

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20923

研究課題名（和文）Bcl2-L-13の心臓におけるミトファジー制御機構の解明と創薬への応用

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms for mitochondrial degradation in the ischemic heart disease

研究代表者

村川 智一（Tomokazu, Murakawa）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50902194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、細胞内の重要なミトコンドリア分解機構であるミトファジーの関連分子としてBcl2-L-13を同定し、圧負荷心において心保護的に働くという予備データを得ていた。しかしながら、Bcl2-L-13の虚血心における働きは未だ明らかになっていなかったことから、本研究では、まずマウス虚血再灌流モデルを確立し、Bcl2-L-13ノックアウトマウスを用いて検討を行った。Bcl2-L-13ノックアウトマウスは野生型マウスに比して虚血再灌流手術後24時間での心筋梗塞領域が縮小することを示唆するデータを得た。これは、Bcl2-L-13が心筋保護及び障害の二面性を持つ分子である可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞に対する急性期再灌流療法により救命率が高まったが、再灌流による心筋細胞障害については未だ克服されていない。再灌流障害にはミトコンドリアが深く関係しており、ミトコンドリアの品質管理機構であるミトファジーの関与が考えられた。我々はミトファジー関連分子であるBcl2-L-13を同定しており、本研究では、その虚血再灌流における役割をノックアウトマウスを用いて検討した。ノックアウトマウスは心筋梗塞領域が縮小する傾向であり、Bcl2-L-13の機能の二面性が示されるとともに、今後再灌流障害に対する新たな分子標的治療を行ううえで適切なタイミングでの介入が要求されることを示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：We had previously found that Bcl2-L-13 is a molecule associated with mitophagy, an important process of degrading mitochondria within cells. Our preliminary data suggested that this molecule played a protective role in pressure-overloaded hearts. However, the function of Bcl2-L-13 in ischemic hearts has not been elucidated. For this purpose, we established an ischemia-reperfusion mouse model and studied the effects of Bcl2-L-13 ablation. Bcl2-L-13 knockout mice showed a smaller myocardial infarct size 24 hours after ischemia-reperfusion surgery compared to wild-type mice. This indicates that Bcl2-L-13 might have a dual role as both a molecule that protects the heart and one that causes injury.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトファジー Bcl2-L-13 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

心不全症例では異常ミトコンドリアが蓄積していることが知られており、細胞死や心筋におけるエネルギー産生の低下及び炎症の惹起により心不全の発症原因になると考えられるが、異常ミトコンドリアの蓄積に至るメカニズムは解明されていない。心筋細胞は終末分化細胞であり、有害物質や傷害を受けた細胞小器官の分裂・増殖による除去が困難であることから、我々は細胞内の主要な分解経路であるオートファジー、特にミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーに注目した。マイトファジーの分子機構解析は酵母において先行しており、マイトファジー必須分子として Atg32 が同定されている (Okamoto et al. Dev. Cell, 2009)。しかしながら、哺乳類細胞のマイトファジーにおいては神経細胞における Parkin/PINK1 系、低酸素誘導性マイトファジーにおける FUNDC1 などが報告されてきたものの、心筋細胞を含む一般的なマイトファジー分子機構は未だ不明である。そこで我々は、新たなマイトファジー関連分子を同定する必要があると考え、タンパク質データベースの網羅的検索により Atg32 の哺乳類細胞における機能的ホモログとして Bcl2-L-13 を同定した (Murakawa et al. Nature Commun. 2015)。我々は Bcl2-L-13 が哺乳類細胞においてミトコンドリア分裂誘導とマイトファジー誘導の二つの機能を併せ持つことを明らかにした。次に、Bcl2-L-13 によるマイトファジーの開始機構として ULK1 複合体が利用されていること明らかにした (Murakawa et al. Cell Rep. 2019)。このように我々は Bcl2-L-13 の機能をこれまで解明してきたが、Bcl2-L-13 の生体における役割は未だ明らかではない。このため、我々は Bcl2-L-13 ノックアウトマウスを作成し、Bcl2-L-13 を多く発現する心臓に着目して圧負荷誘導性心不全モデルによる予備的検討を行った。Bcl2-L-13 ノックアウトマウスは横行大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷により野生型マウスに比して有意な心機能の低下を認め、Bcl2-L-13 が心臓における圧負荷に対する恒常性維持に重要な働きをしていることを示唆する結果を得た。そこで、本研究では圧負荷とは異なる心筋障害の主因である虚血による心不全発症進展においてマイトファジーは保護的役割を有するかなどにつき検証することとした。

2. 研究の目的

本研究は、我々が同定したマイトファジー関連分子である Bcl2-L-13 の遺伝子改変マウスを用い、虚血モデルを作製・解析することにより心筋虚血におけるマイトファジーの役割を明らかにするとともに、マイトファジーの分裂細胞と非分裂細胞における機能の差異を解析することにより、心臓におけるミトコンドリア恒常性維持システムの全容を明らかにし、心不全発症進展メカニズムの解明及び新たな治療法開発に結び付けることを目的としている。

3. 研究の方法

(1). 虚血性不全心における Bcl2-L-13 の機能解析及び結合タンパク質の網羅的解析

マウス心筋梗塞モデルの作成

8~10 週齢の C57Bl/6 マウスを使用した。マウスは、ケタミン (75 mg/kg)、メドミジン (1 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔し、気管内挿管の後、人工呼吸器の管理下で手術を施行した。左冠動脈を左心耳下縁から 1mm 下の位置で 8-0 ナイロン糸を用いて結紮し、心筋梗塞を作成した。

マウス虚血再灌流モデルの作製

8-10 週齢のオスの C57/BL6J マウスを人工呼吸器下に胸骨第 3-4 肋間を開胸し、左心耳の 2mm 下の左冠動脈前下行枝を 8-0 シルク糸にて PE10 チューブとともに結紮した。30 分後に結紮を解除し、血流の再開を確認したうえで閉胸した。結紮に用いた糸は下記の虚血領域/梗塞領域の評価のためにその場に残した。

心エコー

マウスを覚醒下に Vevo 2100 を用いて左室壁運動、左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs)、左室短縮率 (FS) などの評価を行った。

虚血領域及び梗塞領域の評価

人工呼吸器下に開胸及び腹部を切開し、下大静脈を露出した。残しておいた糸を用いて再び結紮し、下大静脈から Evans Blue を静注した後に、心臓を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。その後、約 1mm 厚にスライスし、1% TTC 内で 37℃ 10 分間静置した。氷冷したリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、10% ホルマリンで固定した。

評価は、実体顕微鏡で撮影し、Evans Blue で青色に染まらない領域を虚血領域 (AAR)、TTC により赤色に染色されず、白色となる領域を梗塞領域とした。それぞれの面積は Image J により計測した。

(2). 分裂細胞、非分裂細胞それぞれにおける Bcl2-L-13 の機能の解析

Bcl2-L-13^{-/-}MEF の作製

妊娠 13 日の Bcl2-L-13 ノックアウトマウスを用い、胎児を摘出した。soft tissue を除去した後、ミンスし、細胞を回収した。10cm ディッシュに播種し、翌日ストックした。後日、不死化を行い、cell line とした。

4. 研究成果

(1). 虚血性心不全における Bcl2-L-13 の機能解析及び結合タンパク質の網羅的解析

まず、マウス心筋梗塞モデルの確立を試みた。左冠動脈前下行枝の結紮は問題なく行えたが、術後早期の心破裂、心不全死及び突然死が多発した。心エコー評価予定であった、術後 7 日までに約 60% のマウスが死亡した。実際には、急性心筋梗塞に対しては再灌流療法が一般化していることや、今後 in vitro での機序の解析を行う際は hypoxia-reoxygenation を用いることになることなどを考慮し、計画を変更して ischemia-reperfusion モデルを確立することとした。虚血再灌流手術 24 時間後に心エコーで心機能を評価した後、Evans Blue 及び TTC で染色し、虚血領域 (AAR) および梗塞領域 (IA) を評価した。AAR は約 40% であり、IA は AAR の 40% 弱であった。心エコーでは虚血再灌流マウスにおいて有意な LVDd, LVDs の拡大、FS の低下を認めた。これらより、マウスモデルが問題なく確立できたと考えられた。

Bcl2-L-13 ノックアウトマウスを rederivation する際に、コロニーの拡大が上手くいかず、実験に必要なマウスの数を確保するのに非常に多くの時間を要した。予備実験において、少数の Bcl2-L-13 ノックアウトマウスとその littermate である野生型マウスに虚血再灌流手術を行ったところ、我々の予想に反して、ノックアウトマウスにおいて梗塞領域が縮小する傾向が見られた。

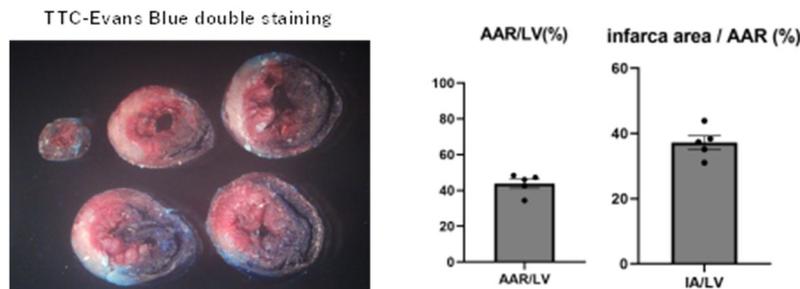


図1 虚血領域 (AAR) 及び梗塞領域 (IA) の評価

虚血再灌流 24 時間後に TTC/Evans Blue の二重染色により AAR 及び IA を評価した (n=5)。実体顕微鏡で撮影し、Image J にて測定を行った。

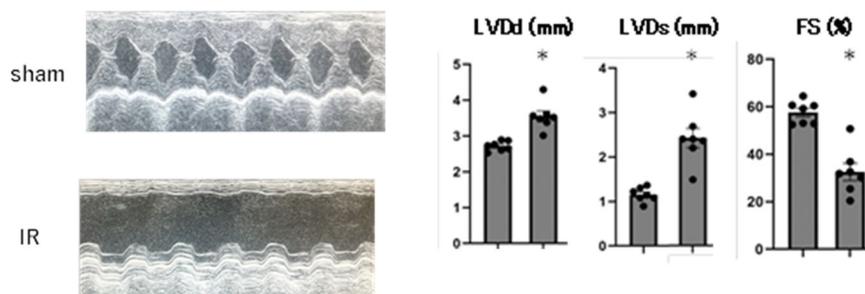


図2 虚血再灌流モデルマウスの心エコー図

虚血再灌流 24 時間後に心エコーを施行した。LVDd: 左室拡張末期径、LVDs: 左室収縮末期径、FS: 左室短縮率 * $p < 0.05$

これは、Bcl2-L-13 が圧負荷に対しては保護的に作用するのに対し、虚血再灌流障害旧跡には、心筋障害を惹起する機能を持つことを示唆している。この知見は、今後心筋虚血に対して分子を標的とした治療を考えていくうえで非常に重要であり、メカニズムの解明が必要である。TUNEL 染色によるアポトーシスの評価、組織蛍光免疫染色によるミトファジーの評価、電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の評価を行い、いずれのメカニズムによりこの表現型に至ったかについての検討を行っていく。

(2). 分裂細胞、非分裂細胞それぞれにおける Bcl2-L-13 の機能の解析

線維芽細胞におけるミトコンドリア動態を解析するために、野生型マウス及び Bcl2-L-13 ノックアウトマウスから MEF を採取し、細胞株化した。まず、細胞株につき validation を行うため

に細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行った(図 3)。Bcl2-L-13^{-/-}MEF における Bcl2-L-13 タンパク質レベルの低下が確認できた。これらの細胞を用いてミトコンドリア形態について評価した。脱共役剤である CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) によりミトコンドリア分裂が誘導されることが報告されている。HEK293 細胞などでは、10 μM の CCCP の投与でミトコンドリア分裂が惹起されるが、MEF ではミトコンドリア分裂の誘導は 10%程度の細胞で見られなかった。MEF は重要なミトファジー関連因子 Parkin の発現が見られないことが知られている。

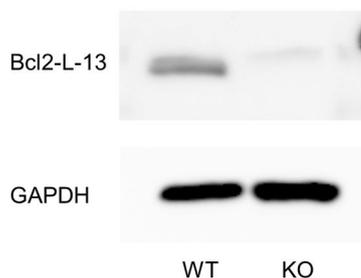


図 3 MEF における Bcl2-L-13 タンパク質レベルの評価
WT; Bcl2-L-13^{+/+}MEF
KO; Bcl2-L-13^{-/-}MEF

我々は、Parkin を恒常発現する MEF を作製し、CCCP に対する反応を確認した。10 μM CCCP の投与により Parkin 恒常発現 MEF は 60%程度のミトコンドリア分裂を示し、Parkin が MEF におけるミトコンドリア分裂を促進することが示唆された。さらに、我々は Bcl2-L-13^{-/-}MEF 及び Parkin 恒常発現 Bcl2-L-13^{-/-}MEF を用いて同様の解析を行った。Bcl2-L-13^{-/-}MEF、Parkin 恒常発現 Bcl2-L-13^{-/-}MEF とともに 10%以下の細胞死かミトコンドリア分裂を示さず、MEF における Parkin のミトコンドリア分裂誘導能に Bcl2-L-13 が重要な働きをしていることが示唆された。今後、さらに解析を進め、線維芽細胞におけるミトコンドリア動態への Bcl2-L-13 関与のメカニズムを明らかにする。また、線維芽細胞特異的 Bcl2-L-13 ノックアウトマウスを作製することで、in vivo における評価も行っていく。

本研究により、虚血再灌流マウスモデルを確立することに成功した。また、虚血再灌流障害においては、我々の予想に反し、Bcl2-L-13 が心機能に有害な作用を持つ可能性が示唆された。これは、今後ミトコンドリアダイナミクスの制御による心不全治療を考えるうえで、非常に重要な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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