

心筋炎症における細胞質ミトコンドリア DNA 制御機構の解明

松島将士

九州大学大学院医学研究院 循環器内科学

【研究の背景】

心不全の病態基盤である心筋リモデリングには心筋炎症が密接に関与している。我々は心筋炎症が心不全の病態進展において中心的な役割を果たしていることを明らかにした。また、心筋障害にはミトコンドリア DNA (mtDNA) の修飾も関与するが、特に、不全心では心筋細胞の細胞質に出現した mtDNA が DAMPs として TLR9-RIPK3-NLRP3 (インフラマソーム) 系を介して心筋炎症を惹起し、その細胞質 mtDNA を中和することで心筋炎症、心筋リモデリングが改善することを見出した¹⁾ (*Circ Res.* 2023)。細胞質 mtDNA が制御できれば心筋炎症、心不全の治療につながるが、細胞質に mtDNA が出現する機序については未だ明らかとなっていない。一方で、不全心筋や心筋炎症においてミトコンドリア障害が重要であることが知られている。我々は酸化ストレスが増加することでミトコンドリア障害、心機能障害が進展することを明らかにしてきた²⁻⁴⁾ (*Circ Res.* 2013, *J Clin Invest.* 2016, *Hypertension.* 2020)。これらの知見からミトコンドリア障害が細胞質 mtDNA の挙動に関連している可能性がある。本研究はミトコンドリア機能障害という観点から心筋細胞の細胞質に mtDNA が出現する機序およびその制御機構を解明し、新たな心筋炎症、心不全の治療法の確立を目指すものである。

【目 的】

あらゆる心疾患の終末像である心不全の病態には心筋炎症が中心的な役割を果たしている。ミトコンドリア DNA は内因性の damage-associated molecular patterns (DAMPs) として心筋炎症を惹起することが知られているが、細胞質におけるミトコンドリア DNA の挙動については明らかとなっていない。本研究の目的は『心筋炎症における細胞質ミトコンドリア DNA 制御の分子機構を明らかにし、新たな心不全の治療標的を創出する』ことである。

【方 法】

(1) 酸化ストレスによるミトコンドリア機能および細胞質 mtDNA の評価

培養心筋細胞に H₂O₂ (1~100 μM)、アンジオテンシン II (1~100 μM) を添加し、ミトコンドリア機能、細胞質 mtDNA を評価し、ミトコンドリア機能障害と細胞質 mtDNA の関係を明らかにする。

- ①ミトコンドリア機能評価: Seahorse によるミトコンドリア呼吸能 (O₂ 消費)、ATP 産生
- ②細胞質 mtDNA の定量評価: RT-PCR 法
- ③炎症評価: IL-1β、IL-6 (RT-PCR 法)、TLR9、RIPK3、NLRP3 ((ウェスタンブロット (WB) 法)
- ④酸化ストレスの評価: Amplex red assay、HNE・S グルタチオン化 (WB 法)
- ⑤細胞死評価: cleaved caspase 3 (WB 法)、TUNEL 染色、LDH アッセイ、フェロトーシス評価

(2) 細胞質 mtDNA 制御に関わる因子の網羅的解析

上記(1)においてミトコンドリア外膜および内膜分画を抽出し、質量分析 (LC-MS/MS) を用いてそれぞれの分画で増加もしくは減少した蛋白を網羅的に解析する。

- ①増加した蛋白をノックダウンし上記(1)①~⑤の項目を評価し、細胞質 mtDNA 制御に関わる因子を同定
- ②減少した蛋白を過剰発現し上記(1)①~⑤の項目を評価し、細胞質 mtDNA 制御に関わる因子を同定

(3)新規細胞質 mtDNA 結合蛋白の同定

我々は細胞質 mtDNA に ZBP1 が結合することを明らかにした (Circ Res. 2023)。その他の結合蛋白を ZBP1 の免疫沈降法で抽出し、質量分析で同定し、同定された蛋白をノックダウンして機能解析を行う。

(4)不全心における酸化ストレス制御による細胞質 mtDNA 由来炎症抑制効果の検証

冠動脈結紮による梗塞後心不全モデルおよび圧負荷による心不全モデルを作成し、上記で同定された因子の阻害薬の投与により以下を検証する。

- ①生存率および心機能の評価:心エコーによる左室径、左室駆出率、左室壁厚、拡張能
- ②心筋リモデリングの評価:心筋細胞肥大(WGA 染色)、間質線維化(Picrosirius red 染色)
- ③細胞死:cleaved caspase 3、TUNEL 染色
- ④ミトコンドリア機能評価: Seahorse によるミトコンドリア呼吸能(O₂消費)、ATP 産生
- ⑤細胞質 mtDNA の定量評価:RT-PCR 法
- ⑥炎症評価:IL-1 β 、IL-6(RT-PCR 法)、TLR9、RIPK3、NLRP3(WB 法)
- ⑦酸化ストレスの評価:Amplex red assay、HNE・S グルタチオン化(WB 法)
- ⑧上記(2)(3)で同定されたタンパクの評価:WB 法

(5)新規細胞質 mtDNA 制御タンパクの機能解析および細胞外 mtDNA 取り込みの評価

AAV9 を用いて上記(2)で同定されたタンパクを上記(4)の心不全モデルにおいて心筋特異的にノックダウンし、(4)①~⑦と同様の項目を評価することで新規細胞質 mtDNA 制御タンパクの心不全における役割を検証する。もし変化がなければmtDNA が細胞以外から細胞内へ取り込まれている可能性があるため、上記(3)で同定されたタンパクをノックダウンして評価することで、mtDNA の動態評価を行う。

【結 果】

1. 培養心筋細胞に H₂O₂ (100 μ M) を添加し、seahorse にてミトコンドリア呼吸能を測定したところ、最大呼吸能の低下を認めた。H₂O₂ 添加により同様に細胞質ミトコンドリア DNA と小胞体ストレスマーカーである CHOP、PERK の上昇も認めた。さらに、様々なタンパクの評価を行いゴルジ体形態維持に関連するタンパク群の変化を同定した。
2. 上記で同定したタンパクの阻害薬およびノックダウンを行ったところ、ミトコンドリア機能の改善を認めた。
- 3-1. さらに上記阻害薬を心不全モデルマウスに投与したところ、心筋組織の酸化ストレスマーカーの減少に伴い、左室駆出率の改善および左室拡張末期径の縮小を認めた。
- 3-2. 阻害薬を心不全モデルマウスへの投与により心重量、肺重量の減少を認めた。
- 3-3. 阻害薬を心不全モデルマウスへの投与により心筋組織における心筋細胞肥大、間質線維化の減少を認めた。

【考 察】

ミトコンドリア障害に伴う細胞質ミトコンドリア DNA に小胞体ストレスやゴルジ体制御が関連していることが示唆された。また、これらの因子に関わる新たなタンパクへの介入が心不全の改善につながる可能性がある。今後は炎症の変化の評価が重要と考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体といった細胞内オルガネラへの介入が心不全治療の新たなターゲットとなる可能性があることが示された。今後の創薬に貢献することが期待される。

【参考・引用文献】

1. Enzan N, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Ishikita A, Yamamoto T, Sada M, Miyake R, Tsutsui Y, Nishimura R, Toyohara

- T, Ikeda Y, Shojima Y, Miyamoto DH, Tadokoro T, Ikeda M, Abe K, Ide T, Kinugawa S, Tsutsui H. ZBP1 protects against mtDNA-induced myocardial inflammation in failing hearts. *Circ Res.* 132(9):1110–1126. 2023
2. Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Park JY, Xie LH, Tian B, Sadoshima J. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 112(4):651–63. 2013
 3. Matsushima S, Kuroda J, Zhai P, Liu T, Ikeda S, Nagarajan N, Oka S, Yokota T, Kinugawa S, Hsu C, Li H, Tsutsui H, Sadoshima J. Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 126(9):3403–16. 2016
 4. Okabe K, Matsushima S, Ikeda S, Ikeda M, Ishikita A, Tadokoro T, Enzan N, Yamamoto T, Sada M, Deguchi H, Shinohara K, Ide T, Tsutsui H. DPP-4 Inhibitor Attenuates Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy via GLP-1-Dependent Suppression of Nox4-HDAC4 Pathway. *Hypertension.* 75(4):991–1001. 2020