

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08082

研究課題名（和文）心不全におけるミトコンドリア-小胞体接触の役割の解明と新規治療の開発

研究課題名（英文）a

研究代表者

松島 将士 (Matsushima, Shoji)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80552869

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）：心筋特異的Mitolノックアウトマウスに圧負荷により心筋リモデリングモデルを作成し心肥大が抑制されることを見出した。この抗肥大効果には心肥大シグナル因子の抑制および酸化ストレスのマーカーの減少を伴っていた。また、心筋細胞にsiRNAによってMitolをノックダウンすると肥大刺激により誘発される心筋細胞肥大が抑制された。GRP75阻害薬投与でも同様の抗心肥大効果およびその機序を認めた。MitolおよびGRP75の機能阻害によりミトコンドリア-小胞体接触が減少し、抗肥大効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はオルガネラの連関という観点から新たな心筋リモデリング・不全の進展機序を明らかにし、心不全病態の理解に寄与する。さらに、ミトコンドリアと小胞体に対する個別の介入ではなくそれらの関係性への介入が心不全の新たな治療ターゲットとなりうることを示しており、今までにない心不全治療創出の基盤となる。高齢化により心不全パンデミックとして今後増加が予想されている心不全患者に対する医療への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Cardiac hypertrophy was suppressed in a pressure-load-induced remodeling model in myocardial-specific Mitol knockout mice. This antihypertrophic effect was accompanied by suppression of cardiac hypertrophic signaling factors and reduction of markers of oxidative stress. In addition, siRNA knockdown of Mitol in cardiomyocytes suppressed hypertrophy induced by hypertrophic stimuli. Similar anti-cardiac hypertrophic effects and mechanisms were observed with GRP75 inhibitor treatment. Inhibition of Mitol and GRP75 function reduced mitochondria-endoplasmic reticulum contact, resulting in an antihypertrophic effect.

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 小胞体

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高血圧、虚血性心疾患、心筋症などのあらゆる心疾患の終末像である心不全の生命予後は極めて不良であり、重症例の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わが国における心不全患者数は増加の一途をたどっており、2030年には130万人に達すると予想されている。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・進展にはミトコンドリア機能障害や小胞体ストレスが密接に関与している。

ミトコンドリア、小胞体(ER)などのオルガネラは独自の機能を発揮すると共に、オルガネラ間で情報・物質を交換し連携することで細胞機能を維持している。特に、Mitochondria-associated ER membrane(MAM)はミトコンドリアと小胞体の接触の場としてMITOLやGRP75によりその形成が制御されており、ミトコンドリア・小胞体間のカルシウム、ATP、蛋白質、脂質の輸送を効率的に行い、ミトコンドリア機能、アポトーシス、オートファジー、シグナル伝達において極めて重要な役割を果たし、その機能の破綻はアルツハイマー病、癌、免疫不全など様々な病態に密接に関与する。不全心では同じ時相でミトコンドリア、小胞体の機能障害をきたすことから、心臓の恒常性維持にオルガネラの連関が重要であり、その機序を解明することで心不全の病態に関する新たな知見が得られる可能性がある。特に、ミトコンドリア-小胞体間の情報伝達の中核を担うMAMの破綻は、ミトコンドリア機能異常によるATP産生障害、酸化ストレス、Ca代謝異常や小胞体ストレスを介して圧負荷や心筋梗塞後などの心血管ストレスに起因する心筋障害・心不全の発症・進展を引き起こす可能性がある。しかし、心筋細胞および心不全の発症・進展におけるMAMの病態生理学的意義は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、『ミトコンドリアと小胞体をつなぐMAMの形成・機能不全がミトコンドリア障害をもたらす心筋障害・心不全の発症・進展に関与する』(図)という仮説を検証するとともに、『MAMの精細な構造とMAM制御の分子基盤を解明』し、『MAM形成制御によるミトコンドリア機能の保持というパラダイムに基づく新たな心不全の治療の開発』を目指すものである。

### 3. 研究の方法

#### 1. 心筋細胞におけるMAMの形態・機能解析

心筋細胞におけるMAM形成とミトコンドリア機能との関連を解明する。

1) *in vitro* MITOL ノックダウン培養心筋細胞における検討：我々は正常心筋細胞における「ミトコンドリア周囲長あたりのMAMの割合」を電子顕微鏡で解析し平均約20%であることを確認している(MAM：ミトコンドリアと小胞体の距離が30nm以下の部位)。三次元走査電子顕微鏡(3D-SEM)でMAMの構造実態を解明し、「ミトコンドリア表面積あたりのMAMの割合」としてMAM定量化のゴールドスタンダードを確立する。さらに、short-hairpin アデノウイルスで濃度依存性に心筋細胞のMITOLをノックダウンし、MAM形成量と以下、によるミトコンドリア機能・形態との相関を明らかにする。特に、MAM形成とATP産生、酸化ストレス、Ca代謝などのミトコンドリア機能との関連を解析し、MAMによるミトコンドリア機能の多面的制御機構を明らかにする。また、3D-SEMと既存のMAM評価法である2D-SEMおよびMitochondria(Mito-GFP)とER(ER-DsRed)の二重免疫法との相関を評価し、MAM形成指標としての有用性を検証する。

ミトコンドリア機能評価：・ミトコンドリア呼吸能(O<sub>2</sub> flux analyzer) ATP産生(生化学アッセイ)・酸化ストレス(Mitosox, Amplex Red)・Ca代謝(XRhod1-AM) 生合成マーカー(PGC-1)・代謝物質の変化(ミトコンドリア分画におけるメタボローム解析) ミトコンドリア形態評価：・電子顕微鏡による形態評価(サイズ、分裂・融合、マイトファジー) MITOLのoff-target効果による影響を考慮して、GRP75 ノックダウンにおいても同様の解析を行う。

2) *in vivo* 心筋細胞特異的MITOL欠損マウスおよびGRP75阻害薬投与マウスにおける検討：心筋特異的MITOL遺伝子欠損マウスおよびGRP75阻害薬投与マウスにおいて心筋細胞におけるMAM形成とミトコンドリア機能・形態との関連を上記1)と同様の方法で解析する。

#### 2. 心筋障害・心不全におけるMAMの役割の解明

*in vitro* 培養心筋細胞障害モデル、*in vivo* 心不全モデルを用いてMAMの役割を解析する。

1) *in vitro* 培養心筋細胞障害モデルにおける検討：ラット培養心筋細胞にアンジオテンシン(10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup>mol/L, 24h) 過酸化水素(10<sup>-7</sup>-10<sup>-4</sup>mol/L, 48h)の添加により心筋細胞障害モデルを作成し、MAM形成、MITOL、GRP75の発現を評価する。またMITOL、GRP75をノックダウンし、上記1) および下記の項目を評価する。

小胞体機能：・ERストレスシグナル(PERKリン酸化、CHOP:WB法) 細胞機能：・アポトーシス(cleaved caspase3:WB法、TUNEL染色)・オートファジー(LC3-II:WB法、autophagosome:電子顕微鏡)・炎症・インフラマソーム(サイトカイン、caspase-1発現) また、上記1)の二重

免染を用いたリアルタイム細胞イメージングと収束イオンビーム SEM (FIB-SEM) による光-電子相関顕微鏡 (CLEM) により心筋細胞の MAM 形成の動的過程を解明し、活性酸素 (MitoSOX)、Ca 代謝 (XRhod1-AM)、ATP (Ateam) との関連を評価する。

2) in vivo 心筋細胞特異的 MITOL 遺伝子欠損マウスにおける検討: 野生型マウス、心筋特異的 MITOL ノックアウトマウス、心筋特異的 MITOL 過剰発現マウスに左冠動脈結紮による梗塞後心不全モデルを作成し、4 週後に以下の項目および 1.1)、2.1) を評価する。

心臓構築・機能: ・生存率・心エコー (左室径・駆出率・壁肥厚) ・血行動態 (大動脈・左室圧、収縮拡張指標) 臓器重量 (心臓、肺、骨格筋) 心臓学的評価: 心筋細胞肥大 (WGA 染色) 間質線維化 (MT 染色)

3. 心筋細胞における MAM 形成の分子基盤の解明

Agilent Array 発現解析、iTRAQ 解析により MAM 形成機序を MITOL、GRP75 を含め包括的に解明する。

1) Agilent Array 発現解析による MAM 形成シグナルの解明: short-hairpin アデノウイルスにより培養心筋細胞において MITOL、GRP75 をノックダウンし、RNA 発現を Agilent Array 発現解析、蛋白発現および修飾蛋白発現を LC-MS/MS による iTRAQ 解析を用いてより広いダイナミックレンジで網羅的に解析し、データマイニングにより既存の MAM 関連因子を含めて MAM 形成シグナルを遺伝子発現・蛋白レベルで解明する。

2) iTRAQ 解析による MAM 形成シグナルの解明: 上記 1) で同定された遺伝子の中で、心筋細胞の MAM 分画に局在する蛋白を iTRAQ 解析により同定する。また、上記 2) で同定された蛋白と相互作用する蛋白を免疫沈降法と質量分析により同定する。特に MITOL、GRP75 との相互作用を検証する。さらに、パキユロウイルス発現系を用いて同定された両蛋白のリコンビナントを作成し、in vitro binding assay で結合および結合部位を評価する。同定された蛋白を心筋細胞にてノックダウンして機能解析を行う。

4. MAM 機能制御による心筋障害抑制効果の検討

1) MITOL 過剰発現心筋細胞における検討: MITOL 過剰発現心筋細胞における心筋障害抑制効果を上記 2. 1) と同様の方法で評価する。

2) 心筋特異的 MITOL 過剰発現マウスにおける検討: 心筋特異的 MITOL 過剰発現マウスにおける心不全抑制効果を上記 2. 2) と同様の方法で評価する。

5. MAM 機能制御法の心不全治療への応用 (2021-2023 年度、担当: 松島、筒井)

1) 薬剤スクリーニングによる新規 MAM 制御薬物の同定: 九州大学「創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS)」における約 1,200 の化合物ライブラリーを用いて、心筋細胞における MAM 形成を 1. 1) における二重免染法により評価し、MAM 形成促進薬、抑制薬を同定する (図 5)。

2) 新規 MAM 制御薬物の有効性の検証: 上記 1) で同定された薬剤を培養心筋細胞、障害心筋細胞に投与し MAM 形成、ミトコンドリア機能、細胞障害保護作用を評価する。さらに、心不全モデルマウスに投与し、2. 2) と同様の項目を評価する。

4. 研究成果

心筋特異的 Mitol ノックアウトマウスに圧負荷により心筋リモデリングモデルを作成し心肥大が抑制されることを見出した。この抗肥大効果には心肥大シグナル

因子である c-Jun N-terminal kinase (JNK) の抑制および酸化ストレスのマーカーである 4-Hydroxy-2-Nonenal (4HNE) の減少を伴っていた。

また、心筋細胞に siRNA によって Mitol をノックダウンすると肥大刺激により誘発される心筋細胞肥大が抑制された。

これらの知見は前年度までの GRP75 阻害薬の抗心肥大効果およびその機序と一致していた。

全研究期間を通して Mitol および GRP75 の機能阻害によりミトコンドリア-小胞体接触が減少し、抗肥大効果を示すことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Abe Ko, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Furusawa Shun, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Ishimaru Kosei, Watanabe Masatsugu, Matsushima Shouji, Koumura Tomoko, Yamada Ken-ichi, Imai Hirotaka, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabn8017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abn8017	査読の有無 無
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 Masataka, Ide Tomomi, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Sada Masashi, Abe Ko, Sato Midori, Hanada Akiko, Arai Shinobu, Ohtani Kisho, Nonami Atsushi, Mizuno Shinichi, Morimoto Sachio, Motohashi Shinichiro, Akashi Koichi, Taniguchi Masaru, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Immunomodulatory Cell Therapy Using GalCer-Pulsed Dendritic Cells Ameliorates Heart Failure in a Murine Dilated Cardiomyopathy Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation: Heart Failure	6. 最初と最後の頁 e009366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.122.009366	査読の有無 無
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 Ishikita A, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Nishimura R, Tadokoro T, Enzan N, Yamamoto T, Sada M, Tsutsui Y, Miyake R, Ikeda M, Ide T, Kinugawa S, Tsutsui H.	4. 巻 24
2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience.	6. 最初と最後の頁 103517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103517.	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	筒井 裕之  (Tsutsui Hiroyuki)  (70264017)	九州大学・医学研究院・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
---------	---------