

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19358

研究課題名(和文) Nox4を介したミトコンドリア形態制御の分子基盤解明による新たな心不全治療の開発

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of mitochondrial morphology by Nox4 and treatment for heart failure

研究代表者

松島 将士 (Matsushima, Shoji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80552869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：不全心筋においてミトコンドリアのサイズは減少し、数は増加した。この変化に伴って、ミトコンドリア形態制御因子であるDrp1活性を抑制するリン酸化は低下し、Mitofusin1は増加傾向であった。AngII刺激により培養心筋細胞においてDrp1は活性化した。一方でNox4阻害剤であるGKT137831投与により、AngII誘導性のDrp1活性化は抑制された。Nox4はDrp1活性制御因子であり、ミトコンドリアダイナミクスに関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In failing myocardium, mitochondrial size was decreased and number of mitochondria was increased. These changes were accompanied by a decrease in phosphorylation of Drp1, an inhibitor form of Drp1, and an increase in Mitofusin1. Treatment with angiotensin II (AngII) increased active form of Drp1 in cardiomyocytes. GKT137831, an inhibitor of Nox4, inhibited AngII-induced activation of Drp1. These results suggest that Nox4 is a regulator of Drp1 and involved in mitochondrial dynamics in cardiomyocytes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋リモデリング 心不全 ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

薬物療法・非薬物療法の進歩によって心不全の予後は格段に改善してきたが、慢性心不全例の5年生存率が70%、重症心不全例の2年生存率は50%程度といまだ予後不良である。日本における心不全患者数は推定200万人で、毎年新たに約10-20万人ずつ増加しており、今後高齢化に伴いさらに増加することが予想される。したがって心筋リモデリング、心不全の病態解明と新たな治療戦略の開発は重要な研究課題である。近年、心不全・心筋リモデリングの形成・進展に、心筋組織における酸化ストレスの増加とミトコンドリア機能障害が関与することがあきらかにされてきた。心不全の薬物治療としてRA系抑制薬や遮断薬による神経体液性因子の制御が奏功した一方で、ROSの制御による心不全治療はいまだに確立されていない。

心臓は絶えず拍動しておりエネルギー要求性が高い臓器である。心筋細胞内の多くのミトコンドリアから効率よくATPが産生されることでエネルギーが供給されているが、ミトコンドリア機能障害によるATP産生の低下は心筋細胞死により心筋リモデリングを促進する。最近、傷害されたミトコンドリアの処理機構として、ミトコンドリアの分裂・融合が重要な役割をはたしており、ミトコンドリア機能はこのミトコンドリアの分裂・融合により高度に制御されていることが知られるようになった。特に、ミトコンドリアの分裂はミトコンドリアDNA保持に、ミトコンドリアの融合は老化に対するミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たしている。つまり、このミトコンドリアの分裂と融合のバランスがミトコンドリア機能維持やミトコンドリアの品質管理に重要と考えられる。(Youle RJ et al. Science 2012)。このような知見は、ミトコンドリアの分裂・融合が、ミトコンドリア機能障害が重要な役割をはたしている心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する可能性を支持するものである。さらに、ミトコンドリア分裂・融合の制御によりミトコンドリア機能およびエネルギー代謝を維持し、心不全の病態を改善できる可能性がある。ミトコンドリアの分裂はDrp1、Fis1、ミトコンドリアの融合はMtf1、Mtf2、Opa1によって複雑に制御されているが、心筋リモデリングにおける酸化ストレスとこれらミトコンドリア分裂・融合制御蛋白の関連については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は『Nox4活性の制御による心筋組織内ROSの最適化によりミトコンドリア分裂・融合を調節することで、ミトコンドリア機能およびエネルギー代謝を維持し、心筋リモデリング・心不全の発症・進展を抑制する』という仮説を検証し『ミトコンドリア形態制御の分子基盤における新たな心不全治療タ

ーゲットを探索する』ことである。

3. 研究の方法

心筋梗塞後の心筋リモデリングに陥った不全心筋においてミトコンドリア分裂・融合バランス異常がみとめられるかを明らかにする。また、ミトコンドリア形態制御因子がNox4によって制御されているかを検証する。

左冠動脈結紮により心筋梗塞作成後28日間飼育し、下記(1)-(4)を評価した。

(1)心不全重症度評価

心エコー法による左室径、左室駆出率計測
ミラーカテーターによる大動脈圧、左室内圧測定

臓器重量測定：心重量、肺重量

(2)心筋組織学的評価

- ・心筋細胞肥大
- ・間質線維化
- ・アポトーシス

(3)ミトコンドリア分裂・融合の形態評価(電子顕微鏡)

(4)ミトコンドリア形態規定蛋白評価

- ・分裂促進因子 Drp1、Fis の蛋白量(ウェスタンブロット法)
- ・融合促進因子 Mitofusion1、Mitofusin2、OPA1 の蛋白量(ウェスタンブロット法)
- ・Drp1 リン酸化の評価(ウェスタンブロット法)

(5)オートファジーとの関連

- ・オートファジーのマーカーである LC3-II の蛋白量を評価

心筋リモデリングを引き起こす中心的な神経体液性因子であるアンジオテンシン II (AngII) を培養心筋細胞に投与し以下の項目を評価する。

(6)AngII 刺激により Drp1 の発現量、リン酸化レベルは変化するか?

(7)Nox4 阻害薬により AngII 誘導性の Drp1 の変化は抑制されるか?

4. 研究成果

(1)心不全重症度評価

心筋梗塞(MI)マウスは偽手術(sham)マウスに比べ心エコー上、左室内腔は拡大し、左室駆出率は低下していた(図1)。

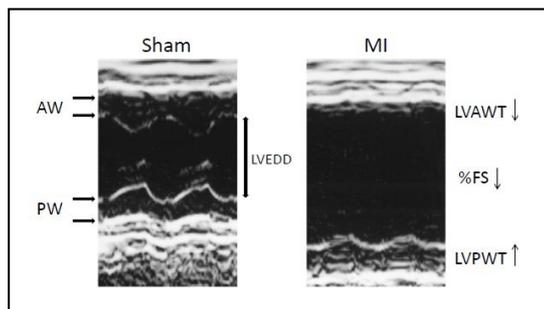


図1. 心エコー所見

LV, left ventricular; AW, anterior wall; PW, posterior wall; EDD, end-diastolic diameter; ESD, end-systolic diameter; FS, fractional shortening

また、また非梗塞部の左室壁厚は肥厚を認めた。心重量/体重比、肺重量/体重比は MI マウスにて sham マウスに比べ増加しており、心不全状態となっていることが確認できた (表 1)。

	Sham 4w n=10	MI 4w n=19
BW (g)	25.2±0.5	24.7±0.3
Heart weight (mg)	111.8±2.8	174.7±5.0*
Heart weight/BW (mg/g)	4.4±0.1	6.8±0.2*
LV weight (mg)	77.5±2.2	107.0±2.6*
LV weight/BW (mg/g)	3.1±0.1	4.2±0.1*
Lung weight (mg)	142.8±4.6	242.7±17.6*
Lung weight/BW (mg/g)	5.7±0.2	9.6±0.7*

表 1. 臓器重量

Data are shown as mean ± SEM; BW, bod weight; LV, left ventricle *P<0.001 vs Sham.

(2)心筋リモデリングの評価

MI 群では非梗塞部の心筋肥大、間質線維化、アポトーシスの亢進を認め、心筋リモデリングが進行していた。

(3)ミトコンドリア分裂・融合の形態評価

心筋梗塞後の非梗塞部心筋細胞におけるミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリアサイズが減少し (図 2) ミトコンドリア数は増加していた。

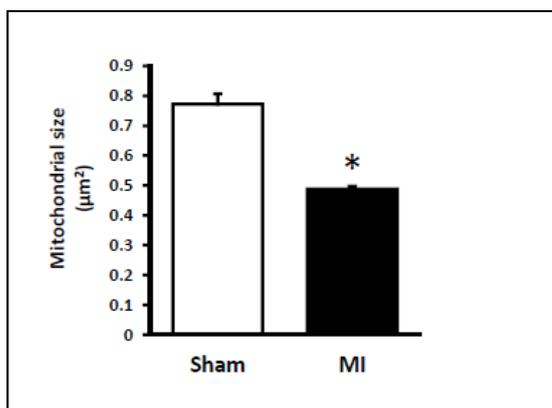


図 2. ミトコンドリアサイズ

Data are shown as mean ± SEM, *P<0.0001 vs. sham

(4)ミトコンドリア形態規定蛋白評価

非梗塞部における Drp-1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルはいずれも MI と sham マウスにおいて有意な差を認めなかったが、Mitofusion1 は MI マウスにおいて高い傾向で

あった。

一方、OPA1、Fis1 の蛋白レベルを western blot 法にて評価したところ MI 群で sham 群に比べて有意差はなかった。一方、Drp1 はリン酸化で制御されているが、Drp-1 を抑制するリン酸化に関しては低下していた。

(5)オートファジーとの関連

・オートファジーのマーカーである LC3-II の発現量は低下していた。

(6) AngII 刺激により Drp1 の変化

AngII 刺激により培養心筋細胞の Drp1 リン酸化が増加した (図 3)。

(7)Nox4 阻害薬による Drp1 制御

Nox4 阻害薬により AngII 誘導性の Drp1 の活性化は抑制された (図 3)。

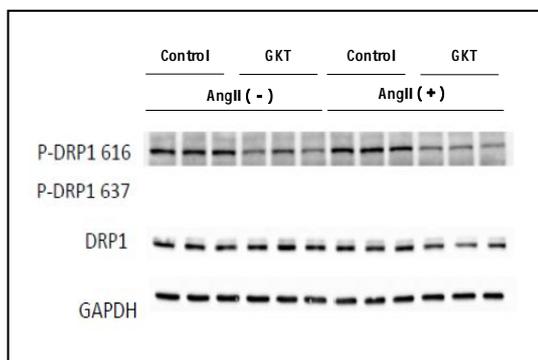


図 3. Nox4 による Drp1 制御

Data are shown as mean ± SEM, *P<0.0001 vs. sham

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 2 件)

1. Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Tsutsui H, Hatakeyama S. The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 100:43-53. 2016

2. Matsushima S, Kuroda J, Zhai P, Liu T, Ikeda S, Nagarajan N, Oka S, Yokota T, Kinugawa S, Hsu C, Li H, Tsutsui H, Sadoshima J. Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. Journal of Clinical Investigation 126(9):3403-16. 2016

[学会発表](計 2 件)

1. Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J:

“ Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling ” 第 81 回日本循環器学会学術集会, プレナリーセッション 2 心不全の病態解明への挑戦 ~ゲノムから臓器まで~ (2017/3/17 石川県立音楽堂, 金沢)

2. Matsushima S, Kinugawa S, Tsutsui H, Sadoshima J: “NADPH oxidase 4 is a major source of mitochondrial reactive oxygen species in the heart” 第 20 回日本心不全学会, シンポジウム 15 心不全治療ターゲットとしてのミトコンドリア (2016/10/9 ロイトン札幌, 北海道)

〔図書〕(計 2 件)

1. 松島 将士, 筒井裕之: 「心筋炎症/酸化ストレス制御による心不全治療」: 循環器内科 (科学評論社) Vol. 78, No.2, 119-125 ページ, 2015

2. 松島 将士, 筒井裕之: 「AHA 2014 からの報告 - Melvin L. Marcus Young Investigator Award に選出されて - 」: 循環器診療 (協和企画) No.22, 50-53 ページ, 2015

〔その他〕

ホームページ等

www.cardiol.med.kyushu-u.ac.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 将士 (MATSUSHIMA, Shoji)
九州大学病院・循環器内科・助教
研究者番号: 80552869

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

筒井 裕之 (TSUTSUI, Hiroyuki)
九州大学・大学院医学研究院・循環器内科学・教授
研究者番号: 70264017

絹川 真太郎 (KINUKAWA, Shintaro)

北海道大学・大学院医学研究科・循環病態内科学・講師
研究者番号: 60399871

(4) 研究協力者

松本 純一 (MATSUMOTO, Junichi)
北海道大学・大学院医学研究科・循環病態内科学・大学院生

岡部 浩祐 (OKABE, Kosuke)

九州大学・大学院医学研究院・循環器内科学・大学院生

池田 宗一郎 (IKEDA, Soichiro)

九州大学・大学院医学研究院・循環器内科学・大学院生