

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591102

研究課題名(和文) 不全心筋におけるミトコンドリア品質管理因子の制御機構解明及び治療への応用

研究課題名(英文) Regulation of mitochondrial quality control factors and its possibility as a therapeutic target in cardiac failure

研究代表者

小原 幸 (KOBARA, MIYUKI)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80275198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット培養心筋細胞及び心筋梗塞モデルを用いて、ミトコンドリア(MIT)機能、形態、品質制御因子(融合(OPA1)、分裂(Drp1)、ミトファジー(Parkin))の関連を検討した。培養細胞へのノルエピネフリン投与は細胞死を増強し、断片化MITを増加させたが、Drp1、Parkinの減弱が認められ、障害MIT除去機構不全が認められた。低酸素再酸素化障害では細胞死増加、MIT膜電位低下及び断片化を認め、Drp1、Parkinの増加が認められた。GLP1作動薬はこれらを改善しATPを保持した。

心筋梗塞後心不全モデルでは脂肪酸のEPAが心不全を軽減し、OPA1を維持しMIT形態・機能を改善した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial quality control factors, such as fusion factor, OPA1; fission factor, Drp-1; mitophagy-related factor, parkin, have critical roles to mediate mitochondrial morphology and function. The present study examined the regulation of these factors using neonatal cultured myocytes and myocardial infarction (MI) model. Norepinephrine (NE) increased myocytes death and fission mitochondria, though Drp-1 and parkin expressions were not incremented. Hypoxia/reoxygenation (H/R) increased myocytes death, and GLP-1 analogue significantly attenuated. H/R enhanced fragmented and membrane potential-dissipated mitochondria, in association with decreased ATP content. GLP-1 analogue attenuated these morphological and metabolic damages, and attenuated H/R-induced Drp-1 and parkin enhancements.

In vivo MI experiments. Dietary EPA attenuated post-MI remodeling and preserves mitochondrial morphology and function in association with OPA-1 preservation.

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 品質管理因子

1. 研究開始当初の背景

(1)心不全はさまざまな心疾患の終末像であり、治療法の改善にも関わらず今だ予後不良の病態である。心筋細胞は収縮・弛緩によるポンプ機能を維持するため、その3割をミトコンドリアが占める細胞であり、このミトコンドリアにおいて90%以上のATPが産生されている。そのため、その機能維持は心不全の治療ターゲットとしてきわめて重要だと考えられる。

(2)ミトコンドリアはエネルギー産生のある場であるとともに、レドックス制御や、Caホメオスタシスにも関与し、細胞生死に関わる細胞内小器官である。近年、ミトコンドリア機能に関連してそのクオリティーコントロールが重要視されている。

(3)ミトコンドリアは常時、機能低下を来した部位を分裂(fission)させ、障害ミトコンドリアをミトファジーにて取り除く。また新たにbiogenesisされたミトコンドリアなど健常ミトコンドリアは融合(fusion)し均質化が保たれる、といった一連の現象を繰り返しておりミトコンドリアクオリティーコントロールと呼ばれている。ミトコンドリアクオリティーコントロール関連因子としてfissionにはDrp-1、Fis-1が、fusionにはmitofusin1/2、OPA1が、biogenesisにはPCG1が、ミトファジーにはParkin、PINK1の関与が報告されている。しかし疾患とミトコンドリアクオリティーコントロールに関わる研究は主に神経変性疾患におけるものが多く、各種循環器疾患との関わりは解明されていない。そこで、心不全の病態進展におけるミトコンドリアクオリティーコントロール因子の動態を明らかにし、ミトコンドリア保護・機能維持を目指した治療ターゲット開発に関わる基礎的検討を行う

2. 研究の目的

(1)新生仔ラット培養心筋細胞を用いて心不全時、障害増悪に関わる因子(酸化ストレス、神経体液性因子)を付与しミトコンドリア障害、形態学的変化を観察し、ミトコンドリアクオリティーコントロール因子の変動を検討する。

(2)心不全の最大原因である虚血再還流障害を模した低酸素再酸素化障害を培養心筋細胞に加え、ミトコンドリア障害、ミトコンドリアクオリティーコントロール因子の変動を検討する。さらにミトコンドリア融合因子の保持を介した、心筋保護薬の検討も行う。

(3)ラット心筋梗塞後リモデリングモデル及び培養心筋細胞を用い、ミトコンドリア脂肪酸組成の変動と、ミトコンドリア機能・形態・クオリティーコントロール因子への影響を検討し脂肪酸のミトコンドリア保護薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1)新生仔ラット心筋細胞を培養した。ミトコンドリア酸化ストレス付与としてH₂O₂ 100 μM、ミトコンドリアATP感受性Kチャネル開口薬であるDiazoxiside 100, 500 μMを24時間投与した。また電子伝達系阻害を行うantimycinAは5-100 μM、2時間の投与で検討を行った。心筋細胞necrosisは培養上清のLDH活性で検討し、apoptosisはDAPI染色による核の形態変化、Caspase3活性により検討した。ミトコンドリア膜電位、及び断片化はTMRM染色で検討し、ミトコンドリア由来ROS産生はMitSOXred染色で検討した。ミトコンドリアクオリティーコントロール因子の中でPCG1はreal time PCRでmRNA発現を検討し、fusion、fission、mitophagy関連因子は蛋白発現をWesternblotで検討した。

(2)低酸素再酸素化刺激はアネロパッケージを用い、5時間の低酸素刺激のち30分再酸素化を行った。ミトコンドリア障害、ミトコンドリアクオリティーコントロール因子検討は(1)と同様に行った。さらに、インクレチン作動薬であるGLP-1analogueとしてExendin 4(50 nmol/L)の障害に対する影響、ミトコンドリアクオリティーコントロール因子に対する影響を検討した。

(3)雄性SDラットの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。EPAは心筋梗塞作成時より経口投与した。心筋梗塞後リモデリングは心エコーによる心機能評価、組織学的検討を行った。ミトコンドリア長はMitotracker redを用いて染色した。ミトコンドリアを単離し、酸素消費量によるミトコンドリア機能評価を行い、ミトコンドリアクオリティーコントロール因子の蛋白発現を検討した。培養心筋細胞にたいする直接作用の検討では水溶性EPAを必要とするためNa塩を10-50 nmol/Lの濃度で投与した。

4. 研究成果

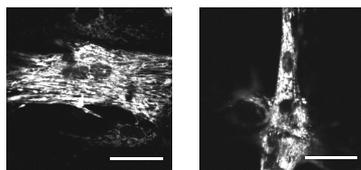
(1)ミトコンドリアROS産生の指標であるMitSOXredはH₂O₂負荷群において明らかに増加し、ミトコンドリア膜電位指示薬であるTMRMの蛍光減弱を来した。しかし、diazoxide投与細胞では、既報の濃度を元に検討したが、意外にもミトコンドリアROS産生、膜電位ともに有意な変化を認めなかった。また電子伝達系阻害を行うantimycinAは100 μM、2時間の投与で顕著な細胞死が誘導され、より低濃度での検討を行った。5-10 μM、2時間でも十分に顕著なMitSOX蛍光増強と、膜電位の消失を来した。一方ミトコンドリア量の指標とされるTom20は逆に増加していたが、染色上での形態学的ミトコンドリア量と解離しており、細胞障害に伴う細胞内他蛋白減少との対比によるみかけの増加を疑っている。

100 nM 6時間angiotensin II負荷では明らかなミトコンドリア膜電位低下を認めないものの、24時間負荷で明らかに低下した。

これに伴い心筋細胞アポトーシスも6時間では認めず、24時間で有意に増加した。またミトコンドリア量の指標とされる Tom20 が 24 時間付与後には有意に減少していた。しかし、ミトコンドリアクオリティコントロール因子の蛋白発現への影響では、24 時間刺激でも OPA1、mitofusin 1、Drp-1、Fis1、Parkin いずれの指標へも有意な影響を与えておらず、細胞分画法における検討でも、Parkin のミトコンドリアへの translocate は認めなかった。

100 nM 24 時間 aldosterone 負荷では明らかなミトコンドリア膜電位低下及びミトコンドリア ROS 産生増加を来した。心筋細胞アポトーシスは 48 時間後で増加した。しかし、24 時間後の検討においてミトコンドリアクオリティコントロール因子の蛋白発現への影響では、OPA1、mitofusin 1、Drp-1、Fis1、Parkin いずれの指標へも有意な影響を与えていなかった。

10^{-7} - 10^{-5} mol/L の norepinephrine(NE)投与は濃度依存性にミトコンドリア ROS 産生を増加させ、断片化障害ミトコンドリアを増加させた。また 10^{-5} mol/L の濃度では有意な necrosis 増加がみられた。しかし、ミトコンドリアクオリティコントロール因子では断片化ミトコンドリアの増加に反し、Mitophagy 誘導に関わる Parkin の減弱が認められこれが細胞死増強につながるのではないかと考えられた。



Cont NE 10 μ M
図 1 ミトコンドリア断片化

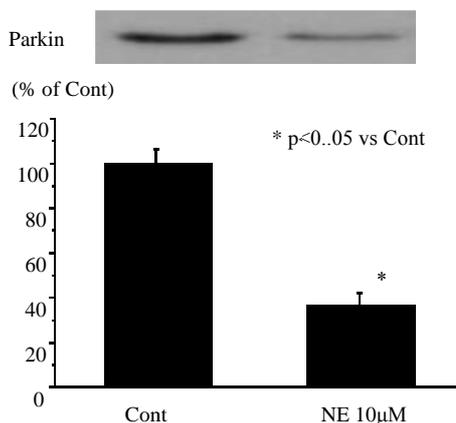


図 2 NE の Parkin 発現への影響

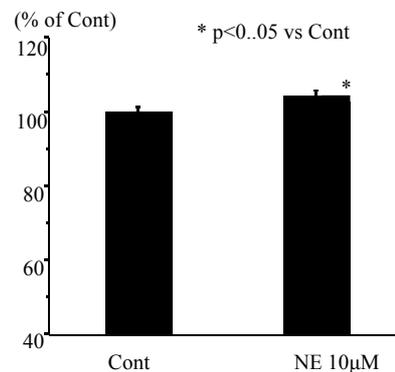
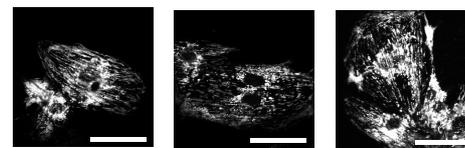


図 3 NE の LDH 放出への影響

(2) 培養心筋細胞に低酸素・再酸素化刺激(HR)を負荷したところ、明らかなミトコンドリア ROS 産生増強、膜電位の低下、断片化を顕著に認めた。品質管理因子発現では fusion 因子の OPA1 はやや増加し、断片化因子の Drp1 は顕著に増加していた。それとともに Parkin 発現も増加しミトファジーの亢進が考えられた。しかし Tom20 発現によるミトコンドリア量の減少は認めなかった。GLP1 作動薬(exendin4: Ex)は apoptosis、necrosis とともに抑制し、fusion 因子をさらに有意に増強、Drp1 の増加を緩和し、Parkin 発現の減少を来した。また膜電位の維持されたミトコンドリアが多く、断片化が軽減していた。ミトコンドリア生合成に働く PCG1 発現は増加を認めなかったが、ATP 含量の保持が認められ、ミトコンドリア量とは独立した融合に伴う機能保持が、エネルギー代謝改善につながったと考えられる。



Cont HR Ex+HR

図 4 ミトコンドリア断片化

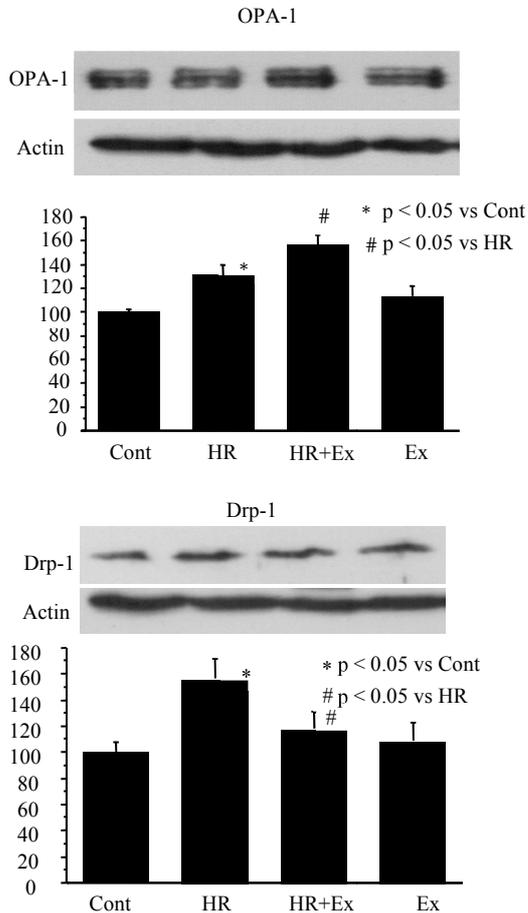


図5 ミトコンドリア品質管理因子変動

(3) ラット心筋梗塞モデル(MI)において、慢性脂肪酸のEPA投与は梗塞後リモデリング軽減に働き、ミトコンドリア融合因子 OPA-1を増強し、形態学的にも心筋梗塞辺縁部残存心筋細胞において断片化ミトコンドリアの減少を来し、ミトコンドリア機能保持作用を示した。

イコサペンタエン酸 Na 塩を、直接培養心筋細胞に投与し、その後の低酸素再酸素化障害に与える影響を検討したが、低濃度 高濃度に関わらず細胞障害増強を来した。

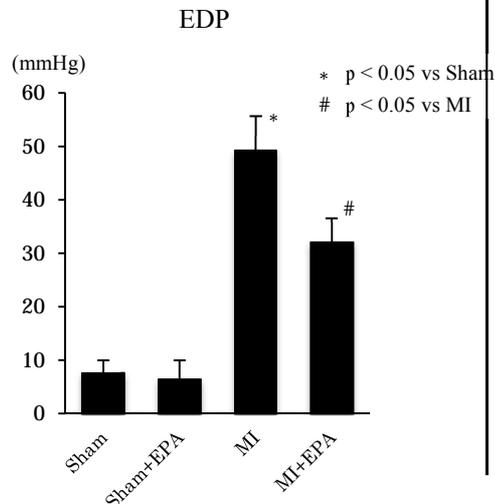


図6 EPAによる心筋梗塞後心機能改善

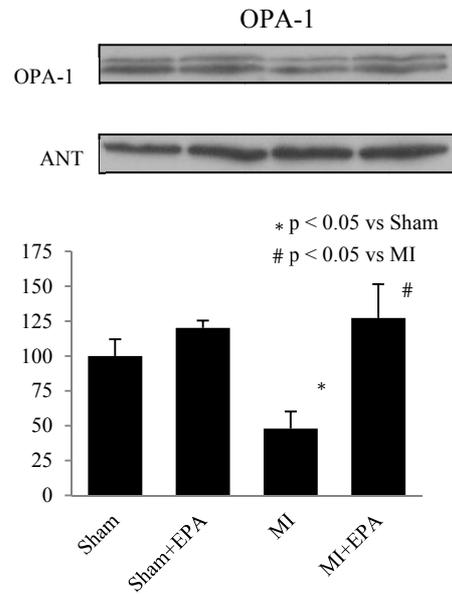


図7 EPAによるミトコンドリア融合促進

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 8 件)

Kobara M, Furumori-Yukiya A, et. al.

Short-Term Caloric Restriction Suppresses Cardiac Oxidative Stress and Hypertrophy Caused by Chronic Pressure Overload. In press J Card Fail. 査読有 2015. doi: 10.1016/j.cardfail.2015.04.016.

Noda K, Kobara M, et. al. Additive

amelioration of oxidative stress and cardiac function by combined mineralocorticoid and angiotensin receptor blockers in postinfarct failing hearts. J Cardiovasc Pharmacol. 査読有 2012 ;60:140-9. doi: 10.1097/FJC.0b013e318258f8ce.

Hoshino A, Matoba S, et.al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the

mouse heart. Nat Commun. 査読有
2013;4:2308. doi: 10.1038/ncomms3308.

〔学会発表〕(計 15 件)

Koara M, Ohigashi M, et. al. Glucagon-like Peptide 1 Analogue Preserves Mitochondrial Fusion Proteins and Suppresses Lethal Myocyte Injury after Hypoxia-reoxygenation in Cultured Myocytes The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (大阪), 2015. 4.

Kobara M, Furumori A, et. al. Short-term caloric restriction mediates cardiac redox state and improves diastolic function in pressure overload hypertrophy. ESC Congress 2014 (Barcelona, Spain), 2014. 8.

Kobara M, Shiraishi T, et. al. Eicosapentaenoic acid mediates mitochondrial fatty acid composition and fusion protein OPA-1 in associated with preservation of oxidative phosphorylation after myocardial infarction ESC Congress 2013 (Amsterdam, Holland), 2013. 9.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小原 幸 (KOBARA MIYUKI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：80275198

(2)研究分担者

的場 聖明 (Matoba Satoaki)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：10305576

(3)連携研究者

()

研究者番号：