

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461383

研究課題名(和文)ミトコンドリアダイナミクスが制御するオルガネラネットワーク機構の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of organelle network mechanism controlled by mitochondrial dynamics and its application.

研究代表者

野村 政壽 (Nomura, Masatoshi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30315080

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)：ミトコンドリアは、細胞のエネルギー需要に応じて融合と分裂を繰り返しながらダイナミックに構造を変化している。高脂肪食などエネルギー過剰状態では、MtとER間のオルガネラネットワークが障害され、ERストレスが惹起される。その結果、PERK-eIF2a-ATF4経路の活性化によりFGF21が肝臓から分泌され、末梢臓器である骨格筋、脂肪組織においてエネルギー消費が亢進する。すなわち、肝臓のミトコンドリアダイナミクス-ERストレス-FGF21軸はエネルギー代謝の生体防御システムとして機能し、ミトコンドリアダイナミクスは肥満・糖尿病の治療標的となる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are highly dynamic organelles that frequently fuse and divide in response to cellular energy demands. In an excessive energy state such as a high fat diet, the organelle network between Mt and ER is impaired, followed by the induction of ER stress. As a result, FGF21 is secreted from the liver by activation of PERK-eIF2a-ATF4 pathway, and energy expenditure is accelerated in the peripheral organs such as skeletal muscle and adipose tissue. In other words, mitochondrial dynamics-ER stress-FGF21 axis function as a biological defense system for energy excess. Therefore, mitochondrial dynamics is a therapeutic target for the obese diabetes.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：ミトコンドリア 糖尿病 小胞体ストレス DRP1

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア(Mt)はATP産生、細胞内Ca<sup>2+</sup>制御、アポトーシス制御といった生命活動に必須の役割を持ち、様々な代謝系シグナルが収斂される細胞内小器官である。生体内では常時分裂・融合を介してダイナミックにその形態を変化させている(Mtダイナミクス)。Dynamitin-Related Protein 1 (Drp1)がMt外膜上の受容体であるMitochondrial fission factor (Mff)に結合、Mtに局在化、そのGTPase活性を利用してMtの分裂が生じる。すなわち、Drp1とMffがMtダイナミクスの制御に重要な役割をもつ。これまで我々は、Drp1遺伝子改変マウスを用いて膵細胞、肝細胞におけるMtダイナミクスの機能解析を行ない、細胞内外の環境変化に適応し、細胞機能維持のためにMtダイナミクスが不可欠であることを明らかにした。すなわち、1) 膵細胞特異的Drp1欠損マウスでは高グルコース刺激に应答したMtの分裂がみられず、グルコース応答性インスリン分泌が障害され耐糖能異常を示すこと、2) 肝細胞特異的Drp1欠損マウス(Drp1LiK0)では高脂肪食負荷により肝組織において肝細胞の腫大、炎症細胞浸潤、肝線維化を認め、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を発症することを明らかにした。RT-PCRによる発現解析で、P8、Atf3など小胞体ストレスマーカーが著明に誘導されることを明らかにした。野生型と比較し、NASHが見られない通常食下でも20倍、高脂肪食下では60-100倍と著増した。Mtダイナミクスの破綻が小胞体(ER)ストレスを惹起することを示す結果であり、Mtダイナミクスの理解とその制御を通じて、ERストレスが関与する種々の病態を制御できる可能性を示唆している。さらに興味深いことに、NASHにも関わらずDrp1LiK0マウスの全身のインスリン感受性は亢進し、耐糖能が改善、高脂肪食による肥満に抵抗性を示すことを見出した。

### 2. 研究の目的

MtダイナミクスはMtの品質管理のみならず、細胞内オルガネラ間コミュニケーションに不可欠であることが明らかになりつつある。すなわち細胞内にはMtダイナミクスを介するオルガネラネットワークが細胞の恒常性維持において極めて重要であることが分かってきた。本研究では、細胞をオルガネラネットワーク機構に基づくシステムとして捉え直し、個体レベルの代謝を理解しようとするものである。肝臓に焦点をあて、エネルギー代謝におけるオルガネラネットワーク機構の役割を解明し、その制御法開発・臨床応用へ向けた基礎的基盤の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 肝臓におけるMtダイナミクス破綻によるERストレス惹起機構の解明

電子顕微鏡(EM)による形態学的解析：

8週令のDrp1LiK0および野生型マウスに対し、高脂肪食負荷、絶食、再摂食時のEMによるMt、ERの形態評価を行い、MAM形成障害を明らかにする。

網羅的遺伝子発現解析/メタボローム解析：

高脂肪食負荷前後でのDrp1LiK0マウスの肝臓での遺伝子発現の変化を、マイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行う。ERストレスの亢進がみられ、MtとERのコミュニケーションの破綻、すなわちMAMの機能不全が予想されることから、脂肪酸代謝、リン脂質合成系に関与する遺伝子発現の変化を中心に解析する。また、Drp1LiK0マウス野生型マウスで絶食および再摂食後4時間でのそれぞれの肝臓を用いてメタボローム解析を行ない、Mtダイナミクスの破綻による脂肪酸代謝の変化を解析し、機能的にMAMの形成障害を明らかにする。

培養細胞での検証：Drp1LiK0マウス初代培養肝細胞へDrp1を強制発現させ、ERストレスを含めた変化を調べる。前年度の遺伝子発現解析結果を基に、Mtダイナミクスの破綻により増減した遺伝子群の発現の変化を詳細に調べる。これらの結果をもとにMtダイナミクスとERストレスの関係を遺伝子レベルで解明する。

Mff遺伝子改変マウスの解析：

Mff KOマウスはDrp1KOマウスと同様に胎生8.5日前後で致死となる。そこでMff floxマウスとAlbumin Creマウスを交配し、肝細胞特異的Mff欠損マウス(MffLiK0)を作製し、体重測定、糖負荷試験、インスリン負荷試験など代謝パラメータを評価する。EMによる肝細胞の形態学的解析を行う。MtとERの形態をDrp1LiK0マウスと比較することで、MffのDrp1受容体としての機能を考察する。

(2) Mtダイナミクスを介する肝臓と筋肉・脂肪組織間連関の機序解明

迷走神経肝枝切断実験：Drp1LiK0マウスに対し肝臓からの神経求心路である迷走神経肝枝を切断し、筋肉、脂肪組織でのインスリン感受性を解析し、糖代謝パラメータを評価する。

肝細胞への核酸送達システムを用いて、Drp1をDrp1LiK0マウス肝臓へ強制発現させ、糖代謝パラメータ回復が見られるかを検討する。肝臓の組織学的解析、遺伝子発現プロファイルを解析する。

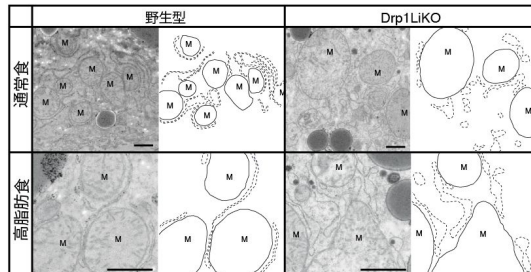
(3) 肝Mtダイナミクスを介する臓器間連関を利用したメタボリックシンドロームの治療法確立に向けた基礎的検討

臨床応用を念頭におき、siRNA, dn-cDNAを用いて肝臓でのDrp1ノックダウン(KD)、機能阻害を行う。核酸送達用多機能型リボソーム(Hayashi Y et al. *Nucleic Acid Ther* 2012)を用いてsiRNA, dn-cDNAによるKDを行い、

経時的に糖負荷試験を施行し、耐糖能改善効果の持続を検討する。また、肝臓の組織学的評価、肝臓、筋肉、脂肪組織での AKT リン酸化を調べ、インスリン感受性改善のメカニズムを解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝臓における Mt ダイナミクス破綻による ER ストレス惹起機構の解明



通常食 (上段) および高脂肪食 (下段) にて飼育した 8 週令の野生型と Drp1LiKO マウス肝臓の電子顕微鏡写真を示す。DRP1LiKO では Mt サイズが大きくなる。破線で示す ER は野生型では Mt (M) を囲むように糸状の形態を示しているが、Drp1LiKO では ER の内腔の拡大、断片化がみられ、Mt との空間的位置関係が乱れ、不規則となっていることが分かる。高脂肪食負荷ではその傾向が顕著となる。Mt と ER の物理的接触が障害され、その界面が減少していることが明らかである。

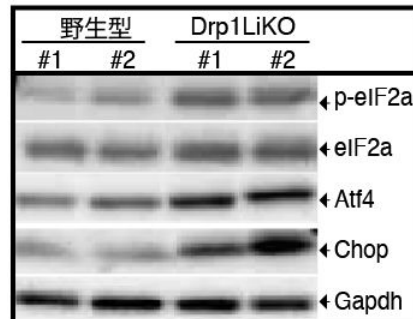
Drp1LiKO マウスに高脂肪食負荷をかけると Unfolded protein response が誘導され、ミトコンドリアダイナミクスの障害は著明な ER ストレスを引き起こす。マイクロアレイ解析を行った結果、Nupr1(P8), Atf3, Trb3, Asns, Chop といった ER ストレス応答遺伝子が著増していた。次に eIF2a のリン酸化が亢進していることを確認し、Drp1LiKO マウス肝では PERK-eIF2a-Atf4 経路が活性化されていることを明らかにした。

Mff 欠損マウスは Drp1 欠損マウス同様に胎生致死となった。胎生期を遡り、組織学的に解析したところ、Mff 欠損マウスは胎生 6.5 日前後で致死となることを明らかにした。Drp1 欠損マウスに比べより早期に致死となり、Mff は中胚葉誘導に不可欠であることを明らかにした。並行して、MffLiKO マウスの解析を進め、Drp1LiKO マウスとの比較検討を行った。Drp1LiKO 初代培養肝細胞の結果から Mt-ER 間の Ca<sup>2+</sup>恒常性を破綻させ、その結果 ER ストレスが生じることを明らかにした。MffLiKO 初代培養肝細胞に Thapsigargin (2-5 μM) を添加したところ、Chop, P8 の用量依存的な発現亢進を認め、eIF2a のリン酸化亢進がみられた。このことから Mt の分裂異常により Mt-ER 間の Ca<sup>2+</sup>恒常性が破綻することが ER ストレスに繋がると考えられた。

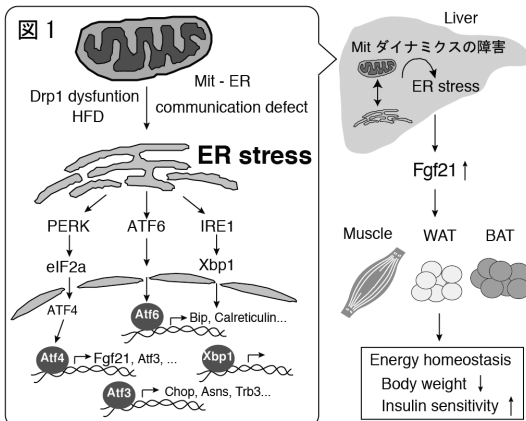
##### (2) Mt ダイナミクスを介する肝臓と筋肉・脂肪組織間連関の機序解明

Drp1LiKO マウス肝臓では ER ストレスが惹起されインスリン抵抗性が亢進しているが、

一方、筋肉や褐色脂肪でのインスリン感受性 (AKT リン酸化) が改善し、Drp1LiKO マウスは耐糖能が良好であり脂肪を燃焼し肥満抵抗性を示す。



野生型および Drp1LiKO マウス肝のウェスタンブロットの結果を示す。Drp1LiKO マウス肝臓では PERK-eIF2a-Atf4 経路の活性化がみられ、その結果、FGF21 の発現亢進が見られ、末梢組織のインスリン感受性亢進、脂肪燃焼の増加がみられることを明らかにした。肝臓の迷走神経切除実験をおこなったが、FGF21 の発現亢進に変化はみられず、Drp1LiKO マウスでみられる代謝改善効果は主に FGF21 による作用であることを明らかとなった。MffLiKO マウスでも同様に FGF21 が増加し、インスリン感受性亢進、高脂肪食負荷による肥満に抵抗性を示した。したがって、ミトコンドリア分裂異常による ER ストレスが FGF21 発現亢進の主要なメカニズムであることが示唆された。図 1 にまとめを示す。すなわち、高脂肪食などエネルギー過剰状態では Mt ダイナミクスの障害により、Mt と ER 間のオルガネラネットワークが障害され、その結果 ER ストレスが惹起される。PERK-eIF2a-ATF4 経路が活性化し、FGF21 が上昇し、末梢臓器である骨格筋、脂肪組織において熱産生が亢進することが明らかとなった。



##### (3) 肝 Mt ダイナミクスを介する臓器間連関を利用したメタボリックシンドロームの治療法確立に向けた基礎的検討

肝臓を標的として、核酸医薬による糖尿病治療法の開発を行った。予備的研究結果として肝細胞特異的 Drp1 欠損マウスでは骨格筋、褐色脂肪組織でのインスリン感受性が亢進

し、耐糖能が改善することを明らかにした。そこで、Drp1 遺伝子に対する siRNA を作成し、YS-MEND (肝細胞指向性多機能性エンベロープ型ナノ構造体) に搭載し、マウスへの投与実験を行った。220 µg/mL に調整した siRNA/YS-MEND を 100-200 µL マウス尾静脈より投与を行い、投与前と投与後 3 日に糖負荷試験 (1g/kg BW) を行い、耐糖能を比較した。30 分値 (前 355mg/dL, 後 308mg/dL, P=0.006) で有意な血糖値の改善を認めた。次にレギュラーインスリン 5 単位を下大静脈へ投与 2 分後にマウス各組織を回収し、AKT リン酸化をウェスタンブロット法により解析した。その結果、骨格筋での AKT リン酸化の亢進を認めた。その機序として、肝臓での Drp1 の機能阻害により FGF21 等のサイトカインの上昇が見られた。肝臓を標的とした核酸医薬による全く新しい糖尿病治療法開発の可能性が示唆された。

次に、野生型マウスに dnDrp1 をハイドロダイナミクス法ならびに肝細胞特異的ナノキャリア MEND を用いて導入し、耐糖能ならびに肝臓の組織学的評価を行なった。dnDrp1 導入群では導入 3 日後の肝臓において Drp1 の発現が 30-40% に低下していた。糖負荷試験では、統計学的有意差はみられなかったが、耐糖能の改善傾向を認めた。組織学的には F4/80 の染色性、血中 AST/ALT 値に野生型と比べ有意差は見られなかったが、Chop, P8 の発現増加をみとめた。肝臓の Drp1 はメタボリックシンドロームの治療標的となる可能性が極めて高いことが示唆された今後は MEND と DNA の混合比率を含めた dn-cDNA のマウス肝臓への導入の最適化が検討課題として残った。

## 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)

Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, Miyamoto T, Komatsu R, Imura Y, Morizawa Y, Hiasa M, Miyaji T, Kira S, Araki I, Fujishita K, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Ichikawa R, Uneyama H, Iwatsuki K, Nomura M, Groat W, Moriyama Y, Taketa M, Koizumi S: Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. SCI REP 査読有 6: 29761, 2016  
<https://doi.org/10.1038/sep29761>

Kiryu-Seo S, Tamada H, Kato Y, Yasuda K, Ishihara N, Nomura M, Mihara K, Kiyama H: Mitochondrial fission is an acute and adaptive response in injured motor neurons. SCI REP 査読有 6: 28331, 2016  
<https://doi.org/10.1038/srep28331>

Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Morita M, Oike T, Miyamoto K,

Soga T, Nomura M, Yoshimura A, Tomita M, Matsumoto M, Nakamura M, Toyama Y, Miyamoto T: Smad2/3 are required for immobilization-induced skeletal muscle atrophy. J BIOL CHEM 291: 12184-94, 2016  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680579>

Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Hsu CP, Nomura M, Egashira K, Levine B, Sadoshima J: Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure-overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure. CIRCULATION 査読有 133: 1249-1263, 2016  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502>

Wang L, Nomura M: Loss of Drp1 in the liver leads to an alteration in expression of the genes involved in the immune system. GENOMIC DATA 査読有 6: 27-30, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.07.021>.

Wang L, Ishihara T, Ibayashi Y, Tatsushima K, Setoyama D, Hanada Y, Takeichi Y, Sakamoto S, Yokota S, Mihara K, Kang D, Ishihara N, Takayanagi R, Nomura M: Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration. DIABETOLOGIA 査読有 58: 2371-2380, 2015  
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3704-7>

Ikeda Y, Maejima Y, Zhai P, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Sadoshima J: Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. CIRC RES 査読有 116: 264-278, 2015  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303356>.

Ishihara T, Ban-Ishihara R, Maeda M, Matsunaga Y, Ichimura A, Kyogoku S, Aoki H, Katada S, Nakada K, Nomura M, Mizushima N, Mihara K, Ishihara N: Dynamics of mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. MOL CELL BIOL 査読有 35: 211-223, 2015  
<https://doi.org/10.1128/MCB.01054-14>.

Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, Ichikawa R, Uematsu A, Iwatsuki K, Shibata A, Uneyama H, Takayanagi R, Yamamoto A, Omote H, Nomura M, Moriyama Y: Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. SCI REP 査読有 4: 6689, 2014  
<https://doi.org/10.1038/srep06689>.

Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Miyado K, Shitara H, Yokota S, Nomura M, Mihara K, Mizushima N, Ishihara N: Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. CURR BIOL 査読有 24: 2451-2458, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.060>.

Nomura M, Morinaga H, Hei-lay Z, Wang L, Hasuzawa N, Takayanagi R, Teramoto N: Activation of activin type IB receptor signal in pancreas beta cells leads to defective insulin secretion through the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 査読有 450: 440-446, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.141>.

Yamada Y, Tabata M, Yasuzaki Y, Nomura M, Shibata A, Ibayashi Y, Taniguchi Y, Sasaki S, Harashima H: A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to pancreatic beta cell line. BIOMATERIALS 査読有 35: 6430-6438, 2014 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.017>.

Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki K, Moriyama Y, Gachet C, Koizumi S: Microglia triggers astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. SCI REP 査読有 4: 4329, 2014 <https://doi.org/10.1038/srep04329>.

Nomura M, Hei-lay Z, Wang L, Morinaga H, Takayanagi R, Teramoto N: Smad2 disruption in mouse pancreatic b cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. 査読有 DIABETOLOGIA 57: 157-166, 2014 <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3704-7>

〔雑誌論文〕(計 29 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

武市幸奈、野村政壽、他：ミトコンドリア分裂は脂質代謝を制御する。  
第 16 回日本内分泌学会九州支部学術集会 2016

花田有希、野村政壽、他：ミトコンドリア分裂因子(MFF)は飽和脂肪酸により惹起される炎症を制御する。  
第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016

王麗香、野村政壽、他：ミトコンドリア分裂の炎症における役割。  
第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016

Wang L, Nomura M et al.: Impact of mitochondrial dynamics on metabolic disease and inflammation.  
Targeting Mitochondria World Congress Berlin 2016

Ibayashi Y, Nomura M et al.: Mitochondrial fission role in brown adipose tissue.  
Targeting Mitochondria World Congress Berlin 2016

王麗香、野村政壽、他：肝 Drp1 欠損は FGF21 を誘導することでエネルギー代謝を亢進させ、食餌性肥満を改善する。  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015

井林勇太、野村政壽、他：脂肪細胞特異的 Drp1 遺伝子欠損マウスの表現型解析。  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015

嶋田伸吾、野村政壽、他：Mitochondrial fission factor 遺伝子欠損マウスの表現型解析。  
第 88 回日本内分泌学会学術総会 2015

田端麻衣、山田勇磨、野村政壽、原島秀吉：腭細胞を標的とした核酸送達キャリアの構築および in vivo への応用。  
第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014

野村政壽：ミトコンドリアダイナミクスを介したエネルギー代謝調節機構。  
第 87 回日本内分泌学会学術総会 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 政壽 (NOMURA, Masatoshi)

九州大学病院内分泌代謝糖尿病内科・講師  
研究者番号：30315080

(2) 連携研究者

石原 直忠 (ISHIHARA, Naotada)

久留米大学・分子生命科学・教授  
研究者番号：10325516

(3) 連携研究者

山田 勇磨 (YAMADA, Yuma)

北海道大学・薬学研究院・助教  
研究者番号：60451431