

令和元年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16016

研究課題名(和文)心不全の発症・進展における心筋ミトコンドリア鉄恒常性の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of mitochondrial iron homeostasis in development and progression of heart failure

研究代表者

佐藤 達也 (SATO, TATSUYA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40592473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア鉄代謝異常は酸化ストレスを介して心不全を発症・進展させるが、詳細は未だ不明な点も多い。本研究では、収差補正走査型電子顕微鏡Titanを用いたエネルギー分散X線分光法(EDS)により、心筋ミトコンドリアの鉄のマッピングを試みた。ドキシソルピシン心筋症マウスでは、生化学的手法で定量した心筋ミトコンドリア総鉄含有量が増加していたが、EDSによる鉄のマッピングではミトコンドリアクリステ上には鉄のシグナルはむしろ少なく、特定の領域への鉄の集積や凝集は認めなかった。以上より、ドキシソルピシン心筋症ではミトコンドリアにおいて反応性が高く活性酸素産生に関与する遊離鉄が増加していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、心筋ミトコンドリアにおける鉄恒常性の破綻を、収差補正走査型電子顕微鏡Titanを用いたエネルギー分散X線分光法(EDS)により詳細に解析できる可能性が示唆された。これは、患者から得られた心筋生検標本に対しても応用が可能であることを意味する。今後は解析対象を患者心筋生検標本に拡大し、ミトコンドリア鉄恒常性の破綻が治療標的となりうる疾患像を明らかにすることで臨床への応用を目指し、更に研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Impaired mitochondrial iron homeostasis is known to lead to development of heart failure through increased oxidative stress. However, the details are still unclear because the way to evaluate distribution of cardiac mitochondrial iron has not been established. In this study, we examined how cardiac mitochondrial iron homeostasis is impaired in the models of heart failure by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) using an aberration-corrected scanning electron microscope. Mice model of doxorubicin-induced cardiomyopathy showed increased mitochondrial iron content measured by biochemical Ferrozin assay. However, mapping of mitochondrial iron by EDS resulted in a rather small iron signal on the mitochondrial cristae and there was no iron accumulation in the mitochondria. The findings suggest that free iron, which catalyzes production of hydroxyl radicals, is increased and mitochondria-specific iron chelation is promising therapeutic target in doxorubicin-induced cardiomyopathy.

研究分野：循環器生理学

キーワード：ミトコンドリア 鉄代謝 心不全

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鉄は生体にとって必要不可欠な微量元素であり、酸素運搬、酸化還元反応、DNA の修復、蛋白質の翻訳、ミトコンドリア呼吸鎖における電子授受など、細胞生存にとって中心的役割を担っている。一方で、過剰な鉄は、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) から非常に細胞障害性の強い活性酸素種 (ROS) であるヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ ) を産生する反応 (Fenton 反応) を触媒するため、鉄は両刃の剣と形容されている。特に、ミトコンドリアはこれらの鉄の生合成を介した反応の中心であり、ミトコンドリア鉄恒常性の維持は細胞の生存・機能維持に重要であることが示唆されている。実際、鉄-硫黄クラスターの生成・輸送に関与するミトコンドリア蛋白 Frataxin の遺伝子欠損を特徴とする Freidrich 失調症の患者は、心筋ミトコンドリア内に鉄過剰を引き起こし、心肥大を伴う心不全を呈することが知られている。また、ミトコンドリアから細胞質への鉄輸送蛋白質 ATP Binding Cassette Protein B8 (ABCB8) の心臓特異的ノックアウトマウスは、ミトコンドリアにおける非ヘム鉄蓄積を介し、ROS 依存性に心機能障害を引き起こすことが報告された。更に、抗癌剤であるドキシソルピシンは容量依存的に心毒性を呈し、ドキシソルピシン心筋症は一度発症すると予後不良な疾患であるが、マウスのドキシソルピシン心筋症モデルでは心筋ミトコンドリア ABCB8 の発現低下を介し、ミトコンドリア鉄過剰による ROS を介した細胞障害が起こることが報告されたことから、ドキシソルピシン心筋症の発症機序の一つとして、ミトコンドリア鉄代謝異常の存在が示唆された。このように心筋ミトコンドリア鉄代謝異常は心筋症を呈することが明らかである一方、種々の心筋症における心不全の病態において、心筋ミトコンドリア鉄代謝異常が、心筋症や心不全発症にどのように寄与するのかの詳細は明らかになっていない。この理由として、臨床的な心筋ミトコンドリア鉄代謝を評価する方法が確立されていないことが挙げられる。血清鉄やトランスフェリン飽和度・血清フェリチンは心筋細胞内の鉄を必ずしも反映せず、心臓 MRI ( $T2^*$ -mapping) による鉄の評価は心筋全体の鉄の含有量は推定することが可能であるが、細胞内の鉄の分布について評価できる解像度を有していない。そこで研究代表者は、最近の収差補正走査透過型電子顕微鏡 (Titan) に着目した。Titan は従来の電子顕微鏡よりも空間分解能が飛躍的に向上し、原子レベルの詳細な構造評価が可能であり、生体試料へも応用できる。Titan を用いたエネルギー分散 X 線分光 (EDS) の手法により不全心筋ミトコンドリアにおける鉄のマッピングおよび定量化する方法が確立できれば、心筋ミトコンドリア内の鉄の局在が明確になり、不全心筋におけるミトコンドリア鉄恒常性の役割の解明に大きく貢献できる。また、将来的には患者の心筋生検標本に応用することで、鉄キレート剤投与の是非の判断や鉄恒常性破綻に関する分子の標的治療により、新しい心不全治療の開発にも貢献できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、種々の心不全モデルにおける心筋ミトコンドリア鉄含有量の評価と、収差補正走査型電子顕微鏡 Titan を用いたエネルギー分散 X 線分光法 (EDS) によるミトコンドリアにおける鉄のマッピングを試みた。また、血清鉄や血液ヘモグロビン値との関連や収縮不全・拡張不全など心不全の病態との関連の評価も評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物モデル

左室収縮能が低下する心不全モデルとしてドキシソルピシン心筋症マウスを用いた。8 週齢の C57BL/6 マウスに、ドキシソルピシン総量  $0.75\text{mg} / 25\text{g body}$  (対照群にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) を週 3 回分注にて腹腔内投与し、ドキシソルピシン心筋症モデルを作成した (J Clin Invest 2014;124:617)。左室拡張能が低下する心不全モデルとして、25-30 週齢の肥満 2 型糖尿病ラットモデル OLETF を用いた (PLoS One. 2012;7(6):e39893, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014;306:H1054)。また、個体の鉄代謝異常と心筋ミトコンドリア鉄の関連を評価する目的で慢性腎不全モデルラットを用いた。慢性腎不全は 8 週齢の SD ラットに、6/5 腎摘 (Subtotal Nephrectomy: SNx) 作成 5 週後の血液中の鉄指標および心筋を評価した。また、ミトコンドリア鉄蓄積の positive control として 8 週齢の C57BL/6 マウスに、鉄デキストラン  $5\text{mg}/25\text{g body}$  (対照群には 5%デキストラン) を週 5 日 4 週間腹腔内投与することで鉄過剰マウスを作成した (Sci Rep. 2015;5:18132)。

#### (2) 心筋標本作成とエネルギー分散 X 線分光法 (EDS) による鉄のマッピング

電子顕微鏡用の標本を以下のように作成した。まず心筋サンプルを  $0.5\text{-}1\text{mm}$  サイズにカットし、電顕用バッファー (2.5%グルタルアルデヒドと  $0.1\text{M}$  カコジル酸ナトリウムの混合液) に保存し一次固定。PBS にて洗浄後、4 酸化オスミウムにて 2 次固定し、シュクロースにて洗浄した。エタノール脱水、プロピレンオキシド脱水を経てプロピレンオキシドからエポキシ樹脂に置換し、エポキシブロックの型に包埋しウルトラミクロトームにてトリイジンブルー標本作製した。薄切箇所をウルトラミクロトームにて透過電顕標本作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色にて電子染色を行った。最後に、組織ドリフト予防のため、標本に炭素をコーティングした。グリッドには銅を用いた。尚、EDS によるスペクトラム評価では、ウラニル、鉛、炭素、銅のピークは鉄のピークとずれており、鉄の評価には影響がないことを確認した。標本を収差補正走査型透過電子顕微鏡 Titan G2 60-300 を用い、STEM モードで観察した。EDS

により標本中の鉄元素のマッピングおよびスペクトラムを評価した。

### (3) 生化学的な鉄の評価

心筋を摘出した後 PBS で灌流し血液を洗い流し、ホモジナイザーとミトコンドリア単離試薬を用いて、心筋ミトコンドリア分画ライセートを作成した。非ヘム鉄の定量は Ferrozin 法 (EMBO Mol Med 2016;8:247, Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:E6291) で、ヘム鉄の定量は高濃度シュウ酸により遊離した蛍光性プロトポルフィリン IX を測定する方法 (J Am Heart Assoc. 2015 Jul 31;4(8):e002272, Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:E6291) で行った。

## 4. 研究成果

Positive control として鉄過剰マウスの肝臓標本を観察した。STEM モードにてヘモジデリンを同定し EDS で鉄を評価したところ、鉄はヘモジデリンに一致して観察され、著明な鉄のピークが観察された。Negative control として組織片が無くグリッドのみの部分を EDS で評価したが、鉄のピークは見られなかった。以上より、Titan を用いた EDS では生体試料においても鉄の評価が可能であることが示唆された。

ドキシソルピシン心筋症マウスでは、生化学的手法で定量した心筋ミトコンドリア鉄含有量がコントロールと比して有意に増加していた。しかし、EDS による鉄のマッピングでは、心筋ミトコンドリアのクリステ上には鉄のシグナルはむしろ少なく、特定の領域への鉄の集積や凝集は認めなかったことから、ドキシソルピシン心筋症ではミトコンドリアにおいて活性酸素産生を触媒する遊離鉄が増加していることが示唆された。以上の結果より、ドキシソルピシン心筋症ではミトコンドリア移行性のある鉄キレート剤が、ミトコンドリアで増加した鉄を除去できる可能性があり、治療標的となりうる可能性を支持する結果であった。

次に、肥満 2 型糖尿病ラット(OLETF)では、非糖尿病コントロール(LETO)に比べ酸化ストレスを反映する過酸化脂質の増加を認めた(J Pharmacol Exp Ther. 2019;368:524, Physiol Rep. 2018;6:e13741.)。しかし、生化学的手法によるミトコンドリア鉄含有量の評価では、OLETF と LETO でミトコンドリア内の鉄含有量に差を認めず、EDS による鉄のマッピングは両群で差を認めなかった。以上より、OLETF の心筋での酸化ストレス亢進は、ミトコンドリア鉄代謝とは独立した機序であることが示唆された。実際、OLETF の心筋および腎臓で亢進した酸化ストレスは、sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor の投与により軽減されたが、細胞質およびミトコンドリアの鉄の含有量に変化がなかったことから、糖尿病による酸化ストレス亢進の病態及び治療標的としてはミトコンドリア鉄代謝障害の関与は低いことが示唆された。

最後に、慢性腎不全モデル(SNx)における心筋ミトコンドリア鉄代謝を検討した。血液ヘモグロビン濃度、血清鉄、不飽和鉄結合能は、腎筋膜のみ剥離した Sham 群に比べ SNx 群で有意に低値であった一方、心筋鉄含有量はミトコンドリア分画および細胞質分画の両方で両群に差を認めなかった。血液中の鉄の変化は必ずしも心筋内の鉄の変化を反映せず、臨床応用可能な心筋ミトコンドリアの鉄評価方法の確立が重要であることが改めて示唆された。

以上を踏まえ、今後は患者の心筋生検標本でミトコンドリア鉄定量とマッピングを試み、ミトコンドリア鉄代謝異常が関与する心不全の患者像を明らかにしてい

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kimura Y, Kuno A, Tanno M, Sato T, Ohno K, Shibata S, Nakata K, Sugawara H, Abe K, Igaki Y, Yano T, Miki T, Miura T. Canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, normalizes renal susceptibility to type 1 cardiorenal syndrome through reduction of renal oxidative stress in diabetic rats. J Diabetes Investig. 2019 Jan 21. doi: 10.1111/jdi.13009. [Epub ahead of print]

Oshima H, Miki T, Kuno A, Mizuno M, Sato T, Tanno M, Yano T, Nakata K, Kimura Y, Abe K, Ohwada W, Miura T. Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Reduced the Mortality Rate after Acute Myocardial Infarction with Modification of Cardiac Metabolomes and Antioxidants in Diabetic Rats. J Pharmacol Exp Ther. 2019 Mar;368(3):524-534. doi:10.1124/jpet.118.253666. Epub 2018 Dec 14.

Sato T, Chang HC, Bayeva M, Shapiro JS, Ramos-Alonso L, Kouzu H, Jiang X, Liu T, Yar S, Sawicki KT, Chen C, Martínez-Pastor MT, Stumpo DJ, Schumacker PT, Blackshear PJ, Ben-Sahra I, Puig S, Ardehali H. mRNA-binding protein tristetraprolin is essential for cardiac response to iron deficiency by regulating mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jul 3;115(27):E6291-E6300. doi: 10.1073/pnas.1804701115. Epub 2018 Jun 18.

Mizuno M, Kuno A, Yano T, Miki T, Oshima H, Sato T, Nakata K, Kimura Y, Tanno M, Miura T. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts. *Physiol Rep*. 2018 Jun;6(12):e13741. doi: 10.14814/phy2.13741.

〔学会発表〕(計4件)

Sato T, Yano T, Nishizawa K, Kimura Y, Miki T, Tanno M, Kuno A, Hirata M, Kawasaki R, Miura T. Infarct size-limiting effect of continuous erythropoietin receptor activator in chronic kidney disease is eliminated by use of its excessive dose. 第83回日本循環器学会年次学術集会(2019年)

Sato T, Chang HC, Bayeva M, Shapiro JS, Ramos-Alonso L, Kouzu H, Jiang X, Liu T, Yar S, Sawicki KT, Chen C, Stumpo DJ, Schumacker P, Blackshear PJ, Ben-Sahra I, Puig S, Ardehali H. mRNA Binding Protein Tristetraprolin is Required for Cardiac Protection Against Iron Deficiency Through Regulating Production of Mitochondrial Electron Transport Chain Components. American Heart Association Annual Meeting (2018年)

Sato T, Tanno M, Miki T, Yano T, Chang HC, Ardehali H, Miura T. 鉄欠乏に対するミトコンドリアの新規適応機構. 第18回日本抗加齢学会総会(2018年)

Sato T, Tanno M, Miki T, Yano T, Chang HC, Ardehali H, Miura T. Tristetraprolin prevents iron deficiency-induced mitochondrial ROS production by optimizing expression of UQCRCFS1 iron-containing mitochondrial protein in parallel with iron availability. 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム(2018年)

〔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)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菊地竜也

ローマ字氏名：Kikuchi Tatsuya