

受賞者

桑原 宏一郎

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

研究テーマ

高齢者心不全における核-ミトコンドリア連関と心筋細胞死の役割の解明

1、はじめに

社会の高齢化に伴う高齢者心不全の増加が問題となっており、高齢者の心不全の背景に心筋細胞老化に伴う心筋細胞機能低下の存在が考えられている。しかし心筋細胞老化の分子メカニズムに関してはその詳細は明らかではない。近年ミトコンドリア機能と老化の関係が注目されており、骨格筋や心筋においても老化における臓器機能低下とミトコンドリア機能低下との関係が指摘されている。しかしどの分子が心筋老化におけるミトコンドリア機能低下の critical mediator であり、またどのような downstream pathways を経て機能不全につながるかといった分子メカニズムはまだ不明な点が多い。

最近我々は ANP・BNP をはじめとする心筋胎児型遺伝子の発現調節機構を研究する過程において、転写抑制因子 NR S F が重要な役割を果たしていることを見出し¹、組織特異的に発現するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が NR S F の機能制御に関与していることを明らかにした²。また転写抑制因子 NR S F の機能を阻害したマウスはヒト拡張型心筋症類似の病態を呈し、突然死することも報告した³。これらの研究を受けて、逆に転写を促進させる働きをもつ転写共役因子であるヒストンアセチル化酵素 (HAT) p300 の機能を心筋細胞で阻害したマウスを作成した (dnp300 Tg)。興味深いことにこのマウスは予想に反して生後数週間でうっ血性心不全により死に至る表現形質を示した。その原因をさらに検索したところ、このマウスではミトコンドリアの形態異常、増殖、さらにはミトコンドリア膜電位の低下を認め、ミトコンドリア遺伝子のマスターレギュレーターである PGC-1 α をはじめ複数のミトコンドリア遺伝子の発現低下も認めた。p300 は PGC-1 α の co-activator としてその転写活性に重要な役割を果たしていることから、我々は p300 の阻害による PGC-1 の機能低下がミトコンドリア機能低下を引き起こし、心不全発症の原因になっているものと考えた。さらにこれらミトコンドリア機能低下と心機能低下は老化に伴う心不全に関与している可能性が考えられているものでもある。そこで本研究は、上記我々が最近に得た心筋における核-ミトコンドリア連関に関する新たな知見を基に、さらにその分子機序の解析を進め、心筋老化メカニズムの解明とその治療法の探索につなげていくことを目的とする。

2. 方法

A, p300機能阻害による心不全病態の詳細な生理学的特性の解析

dnp300 Tgはうっ血性心不全にて生後数週にて死亡する。dnp300Tgの心機能について心エコー、心カテーター検査、心電図モニタリングを用いて詳細な生理学的検討を加える。

B, p300機能阻害による心筋ミトコンドリア機能低下にかかわる分子機序の詳細の検討

dnp300 Tgマウスの心室ではサイズの小さいミトコンドリアの著名な増殖とミトコンドリア膜電位の低下が認められ、ミトコンドリア機能異常が疑われる。dnp300 Tgにおけるミトコンドリア機能異常の分子機序とその特質について明らかにするため、ミトコンドリア代謝遺伝子とミトコンドリア機能の

解析を行う。

C, p300機能阻害による心不全病態における細胞死の関与とその分子機序の解析

ミトコンドリア機能低下はアポトーシスやオートファジー経路の活性化を介して細胞死を誘導することが知られることから、dnp300 Tgにおいて細胞死の有無、およびその分子経路について検討する。

D, 老化マウスの心筋におけるミトコンドリア機能低下とその分子機序に関する検討

実際の高齢マウスや老化モデルマウス (Klothoなど) を用いて心筋ミトコンドリア機能およびミトコンドリア遺伝子群の発現について観察し、p300-PGC-1経路が実際の心筋老化にどのように寄与しているかを検討する。

E, 核ミトコンドリア関連標的とした心筋老化新規治療法の検討

p300の活性化薬がdnp300 Tgマウスや高齢マウスや老化モデルマウスの心筋老化にどのような効果を及ぼすか検討する。

3. 結果

A, p300機能阻害による心不全病態の詳細な生理学的特性の解析

dnp300 Tgの心機能について心エコー、心カテーテル検査、心電図モニタリングを用いて詳細な生理学的検討を行なった。dnp300 Tgでは心エコーにて有意な左室駆出率の低下を認めた。また心カテーテルによる結構動態解析ではdnp300Tgにおける左室拡張末期圧の上昇を認めdp/dtの低下、negative dp/dtの障害を認めた。特にnegative dp/dtnの障害が顕著であり、収縮不全とともに明らかな拡張不全が存在し、それが拡張末期圧の上昇に関与している可能性が示唆された。また心電図モニタリング検査にて心房細動の発症を認めた。dnp300 Tgの心臓の病理学的所見では左室とともに左房の拡大と左房血栓をみとめ、上記左室拡張末期圧上昇、心房細動発症と矛盾しない結果であった。

B, p300機能阻害による心筋ミトコンドリア機能低下にかかわる分子機序の詳細の検討

dnp300 Tgマウスの心室ではミトコンドリア膜電位の低下が認められ、ミトコンドリア機能異常が疑われる。実際、FAOに関与するミトコンドリア遺伝子を調べたところそれら遺伝子の発現がdnp300Tgにおいては有意に低下していた。またこれら遺伝子を制御する転写因子であるPGC-1 α およびその下流に存在し同様にミトコンドリア遺伝子発現制御に係る転写因子であるERR α , PPAR α の発現が明らかに低下していた。PGC-1 α は転写因子MEF2により制御されるが、dnp300はMEF2によるPGC-1 α の転写を著明に抑制した。またPGC-1 α はp300とcomplexを形成し転写を活性化するが、dnp300はこのPGC-1 α complexによる転写活性化も有意に抑制した。これらのことから心筋におけるp300の機能阻害はPGC-1 α の発現低下、転写活性抑制を引き起こし、ミトコンドリア遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。

C, p300機能阻害による心不全病態における細胞死の関与とその分子機序の解析

ミトコンドリア機能低下はアポトーシスやオートファジー経路の活性化を介して細胞死を誘導することが知られることから、dnp300 Tgの心不全発症に関与する可能性が考えられる心筋細胞死について検討した。まずevans blue dyeを腹腔内に投与したところ、左室にその漏出を認め、dnp300 Tgにおける心筋細胞死が示された。次にその分子機序に関してアポトーシスの可能性を考え、DNAラダーアッセイおよびcaspase3活性を測定したが、これらの有意な活性化は認められなかった。一方で、電顕によりマクロオートファジー像がdnp300 Tgの左室心筋において認められ、LC3IIカテプシンDなど

オートファジーマーカーの増加も認めた。これらのことからオートファジーがdnp300 Tgの心筋細胞死の原因であることが明らかとなった。

D, 老化マウスの心筋におけるミトコンドリア機能低下とその分子機序に関する検討

実際の高齢マウスを用いてPGC-1 α , PPAR α の心臓左心室での発現を8週令と48週令のマウスとで検討したところ、48週令マウスで有意に低下していた。

E, 核ミトコンドリア関連標的とした心筋老化新規治療法の検討

上記結果よりp300の活性化薬がdnp300 Tgマウスや高齢マウスや老化モデルマウスのミトコンドリア機能低下に対し拮抗的に働く可能性が考えられるため今後p300活性化薬の心筋老化に対する効果を検討していく予定としている。

4. 考察

本研究からヒストンアセチル化酵素であるp300は心筋においてミトコンドリア関連遺伝子発現制御に特に重要な役割を果たしており、その機能低下がミトコンドリア機能低下を介して心機能低下の原因となりうることが示された。この結果は最近発表されたヒストン脱アセチル化酵素HDAC3のコンディショナルノックアウトでは逆に心筋におけるPPAR α の活性化が起こっていたとする結果⁴とも合致するものと思われ、PGC-1 α , PPAR α ミトコンドリア遺伝子転写経路に対してp300とHDAC3が重要な制御因子であることを示すものと考えられる。さらにこのp300-PGC-1 α , PPAR α 転写経路の発現が高齢マウスの心室において低下していたことは、心筋老化における心機能障害にこの転写経路の障害が関与していることを強く示唆するものと考えられた。今後この経路が高齢者心不全に対する有効な治療標的となりうるかどうかを検討する予定である。

5. 発表論文・参考文献

1. Kuwahara K, Saito Y, Ogawa E, Takahashi N, Nakagawa Y, Naruse Y, Harada M, Hamanaka I, Izmi T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kawakami R, Nakanishi M, Mori N, Nakao K. The neuron-restrictive silencer element-neuron-restrictive silencer factor system regulates basal and endothelin 1-inducible atrial natriuretic peptide gene expression in ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2085-2097.
2. Nakagawa Y, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Yasuno S, Adachi Y, Kawakami R, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Kinoshita H, Saito Y, Nakao K, Class II HDACs mediate CaMK-dependent signaling to NRSF in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41: 1010-1022.
3. Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *Embo J.* 2003;22:6310-6321.
4. Montgomery RL, Potthoff MJ, Haberland M, Qi X, Matsuzaki S, Humphries KM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:3588-3597.