

遠隔臓器障害による心筋ミトコンドリア障害の検討

野入英世¹⁾, 岡本好司²⁾, 小笠原絵美³⁾

1) 東京大学医学部附属病院

2) NIH/NIDDK

3) 筑波大学大学院

【研究の背景】

遠隔臓器間のクロストークは、臨床的には例えば心機能が低下すると尿量が減じるように、古くから知られていた。これは、心筋梗塞の急性期において臨床的にはしばしば経験されるもので、心機能の急激な変化が急激な腎機能の変化を惹起する例である。腎臓は心拍出量の 20%を受け止めており、循環動態を密接に制御している。このような病態をもとにして、急速な腎機能の悪化に基づく心機能低下、慢性的な心機能低下による腎機能低下、慢性的な腎機能低下による心機能低下といったシナリオが想定され、議論されつつある。これは、近年の C. Ronco の JACC での総説が皮切りとなっているが、急性あるいは慢性の心機能低下すなわち急性あるいは慢性腎不全に基づく腎機能低下という方向性からの病態についてのみ許容できるとする臨床家や研究者がまだまだ多いのが現状である。急速な腎機能の低下による心臓への影響は、特に一過性の急性腎障害では、どの程度の影響が心臓へ生じるのかは疑問視されやすく、これまでその現象を示して、更に病態へ介入した検討は行われたことがなかった。

研究チームでは、遠隔臓器障害を近年の研究テーマの一つとしている。その手始めに腎機能が遮断され尿毒症が発症した際に来す肺への影響を検討した (Am J Pathol 177, 1665-73, 2010)。更に腎臓での虚血再灌流障害の遠隔臓器効果へと解析を進め、心臓の電顕用標本を昨年透過電顕により観察したところ、シャム手術を腎臓に実施したものと比較して、心筋ミトコンドリアが小さく不揃いとなっていることを確認した (下図透過電顕写真参照)。

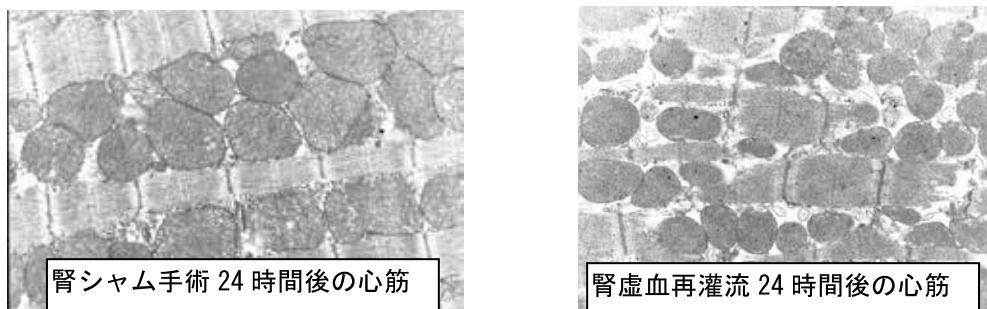


図1

即ち、一過性の急速な腎機能障害により、心筋障害を生じたことを見いだした可能性があるため、さらに研究を推進するために本研究助成へ応募した。

【目 的】

遠隔臓器同士のクロストークの重要性が認識されている。心腎連関がその一つで心不全に起因する腎障害を指す。心臓が原因での遠隔臓器障害は数多く検討されているが、その逆の検討は極めて数少ない。我々はこれまでの検討で、腎虚血再灌流による心ミトコンドリアでの形態変化を電顕的に捉えることに成功したため、本研究では他臓器の虚血再灌流障害が心ミトコンドリアへ及ぼす影響を分子生物学的・生化学的に検討する。これまで他臓器の手術侵襲で顧みられることのなかった心筋ミトコンドリアへの影響を解明する。

【方 法】

ミトコンドリア形態変化が遠隔臓器として心筋に生じることを受けて、心筋での分子メカニズムを検討する。

形態変化は、心筋ミトコンドリアで融合 (Fusion) と断片化 (Fission) に該当する所見が生じていると考えてよい。そこで、その分子メカニズムと、心筋の障害について検討を行う。

〔心筋ミトコンドリア Fission, Fusion の検討〕

- ・ミトコンドリア Fission 蛋白として dynamin-related protein (Drp1)
- ・ミトコンドリア Fusion 蛋白として mitofusion 1/2 (Mfn1/2)、optic atrophy protein 1 (OPA1)

の検討を実施する。同時にチトクローム C の解析を実施する。

また、これらの機序の関与を確認したところで、阻害剤による検討を実施する。例えば、Drp1 に対しては Mdivi-1 による阻害効果が得られるため、Fission を阻害することによる障害減弱効果を検討することが可能となる。効果は血清尿素窒素を指標に簡単に評価可能である。

〔心筋 apoptosis 検討〕

次に、このようなミトコンドリアの形態変化は、組織の apoptosis を誘導することが知られているために、心筋における apoptosis を蛋白解析としては caspase 3、免疫組織学的には TUNEL 染色や ssDNA 染色により実施する。また、今回心筋ミトコンドリアの形態変化を腎臓での虚血再灌流障害発症 24 時間後に発見したが、心筋での apoptosis が誘導されるのは 24 時間以降の可能性も高いので、時間を追って採材し、心筋での apoptosis の経過を追うこととする。

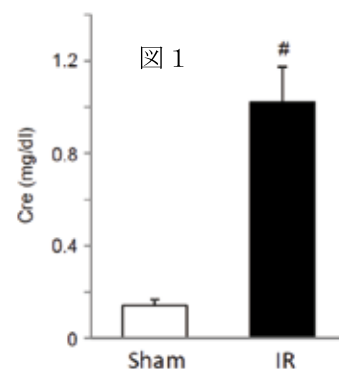
〔心筋ミトコンドリア障害が与える心機能変化の検討〕

心筋ミトコンドリア障害を生じる病態は、心機能に影響を与えるレベルかどうかを生理学的に検討する。現在検討しているのは、小児用心臓超音波装置をマウス用に改良した機器を用いた検査で経時的に行う。

【結 果】

〔マウス腎虚血再灌流モデルの検討〕

マウスに 30 分の腎虚血をかけて、その後に再灌流して急性腎障害を発症される手法が近年報告されている。当該研究室からも報告しており、その確認検討を行った。図 1 に示すように虚血再灌流 24 時間後に有意に血清クレアチニン値が上昇することを示している。尚、血清クレアチニン値はマウスでは、比色反応が用いにくいことが知られており、HPLC により測定した。



〔心筋ミトコンドリア Fission, Fusion の検討〕

生理的にミトコンドリアは fusion と fission を繰り返しており、虚血状態が生じると断片化しやすいことが知られている。Fusion に関わる蛋白は、Mfn1/2、OPA1 であり、fission に関わる蛋白は Drp1 で一部を Fis1 が担う。これらの蛋白発現のバランスにより制御されている。

心筋のミトコンドリア分画を抽出して、これらの蛋白に対する抗体を用いたウェスタン解析を行うと、図 2 (次頁) のように、fusion に関わる Mfn1/2、OPA1 では特段の差が認められなかったが、fission に関わる Drp1 は腎虚血再灌流を生じた個体からの心筋で発現が有意に上昇することを確認した。電顕所見は Drp1 依存的に生じていると考えられた。

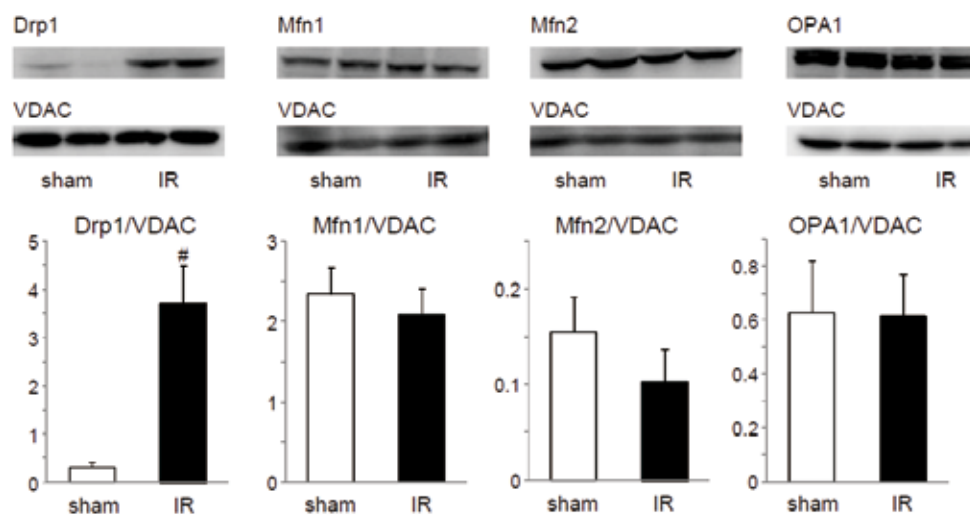


図 2

そこで、Mdivi-1 で Drp1 の細胞質からミトコンドリアへの移動を抑制することで、心筋ミトコンドリアの fission を抑制できるかを検討した。図 3 に示すように Drp1 は抑制され、電顕でもミトコンドリアの fission の減少が確認された(図 4)。

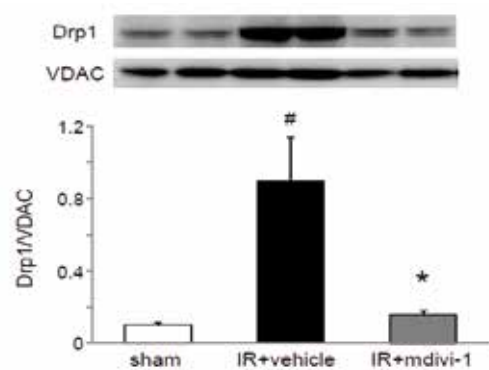


図3

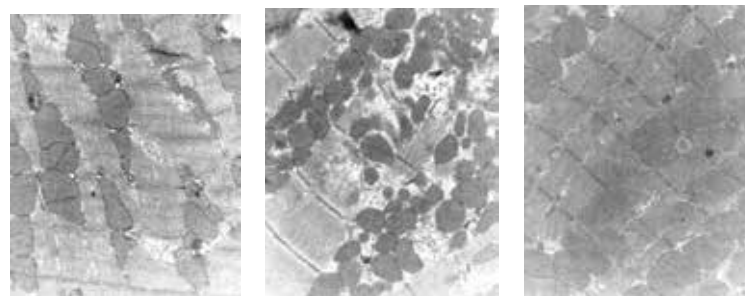


図 4 Sham IR + vehicle IR + Mdivi-1

〔心筋 apoptosis 検討〕

ミトコンドリアが断片化すると、細胞質にチトクローム C が放出され、これによりカスパーゼ 3 が活性化されるため、アポトーシスが促進されることが知られている。

そこで、心筋のチトクローム C を解析すると、図 5 のように急性腎障害を受けた個体の心筋において有意に上昇することが確認された。これを受けて、心筋のカスパーゼ 3 を測定すると、図 6 のように有意に上昇することが確認され、しかも急性腎障害を受けた個体の心筋において経時的にその割合が増強することが示された。更に、Mdivi-1 によりカスパーゼ 3 の活性を抑制しうることが示された(図 7)。

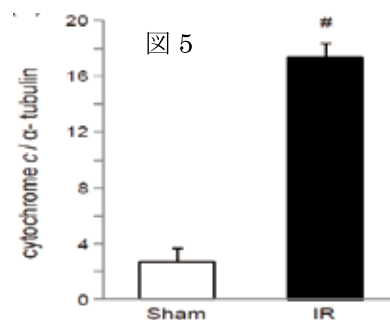


図 5

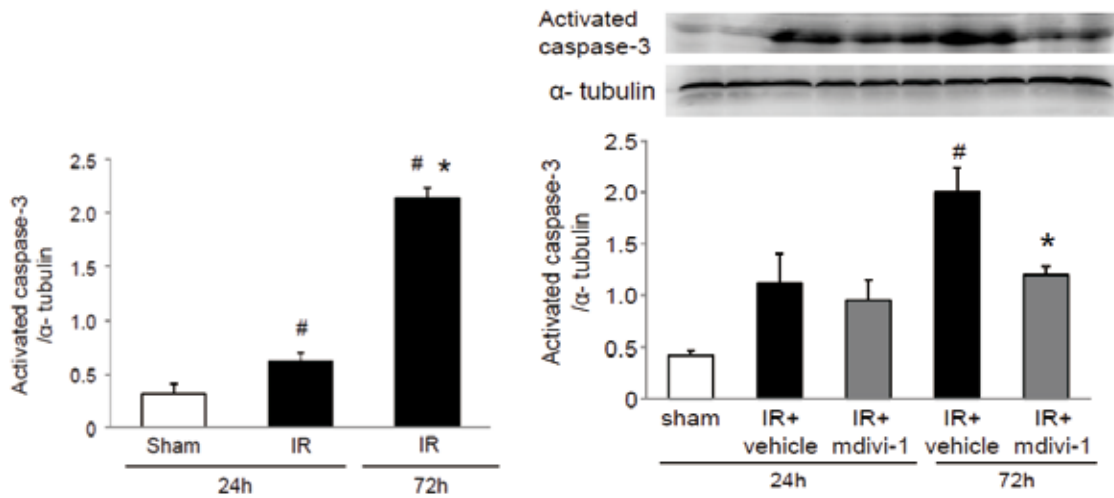


図 6

図 7

〔心筋ミトコンドリア障害が与える心機能変化の検討〕

以上のミトコンドリアの fission に関わる分子メカニズムから、アポトーシスが誘導され、更に 72 時間にわたって増強されるという現象が、心機能そのものにどのような変化をもたらしているかを観察するために、経時的な心臓超音波検査を行った。それによると、24 時間では心機能の目覚ましい変化は認められなかったが、観察時間を腎虚血再灌流障害から 72 時間まで広げることにより、図 8 で示されるように %FS の有意な低下を、急性腎障害を受けた個体の心機能において認めた。その低下は Mdivi-1 を投与することにより抑制しうることがわかった(図 9)。

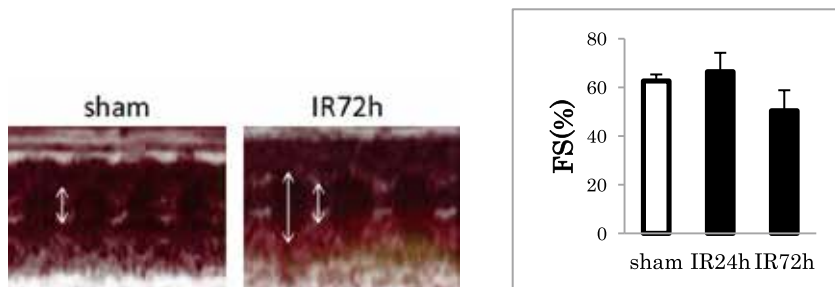


図8

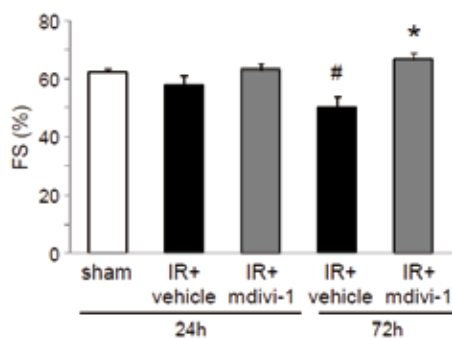


図 9

【考 察】

心機能障害と腎機能障害は、特に集中治療を要する重症患者で協働することは知られつつも、一つの臓器障害が他方へ直接的に影響していることを示すのは困難なことが多い。心腎連関という概念がしばしば用いられるが、腎障害が心機能障害をもたらすことを直接的に示した報告はこれまでなかった。本研究成果は、初めてその実態を示すことに成功した。特に、

心筋ミトコンドリアのレベルでこれを感じて形態的变化を示し、更にアポトーシスを誘導すると共に、これが経時的に増強し、急性腎障害が惹起されて 24 時間後には明確でなかった心機能障害が、72 時間後には明確となることも示された。このような心筋ミトコンドリアの障害は、fission を誘導する Drp1 が関与している。Mdivi-1 による GTPase 活性の低下作用が、Drp1 の細胞質からミトコンドリアへの移動を抑制することで fission を制御すると心筋障害及び心機能障害が抑制できることが本検討により、初めて明らかとなった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、心筋ミトコンドリアの形態的变化を手始めにミトコンドリアを中心とした分子メカニズムを解析することから、心腎連関ならぬ腎心連関の病態のメカニズムを明確化した。そして、心機能障害は腎機能障害の極期より少し遅れて生じる可能性も示唆している。実際の臨床においても、急性腎障害が生じた場合にこのような視点で心機能の潜在的な変化の可能性を、注意深く観察する必要がある。例えば、人工心肺を用いる心臓手術後に生じる急性腎障害が、術後心機能の立ち上がりを悪くする要因として働いていると積極的に推察することができる。このような視点からの創薬へのターゲットを考えることが可能となると期待される。

【参考・引用文献】

- Sumida M, Doi K, Ogasawara E, Yamashita T, Hamasaki Y, Kariya T, Takimoto E, Yahagi N, Nangaku M, Noiri E.*
Regulation of mitochondrial dynamic by dynamin-related protein-1 in acute cardiorenal syndrome.
J. Am. Soc. Nephrol., 26: 2378-87, (2015)
- Katagiri D., Hamasaki Y., Doi K., Okamoto K., Negishi K., Nangaku M., Noiri E.*
Glucagon-like peptide-1 attenuates cisplatin-induced renal injury: a gut-kidney connection in acute kidney injury.
J. Am. Soc. Nephrol., 24: 2034-43, (2013)
- Doi K., Katagiri D., Negishi K., Hasegawa S., Hamasaki Y., Fujita T., Matsubara T., Ishii T., Yahagi N., Sugaya T., Noiri E.*
Mild elevation of urinary biomarker in prerenal acute kidney injury.
Kidney Int. 82, 1114-1120 (2012) [IF, 7.916; citation, 3]
- Okamoto K., Tokunaga K., Doi K., Fujita T., Suzuki H., Katoh T., Watanabe T., Nishida N., Mabuchi A., Takahashi A., Kubo M., Maeda S., Nakamura E., Noiri E.*
Common variation in GPC5 is associated with acquired nephrotic syndrome.
Nat. Genet. 43, 459-63 (2011)
- Ishii T., Doi K., Okamoto K., Imamura M., Dohi M., Yamamoto K., Fujita T., Noiri E.*
Neutrophil elastase contributes to acute lung injury induced by bilateral nephrectomy.
Am. J. Pathol. 177, 1665-73 (2010)
- Maeda-Mamiya R., Noiri E.*, Isobe H., Nakanishi W., Okamoto K., Doi K., Sugaya T., Izumi T., Homma T., Nakamura E.
In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene.
Proc. Nat. Acad. Soc. USA. 107, 5339-5344 (2010)
- Noiri E.*, Doi K., Negishi K., Tanaka T., Hamasaki Y., Fujita T., Portilla D., Sugaya T.
Urinary fatty acid binding protein 1: An early predictive biomarker of kidney injury.
Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 296:F669-F679 (2009) [IF, 3.711; citation, 27]
- Noiri E.*, Nakao A., Uchida K., Tsukahara H., Ohno M., Fujita T., Brodsky S.V., Goligorsky M.S.
Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia.
- Doi K., Suzuki Y., Nakao A., Fujita T., Noiri E.*
Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney.

- Kidney Int.*** 65, 1714-1723 (2004) [IF, 7.916; citation, 65]
- Am. J. Physiol.*** 281, F948-F957 (2001) [IF, 3.612; citation, 145]
10. Noiri E., Yokomizo T., Nakao A., Izumi T., Fujita T., Kimura S., Shimizu T.*
An *in vivo* approach showing the chemotactic activity of leukotriene B₄ in acute renal ischemic-reperfusion injury.
Proc. Nat. Acad. Soc. USA 97, 823-828 (2000) [IF, 9.737; citation, 57]
11. Noiri E., Peresleni T., Miller F., Goligorsky M.S.*
In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia.
J. Clin. Invest. 97, 2377-2383 (1996) [IF, 12.812; citation, 268]