

CRISPR ライブラリを用いた新規マイトファジー制御因子の発見と心不全治療への応用

樋口雄亮

京都府立医科大学大学院医学系研究科 循環器内科学

【研究の背景】

心不全患者は高齢化社会に伴って日本だけでなく世界中で急増しており、診断から5年で50%の死亡率と高く効率的な新規治療法の確立が重要と考える。心不全の要因として虚血性心疾患・高血圧症・弁膜症が挙げられるが、これらは心臓における局所心筋虚血が関与していることが知られている。

心筋細胞は筋収縮に多くのエネルギーを必要とし、エネルギー生成源としてミトコンドリアが重要であることは知られている。実際に心不全患者では心筋のミトコンドリアに形態的・機能的異常が生じている。これは、ミトコンドリア品質管理機構であるマイトファジーの破綻に伴い異常ミトコンドリアが蓄積していることを示している。以上からもマイトファジーの制御はアポトーシスを誘導する異常ミトコンドリアを除去するための有望な治療標的として考えられる。

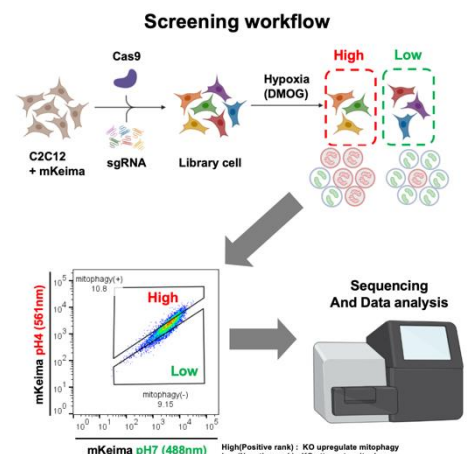
マイトファジー誘導経路として PINK1-Parkin 経路が詳細に知られているが、低酸素下におけるマイトファジーの誘導において主要な原因遺伝子や分子メカニズムは十分に解明されていないため、その解明は心不全治療の有効な標的になると考えられる。

【目 的】

生理的条件を反映する低酸素下でのミトコンドリアの品質管理機構であるマイトファジーの制御機構については十分に解明されていない。そこで、本研究では CRISPR ライブラリを用いた網羅的手法により低酸素下でのマイトファジー制御機構を解明し、ミトコンドリアの品質制御を中心とした新たな心不全治療法の確立を目指す。

【方 法】

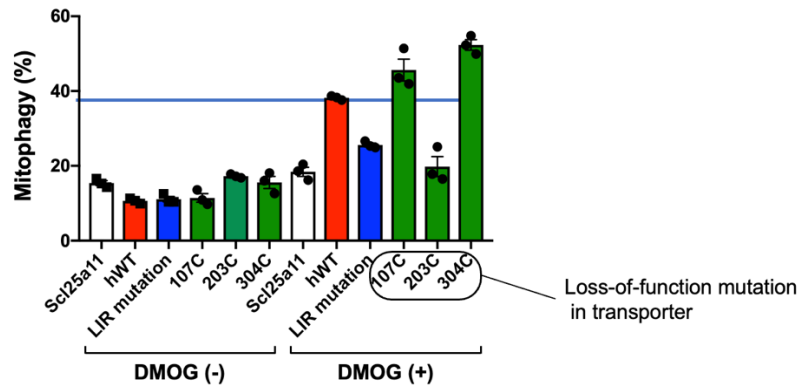
低酸素下におけるマイトファジーの制御因子を網羅的に評価するため、In Vitro で低酸素刺激におけるマイトファジー制御遺伝子について CRISPR スクリーニングを行う（横図参照）。マイトファジーの評価のため mito-Keima を導入した C2C12 細胞に 20000 種類以上の遺伝子をノックアウトした細胞群を作成した。低酸素刺激として HIF インヒビターである DMOG 刺激を行い、マイトファジーが誘導された群（High）と誘導されなかった群（Low）に分け解析した。得られた結果から、実際にマイトファジーが制御されているかを評価し、そのメカニズムをタンパク相互作用や細胞内シグナルの観点から解明していく。



【結 果】

スクリーニングの結果から低酸素刺激におけるマイトファジーを制御する遺伝子の一つに Slc25a11 が挙げられた。これまでに報告されている HIF1a などと比較してもより強い制御を認めた。次に Slc25a11 を過剰発現させたと、マイトファジーの促進が確認された。そこで、Slc25a11 の機能を検索したところグルタチオトランスポーターであること、タンパク質としての性質を

評価したところ LC3 認識配列である LIR モチーフを有することが分かった。まず、LIR モチーフに変異を加えたところ、マイトファジーが抑制された。続けて、トランスポーターとしての機能を失活させる部分に変異を加えたところ、マイトファジーへの影響は変異部位によって様々であった。(下図参照)



【考 察】

本研究の特色は CRISPR ライブラリによる網羅的手法を用いることでマイトファジーの誘導に関与する新規遺伝子を既知の遺伝子も含めて順位付けを行い評価できる点である。その上で Slc25a11 が今回のスクリーニングで強くマイトファジーを制御する因子であることを発見した。Slc25a11 は LIR モチーフに加え、トランスポーターとしての役割を持つ。LIR モチーフに変異を加えることでマイトファジーを部分的に抑制することが確認された。このことから、Slc25a11 がマイトファジーを制御するメカニズムには LC3 依存的なメカニズムに加えて、トランスポーター機能を含めた他のメカニズムも関与している可能性が考えられた。

今後、①Slc25a11 の失活や過剰発現とミトコンドリア機能の関係、②変異部位とマイトファジーへの影響を検討していくことが重要と考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

Slc25a11 を中心とした低酸素下でマイトファジー制御メカニズムを細胞内分子レベルで解明することで、生理的条件下での制御を反映することで治療標的として有効性が高いと考えられる。

【参考・引用文献】

- (1) Salim S et al. Virani. Circulation. 2020
- (2) Yibo Yang et al. Aging Dis. 2020
- (3) Xiaonan Liu et al. Nature communications. 2018
- (4) Julia Joung et al. Nat Protoc. 2017
- (5) Na Ta et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022