

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893317

研究課題名(和文)ミトコンドリアCa²⁺制御機構とその破綻による心血管病態機序研究課題名(英文)The regulation mechanism of mitochondrial Ca²⁺ signaling and pathological mechanism of cardiovascular diseases for its abnormality

研究代表者

田頭 秀章 (TAGASHIRA, Hideaki)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90735028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは細胞の生と死に關与する重要な小器官である。我々は、近年同定されたミトコンドリアにCa²⁺を輸送するmitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU)、Ca²⁺を排泄するミトコンドリアNa⁺/Ca²⁺交換体(NCLX)両者の遺伝子欠損マウスを作出し、心血管病の病態機序におけるミトコンドリアCa²⁺輸送体の役割について検討した結果、ミトコンドリアCa²⁺濃度維持機構の崩壊は、心血管病態の発症・進展に密接に関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease including heart failure is a one of the most important health problem owing to its significant morbidity and mortality. One of the most important factor causing heart disease including cardiac hypertrophy and heart failure is dysregulation of Ca²⁺ signaling. Recently, mitochondrial calcium uniporter (MCU) and mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCLX) was identified, and possessed mitochondrial Ca²⁺ signaling study in many different cells and organs. However, physiological and pathological roles of mitochondrial Ca²⁺ signaling in cardiovascular function are still unclear. To study the functional role of mitochondrial Ca²⁺ signaling in cardiovascular diseases, we developed NCLX and MCU-knockout mice. In this study using these mice, we found that the disruption of mitochondrial Ca²⁺ signaling contribute to the onset and progression of cardiovascular diseases.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：ミトコンドリア 心血管疾患

1. 研究開始当初の背景

日本における死亡要因の三大疾患として、悪性腫瘍、脳梗塞、そして心疾患が挙げられる。特に、慢性心不全の患者数は100万を超えると推定され、高齢化に伴いその数は増加している。心不全患者の予後は悪く、QOLの改善や医療費削減の観点から、より優れた治療薬の開発が求められている。

これまでの研究において申請者らは、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX)の遺伝子改変マウスや特異的阻害薬を開発・応用することにより、食塩感受性高血圧や狭心症、ナトリウム利尿や高カルシウム尿症にNCXを介する Ca^{2+} 輸送が関与することを明らかにしてきた。また、病的肥大・心不全モデルマウスおよび培養心筋細胞を用いて、心不全病態においてオーファン受容体であるsigma-1受容体が不活化され、sigma-1受容体/IP3受容体を介した筋小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送が障害されていること、さらに、sigma-1受容体アゴニスト(SA4503、fluvoxamine)は心不全時のミトコンドリア Ca^{2+} 輸送障害を改善し、心筋保護作用を示すことを明らかにしてきた。最近の研究により、ミトコンドリアはATP産生の場としてだけでなく、アポトーシスの制御、活性酸素種(ROS)の生成および Ca^{2+} の貯蔵庫としての役割が明らかになってきており、細胞の生死を司る重要なオルガネラとして注目されている。特に、心臓においてATP産生と Ca^{2+} 調節はポンプ機能の維持に必須であり、また一方、ROSの生成は心不全の病態形成に密接に関わっている。このように、ミトコンドリアの制御機構は心臓の機能維持と病態生理を理解する上で重要であり、心不全の創薬標的としても極めて興味深い。

近年、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体の分子実体に関する研究が急速に進展しており、ミトコンドリアのマトリクスに Ca^{2+} を輸送するmitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU)が同定された。また、ミトコンドリアには細胞膜と異なる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体(NCX)が発現しており(遺伝子名:NCLX)、主要なミトコンドリア Ca^{2+} 排出系としてミトコンドリア Ca^{2+} シグナルに深く関与することが報告された。しかし、心血管病(心肥大・心不全、血管肥厚・動脈硬化、等)の病態機序におけるミトコンドリア Ca^{2+} 輸送体(MCU、NCLX)の役割については、現在まだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

MCUを介したミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を促進するタンパク質であるmitochondrial calcium uniporter regulator 1 (MCUR1)や逆に抑制するタンパク質であるmitochondrial Ca^{2+} uptake (MICU)制御タンパク質とMCUとの複合体形成に必須なタンパク質であるessential MCU regulator (EMRE)も同定され、MCUの機能調節機構についてはある程度理解されつつあるが、心血管病の病態発症・進展機序におけるミトコン

ドリア Ca^{2+} 輸送体の役割については、現在まだ明らかにされていない。そこで、申請者らは、ミトコンドリア Ca^{2+} 制御機構とその破綻による心血管病態機序を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) NCLX欠損マウスの作製

まず初めに、申請者らは、NCLX欠損マウスの作製を行った。NCLXの野生型ゲノム断片をクローニングし、そのexon 1,2をネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挟んだ配列を挿入した相同組換え用ベクターを作製した。ES細胞で相同組換えを行い、常法により遺伝子欠損マウスを得た。野生型マウスおよびNCLXホモ欠損マウスより心臓、血管および腎臓を摘出し、定量的リアルタイムPCRを行い、NCLXホモ欠損マウスの心臓、血管および腎臓においてNCLX遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていることを確認した。このホモ欠損マウスは、成獣まで成長した。作製したNCLXホモ欠損マウスの体重、収縮期血圧、心拍数、エコー、心重量等の測定を行った。

(2) MCU欠損マウスの作製

次に、申請者らは、MCU欠損マウスの作製を行った。MCU欠損マウスの作製には、MCUの野生型ゲノム断片をクローニングし、そのexon 5,6をネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挟んだ配列を挿入した相同組換え用ベクターを作製した。ES細胞で相同組換えを行い、常法により遺伝子欠損マウスを得た。このホモ欠損マウスは、胎生致死のため、ヘテロ欠損マウスを使用することとした。作製したMCUヘテロ欠損マウスの体重、心重量等の測定を行った。

4. 研究成果

(1) NCLX欠損マウスの作製および心血管機能解析

申請者らは、NCLX欠損マウスの作製を行った。NCLXの野生型ゲノム断片をクローニングし、そのexon 1,2をloxP配列で挟み、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挟んだ配列を挿入した相同組換え用ベクターを作製した。ES細胞で相同組換えを行い、遺伝子欠損マウスを得た。まず、NCLXホモ欠損マウスにおいてNCLX遺伝子発現が抑制されていることを確認するため、NCLXホモ欠損マウスおよび野生型マウスより心臓、血管および腎臓を摘出してリアルタイムPCRを行い、NCLXホモ欠損マウスのこれら臓器においてNCLX遺伝子発現がほぼ完全に抑制されていることを確認した。NCLXホモ欠損マウスは、成獣まで成長した。NCLXホモ欠損マウスの体重は、野生型と比較して差異はみられなかった。NCLXホモ欠損マウスの無麻酔下での収縮期血圧および心拍数は、野生型マウスと同程度であった。また、心肥大の指標となる心重量/体重比も両マウスでほとんど同じであ

り、心臓の形態変化は観察されなかった。NCLX ホモ欠損マウスの無麻酔下での収縮期血圧および心拍数は、野生型マウスと同程度であった。また、心肥大の指標となる心重量/体重比も両マウスでほとんど同じであり、心臓の形態変化は観察されなかった。さらに、超音波診断装置を用いてMモード心エコー法により心機能を測定したが、左室駆出率(EF)および左室内径短縮率(FS)ともに両マウス間で有意な差はなく、NCLX ホモ欠損マウスの心機能に異常は認められなかった。次に、野生型マウスにフェニレフリン(PE)を静脈内に投与すると用量依存的な血圧の上昇が見られた。同様に、NCLX ホモ欠損マウスにPEを静脈内投与したところ、野生型マウスと比較して低濃度PEによる血圧上昇が有意に抑制された。

(2)MCUヘテロ欠損マウスの心血管系における機能解析

作製したMCUホモ欠損マウスは、胎生致死のため、MCUヘテロ欠損マウスを使用することとした。MCUヘテロ欠損マウスの体重は野生型と比較してほとんど差異はなかった。また、心重量/体重比は両マウスで同程度であり、心肥大などの形態変化は見られなかった。

これらの結果から、NCLXを介したミトコンドリアCa²⁺輸送は、細胞内Ca²⁺濃度調節に関与していることが考えられ、心血管病態の発症・進展に大きく寄与していることが明らかとなった。これらの成果は、MCUおよびNCLX欠損マウスを用いて見出された新知見である。

本研究により、ミトコンドリアCa²⁺濃度維持機構の崩壊は、心血管病態の発症・進展に重要な役割を果たすことが示唆されたが、その詳細なメカニズムについては現在解析中である。今後、Ca²⁺ imaging法による血管平滑筋細胞内局所Ca²⁺濃度の測定、ミトコンドリア酸素消費量やATP産生の測定によるミトコンドリア機能解析、real-time PCR法、western blot法によるCa²⁺シグナル関連因子の解析を行い、心血管病態発症・進展機構との関連メカニズムを解明していきたいと考えている。

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4件)

1. Gotoh Y, Kita S, Fujii M, Tagashira H, Horie I, Arai Y, Uchida S, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem Biophys Res Commun.* 456(2): 670-675, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.016.

2. Kita S, Tagashira H, Gotoh Y, Fujii M, Iwamoto T. Phosphoinositide analysis using the HPLC system equipped with a fraction collector and the TSKgel SAX column. *Med Bull Fukuoka Univ.* 42(1): 175-181, 2015. 査読有
3. Fukunaga K, Shinoda Y, Tagashira H. The role of SIGMAR1 gene mutation and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 127(1): 36-41, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.jphs.2014.12.012.
4. Tagashira H, Shinoda Y, Shioda N, Fukunaga K. A mutation in the chaperone 1-receptor impairs mitochondrial ATP production in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1840(12): 3320-3334, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.08.012.

[学会発表](計8件)

1. Tagashira H, Kita S, Arai Y, Iwamoto T. Functional analysis of renal Na⁺/Ca²⁺ exchangers using several genetically altered mice. 第89回日本薬理学会年会、横浜、2016年3月11日
2. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、岩本 隆宏 Mg²⁺輸送体 SLC41 の腎臓・血管機能調節における役割、第68回日本薬理学会西南部会、下関、2015年11月21日
3. Tagashira H, Kita S, Gotoh Y, Iwamoto T. Physiological role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-2 (NCX2) in the kidney. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (2015) (ISCIDK2015), Kumamoto, 16 October, 2015.
4. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、後藤 雄輔、岩本 隆宏 Na⁺/Ca²⁺交換体機能抑制の腎機能およびCa²⁺排泄に及ぼす影響について、第34回臨床薬理阿蘇九重カンファレンス、福岡、2015年10月3日
5. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、後藤 雄輔、岩本 隆宏 SLC41 トランスポーターの in vivo 生理機能解析、第8回トランスポーター研究会九州部会、鹿児島、2015年7月18日
6. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、後藤 雄輔、永田 旭、岩本 隆宏 ビタミンD誘発高カルシウム血症に対するNCX阻害薬の保護効果、第88回日本薬理学会年会、名古屋、2015年3月19日
7. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、後藤 雄輔、岩本 隆宏 Mg²⁺トランスポーターSLC41 family の機能解析、第5回福岡薬理・生理系研究会、福岡、2014年12月9日
8. 田頭 秀章、喜多 紗斗美、後藤 雄輔、岩本 隆宏 マグネシウム代謝異常症の新規モデルマウスの開発、第67回日本薬理

学会西南部会、福岡、2014年11月23日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/pharmaco/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田頭 秀章 (TAGASHIRA, Hideaki)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90735028

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：