

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390236

研究課題名（和文）心筋リモデリングにおけるミトコンドリア転写因子制御の分子機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanisms and treatment for mitochondrial regulation in cardiac remodeling

研究代表者

筒井 裕之 (Tsutsui Hiroyuki)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70264017

研究成果の概要（和文）：活性酸素は、ミトコンドリア DNA・機能障害をもたらし、さらなるミトコンドリア酸化ストレスと細胞障害を引き起こす。酸化ストレスは肥大・アポトーシス・細胞外マトリックスリモデリングを惹起する。心筋リモデリングにおけるミトコンドリア転写因子による機能制御機構を解明するとともに、ミトコンドリア DNA・ミトコンドリア機能の保持による心筋保護基盤をあきらかにした。さらに、これらは心筋リモデリング・心不全の形成・進展に密接に関与した。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial oxidative stress leads to a catastrophic cycle of mitochondrial DNA damage as well as functional decline, higher oxidative stress, and cellular injury. Oxidative stress activates a broad variety of hypertrophy signaling kinases and transcription factors and mediate apoptosis. It also stimulates cardiac fibroblast proliferation and activates the matrix metalloproteinases, leading to the extracellular matrix remodeling. These cellular events are involved in the development and progression of maladaptive myocardial remodeling and failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心筋リモデリング、心不全、ミトコンドリア、DNA、転写因子

1. 研究開始当初の背景

（1）薬物療法・非薬物療法の進歩によって、慢性心不全の予後は格段に改善してきたが、重症例の予後は未だに不良であり、患者は心不全増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心不全の病態形成に関与する心筋リモデリングの基盤的な分子機序

のさらなる解明とそれに基づく新たな治療法の開発は、重要な研究課題である。

（2）近年、ミトコンドリア機能障害とそれに起因する活性酸素の過剰産生（酸化ストレス）が、ガン、糖尿病、神経変性、加齢など種々の疾病に共通する基盤的病態であることがあきらかにされてきた。ミトコンドリアの機能は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) とそ

の複製と維持を担う TFAM (mitochondrial transcription factor) などミトコンドリア転写因子によって、調節されている。すなわちミトコンドリア転写因子は、脂肪酸β酸化などミトコンドリアエネルギー代謝に必要な酵素遺伝子の発現と TFAM 発現調節による mtDNA の複製・維持という2つの経路を介してミトコンドリア機能を極めてダイナミックかつ巧妙に制御している。

2. 研究の目的

(1) 心筋リモデリング・心不全におけるミトコンドリア転写因子 TFAM の発現制御機構を明らかにするとともに、mtDNA・ミトコンドリア機能の保持による心筋保護の基盤的分子機序をあきらかにする。

(2) mtDNA・ミトコンドリア機能の保持に基づく新たな心不全治療法の有効性を検証する。

具体的には以下の点をあきらかにする。ミトコンドリア機能の維持により心筋細胞傷害の抑制が可能か？さらに、心筋リモデリング・心不全の発症・進展が抑制されるか？

(3) 心不全とインスリン抵抗性の両者に共通する病態基盤としてのミトコンドリア機能制御の役割について検討する。

3. 研究の方法

(1) ストレスに対するミトコンドリア転写因子のネットワーク応答

心筋に対して虚血によるストレス負荷を行い、ストレス応答としてのミトコンドリア転写因子および mtDNA (サザンブロット)、ミトコンドリア機能(電子伝達系複合体酵素活性およびミトコンドリア呼吸能)を測定した。ミトコンドリア転写因子とともに、どのようなストレス応答分子の変容が引き起こされるかを解析した。なかでも、細胞内シグナル伝達や転写因子などを含む下流因子に着目し、DNA array を用い網羅的に解析した。

(2) ミトコンドリア転写因子制御による細胞保護

培養心筋細胞に酸化ストレスを加え、TFAM の発現と mtDNA、ミトコンドリア電子伝達機能を検討した。

(3) ミトコンドリア転写因子制御による心筋リモデリング・心不全の抑制効果

冠動脈結紮後4週間飼育する梗塞後心不全モデル動物マウスを用いて、TFAM の発現と心筋リモデリング・心不全とミトコンドリア転写因子、mtDNA 損傷、ミトコンドリア機能障害の関連について解析した。

(4) SIRT1 経路を介するミトコンドリア転写因子活性化の機能的役割の検討

ヒトリコンビナント TFAM を作成し、培養心筋細胞における細胞保護効果を検討した。さらに、ミトコンドリア転写因子を誘導する低

分子化合物である SRT1720 の合成を行った。

4. 研究成果

(1) ストレスに対するミトコンドリア転写因子のネットワーク応答

冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを用いて、末梢血液中の酸化ストレスマーカーである TBARS とともに、in vivo 電子スピン共鳴法を用いて心筋における活性酸素の産生を経時的に測定した。末梢血酸化ストレスマーカーの亢進は梗塞作成後急性期にみとめられ、一過性であった。一方で、心筋における酸化ストレスの亢進と左室リモデリング(左室内腔の拡大と収縮能の低下)の進行はよく合致した。

さらに、ストレスに対するネットワーク応答をあきらかにするために、ミトコンドリア酸化ストレスおよび酸化ストレス関連遺伝子の発現を網羅的に解析したところ、心筋 DNA microarray で、核 DNA でコードされた Mthfd2 や Adh1 などの抗酸化酵素が増加したが、ミトコンドリア呼吸酵素は不変であった。

(2) ミトコンドリア転写因子制御による mtDNA の制御機構

ミトコンドリア転写因子 TFAM 遺伝子過剰発現マウスおよびミトコンドリアヘリカーゼである Twinkle 遺伝子過剰発現マウスにおいて、TFAM は mtDNA 合成には影響せず、タンパクと結合しヌクレオイドを形成して mtDNA を安定化させた。一方、Twinkle は mtDNA の複製を亢進させ TFAM 同様ヌクレオイドを形成した。

(3) ミトコンドリア転写因子制御による心筋細胞保護効果

in vitro 培養心筋細胞実験系において、TFAM は mtDNA の酸化損傷を抑制し、ミトコンドリア機能を保持することによって心筋細胞保護作用を発揮した。

(4) ミトコンドリア転写因子制御による心筋リモデリング・心不全の抑制効果

in vivo 冠動脈結紮による梗塞後心不全モデルにおいて、TFAM 過剰発現は、心筋ミトコンドリア DNA 傷害を軽減し、梗塞後リモデリングおよび心不全の発症・進展を抑制した。さらに、遅発性神経細胞死モデルにおいて、TFAM 過剰発現は心筋細胞ばかりでなく神経細胞に対しても同様の保護作用を発揮した。

(5) SIRT1 経路を介するミトコンドリア転写因子活性化の機能的役割の検討

ヒトリコンビナント TFAM は、培養心筋細胞内に極めて容易に移行し細胞保護効果を発揮した。さらに、ミトコンドリア転写因子を誘導する低分子化合物である SRT1720 を合成した。また、マウスの食餌量を50%制限するカロリー制限によっても心筋ミトコンドリア転写因子の活性化がみとめられた。

(6) 心不全の基盤病態としてのミトコンド

リア機能制御

心筋梗塞後心不全モデルマウスでは、心筋ばかりでなく骨格筋における酸化ストレスが亢進しており、インスリンシグナル経路のうち Akt のリン酸化および GLUT-4 の膜への translocation が傷害されており、インスリン抵抗性が惹起された。一方、高脂肪食による糖尿病モデルマウスでも骨格筋において NAD(P)H oxidase 由来スーパーオキシドの産生が亢進し、ミトコンドリア電子伝達系複合体の酵素活性の低下、ミトコンドリア呼吸能の障害とともに運動能力の低下をみとめた。さらに、磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) を用いた骨格筋代謝の解析により心不全患者の骨格筋において、ミトコンドリア機能障害がみとめられ運動機能の低下と関連した。

(7) 以上より、心筋リモデリング・心不全におけるミトコンドリア転写因子の発現制御機構を解明するとともに、ミトコンドリア DNA・ミトコンドリア機能の保持による心筋保護の基盤をあきらかにした。さらに、ミトコンドリア機能制御が心不全の病態に極めて密接に関与していることもあきらかにした。

本研究によって得られた研究成果は、国内外学会・論文等で多数公表しており、心筋リモデリングの基盤病態をあきらかにしたものとして、高い評価を受けている。

本研究の成果は、今後、ミトコンドリア DNA・ミトコンドリア機能の保持に基づいた心筋リモデリング・心不全の新たな予防・治療法の有効性・安全性を検証する研究へと、さらに発展・展開していくことが期待される。

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 22 件)

1. Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(5):H1202-10, 2012 査読有
2. Inoue N, Kinugawa S, Suga T, Yokota T, Hirabayashi K, Kuroda S, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302:H1202-10, 2012 査読有
3. Takada S, Okita K, Suga T, Omokawa M, Morita N, Horiuichi M, Kadoguchi T, Takahashi M, Hirabayashi K, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H: Blood Flow Restriction Exercise in Sprinters and Endurance Runners. *Med Sci Sports Exerc* 44(3):413-19, 2012 査読有
4. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K: Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* 7(2):e30568, 2012 査読有
5. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, Yokota T: Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 48(1): 68-71, 2011 査読有
6. Yamato M, Shiba T, Ide T, Seri N, Kudo W, Ando M, Yamada K, Kinugawa S, Tsutsui H: High-fat diet-induced obesity and insulin resistance were ameliorated via enhanced fecal bile acid excretion in tumor necrosis factor-alpha receptor knockout mice. *Mol Cell Biochem* 359(1-2):161-7, 2011 査読有
7. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(6):H2181-90, 2011 査読有
8. Yokota T, Kinugawa S, Okita K, Hirabayashi K, Suga T, Hattori M, Nakagawa Y, Oyama-Manabe N, Shirato H, Tsutsui H: Lower aerobic capacity was associated with abnormal intramuscular energetics in patients with metabolic syndrome. *Hypertens Res* 34(9):1029-34, 2011 査読有
9. Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5):1066-74, 2011 査読有
10. Ohta Y, Kinugawa S, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N, Yokota T, Hirabayashi K, Tsutsui H: Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(5):H1637-44, 2011 査読有
11. Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial

- infarction. *Circ Res* 108(11):1328-39, 2011 査読有
12. Horiuchi M, Okita K, Takada S, Omokawa M, Suga T, Morita N, Hirabayashi K, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H: Effects of oral single-dose administration of sarpogrelate hydrochloride on saturation of calf muscle during plantar flexion exercise. *Adv Exp Med Biol* 662: 531-36, 2010 査読有
 13. Ylikallio E, Tyynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A: High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet* 19(13):2695-2705, 2010 査読有
 14. Hokari M, Kuroda S, Kinugawa S, Ide T, Tsutsui H, Iwasaki Y: Overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) ameliorates delayed neuronal death due to transient forebrain ischemia in mice. *Neuropathology* 30(4):401-7, 2010 査読有
 15. Suga T, Okita K, Morita N, Yokota T, Hirabayashi K, Horiuchi M, Takada S, Omokawa M, Kinugawa S, Tsutsui H: Dose effect on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* 108(6):1563-67, 2010 査読有
 16. Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K: Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(3):H1072-78, 2010 査読有
 17. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoe K, Tsutsui H: Natural killer T Cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-Induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2):193-99, 2010 査読有
 18. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res* 81(3):449-56, 2009 査読有
 19. Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Sobirin A, Ono T, Suga T, Kuroda S, Tanaka S, Terasaki F, Okita K, Tsutsui H: Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(3):1069-1077, 2009 査読有
 20. Matsushima S, Kinugawa S, Yokota T, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Tsutsui H: Increased myocardial NAD (P) H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of post-infarct heart failure in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:409-416, 2009 査読有
 21. Suga T, Okita K, Morita N, Yokota T, Hirabayashi K, Horiuchi M, Takada S, Takahashi T, Omokawa M, Kinugawa S, Tsutsui H: Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* 106:1119-24, 2009 査読有
 22. Inoue T, Ide T, Yamato M, Yoshida M, Tsutsumi T, Andou M, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Time-dependent changes of myocardial and systemic oxidative stress are dissociated after myocardial infarction. *Free Radic Res* 43(1):37-46, 2009 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. 筒井裕之: 骨格筋からみた心不全の病態解明と治療への応用 第15回日本心不全学会学術集会, 2011年10月15日, 鹿児島県民交流センター
 2. 筒井裕之: エビデンスに基づく慢性心不全治療 第25回日本臨床内科医学, 2011年9月19日, 札幌コンベンションセンター
 3. 筒井裕之: 治療抵抗性心不全に挑む～エビデンスにもとづくストラテジー～ 第220回日本循環器学会関東甲信越地方会, 2011年6月4日, 東京慈恵会医科大学
 4. Tsutsui H: Mitochondrial Oxidative Stress in Cardiac Remodeling and Failure. International Symposium on Free Radical Research: Contributions to Medicine, 2011年1月21日, Hyatt Regency Kyoto
 5. Tsutsui H: Mitochondrial oxidative stress in cardiac remodeling and failure. The Cardiovascular System Dynamics Society (CSDS), 2010年9月24日, グランドハイアット福岡
 6. Tsutsui H: The medical treatment of myocardial dysfunction. European Society of Cardiology 2010, 2010年8月29日 Stockholm International Fairs
 7. 筒井裕之: 心不全における心腎連関 日本腎臓学会, 2010年6月18日, 神戸国際会議場
 8. Tsutsui H: Diagnosis and management of stress-induced cardiomyopathy. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010年3月5日, 京都国際会議場

9. Tsutsui H: Insulin Resistance in Heart Failure: A New Therapeutic Target. American Heart Association Scientific Sessions 2009, 2009年11月17日 Orange County Convention Center
10. 筒井裕之: 心不全の発症・進展抑制を目指した高血圧治療 第57回日本心臓病学会学術集会, 2009年9月19日, ロイトン札幌

[図書] (計6件)

1. 松島将士, 筒井裕之: 心不全, 糖尿病と酸化ストレス, P103-112, メディカルレビュー社, 東京, 2011年
2. 絹川真太郎, 筒井裕之: 酸化ストレス, 高血圧ナビゲーター, P138-139, メディカルレビュー社, 東京, 2011年
3. 横田卓, 筒井裕之: ミトコンドリア(エネルギーの産生), 診療に活かす心機能評価, p26-29, 羊土社, 東京, 2010年
4. 絹川真太郎, 筒井裕之: 心不全とストレス応答, 循環器ストレス学, p265-272, 南山堂, 東京, 2010年
5. 絹川真太郎, 筒井裕之: 糖尿病と心不全, Cardio Diabetic Frontier〜心血管病と糖尿病を統一的に理解する新たな視点を求めて〜, p62-68, メディカルレビュー社, 東京, 2010年
6. 筒井裕之(編): 別冊・医学のあゆみ 酸化ストレスと心血管疾患—分子機構の解明から治療への応用まで, p91-95, p119-122, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2007年

[その他]

ホームページ等

<http://cvhp.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井 裕之(Tsutsui Hiroyuki)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70264017

(2)研究分担者

絹川 真太郎(Kinugawa Sintaro)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 60399871

石森 直樹(Ishimori Naoki)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 70399848

松井 裕(Matsui Yutaka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任准教

授

研究者番号: 30431381

(3)連携研究者

()

研究者番号: