

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09140

研究課題名(和文) 心臓逆リモデリングにおけるミトコンドリアダイナミクスの関与の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of mitochondria dynamics during progression of cardiac reverse remodeling

研究代表者

山口 修 (Yamaguchi, Osamu)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90467580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全後の心形態改善は逆リモデリングと称されるが、その細胞内分子機構にオートファジー性ミトコンドリア分解や、ミトコンドリア分裂融合が関わるとの仮説を立てた。網羅的解析を行った結果、新規ミトコンドリア分裂、マイトファジー誘導分子Bcl2-L-13を発見した。また逆リモデリングの評価システムを確立すると共に、逆リモデリングに関わると考えられるBcl2-L-13, Drp1, Rubiconの心筋細胞特異的遺伝子改変動物を作成し、病態モデルを用いた解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Although cardiac reverse remodeling involving regression of cardiac hypertrophy occurs after control of etiological factors, the molecular mechanisms remain to be clarified. We hypothesized that autophagic degradation of mitochondria and mitochondrial fusion/fission play an important role during reverse remodeling. We identified Bcl2-L-13 as a mitophagy receptor on outer mitochondrial membrane. Bcl2-L-13 binds to LC3 through the WXXI motif and induces mitochondrial fragmentation and mitophagy not only in HEK293 cells but in rat neonatal cardiomyocytes. The BH domains are important for the fragmentation, while the WXXI motif facilitates mitophagy. Rubicon is thought to negatively regulate autophagic machinery. We generated cardiac-specific deficient mice of Bcl2-L-13 and Rubicon.

研究分野：循環器内科

キーワード：オートファジー 心不全 心肥大 逆リモデリング ミトコンドリアダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

心臓に圧負荷や容量負荷などの血行力学的負荷が持続的にかかり続けると適応反応としての代償性肥大が認められるが、次第に心収縮力の低下、心内腔の拡大といった代償破綻を来し心不全状態となる。この一連の過程を心臓リモデリングと称する。一方で不全心筋の回復や心肥大の改善は、臨床的にはしばしば観察される現象である。こうした心形態の改善は心臓逆リモデリングと総称される。例えば、遮断薬や左室補助人工心臓(LVAD)の装着などの減負荷により、心収縮力改善が一部で認められる。大動脈弁狭窄症に対する大動脈弁置換術、降圧剤などの左室減負荷によって代償性心肥大も改善しうる。心肥大の細胞内分子機構は2000年代に次々と明らかにされたが、心臓逆リモデリングに関与する細胞内分子機構は殆ど明らかにされていない。心臓逆リモデリング現象からは、心臓自体の回復力の存在が示唆されるがこうした観点からの基礎的知見に基づいた研究は殆ど行われておらず、既知の臨床的マーカーを用いて心臓逆リモデリングを予測する事は、現時点では困難である。

申請者はこれまでオートファジーと呼ばれる細胞内分解機構が、心肥大後の逆リモデリングにおける心筋細胞内の必須機構であることを報告した(BBRC 2013)。しかしながら、オートファジーが逆リモデリングを誘導する詳細な機構については未だ明らかにされていない。さらに、血行動態負荷や老化において、オートファジー不全が心筋細胞内ミトコンドリアの大小不同やクリステ異常などの形態異常を惹起することを報告した(Nature Medicine 2007, Autophagy 2010, Nature 2012)。ミトコンドリアはfusion(融合)とfission(分裂)による形態変化を恒常的に繰り返し、fissionを起こした傷害ミトコンドリアは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によって分解される。この過程はミトコンドリアダイナミクスと総称され、fission/fusionとマイトファジーには密接な関係が存在する。

以上の研究成果と既報に着想を得て、心臓逆リモデリングにおける心筋細胞肥大や心機能低下の改善に、ミトコンドリアダイナミクスの変化が直接的に関与しているとの仮説を立てた。すなわち、ミトコンドリア形態が適切に変化することが、心臓逆リモデリングに必須の機構であるとの仮説を検証するのが本課題の主題である。本仮説を支持する報告として、心不全症例においてミトコンドリア大小不同などの形態異常が頻繁に見受けられることは広くコンセンサスを得ている。しかしながらその本態に迫る研究成果は報告されていない。また重症心不全症例においてミトコンドリア形態異常の有無が、治療に伴う逆リモデリングを予測しうる事が直近に報告された。また少数例の予備的検討として、逆リモデリング過程において、ミ

トコンドリア fission が促進されることを見出した。Fission 誘導後にはミトコンドリア分解過程であるマイトファジーが誘導されると考えられる。すなわちミトコンドリア形態への介入が、逆リモデリング誘導による心肥大・心不全の治療へと繋がる可能性が示唆されている。さらに、オートファジーの抑制は異常ミトコンドリアの蓄積と同時に、逆リモデリングを阻害する。オートファジーの適切な誘導促進が異常ミトコンドリア蓄積を解除し、逆リモデリング促進に基づく治療効果が期待される。オートファジー抑制因子である Rubicon(Nat Cell Biol. 2009)の欠損はオートファジーを促進しうる。そこで心筋特異的時期特異的 Rubicon 欠損マウスを作成し、心臓逆リモデリングの促進効果を検討するとともに、その詳細な分子機構の検討を行う。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究ではミトコンドリア fusion/fission などの形態変化ならびにマイトファジーの両者を介して行われるミトコンドリアダイナミクスに関わる分子を同定することで、肥全心筋および不全心筋からの回復過程である心臓逆リモデリングを制御する分子機構の解明を目的とする。さらに、ミトコンドリア形態への介入やオートファジーへの介入がもたらす、心肥大・心不全治療への影響についての基礎的検討を行い、ミトコンドリア形態異常への介入が心臓逆リモデリング促進の観点から治療効果を有する事を示す。

(1) ミトコンドリア形態変化の検討に関わる新規分子の網羅的解析と心筋細胞における機能解析

(2) 逆リモデリング解析のための病態モデルの確立

(3) 新たに同定した候補分子を含めたミトコンドリアダイナミクス関連因子の機能解析、および介入標的分子としての治療効果の検討

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア形態変化の検討に関わる新規分子の網羅的解析と心筋細胞における機能解析

ミトコンドリア形態変化をもたらす fusion/fission には、既報分子である Drp1, Mfn1/2, Opa1 などが、マイトファジーには哺乳類細胞では PINK1/Parkin、酵母では Atg32 などが重要な役割を果たしている。まず、酵母 Atg32 の機能的ホモログ検索を行う。候補分子の検索には分子構造からアプローチする in silico 解析、Atg32 結合蛋白質である LC3 を bait とした yeast two-hybrid 法、siRNA ライブラリによる網羅的解析、の 3 方向からアプローチし、候補分子を明らかにする。

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。

(2) 逆リモデリング解析のための病態モデルの確立

・ラット新生仔心筋細胞を用いた心臓逆リモデリング評価システムの確立

ラット新生仔心筋細胞に A-II、PE、ET-1 などの GPCR アゴニストを投与し肥大を誘導後、刺激除去を行い、心筋細胞肥大が改善する至適条件を検討する。肥大の評価にはサルコメア形成、細胞面積、肥大バイオマーカーの mRNA 定量を用いる。

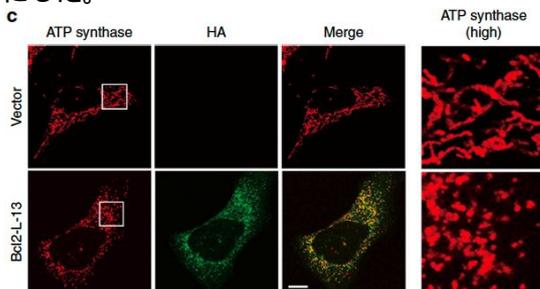
・マウス圧負荷後心不全の逆リモデリングモデル樹立

心肥大については、既に圧負荷後ならびに A-II 投与後の刺激除去により逆リモデリングを呈するモデルを樹立する。野生型マウスに横行大動脈縮窄圧負荷手術(TAC)を行い、心機能低下を認めた後 TAC を解除し、心機能が改善する至適条件を、圧負荷および期間の側面から検討し確立する

(3) ミトコンドリア fission を抑制する Drp1 変異体である Drp1K38A の心筋細胞特異的発現マウスを作成解析する。また、オートファジー抑制因子である Rubicon の心筋細胞特異的欠損マウスを作成解析する。また(1)で同定した新規因子の遺伝子改変動物も作成する。

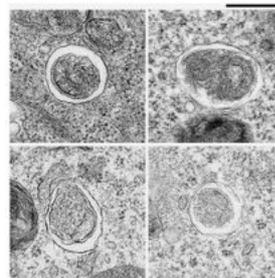
4. 研究成果

(1) Bcl2-L-13 の発見同定および機能解析
ミトコンドリアダイナミクスに関わる新規分子機構についての網羅的解析を行い、酵母において見いだされたマイトファジー必須因子である Atg32 の機能的ホモログとして Bcl2-L-13 を同定した。Bcl2-L-13 はミトコンドリア外膜上に発現しており、ミトコンドリアの分裂を誘導すると共に、マイトファジーレセプターとして機能することを明らかにした。



傷害を受けたミトコンドリアでは Bcl2-L-13 が LC3 に対する受容体として機能し、LIR モチーフが LC3 と結合する。またミトコンドリア膜上の Bcl2-L-13 は、ミトコンドリアの分裂を誘導した。さらに、Bcl2-L-13 は Atg32 欠損酵母株におけるマイトファジーも回復したことから、今回同定した BCL2L13

が哺乳類細胞における Atg32 の機能的ホモログであると結論された。(雑誌論文業績)



続いて、終末分化細胞である新生仔ラット心筋細胞における Bcl2-L-13 の機能解析を行った。その結果、Bcl2-L-13 過剰発現アデノウイルスベクターを MOI10 で感染後 48 時間での新生仔ラット心筋細胞のミトコンドリア形態を観察した。Bcl2-L-13 はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの fragmentation が見られた。また shBcl2-L-13 発現アデノウイルスベクターを新生仔ラット心筋細胞に MOI10 で感染させた結果、72 時間後、対照群に比しミトコンドリアの伸長が認められた。以上の結果より Bcl2-L-13 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。

(2) 逆リモデリング解析のための病態モデル樹立

逆リモデリングに関する機構解析を行うためのモデル樹立を行った。まず in vivo の評価系として、アンジオテンシン II 持続投与後の心肥大退縮モデルならびに横行大動脈縮窄圧負荷心肥大手術後の圧負荷解除による心肥大退縮モデルを作成し、いずれにおいても心臓逆リモデリングが評価可能であることを確認し、モデル樹立に成功した。続いて in vitro の系としてフェニレフリン刺激による心筋細胞肥大後の、刺激除去による心筋細胞肥大退縮を評価するための適切な条件設定を実施し、評価系の樹立に成功した。

(3) ミトコンドリアダイナミクスへの介入を行うための遺伝子改変動物の作成・解析
Atg5 依存性のオートファジーによる細胞内分解系は、心肥大以後の刺激除去に際しての肥大退縮に代表される逆リモデリングに関わることを明らかにしてきた。まず、オートファジー抑制因子 Rubicon の心筋細胞特異的欠損マウスの評価を行った。本遺伝子改変マウスは横行大動脈縮窄圧負荷手術を用いた血行動態負荷により、対照群と比し有意な心臓機能、心臓リモデリングに関する表現型を認めた。さらに同遺伝子改変マウスでは、野生型と比し、ミトコンドリア形態についての有意な変化を見出した。

次にミトコンドリア分裂の必須因子である Drp1 の変異体を心筋細胞特異的に発現させる遺伝子改変マウスを作製した。その際に、一つは心筋細胞特異的プロモーターによる発現モデル、もう一系統としては薬剤誘導性 (Tamoxifen) に後天的に心筋細胞特異的に Drp1 変異体を発現させる遺伝子改変マウス

の作出に成功した。その後遺伝子改変マウスを交配させ、心筋細胞特異的 Drp1K38A 発現マウスの解析を行ったが、基底状態での左室機能には心臓超音波法による明らかな心臓表現型を認めなかった。さらに、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因子の酵母 Atg32 について、我々がほ乳類の機能的ホモログとして同定した BCL2L13 についても、Cre-loxP システムによる心筋特異的欠損マウスを作製した。

さらに、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因子の酵母 Atg32 のほ乳類機能的ホモログ候補として同定した FKBP8 についても、Cre-loxP システムによる心筋特異的欠損マウスを作製・解析し、ストレス応答において心臓保護的に機能していることを明らかにした。(雑誌論文業績)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

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

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(6):H1485-H1497

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(3):e0152628

Receptor-mediated mitophagy. Yamaguchi O, Murakawa T, Nishida K, Otsu K. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;95:50-6

Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation.

Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso 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

〔学会発表〕(計5件)

mitochondria dynamics ~ mitophagy と心機能 ~、山口修、第 82 回日本循環器学会学術集会(招待講演) 大阪 2018 年

The Role of Autophagic Degradation in Heart Failure. 山口修、第 82 回日本循環器学会学術集会(招待講演) 大阪 2018 年

The Role of Autophagy in the Pathogenesis of Cardiac Diseases. 山口修、第 82 回日本循環器学会学術集会(招待講演) 大阪 2018 年

Involvement of mitochondrial DNA accumulation with inflammatory response during progression of heart failure. 山口修、第 34 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会(招待講演) 大阪、2017 年

Autophagy and quality control of mitochondria during progression of heart Failure. 山口修 第 81 回日本循環器学会学術集会、金沢 2017 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 修 (YAMAGUCHI, Osamu)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90467580

(3)連携研究者

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)
安井 博規 (YASUI, Hiroki)
上田 宏達 (UEDA, Hiromichi)
赤澤 康裕 (AKAZAWA, Yasuhiro)