

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08518

研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流傷害・梗塞後リモデリングにおけるミトコンドリア制御分子の役割解明

研究課題名(英文) Mitochondrial dynamics in myocardial ischemia-reperfusion injury and post-infarct remodeling

研究代表者

古賀 純一郎 (Koga, Jun-ichiro)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：10746142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマクロファージ特異的Drp1(dynamin-related protein 1)欠損マウスを用い、心筋梗塞の病態におけるミトコンドリア分裂誘導タンパクDrp1が果たす役割を検討した。本マウスに左冠動脈前下行枝領域の虚血・再灌流を行ったところ対照マウスと比べ梗塞サイズの明らかな減少は認めなかった。一方、完全閉塞モデルでは慢性期の左室拡大、駆出率低下を認めた。また、培養マクロファージではDrp1機能阻害によりマイトファジーが抑制された。これら結果はミトコンドリア分裂阻害によりミトコンドリア品質維持機構が障害され炎症の遷延、左室リモデリング増悪が生じる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまで不明であったマクロファージDrp1が急性心筋梗塞の病態において果たす役割が明らかとなった。心筋梗塞後の左室リモデリングは慢性期に繰り返す心不全の原因となり患者の生活の質(quality of life)、生命予後に及ぼす影響も大きく、その分子メカニズム解明と新規予防法、治療法の開発が求められている。本研究の成果はミトコンドリアダイナミクスへの介入を通じた新規治療開発に向けた第一歩となりうるが、ミトコンドリアは細胞内において多様な機能を担っており、副作用の少ない治療開発のためにはさらなる分子メカニズムの解明と適切な標的分子の選択が必要である。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria consistently change their morphology, which is closely related to cellular functions. In this study, we focused on the role of Drp1 (dynamin-related protein 1), which promotes mitochondrial division, in macrophages accumulating in the heart after myocardial infarction. For this purpose, we used Lysozyme-M-positive cells-specific Drp1-deficient mice. There was no significant difference in myocardial infarct size between these mice and control mice after transient occlusion of the anterior descending left coronary artery (LAD). In contrast, the deletion of Drp1 exacerbated inflammation and left ventricular enlargement after permanent occlusion of LAD compared to control mice. These results suggest that long-term inhibition of mitochondrial fission after myocardial infarction may promote the accumulation of damaged mitochondria, inflammation, and left ventricular remodeling. Further investigation is needed to clarify the detailed mechanism.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マクロファージ 心筋梗塞後リモデリング ミトコンドリアダイナミクス マイトファジー

## 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は生活の質(Quality of Life)のみならず生命を脅かし、1年以内に7%、3年で約15%の患者が死亡する(日本循環器学会/日本心不全学会合同ガイドライン:急性・慢性心不全診療ガイドライン)。超高齢社会に伴う患者数増加も相まって心不全に対する新たな戦略の確立が急務となっているが中でも虚血性心疾患は日本人における慢性心不全の原因として第1位を占め、その割合は近年増加している。特に心筋梗塞に伴う収縮心筋の喪失と慢性期の左室リモデリング(左室拡大、線維化)は心不全の発症原因として重要であり、これらの予防が慢性心不全の発症抑制、予後改善のため必要である。

近年、急性心筋梗塞に対する再灌流治療の普及に伴い、虚血再灌流傷害が臨床的問題となっている。その主な発生機序に「炎症」があげられ、血行再建後に心臓に浸潤した炎症性(M1)マクロファージが心筋細胞死を誘導することが知られている。一方、亜急性期～慢性期には修復性(M2)マクロファージが壊死組織の線維化・治癒を促進する。線維化の生じる詳細な分子機序は不明だが、申請者は炎症性マクロファージへの分化を抑制する薬剤(HMG-CoA還元酵素阻害薬、PPAR $\gamma$ アゴニスト)を梗塞部位に効率的に送達すると、梗塞サイズ縮小効果、左室線維化抑制効果を示すこと明らかにしており、これらの結果は「炎症」を標的とする治療が心筋梗塞後の慢性心不全を予防し長期予後改善につながる新規治療法となる可能性を示している。

近年、従来のM1・M2とは異なる概念として動脈硬化、がん、アレルギーなどそれぞれの病態に特徴的な“疾患特異的マクロファージ”が存在する可能性が提唱されている。心筋梗塞後の左室線維化にも同様の新たに提唱されたマクロファージが関与している可能性が考えられるが、その詳細は全く不明である。申請者はこれまでミトコンドリア分裂を誘導するDrp1(dynamamin-related protein 1)に着目し、Drp1がM1マクロファージへの分化を誘導することを明らかにした。しかし、心筋虚血再灌流傷害、左室リモデリングにおけるマクロファージDrp1の役割は不明である。申請者はIL-4により誘導されるM2マクロファージにおいてミトコンドリア融合が生じることを確認しており、Drp1はM2マクロファージへの分化誘導に対し抑制的に作用する可能性が示唆されるが、線維化を促進するマクロファージの存在を含め、Drp1によるマクロファージ分化制御機構の詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

故に、申請者は“マクロファージDrp1は炎症性マクロファージへの分化誘導を通じ心筋虚血再灌流傷害、梗塞後左室リモデリングを促進する”との仮説を立てた。本研究により心筋虚血再灌流傷害、心筋梗塞後左室リモデリングの病態におけるマクロファージDrp1の選択的役割を細胞～生体レベルで明らかにし、新規治療標的分子となり得るか明らかにする。具体的には以下の点を明らかにすることを試みる。

- マクロファージDrp1が心筋虚血再灌流傷害を促進するか否か明らかにする。
- マクロファージDrp1が心筋梗塞後リモデリング(左室拡大・線維化)を促進する否か明らかにする。
- 心筋梗塞部位に線維症型マクロファージが存在することが確認されれば、Drp1が同マクロファージへの分化誘導において果たす役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マクロファージ Drp1 欠損マウスにおける虚血再灌流傷害

マクロファージ Drp1 の心筋虚血再灌流傷害における役割を明らかにするため、マクロファージ特異的 Drp1 欠損マウスに対し冠動脈左前下行枝の虚血再灌流傷害を行った。マクロファージ Drp1 が虚血再灌流傷害を促進することが明らかとなれば Drp1 が梗塞部位への炎症細胞浸潤において果たす役割を病理組織学的解析、flow cytometry、各種イメージングにより明らかにする。

#### (2) マクロファージ特異的 Drp1 欠損マウスにおける心筋梗塞後左室リモデリング

心筋梗塞後慢性期に生じる左室リモデリング(左室拡大、線維化)においてマクロファージ Drp1 が果たす役割を明らかにする。上記マウスの左冠動脈前下降枝を結紮し、心筋梗塞を作成する。28日後の左室サイズ、心機能を小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo®2100 を用い定量的に評価する。また、摘出心臓組織の Masson-Trichrome 染色、Picro-Sirius Red 染色を行い、コラーゲンを定量することにより左室線維化を定量する。

#### (3) 心筋梗塞後に集積するマクロファージのプロファイリング

慢性期の左室リモデリングに及ぼすマクロファージ Drp1 の役割が明らかとなれば、Drp1 によるマクロファージ分化制御機構の詳細を明らかにする。

##### a. 心筋梗塞部位に集積するマクロファージのプロファイリング

心筋梗塞部位に浸潤するマクロファージについて炎症性マクロファージ関連分子(Ly-6C)、修復性マクロファージ関連分子(マンノース受容体(CD206))ならびに線維症型マクロファージ関連分子(M-CSFR、C5aR、Ceacam1)の発現を FACS にて解析し、各マクロファージの経時的な動態を明らかにする。マクロファージ Drp1 欠損マウスにおいても同様の解析を行い、Drp1 がこれら細胞の梗塞部位への集積にどのような影響を与えるかを明らかにする。

##### b. Drp1 による線維症型マクロファージへの分化制御機構の解明

Drp1 欠損により線維症型マクロファージへの分化が促進あるいは抑制されることが明らかとなれば、培養マクロファージにおいて Drp1 の機能抑制、Drp1 の強制発現を行い Drp1 がマクロファージ分化を誘導する分子機序について明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) マクロファージ Drp1 欠損マウスにおける虚血再灌流傷害

心筋虚血再灌流障害におけるマクロファージ Drp1 の役割を明らかにするため C57Bl/6J マウスの左冠動脈前下行枝(LAD)について一過性血流遮断を行った。再灌流 24 時間後に心臓を摘出し梗塞面積、LAD 灌流域(area at risk)を測定した。マクロファージ Drp1 欠損の影響について梗塞面積/area at risk により定量したところ対照群と明らかな差は認めなかった。

#### (2) マクロファージ特異的 Drp1 欠損マウスにおける心筋梗塞後左室リモデリング

心筋梗塞後慢性期の左室リモデリングにおいてマクロファージ Drp1 が果たす役割を明らかにするため LAD 完全結紮による心筋梗塞モデルを作成した。小動物用超音波高解像度イメージングシステムにより梗塞後 28 日目の左室径、左室壁厚、左室駆出率を測定した結果、マクロファージ Drp1 欠損により左室拡張末期径の拡大、左室駆出率の低下を認めた。LAD 結紮後の生存率については 28 日時点において有意差を認めなかった。

摘出心臓組織の免疫組織学的解析ではマクロファージ Drp1 欠損群において Mac-3 陽性マクロファージ集積の増加を認め、Masson-Trichrome 染色を行い定量した左室線維化も同様にマクロ

ファージ Drp1 欠損により増悪した。アポトーシス細胞も Drp1 欠損群において増加を認めた。

### (3) 心筋梗塞後に集積するマクロファージのプロファイリング

心筋梗塞 3 日後の心臓組織をコラゲナーゼ、エラスターゼにより分解し単離した単球・マクロファージのフローサイトメトリーではマクロファージ Drp1 欠損群、対照群間に Ly-6C 高発現炎症性単球の割合に有意な差は認めなかった。

(4) マクロファージ機能制御における Drp1 の役割を明らかにするため LPS、IFN- $\gamma$  により誘導した炎症性マクロファージを用いた機能解析を行った。その結果、炎症性マクロファージではミトコンドリア分裂を認め、Drp1 機能阻害により抑制された。炎症性サイトカイン(CCL2、TNF- $\alpha$  など)の発現は Drp1 阻害剤、siRNA による Drp1 のノックダウンにより抑制された。Drp1 阻害剤により処理した炎症性マクロファージの RNA-seq 解析ではこれらに加え細胞周期や細胞外基質の産生に関連する様々な経路の mRNA 発現の抑制を確認した。これらの結果は in vivo における炎症の遷延とは反対の結果であり、梗塞後心筋組織においてミトコンドリア品質維持機構が破綻し炎症が遷延している可能性を考え、マクロファージより単離したミトコンドリアの LC3 についてウェスタンブロッティングを行い、マイトファジーを定量した。その結果、Drp1 欠損によりマイトファジーの抑制を認め、上記、仮説を支持するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umezū Ryūta, Kōga Jun-ichirō, Matōba Tetsuya, Katsuki Shunsuke, Wang Lixiang, Hasuzawa Nao, Nomura Masatoshi, Tsutsui Hiroyuki, Egashira Kensuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Macrophage Dynamin-Related Protein 1 Accelerates Intimal Thickening After Vascular Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 e214-e226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.120.314383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun-ichiro Koga
2. 発表標題 Mitochondrial dynamics in macrophage-mediated inflammation and cardiovascular diseases
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun-ichiro Koga, Ryuta Umezū, Shunsuke Katsuki, Tetsuya Matoba, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Dynamin-related protein 1 induces macrophage activation and intimal hyperplasia after mechanical injury in mouse femoral arteries
3. 学会等名 VASCULAR BIOLOGY 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀 純一郎, 的場 哲哉, 蓮澤 奈央, 野村 政壽, 江頭 健輔, 筒井 裕之.
2. 発表標題 ミトコンドリアダイナミクスによるマクロファージ機能制御と血管病.
3. 学会等名 Cardiovascular and Metabolic Week 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun-ichiro Koga, Ryuta Umezu, Tetsuya Matoba, Hiroyuki Tsutsui, Kensuke Egashira.
2. 発表標題 Macrophage dynamin-related protein 1, a mitochondrial fission protein, promotes inflammation and vascular remodeling after mechanical injury in mice.
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------