

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860559

研究課題名(和文)ミトコンドリア蛋白質MENTの心筋虚血プレコンディショニングに関する機能解析

研究課題名(英文)The role of mitochondrial protein MENT in myocardial ischemic preconditioning

研究代表者

木岡 秀隆 (Kioka, Hidetaka)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：70642099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は培養心筋細胞において低酸素刺激により発現上昇する遺伝子群のなかから、ミトコンドリアの最も重要な機能であるATP産生を司るFoF1-ATP合成酵素と結合することによりそのATP合成活性を増強させる遺伝子MENTを新規に同定し報告した。本研究では心機能とATP濃度を同時に評価できるゼブラフィッシュモデルを作成することでMENTが生体内でもATPを保持し、臓器保護作用を持つことを示し、またイヌ虚血プレコンディショニングモデルを用いることで虚血プレコンディショニングへの関与を示した。

研究成果の概要(英文)：Most eukaryotic cells generate ATP through oxidative phosphorylation system (OXPHOS) to support cellular activities. We have recently established the method for the selective measurement of intra-mitochondrial ATP levels and have identified the hypoxia-inducible protein MENT as a positive regulator of OXPHOS by cultured cell-based experiments. In this study, we introduced a FRET-based ATP biosensor named ATeam into zebrafish heart and examined in vivo role of MENT under hypoxia. We established the in vivo ATP imaging technique. This technique clearly revealed that MENT-expressing cardiomyocyte populations showed preserved contractility with increased intra-mitochondrial ATP concentration in hypoxic condition. Furthermore, we showed that MENT expression is enhanced in the risk area in canine ischemic preconditioning model. These results suggest that MENT functions as a guardian of hypoxic tissue and could become a therapeutic target for hypoxia-related diseases.

研究分野：循環器病学

キーワード：心筋虚血 ミトコンドリア エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

虚血プレコンディショニングとは、短時間心筋虚血の先行により、その後生じる長時間虚血による心筋細胞障害に対して保護的に作用する現象である。初めに実験的にイヌを用いて報告された (Circulation 1986;74:1124-1136) が、ヒトにおいても心筋梗塞前狭心症を有する心筋梗塞症例の梗塞サイズが小さいことが報告された (Circulation 1995;91:291-297) ことからヒトにおいても同様に強力な心保護効果を示すと考え、そのメカニズムの解明は大きな臨床応用の可能性を秘めている。虚血プレコンディショニングによる心保護効果は虚血時の細胞内 ATP 低下の抑制を介しているとして報告され (Circ Res. 1990;66:913-931)、現在までこの考えは支持されている。しかしながら、最も重要であると思われる経時的な ATP 濃度の連続評価が困難であることが研究の大きな limitation となり詳細なメカニズム解明に至っていない。エネルギー代謝調節機構の研究を行う上で細胞内 ATP 濃度の測定は不可欠であるが、従来の方法では細胞を破壊するため、生細胞での経時的な測定が不可能であった。近年細胞質およびミトコンドリアの ATP 濃度をリアルタイムで測定することができる ATP 感受性蛍光 FRET プローブ、ATeam が開発され (PNAS 2009; 106, 15651-15656)、京都大学との共同研究により FRET プローブを培養心筋細胞の心臓に導入して ATP 濃度を測定する実験系を新たに確立した。研究代表者らは、培養心筋細胞において虚血刺激によって早期に発現誘導される遺伝子に着目し、新規遺伝子 MENT を同定した。MENT 遺伝子は低酸素刺激後すぐに一過性に発現誘導され、また MENT タンパク質はミトコンドリアに局在することを明らかにした。さらに MENT 過剰発現により低酸素下においても ATP 産生が維持されることを示した。

2. 研究の目的

MENT の in vivo での ATP 産生増強効果を確認し、虚血プレコンディショニングにおける MENT の関与を調べる

3. 研究の方法

(1) in vivo ATP imaging システムの構築

研究代表者らのグループはこれまでにゼブラフィッシュをモデルとした心血管系の機能解析技術を確立している。生後数日までのゼブラフィッシュは全身が透明であり、解剖学的にも心臓は解析しやすい位置に存在する。またゼブラフィッシュの心エコーや心電図解析を行うシステムも構築している。高速で拍動する心臓のイメージングには高速での画像取得が必須である。近年顕微鏡システムの進歩は目覚ましく、Dual CCD カメラを搭載した蛍光顕微鏡を用いることで拍動した心臓の in vivo FRET imaging も可能となった。ATeam をゼブラフィッシュ心臓のミトコンドリアに発現させることにより、in vivo において ATP 濃度と心収縮能を同時に評価す

ることが可能となると考えられる (Mit-ATeam ゼブラフィッシュ)。本技術の開発は生体エネルギー研究において必須のツールとなると考えられる。

(2) MENT 強制発現による虚血耐性獲得評価とメカニズム解明

Mit-ATeam ゼブラフィッシュの心臓に、モザイク状に MENT を局所的に発現させることにより同一固体内で MENT 強制発現領域とコントロール領域 (非発現領域) で ATP 濃度の変化を比較することが可能となる。低酸素ストレス下における ATP dynamics および心機能の評価を行う。

(3) イヌ虚血プレコンディショニングにおける MENT 発現誘導解析

研究代表者らはこれまでにイヌを用いた虚血プレコンディショニングモデルを確立し研究を行ってきた (J Am Coll Cardiol. 2009;46(4):452-62, Circulation 2004;110(1):51-7)。イヌ虚血プレコンディショニングモデルにおいて、虚血領域 (risk area) と非虚血領域 (non-risk area) において MENT 発現の差異を調べることにより虚血プレコンディショニングにおける MENT の関与を調べる。

4. 研究成果

(1) in vivo ATP imaging システムの構築

我々は in vivo において ATP の可視化を行うために Gal4 UAS システムを用いることにより心臓特異的に Mit-ATeam を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ (Mit-ATeam ゼブラフィッシュ) を作成した。ゼブラフィッシュ心臓においても、Mit-ATeam は正確にミトコンドリアに局在した (図 1)。

次に Mit-ATeam ゼブラフィッシュを虚血に晒すことにより、虚血状態で ATP 濃度が徐々に低下していくことを real time に観察しえた (図 2)。この変化は変異を導入することにより ATP 濃度非感受性とした変異 ATeam (ATeam-RK) のトランスジェニックゼブラフィッシュでは見られないことから、ATP 濃度を反映していると考えられた。

更に心収縮および拡張に伴う motion artifact の影響もほとんど認めないことが示された。

以上のように我々は生体内で拍動を続ける心臓内での ATP 濃度の可視化に世界で初めて成功した。

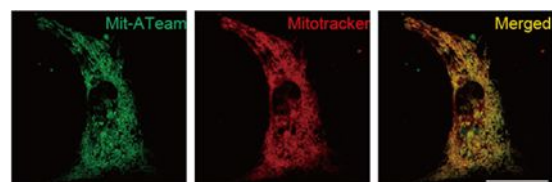


図 1. Mit-ATeam ゼブラフィッシュ心臓の共焦点顕微鏡像。Mit-ATeam (緑) はミトコンドリア (赤) と merge しており、ミトコンドリアに局在している。

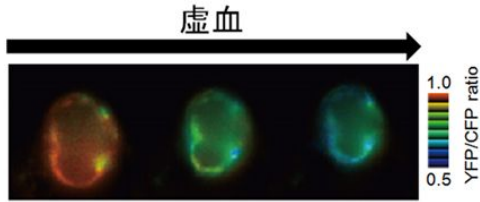


図2.ゼブラフィッシュ心臓でのATP濃度の可視化

(2) MENT 強制発現による虚血耐性獲得評価とメカニズム解明

ゼブラフィッシュ受精卵に心臓特異的プロモーターをつけた MENT コンストラクトをインジェクションすることにより、Mit-ATeam ゼブラフィッシュの心臓に局所的に MENT 発現させるモザイクモデルを作成した。この MENT モザイク発現モデルを用いて、MENT 発現領域 (*ment(+)*) と非発現領域 (*ment(-)*) での ATP 濃度の変化を観察した。MENT 発現領域では非発現領域に比べ ATP 濃度 (YFP / CFP 比にて表される) が保持されていることが示された (図3)。このことより MENT は生体内においても A 低酸素条件下においても ATP 産生を保持することにより臓器保護作用を持つ事が示された。

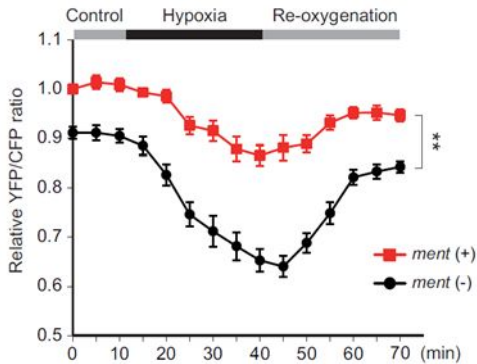


図3. MENT 強制発現領域 (*ment(+)*) の ATP 濃度 (YFP/CFP 比にて表される) はコントロール領域 (*ment(-)*) に比べ、特に低酸素条件下において高値で推移している。

(3) イヌ虚血プレコンディショニングにおける MENT 発現誘導解析

虚血プレコンディショニングに MENT が関与している可能性を検討するために、イヌ虚血プレコンディショニングモデルにける MENT 発現を調べたところ虚血領域 (risk area) にて有意な発現増強を認められた (図4)。一方プレコンディショニングを行わなかったイヌにおいてはこのような左室内で MENT 発現量の差は認めなかったことから、MENT は虚血プレコンディショニングによりすみやかに誘導される蛋白質であり、心保護作用獲得に関与している可能性が示唆された。

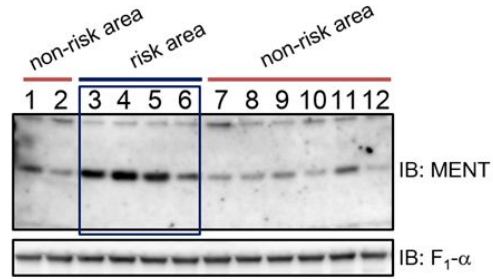


図4. MENT 発現は虚血領域 (risk area) で非虚血領域 (non-risk area) に比べ発現増強が見られる。(F₁-α : 内因性コントロール)

以上の結果から、我々が培養心筋細胞を用いた実験により低酸素下においても ATP 産生を増強させる蛋白質として同定した MENT が、in vivo においても ATP 産生を維持することにより、臓器保護効果を示しさらに最も強力な心保護効果として知られる虚血プレコンディショニングにも関与していることが示された。

以上の成果について現在論文作成中である。

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 6 件)

1. M. Kanzaki, Y. Asano, H. Ishibashi-Ueda, E. Oiki, T. Nishida, H. Asanuma, H. Kato, Y. Oka, T. Ohtani, O. Tsukamoto, S. Higo, H. Kioka, K. Matsuoka, Y. Sawa, I. Komuro, M. Kitakaze, S. Takashima, Y. Sakata. A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart Failure.

PLoS One. 2016 Feb 4;11(2):e0148209.

査読あり

2. T. Hayashi, Y. Asano, Y. Shintani, H. Aoyama, H. Kioka, O. Tsukamoto, M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, K. Takafuji, S. Higo, H. Kato, S. Yamazaki, K. Matsuoka, A. Nakano, H. Asanuma, M. Asakura, T. Minamino, Y. Goto, T. Ogura, M. Kitakaze, I. Komuro, Y. Sakata, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, S. Takashima. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase.

Proc Natl Acad Sci U S A 2015 Feb 3;112(5):1553-8.

査読あり

3. Y. Yan, O. Tsukamoto, A. Nakano, H. Kato, H. Kioka, N. Ito, S. Higo, S. Yamazaki, Y. Shintani, K. Matsuoka, Y.

Liao, H. Asanuma, M. Asakura, K. Takafuji, T. Minamino, Y. Asano, M. Kitakaze, S. Takashima. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5.

Nat Commun. 2015 Jan 30;6:6137.

査読あり

4. H. Kioka, H. Kato, M. Fujikawa, O. Tsukamoto, T. Suzuki, H. Imamura, A. Nakano, S. Higo, S. Yamazaki, T. Matsuzaki, K. Takafuji, H. Asanuma, M. Asakura, T. Minamino, Y. Shintani, M. Yoshida, H. Noji, M. Kitakaze, I. Komuro, Y. Asano and S. Takashima. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.

Proc Natl Acad Sci U S A 2014 111, 273-278.

査読あり

5. Y. Shintani, H. C. Drexler, H. Kioka, C. M. Terracciano, S. R. Coppen, H. Imamura, M. Akao, J. Nakai, A. P. Wheeler, S. Higo, H. Nakayama, S. Takashima, K. Yashiro and K. Suzuki. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2.

EMBO Rep 2014 15, 438-445.

査読あり

6. K. Matsuoka, Y. Asano, S. Higo, O. Tsukamoto, Y. Yan, S. Yamazaki, T. Matsuzaki, H. Kioka, H. Kato, Y. Uno, M. Asakura, H. Asanuma, T. Minamino, H. Aburatani, M. Kitakaze, I. Komuro and S. Takashima. Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart.

FASEB J 2014 28, 1870-1879.

査読あり

〔学会発表〕(計1件)

Kioka H, Kato H, Asano Y, Sakata Y, Kitakaze M, Takashima S. In vivo Visualization of ATP Dynamics Under Hypoxia Reveals That G0/G1 Switch Gene 2 Provides Ischemic Tolerance Through the Increase of ATP production. American Heart Association Scientific Sessions 2014 2014年11月15日~2014年11月19日(Chicago, Illinois)

国内外の別： 国外

〔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学

<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

/

6. 研究組織

(1)研究代表者

木岡 秀隆 (Kioka Hidetaka)
大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座
助教
研究者番号：70642099