

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713031

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNA蓄積と炎症の観点からの心不全治療開発

研究課題名(英文) Exploration for novel therapeutic target of inflammation and heart failure induced by accumulation of mtDNA

研究代表者

岡 崇史 (Oka, Takafumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30647285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイトファジーと呼ばれるオートファジー性ミトコンドリア分解に着目し、心不全の新たな治療戦略を旨とした基礎医学的検討を行った。

マイトファジーを介したミトコンドリアDNAの分解不全による蓄積が炎症と心不全を惹起するというこれまでの成果を展開し、哺乳類細胞におけるミトコンドリア分解についての全く新しい分子機構を解明した。本研究で同定したミトコンドリア外膜蛋白質BCL2L13は、ミトコンドリア分裂ならびにマイトファジーを誘導することを明らかにした。さらにBCL2L13は、酵母のマイトファジー必須分子であるAtg32の哺乳類細胞における機能的ホモログであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the accumulation of mitochondrial DNA in cardiomyocytes can induce inflammatory response and heart failure. Mitochondria are usually degraded through mitochondria-specific autophagy, mitophagy. In yeast, Atg32 was found to be an essential molecule during mitophagy, however, no functional homologue for Atg32 in mammalian cells had been identified. In this research we investigated a novel molecular mechanism involved in the mitophagy in mammalian cells, and found BCL2L13 as a functional homologue of Atg32. BCL2L13 induced mitochondrial fragmentation and played an important role as a mitophagic receptor on outer mitochondrial membrane.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア 炎症 心不全

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であり先進国における主要な死亡原因の一つである。ヒトの心不全において、炎症性サイトカインの血中濃度が心不全の重症度や予後と強い相関を有すること (J Cardiac Failure 1996, Circulation 2001)、また拡張型心筋症や虚血性心筋症において炎症細胞の浸潤を認めること (Circulation 1995, Circulation 2003) が報告されており、心不全においても炎症が重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら不全心において炎症を惹起する病原微生物が検出される症例は稀であり (N Engl J Med 2000)、不全心において無菌的に生じる炎症の原因は不明であった。

そこで私たちは不全心における炎症原性物質として、細菌由来の細胞内共生体であるミトコンドリア DNA に着目した。ミトコンドリアは独自の遺伝子としてミトコンドリア DNA (mtDNA) を内包し、mtDNA は細菌と同じく非メチル化 CpG モチーフを有する。非メチル化 CpG モチーフ DNA は、自然免疫に関与する Toll-like receptor 9 (TLR9) を介して炎症を惹起する (Nature 2000)。ミトコンドリアは種々のストレスにより傷害を受けると、オートファジーを介してリソソームで分解される。Deoxyribonuclease 2 (DNaseII) はリソソームに存在する DNA 分解酵素である。(Nature 2006) そこで mtDNA 蓄積が心不全における炎症の一因であるとの仮説を立て、不全心の炎症反応におけるミトコンドリア分解異常の関与を検討した。

私たちは横行大動脈縮窄術 (TAC) によるマウス圧負荷心不全モデルを作製した。野生型マウスでは圧負荷後不全心において、炎症細胞の浸潤とオートリソソーム内の DNA 蓄積を確認した。次に心筋細胞特異的 DNaseII 欠損マウス (KO) を作出した。KO は対照群と比し、TAC 後に心機能低下と心不全を呈して早期に死亡した。TAC 後の KO マウス心は対照群と比し、術後早期から強い炎症所見を呈し、オートリソソーム内に mtDNA の蓄積を認めた。TAC 後の KO マウスに TLR9 抑制 oligodeoxynucleotides (ODN) を投与することにより KO マウスの心不全の表現型が救済された。つまり KO マウスの心不全発症の分子機構にはオートファジー性分解を免れた mtDNA が TLR9 経路を介して炎症を惹起することが関与していることが示された。さらに TLR9 単独欠損マウスでは、野生型マウスと比し圧負荷後心不全発症が抑制された。また TLR9 抑制 ODN の投与により野生型マウス圧負荷手術後の生命予後が改善したことから、野生型マウスの圧負荷後心不全発症に TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。(T Oka et al. Nature 2012) 以上より、ストレス下においては心筋細胞内にミトコンドリア DNA の蓄積が生じ、TLR9 経路の

活性化を介して炎症が惹起され不全心の増悪が進行する可能性が示される。またヒトにおける心不全にも同様の機構が関与していることが考えられるため、この経路の障害が心不全治療につながる可能性がある。

ミトコンドリアは外的ストレスによって傷害を受けた結果、活性酸素種等を細胞質へ漏出し細胞傷害を与えると考えられている。細胞生存のため、傷害を受けたミトコンドリアは選択的オートファジーであるマイトファジーによって除去される必要がある。マイトファジーの機能異常は種々の変性疾患の原因となりうる。これまでに、酵母において Autophagy-related 32 (Atg32) がマイトファジーに必須のミトコンドリア外膜上に存在するレセプター分子として同定されており、哺乳動物細胞においては Parkin が関与する神経細胞のマイトファジーが詳しく研究されている。しかしながら、Parkin を発現しない他の多くの細胞や臓器でもマイトファジーが誘導されることから、他のマイトファジー分子機構の存在が示唆されてきた。これまで Atg32 の哺乳動物細胞における機能的ホモログは報告されておらず、Atg32 の哺乳動物細胞ホモログ同定ならびに機能解析は、ミトコンドリア DNA の蓄積や炎症反応に関与する分子機構の解析に必須である。

2. 研究の目的

(1) ヒト不全心における DNA の蓄積の検討

ヒト不全心サンプルを用いた解析にて DNaseII 蛋白質発現量が低下しているものが一部に認められる。また特発性拡張型心筋症と診断された症例の剖検心切片を用いた DNA、リソソームの同時染色において両陽性シグナルを認めた。そこで、まず DNA 蓄積がヒト不全心において一般的に観察されるかを、症例数を増やして検討する。さらに DNA 蓄積の程度と心不全の病型、炎症の程度 (組織学的、生化学的)、重症度、予後の関連を検討する。

(2) DNA 蓄積の解消による心不全治療の検討

マウス圧負荷後不全心の検討において、不全心に DNA 蓄積に DNaseII の活性低下が伴う (T Oka et al. Nature 2012)。そこで、DNaseII 活性低下が心不全発症および進展に及ぼす影響について検討する。マウスにおいて、DNaseII を心筋細胞特異的に過剰発現することにより、DNA 蓄積の抑制効果、ひいては心筋保護効果が得られるかについて、心不全病態モデルを用いた系で明らかにする。

またミトコンドリア分解分子機構として、心筋細胞内のミトコンドリア処理に関わる未知の mitophagy 受容体分子の検索同定し、同分子の機能解析を実施する。

3. 研究の方法

本研究は遺伝子組換え実験を含んでいるが、大阪大学遺伝子組換え実験安全管理規定にもとづき実施した。また、動物実験については、大阪大学動物実験規定に基づき実施した。本研究計画については、大阪大学遺伝子組み換え実験安全委員会、大阪大学大学院医学系研究科動物実験委員会による承認を受けた。また臨床検体を用いた研究を含むため当大学附属病院における倫理委員会における承認を得て行った。

(1) ヒト不全心における DNA の蓄積の検討

過去に心臓カテーテル検査における心筋生検を受けた症例を対象とした検討を行った。心筋生検は心機能低下や不整脈の原因精査目的で行われており、特異的な疾患群を対象にしておらず、既存資料を用いた検討を実施した。心機能低下の原因として何らかの炎症細胞浸潤や、心筋細胞内の核酸蓄積が関与しているか否かを病理学的に検討した。既存の心筋生検パラフィン包埋サンプルを薄切片し、高感度 DNA 染色剤である Picogreen にて染色する。同時にリソソームマーカーである Lamp2a もしくはオートファゴソームマーカーである LC3 にて共染色を行う。観察は蛍光顕微鏡にて実施し、共染色されるドット数を細胞面積もしくは細胞当たりの数値として評価した。

(2) DNA 蓄積の解消による心不全治療の検討

心筋特異的 DNaseII 過剰発現マウスによる心不全病態救済効果の検討

DNaseII の C 末端に HA tag を付加した融合タンパク質を心筋細胞特異的な α ミオシン重鎖プロモーター依存性に発現するコンストラクトを作成し、心筋細胞特異的 DNaseII 発現トランスジェニックマウスを作製した。得られたトランスジェニックマウスに横行大動脈縮窄圧負荷手術 (TAC) を行い、4 週間後の心不全発症機における心機能 (心臓超音波法) DNA の蓄積、炎症所見を評価した。TAC 手術には 10 週齢前後の雄性マウス (25g) を用いて、麻酔下に気管内挿管による人工呼吸器装着し、26G 針ならびに 7-0 絹糸による横行大動脈圧負荷を作成した。

新規マイトファジー関連蛋白質の同定ならびに機能解析

ミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジー関連蛋白質の検索を実施した。哺乳動物細胞におけるマイトファジーレセプターが Atg32 と共通の分子的特徴 (ミトコンドリアへの局在、WXXL/I (LC3-interacting region (LIR)) を有する、1 回膜貫通蛋白、酸性アミノ酸のクラスター配列を有する) を有していると仮定し、in silico における網羅的解析ならびに酵母 two-hybrid 法による検索を行った。

同定した分子の機能解析として、HEK293

細胞において過剰発現もしくはノックダウンすることで、同分子の有する機能を評価した。さらに、さまざまな mutant を作成し、それらの表現型を解析することで、他分子との結合や活性に関する評価を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト不全心における DNA の蓄積の検討

高感度 DNA 染色剤である PicoGreen を用いた心筋細胞内核酸の評価を行った。同時に Lysosome を Lamp2a にて染色し、オートリソソーム内の核酸蓄積の評価を行った。今回評価した症例を心機能低下群と心機能保持群の 2 群に分類し、比較検討を行った。その結果、心機能保持群と比し、心機能低下群において有意にリソソーム内において DNA 蓄積が認められた (60%)。DNA がミトコンドリア由来の DNA であるか否かについての評価は本検討では不能であるが、心不全の発症進展機構において、ヒトにおいてもマウス実験で得られた結果と同様に、心筋細胞内の核酸蓄積が関与している症例が少なからず存在すると考えられる。左室駆出率 (LVEF) とミトコンドリア DNA 蓄積の有無は有意な相関が認められたが (相関比=0.34)、他の臨床パラメーターとの有意な相関は認められなかった (NYHA 分類、左室拡張末期径、左室収縮末期径、脳性利尿ペプチド)。これら DNA 蓄積が認められた症例における、炎症性反応については未検討であり、炎症性細胞の心筋浸潤および炎症性サイトカイン発現量などの炎症反応について、今後検討を加えていくことが必要であると考えられる。

(2) DNA 蓄積の解消による心不全治療の検討

心筋特異的 DNaseII 過剰発現マウスによる心不全病態救済効果の検討

DNase II を分子標的とした心不全に対する治療効果の基礎的検討を行うため、心筋特異的 DNase II 過剰発現マウスのコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウス作出に成功した。トランスジェニックマウス心において DNase II-HA の蛋白質発現量の上昇、および SRED アッセイを用いて酸性条件下での心臓 DNase II 活性の上昇が確認された。本マウスの定常状態における生理学的表現型を心臓超音波法にて評価したところ、定常状態における左室機能に特記すべき異常や構造的異常は認められなかった。そこで、横行大動脈縮窄手術による圧負荷心不全病態モデルの慢性期表現型を評価した。本マウスが術後 4 週間後の心負荷代償期に、Dnase II 発現を維持される事で心不全発現を救済しうるか否かについての評価を行った。その結果、TAC4 週後に対照群マウスでは有意な左室機能低下を呈したのに比し、トランスジェニックマウスでは左室機能低下ならびに圧負荷心不全の出現が抑制されることが示さ

れた。

すなわち心不全病態の出現過程において、心筋細胞のリソソーム内に蓄積する DNA は、心不全の原因の一つであり、本機構に介入することで、心不全病態が有意に抑制されることが明らかとなった。この結果は、ヒトにおいて認められた心筋細胞リソソーム内 DNA 蓄積に対しても分解を促進する介入を行うことで、心筋細胞炎症反応などの心機能低下要素が排除され、心不全発症進展を抑制しうる可能性を強く支持するデータと考えられた。さらに、本遺伝子改変マウスに加えて、薬剤誘導性かつ心筋特異的 DNase II 過剰発現マウスの系を新たに作出した。心筋細胞特異的 MER (mutant estrogen receptor) -Cre-MER 発現トランスジェニックマウスと交配を行い、double transgenic マウスを樹立し、継続検討を行うことにより、発症後の心不全に対する治療効果の検討が可能となり、今後の研究進展の一助となることが期待される。

新規マイトファジー関連蛋白質の同定ならびに機能解析

哺乳動物細胞におけるマイトファジーレセプターが酵母 Atg32 と共通の分子的特徴 (ミトコンドリアへの局在、WXXLI (LC3-interacting region (LIR)) を有する、1 回膜貫通蛋白質、酸性アミノ酸のクラスター配列を有する) を有しているとの仮定に基づき、in silico ならびに yeast two hybrid 法における網羅的解析を実施した。その結果、Bcl2 関連蛋白質の一つである Bcl2 like protein 13 (Bcl2-L-13) を新規マイトファジー候補分子として同定した。HEK293 細胞における Bcl2-L-13 過剰発現により、ミトコンドリア分裂とマイトファジーが誘導された。Bcl2-L-13 によるミトコンドリア分裂誘導には、Bcl2-L-13 の 4 か所の Bcl-2 homology domain (BH ドメイン) が必須であった。BH ドメインに変異を加えた Bcl2-L-13 はいずれも、ミトコンドリアの分裂誘導能が失われた。また、Bcl2-L-13 は LIR を介してオートファジーの中心実行分子である Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) と結合しており、マイトファジー誘導には LIR が寄与していた。LIR 変異体はミトコンドリア分裂誘導能を有していたものの、mitophagy 活性は完全に消失した。既知のミトコンドリア分裂必須分子である Dynamin-related protein 1 (Drp1) を RNAi による発現抑制した条件下においても、Bcl2-L-13 によるミトコンドリア分裂能は保持された。また、これまで神経細胞を含めた哺乳類細胞で多数報告されているマイトファジー因子である Parkin 非発現細胞においても、Bcl2-L-13 はマイトファジーを誘導した。すなわち、既知のミトコンドリア分裂やマイトファジー関連因子とは異なった経路で、ミトコンドリア分裂およびマイトファジーを誘導するものと考えられた。

さらにマイトファジー誘導刺激である Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) 添加により Bcl2-L-13 の蛋白質発現量は増加し、siRNA による Bcl2-L-13 の発現抑制により CCCP 誘導性のミトコンドリア分裂及びマイトファジーは抑制された。すなわち Bcl2-L-13 によるミトコンドリア分裂とマイトファジーは、生理的意義を有していると考えられる。心筋細胞においても CCCP によってマイトファジーが誘導されることから、心筋細胞におけるマイトファジーならびに最終的なミトコンドリア DNA の分解に至る経路に Bcl2-L-13 が関与していることを示唆する結果である。さらに、Bcl2-L-13 に存在する LIR 近傍のセリン残基変異体では、ミトコンドリア分裂及びマイトファジーの誘導が抑制された。すなわち Bcl2-L-13 はリン酸化酵素による制御を受けていることが示唆された。以上の結果より Bcl2-L-13 タンパク質発現量の増加及びリン酸化が、Bcl2-L-13 の活性化機構であることが示唆された。さらに、Atg32 欠損酵母株においても Bcl2-L-13 によってマイトファジー活性が回復することが明らかとなり、Bcl2-L-13 がこれまで発見されていなかった Atg32 の機能的ホモログであることが示された。

また、心筋細胞においても、Bcl2-L-13 を過剰発現させることでミトコンドリアの分裂が誘導され、逆にノックダウンによりミトコンドリアの伸長が観察された。すなわち心筋細胞においても Bcl2-L-13 はミトコンドリアダイナミクスに影響を与えていることが示された。これらの知見から、本分子が心筋細胞においてもミトコンドリア分解ならびにミトコンドリア DNA 分解を介した炎症機転に重大な機能を果たしている可能性が示唆され、今後の心不全治療介入に向けた分子標的となることが期待される。

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 1 件)

Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K.

Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation.

Nature Communications

査読有り

6 巻、2015 年、7527 頁

doi: 10.1038/ncomms8527

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科 HP
<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡 崇史 (TAKAFUMI, Oka)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号：30647285

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし