

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461122

研究課題名(和文) 老化とミトコンドリア機能異常におけるHMGB1の役割

研究課題名(英文) The role of HMGB1 in regulating mitochondrial dysfunction induced by aging

研究代表者

久保田 功 (KUBOTA, Isao)

山形大学・学内共同利用施設等・理事

研究者番号：30161673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：経皮的冠動脈形成術などによる再灌流は、急性心筋梗塞患者へのもっとも有効な治療法である。しかしながら、高齢化や代謝異常症の存在は心筋梗塞後の予後に関連することが知られるが詳細な機序には明らかとなっていないことも多い。本研究では加齢や代謝異常症によりSMP30の発現が低下すること、SMP30が低下することにより虚血再灌流傷害が増加していること、SMP30を保持することで再灌流傷害が低減することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is well documented that reperfusion by PCI is the most effective therapy for acute myocardial infarction. Although several factors including aging and metabolic disorders is known to be associated with their prognosis, precise mechanism has not been clearly determined. We found that aging and metabolic disorder lowered expression levels of SMP30, and ischemia/reperfusion injury was worsened at the result of decreased expression of SMP30. Moreover pre-savation of SMP30 expression attenuated ischemia/reperfusion injury.

研究分野：循環器内科

キーワード：糖尿病 脂質異常症 老化

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化に伴い緩徐進行性で無症候性の心不全患者が増加しており、感染などの軽微な負荷によって症候性かつ治療抵抗性の心不全へと進展することから、心臓老化の進展機序の解明と新規治療法の開発が急務である。ミトコンドリア機能障害は、細胞変性や apoptosis を伴い、Huntington 病やパーキンソン病の進行 (J. Clin. Invest 2009, J Cell Sci. 2010) と関連がある。同様に、異常ミトコンドリアの増加やミトコンドリアの機能低下が、加齢に伴う心不全の進展に関連があると想定されている。(Circ Res 2012, Nat Med 2007)。

Senescence marker protein 30 (SMP30) は、加齢によって発現が低下し、ミトコンドリア機能異常と酸化ストレスの増加をきたし、細胞老化に関与する蛋白である。心臓老化と心機能障害における SMP30 の意義が不明であったが、我々は SMP30-ノックアウト (SMP30-KO) マウスと SMP30 心臓特異的過剰発現 (SMP30-TG) マウスを用いて検討を行い、SMP30 低下によって心機能の低下、心筋アポトーシス、心臓老化を促すことを報告した (Cardiovasc Res. 2013, PLoS One 2013, Biochem Biophys Res Commun. 2013)。

ミトコンドリア機能障害は、細胞変性や apoptosis を伴い、Huntington 病やパーキンソン病の進行 (J. Clin. Invest 2009, J Cell Sci. 2010) と関連がある。同様に、異常ミトコンドリアの増加やミトコンドリアの機能低下が、加齢に伴う心不全の進展に関連があると想定されている。(Circ Res 2012, Nat Med 2007)。ミトコンドリア機能不全や異常ミトコンドリア蓄積回避システムとして、PPAR や PPAR gamma coactivator 1-alfa を介したミトコンドリア遺伝子発現 (PNAS 2009)、Heat Shock Protein (HSP) を介した異常ミトコンドリア増加の抑制 (Biol Pharm Bull. 2013, Nature Med 2006) Parkin や Beclin 1 を介した異常ミトコンドリアの細胞内消化システム (mitophagy) などが存在する。加齢に伴う酸化 DNA 障害の蓄積によってこれらの防御機構が障害を受け、細胞の老化や機能障害が生じると考えられている。

非ヒストン核蛋白はヒストンや DNA に結合し、クロマチン構造を調節する (EMBO J. 2003) ことが知られている。その機序としては、mRNA 合成調節のみでなく様々な刺激によって傷害された DNA の塩基除去修復作用や転写因子活性の調節作用を持っていることが明らかとなってきている。我々は、ある非ヒストン核タンパクが心筋保護作用を有すること (Cardiovasc Res. 2008)、大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷モデルにおいて心筋の DNA 傷害がその蛋白によって優位に抑制されていること、酸化ストレスによって心筋細胞内の核タンパクが減少すると心筋細胞は胎児型遺伝子を発現し心筋機能障害をきた

すこと、DNA 傷害が抑制されることで、健全なミトコンドリアが保たれ、心筋アポトーシスと心機能障害が抑制されることを見出した (J Mol Cell Cardiol. 2015)。

SMP30 の低下によるミトコンドリア機能障害のメカニズムは明らかとなっていないものの、SMP30 が細胞内 Ca 濃度調節機構を持ち、SMP30 の低下によって細胞内 Ca が上昇をきたすことが報告されている。一方で、細胞質の HMGB1 は beclin 1 と結合し mitophagy と anti-apoptosis に作用も報告されているが、細胞内 Ca²⁺ 増加、活性酸素種などの刺激により核内タンパクがアセチル化を受け、局在変化や機能的抑制が起こる。

これらことから、加齢心臓では、SMP30 の低下により核内タンパク機能が抑制され、心筋保護作用が減弱している可能性がある。予備実験として、酸化 DNA 障害と心筋アポトーシスを呈するドキシソルピシン心筋症マウスを作成し、ミトコンドリア機能や心筋アポトーシスに与える効果に関して検討を行った。ドキシソルピシン心筋症では SMP30 発現の低下を認めた。また、心筋細胞ミトコンドリア膜電位差の低下 (ミトコンドリアの機能的異常) 異常ミトコンドリアの増加、腫大と変性 (形態的異常) が核内タンパクの正常化によって抑制されていることを確認した。

しかしながら、SMP30 減少による老化進行に関して、詳細な機序は明らかにならず、また、メタボリック症候群のような病態と加齢性の心機能低下に関する共通の機序はまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、加齢指標タンパクである Senescence marker protein 30 (SMP30) の役割を明らかにし、老化、代謝異常症に伴う心機能低下の進展メカニズムを解明することを目的としている。そのために、加齢による心筋細胞の機能障害を代謝異常症による機能障害の関連性を明らかにすること、様々な刺激に伴う DNA 傷害の出現に与える SMP30 の意義を明らかにし、新規の治療法を確立することを目的としている。心臓老化の進展抑制機構を解明することである。

3. 研究の方法

SMP30 ノックアウトマウス、心臓特異的 SMP30 過剰発現マウスに対しては、糖尿病、脂質異常症モデル、虚血再灌流モデルを作成する。

おのおの野生型マウスとの比較を、組織学的差異、生理学的差異、細胞内シグナルの変化、胎児型遺伝子発現の検討を行う。

4. 研究成果

様々な刺激による SMP30 の発現の変化の検討を行った。予想に反して、ストレブ

トゾトシンを用いた Type I DM モデルでは、心臓内の SMP 30 の発現は減少を認めなかったものの、組織学的にも想定に反する結果であったため、STZの影響によると考えられた。

続いて、SMP 30 過剰発現による心筋保護作用の検討を行った。野生型マウスと、SMP 30 ノックアウトマウスに左前下行枝 ligation によって 30 分虚血を行なったのちに、ligation を解除して再灌流モデルを作成し、心機能に関して検討を行った。左前下行枝結紮による虚血領域の大きさをエバンスブルー染色によって測定したが、両群に差がなかった。心筋梗塞サイズは、TTC 染色を用いて行った。SMP 30 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて虚血再灌流後の心筋梗塞サイズが有意に大きかった。虚血再灌流により、血中の CK 濃度は、虚血再灌流後に上昇していた。シャム手術では、野生型マウスと SMP 30 ノックアウトマウスに血中 CK 濃度に差を認めなかった。しかし、虚血再灌流後、血中 CK 濃度は野生型マウスに比べ SMP 30 ノックアウトマウスで有意に高値であった。このことから、SMP 30 ノックアウトでは、虚血再灌流による心筋傷害が亢進していることが明らかとなった。そこで、心機能を超音波心臓図で検討を行った。予想通り、SMP 30 ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ虚血再灌流後左室駆出率が有意に低下していた。

これらのことから、虚血時の心機能低下が加齢によって増悪する機序として、SMP 30 の発現の低下が関与していることが明らかとなり引き続きメカニズムの解明が元得られると考えた。

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 32 件) **すべて査読有**

1. Honda Y, Shishido T(17 人中 8 番目), Kubota I(17 人中 17 番目): Gender differences in the impact of anemia on subclinical myocardial damage and cardiovascular mortality in the general population: The Yamagata (Takahata) study. *Int J Cardiol.* 2018;252: 207-212
DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.11.019
2. Honda Y, Shishido T(12 人中 7 番目), Kubota I(12 人中 12 番目): Presence of Myocardial Damage Predicts Future Development of Hypertension in a Normotensive Japanese General Population: The Yamagata (Takahata) Study. *Am J Hypertens.*2018;1-8
DOI: 10.1093/ajh/hpy008
3. Yokoyama M, Shishido T(17 人中 13 番目), Kubota I(17 人中 17 番目): Impact of Objective Malnutrition Status on the Clinical Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease Following Endovascular Therapy. *Circ J.*2018;82 (3) 847-856
DOI: 10.1253/circj.CJ-17-0731
4. Kadowaki S, Shishido T(10 人中 8 番目), Kubota I(10 人中 10 番目): The clinical and pathological . *World Journal of Cardiology .* 2017 ; 9 (5): 457-465
5. Honda Y, Shishido T(22 人中 13 番目), Kubota I(22 人中 22 番目): Impact of restrictive lung disorder on cardiovascular mortality in a general population: The Yamagata (Takahata) study. *Int J Cardiol.* 2017;241:395-400
DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.04.049
6. Watanabe T, Shishido T(17 人中 14 番目), Kubota I(17 人中 17 番目): A randomized controlled trial of eicosapentaenoic acid in patients with coronary heart disease on statins. *J Cardiol.* 2017;70(6): 537-544
DOI: 10.1016/j.jjcc.2017.07.007
7. Takahashi T, Watanabe T, Shishido T, Watanabe K, Sugai T, Toshima T, Kinoshita D, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Yamanaka T, Miyamoto T, Kubota I: The impact of non-alcoholic fatty liver disease fibrosis score on cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels.* 2017 DOI: 10.1007/s00380-017-1113-1
8. Iwayama T, Shishido T(15 人中 11 番目), Kubota I(15 人中 15 番目): The clinical value of nongated dual-source computed tomography in atrial fibrillation catheter ablation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2016;27(1)34-40 DOI: 10.1111/jce.12826
9. Otaki Y, Shishido T(16 人中 12 番目), Kubota I(16 人中 16 番目): HECT-Type Ubiquitin E3 Ligase ITCH Interacts With Thioredoxin-Interacting Protein and Ameliorates Reactive Oxygen Species-Induced Cardiotoxicity. *J Am Heart Assoc.*2016.5(1) pii: e002485.
DOI: 10.1111/jce.12826
10. Otaki Y, Shishido T(13 人中 10 番目), Kubota I(13 人中 13 番目): Comorbid renal tubular damage and hypoalbuminemia exacerbate cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2016;105(2): 162-171
DOI: 10.1007/s00392-015-0899-z
11. Niizeki T, Kubota I(6 人中 6 番目): A case of cystic adventitial degeneration of the left popliteal artery diagnosed by intravascular ultrasound. *Clin Med Insights Case Rep.*2016; 9:11-14

- DOI: 10.4137/CCRep.S38175
12. Daidoji H, Shishido T(12人中9番目), Kubota I(12人中12番目): Circulating heart-type fatty acid-binding protein levels predict ventricular fibrillation in Brugada syndrome. *J Cardiol.*2016; 67(3): 221-228
DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.04.011
 13. Kadowaki S, Shishido T(12人中2番目), Kubota I(12人中12番目): Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessels.*2016; 31(4): 535-544
DOI: 10.1007/s00380-015-0628-6
 14. Kadowaki S, Shishido T(17人中2番目), Kubota I(17人中17番目): Deficiency of Senescence Marker Protein 30 Exacerbates Cardiac Injury after Ischemia/Reperfusion. *Int J Mol Sci.*2016; 17(4):pii: E542
DOI: 10.3390/ijms17040542
 15. Ishigaki D, Shishido T(14人中9番目), Kubota I(14人中14番目): The association between defibrillation shock energy and acute cardiac damage in patients with implantable cardioverter defibrillators. *J Arrhythm.* 2016;32(6): :481-485.
 16. Honda Y, Shishido T(16人中2番目), Kubota I(16人中16番目): Midkine Deteriorates Cardiac Remodeling via Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Chronic Kidney Disease. *Hypertension.* 2016;67(5) 857-865
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06922
 17. Kumagai YU, Kubota I(7人中7番目): Contact Force-Guided Deep Engagement with a Steerable Sheath in the Distal Great Cardiac Vein: A Case Report. *Pacing Clin Electrophysiol.*2016;39(5): 507-510
DOI: 10.1111/pace.12826
 18. Hasegawa H, Shishido T(22人中18番目), Kubota I(22人中22番目): The role of macrophage transcription factor MafB in atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis.*2016;250: 133-143
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.021
 19. Wanezaki M, Shishido T(11人中7番目), Kubota I(11人中11番目): Trends in the incidences of acute myocardial infarction in coastal and inland areas in Japan: The Yamagata AMI Registry. *J Cardiol.*2016;68(2): 117-124
DOI: 10.1016/j.jjcc.2015.08.015
 20. Ando K, Shishido T(11人中8番目), Kubota I(11人中11番目): Impact of Serum Uric Acid Levels on Coronary Plaque Stability Evaluated Using Integrated Backscatter Intravascular Ultrasound in Patients with Coronary Artery Disease. *J Atheroscler Thromb.*2016;23(8): 932-939
DOI: 10.5551/jat.33951
 21. Otaki Y, Shishido T(9人中7番目), Kubota I(9人中9番目): Renal tubular damage is associated with poor clinical outcome in patients with peripheral artery disease who underwent endovascular therapy. *Int J Cardiol.* 2016;220: 376-381
DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.238
 22. Otaki Y, Shishido T(16人中6番目), Kubota I(16人中16番目): The Impact of Superoxide Dismutase-1 Genetic Variation on Cardiovascular and All-Cause Mortality in a Prospective Cohort Study: The Yamagata (Takahata) Study. *PLoS One.*2016;11(10) e0164732
DOI: 10.1371/journal.pone.0164732
 23. Yashiro Y, Shishido T(13人中10番目), Kubota I(13人中13番目): Predictors of left atrial coagulation activity among paroxysmal atrial fibrillation patients. *Circ J.* 2015; 79: 61-69
DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0630.
 24. Hirayama A, Kubota I(9人中9番目): Slight increase in urinary albumin excretion within the normal range predicts incident hypertension in a community-based Japanese population: the Takahata study. *Hypertens Res.* 2015; 38(1): 56-60
DOI: 10.1038/hr.2014.117.
 25. Narumi T, Shishido T(20人中2番目), Kubota I(20人中20番目): High-mobility group box 1-mediated heat shock protein beta 1 expression attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 82: 1-12
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.018
 26. Narumi T, Shishido T(14人中12番目), Kubota I(14人中14番目): Sarcopenia evaluated by fat-free mass index is an important prognostic factor in patients with chronic heart failure. *Eur J Intern Med.* 2015; 26(2): 118-122
DOI: 10.1016/j.ejim.2015.01.008
- 〔学会発表〕(計42件) **すべて査読有**
1. Sugai T, Shishido T(12人中9番目), Kubota I(12人中12番目): Intramuscular fat deposition can predict adverse clinical outcomes in patients with peripheral artery disease. ESC CONGRESS 2017, Barcelona; August 2017
 2. Takahashi T, Shishido T(13人中2番目), Kubota I(13人中13番目): Cardiac Nuclear High Mobility Group Box 1 Attenuates

Angiotensin 2 Induced Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Cardiomyocyte DNA Damage. Scientific Sessions 2016, New Orleans ; November 2016

3. Kadowaki S, Shishido T(11人中2番目), Kubota I(11人中11番目): Senescence marker protein 30 protect the cardiac injury from after ischemia reperfusion. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago; November 2014

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保田 功 (KUBOTA, Isao)
山形大学・学内共同利用施設等・理事
研究者番号：30161673

(2)研究分担者

宍戸 哲郎 (SHISHIDO, Tetsuro)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：60400545

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし