

令和 6 年 5 月 19 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：21K11678

研究課題名(和文) 老化に伴い発症するミトコンドリア関連性疾患の機能解析と予防治療

研究課題名(英文) Functional Analysis and Preventive Treatment of Aging Mitochondrial Disease

研究代表者

八木 美佳子 (Yagi, Mikako)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70536135

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)：ミトコンドリア機能低下が原因で発症する拡張型心筋症モデルマウスでは、老化と共に減少することが知られているNAD+量が著しく減少していることが分かった。そこでNAD+前駆体であるNMNをモデルマウスに投与すると心筋症の病状が改善し、寿命延長効果がみられた。その分子機序を解析すると、ミトコンドリア機能障害から生じるリソソーム機能障害の回復であった。我々の研究成果によりリソソーム近傍には解糖系酵素が局在しNAD+をATPへ変換しリソソーム機能を維持することを発見した。老化と共に減少したNAD+をNMNにより補えばリソソーム機能が改善することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア病は遺伝子変異によるものが多くその治療は困難であり、根本的な治療方法がないのが現状である。そこでミトコンドリア機能障害から生じる2次的機能障害を改善できれば、間接的ではあるがミトコンドリア病改善が見込めると考えこの研究を始めた。老化と共に減少することが知られているNAD+はミトコンドリア機能障害においても著しく減少する。さらにNAD+の前駆体であるNMNはサプリメントとしても売られており摂取しやすい状況である。我々の研究成果によりミトコンドリア機能障害からリソソーム機能障害になり、その障害がNMNにより改善できることが分かり、NMNは予防治療としても有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by mitochondrial dysfunction, the amount of NAD+, which is known to decline with age, was found to be significantly reduced. Administration of NMN, a precursor of NAD+, to the model mice improved their cardiomyopathy and extended their lifespan. The molecular mechanism of this improvement was the restoration of lysosomal dysfunction resulting from mitochondrial dysfunction. We found that glycolytic enzymes localize near lysosomes and convert NAD+ to ATP to maintain lysosomal function. We have shown that lysosomal function can be improved by supplementing NAD+ with NMN, which declines with age.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア リソソーム 老化 NAD NMN Hif1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む現在社会において、老化に伴う疾病の病態解明、及び根本的・予防的治療法の確立は健康寿命の延長等、喫緊の重要な課題である。ミトコンドリア機能はATP産生、酸化的リン酸化、アポトーシスなど多機能を有すること、またミトコンドリアは非常に強い酸化障害を受ける環境下にあるため、ミトコンドリア障害が加齢に伴う疾患の病因になることは多くの研究者に知られている。さらに、老化プロセスにおけるミトコンドリア機能低下は脳、心臓、膵臓、肝臓をはじめとする全ての臓器、組織の機能低下の原因の一つでもある。即ち、老化に伴い発症する孤発性のアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患、心筋症、糖尿病、がんなどは加齢に伴うミトコンドリア機能障害が主因と考えられるが、その詳細な分子機構は明らかではなく、有効な治療法・予防法も少ないのが現状である。したがって、老化に伴いミトコンドリア機能はどのように低下していくのか、ミトコンドリア機能低下から生じる生体内の様々な変化とはどのようなものか、そのうち疾病へと繋がる主要因は何か、詳細なメカニズムを解明することで治療戦略となり得ると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はミトコンドリア機能低下が原因となる、老化に伴い重症度の増す疾患の、詳細な分子機序の解明と予防治療の開発である。拡張型心筋症モデルマウスを用いて発症メカニズムを解明する。このモデルマウスはミトコンドリア翻訳機能障害から拡張型心筋症を発症し寿命が短くなること、さらにNAD<sup>+</sup>量の減少、リソソーム形態異常、オートファジー分解抑制による異常形態ミトコンドリアの増加、などの症状が確認できている。したがって、ミトコンドリア機能障害から拡張型心筋症を発症する理由として(1)から(4)のようなメカニズムを考えた。(1)ミトコンドリア機能障害によって心臓組織内NAD<sup>+</sup>量が減少する。(2)NAD<sup>+</sup>合成量減少によりリソソーム機能が低下する。(3)治療戦略としてNAD<sup>+</sup>前駆体NMN投与が有効か、有効ならばどの機能を改善したのか検証する。(4)転写因子HIF1とNAD<sup>+</sup>合成のメカニズムを解明し治療戦略となり得るのか検証する。

### 3. 研究の方法

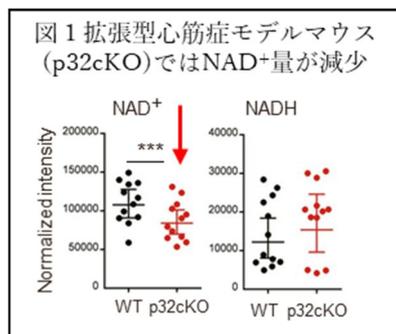
(1)ミトコンドリア機能障害によって心臓組織内NAD<sup>+</sup>量が減少することをメタボローム解析から確認する。NAD<sup>+</sup>合成酵素の発現量をリアルタイムPCRにより解析する。さらにミトコンドリア分画を採取しMS解析を行い、発現低下した酵素群の中からミトコンドリアと直接相互作用するものを探索し、ミトコンドリア機能障害がどのようなメカニズムで細胞内NAD<sup>+</sup>量を減少させるのかを解明する。(2)転写因子HIF1によってNAD<sup>+</sup>合成酵素の発現が制御されているのか、リアルタイムPCRとウエスタンブロットで確認する。

(3)NAD<sup>+</sup>量とリソソーム機能の関連性メカニズムを解明する。電顕より心臓組織のリソソーム形態異常を確認する。リソソームマーカータンパク質の発現や免疫による局在変化、リボフスチンの同定、リソソーム活性測定、を行いモデルマウスでのリソソーム機能低下を証明する。リソソーム分画を抽出し局在する因子を同定する。リソソーム機能低下の原因がNAD<sup>+</sup>合成量低下にあると予測しているため、培養細胞にNAD<sup>+</sup>合成阻害剤を添加するとリソソーム活性が低下するの  
か確認し、NAD<sup>+</sup>とリソソーム機能が直接的に関連することを証明する。(4)NAD<sup>+</sup>前駆体NMN投与によってモデルマウスの寿命延長効果を確認する。

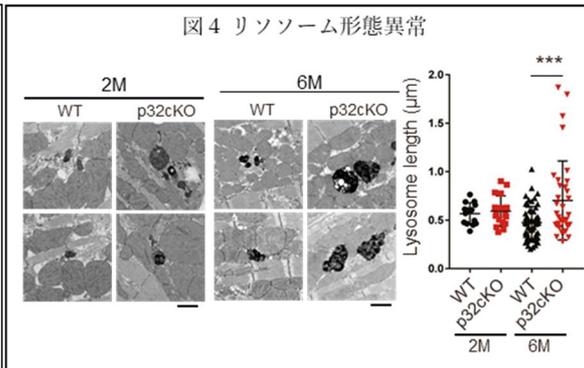
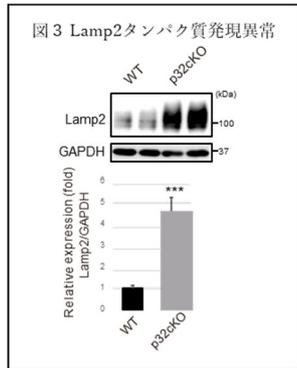
### 4. 研究成果

(1)ミトコンドリア翻訳因子p32の心臓特異的ノックアウトマウスを拡張型心筋症モデルマウスとして用い、その心臓組織においてNAD<sup>+</sup>量が減少することをメタボローム解析より確認した(図1)。さらに心臓組織よりRNAを抽出しNAD<sup>+</sup>合成酵素のサルベージ経路の酵素の発現が低下していることを発見した。つまり、NAD<sup>+</sup>量減少の原因は合成酵素(Nmnat1, Nmnat2, Nmnat3, Sirt3, )の発現減少によるものであった。(2)NAD<sup>+</sup>合成酵素の発現減少の原因は転写因子HIF1の発現減少によるものであった。クロマチン免疫沈降(ChIP)のデータベースからHIF1はこれらのNAD<sup>+</sup>合成酵素遺伝子群のプロモーター領域に結合することを見出した。Namt1やNmnat3などのNAD<sup>+</sup>合成酵素はHIF1によって発現制御されることは知られており、我々のモデルマウス(p32cKO)でも同様の結果が得られた(図2)。

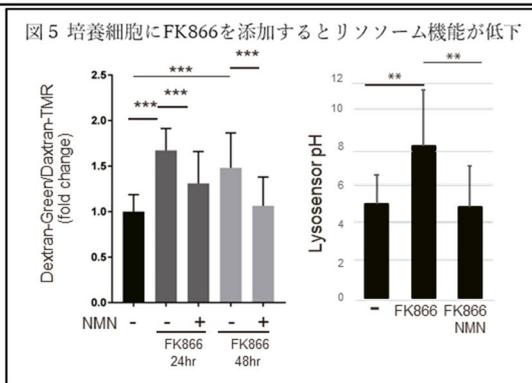
(3)モデルマウス(p32cKO)において、リソソーム機能低下を見出した。リソソームマーカータンパク質Lamp2のタンパク質発現異



常(図3)局在変化、さらに電子顕微鏡解析によるリソソーム形態異常から確認した(図4)。そこでリソソーム機能とNAD<sup>+</sup>量には関連性メカニズムがあると考察し、培養細胞にNAD<sup>+</sup>合成酵素Nmamp1阻害剤



FK866を添加し、リソソーム機能の低下を確認した。リソソーム機能は、Dextran GreenとDextran TMR 試薬を用いて全リソソームと活性リソソームの存在比を蛍光顕微鏡解析より算出し定量した(図5)。リソソーム活性を異なる試薬(Lysosensor)を用いて定量しても、やはりFK866添加によってリソソーム活性は低下した。さらにFK866添加後にNAD<sup>+</sup>前駆体NMNを添加してNAD<sup>+</sup>合成量を増加させるとリソソーム活性が回復した(図5)。したがってNAD<sup>+</sup>合成とリソソーム機能には関連性があることが示唆された。



では、リソソーム機能とNAD<sup>+</sup>合成はどのようなメカニズムで関係しているのか。我々は解糖系酵素であるGAPDHとPGKに着目した。このGAPDHとPGKはNAD<sup>+</sup>からATPを産生する(図6)。ATPはリソソーム活性に不可欠であり、細胞内に多く存在するNAD<sup>+</sup>を効率よくすぐにATPに変換するには、リソソーム近傍にGAPDHとPGKが局在する必要があると考えた。そこでリソソーム分画を採取し、GAPDHとPGKが共局在しているのか、ウエスタンブロットで確認した。リソソーム分画は図7の方法で超遠心を使用して採取した。パーコールグラジエントを作製し、超遠心後にフラクションを5つ回収した(図7)。そのうちフラクション2をリソソーム分画、フラクション5をミトコンドリア分画とした。

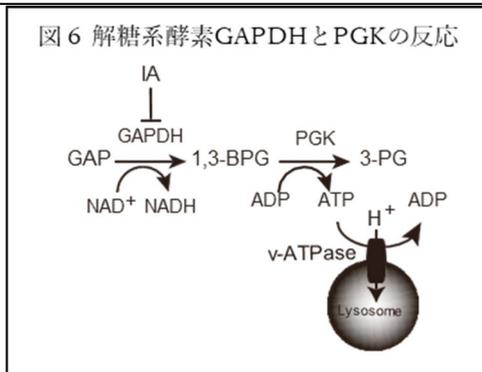
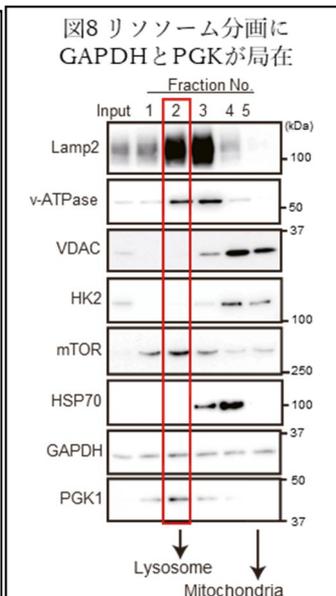
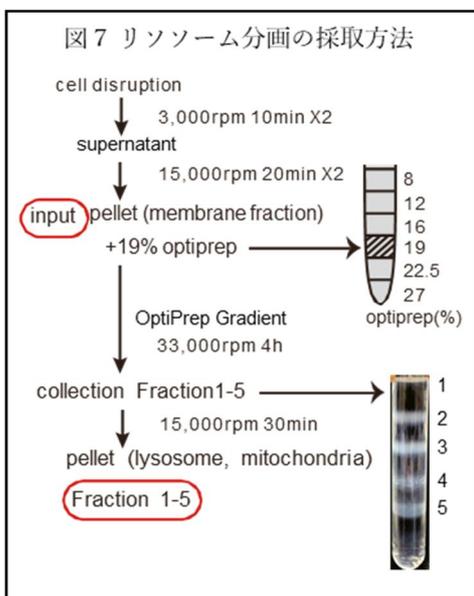


図8の超遠心後のフラクション1-5のウエスタンブロットの結果より、フラクション2にはリソソームマーカータンパク質であるLamp2とv-ATPaseが局在し、ミトコンドリアマーカータンパク質VDACは局在していないため、このリソソームフラクションにはミトコンドリアの混合はほぼないと考えられる。このリソソームフラクションに、GAPDHとPGKが局在することが確認できた(図8)。さらに別の解糖系酵素HK2(ヘキソキナーゼ2)は存在しないこともわかった。解糖系酵素の全てがリソソーム近傍に局在するわけではなく、ある程度の特異性をもつことが示唆された。次に、このリソソームフラクションを用いて、GAPDHとPGKによってATPが産生されるのか確認した。採取したリソソームフラクションにGAPDHの基質GAP(グリセルアルデヒド3-リン酸)を添加するとATPが産生され、GAPDH阻害剤IA(ヨードアセテート)を添加するとATP産生量が減少した。つまり、リソソーム近傍でGAPDH依存的にATPが産生されたことが示唆された。再現性を確認するために、リソソーム膜タンパク質TMEM192にHAタグをつけた過剰発現細胞を作製し、IP(HAタグによる免疫沈降)によってリソソーム分画を採取して同様の実



験を行った。採取したリソソームフラクションにGAPDHの基質GAP(グリセルアルデヒド3-リン酸)を添加するとATPが産生され、GAPDH阻害剤IA(ヨードアセテート)を添加するとATP産生量が減少した。つまり、リソソーム近傍でGAPDH依存的にATPが産生されたことが示唆された。再現性を確認するために、リソソーム膜タンパク質TMEM192にHAタグをつけた過剰発現細胞を作製し、IP(HAタグによる免疫沈降)によってリソソーム分画を採取して同様の実

験を行った結果、やはりリソソーム近傍に GAPDH と PGK が局在して ATP を産生することが確認できた。2つの異なる方法を用いた実験で同様の結果が得られたことから、リソソームと NAD<sup>+</sup>の新たな分子機序として、解糖系酵素である GAPDH と PGK がリソソーム近傍に局在し、NAD<sup>+</sup>から ATP を産生してリソソーム活性に関与しているメカニズムを提唱した(図9)。

(4) NAD<sup>+</sup>前駆体 NMN 投与によってモデルマウスの寿命延長効果を確認した。NAD<sup>+</sup>は老化と共に減少していくことは知られている。また NMN はサプリメントとしても販売されており、臨床応用を考える上でも実用化には

問題ない。老化性疾患の治療戦略として NAD<sup>+</sup>前駆体 NMN 投与が有効か検証した。培養細胞に NMN を添加すると細胞内 NAD<sup>+</sup>量が増加しリソソーム活性も上昇し、ミトコンドリア翻訳障害が緩和されることを証明した後、この現象をモデルマウスでも証明するために、2ヶ月齢モデルマウスに NMN を投与し、その効果を検証した。臨床応用を見据えて NMN は飲水より投与した。するとこ

この心筋症モデルマウスでは、寿命が延長した(図10)。6ヶ月齢マウスに NMN を投与しても寿命延長効果はなかった。したがって NMN は長期投与する方が効果が高い可能性が示唆された。NMN 投与によって寿命が延長した原因を調べるために、心臓機能を評価した。心筋症マーカーである ANF、MHC の遺伝子発現が NMN 投与によって減少しており、心筋症が改善したことが確認できた。また、心臓組織の線維化をマッソントリクローム染色より定量すると、やはり NMN 投与によって改善していた。さらにメタボローム解析よりドーパやエピネフリンの代謝物に関して NMN 投与によって改善した。以上の結果より拡張型

心筋症モデルマウスに NMN を投与すると、低下していた心臓機能が改善し寿命が延長したことが示唆された。老化性疾患の予防的な治療戦略として、NMN はある程度の改善効果が期待できると考えている。

図9 ミトコンドリア機能障害からNAD<sup>+</sup>合成量が低下しリソソーム機能障害がおこる分子機序

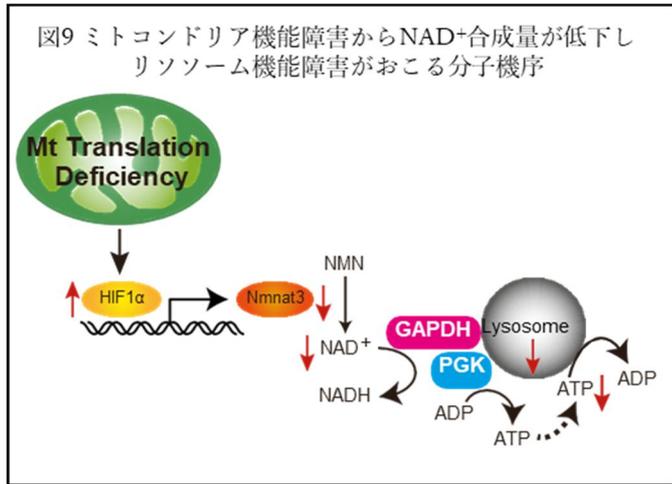
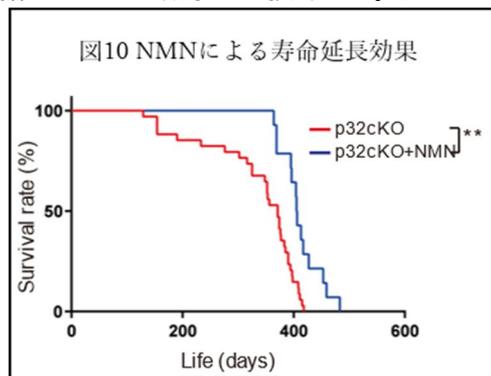


図10 NMNによる寿命延長効果



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Fujinuma Shun, Nakatsumi Hirokazu, Shimizu Hideyuki, Sugiyama Shigeaki, Harada Akihito, Goya Takeshi, Tanaka Masatake, Kohjima Motoyuki, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Yagi Mikako, Kang Dongchon, Kaneko Mari, Shigeta Mayo, Bamba Takeshi, Ohkawa Yasuyuki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 42
2. 論文標題 FOXK1 promotes nonalcoholic fatty liver disease by mediating mTORC1-dependent inhibition of hepatic fatty acid oxidation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112530 ~ 112530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112530	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 -
1. 著者名 Yagi Mikako, Do Yura, Hirai Haruka, Miki Kenji, Toshima Takahiro, Fukahori Yukina, Setoyama Daiki, Abe Chiaki, Nabeshima Yo-Ichi, Kang Dongchon, Uchiumi Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Improving lysosomal ferroptosis with NMN administration protects against heart failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202302116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202302116	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 -
1. 著者名 Miki Kenji, Yagi Mikako, Noguchi Naoki, Do Yura, Otsuji Ryosuke, Kuga Daisuke, Kang Dongchon, Yoshimoto Koji, Uchiumi Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of glioblastoma cell ferroptosis using combined treatment with chloramphenicol and 2-deoxy-d-glucose	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-37483-5	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 -
1. 著者名 Ueda Saori, Yagi Mikako, Tomoda Ena, Matsumoto Shinya, Ueyanagi Yasushi, Do Yura, Setoyama Daiki, Matsushima Yuichi, Nagao Asuteka, Suzuki Tsutomu, Ide Tomomi, Mori Yusuke, Oyama Noriko, Kang Dongchon, Uchiumi Takeshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Mitochondrial haplotype mutation alleviates respiratory defect of MELAS by restoring taurine modification in tRNA with 3243A?&gt;?G mutation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7480 ~ 7495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad591	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 -

1. 著者名 Fujii Masakazu, Setoyama Daiki, Gotoh Kazuhito, Dozono Yushi, Yagi Mikako, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Uchiyama Takeshi, Kang Dongchon	4. 巻 25
2. 論文標題 TFAM expression in brown adipocytes confers obesity resistance by secreting extracellular vesicles that promote self-activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104889 ~ 104889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104889	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 -

1. 著者名 Kiyokoba Ryo, Uchiyama Takeshi, Yagi Mikako, Toshima Takahiro, Tsukahara Shigehiro, Fujita Yasuyuki, Kato Kiyoko, Kang Dongchon	4. 巻 12
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction-induced high hCG associated with development of fetal growth restriction and pre-eclampsia with fetal growth restriction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07893-y	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 -

1. 著者名 Miki Kenji, Yagi Mikako, Yoshimoto Koji, Kang Dongchon, Uchiyama Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction and impaired growth of glioblastoma cell lines caused by antimicrobial agents inducing ferroptosis under glucose starvation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-022-00437-z	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 -

1. 著者名 Miki Kenji, Yagi Mikako, Yoshimoto Koji, Kang Dongchon, Uchiyama Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Correction: Mitochondrial dysfunction and impaired growth of glioblastoma cell lines caused by antimicrobial agents inducing ferroptosis under glucose starvation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41389-022-00443-1	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 -

1. 著者名 Tsukahara Shigehiro, Shiota Masaki, Takamatsu Dai, Nagakawa Shohei, Matsumoto Takashi, Kiyokoba Ryo, Yagi Mikako, Setoyama Daiki, Noda Nozomi, Matsumoto Shinya, Hayashi Tetsutaro, Contreras-Sanz Alberto, Black Peter C., Inokuchi Junichi, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Uchiumi Takeshi, Eto Masatoshi, Kang Dongchon	4. 巻 12
2. 論文標題 Cancer genomic profiling identified dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in bladder cancer promotes sensitivity to gemcitabine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12528-3	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 -

1. 著者名 Yagi Mikako, Toshima Takahiro, Amamoto Rie, Do Yura, Hirai Haruka, Setoyama Daiki, Kang Dongchon, Uchiumi Takeshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Mitochondrial translation deficiency impairs NAD <sup>+</sup> mediated lysosomal acidification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020105268	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 八木美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリア機能障害による心不全の 病態解析と治療戦略
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリア翻訳障害による心筋症発症メカニズムとその治療
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 八木美佳子
2. 発表標題 ミトコンドリアとリソソームの新分子機序
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 柳 茂、三牧 正和	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 245
3. 書名 ミトコンドリア 疾患治療の新時代	

1. 著者名 石原孝也 前田真希 石原直忠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス 機能研究から疾患・老化まで	

〔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

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