

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590865

研究課題名(和文) 心不全進展におけるオートファジー制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Role of autophagy in the progression of heart failure

研究代表者

山口 修 (YAMAGUCHI OSAMU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90467580

研究成果の概要(和文)：オートファジーとは代表的な細胞内分解系である。我々はこれまで、心不全病態におけるオートファジーの亢進が心保護的機構であることを明らかにした。本研究では心筋細胞特異的オートファジー欠損マウスが、経時的に異常ミトコンドリア蓄積と酸化ストレスの上昇を伴い、心機能低下と心拡大を来し、早期に心不全死に至ることを見いだした。すなわちオートファジーは老化に対しても心臓保護的であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Constitutive autophagy is important for control of the quality of proteins and organelles to maintain cell function. We have previously reported that autophagy in the heart has a protective role in the pathogenesis of heart failure. In the present study, we monitored cardiac-specific Atg5-deficient mice. The Atg5-deficient mice began to die after the age of six months. Atg5-deficient mice exhibited severe cardiac dysfunction at the age of 10 months. Ultrastructural analysis revealed a disorganized sarcomere structure and collapsed mitochondria in Atg5-deficient mice. These results suggest that continuous constitutive autophagy plays a crucial role in maintaining cardiac structure and function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全の生命予後は5年生存率50%以下と他の慢性疾患と比しても極めて悪く、主要先進国において最も頻度の高い死因の1つである。オートファジーとは細胞内分解系の一つであり、細胞内のタンパク質やミトコンドリアなどの細胞内構造を非選択的に分解し、再合成やエネルギー源として再利用する系である。我々はこれまで、オートファジー必須分子である Atg5 の心筋細胞特異的欠損マウスを作製解析することで、オートファジーが圧負荷や β 刺激による血行動態ストレスにおいて、心保護的に機能していることを明らかにしてきた。オートファジー制御を心不全の新規治療に応用するにあたり、心筋細胞におけるオートファジー制御機構を明らかにすること、オートファジー低下が心筋細胞死を誘導する分子機構を解明することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究はオートファジーを制御する分子機構を明らかにし、心不全の治療に応用することを目的とする。オートファジー関連分子の遺伝子改変動物を解析することで、心臓ストレスがオートファジーを制御する分子機構を明らかにし、心不全治療への応用の分子標的を同定する。

また、心不全患者は特に高齢者に多く、加齢に伴いオートファジー活性が低下することが知られている点から、加齢ストレスがオートファジーを介して心不全に及ぼす影響についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1)加齢に伴う心臓オートファジー活性変化の検討を行う。10週齢、6ヶ月齢、14ヶ月齢、26ヶ月齢の野生型C57B/6J雄性マウス心臓左室を摘出し、タンパク質を抽出した後にSDS-PAGE、Western Blottingを行った。オートファジー活性の検出には抗LC3抗体を用いた。オートファジー活性の低下は一般的にLC3-IIの発現量低下(LC3-I/LC3-II ratio 上昇)として検出可能である。

(2)心筋細胞特異的Atg5ノックアウト(KO)マウスの作製ならびに生存期間の観察を行う。

Atg5はオートファジー必須遺伝子の一つであるが、その全身性ノックアウトマウスは生直後に死亡するため、加齢におけるその機能解析は不可能である。そこで α MHCプロモーターを用いて心筋細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと、Atg5 flox マウスを交配し、心筋特異的Atg5KOマウスを作製した。本マウスを12ヶ月齢まで観察し生存曲線を作成した。

(3)Atg5KOマウスの心機能を検討するため、3

ヶ月齢、6ヶ月齢、12ヶ月齢と経時的に本マウスの心エコーを行い、拡張末期左室径(LVd)、収縮末期左室径(LVs)、左室短縮率(FS)を計測した。エコー機器にはPhilips Medical Systems SONOS-5500、15-MHz リニアトランスデューサーを用いた。

(4)Atg5KOマウスの組織学的検討および心臓リモデリングマーカーの評価。

心臓を摘出、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、薄切切片を作成。ヘマトキシリンエオジン染色ならびにアザン・マロリー染色を施行。また、mRNAを抽出し、定量的RT-PCRを施行、ANFやBNPなどの心臓リモデリングマーカーを定量した。

(5)Atg5KOマウスのミトコンドリア機能や酸化ストレス、アポトーシス性心筋細胞死の評価。マウス心臓からミトコンドリアを単離し、Complex I+III、Complex II+IIIの活性をそれぞれNADH、コハク酸を基質として酵素活性測定を施行した。酸化ストレスの指標にはヘムオキシゲナーゼ1のmRNA発現量を定量的RT-PCR法で、4-ヒドロキシ-2-ノネナール化蛋白質発現量をWestern Blottingにて評価した。また透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察も施行した。

(6)オートファジー分子機構の上流に位置するmTORの制御に関わる分子、Rhebの心筋特異的ノックアウトマウスを(2)と同様の方法で作成し、表現型を解析した。

4. 研究成果

(1)野生型マウス心における検討により、心臓におけるオートファジー活性は若年マウスと比し6ヶ月齢頃より低下することが明らかとなった。

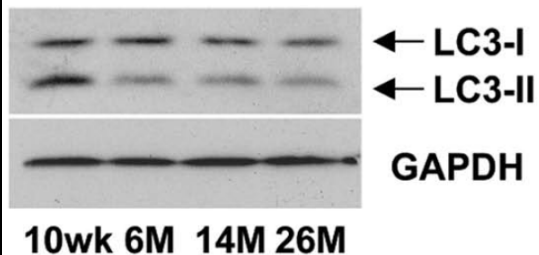


図1 加齢に伴うオートファジー活性の低下

(2)Cre/loxPシステムを応用し、オートファジー必須遺伝子であるAtg5の心筋細胞特異的ノックアウト(KO)マウスを作成し、長期間にわたる生存期間の観察を行った。その結果図2に示すようにAtg5KOマウスは対照群に比し、6ヶ月頃より死亡し始め、1年後の生存率は約40%と、対照群に比し有意に早期に死亡することが明らかとなった。

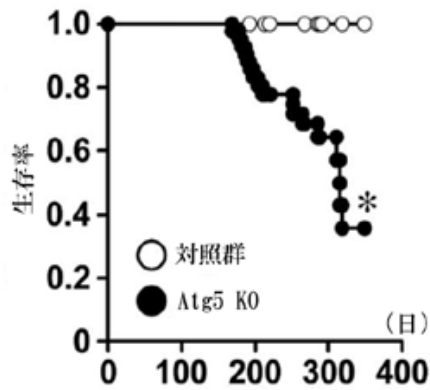


図2 Atg5欠損マウスの生存曲線 (* p<0.05)

(3)心臓超音波法による経時的心機能観察を行った。その結果本マウスは、3ヶ月齢では心機能は正常であったが、6ヶ月齢で左室収縮能低下と左室拡大を来し、6ヶ月齢以降心不全死に陥ることを見いだした。図3心エコー図に示すように、12ヶ月齢のAtg5KOマウスは著明な左室拡大と左室収縮力の低下を来した。本マウスで示される左室拡大並びに左室収縮力の低下は経時的に進行することが明らかとなった。すなわちオートファジーは老化に対して心臓保護的機構であることが明らかとなった。

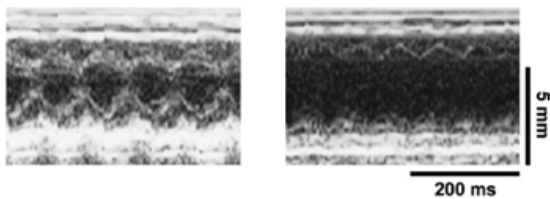


図3 12ヶ月齢マウスのMモード心エコー図

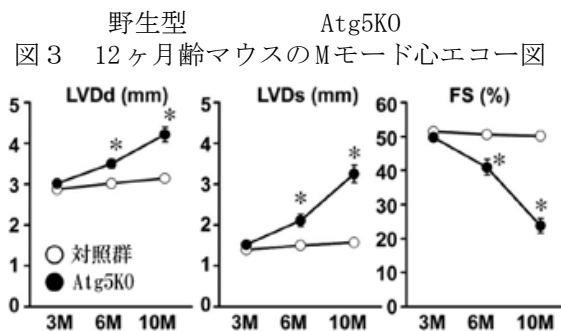


図4 月齢による心機能の推移

(4)組織学的検討において、HE染色でAtg5KOマウスの心筋細胞黄疸面積が有意に拡大していることが示された。またアザン・マロリー染色で心臓線維化が亢進していることが示された(図5)。これらの結果は定量的RT-PCRにおける、コラーゲン type 1、心房性利尿因子、脳性利尿ペプチド、 α スケルタルアクチンの mRNA 発現量増加に示される心臓リモデリングマーカーの変化と一致した。

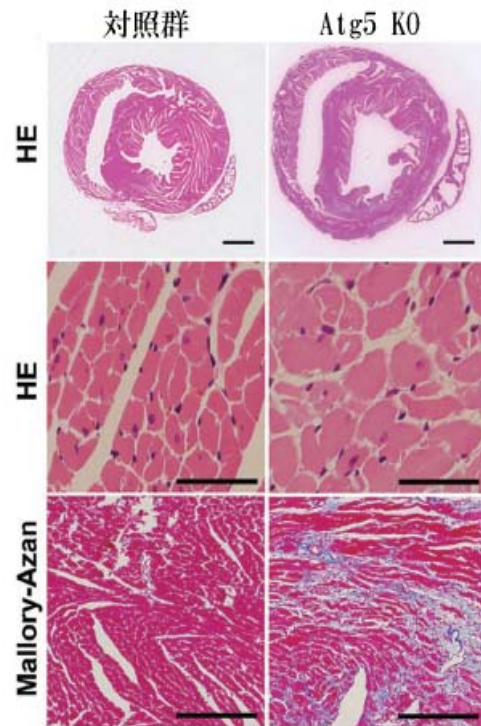


図5 Atg5KOマウスの組織学的評価

(5)電子顕微鏡による細胞内微細構造の検討により、心機能低下出現前の3ヶ月齢から、既に異常ミトコンドリアの蓄積が認められた。更にミトコンドリア呼吸鎖酵素機能低下、酸化ストレスの蓄積、アポトーシス性心筋細胞死の増加を呈していることを見いだした。すなわちオートファジーによる障害ミトコンドリアの除去が加齢に伴う心機能維持に重要であることが示唆された。

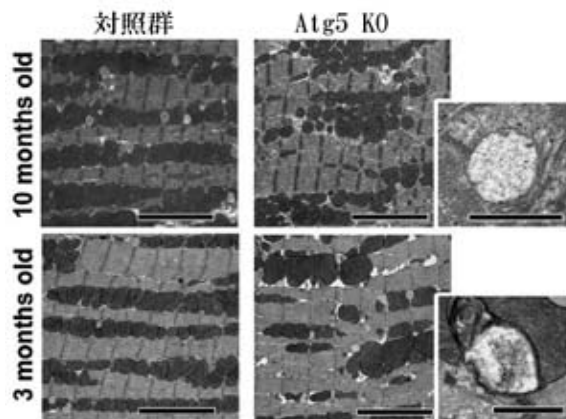


図6 Atg5KOマウス心の細胞内微細構造

(6)オートファジー分子機構の上流に位置するmTORの制御に関わる分子、Rhebの心筋特異的ノックアウトマウスを作成解析した。その結果、本ノックアウトマウスは生後10日で心重量の低下並びに心機能低下を呈し、心不全死を来することが明らかとなった。電子顕微鏡による微細構造の検討により、心筋線

維異常が認められた。以上より Rheb がオートファジー制御による心不全治療の分子標的となり得る可能性が示唆された。

(7)以上(1)～(6)の結果より、心筋細胞の恒常性維持におけるオートファジーの主要な役割はミトコンドリアのターンオーバーにあると考えられる。オートファジー活性が加齢と共に低下することが、細胞内の異常を蓄積し疾患発症に結びつくものと推察される。心不全が高齢者に多く認められていることもこの点に關与する可能性が示唆された。

近年、酵母においてミトコンドリア特異的なオートファジーの存在ならびにその責任分子 Atg32 が同定された。未だ哺乳類細胞では、ミトコンドリア特異的なオートファジーの責任分子は同定されていないが、パーキンソン病では神経細胞におけるミトコンドリア特異的なオートファジーの低下が発症の一因であることが示唆されている。心筋細胞はエネルギー代謝が極めて活発な臓器であり、ミトコンドリア含有量が多い。また心不全病態では異常ミトコンドリアの蓄積が頻りに観察されることから、異常ミトコンドリア除去が心不全期に誘導されるオートファジーの主たる役割であると推察される。

今後は異常ミトコンドリアがオートファジーに認識される分子機構を明らかにすることが、心不全治療に結びつく可能性が高いと考えられる。ミトコンドリア異常は、心疾患のみならず神経変性疾患や筋疾患などに強い関連を有する。オートファジーは全細胞で認められる普遍的な細胞内機構であることから、その応用範囲は広いものと期待される。

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 5 件)

①種池学, 山口修, 他 15 名, Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* 6 巻 600-606 頁 2010 年, 査読有

②溝手勇, 山口修, 他 11 名, Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 48 巻 302-309 頁 2010 年, 査読有

③彦惣俊吾, 山口修, 他 15 名, The I{ κ }B kinase { β }/nuclear factor { κ }B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression. *Circ Res.* 105 巻 70-79 頁 2009 年, 査読有

④大宮茂幹, 彦惣俊吾, 山口修 (5 番目), 他 12 名, Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 46 巻 59-66 頁 2009 年, 査読有

⑤渡部徹也, 武田理宏, 大宮茂幹, 彦惣俊吾, 山口修, 他 14 名, Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 52 巻 779-786 頁 2008 年, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 山口修, The Degradation System in Cardiomyopathy. 第 75 回日本循環器学会学術集会, 2011 年 3 月 18 日, 横浜

② 山口修, Mitochondrial Permeability Transition and Non-apoptotic Cell Death. Basic Cardiovascular Sciences 2010 Scientific Sessions, 2010 年 7 月 20 日, Rancho Mirage (米国)

③ 山口修, Essential Role of Autophagy to Maintain Cardiac Function in Response to Hemodynamic Stress and in Senescence. 第 26 回国際心臓研究会日本部会, 2009 年 12 月 5 日, 札幌

④ 山口修, Non-apoptotic Cardiomyocyte Death as a Cause of Cardiac Remodeling. 第 73 回日本循環器学会学術集会, 2009 年 3 月 22 日, 大阪

⑤ 山口修, Cell death and cardiac remodeling, 第 25 回国際心臓研究会日本部会, 2008 年 12 月 5 日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 修 (YAMAGUCHI OSAMU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90467580

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：