

180. Nox による不全心筋におけるミトコンドリア制御機構

松島 将士

*北海道大学 大学院医学研究科 循環病態内科学

Key words : 酸化ストレス, ミトコンドリア, NADPH oxidase, 心不全

緒言

日本における心不全死は持続的に増加しており、心不全患者数は推定 100–200 万人で、毎年新たに約 10–20 万人ずつ増加しているとされるが、今後高齢化に伴いさらに増加することが予想される。薬物療法・非薬物療法の進歩によって、心不全の予後は格段に改善してきた。しかし、慢性心不全の 5 年生存率は 70 %、虚血性心筋症や拡張型心筋症などの重症心不全例の 2 年生存率は 50 %とまだ予後不良であり、心筋リモデリング、心不全への新たな治療戦略が求められている。近年、心筋リモデリングの形成・進展に、心筋組織における酸化ストレス (ROS) の増加とミトコンドリア機能障害が関与することが明らかにされてきた。心不全の薬物治療として RA 系抑制薬や β 遮断薬による神経体液性因子の制御が奏功した一方で、ROS の制御による心不全治療はいまだに確立されていない。

最近、傷害されたミトコンドリアの処理機構として、ミトコンドリアの分裂・融合が重要な役割を果たしており、ミトコンドリア機能はこのミトコンドリアの分裂・融合により高度に制御されていることが知られるようになった。特に、ミトコンドリアの分裂はミトコンドリア DNA 保持に、ミトコンドリアの融合は老化に対するミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たしている。つまり、このミトコンドリアの分裂と融合のバランスがミトコンドリア機能維持やミトコンドリアの品質管理に重要と考えられる¹⁾。

このような報告は、ミトコンドリアの分裂・融合が、ミトコンドリア機能障害が重要な役割を果たしている心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する可能性を支持するものである。さらに、ミトコンドリア分裂・融合の制御によりミトコンドリア機能およびエネルギー代謝を維持し、心不全の病態を改善できると期待される。ミトコンドリアの分裂は Drp1、Fis1、ミトコンドリアの融合は Mtf1、Mtf2、Opa1 によって複雑に制御されているが、心筋リモデリングにおける酸化ストレスとこれらミトコンドリア分裂・融合制御蛋白の関連については明らかとなっていない。

著者は、現在まで一貫して心筋リモデリング・心不全の形成・進展における酸化ストレスの役割を解明する研究に取り組んできた。特に心筋梗塞後に心筋リモデリング・心不全に陥った心筋ではミトコンドリア分画の ROS が増加し、ミトコンドリア機能を障害することで心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化を引き起こすことを明らかにしてきた。近年、細胞における主要な ROS 産生源として、 O_2^- や H_2O_2 を能動的に産生する酵素である NADPH oxidase (Nox) が知られるようになった。7 つの Nox isoform のうち、Nox4 が心筋に優位に発現しており、圧負荷肥大心でみられる心筋リモデリングに関与している。Nox4 はミトコンドリア機能障害を介して心筋障害の形成過程における心筋細胞アポトーシスや肥大に関与している^{2,3)} が、心筋リモデリングを引き起こす詳細な分子機序は明らかではない。ROS はミトコンドリアの分裂を刺激することから ROS がミトコンドリア分裂・融合を介したミトコンドリア機能維持へ関与していることが示唆されている。不全心においてはミトコンドリア融合が低下していることが知られている。不全心では Nox 由来の ROS が増加することから、Nox がミトコンドリア分裂と融合のバランスを崩すことでミトコンドリア機能を低下させている可能性がある。さらに、ミトコンドリアの分裂・融合は非常に動的であることから、Drp1 や Mtf1、Mtf2 などの蛋白質は転写レベルの調節だけでなく翻訳後修飾で制御されている可能性があり、ROS による oxidation による制御の可能性も考えられる。

このような背景をふまえて、『Nox 活性の制御による心筋組織内 ROS の最適化によりミトコンドリア分裂・融合を調節することで、ミトコンドリア機能およびエネルギー代謝を維持し、心筋リモデリング・心不全の発症・進展を抑制す

*現所属：九州大学 大学院医学研究院 循環器内科学

る』という仮説を検証する本研究を着想するに到った。今まで心筋における ROS 制御に関する研究は抗酸化物質によるものが中心であり、ROS の産生源である Nox の活性化制御によるミトコンドリア機能維持の分子機構に着目した研究は著者独自の発想に基づくものである。また、心筋リモデリング、心不全の発症・進展とミトコンドリア 分裂・融合を介したミトコンドリア機能制御における Nox4 の役割については明らかとなっていない。

方 法

不全心筋におけるミトコンドリア分裂・融合バランスおよびミトコンドリア機能の解析

心筋リモデリングに陥った不全心筋においてミトコンドリア分裂・融合バランスの破綻およびミトコンドリア機能異常が認められるかを明らかにする。左冠動脈結紮により心筋梗塞作製後 28 日間飼育し、下記 (1) - (5) を評価した。

- (1) 心不全重症度評価 (心エコー)
- (2) 心筋組織学的評価 (心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシス)
- (3) ミトコンドリア分裂・融合の形態評価 (電子顕微鏡)
- (4) ミトコンドリア分裂促進因子 Drp1 と融合促進因子 Mitofusion1 の蛋白量 (ウェスタンブロット法)
- (5) 酸化ストレス関連蛋白: 心筋組織における Nox4 蛋白発現

結 果

(1) 心不全モデルの作製

心筋梗塞 (MI) マウスは偽手術 (sham) マウスに比べ心エコー上、左室内腔は拡大し、左室駆出率は低下していた (表 1) (*P < 0.05)。

表 1. 心エコー

| MI model | | |
|-------------------------------|-----------|------------|
| | Sham | MI |
| Echocardiographic data | n=5 | n=15 |
| HR(bpm) | 497±11 | 517±8 |
| LV EDD(mm) | 3.1±0.2 | 5.4±0.2* |
| LV ESD(mm) | 1.8±0.1 | 4.8±0.2* |
| Fractional shortning(%) | 43.4±1.4 | 12.3±2.0 |
| Anterior wall thickness(mm) | 0.81±0.01 | 0.34±0.04* |
| Posterior wall thickness(mm) | 0.77±0.02 | 0.85±0.03* |

心筋梗塞後心エコー

また、心重量、左室重量、肺重量の増加を認めた (表 2) (*P < 0.05)。

表 2. 臓器重量

MI model

| | Sham | MI |
|----------------------|-----------|------------|
| Organ weights | n=5 | n=15 |
| B.W.(g) | 24.7±0.3 | 26.7±0.4* |
| ΔB.W.(g) | 2.1±0.3 | 3.0±0.2 |
| HW(mg) | 115.1±3.9 | 159.5±5.6* |
| HW/BW(mg/g) | 4.7±0.1 | 5.9±0.1* |
| LVW(mg) | 79.7±3.6 | 102.3±2.2* |
| LVW/BW(mg/g) | 3.2±0.1 | 3.8±0.1* |
| Lung(mg) | 145.1±9.4 | 164.7±9.3 |
| Lung/BW(mg/g) | 5.9±0.3 | 6.1±0.2 |

心筋梗塞後臓器重量

(2) 心筋リモデリングの評価

MI 群では非梗塞部の心筋肥大、間質線維化、アポトーシスの亢進を認め、心筋リモデリングが進行していた。

(3) ミトコンドリア形態の評価

筋梗塞後の非梗塞部心筋細胞におけるミトコンドリア形態を電子顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリアサイズが減少し、ミトコンドリア数は増加していた（図 1、2）。

(4) ミトコンドリアダイナミックス制御蛋白の評価

次に、心筋梗塞 28 日後での非梗塞部における Drp1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルを Western blot 法にて評価した。Drp-1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルはいずれも MI と sham マウスにおいて有意な差を認めなかったが、Mitofusion1 は MI マウスにおいて高い傾向であった（約 1.4 倍、P = 0.1）。

さらに、心筋梗塞後の心筋におけるミトコンドリア形態制御因子である OPA1、Fis1 の蛋白レベルを western blot 法にて評価したところ MI 群で sham 群に比べて有意差はなかった。一方、Drp1 はリン酸化で制御されているが、Drp-1 を抑制するリン酸化に関しては western blot 法にて低下していた。

MI 作製 14 日後の非梗塞部におけるミトコンドリア形態蛋白質の発現も 28 日後と同様の傾向であった。オートファジーの指標である LC-3II は MI マウスの心筋にて高度に低下していた。

Mitochondrial area trace

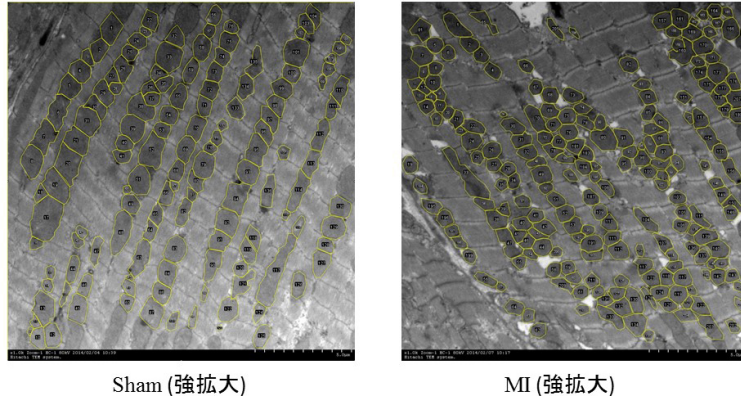


図1. ミトコンドリア形態
梗塞後心筋細胞におけるミトコンドリア形態（電子顕微鏡）。

Mitochondrial size and number

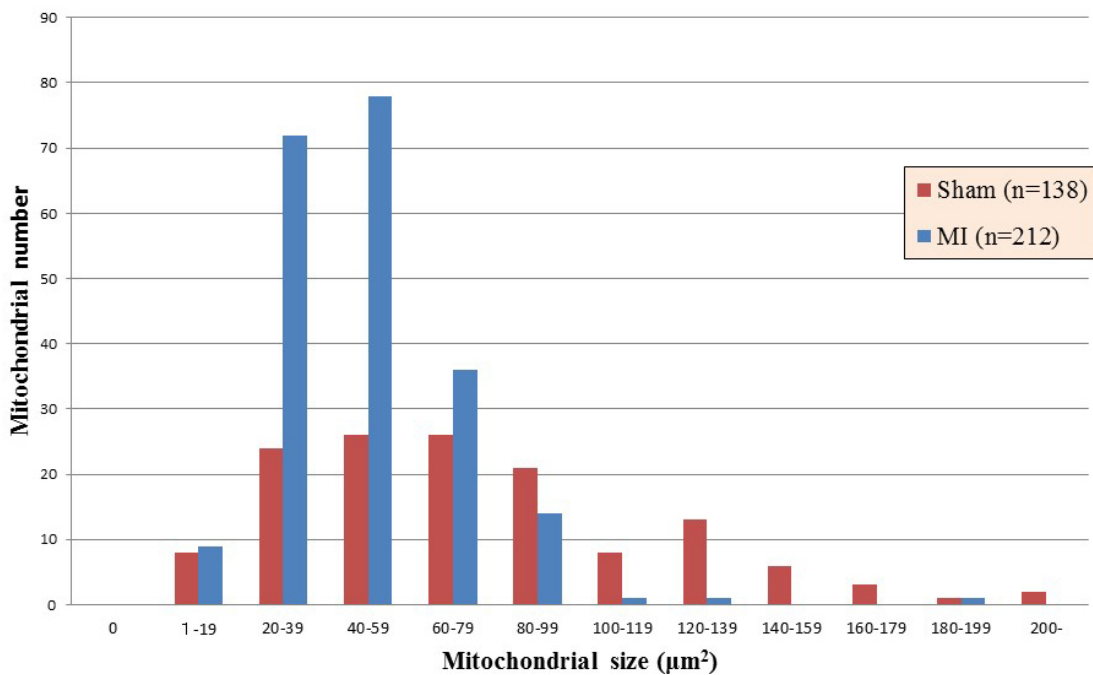


図2. ミトコンドリアサイズと数
心筋梗塞によりミトコンドリアサイズは減少し数は増加する。

(5) 酸化ストレス関連蛋白

心筋梗塞後の非梗塞部における Nox4 の蛋白発現は sham マウスに比べて低下していた。

考 察

心筋梗塞後の非梗塞部心筋細胞におけるミトコンドリア形態はサイズが減少し、数が増加していた。ミトコンドリア形態制御蛋白である Mitofusin1 の発現は増加傾向であった。ミトコンドリア形態はミトコンドリア機能と関連していることから、心筋リモデリングにおいてミトコンドリア形態制御が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今までの研究から心筋リモデリングの進展に Nox 由来の酸化ストレスが重要であることが明らかとなっているが、心筋細胞において Nox4 をノックダウンするとミトコンドリア形態が変化することから (preliminary data)、Nox4 由来酸化ストレスがミトコンドリア形態を制御していることが推察された。本研究におけるこれまでの研究成果から心筋梗塞後のミトコンドリアダイナミクスに関連する蛋白の経時的変化が示された (図 3)。

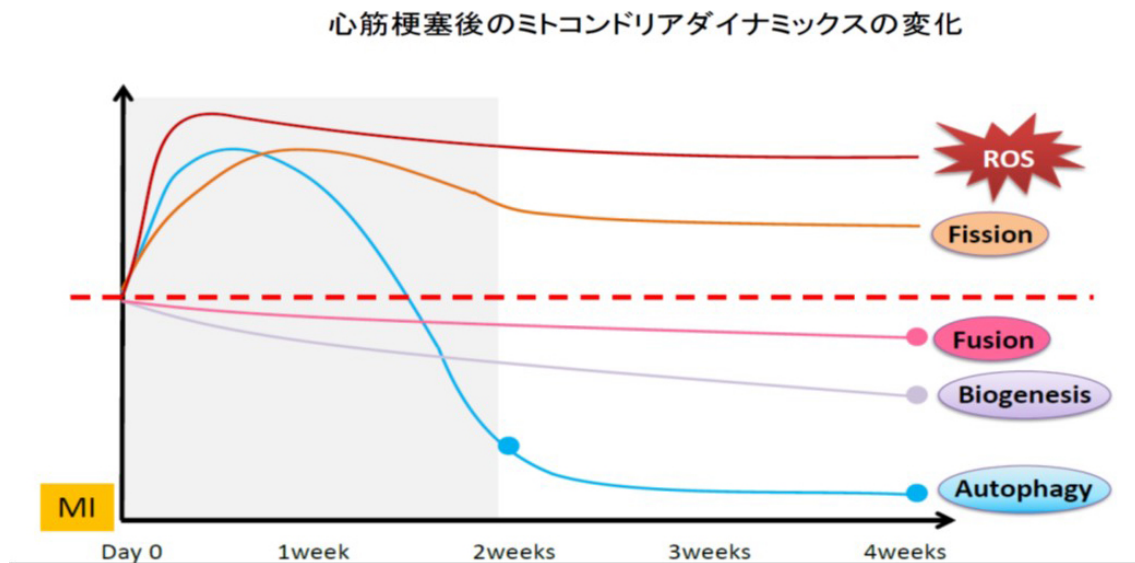


図 3. 心筋梗塞後のミトコンドリアダイナミクスの変化
心筋梗塞後の心筋細胞ではミトコンドリア fission が亢進する。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学の筒井裕之、絹川真太郎、松本純一、ラトガス大学の佐渡島純一である。

文 献

- 1) Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012 Aug 31;337(6098):1062-5. doi: 10.1126/science.1219855.
- 2) Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010 Apr 16;106(7):1253-64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.213116.
- 3) Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31;107(35):15565-70. doi: 10.1073/pnas.1002178107. Epub 2010 Aug 16.