

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293162

研究課題名(和文)急性心筋梗塞あるいはMDMA中毒のミトコンドリア障害に関する研究

研究課題名(英文)Mitochondrial dysfunction on acute myocardial infarction or MDMA poisoning

研究代表者

新谷 香(石田香)(Shintnai-Ishida, Kaori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50345047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性心筋梗塞や合成麻薬であるMDMA中毒で引き起こされる心臓の収縮機能低下の分子機序を解明するために、ミトコンドリア障害に着目して研究した結果、下記を明らかにした。

1. ラットおよびヒトの心筋細胞のミトコンドリアにはカルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインが存在し、これが心筋梗塞時に活性化してミトコンドリアの呼吸を司るタンパク質を分解し、心機能を低下させる。
2. ラットMDMA中毒モデルでは、オートファジーの亢進によりオートリソソームが増加するが、MDMA代謝で産生される活性酸素種がこのリソソーム膜を傷害し、内部の消化酵素を漏出させる結果、心筋線維が傷害され、心機能が低下する。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study was to clarify the molecular mechanisms of cardiac dysfunction, especially of mitochondria dysfunction, on acute myocardial infarction or a designer drug MDMA poisoning, and new findings were as follow;

1. Mitochondria of both rat and human cardiomyocytes have a calcium-dependent protease calpain. Acute myocardial infarction-activated mitochondrial calpain cleaves mitochondrial functional proteins, resulting in cardiac dysfunction.
2. In rat heart, MDMA causes lysosome destabilization following activation of the autophagy-lysosomal pathway, through which released lysosomal proteases damage myofibrils and induce cardiac dysfunction.

研究分野：法医学

キーワード：急性心筋梗塞 MDMA ミトコンドリア カルパイン オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

心臓突然死の多くは急性心筋梗塞等の虚血性心疾患による。一方、合成麻薬 MDMA は乱用に関連した突然死が社会問題化し心臓突然死が注目されている。法医実務上、心臓突然死の診断は困難であり、診断・治療には病態の分子機構の解明が必須である。Mitochondria (Mt) の障害はエネルギー供給不足、ROS 増生、および細胞死実行から心不全や心筋梗塞等による突然死の病態に重要な役割を担っている。最近、Mt、小胞体、lysosome 等の細胞内小器官の間の情報伝達が、細胞障害、細胞死から心不全等の病態に深く関わることが見出された。しかし、虚血性心疾患、あるいは MDMA 等による薬物中毒の病態への関与に関してはほとんど未解明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は、急性心筋梗塞および MDMA 中毒の動物モデルにおいて、心筋の Mt と他の細胞内小器官間の情報伝達の観点から心不全や心臓突然死の分子機構を解明し、診断に活用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

心筋梗塞進展の研究では、

(1) Mt の subfraction を行ない、カゼインを基質としたザイモグラフィ法により Mt-calpain の局在を同定した。

(2) 単離 Mt へのカルシウム溶液の添加あるいは冠状動脈結紮による虚血再灌流を负荷したラット心臓から単離した Mt に、膜透過性カルパイン蛍光基質ペプチド t-BOC-LM-CMAC を添加して Mt-calpain の活性を測定した。

(3) さらに、上記の単離 Mt のウェスタンブロットングを行い、Mt 呼吸鎖関連タンパク質の分解を観察し、Mt-カルパインの基質を同定した。

(4) Mt-calpain の mPTP 開口への関与を、calpain 阻害剤添加により検討した。

MDMA 中毒の研究では、

(1) MDMA を単回投与したラットの急性中毒モデルを用いて心収縮能を心エコーで評価した。

(2) LC3、カテプシン等のウェスタンブロットングにより、autophagy 誘導の経時的变化を観察した。

(3) autophagy 阻害剤、lysosome 阻害剤を用いて autolysosome 傷害が心機能低下、Mt 機能不全に関与しているのか検討した。

(4) Autophagy 誘導に関わるシグナル経路をウェスタンブロットング法で明らかにした。

(5) 単離 Mt を用いて、Complex I の活性測定により Mt 呼吸鎖能を、520 nm の吸光度測

定により mPTP 開口を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 急性心筋梗塞におけるミトコンドリア障害について

細胞質内に存在するカルシウム依存性プロテアーゼである calpain は虚血再灌流後の細胞質内カルシウム過剰により活性化し、細胞骨格タンパク質を分解することにより necrosis に寄与する。本研究で私達は、calpain が心筋細胞の Mt マトリクスにも存在することを初めて見出した (図 1)。

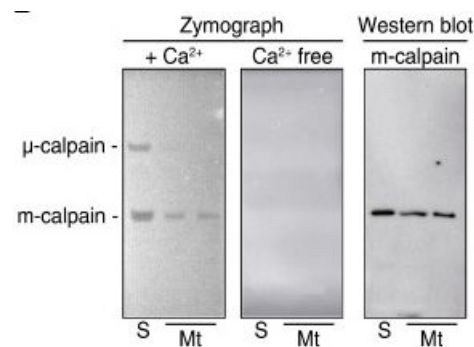


図1 ラット心筋単離Mtのザイモグラフとウェスタンブロット。Sは細胞質分画、MtはMt分画で、Mtにはm-calpainのみ存在することが明らかとなった。(文献11より引用)

Mt-calpain は虚血再灌流後の Mt 内カルシウム過剰により活性化し (図 2A) Mt 呼吸鎖の Complex I のサブユニットを限定分解して (図 3B-E) Complex I を不活性化する結果 (図 3A) mitochondria permeability transition pore (mPTP) を開口すること (図 2B) が示された。

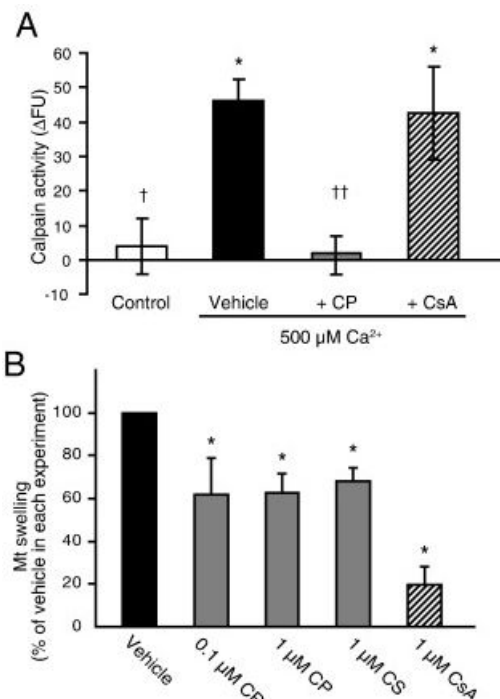


図2 ラット心筋単離 Mt にカルシウムを添加したときの calpain 活性 (A) あるいは Mt 膨化 (mPTP 開口を反映する) (B) に対する calpain 阻害剤の影響。Mt カルシウム過負荷により、calpain 活性化と mPTP 開口が引き起こされるが、calpain 阻害剤によりブロックされた。(文献 11 より引用)

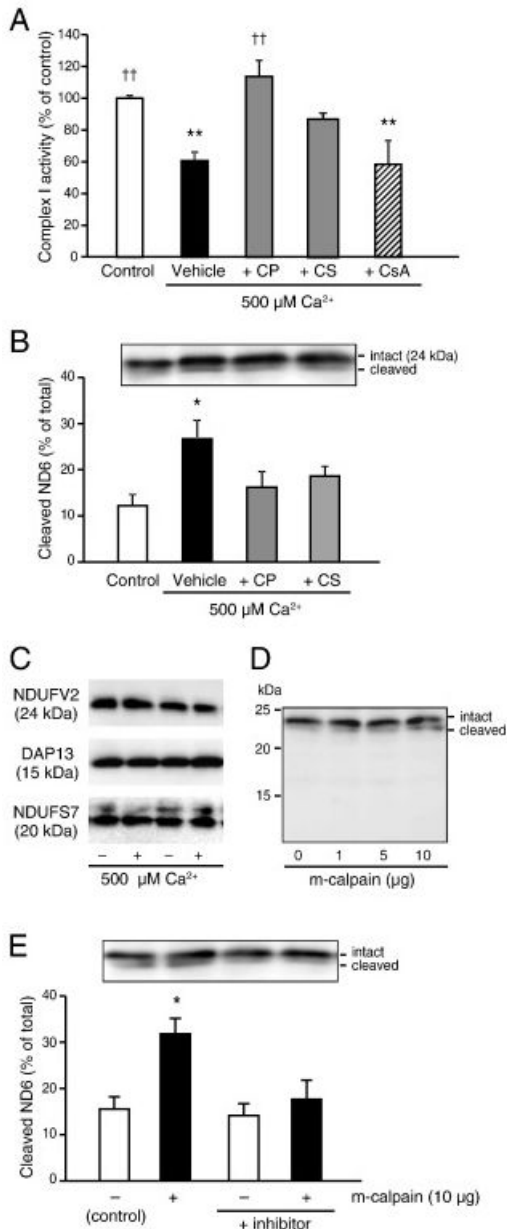


図3 ラット心筋単離 Mt にカルシウムを添加したときの Complex I 活性低下、Complex I のサブユニット SD6 の限定分解と calpain 阻害剤の影響。カルシウム添加だけでなく、外因性の m-calpain でも ND6 が分解された (D)。NDUFV2, DAP13, NDUFS7 などの他のサブユニットは分解されなかった (C)。

Calpain 阻害剤の心筋梗塞抑制効果はよく知られているが、本研究の結果は calpain が虚血再灌流後の細胞骨格破綻だけでなく、Mt 障害を引き起こし、心筋梗塞進展に貢献することを示唆している。

## (2) MDMA 急性投与後の心収縮低下における Mt と lysosome のクロストーク

最近、MDMA 代謝の際に産生される活性酸素種 (ROS) が lysosome 膜を傷害する結果、漏出した lysosome 消化酵素が Mt を傷害し、Mt の ROS 産生を加速させ、さらに lysosome 膜傷害を引き起こすというクロストーク説が示された。本研究で私達は、MDMA はオートファジーを誘導し (図 4) 増加した autolysosome が MDMA により産生された ROS により不安定化し、内部の消化酵素が漏出する結果、Mt や心筋線維を傷害し (図 5) 心収縮機能低下を引き起こすことを明らかにした。

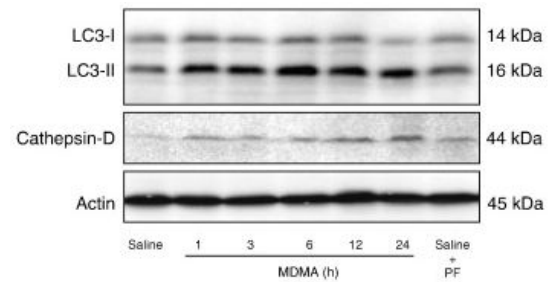


図4 オートファジーマーカーLC3と autolysosome 内の消化酵素 cathepsin-D の MDMA 投与後の経時変化。両者とも投与後 1 時間から誘導が認められた。(文献 4 より引用)

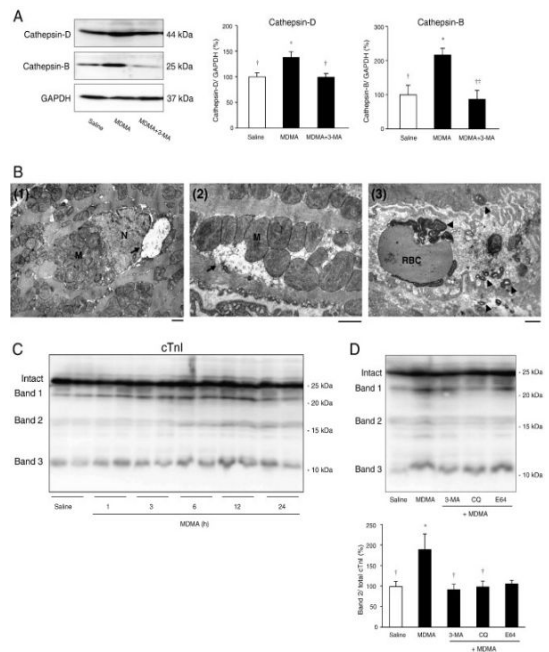


図5 MDMA 投与による cathepsin の誘導および心筋傷害に対するオートファジー阻害剤の影響。MDMA 投与による cathepsin の誘導はオートファジー阻害剤で抑制された (A)。MDMA 投与後の心筋細胞を電子顕微鏡で観察すると、核周囲の空胞形成、心筋線維の溶解、毛細血管内外にミエリン様構造物を認めた (B)。また、心筋収縮の調節タ

ンパク質である心筋トロポニン I (cTnI) の限定分解が認められ (C)、これはオートファジー阻害剤やリソソーム酵素阻害剤により抑制された (D)。(文献 4 より引用)

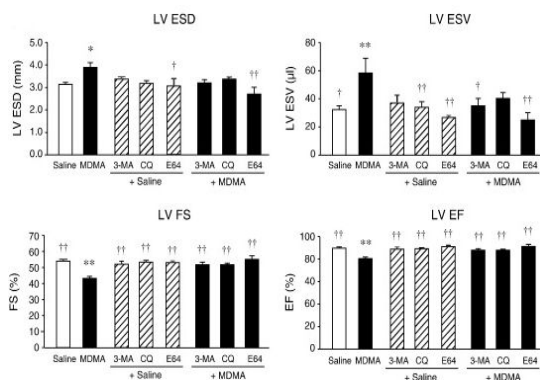


図 6 MDMA 投与による心収縮能低下とオートファジー阻害剤およびリソソーム酵素阻害剤の影響。心エコーで MDMA 投与後のラット心臓の収縮機能を評価したところ、収縮能が低下していることが明らかとなり、これをオートファジー阻害剤やリソソーム酵素阻害剤が改善した。(文献 4 より引用)

## 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 13 件)

1. Shintani-Ishida K, Kakiuchi Y, Ikegaya H. Successful quantification of 4'-methyl-2-pyrrolidinohexanophenone (MPPH) in human urine using LC-TOF-MS in an autopsy case. *Forensic Toxicol* 査読有 (2016) (in press) DOI:10.1007/s11419-016-0307-z
2. Shintani-Ishida K, Yoshida K. Mitochondrial m-calpain opens the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion. *Int J Cardiol* 査読有 197(15):26-32 (2015) DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.06.010
3. Shintani-Ishida K, Nakamura M, Tojo M, Idota N, Ikegaya H. Identification and quantification of 4-methoxy-2-pyrrolidinobutylphenone (4-MeOPBP) in human plasma and urine using LC-TOF-MS in an autopsy case. *Forensic Toxicol* 査読有 33(2):348-354 (2015) DOI: 10.1007/s11419-015-0281-x
4. Yoshida K, Saka K, Shintani-Ishida K, Maeda H, Nakajima M, Hara S, Ueno M, Sasaki K, Iwase H, Sakamoto T. A case of fatal intoxication due to the new designer drug 25B-NBOMe. *Forensic Toxicol* 査読有 33(2):396-401 (2015) DOI: 10.1007/s11419-015-0276-7
5. Kuroda R, Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K. Immobilization stress with alpha2-adrenergic stimulation induces regional and transient reduction of cardiac contraction through Gi coupling in rats. *Int Heart J* 査読有 56:537-543 (2015) DOI: 10.1536/ihj.15-034
6. Nara A, Nagai H, Shintani-Ishida K, Ogura S, Shimosawa T, Kuwahira I, Shirai M, Yoshida K. Pulmonary Arterial Hypertension in Rats Due to Age-related Arginase Activation in Intermittent Hypoxia. *Am J Res Cell Mol Biol* 査読有 53:184-192 (2015) DOI: 10.1165/rcmb.2014-01630C
7. 新谷香 心筋梗塞進展における小胞体とミトコンドリアのクロストーク. *医学のあゆみ* 査読無 249:177-178 (2014).
8. Nagai H, Maeda H, Kuroda, R, Komori M, Nakajima M, Nara A, Ito-Tsujimura T, Shintani-Ishida K, Yahagi N, Yoshida K. Lethal pulmonary air embolism caused by the removal of a double-lumen hemodialysis catheter. *Am J Forensic Med Pathol* 査読有 35(4):237-238 (2014) DOI: 10.1097/PAF.0b013e318288b1ee
9. Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida K. Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in normal and steatotic human livers. *Hepatol Res* 査読有 44(7):779-787 (2014) DOI: 10.1111/hepr.12183
10. Shintani-Ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K. MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome destabilization in rats. *Biochim Biophys Acta* 査読有 1842(5):691-700 (2014) DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.01.013
11. Kuroda R, Nakajima M, Nagai H, Maeda H, Saka K, Shintani-Ishida K, Igarashi A, Yoshida K. Small focal coagulation necrosis in the myocardium of a young methamphetamine user. *Int J Cardiol* 査読有 164: E4-E5 (2013) DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.145
12. Ishii Y, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Connexin-43 hemichannels contribute to the propagation of

$\mu$ -calpain-mediated neuronal death in a cortical ablation injury model. Biochem Biophys Res Commun 査読有 441(2):457-62 (2013) DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.091

13. Maeda H, Nagai H, Takemura G, Shintani-Ishida K, Komatsu M, Ogura S, Aki T, Shirai M, Kuwahira I, Yoshida K. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. Biochim Biophys Acta 査読有 1832: 1159-1166 (2013) DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.02.014

〔学会発表〕(計7件)

1. 新谷 香, 坂幹樹, 吉田謙一, 池谷博. フェネチルアミン系化合物 25B-NBOMe の死後再分布に関する実験的検討. 日本法中毒学会第35年会 2016年7月1日~2016年7月2日 大阪産業創造館(大阪)
2. 中村磨美, 新谷香, 東條美沙, 井戸田望, 池谷博. 25B-NBOMe により刺激された 5-HT<sub>2A</sub> 受容体は環境温度依存性に高体温を引き起こす. 第100次日本法医学会学術全国集会 2016年6月15日~2016年6月17日 きゅりあん(品川区立総合区民会館)(東京)
3. 坂幹樹, 吉田謙一, 新谷香, 前田秀将, 中嶋信, 原修一, 岩瀬博太郎. 危険ドラッグ 25B-NBOMe 中毒例における血中濃度の経時測定. 第99次日本法医学会学術全国集会 2015年6月10日~2015年6月12日 高知市文化プラザかるぽーと(高知)
4. Kuroda R, Nakajima M, Nagai H, Maeda H, Kashima J, Saka K, Shintani-Ishida K, Yoshida K. Occasional usage of methamphetamine can induce focal myocardial necrosis. 9<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM) 2014年6月16日~2014年6月20日 福岡国際会議場(福岡)
5. 坂幹樹, 新谷香, 山口晃志, 林田眞喜子, 大野曜吉, 吉田謙一. MDMA 及びその活性代謝物(DHMA, DHA)のLC-MS/MSを用いた同時定量分析. 第82回日本法医学会学術関東地方集会 2013年10月19日はまぎんホールヴィアマール(横浜)
6. 黒田亮平, 新谷香, 永井恒志, 前田秀将, 吉田謙一. 2 受容体シグナルとストレスによる心収縮不全の関連. 第97次日本法医学会学術全国集会 2013年6月26日~2013年6月28日 ロイトン札幌(札幌)
7. 前田秀将, 永井恒志, 山口るつ子, 加島淳平, 新谷香, 吉田謙一. Heart failure induced by intermittent hypoxia in rat fed high-fat diet. 第97次日本法医学

会学術全国集会 2013年6月26日~  
2013年6月28日 ロイトン札幌(札幌)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/hoi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新谷 香(石田 香)(SHINTANI-ISHIDA, Kaori)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 50345047

(2)研究分担者

乾 誠(INUI, Makoto)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70223237

(3)連携研究者

なし