

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461132

研究課題名(和文) グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 のミトコンドリア移行抑制による心不全治療の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach for heart failure by suppression of mitochondrial translocation of GSK-3beta

研究代表者

丹野 雅也 (Tanno, Masaya)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00398322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GSK-3 活性によるミトコンドリア透過性遷移孔(mPTP)開孔の機序解明を目的として研究を行った。(1) GSK-3 は voltage dependent anion channel 2との相互作用によりミトコンドリアへ移行すること、(2) N末端のK15がミトコンドリア移行シグナルの機能に重要であること、(3) GSK-3 の上流のERKおよびAktは酸化ストレスによりミトコンドリアへ移行し、脱リン酸化されること(4) ERKおよびAktの特異的な脱リン酸化酵素であるDusp5およびPHLPP1は酸化ストレスによりミトコンドリアへ移行することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanisms by which activity of GSK-3beta promotes opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). The experiments yielded the following results:

(1) Interaction of GSK-3beta with voltage dependent anion channel 2 mediate mitochondrial translocation of GSK-3beta. (2) Lysine 15 at the N terminus of GSK-3beta plays an important role in the function of N-terminal region as a mitochondria targeting signal. (3) ERK and Akt, upstream kinases of GSK-3beta, translocate to the mitochondria and are dephosphorylated in response to oxidative stress. (4) Dusp5 and PHLPP-1, specific phosphatases for ERK and Akt, respectively, also undergo mitochondrial translocation under oxidative stress.

研究分野：心不全

キーワード：ミトコンドリア透過性遷移孔 細胞死 グリコーゲン合成酵素キナーゼ3beta

1. 研究開始当初の背景

近年本邦では、糖尿病や高血圧などの生活習慣病およびその合併症として冠動脈疾患の増加が顕著である。これらの疾患はいずれも最終的に心不全発症をもたらす。臨床試験によりβ遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 / アンジオテンシン受容体遮断薬、アルドステロン拮抗薬が心不全の予後を改善することが示されており、現在の心不全の内科的治療は神経体液性因子の阻害が中心である。しかし、これらの薬物治療に加えて、非薬物療法（植え込み型除細動器、心室再同期療法などのデバイス、運動療法、睡眠時呼吸障害への介入など）を併用しても重症心不全の死亡率は極めて高く、NYHA Class III-IVの重症心不全は1年生存率がそれぞれ80%、40%と極めて予後が悪い（Braunwald's Heart Disease, 2011, 9th edition）。臓器移植法の改正により心臓移植の件数は増加し、特に本邦では移植後の良好な成績が得られているが、ドナー数の絶対的不足からその恩恵を受けるのは適応患者のごく一部であり、最重症のステータス1の症例でも平均待機時間は3年におよぶ。心筋再生治療研究は着実に進歩しておりその将来性は囑望されるが、現時点では実用化にはいたっていない。このように心不全は社会的な問題となりつつあり、新しい心不全治療の開発が待望される状況である。

2. 研究の目的

心不全の病態は多因子により形成されるが、その中心的な役割を担うのが持続的、進行性の心筋細胞死である（Kostin et al. Circ Res 2003）。心不全患者の心筋組織では酸化ストレスのレベルが増加しており心筋細胞死を促進する。酸化ストレスによる細胞死はミトコンドリア内膜上に存在するミトコンドリア透過性遷移孔（mPTP）の開孔により惹起される。mPTPが開孔すると分子量1.5 kDa以下の分子が非選択的に通過する。これによってミトコンドリアの膜電位が消失しATP産生が停止する。またミトコンドリアの膨張により外膜が破綻しミトコンドリア機能が消失する。心筋虚血再灌流障害による心筋壊死においてはmPTP開孔が主要な細胞死の機序であるが、mPTPの慢性的かつ部分的な開孔は不全心での持続的な心筋細胞死にも寄与する（Hafner et al. Aging 2010）。我々はこれまでに酸化ストレスによるmPTP開孔の制御にはGSK-3β活性が重要な役割を担うことを示した（Terashima et al. J Mol Cell Cardiol 2010）。これらの成績から、GSK-3β活性を阻害すれば心筋細胞死を抑制し心不全の発症進展を抑制できる可能性がある。GSK-3βの機能制御は、Ser9リン酸化による活性抑制が知られる。しかしGSK-3βは細胞内に広く分布し多彩な機能を有するため、一律に阻害することにより代謝障害、心筋肥大や発癌などの有害事象が惹起され得る。こういった有害事象を回避しつつ心筋細胞死を

選択的に抑制するためにはmPTP開孔に特異的に寄与する機序の解明、その修飾が有効である可能性がある。

GSK-3βの活性制御にはSer9リン酸化のほかに scaffold 蛋白との相互作用や細胞内局在変化が寄与する（Miura and Tanno. Cardiovasc Res 2010）。mPTPの開孔促進/抑制はミトコンドリア内でのGSK-3βの活性により修飾されると考えられるため、GSK-3βのミトコンドリア移行の機序や、ミトコンドリア内でのGSK-3βのリン酸化状態に影響を及ぼす上流のkinase/phosphataseの細胞内局在変化、活性制御を解明することにより、mPTP開孔のみを選択的かつ直接抑制する治療介入に結びつけることができる可能性が考えられる。

3. 研究の方法

(1) GFP標識した野生型GSK-3β（WT）、恒常活性型変異GSK-3β（S9A）、不活性型変異GSK-3β（K85R）プラスミドを作成する。これらのプラスミドを心筋細胞に導入し酸化ストレス（過酸化水素, 10 μmol/L）暴露下にtime-lapse顕微鏡で観察し、酸化ストレスによるGSK-3βのミトコンドリア移行の有無とそれに対するGSK-3β活性の影響を検討する。

(2) GSK-3βの阻害薬であるLiCl（30 mmol/L）の存在下で酸化ストレスによるGSK-3βのミトコンドリア移行を観察し、キナーゼ活性がおよぼす影響を検討する。

(3) 過酸化水素によるGSK-3βのミトコンドリア移行が、さらなる活性酸素種（ROS）の産生増加をもたらすかを、H9c2細胞をDCF染色することにより定量評価する。

(4) 超解像顕微鏡（ニコン、N-SIM）によるtime-lapse観察を用いて、ミトコンドリアが過酸化水素刺激により膨化、断裂していく様子をmPTP開孔の指標として観察する。野生型GSK-3β（WT）のトランスフェクションがミトコンドリアの膨化、断裂におよぼす影響を確認する。

(5) GSK-3βのミトコンドリア移行の機序に関するこれまでの我々の検討では、摘出灌流心における虚血再灌流後にミトコンドリア外膜上の輸送体であるTOM20とGSK-3βが結合するという成績を得ている（Nishihara et al. J Mol Cell Cardiol 2007）。そこで、GSK-3βのミトコンドリア移行の機序をさらに詳細に解明するために以下の2つの仮説をたてた。[仮説A] 酸化ストレス下でGSK-3βは他のミトコンドリア移行蛋白（以下Protein-Xとする）と結合し受動的にミトコンドリアへ輸送される。

[仮説B] GSK-3βのN末端のアミノ酸配列がミトコンドリア移行シグナルとして機能する。

仮説Aを検証するために以下の実験をおこ

なう。

心筋細胞を酸化ストレスに暴露し、細胞質分画で GSK-3 β との結合が増加する蛋白を検索する。GSK-3 β 抗体による免疫沈降物を二次元電気泳動し、酸化ストレスの有無で差異を認めるスポットを抽出し、TOF/MS により蛋白を同定する。

GSK-3 β との結合が増加した蛋白を、順次 siRNA 法で発現抑制させた上で GSK-3 β のミトコンドリア移行が受ける影響を観察する。これにより、Protein-X を同定する。

Protein-X の発現抑制が実際に mPTP の開孔を抑制するかを検討する。

Protein-X と GSK-3 β の一連の欠失変異体および点変異体を作成することによりそれぞれの結合部位を同定する。

古典的なミトコンドリア移行シグナル (MTS) は N 末端の 20-30 個程度のアミノ酸で塩基性アミノ酸および 2、3 個の疎水性アミノ酸の繰り返しで構成される配列である (Ohmura et al. J Biochem 1998)。MTS 予測アルゴリズム (Guda et al. Bioinformatics 2004) では GSK-3 β が MTS を有する可能性が示唆される。そこで、N 末端の塩基性アミノ酸に点変異を挿入し、酸化ストレスによるミトコンドリア移行が抑制されるかを観察する。

Protein-X の発現を恒常的に抑制すれば GSK-3 β のミトコンドリア移行が抑制されると考えられる。しかし、Protein-X の生理的な機能の喪失によって、同時に有害事象も惹起され得る。同様に MTS の除去は GSK-3 β のミトコンドリア移行に伴う細胞死を抑制する可能性があるが、重要なリン酸化部位 (Ser9) が消失するため、GSK-3 β の生理機能が失われる。そこで、Protein-X と GSK-3 β の結合部位や MTS の相補性ペプチドを設計し (Campbell et al. Microbiol Immunol 2002)、Protein-X と GSK-3 β の結合や MTS の機能のみを選択的に阻害したい。これによって GSK-3 β の持つ生理機能に影響を与えずに、病的ストレスが惹起する心筋細胞死のみを抑制できる可能性がある。

設計した相補性ペプチドが mPTP 開孔および細胞死の抑制効果を有するか、心筋細胞や H9c2 細胞を含む複数の細胞株を用いて in vitro で確認する。

将来的な臨床応用を念頭に置き、心不全モデル動物においてこの相補性ペプチドの delivery 法を確立しその効果を確認する。また原因の異なる心不全に対して相補性ペプチドの有効性が異なるかを確認するために、複数の心不全モデルを用いて検討する。

次に仮説 B を検証するために以下をおこなう。古典的なミトコンドリア移行シグナル (MTS) は N 末端の 20-30 個程度のアミノ酸で塩基性アミノ酸および 2、3 個の疎水性ア

ミノ酸の繰り返しで構成される配列である (Ohmura et al. J Biochem 1998)。MTS 予測アルゴリズム (Guda et al. Bioinformatics 2004) では GSK-3 β が MTS を有する可能性が示唆される。そこで、N 末端の塩基性アミノ酸に点変異を挿入し、酸化ストレスによるミトコンドリア移行が抑制されるかを観察する。

(6) GSK-3 β のミトコンドリア内での局在、上流のキナーゼである Akt ならびに ERK、さらに Akt 特異的なフォスファターゼである PHLPP-1 ならびに ERK 特異的なフォスファターゼである DUSP の局在を検討する。H9c2 細胞からミトコンドリアを単離し、培養液にトリプシンを添加して培養する。トリプシンによりミトコンドリア外膜および内膜がトリプシン濃度/培養時間依存性に digestion されることを利用し、ミトコンドリア外膜、内膜上に局在する GSK-3 β 、Akt、ERK、PHLPP-1 ならびに DUSP 蛋白量およびリン酸化状態を評価する。

(7) PHLPP-1 および DUSP を siRNA 法により発現抑制し、ミトコンドリア内膜および外膜での GSK-3 β のリン酸化状態を定量する。さらに、過酸化水素により誘導される細胞死を溶媒中の LDL 活性で評価し、上流のフォスファターゼにより制御されるミトコンドリア内での GSK-3 β リン酸化が mPTP の開孔制御を介して細胞死の抑制に寄与するかを検討する。

4. 研究成果

(1) GFP 標識した野生型 GSK-3 β (WT)、恒常活性型変異 GSK-3 β (S9A)、不活性型変異 GSK-3 β (K85R) を心筋細胞に導入し過酸化水素 (10 μ mol/L) 暴露下に time-lapse 顕微鏡で観察した。WT および S9A は速やかにミトコンドリアに移行したが、K85R は細胞質にとどまった。GSK-3 β のミトコンドリア移行は細胞膜の破綻、すなわち細胞壊死を誘導した。したがって、GSK-3 β のミトコンドリア移行は自身のキナーゼ活性に依存することが示唆された。

(2) GSK-3 β の阻害薬である LiCl (30 mmol/L) の存在下では酸化ストレスによる WT のミトコンドリア移行は抑制された。よってキナーゼ活性依存の GSK-3 β のミトコンドリア移行が支持された。

(3) DCF 染色を用いて酸化ストレスを定量評価したところ、GSK-3 β のミトコンドリア移行は活性酸素種の産生を増加させ、ミトコンドリアへ移行した GSK-3 β がさらに活性酸素酸性を増幅させることが示された。

(4) 超解像顕微鏡 (ニコン、N-SIM) による time-lapse 観察では管状であったミトコンドリアが過酸化水素刺激により膨化、断裂

し、細胞死の原因は mPTP 開孔によることが示唆された。以上の成績から、酸化ストレスに暴露された心筋細胞では、GSK-3 β がその酵素活性依存性にミトコンドリアに移行し、活性酸素種産生増加を介して mPTP 開孔を促進させ、最終的に心筋細胞死を誘導することが示唆される。

(5) H9c2 細胞において過酸化水素刺激により GSK-3 β との相互作用が増加した蛋白のひとつとして voltage dependent anion channel 2 (VDAC2) が同定された。VDAC の発現を siRNA 法により抑制したところ、過酸化水素刺激に対する GSK-3 β のミトコンドリアへの移行が有意に抑制され、超解像顕微鏡で観察したミトコンドリアの膨化、断裂が阻害され、溶媒中の LDH 活性で評価した細胞死が減少した。したがって、GSK-3 β のミトコンドリアへの移行、mPTP 開孔促進の機序のひとつとして、VDAC2 との相互作用が挙げられる。次に、GSK-3 β の N 末端がミトコンドリア移行シグナルとして機能する可能性を検討するために、N 末端の塩基性アミノ酸、すなわち Arg4, Arg6 および Lys15 を Ala に置換し (R4A, R6A, K15A)、酸化ストレスによるミトコンドリア移行を野生型 (WT) と比較検討したところ、R4A は WT 同様にミトコンドリア移行したものの、R6A および K15A のミトコンドリア移行は有意に抑制された。すなわち GSK-3 β の N 末端がミトコンドリア移行シグナルとして機能し Arg6 および Lys15 が重要な役割を果たすことが示された。

(6) GSK-3 β とその上流のキナーゼである Akt, ERK および Akt 特異的なフォスファターゼである PHLPP-1, ERK 特異的なフォスファターゼである DUSP のミトコンドリア内での蛋白量、局在を検討した。

H9c2 細胞の培養液中に過酸化水素 (100 $\mu\text{mol/L}$) を添加することによりミトコンドリア全体に局在する GSK-3 β は増加し、ミトコンドリア外膜および内膜のいずれにおいても増加した (外膜>内膜)。一方、上流の Akt および ERK も過酸化水素刺激により GSK-3 β 同様にミトコンドリア局在が増加し、Akt は外膜、内膜にほぼ均等に、ERK は外膜に主に分布した。PHLPP-1 は Akt と同様に外膜、内膜のいずれにおいても増加したが、内膜での増加が優位であった。

DUSP には ERK 特異的なアイソフォームである DUSP5 および DUSP6 があり、これまでは、それぞれ核および細胞質に局在することが報告されてきた。DUSP6 は既報の結果と一致してミトコンドリア分画での局在は確認されなかった。しかし、核分画の混在を慎重に除外したミトコンドリア分画においても DUSP5 蛋白が存在することがウェスタンブロッティングによって確認された。DUSP5 は過酸化水素刺激により主に外膜において増加した。酸化ストレスによる mPTP 開孔を抑

制し細胞死を減少させる IGF-1 を溶媒に添加すると、GSK-3 β , Akt, ERK はミトコンドリア外膜、内膜のいずれでもリン酸化されたが、さらに過酸化水素を添加することにより、これらのキナーゼは外膜、内膜のいずれにおいても脱リン酸化され、IGF-1 の mPTP 開孔抑制作用は消失した。これらの成績から、酸化ストレスによりミトコンドリアへ移行する PHLPP-1 および/または DUSP5 による Akt および/または ERK の脱リン酸化により GSK-3 β のリン酸化レベルが低下することが mPTP 開孔、細胞死促進に寄与すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

Tobisawa T, Yano T, Tanno M, Miki T, Kuno A, Kimura Y, Ishikawa S, Kouzu H, Nishizawa K, Yoshida H, Miura T. **Insufficient activation of Akt upon reperfusion because of its novel modification by reduced PP2A-B55 α contributes to enlargement of infarct size by chronic kidney disease.** Basic Res Cardiol. 2017;112:31(査読有)

Nishizawa K, Yano T, Tanno M, Miki T, Kuno A, Tobisawa T, Ogasawara M, Muratsubaki S, Ohno K, Ishikawa S, Miura T. **Chronic treatment with an erythropoietin receptor ligand prevents chronic kidney disease-induced enlargement of myocardial infarct size.** Hypertension. 2016;68:697-706(査読有)

Yano T, Shimoshige S, Miki T, Tanno M, Mochizuki A, Fujito T, Yuda S, Muranaka A, Ogasawara M, Hashimoto A, Tsuchihashi K, Miura T. **Clinical impact of myocardial mTORC1 activation in nonischemic dilated cardiomyopathy.** J Mol Cell Cardiol. 2016;91:6-9(査読有)

Murase H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Yano T, Kouzu H, Ishikawa S, Tobisawa T, Ogasawara M, Nishizawa K, Miura T. **Inhibition of DPP-4 reduces acute mortality after myocardial infarction with restoration of autophagic response in type 2 diabetic rats.** Cardiovasc Diabetol. 2015;14:103(査読有)

Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Ishikawa S, Miura T. **Excessive degradation of adenine nucleotides by up-regulated AMP deaminase underlies afterload-induced**

diastolic dysfunction in the type 2 diabetic heart.

J Mol Cell Cardiol. 2015;80:136-45(査読有)

Sunaga D, Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Ogasawara M, Yano T, Miki T, Miura T. **Accelerated recovery of mitochondrial membrane potential by GSK-3 β inactivation affords cardiomyocytes protection from oxidant-induced necrosis.** PLoS One. 2014;9:e112529(査読有)

Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Horio Y, Miura T. **Translocation of glycogen synthase kinase-3 β , a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by interaction with voltage-dependent anion channel 2.** J Biol Chem. 2014;289:29285-96(査読有)

[学会発表](計 11 件)

丹野雅也 **Regulation of mitochondrial localization of GSK-3 β by SIRT3. - A novel regulatory mechanism underlying opening of mitochondrial permeability transition pore in the aged hearts - (シンポジウム)**

第 81 回日本循環器学会学術集会: 2017 年 3 月 17-19 日: 石川県立音楽堂(石川県金沢市)

Tanno M, Ohwada W, Yano T, Miki T, Kuno A, Ishikawa S, Tatekoshi Y, Nishizawa K, Mizuno M, Miura T. **Excessive ROS production in mitochondria switches off protective mitochondrial kinase signaling. (シンポジウム)** In: 4th Congress of Frontiers in Cardiovascular Biology: 2016 July 8-10, Florence, Italy.

Nishizawa K, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Tobisawa T, Ogasawara M, Muratsubaki S, Ohno K, Mizuno M, Ohwada W, Ishikawa S, Miura T. **Restoration of the intra-mitochondrial interplay between protective signals and malate-aspartate shuttle by continuous erythropoietin receptor activation prevents CKD-induced infarct size enlargement.** 38th Congress of the European Society of Cardiology: 2016 Aug 27-31, Rome, Italy.

矢野俊之、丹野雅也、三木隆幸、三浦哲嗣。 **心不全の新たな薬物治療の展望: 拡張型心筋症の心筋生検ガイド下分子標的治療 -mTORC1 阻害薬の可能性- (シンポジウム)**

第 64 回日本心臓病学会学術集会: 2016 年 9 月 23-25 日: 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Ohwada W, Tanno M, Yano T, Kuno A, Miki T, Ishikawa S, Tatekoshi Y, Abe K, Ohno K, Mizuno M, Nakata K, Miura T. **ROS-induced mitochondrial translocation of phosphatases cancels cell-protective signals activated by phosphorylation of mitochondrial protective kinases.** 89th Scientific Session of American Heart Association: 2016 Nov 12-16, New Orleans, U.S.A.

Ohwada W, Tanno M, Yano T, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Miura T. **DUSP5 and PHLPP-1, protein phosphatases targeting ERK and Akt, translocate to mitochondria and suppress cell-protective signals under oxidative stress.** 33rd Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. 2016 Dec 16-17, Tokyo, Japan.

Tobisawa T, Yano T, Miki T, Kuno A, Tanno M, Kouzu H, Ogasawara M, Muratsubaki S, Ohno K, Miura T. **Dysregulation of two phosphorylation sites in Akt, Thr308 and Ser473, upon reperfusion mediates enlargement of myocardial infarct size by chronic renal failure.** 37th Congress of the European Society of Cardiology: 2015 Aug 29-Sept 2, London, UK.

Nishizawa K, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Tobisawa T, Mizuno M, Sugawara H, Miura T. **Continuous erythropoietin receptor activation reverses increased myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury in chronic renal failure.** 37th Congress of the European Society of Cardiology: 2015 Aug 29-Sept 2, London, UK.

Tobisawa T, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Ogasawara M, Muratsubaki S, Ohno K, Nishizawa K, Mizuno M, Ohwada W, Ishikawa S, Miura T. **Intramolecular inhibition of Ser473 phosphorylation by up-regulated Thr308 phosphorylation in Akt contributes to enlargement of infarct size by chronic renal failure.** 88th Scientific Session of American Heart Association: 2015 Nov 7-11, Orlando, U.S.A.

Tanno M, Miura T, Miki T, Kuno A, Ishikawa S, Yano T and Kouzu H.

Mitochondrial translocation of GSK-3 β , a trigger of mitochondrial permeability transition, is mediated by its N-terminal domain and promoted by interaction with VDAC2.(シンポジウム) 3rd Congress of Frontiers in Cardiovascular Biology: 2014 July 4-7, Barcelona, Spain.

Tobisawa T, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Murase H, Ogasawara M, Muratsubaki S, Mizuno M, Nishizawa K, Ishikawa S, Yoshida H, Miura T. **Disruption of mTORC2 integrity underlies increased myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion injury in chronic renal failure.** 87th Scientific Session of American Heart Association: 2014 Nov 18, Chicago, U.S.A.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹野雅也 (TANNO, Masaya)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00398322

(2) 研究分担者

三木隆幸 (MIKI, Takayuki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00336405

三浦哲嗣 (MIURA, Tetsuji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90199951