

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22622

研究課題名（和文）心筋障害における細胞質ミトコンドリアDNAの制御機構の解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanism of cytosolic mitochondrial DNA in cardiac injury and its therapeutic application

研究代表者

筒井 裕之（Tsutsui, Hiroyuki）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70264017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：不全心筋においてZBP1が増加し、培養心筋細胞へのミトコンドリアDNAの投与により、ZBP1および炎症性サイトカインが増加した。ZBP1ノックアウトでは心機能が悪化し、心筋の炎症反応上昇とNF-κBの活性化を伴っていた。さらに、TLR9の阻害によりZBP1が減少することが明らかとなった。ZBP1はTLR9により発現が制御されており、また、ZBP1はNF-κB経路を介して炎症を負に制御することで、抗炎症および心筋保護的に機能す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

本研究は心筋細胞における新たな炎症制御機構を明らかにすることで心不全の病態理解を進め、新たな治療法の確立へと発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In failing hearts and mitochondrial DNA-treated cardiomyocytes, ZBP1 protein levels were increased. ZBP1 knockout mice demonstrated exacerbation of cardiac dysfunction, accompanied by elevation of inflammatory cytokines and NF-κB. In addition, the inhibition of TLR9 decreased ZBP1 protein levels. ZBP1 is positively regulated by TLR9. ZBP1 plays a protective role in cardiac inflammation and injury by negatively regulating NF-κB pathway.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 ミトコンドリアDNA 炎症

1. 研究開始当初の背景

あらゆる心疾患の終末像である心不全の重症例の生命予後は極めて不良であり、2年生存率は約50%と悪性腫瘍に匹敵する。生活習慣の欧米化と人口の高齢化に伴い心不全患者数は増加しており、わが国では2030年には130万人に達すると推計され、「心不全パンデミック」として全世界においても医学的・医療経済的な大きな問題となっている。したがって、心不全の病態解明と新たな治療戦略の開発は循環器領域において最も重要な研究課題である。心不全の病態基盤は心筋細胞肥大・細胞死・間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には炎症およびエネルギー代謝異常が密接に関与している。ミトコンドリアはストレスによりミトコンドリアDNAを細胞質に漏出するが、細胞質におけるフリーのミトコンドリアDNAを認識する蛋白であるZBP1はTBK1を介して炎症、エネルギー代謝、細胞生存シグナル、インスリンシグナルなどに深く関与する(図1)。また、エクソソーム中のミトコンドリアDNAは細胞に取り込まれることが知られている(図1)。本研究の目的は、『細胞質ミトコンドリアDNA増加によるZBP1の活性化が、炎症、エネルギー代謝異常を引き起こし、心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する』(図2)という仮説を検証するとともにZBP1の安定化による炎症・エネルギー代謝制御というパラダイムに基づく新規心不全治療法の開発を目指すものである。

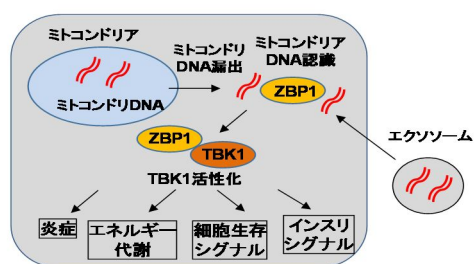


図1. ZBP1によるミトコンドリアDNA認識

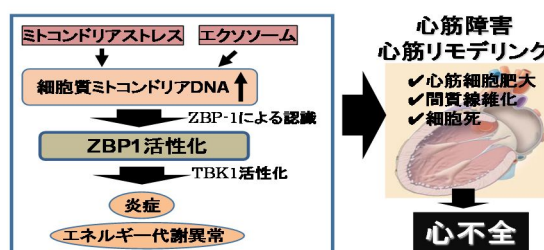


図2. 細胞質ミトコンドリアDNA認識蛋白ZBP1活性化による心筋障害・心筋リモデリング(仮説)

2. 研究の目的

本研究では具体的には以下の点を明らかにすることを目的とする。

1) 細胞質ミトコンドリアDNAの増加により心筋細胞のZBP1とTBK1発現・活性が変化するか?

2) 障害心筋・不全心筋において細胞質ミトコンドリアDNAの増加、ZBP1-TBK1系の活性化を伴うか?

また、エクソソームにより細胞質ミトコンドリアDNAは増加するか?

3) ZBP1抑制により炎症、エネルギー代謝異常が改善し、心不全の形成・進展が抑制されるか?

3. 研究の方法

1) 細胞質ミトコンドリアDNAの増加により心筋細胞のZBP1とTBK1発現・活性が変化するか?

2) 障害心筋・不全心筋において細胞質ミトコンドリアDNAの増加、ZBP1-TBK1系の活性化を伴うか?

また、エクソソームにより細胞質ミトコンドリアDNAは増加するか?

3) ZBP1抑制により炎症、エネルギー代謝異常が改善し、心不全の形成・進展が抑制されるか?

[2019年度の研究計画]

1. ミトコンドリアDNAによる心筋細胞におけるZBP1とTBK1制御機構の解析

マウスの肝臓から抽出したミトコンドリアDNAをリポフェクタミンを担体として新生仔培養心筋細胞に投与することで、ZBP1-TBK1経路が活性化されるか評価する。1) 細胞質ミトコンドリアDNA評価: 細胞質分画ミトコンドリアDNA量、(RT-PCR) mtDNAとZBP1の共局在(Binary assay) ZBP1-mtDNA相互作用(ChIP assay) BrdUラベルmtDNA評価 2) ZBP1・TBK1蛋白評価: 発現・リン酸化(ウエスタンブロット法(WB法)) ZBP1-TBK1相互作用(免疫沈降) 3) 炎症シグナル評価: NF-κB発現・リン酸化(WB法) サイトカイン発現: TNF-α、IL-1、IL-6、(RT-PCR) 4) エネルギー代謝評価: ミトコンドリア呼吸能: state3、state4(O₂ flux analyzer) TCA cycle 活性(クエン酸合成酵素) ミトコンドリア膜電位(JC-1染色)

また、ミトコンドリアDNA漏出を誘導するグルコースオキシダーゼを投与して上記1)~4)を同様に評価する。

2. 心筋細胞障害モデルにおける細胞質ミトコンドリアDNAおよびZBP1/TBK1の解析

過酸化水素(10-3mol/L, 48h) アンジオテンシンII(10⁻⁹-10⁻⁶mol/L, 48h)添加による培養心

筋細胞障害モデルを用いて細胞質ミトコンドリア DNA および ZBP1 の役割を解析する。ZBP1 のノックダウン・過剰発現を行い以下の項目を評価する。1) 心筋細胞障害評価：細胞 viability (Evans blue 染色) 培養液中 LDH 濃度 2) 細胞質ミトコンドリア DNA 評価 3) ZBP1・TBK1 蛋白評価 4) 炎症シグナル評価 5) エネルギー代謝評価

3. エクソソームと細胞質ミトコンドリア DNA および ZBP1/TBK1 の関連の評価

上記モデルにおいて培養液中のエクソソームを分離し(超遠心分離法)エクソソーム中のミトコンドリア DNA を評価する。エクソソームの増加およびミトコンドリア DNA がエクソソームに含有されることを確認した上で、正常心筋細胞に障害心筋細胞から分離したエクソソームを投与して、ZBP1 が活性化されるかを検証する。

[2020 年度の研究計画]

1. 不全心筋における細胞質ミトコンドリア DNA および ZBP1 の解析：モデル動物での検討

冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全マウスと横行大動脈縮窄による圧負荷心不全マウスを用いて、細胞質およびエクソソームのミトコンドリア DNA、ZBP1 発現量の変化と心不全の重症度との関連について検討する。

1) 心筋リモデリングの評価：心不全重症度評価(死亡率、心エコー、血行動態測定、心・肺重量測定) 心筋病理組織(心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシス、炎症細胞浸潤) 2) 細胞質ミトコンドリア DNA 評価 3) ZBP1・TBK1 蛋白評価 4) 炎症シグナル評価 5) エネルギー代謝評価 6) 血液中エクソソーム解析：血中エクソソームの回収およびミトコンドリア DNA 定量

2. ZBP1 の炎症・エネルギー代謝および心筋リモデリングに対する役割の解明

心筋特異的 ZBP1 ノックアウトマウスに心不全を作成し上記 1 と同様の項目を評価する。

3. ZBP1 制御の新たなターゲットの解明 (筒井、松島、井手)

心筋細胞における ZBP1 相互作用蛋白を免疫沈降と M A S かいせき質量分析法により同定する。また、ZBP1 活性を抑制する低分子化合物スクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) ZBP1 ノックダウンは心筋細胞の炎症を増加させた

培養心筋細胞において ZBP1 を siRNA でノックダウンし機能解析を行ったところ、ZBP1 のノックダウンで mtDNA 投与による IL-1、IL-6 が増加した。(図 1)

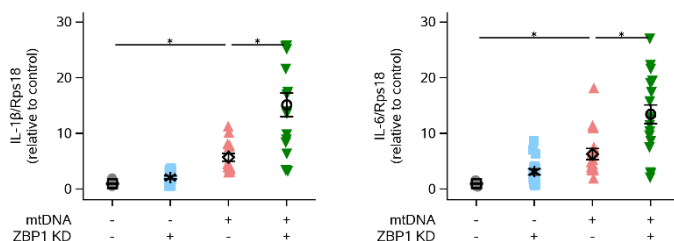


図 1. ZBP1 ノックダウンによる炎症性サイトカインの変化

(2) ZBP1 は RIP3K-NFκB 経路を抑制して抗炎症作用を発揮した

ZBP1 ノックダウンにより心筋細胞における RIP3K およびリン酸化 NF-κB が増加した。

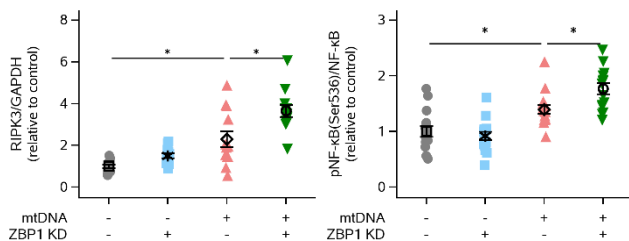


図 2. ZBP1 ノックダウンによる RIP3K および NF-κB の変化

(3) ZBP1 ノックアウトマウスでは梗塞後の心筋炎症が増悪した

ZBP1 ノックアウトマウスでは RIP3K、リン酸化 NF-κB、炎症性サイトカインが増加した。

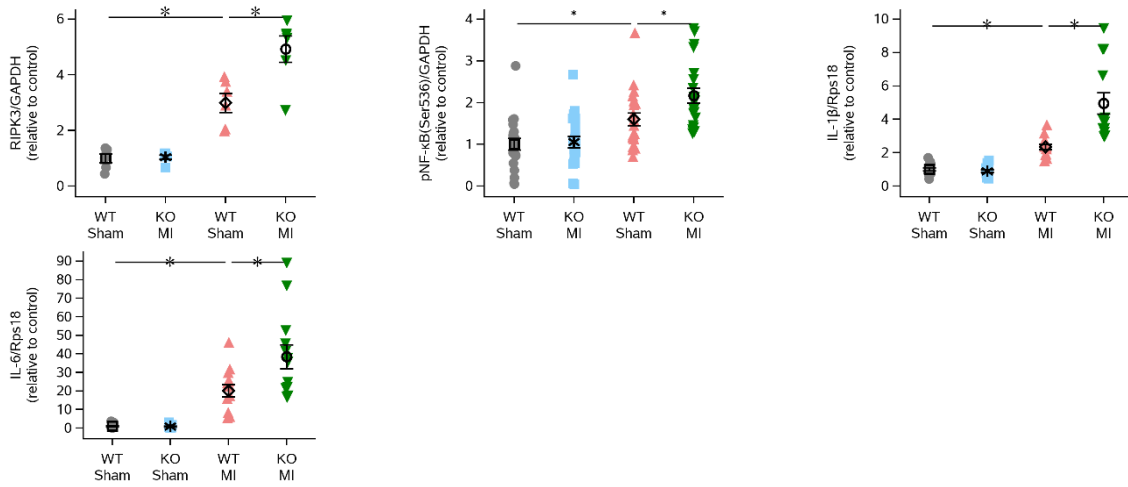


図3 . ZBP1 ノックアウトによる RIP3K、NF-κB、炎症性サイトカインの変化

(4) ZBP1 ノックアウトマウスでは梗塞後の心機能障害が悪化した

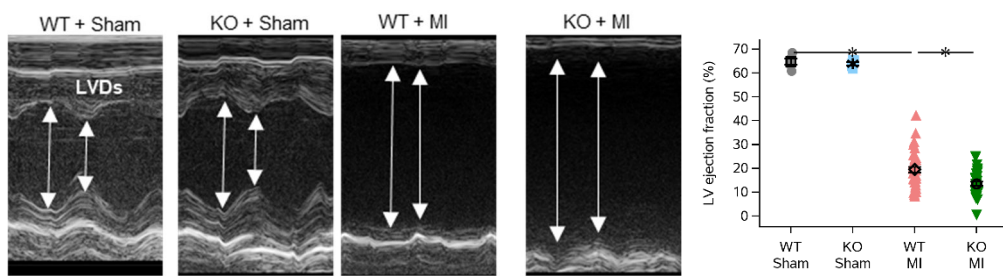


図4 . ZBP1 ノックアウトによる梗塞後心機能の変化

(5)まとめ

上記より ZBP1 は炎症を抑制することで心筋リモデリングに対して保護的に作用することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okabe Kosuke, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Shinohara Keisuke, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 DPP (Dipeptidyl Peptidase)-4 Inhibitor Attenuates Ang II (Angiotensin II)?Induced Cardiac Hypertrophy via GLP (Glucagon-Like Peptide)-1?Dependent Suppression of Nox (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) 4-HDAC (Histone Deacetylase) 4 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 991 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Soichiro, Matsushima Shouji, Okabe Kosuke, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Morimoto Sachio, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Blockade of L-type Ca ²⁺ channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF- κ B pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46367-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	松島 将士 (Matsushima Shouji) (80552869)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	井手 友美 (Ide Tomomi) (90380625)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------