

## 心筋ミトコンドリアエネルギー代謝制御による心不全の新規治療法開発

尾池雄一

熊本大学 大学院生命科学研究部

## 【研究の背景】

心不全は、高血圧症や虚血性心疾患、心筋症などの様々な原因により生じた心機能低下による末梢循環不全状態である。医学・医療技術の目覚ましい進歩にもかかわらず、重度の心不全患者においてはその5年生存率が約50～60%と低く、依然として非常に予後不良である。さらに、心不全患者数は今後も世界規模で増加することが予想され、超高齢社会を迎えた本邦においては特に高齢者の心不全患者数の増加が問題となっている。

組織・臓器では、内的・外的ストレスに応答して細胞内のシグナルや代謝が変化し、様々な細胞間相互作用に起因する組織応答・修復が生じることで、恒常性が維持されている。一方、この恒常性が変容・破綻すると多彩な疾患の発症に繋がる。心臓以外の組織では、幹細胞システムに依存した組織修復が生じることに加え、その動き(機能)を低下させることで応答・修復を行うことが可能である。しかし、心臓は生命維持に必須の臓器であるため、動き続けながら迅速に修復する必要があり、動き続ける故に大量の ATP を必要とする心筋細胞は、ミトコンドリア機能に強く依存する。近年、ミトコンドリアの量や質の制御が心機能維持に重要であるという報告が散見され、ミトコンドリア機能と心機能との連関が注目されている。例えば、ミトコンドリア生合成に関わる TFAM を全身で過剰発現させたマウスは、心筋梗塞による心機能およびミトコンドリア呼吸機能低下に抵抗性を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。また、ミトコンドリア融合制御不全が、心不全発症を引き起こすことも報告されている<sup>2)</sup>。

これまでの研究成果として、申請者は、加齢や高血圧などの圧負荷により心筋細胞におけるアンジオポエチン様タンパク質 2 (ANGPTL2) の発現が誘導され、その結果、心筋細胞における Akt-SERCA2a 経路を介した細胞内カルシウム濃度調節機能および心筋ミトコンドリアエネルギー代謝の減弱による心機能低下が惹起され、心不全発症・進展に繋がること(図 1)、逆に心筋での ANGPTL2 産生及び分泌抑制が、細胞内カルシウム濃度調節機能および心筋ミトコンドリアエネルギー代謝促進による心保護作用を示すことを示した<sup>3)</sup>。また最近、我々は、我々が同定した心筋に豊富に発現する新規 lncRNA CELR-X が心保護作用を有すること、加齢や圧負荷による心機能低下に伴いその発現が低下し心不全を引き起こすことを解明した(論文リバイス中)。また、CELR-X 遺伝子改変マウスの心筋を用いたプロテオーム解析から、CELR-X の標的分子として DNA 損傷応答の活性化に関わることが報告されている target of CELR-X 1 (TCX-1) を同定した。近年、圧負荷に伴う心筋細胞での DNA 損傷応答活性化が心不全の発症・進展に繋がることが注目されている。我々は、CELR-X が、TCX-1 mRNA との相互作用によりその翻訳を阻害することで、心筋細胞における DNA 損傷応答を抑制し、心保護作用を示すことを明らかにした(論文リバイス中)。さらに、野生型マウスに比べ CELR-X Tg マウスの心筋組織では、ミトコンドリア DNA コピー数や TFAM およびミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成因子が増加し、逆に CELR-X KO マウスでは減少していることを見出し、CELR-X がミトコンドリア生合成を促進することで心保護的に作用することが示唆された(論文リバイス中)。以上より、心筋におけるミトコンドリアエネルギー代謝機能を促進することが、心不全の治療戦略として重要であると考えられた。

## 【目 的】

心保護作用を有することを明らかにした CELR-X による心臓組織のミトコンドリア生合成・エネルギー代謝制御機構の解明を目的とする。

【方 法】

CELR-X の KO や Tg マウスの心筋組織から単離したミトコンドリアを用い、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア呼吸機能解析及び blue native-PAGE (BN-PAGE) によるミトコンドリア呼吸鎖複合体解析を行った。また、CELR-X の標的分子として同定した TCX-1 が CELR-X によるミトコンドリアエネルギー代謝機能制御に関わっている可能性を検討する目的で、TCX-1 を過剰発現したラット心筋細胞株 H9c2 を用い、TMRM によるミトコンドリア膜電位及び細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア呼吸機能の検討を行った。さらに、ヒト iPS 由来心筋細胞において、ヒト CELR-X のノックダウンを行い、ミトコンドリア呼吸機能の検討を行った。

【結 果】

CELR-X の KO や Tg マウスの心筋組織から単離したミトコンドリアを用い、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア呼吸機能解析を行った。CELR-X Tg マウスでは、野生型マウスと比べてミトコンドリア呼吸機能に差異は認められなかった(図 1)。また、これまでの結果として、CELR-X Tg マウスでは心筋組織におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成因子が増加することを明らかにしていたが、単離心筋ミトコンドリアを用いた BN-PAGE 解析では、野生型マウスと Tg マウス間でミトコンドリア呼吸鎖複合体の量に差を認めなかった(図 2)。一方、CELR-X KO マウスでは、野生型マウスと比べてミトコンドリア呼吸機能が有意に低下していることが明らかとなった(図 3)。さらに、CELR-X KO マウスでは、単離心筋ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I と III の増加が認められた(図 4)。

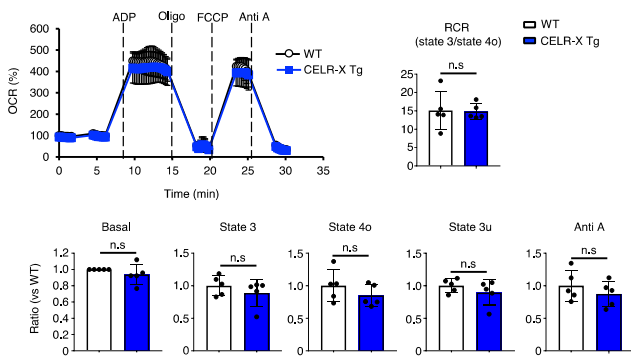


図 1. CELR-X Tg マウスの単離心筋ミトコンドリアを用いた呼吸機能解析

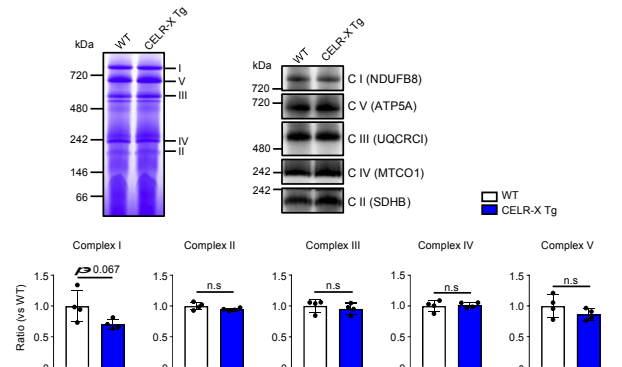


図 2. CELR-X Tg マウスの単離心筋ミトコンドリアを用いた BN-PAGE 解析

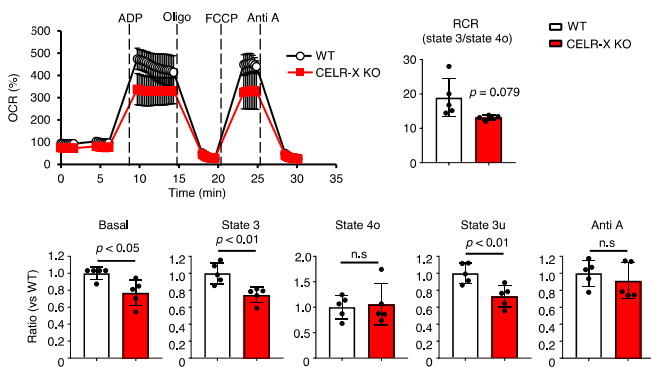


図 3. CELR-X KO マウスの単離心筋ミトコンドリアを用いた呼吸機能解析

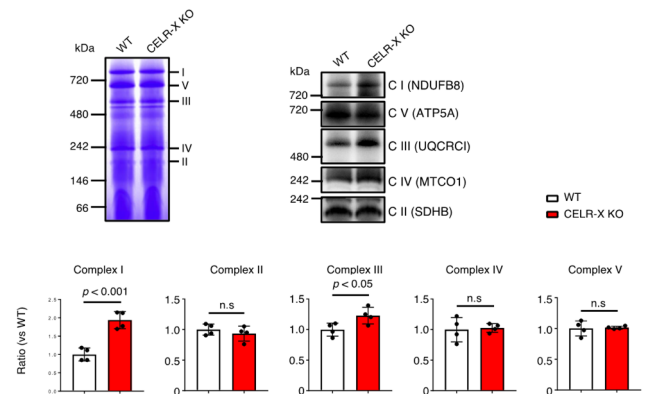


図 4. CELR-X KO マウスの単離心筋ミトコンドリアを用いた呼吸機能解析

次に、TCX-1 が CELR-X によるミトコンドリアエネルギー代謝機能制御に関わっている可能性を検討する目的で、TCX-1 を過剰発現した H9c2 細胞を用い、ミトコンドリア膜電位を測定したところ、TCX-1 を過剰発現させた細胞においてミトコンドリア膜電位の低下が認められた(図 5)。そこで、これらの細胞を用い、ミトコンドリア呼吸機能を検討したところ、TCX-1 を過剰

発現させた細胞ではミトコンドリア呼吸機能が有意に低下していることが明らかとなった(図 6)。

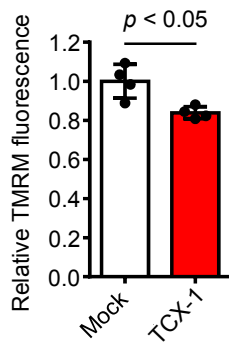


図 5. TCX-1 を過剰発現させた H9c2 細胞におけるミトコンドリア膜電位

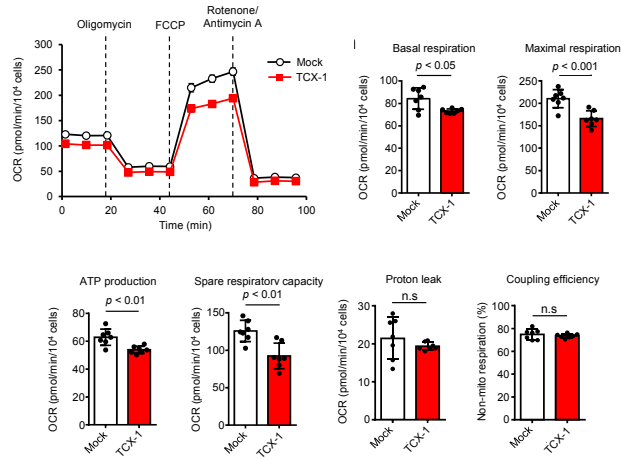


図 6. TCX-1 を過剰発現した H9c2 細胞を用いた呼吸機能解析

最後に、ヒト iPS 由来心筋細胞を用いて CELR-X のノックダウンを行い、ミトコンドリア呼吸機能の検討を行った。その結果、ヒト CELR-X をノックダウンした細胞においてミトコンドリア呼吸機能が有意に低下していることを明らかにした(図 7)。

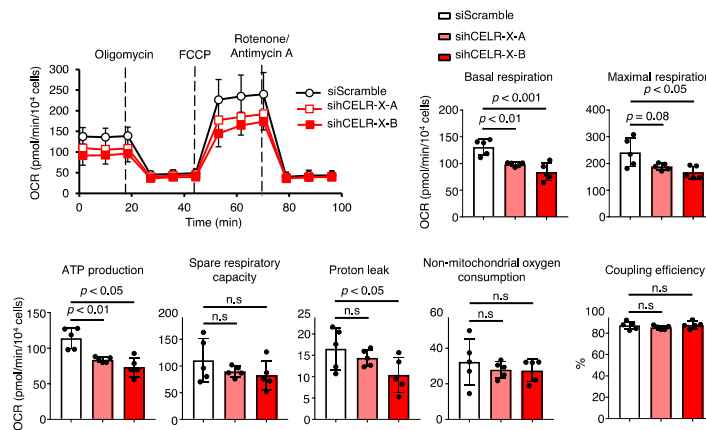


図 7. ヒト CELR-X をノックダウンしたヒト iPS 由来心筋細胞における呼吸機能解析

## 【考 察】

我々はこれまでの研究成果から、CELR-X Tg マウスが心不全発症に対して抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、CELR-X Tg マウスでは TFAM 発現増加によるミトコンドリア生合成の促進が認められた。本研究において、CELR-X Tg マウスの単離心筋ミトコンドリアの呼吸機能及びミトコンドリア内にアセンブルされた呼吸鎖複体の量に変化を認めなかったことから、CELR-X Tg マウスで認められた心保護作用は、ミトコンドリア機能亢進によるものではなく、ミトコンドリア数の増加(ミトコンドリア生合成)に依存したものであることが示唆された。一方、CELR-X KO マウスではミトコンドリア呼吸機能の低下が認められ、CELR-X をノックダウンしたヒト iPS 由来心筋細胞においても同様にミトコンドリア呼吸機能の低下が観察された。さらに、TCX-1 を過剰発現させた H9c2 細胞においてもミトコンドリア呼吸機能の低下を認めた。CELR-X KO マウスの心臓組織では、TCX-1 発現が増加していることから、TCX-1 発現増加がミトコンドリア呼吸機能低下を引き起こしていることが示唆された。また、CELR-X KO マウスでは、ミトコンドリア呼吸鎖複体 I と III の増加が認められたが、ミトコンドリア呼吸機能低下に対する代償応答としてこれらの呼吸鎖複体が増加している可能性が考えられた。以上より、CELR-X は、TFAM を介したミトコンドリア生合成の促進、及び、TCX-1 発現増加を阻害することで TCX-1 によるミトコンドリア呼吸機能低下を抑制し、ミトコンドリアエネルギー代謝機構促進による心保護効果をもたらすことが示唆された。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、心筋細胞のミトコンドリア機能亢進によるエネルギー代謝促進が、心不全の新規治療戦略として注目されている<sup>4)</sup>。我々は、心筋における CELR-X の発現が、高血圧などの圧負荷や加齢によって低下することを明らかにしており、生体で CELR-X の発現量を維持もしくは増進することが可能となれば、ミトコンドリアエネルギー代謝機構を標的とした新規心不全治療戦略の創出につながることを期待される。また、ヒト iPS 由来心筋細胞においても CELR-X 発現低下によってミトコンドリア呼吸機能が低下することから、CELR-X を介したミトコンドリアエネルギー代謝機構の制御がヒトにおいても有効であると推察される。さらに、超高齢社会を迎えた本邦においては特に高齢者の心不全患者数の増加が問題となっており、医療経済の面においても重要な課題であることから、本研究の成果に基づいた新規治療法開発は重要な意義を持つ。今後、CELR-X の発現を誘導可能な化合物スクリーニングやアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療法を中心に、ミトコンドリアエネルギー代謝機構制御による心不全の新規治療法開発を展開していく予定である。

## 【参考・引用文献】

1. Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation* 112: 683-690, 2005.
2. Wai T, Garcia-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, Ruperez FJ, Barbas C, Ibanez B, Langer T. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science* 350: aad0116, 2015.
3. Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M, Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. *Nat Commun* 7: 13016, 2016.
4. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, Cleland JGF, Colucci WS, Butler J, Voors AA, Anker SD, Pitt B, Pieske B, Filippatos G, Greene SJ, Gheorghide M. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 14: 238-250, 2017.