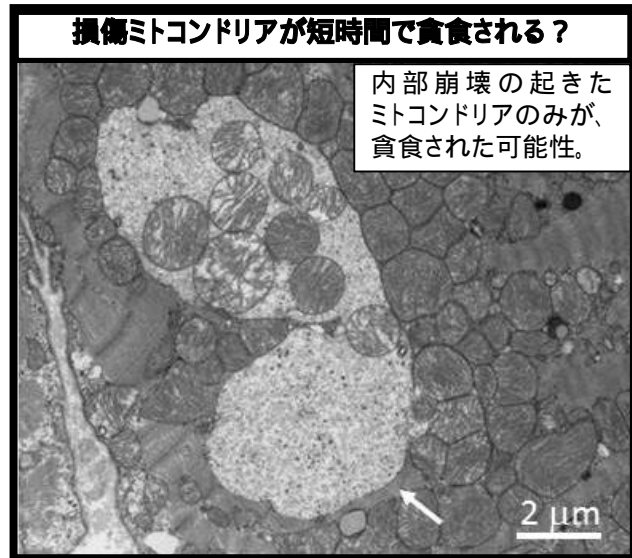
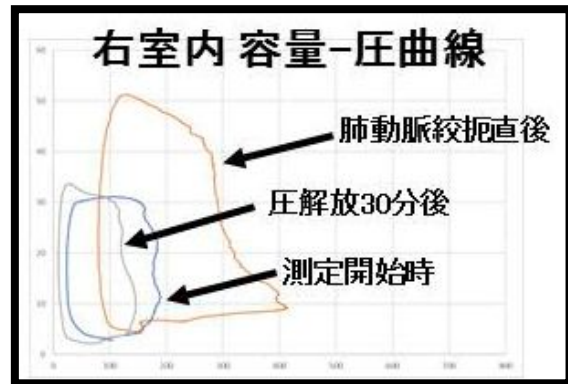
2次元では明らかにできない形態変化の追跡。

○**病態モデルでの検討:**

糖尿病モデル、心筋梗塞モデルで同様の実験を施行する。

病態と形態機能変化の関係を見出すことで、新たな病態解析を進める。

以上の実験を更に進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakai Gaku, Shimura Daisuke, Uesugi Ken, Kajimura Ichige, Jiao Qibin, Kusakari Yoichiro, Soga Tomoyoshi, Goda Nobuhito, Minamisawa Susumu	4. 巻 34
2. 論文標題 Pyruvate dehydrogenase activation precedes the down-regulation of fatty acid oxidation in monocrotaline-induced myocardial toxicity in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 545 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00380-018-1293-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adaniya Stephanie M., O-Uchi Jin, Cypress Michael W., Kusakari Yoichiro, Jhun Bong Sook	4. 巻 316
2. 論文標題 Posttranslational modifications of mitochondrial fission and fusion proteins in cardiac physiology and pathophysiology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C583 ~ C604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Cao Jessica L., Adaniya Stephanie M., Cypress Michael W., Suzuki Yuta, Kusakari Yoichiro, Jhun Bong Sook, O-Uchi Jin	4. 巻 663
2. 論文標題 Role of mitochondrial Ca ²⁺ homeostasis in cardiac muscles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 276 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nishioka N, Kusakari Y, Tanihata J, Minamisawa S.
2. 発表標題 Acute Diastolic Overstretch Causes Abrupt Inner Mitochondrial Collapsing of Isolated Rat Papillary Muscle.
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2018. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草刈 洋一郎、西岡 成知、谷端 淳、南沢 享.
2. 発表標題 心筋ストレスが誘導する心組織の形態機能変化.
3. 学会等名 生理学研究所研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishioka N, Kusakari Y, Tanihata J, Minamisawa S.
2. 発表標題 Acute Overstretch Causes Abrupt Inner Mitochondrial Collapsing of Rat Papillary Muscles.
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kusakari Y, Nishioka N, Tanihata J, Minamisawa S.
2. 発表標題 Vitamin B1 pretreatment prevents cardiac mitochondrial morphology from ischemia/reperfusion injury.
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	三尾 寧 (Mio Yasushi) (00266686)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	立花 利公 (Tachibana Toshiaki) (80163476)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	
研究分担者	岩本 武夫 (Iwamoto Takeo) (90568891)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	