

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590826  
 研究課題名 (和文) 心不全における細胞の生死に係るミトコンドリア機能解析と生体組織工学的アプローチ  
 研究課題名 (英文) Cardiac cellular fate and mitochondrial function in the progress of heart failure  
 研究代表者  
 金井 恵理 (Iwai-Kanai Eri)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20372584

研究成果の概要：本研究は、“心不全における心臓構成細胞の生死のメカニズムを、ミトコンドリア機能の解析に焦点を当て、生物学・生体組織工学の両方のアプローチを通して明らかにする。”ことを目的に行ったものである。その結果、次の点を明らかにした。

- ①心不全の進展において、心筋細胞死等に先だって、心筋ミトコンドリアに異常が現れること。
- ②心不全の早期に現れるミトコンドリア機能障害を救済すると、心筋細胞死および心機能の低下を防ぐことができること。
- ③細胞の恒常性を保つのに必要なメカニズムであるオートファジーが、心不全の進展に、ミトコンドリア機能の変化にともなって関与すること。
- ④心筋オートファジーの新しい評価方法を開発したこと。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物系医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・医歯薬学

キーワード：心不全、アポトーシス、オートファジー、ミトコンドリア、国際研究者交流、米国

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化や生活習慣の欧米化により、心不全は以前にも増して臨床的にも社会

的にも問題になってきた。近年、申請者らやその他の報告により、心筋細胞アポトーシスが心不全の病態形成に重要な役割を持つことが分かってきた。一方、ミトコンドリアは呼吸とエネルギー産生を通して細胞の生存に必須のオルガネラである。特に、絶えず自律拍動する心筋はミトコンドリアの豊富な臓器であり、十分なエネルギー産生が行われないと即座に心不全に陥る。申請者らは、ミトコンドリアの心筋アポトーシス決定機構についての知見を積み重ねてきた。しかしながら、ミトコンドリアにどのように介入すれば心筋細胞死を回避でき、治療の可能性に結びつくのかはわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心不全における心臓構成細胞の生死のメカニズムを、ミトコンドリア機能の解析に焦点を当てて明らかにすることである。これによって、“心不全の病態解明と新しい治療法の開拓”を目指す。具体的には、研究期間内に次の点を明らかにする。

- ①心不全の進展に関わる心臓構成細胞のミトコンドリア機能の解析。
- ②心筋保護に適した環境の研究。

## 3. 研究の方法

- (1) 心不全の進展におけるミトコンドリア電子伝達系の機能解析のため、培養心筋細胞とドキソルビシン因性心筋障害モデルを用いて、ミトコンドリアの膜電位や酸素消費能、bcl-2 family タンパクや Caspase の連鎖的活性化、などを行った。
- (2) 心不全の進展におけるミトコンドリア障害を焦点にした介入治療実験のため、ドキソルビシン因性心筋障害モデルに

G-CSFなどを投与し、心エコーやカテーテル検査などで心機能を、(1)に挙げたような方法でミトコンドリア機能実験を行った。

- (3) 心筋保護に働く生体組織工学研究の途中で、心筋アポトーシスに係るミトコンドリア機能解析にはオートファジー研究が必要であることがわかったため、心筋オートファジーの解析を、Autophagic Flux、GFP-LC3 transgenic mice、Z-stacksを用いた蛍光顕微鏡による解析、などを行った。

実験のほとんどは主に研究代表者一人で実施したが、実験途中で必要性が浮上した(3)心筋オートファジー実験に関しては米国サンディエゴ大学バイオサイエンスセンター長 R.A.Gottlieb 博士と共に実施した。

## 4. 研究成果

ラットやマウス心から調整して培養心筋細胞および繊維芽細胞を用意し、心不全を模倣したストレスをかけて、酸素電極、電子顕微鏡、フローサイトメトリー、western blottingや免疫染色、など、多方面からミトコンドリア機能を検討した。平成19年度にdoxorubicinを用いて心筋ミトコンドリア障害モデルを作製することに成功し、平成20年度はこれを用いて心不全を抑制すべく、さまざまな介入事件を行った。その結果、G-CSFが心不全の早期に起こるミトコンドリアの機能異常を改善することによって、心不全の進展を食い止めることができることを発見した。(Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(3):H823-32.)。

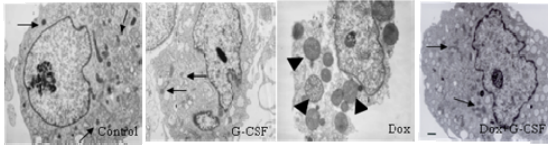


図1. 培養心筋細胞の電子顕微鏡写真。少量の Doxorubicin(Dox)により心筋細胞にアポトーシスは来さなかったが著名なミトコンドリアの膨化を誘導した。この心筋早期障害は G-CSF で救済することができた。→正常ミトコンドリア、▶膨化したミトコンドリア

心筋保護に適した生体組織工学研究の過程で、心不全の進展におけるオートファジーの重要性を見出した。しかしながら、それまで心筋オートファジーをより正確に評価する方法がなかったため、平成19年度にはこの分野の世界第一人者である米国San Diego大学 BioScience Center長R.A.Gottlieb博士と研究に取り組み、Lysosome活性に着目した新たな心筋オートファジー評価方法の開発に成功した (Autophagy. 2008;4(3):322-9.)。

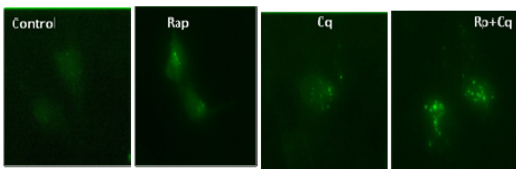


図2. Rap;Rapamycin, Cq;Chloroquine. 培養心筋細胞に LC3-GFP プラスミドを強発現させ、表示のとおり刺激した。緑の dots は心筋細胞内のオートファゴソームを示す。Dots の数から、リソソーム阻害剤である Cq によって Rap による心筋細胞の Autophagic Flux が増強し、Rp がオートファジーを誘導したことがわかる。

平成20年度には、この方法を用いてLPSに

よる心筋オートファジーの役割を解明した (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(2):H470-9.)。

### 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 3件)

- ① Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, WatanabeM, Watanabe K, Toyokuni S, Matsubara H, Nakahata T, and Adachi S. Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. 296(3):H823-32. 査読有
- ② Yuan H, Perry-Garza CN, Huang C, Iwai-Kanai E, Glembotski, and Gottlieb RA. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. 296(2):H470-9. 査読有
- 3 Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, Sayen R, Perry-Garza CN, Kim L, and Gottlieb. RA. Method to measure cardiac autophagic flux in vivo. Autophagy. 2008. 4(3):322-9. 査読有

[学会発表] (計 8件)

- ① Iwai-Kanai E, Hiraumi Y, Adachi S., Matsubara H. Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. Keystone Symposia 2009. 2009.3.27. British Columbia, Canada.
- ② Kimata M., Matoba S., Iwai-Kanai E, et al. Modulation of glucose metabolism by p53

attenuates hypoxia-induced apoptotic cell death in rat cardiac myocytes. 第73回日本循環器学会 2009.3.25.Osaka, Japan.

③ Iwai-Kanai E., Hiraumi Y., et.al. Effects of Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Cardiac Mitochondria. Mitochondrial Biology in Cardiovascular Health and Diseases Conference. 2008.10.6. Washington DC, USA.

④ 木股正樹、的場聖明、金井恵理、他. P53による心筋糖代謝の改善は心筋虚血障害を軽減する. 第17回日本アポトーシス学会 2009.8.2.京都府.

⑤ 平海良美、金井恵理、他. G-CSFは心不全の早期に現れるミトコンドリア障害を救済する. 第44回日本小児循環器学会 2008.7.3.福島県.

⑥ Hiraumi Y., Iwai-Kanai E., et.al. Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac myocytes from mitochondrial injury. 第72回日本循環器学会学術集会 2008.3.28.Fukuoka, Japan.

⑦ Iwai-Kanai E., Yuan H., et.al. Aspirin inhibits autophagic flux with protection from apoptosis in cardiac myocytes. 第72回日本循環器学会学術集会 2008.3.30.Fukuoka, Japan.

⑧ Iwai-Kanai E., Yuan H., et.al. Chloriquine can be used to measure flux of cardiac autophagy. 第72回日本循環器学会学術集会 2008.3.30. Fukuoka, Japan.

[図書] (計 1件)

① 金井恵理 文光堂 わかりやすい内科学 (井村裕夫編)、2007年、p189-196.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 恵理 (Iwai-Kanai Eri)

京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20372584

(2) 研究協力者

Gottlieb Roberta A.

San Diego State University・BioScience Center・

Professor, Director