

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670387

研究課題名(和文)心筋におけるミトコンドリア融合阻害の病態的意義の解明

研究課題名(英文)The functional role of mitochondria innermembrane fusion inhibitor in heart

研究代表者

中山 博之(Nakayama, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40581062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞においてミトコンドリアは細胞の代謝、エネルギー産生及び細胞死に重要である。ミトコンドリアは、分裂・融合を繰り返し、恒常性を維持している。ミトコンドリア内膜融合阻害因子MIFIの発現を各臓器において検討し、心臓において優位な発現を認め、さらに心病態において発現の低下を認めた。心筋特異的にMIFIを過剰発現させた動物を作製した結果、生理条件下においては、心重量・心エコーによる心機能解析・分子マーカーの変化を認めなかったが、大動脈縮窄により圧負荷を作製し、ストレス応答を検討したところ、心重量の有意な増大と左室駆出率の有意な低下を認め、ストレス応答において障害的に働く事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In cardiomyocytes, mitochondria play central roles in metabolism, energy production and cell death. Mitochondria maintain its homeostasis through continuous fusion and fission process. Mitochondrial inner-membrane fusion inhibitor (MIFI) regulates mitochondrial morphology via inhibiting inner-membrane fusion. Since the expression of MIFI is predominant in heart and decreased after myocardial infarction or pressure overload, we generated transgenic mice with cardiac specific overexpression of MIFI (MIFI-TG) to assess functional roles in cardiac pathophysiology. Overexpression of MIFI were confirmed by enhanced protein expression in heart and transgenic mice were obtained according to Mendelian's law. While no overt cardiac phenotype was observed under physiological condition, MIFI-TG displayed accelerated cardiac hypertrophy and dysfunction, suggesting mitochondrial morphological changes caused by MIFI are detrimental after stress stimulation in heart.

研究分野：循環器内科 基礎

キーワード：心肥大 ミトコンドリア 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は、先進国における死亡原因の第一位を占め、心不全はあらゆる心疾患の終末像である。β遮断薬を初めとする心筋保護薬が臨床で用いられるが発症してからの5年生存率は50%と不良であり、新規の治療薬の開発が望まれる。心筋において、ミトコンドリアは細胞の代謝、エネルギー産生及び細胞死において重要な役割を果たしている。不全心筋においてミトコンドリアの形態異常(断片化・不整)がしばしば観察されるが、その意義は未だに不明な点が多い。ミトコンドリアは、ほとんどの細胞でチューブ状の形態をとり、融合・分裂により動的に形態を変化させる(Cell Death Differ. 10:870)。ミトコンドリアの融合(fusion)と分裂(fission)はその恒常性の維持において必須の現象であると考えられており(Cell. 130:548)、機能が低下したミトコンドリアは、正常なミトコンドリアと融合する事により、機能補填され細胞全体としてはミトコンドリアの機能は均一に保たれている。しかしながら、非可逆的にミトコンドリアが障害されると、そのミトコンドリアは融合・分裂のネットワークから隔離されマイトファジーと呼ばれるミトコンドリアに特異的なオートファジー機構により分解されると考えられている。しかしながら、その一連の過程の分子機構に関しては不明な点が多い。ミトコンドリアの融合・分裂の制御因子として、Mitofusin 1/2 (Mfn1/2) や Optic atrophy 1 (Opa1) などの融合促進因子、Fission protein 1 (Fis1) や Dynamin related protein 1 (Drp1) などの分裂促進因子が、2000年以降相次いで同定されている。Mfn1/2 や Opa1 は神経変性疾患の原因遺伝子であり、ミトコンドリア融合が細胞の正常な機能発現に必須であることが示されている(Physiol Rev. 89:799)。これら新規因子の同定とその分子生物学的研究から、ミトコンドリア形態制御の分子機構が解明されると共に、細胞機能維持における同制御機構の役割について新しい概念が導かれつつある現状である。心筋においてミトコンドリアの断片化と細胞死の関連が報告されているがその役割は不明な点が多い。ヒト心不全において筋線維内のミトコンドリアが不整となり融合促進因子である OPA1 の発現が低下するとする報告もあるが(Cardiovasc Res. 84:91)、動物実験モデルでは OPA1 は変化せず、MFN2 の発現低下や、Fis1 の上昇を認めるとの報告もある(Basic Res Cardiol. 106:99)。一方心筋細胞に融合促進因子である Mfn2 を発現させると、apoptosis が亢進するという報告もあり(J Biol Chem. 282:23354)、ミトコンドリアの融合と分裂の正確な病態的意義は明らかでない。研究分担者新谷らは、腓ラ氏島過形成制御因子の探索の過程で同定した機能未知遺伝子が「ミトコンドリアの融合を内膜レベルで阻害する世界初の因子であることを見出し

Mitochondrial Innermembrane Fusion Inhibitor (MIFI) と名付けた。細胞を用いた解析により、MIFI は過剰発現によりミトコンドリアの断片化を惹起するにもかかわらずミトコンドリア機能低下は起こさず、ノックダウンによりミトコンドリアの機能が障害されるという従来の知見とは極めて異なった細胞の状態をもたらすことが見出された。これはミトコンドリアの内膜融合阻害というこれまでほとんど報告されていない特異な分子機能が、これまで報告されてきた分裂促進と異なるためと考えられた。本研究において研究代表者は、ミトコンドリアの融合阻害の心臓における病態的意義を、MIFI の遺伝子改変モデルの解析により明らかにする事を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究はマウス心筋において遺伝子工学的手法を用いて MIFI の gain-of-function モデルを作成し、マウスの心臓におけるストレス応答を解析する事により、MIFI によるミトコンドリアダイナミクス制御の病態的意義を明らかにする事を目的とする。

## 3. 研究の方法

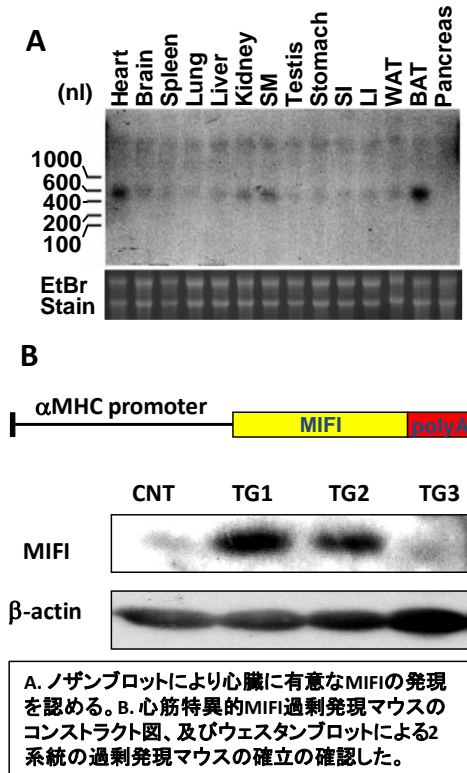
(1) 心筋特異的 MIFI 過剰発現マウスの作製：  
αMHC promoter 下に、MIFI (マウス) 遺伝子の cDNA を挿入し、心筋特異的に MIFI を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製した。同マウスにおいて、MIFI の過剰発現をウェスタンブロット法にて確認した。また、ミトコンドリアダイナミクスに関連する遺伝子の発現と蛋白質の発現の変化を検討した。さらに、電子顕微鏡により MIFI 過剰発現心筋細胞におけるミトコンドリアの形態を観察した。また、オートファジーの活性化の評価をオートファゴソームの形成亢進の有無を評価することにより行った。またオートファジーを、マーカー蛋白質である LC3 のウェスタンブロットにより評価した。過剰発現マウスにおいて、心臓超音波法により心機能の解析を行い、組織切片をもちいたマッソントリクローム染色により線維化を組織学的に検討した。心病態の分子マーカーである心房利尿ホルモン・脳型利尿ホルモン・α型骨格筋アクチンの遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。また、ラット新生仔心筋細胞において、アデノウイルスベクターの作製による MIFI の過剰発現及びノックダウンを可能にする実験系の構築を試みた。

(2) 心筋特異的 MIFI 過剰発現マウスを用いた病態解析：

野生型マウスを用いて、圧負荷心肥大及び心筋梗塞における MIFI の発現変化を RT-PCR 法を用いて検討した。さらに MIFI 発現上昇の圧負荷による心病態に及ぼす影響を心筋特異的 MIFI 過剰発現マウスの圧負荷心肥大モデルを用いて解析した。圧負荷は、大動脈縮

手術により形成した。手術後2週間後において、心臓超音波法を用いた心機能解析・組織重量の計測による形態解析・組織病理学的解析・遺伝子発現解析により MIFI の病態に及ぼす影響を検討した。次に、加齢にともなって生じる心臓における MIFI の意義を、24 から 28 月齢の雄性マウスを用いて検討した。これらの加齢マウスにおいて心機能解析・組織解析・老化マーカーの検討及び活性酸素種

図1. 心筋特異的MIFI過剰発現マウスの作製



による脂質過酸化の評価により表現型解析を施行した。

#### 4. 研究成果

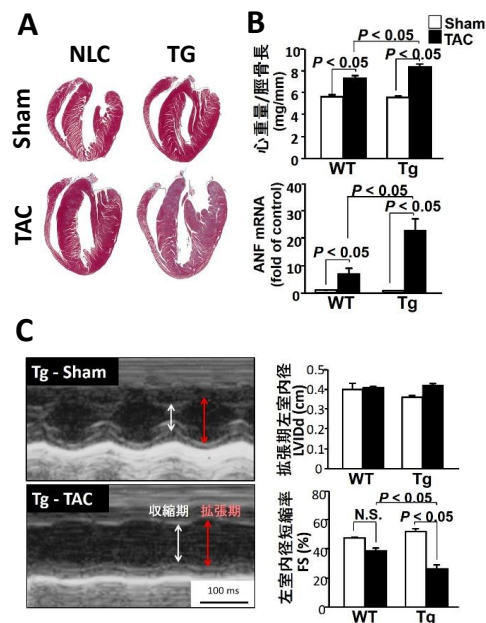
##### (1) 心筋特異的 MIFI 過剰発現マウスの作製:

各組織における MIFI の発現を組織より検討した。その結果、心臓と褐色脂肪組織に高い発現を認めた (図 1A)。心筋細胞における MIFI 発現の病態的意義を解明するために、αMHC promoter 下に、MIFI (マウス) 遺伝子の cDNA を挿入し、心筋特異的に MIFI を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製した。3つの独立した系統を確立し、ウェスタンブロットにより発現の解析を施行し、2つの系統において著明な蛋白質発現の上昇を認めた (図 1B)。今後、これらの系統を用いて解析を進めることとした。2系統ともに、メンデルの法則に従って遺伝子改変マウスが得られ、胎生から新生仔期にかけての MIFI の心筋における発現上昇は、有意な心障害をもたらさない事が示唆された。いずれの系統においても、8週齢においては、心臓超音波法による心機能解析において有意な心機能低下を示さず、心重量の上昇や心房利尿ペプチドの上昇も認め

られなかった。また、電子顕微鏡による微細構造解析において、オートファゴソームの増加や、ミトコンドリアの形態変化も観察されなかった。以上の結果より、MIFI の過剰発現は生理条件下において、心臓を惹起しないと考えられた。

一方、心筋における MIFI の過剰発現を目的にアデノウイルスベクターの作製を試みたが、不成功に終わった。これは組換えウイルスベクターを作製する際の HEK 細胞において過剰な MIFI の発現が増殖に障害をもたらす可能性が考えられた。今後、テトラサイクリン制御システムを用いたアデノウイルスベクターの作製を計画している。

図2. MIFI過剰発現は圧負荷後心肥大を増悪



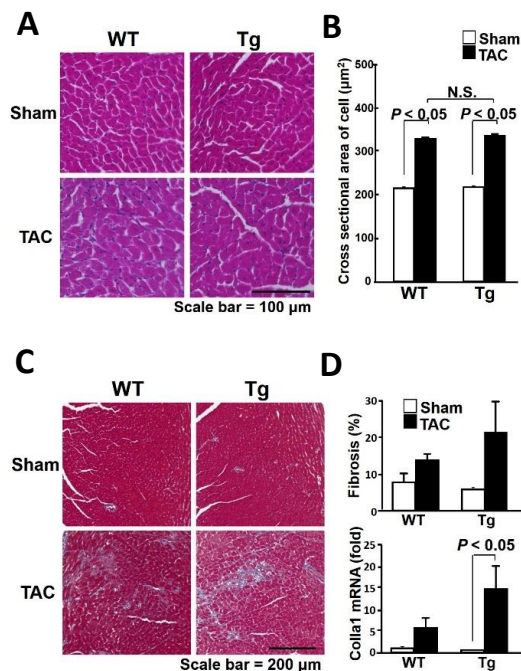
A. 圧負荷 (TAC) 及び Sham 手術後のコントロール (WT) と MIFI 過剰発現マウス (TG) の心室組織像。B. 心重量/脛骨長比と ANF の遺伝子発現。C. 心臓超音波法による心機能解析。

##### (2) 心筋特異的 MIFI 過剰発現マウスを用いた病態解析:

心臓における MIFI の意義を明らかにすることを目的に、圧負荷心肥大モデル及び心筋梗塞モデルにおいて MIFI の遺伝子発現変化を検討した。その結果、双方のモデルにおいて MIFI の発現低下を認めた。かかる上昇の心臓ストレス応答における意義を明らかにすることを目的に、MIFI 過剰発現マウス及び non-transgenic littermate をコントロールとしたマウス (WT) に大動脈縮窄術を施し、2週間後に解析を行った。その結果、心肥大の指標である心重量/脛骨長比は、MIFI 過剰発現マウスにおいて圧負荷後に有意に上昇し (図 2 A, B)、心肥大の増悪が示唆された。また心臓超音波法による心機能解析においてコントロール群と比較して有意な心機能低下の増悪を認めた (図 2 C)。心室内腔も拡大の傾向を過剰発現群において認めた。

さらに、組織学的解析を施行した。心筋細胞の肥大を、ヘマトキシリン・エオジン染色像における cross sectional area で評価した。圧負荷後の、細胞面積はいずれの群においても、sham 群と比較して有意な増加を認めしたが、その程度はコントロール群と過剰発現マウス群の間で、有意な差を認めなかった (図 3A, B)。マッソントリクローム染色による組織学的解析により、過剰発現マウスにおいて、圧負荷後に線維化領域の有意な拡大が観察された (図 3C, D)。この結果と一致して、MIFI 過剰発現マウスにおいて、線維化のマーカー遺伝子である collagen I の発現の有意な上昇が観察された。以上の如く MIFI 過剰発現により、圧負荷後の心臓の悪化が認められた。すなわち、ストレス応答時の MIFI の発現の低下は、生体心の適応反応の一部である可能性が示唆された。かかる病態において、ミトコンドリアの融合と分裂に関する遺伝子の発現変化について検討した。ミトコンドリアの fission に関する事が報告されている Drpl と Fis1 の発現は、圧負荷 2 週間後に低下したが、その程度は過剰発現マウスと NLC との間で有意な差を認めなかった。さらに、fusion に関与するとされている Opal や Mitofusin の遺伝子発現も同様に圧負荷後に低下し、ミトコンドリアのダイナミクスが、圧負荷心においては、減弱している可能性が

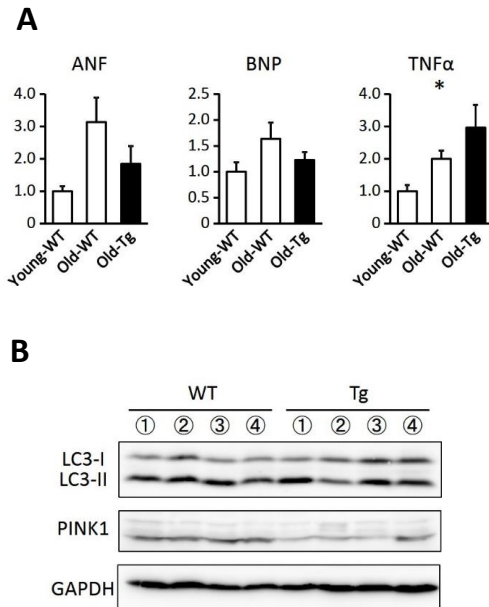
図3. 心筋MIFI-TGの圧負荷における表現型



A. 圧負荷 (TAC)2週間後の、コントロール (WT) 及び過剰発現マウス (Tg) の心筋におけるヘマトキシリン・エオジン染色 (左) 及び細胞面積 (cross sectional area)。B. マッソントリクローム染色による線維化像 (左) と、線維化の面積の評価 (右上段) 及び collagen a1 の遺伝子発現。

示唆されたが、その程度は、MIFI 過剰発現マウスとコントロール群との間に差を認めなかった。一方、ミトコンドリアの主要な転写因子である PGC-1 $\alpha$  の発現は、圧負荷後に過剰発現マウスにおいて、有意な減少を認めしたが、コントロール群との間で有意差を認めなかった。

図4. 心筋MIFI-TGの加齢に伴う表現型



A. 加齢マウスにおける ANF、BNP 及び TNF $\alpha$  の遺伝子発現の変化。Tg において TNF $\alpha$  の発現の上昇を認めた。B. 24-28 月齢の過剰発現マウスの心筋より抽出したタンパク質を用いて LC3 と PINK1 のウェスタンブロットを施行した。PINK1 の発現の低下傾向を認める。

オートファジーをマウスにおいて心筋特異的に欠失させると加齢に伴い、心機能の低下が惹起される事が報告されている (J Biol Chem. 286:32170)。今回、MIFI の心筋特異的過剰発現マウスにおいて、加齢の及ぼす影響を検討した。検討には、24 から 28 月齢の雄性マウスを使用した。24 月齢までの各遺伝子型の生存率は、過剰発現マウスにおいて低い傾向を認めた (87.5% vs 60%)。心臓超音波法を用いた検討において、NLC と比較して、過剰発現マウスは心収縮能と拡張期左室末期径の有意な差を認めなかった。また心肥大の分子マーカーである心房利尿ペプチドや脳型利尿ペプチドの発現において、コントロール群と比較して有意差を認めなかった。加齢マウスにおいて、炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  の有意な上昇を、過剰発現マウスにおいてのみ認めた (図 4A)。他方、IL-1 $\beta$  の発現は、両群の加齢マウスにおいて有意に低下した。

オートファジーの指標とされる LC3-II のタンパク質発現を、両グループの加齢マウスの心筋より調整したサンプルを用いてウェスタンブロットにより評価した。LC3-II の量は、

コントロール群に比較して、過剰発現マウスにおいて増加する傾向を認めた。さらに、ミトコンドリアのオートファジーに関与する事が報告されているPINK1のタンパク質の発現が低下している事が示された(図4B)。しかしながら、加齢心における線維化の程度は、過剰発現マウスとコントロール群において、差を認めなかった。以上の結果より、MIFI過剰発現により、加齢心はミトコンドリアのオートファジーが低下すると共に、軽度の炎症志向性が認められたが、心機能に影響を与えるほどの強い炎症は惹起されていないと考えられた。

#### 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 5 件)

1. Kumagai S, Matsui K, Kawaguchi H, Yamashita T, Mohri T, Fujio Y, Nakayama H\*. (2013) Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling *Biochem Biophys Res Commun.* 437(4):609-14. 査読あり
2. Oyabu J, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Murakawa T, Yasui H, Ueda H, Nakayama H, Taneike M, Omiya S, Shah AM, Nishida K, Otsu K. (2013) Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading. *Biochem Biophys Res Commun.* 441(4):787-92. 査読あり
3. Morimoto S, Hongo K, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, O-Uchi J, Nakayama H, Asahi M, Otsu K, Yoshimura M, Kurihara S. (2014) Genetic modulation of the SERCA activity does not affect the Ca<sup>2+</sup> leak from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 55(1):17-23. 査読あり
4. Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Copen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S,

Nakayama H, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K. (2014) Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. *EMBO Rep.* 15(4):438-45. 査読あり

5. Matsuo R, Morihara H, Mohri T, Murasawa S, Takewaki K, Nakayama H, Maeda M, Fujio Y. (2014) The Inhibition of N-Glycosylation of Glycoprotein 130 Molecule Abolishes STAT3 Activation by IL-6 Family Cytokines in Cultured Cardiac Myocytes. *PLoS One.* 23;9(10): e111097. 査読あり
6. Nakayama H, Otsu K. (2013) Translation of hemodynamic stress to sterile inflammation in the heart. *Trends Endocrinol Metab.* 24(11):546-53. 査読あり
7. Higashi S, Katagi K, Shintani N, Ikeda K, Sugimoto Y, Tsuchiya S, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T, Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A, Hashimoto H. (2015) p13 overexpression in pancreatic  $\beta$ -cells ameliorates type 2 diabetes in high-fat-fed mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 461(4):612-7. 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① 田中翔大、新谷紀人、中山博之他、ミトコンドリア融合阻害因子 MIFI による心臓病態増悪機序に関する解析—遺伝子発現プロファイル解析、第 125 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 6 月 20 日、岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 件)

なし

○取得状況（計 件）

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA HIROYUKI)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40581062

### (2) 研究分担者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10335367