

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20117004

研究課題名（和文）心血管ストレス応答におけるミトコンドリア活性酸素シグナル制御

研究課題名（英文）Regulation of mitochondrial ROS signaling in the cardiovascular stress response

研究代表者

筒井 裕之（TSUTSUI HIROYUKI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70264017

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリアの生体維持機能は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) によって動的に制御されている。近年、mtDNA の酸化損傷およびそれに起因する活性酸素の過剰産生が、種々の疾病の発症、さらには老化にも関与することがあきらかにされ、疾病発症の共通基盤としてのミトコンドリア機能不全が注目されている。本研究では、心血管ストレス応答におけるミトコンドリア転写因子およびミトコンドリア酸化ストレスの役割をあきらかにした。

研究成果の概要（英文）：

The role of mitochondria in maintaining the biological function is dynamically regulated by mitochondrial DNA (mtDNA), a closed-circular double-stranded DNA molecule of ~16.5 kb. MtDNA decline, mitochondrial defects, and mitochondrial oxidative stress are now well recognized in a variety of diseases such as neurodegenerative diseases, diabetes mellitus, cancer, and even aging. The present study clarified the crucial role of mitochondrial transcription factor A (TFAM) in cardiovascular stress response. With further knowledge on the mechanisms of TFAM for maintenance of mtDNA copy number and mitochondrial function, it may eventually be possible to develop novel strategies for the treatment of cardiovascular diseases including heart failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,000,000	5,700,000	24,700,000
2009年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2011年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2012年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
総計	85,800,000	25,740,000	111,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア、酸化ストレス、活性酸素、心血管病、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの生体維持機能は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) によって動的に制御されている。近年、mtDNA の酸化損傷およびそれに起因する活性酸素の過剰産生が、ガン、

糖尿病、神経変性疾患など種々の疾病の発症に関与することがあきらかにされ、疾病発症の共通基盤としてのミトコンドリア機能不全が注目されている。mtDNA およびミトコンドリア機能を制御する Key molecule は、ミ

トコンドリア転写因子 (mitochondrial transcription factor; TFAM) やその上流に存在しトコンドリア転写因子コアクチベーターである PPAR-gamma coactivator-1 (PGC-1)を含むトコンドリア転写因子ファミリーである。したがって、心血管ストレスに対するトコンドリア転写因子の発現調節の破綻が、動脈硬化から心筋梗塞・心不全に至る一連の心血管病の基盤的分子機構である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心血管ストレス応答におけるトコンドリア転写因子タンパクの発現を制御する分子基盤を解明するとともに、心血管病の形成・進展におけるトコンドリア活性酸素シグナル制御の役割をあきらかにし、トコンドリア転写因子の機能制御という新たなパラダイムに基づく心血管病の治療法の開発を目指すものである。

具体的には以下の点を明らかにするのを目的とする。

(1) 心血管細胞へのストレスに対するトコンドリア転写因子タンパクの発現制御の分子基盤は何か？

(2) ミトコンドリア転写因子の誘導・活性化によりトコンドリア機能の維持・細胞傷害の抑制が可能か？その分子機序は何か？さらに心血管病の発症・進展が抑制されるか？

3. 研究の方法

(1) ストレスに対する心血管細胞トコンドリア転写因子ネットワーク応答

心筋細胞にストレス負荷を行い、mtDNA 損傷 (サザンブロット、Quantitative PCR) およびトコンドリア機能障害 (電子伝達系複合体酵素活性およびトコンドリア呼吸能) を測定する。細胞内の活性酸素産生を細胞内酸素ラジカル定量 (DCFH 蛍光測定および DHE 染色) および電子スピン共鳴法を用いて検討する。さらに、細胞障害および細胞死について、細胞数 (核カウント)、細胞 viability (エバンスブルー染色)、アポトーシス (TUNEL 染色および DNA ラダー)、電子顕微鏡によるトコンドリア微細形態を評価する。

(2) ミトコンドリア転写因子制御による心血管細胞保護

培養心筋細胞におけるストレスによる細胞障害を、TFAM の発現や活性化が抑制しうるかどうかが検討する。同時に、mtDNA 損傷が抑制されるか、トコンドリア電子伝達機能が保持されるかどうかを検討する。すなわち、TFAM 遺伝子導入が、mtDNA の酸化損傷を抑制し、

ミトコンドリア機能を保持することによって細胞保護作用を発揮する可能性を *in vitro* 培養細胞実験系で検証する。トコンドリア転写因子ファミリーによるトコンドリア機能制御・細胞保護が可能であることが確認されれば、どのようなストレス応答の分子機構を介して細胞保護作用がもたらされるのか検討する。

さらに遺伝子改変マウスを用いてトコンドリア転写因子による mtDNA およびトコンドリア機能制御の分子機序を *in vivo* でも明らかにする。

(3) ミトコンドリア転写因子活性化による新たな心血管病治療法の開発

トコンドリア転写因子活性化による新たな心血管病治療法を探索しその有効性を検討する。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア転写因子による mtDNA の制御機構

TFAM は mtDNA 合成には影響せず、タンパクと結合しヌクレオイドを形成して mtDNA を安定化させた。一方、トコンドリアヘリカーゼである Twinkle は mtDNA の複製を亢進させ TFAM 同様ヌクレオイドを形成することが明らかとなった。さらにこれらは相加的に mtDNA 複製を亢進させ、ヌクレオイドの形成を増加することを見出した。したがって、ヌクレオイドの形成は、mtDNA の複製・転写・翻訳を制御することにより mtDNA の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

(2) ミトコンドリア転写因子制御による心血管細胞保護: 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

HeLa 細胞および培養心筋細胞にトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害薬であるロテノンを用いて作用させトコンドリアのエレクトロンリークを増加させるとスーパーオキシドが産生された。さらに、TFAM を過剰発現させるとこのスーパーオキシド産生は有意に抑制された。さらに、TFAM によってストレスによる細胞障害が抑制された。

(3) ミトコンドリア転写因子活性化による心血管細胞保護: モデル動物を用いた *in vivo* 実験

TFAM 遺伝子過剰発現は、心筋梗塞後心不全モデルにおいて *in vivo* ESR で測定した心筋酸化ストレスを抑制するとともに、心筋リモデリング・心不全を改善した。

高脂肪食投与は、心筋のみならず骨格筋においても NAD(P)H oxidase の活性化を引き起こし、活性酸素はトコンドリア電子伝達系複合体の酵素活性の低下、トコンドリア呼

吸能の障害とともに運動能力の低下を引き起こした。さらに、磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を用いて、このようなミトコンドリア機能障害がメタボリックシンドローム患者骨格筋においてもみとめられることを見出した。

心筋梗塞後心不全モデルマウスでは、高脂肪食投与糖尿病モデルマウスと同様に、心筋のみならず骨格筋において NAD(P)H oxidase 由来スーパーオキシドの産生が亢進し、ミトコンドリア電子伝達系複合体の酵素活性の低下、ミトコンドリア呼吸能の障害、すなわちミトコンドリア酸化ストレスが引き起こされることを見出した。重要なことに、ミトコンドリア酸化ストレスは、骨格筋機能を障害し、運動能力を低下させるばかりでなく、インスリンシグナルを傷害し、インスリン抵抗性を惹起した。すなわち、インスリン抵抗性・糖尿病は、心不全の重要なリスクであるが、骨格筋ミトコンドリア酸化ストレスを介して、心不全自体が、インスリン抵抗性を惹起し、さらに心不全を悪化させるという悪循環を形成していることを見出した。また、MRS を用いた骨格筋代謝の解析により、拡張型心筋症を基礎疾患とする心不全患者においても、同様の悪循環が生じていることが示唆された。すなわち、インスリン抵抗性は心不全の重要な病態修飾因子であり、その基盤にはミトコンドリア活性酸素シグナルが密接に関与することをあきらかにした。

以上のごとく本研究によってミトコンドリア活性酸素シグナル制御は、心血管系に対するストレス応答として幅広い心血管病の形成・進展に関与する重要な病態基盤であることがあきらかとなった。

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)

[雑誌論文] (計 251 件)

1. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* 7(2):e30568, 2012, 査読有 DOI:10.1371
2. Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1202-H1210, 2012, 査読有 DOI:10.1152
3. Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H: Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(1):H86-95, 2012, 査読有 DOI:10.1152
4. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Hirabayashi K, Suga T, Azalia P, Takada S, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice. *Circ Res* 111(8):1037-47, 2012, 査読有 DOI:10.1161
5. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Iwakura Y, Yagita H, Tsutsui H, Uede T: Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(2):273-80, 2012, 査読有 DOI:10.1161
6. Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res* 108(11):1328-1339, 2011, 査読有 DOI:10.1161
7. Ohta Y, Kinugawa S, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N, Yokota T, Hirabayashi K, Tsutsui H: Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(5):H1637-44, 2011, 査読有 DOI:10.1152
8. Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5):1066-1074, 2011, 査読有 DOI:10.1161
9. Yamato M, Shiba T, Ide T, Honda Y, Yamada K, Tsutsui H: Nifedipine treatment reduces brain damage after transient focal ischemia, possibly through its antioxidative effects. *Hypertens Res* 34(7):840-845, 2011, 査読有 DOI: 10.1038
10. Yokota T, Kinugawa S, Okita K, Hirabayashi K, Suga T, Hattori M, Nakagawa Y, Oyama-Manabe N, Shirato H, Tsutsui H: Lower aerobic capacity was

- associated with abnormal intramuscular energetics in patients with metabolic syndrome. *Hypertens Res* 34(9):1029-34, 2011, 査読有 DOI: 10.1038
11. Yamato M, Shiba T, Ide T, Seri N, Kudo W, Ando M, Yamada K, Kinugawa S, Tsutsui H: High-fat diet-induced obesity and insulin resistance were ameliorated via enhanced fecal bile acid excretion in tumor necrosis factor- α receptor knockout mice. *Mol Cell Biochem* 359(1-2):161-7, 2011, 査読有 DOI:10.1007
 12. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, Yokota T: Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 48(1): 68-71, 2011, 査読有 DOI:10.3164
 13. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(6):H2181-90, 2011, 査読有 DOI:10.1152
 14. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoe K, Tsutsui H: Natural killer T Cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-Induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2):193-199, 2010, 査読有 DOI:10.1161
 15. Hokari M, Kuroda S, Kinugawa S, Ide T, Tsutsui H, Iwasaki Y: Overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) ameliorates delayed neuronal death due to transient forebrain ischemia in mice. *Neuropathology* 30(4):401-407, 2010, 査読有 DOI:10.1111
 16. Ylikallio E, Tyynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A: High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet* 19(13):2695-2705, 2010, 査読有 DOI: 10.1093
 17. Inoue T, Ide T, Yamato M, Yoshida M, Tsutsumi T, Andou M, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Time-dependent changes of myocardial and systemic oxidative stress are dissociated after myocardial infarction. *Free Radic Res* 43(1):37-46, 2009, 査読有 DOI: 10.1080
 18. Matsushima S, Kinugawa S, Yokota T, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Tsutsui H: Increased myocardial NAD (P) H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of post-infarct heart failure in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(1):409-416, 2009, 査読有 DOI: 10.1152
 19. Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Sobirin A, Ono T, Suga T, Kuroda S, Tanaka S, Terasaki F, Okita K, Tsutsui H: Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(3):1069-1077, 2009, 査読有 DOI: 10.1152
 20. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res* 81(3):449-456, 2009, 査読有 DOI: 10.1093
 21. Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, Schulze-Bahr E, Fukuhara, S, Mochizuki N, Makiyama T, Itoh H, Christiansen M, McKeown P, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George AL Jr, Roden DM: The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 118(6):2219-2229, 2008, 査読有 DOI: 10.1172
 22. Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 77(4):713-721, 2008, 査読有 DOI: 10.1093
 23. Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H: Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci* 28(34):8624-8634, 2008, 査読有 DOI: 10.1523
 24. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J Suppl* A:A-31-A-37, 2008, 査読有 DOI: 10.1152
- [学会発表] (計 39 件)
1. 筒井裕之: 心血管病におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日, パシフィコ横浜, 横浜
 2. 筒井裕之: メタボリックシンドローム・心血管病と骨格筋機能不全 第19回日本臨床スポーツ医学会学術集会, 2008年11月2日, 幕張メッセ, 千葉
 3. 筒井裕之: 心不全の病態をふまえた治療戦略～理想的な周術期管理の実践のた

- めに～日本心臓血管麻酔学会第13回学術大会, 2008年11月1日, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄
4. 筒井裕之: 心保護を目指した高血圧の治療戦略 第31回日本高血圧学会総会, 2008年10月10日, ロイトン札幌, 札幌
 5. 筒井裕之: 北大が目指す循環器内科の将来展望 第100回日本循環器学会北海道地方会, 2008年9月20日, 北翔大学, 札幌
 6. 筒井裕之: 心腎連関をふまえた心血管病の治療戦略 第56回日本心臓病学会学術集会, 2008年9月9日, 東京国際フォーラム, 東京
 7. 筒井裕之: 心血管病におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割 第61回日本酸化ストレス学会学術集会, 2008年6月19日, 国立京都国際会館, 京都
 8. 筒井裕之: 心血管リモデリング制御と高血圧・心不全治療 第19回日本心エコー学会学術集会, 2008年4月12日, 神戸ポートピアホテル, 神戸

[図書] (計89件)

1. 筒井裕之: 北海道大学アドミッションセンター、知のフロンティア 北海道大学の研究者は、いま 第2号、2012、68-69
2. 絹川真太郎, 筒井裕之: メディカルレビュー社、高血圧ナビゲーター、2011、138-139
3. 絹川真太郎, 筒井裕之: メディカルレビュー社、Cardio Diabetic Frontier～心血管病と糖尿病を統一的に理解する新たな視点を求めて～、2010、62-68
4. 絹川真太郎, 筒井裕之: 南山堂、循環器ストレス学、2010、265-272
5. 横田卓, 筒井裕之: 羊土社、診療に活かす心機能評価、2010、26-29
6. 井手友美, 筒井裕之: 羊土社、活性酸素シグナルと酸化ストレス、2009年、38-42
7. 絹川真太郎, 筒井裕之: メディカルレビュー社、高血圧ナビゲーター(第2版)、2008、146-147
8. 絹川真太郎, 筒井裕之: 診断と治療社、酸化ストレスの医学、2008、230-239

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 裕之 (TSUTSUI HIROYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70264017
(平成20年度～平成24年度)

(2) 研究分担者

蒔田 直昌 (MAKITA NAOMASA)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00312356

(平成20年度)

絹川 真太郎 (KINUGAWA SHINTARO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60399871

(平成20年度～平成24年度)

松井 裕 (MATSUI YUTAKA)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任准教授
研究者番号: 30431381

(平成21年度～22年度)

石森 直樹 (ISHIMORI NAOKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 70399848

(平成23年度～24年度)

畠山 鎮次 (HATAKEYAMA SHIGETSUGU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70294973

(平成23年度)

(3) 連携研究者

特になし