

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 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390240

研究課題名（和文） 心不全発症における細胞内分解機構の検討とその治療への応用

研究課題名（英文） Role of intracellular degradation systems in genesis of heart failure

研究代表者

大津 欣也（OTSU KINYA）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20294051

研究成果の概要（和文）：本研究では分解系特にタンパク質分解系としてのカルパイン、オートファジー、DNA分解系としてリソソーム DNA 分解酵素の心不全発症における役割を検討した。カルパインは細胞保護の因子であることが明らかとなった。またオートファジーは老化における心機能維持に重要な働きをしていることを見出した。さらに DNA 分解酵素はミトコンドリア DNA を分解することにより心臓における炎症反応を制御していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the role of degradation systems in the genesis of heart failure. Our results indicate that calpain plays a cardioprotective role and autophagy is important to maintain cardiac function during aging. Furthermore, DNase II regulates inflammatory responses in the heart by degrading mitochondrial DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：細胞内分解系、心不全、細胞死

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は 5 年生存率約 50%と予後の悪い疾患であり、また有病率は 65 歳以上では 10%と多い上に近年増加傾向にある。未曾有の高齢化社会に突入する中で心不全に対する有効な治療法の開発は国民健康を考える上で急務である。心不全の治療法を開発するにあたって、心筋リモデリングの過程に関与する分子機構を同定することが極めて重要である。これまでに我々はアポトーシス、ネクローシスなどの心筋細胞死の増加がリモデリングの進行に重要な役割を果たしてい

ることを報告してきた。これらの細胞死の制御に関しては従来、遺伝子発現制御すなわち転写、翻訳という mRNA やタンパク質などの合成による調節が中心と考えられてきた。しかし細胞内にはこれらの合成系とともに様々な細胞内分解機構が存在しており、分解による調節も細胞死の制御に重要であると考えられる。

カルパインはCa依存的に基質を限定分解するプロテアーゼである。カルパインには数多くのアイソフォームが存在することが知られているがそのなかでも μ -及び m-カルパイ

ンは組織普遍的に存在し、生命にとって必要な機能を担っている。それらカルパインはアイソフォーム特異的でプロテアーゼ活性を持つラージサブユニット(calpain 1あるいは2)と共通の安定化に関与するスモールサブユニット(calpain 4)からなるヘテロダイマーである。カルパインは心臓において虚血再灌流時や心不全時などカルシウムオーバーロード時に心筋細胞の細胞骨格分子を分解することにより細胞死を惹起し細胞障害に働く責任分子として知られていた。しかしカルパイン阻害薬を用いた薬理学的研究が主であり、その病態生理学的意義は不明であった。

心不全は加齢に伴って発症率が増加する疾患であり、日本では高齢化社会の進行により、慢性心不全の発症が年々増加の一途を辿っている。加齢臓器では変性タンパク質や傷害を受けたミトコンドリア等の細胞内小器官が蓄積しており、これらが加齢による臓器機能の低下に関与している。またタンパク質や細胞内小器官の細胞内蓄積には、分解が低下することが関与していると考えられている。細胞内分解系の一つがオートファジーであり、飢餓時のエネルギー供給のみならず、タンパク質や細胞内小器官の品質維持に寄与している。オートファジーは加齢によって活性が低下することが報告されているとともに、線虫やショウジョウバエでは寿命との関連性が報告されている。

心不全と炎症との関連性は示唆されているが、不全心において病原微生物が検出される例は少なく、炎症惹起分子機構は不明である。ミトコンドリアは細菌由来である故、そのDNAはToll-like receptor 9(TLR9)依存性に炎症を惹起する非メチル化CpG配列を多く含む。また心臓においてミトコンドリアは血行力学的ストレスにより変性し、オートファジーを介してリソソーム酵素により分解される。Deoxyribonuclease 2(DNase II)はリソソーム酸性DNA分解酵素である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心不全発症機序における細胞内分解経路の役割を明らかにし、新たな心不全治療標的分子を同定することである。まずタンパク質分解経路としては、オートファジー、カルパイン系、ユビキチン・プロテアソーム系がある。本研究の第一の目的は、これらの細胞内蛋白質分解経路とくにオートファジーやカルパインが心筋細胞死を介して心不全発症に関与しているかどうかを明らかにすることである。特にオートファジーに関しては老化における役割を検討する。第2の目的は心筋リモデリング特に炎症過程におけるDNA分解経路の役割について、心筋特異的

DNase II 欠損マウスを用いて検討をおこなう。

3. 研究の方法

(1) カルパインの心不全における役割

① 特異的カルパイン欠損マウスの作成

まず常法によりカルパイン4遺伝子のイントロン6と9にloxP配列を挿入したfloxedカルパイン4マウスを作製した。floxedカルパイン4マウスとalpha myosin heavy chain promoterの下流にCre recombinaseを組み込んだトランスゲニックマウスを交配し、心筋特異的カルパイン欠損マウスを得た。

② 心臓表現型の解析

心機能は心臓エコー法にて評価した。組織学的にはHE染色、Masson trichrome染色、電子顕微鏡的検討を行った。アポトーシスはTUNEL法により評価した。たんぱく質発現はウエスタンブロット法により行った。

③ 血行力学的負荷の作成

常法によりマウス横行大動脈縮窄し左室圧負荷モデル(transverse aortic constriction, TAC)を作製した。またマウスにイソプロテレノールを浸透圧ポンプ(50mg/kg)にて投与した。

④ 膜安定性の評価

マウスにエババンスブルー色素をTAC3時間前に経静脈的に投与し24時間後に心臓より凍結切片を作製し色素の取り込みを評価した。

(2) オートファジーの心老化における役割

① オートファジーの評価

オートファジー活性の分子マーカーであるLC-3の発現をWestern blottingにて評価した

② Atg5 心筋特異的欠損マウスの作成

オートファジーの進行に必須の遺伝子であるAtg5の心筋特異的欠損マウスをfloxed Atg5マウスと α -ミオシン重鎖プロモーター依存性に心筋細胞特異的にCre recombinaseを発現するトランスゲニックマウスを交配することにより心筋細胞特異的Atg5欠損マウスを作製した。

③ 心筋リモデリングマーカーの生化学的解析

mRNA (ANP, BNP, skeletal b-actin) をRT-PCR法により測定した。

(3) DNA分解の役割

① 心筋細胞特異的DNase II 欠損マウスの作製

DNA蓄積と心不全、炎症の関連性を検討するため、floxed *Dnase2a*マウスと α -ミオシン重鎖プロモーター依存性に心筋細胞特異的にCre recombinaseを発現するトランスゲニックマウスを交配することにより心筋細胞

特異的 DNase II 欠損マウスを作製した。

②マウスに横行大動脈縮窄による圧負荷手術を施行した。

③心臓表現型の解析

カルパインの項と同様に行った。

③心組織において DNA 染色剤の PicoGreen と リソソームマーカーである LAMP2a あるいはオートファゴソームマーカーである LC3 に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法を施行した。

④蓄積 DNA の起源を検討するため、チミジンアナログである 5-ethynyl-2-deoxyuridine (Edu) を術前に腹腔内投与することよりミトコンドリア DNA を特異的に標識した。

⑤オートファジーの関与を検討する為、成獣単離心筋細胞においてミトコンドリア脱共役剤 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone を用いてオートファジーを誘導し RT-PCR 法により IL-6 mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1)カルパインの心不全における役割

心筋特異的カルパイン 4 欠損マウスは正常に生まれ、外見上異常を認めなかった。心臓組織においてカルパイン 1、2 に対するウェスタンブロットを行ったところカルパイン 4 だけではなくカルパイン 1、2 タンパク質も発現が著明に低下していた。従ってカルパインは心臓の発生、生後の成長には関与していないことが明らかとなった。

カルパイン 4 欠損マウス心では心エコーで評価した心機能、また体重、血圧、脈拍、心重量、肺重量などの生理学的指標は対照群に比し有意差はなかった。そこで TAC による圧負荷に対する効果を検討した。対照群では TAC 後一週間で心肥大を示すのみで心機能低下を来さなかったがカルパイン 4 欠損マウスでは左室拡張末期径、収縮末期径の増加、左室短縮率の低下を認めた。また心重量、肺重量の増加を示し、カルパイン 4 欠損マウスは圧負荷後に心不全を来していた。組織学的検討では著明な線維化を認めた。心筋細胞の横断面積は両群間に差はなく、カルパインは心肥大には関与していないことが示された。

さらに他の刺激に対するカルパインの効果を検討するためイソプロテレノール負荷を行った。イソプロテレノール負荷に対しても圧負荷と同様に心臓表現型を示した。

対照群ではエバンスブルー色素の心筋細胞への取り込みは生じなかったがカルパイン 4 欠損マウス心では有意な取り込みが認められ、細胞膜障害を示唆した。

本知見は今までの報告とは異なるものであ

る。今までの検討は非特異的阻害薬や非生理的な発現量を示すトランスゲニックマウスを使用して得た知見であることも一因であろうと考えられる。現在カルパインをターゲットにした薬物の開発が進められているが本研究の知見より適応に慎重な姿勢が求められる。

(2) オートファジーの心老化における役割

野生型マウスの心臓において LC-3 の発現を評価したところ、加齢に伴いオートファジー活性が低下していた。次に、オートファジーの進行に必須分子である Atg5 の心筋特異的欠損マウスを長期的に観察したところ、正常に出生し、10 週齢までは明らかな異常を認めなかった。しかし、Atg5 欠損マウスは 6 ヶ月齢頃から死亡する個体がみられ、平均生存期間は 46 週であり、対照群と比し有意に短縮していた。10 ヶ月齢において組織重量を評価したところ、心重量、肺重量、心重量/脛骨長比、肺重量/脛骨長比が Atg5 欠損マウスで有意に増加していた。また、10 ヶ月齢における心臓超音波法による検討では KO は対照群と比較して有意に心拡大および心収縮力低下をきたしていた。さらに 10 ヶ月齢の心臓で、組織学的評価において心筋細胞断面積と線維化の増加、および生化学的評価 ANP, BNP, skeletal b-actin mRNA の有意な上昇を認めた。これらの結果より、10 ヶ月齢の Atg5 欠損マウスでは心機能低下および心不全を発症していることが示された。また、電子顕微鏡による観察を行ったが、KO の心臓ではミトコンドリアの配列、大小不同やクリスタの崩壊などの形態異常が認められた。KO の 10 ヶ月齢で観察される心臓リモデリングの原因を明らかにするため、心機能や構造が正常に保たれている 3 ヶ月齢の心臓についても電子顕微鏡による観察を行ったところ、すでに 10 ヶ月齢と同様のミトコンドリア異常を認めた。この形態異常が機能に影響を及ぼしているのかどうかを調べるため、ミトコンドリア呼吸鎖機能を評価したところ、3 ヶ月齢の KO の心臓で有意に低下していた。ミトコンドリアは細胞内における主たる活性酸素種の産生源であることから、酸化ストレスマーカーである heme oxygenase-1 の mRNA やミトコンドリア分画における

4-hydroxy-2-nonenal を 3 ヶ月齢の心臓において評価したところ、Atg5 欠損マウスにて増加していた。また、心不全の原因の一つとして心筋細胞死があげられるため、心筋細胞アポトーシスを評価したところ、Atg5 欠損マウス心にて増加を認めた。この結果から、心臓におけるオートファジー欠損により、ミトコンドリアの形態異常やミトコンドリア呼吸鎖機能の低下、酸化ストレスの増加、心筋細胞死の増加が引き起こされ、心機能低下や心不全を呈した可能性が示唆された。

(3) DNA 分解の役割

野生型マウスに TAC による圧負荷手術を施行し、術後 1 週の心肥大期及び 10 週の心不全期においてその心表現型を解析した。免疫組織染色法では、不全心にのみに CD45、CD68 陽性炎症細胞浸潤を認めた。不全心にのみ PicoGreen と LAMP2a 並びに PicoGreen と LC3 の共局在を認めた。これは心不全期におけるオートリソソーム内 DNA 蓄積を示唆する。肥大期では DNase II 活性は対照群に比し上昇していたが不全期では差を認めなかった。

定常状態において対照群 (*Dnase2a^{flox/flox}; Cre (-)*) と比し有意な心表現型の差を認めなかった。しかし、圧負荷 DNase II 欠損マウスは有意に高い死亡率を呈し、術後 10 日目では心臓超音波法上、拡張末期ならびに収縮末期左室内腔径の増加、左室内径短縮率の低下、心重量・肺重量の増加を認め、心不全を呈していた。また心組織内細胞浸潤と線維化も認めた。

圧負荷 DNase II 欠損マウスにおける心不全発症の分子機構解明の為、術後 2 日目において解析したところ、CD45、CD68、Ly6G 陽性炎症細胞浸潤、IL-6、IL-1b mRNA 発現の有意な増加を認めた。電子顕微鏡上、オートリソソーム内に存在するミトコンドリア様構造物を認め、さらに免疫電子顕微鏡法では同構造物内に抗 DNA 抗体陽性シグナルが観察された。圧負荷 DNase II 欠損マウスにおいて EdU と LAMP2a、EdU と LC3 の共局在を認め、蓄積 DNA がミトコンドリア由来であることが示唆された。

オートファジーの関与を検討する為、成獣単離心筋細胞においてミトコンドリア脱共役剤 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone を用いてオートファジーを誘導し IL-6 mRNA 発現量を測定した。DNase II 欠損心筋細胞においてのみ IL-6 mRNA 発現は増強し、オートファジー阻害剤 3-methyladenine 負荷によりその発現は抑制され、刺激剤 rapamycin により増強した。従って DNase II 欠損心筋細胞において炎症細胞の関与無しにオートファジー依存性に炎症が惹起されることが明らかとなった。

さらに TLR9 の関与を検討するため、DNase II 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配した。TAC 術後 10 日目において DNase II 欠損マウスに比して、ダブルノックアウトマウスでは心機能の改善、炎症細胞浸潤の抑制が観察され、炎症反応発症に TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。

野生型マウスの圧負荷術後心不全におけ

る TLR9 経路の関与を検討する為、TAC 後 10 日の TLR9 欠損マウスを解析したところ、対照群に比して心機能が維持され、一般的圧負荷後心不全においても TLR9 経路が関与していることが示された。

以上よりオートファジー性分解を免れたミトコンドリア DNA の蓄積および TLR9 経路が不全心における炎症反応に関与していることが明らかとなった。

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岡崇史、彦惣俊吾、山口修、種池学、武田理宏、玉井敬人、大藪丈太、村川智一、中山博之、西田和彦、審良静男、山本章次、小室一成、大津欣也: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. (2012) Nature、査読有、in press

②種池学、溝手勇、森田孝、渡部徹也、彦惣俊吾、山口修、武田理宏、岡崇史、玉井敬人、大藪丈太、村川智一、中山博之、西田和彦、竹田潤二、望月直樹、小室一成、大津欣也: Calpain protects the heart from hemodynamic stress (2011) The Journal of Biological Chemistry. 査読有 286:32170-7.

③種池学、山口修、中井敦子、彦惣俊吾、武田理宏、溝手勇、岡崇史、玉井敬人、大藪丈太、村川智一、西田和彦、清水孝彦、堀正二、小室一成、白澤卓司、水島昇、大津欣也: Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy (2010) Autophagy 査読有 6, 1-7.

[学会発表] (計 26 件)

①大津欣也、Molecular link between cell death and sterile inflammation, ヨーロッパ心不全学会冬季研究学会、2012 年 1 月 19 日、スイス

②大津欣也、Inflammation and autophagy, 基礎心臓病学カンファレンス、ラスベガス、2011 年 7 月 19 日、アメリカ合衆国

③岡崇史、Lysosomal DNaseII Digests Mitochondrial DNA Through Lysosome/Autophagy System to Maintain Cardiac Function in Pressured-Overloaded Hearts、米国心臓学会、2010 年 11 月 10 日、

シカゴ、アメリカ合衆国

④山口修、血行動態負荷並びに老化における心筋細胞オートファジーの役割、第14回日本心不全学会、2010年10月10日、東京

⑤種池学、Constitutive Autophagy is Necessary for Maintenance of Cardiac Structure and Function in Aged mouse Hearts、第10回国際心臓研究学会世界大会、2010年5月10日、京都

⑥彦惣俊吾、The in vivo Role of IKK β /NF- κ B Signaling Pathway in the Heart、第26回国際心臓研究学会日本部会、2009年12月1日、札幌

⑦大津欣也、MAPK Signaling and Regulation of Cardiac Hypertrophy、基礎心臓病学カンファレンス、ラスベガス、2009年7月20日、アメリカ合衆国

⑧大津欣也、Autophagy and apoptosis in heart disease、ヨーロッパ心不全学会、2009年5月20日、ニース、フランス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 欣也 (OTSU KINYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20294051

(2) 研究分担者

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

彦惣 俊吾 (HIKOSO SHUNGO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30423164

