

## Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(追加助成) &lt;概要&gt;

所 属	大阪大学大学院医学系研究科
氏 名	彦惣 俊吾
研究テーマ	心筋における慢性炎症機序の解明とその心不全治療への応用

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

## 【背景ならびに研究目的】

心不全の発症に炎症性サイトカインの増加や炎症細胞の浸潤などの慢性炎症が関与していることは知られているが、慢性炎症が惹起される原因、機序は十分に解明されていない。今回、私は、心筋における慢性炎症の原因にミトコンドリアが関与している可能性について着目し、検討をおこなうこととした。ミトコンドリアの由来は外来の細菌であることと考えられており、ミトコンドリア構成分子は細菌に特有な分子的特徴を有して自然免疫系を活性化する。また、心筋のストレス応答において、圧負荷により変質をきたした異常ミトコンドリアが増加するが、これらは細胞内分解機構であるオートファジー経路により分解され定常性が保たれる。以上より、本研究では心不全の原因分子として特にミトコンドリア DNA に着目し、心筋のストレス応答の過程で発生する異常ミトコンドリアに含まれるミトコンドリア DNA がストレス誘導性の慢性炎症、心不全発症の原因となっている可能性についてまずマウスモデルで検討し、さらに、これらの機序のヒトの心不全における役割、および心不全治療への応用の可能性を明らかにして、心不全治療への応用を目指すことを目的として検討をおこなった。

## 【研究方法】

1. 心筋慢性炎症ならびに心不全におけるミトコンドリア DNA の関与の検討
2. ミトコンドリア DNA の蓄積が心筋に及ぼす影響の検討
3. ヒト不全心における、DNase II 活性ならびに DNA 蓄積の検討
4. DNase II 活性増強による心不全治療法開発に向けた検討

## 【成果】

- ・ マウス心不全心筋において、DNase II の活性化が認められず、リソソームおよびオートファゴソームに DNA の蓄積が生じていることを見出した。
- ・ 心筋特異的 DNase II 欠損マウスは、圧負荷によりミトコンドリア DNA の心筋への蓄積と著明な心筋の炎症を呈し、心不全を発症することを見出した。また、ミトコンドリア DNA は Toll like receptor 9(TLR9)を介して炎症を惹起することを見出した。
- ・ TLR9 の阻害が、マウスにおける圧負荷による心不全発症を抑制しうることを見出した。
- ・ ヒトの心不全心筋における DNase II 発現が低下傾向にあることを確認できた。また、同じく、ヒトの特発性拡張型心筋症の心不全の心筋において、ミトコンドリア DNA の蓄積と考えられる所見を見出した。
- ・ 研究方法に記載した2種類の心筋特異的 DNase II 発現トランスジェニックマウスの作成に成功した。定常状態における心臓の表現型を検討し、定常状態では心臓の状態に大きな変化がないことを見出した。

## 【今後の展望】

DNase II の活性増強もしくは TLR9 阻害による心不全治療の可能性について検討を進めたい。

## Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

## 研究成果報告書(追加助成) &lt;詳細&gt;

所 属	大阪大学大学院医学系研究科
氏 名	彦惣俊吾
研究テーマ	心筋における慢性炎症機序の解明とその心不全治療への応用

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

## 【目的】

心不全の発症に炎症性サイトカインの増加や炎症細胞の浸潤などの慢性炎症が関与していることはこれまでの研究で示唆されてきたところであるが、慢性炎症が惹起される原因、機序は十分に解明されていない。

今回、私は、心筋における慢性炎症の原因にミトコンドリアが関与している可能性について着目し、検討をおこなうこととした。ミトコンドリアはエネルギー産生を司っているが、その由来は外来の細菌であることと考えられている。それを反映して、ミトコンドリアゲノムの DNA (以下、ミトコンドリア DNA) や構成タンパク質には、非メチル化 CpG モチーフなどの哺乳類にはない細菌に特有な分子的特徴を有していることが知られており自然免疫系を活性化する。また、心筋のストレス応答におけるミトコンドリアの関与について、私はこれまでにマウス心臓において、圧負荷により変質をきたした異常ミトコンドリアが増加すること、これらが細胞内分解機構であるオートファジー経路により分解されることにより定常状態が保たれることを見出している。ミトコンドリアの構成分子のなかでも特に DNA は免疫原性が強いことが知られている。以上より、本研究では心不全の原因分子として特にミトコンドリア DNA に着目し、心筋のストレス応答の過程で発生する異常ミトコンドリアに含まれるミトコンドリア DNA がストレス誘導性の慢性炎症、心不全発症の原因となっている可能性についてまずマウスモデルで検討し、さらに、これらの機序のヒトの心不全における役割、および心不全治療への応用の可能性を明らかにして、心不全治療への応用を目指すことを目的として検討をおこなった。

## 【研究方法】

## 1. 心筋慢性炎症ならびに心不全におけるミトコンドリア DNA の関与の検討

- ① 野生型マウスに横行大動脈縮窄による圧負荷をかけて心不全を作製し、心不全の心筋における炎症の程度を評価した。
- ② 心不全の心筋でミトコンドリア DNA の蓄積が認められることを DNA 感受色素ならびに免疫組織染色を用いて検討した。
- ③ 心筋 DNase II 活性の圧負荷後の経時的変化を SRED 法にて検討し、活性の変化と心不全発症の関連について検討した。

## 2. ミトコンドリア DNA の蓄積が心筋に及ぼす影響の検討

ミトコンドリア DNA の蓄積が心筋での慢性炎症、心不全の原因となることを、リソソーム内におけるミトコンドリア DNA 分解の責任分子である DNase II の心筋特異的欠損マウスを用いて検討をおこなった。

- ① 心筋特異的 DNase II 欠損マウスを用いて圧負荷モデルを作製し、心機能、心筋の炎症の程度を心臓超音波および免疫組織染色、炎症性サイトカインの mRNA 定量などにより検討した。
- ② 心筋特異的 DNase II 欠損マウスの圧負荷後の生存曲線を検討した。
- ③ 心筋細胞内でのミトコンドリア DNA の蓄積を検討した。EdU/Lamp2a (リソソームマーカー)、EdU/LC3 (オートファゴソームマーカー) の 2 重免疫組織染色をおこないミトコンドリア DNA のリソソーム内への蓄積を確認した。またミトコンドリア DNA と TLR9 がリソソーム内で共存していることを、EdU/TLR9 の 2 重染色で検討した。
- ④ 圧負荷後の心筋の炎症の状態を評価した。

ミトコンドリア DNA の蓄積→TLR9 刺激が炎症、心不全発症の原因であることを証明するた

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

め、圧負荷後の DNase II 欠損マウスに市販の TLR9 阻害オリゴヌクレオチドを投与し、心筋の炎症、心機能低下が軽減することかどうかを検討した。さらに、心筋特異的 DNase II 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配してダブルノックアウトマウスを作製し、これに圧負荷をかけて同様の検討をおこなった。

- ⑤ これらの in vivo での表現型が心筋細胞に起因していることを単離心筋細胞を用いて検討した。心筋特異的 DNase II 欠損マウスから心筋細胞を単離し、protonophore である carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) にてミトコンドリア傷害を惹起し、それに対する炎症性サイトカイン誘導反応の程度、細胞死の程度を評価した。また、TLR9 阻害オリゴヌクレオチドでその反応が阻害されるかどうかについても検討をおこなった。

**3. ヒト不全心における、DNase II 活性ならびに DNA 蓄積の検討**

重症心不全患者の心筋組織を入手し、不全心筋における DNase II の発現状況について western blot 法にて検討をおこなった。また、拡張型心筋症の心臓組織を DNA 染色し、心不全の心筋におけるミトコンドリア DNA の蓄積の有無、程度の評価をおこなった。

**4. 心筋慢性炎症の制御による心不全治療の可能性の検討**

TLR9 阻害による心不全治療の可能性について検討した。

- ① TLR9 欠損マウスを用いて圧負荷モデルを作製し、心筋の炎症および心機能低下を抑制効果を検討した。
- ② 上記の心不全動物モデルに TLR9 を阻害するオリゴヌクレオチドを投与し、その効果を検討した。
- ③ さらに以下の 2 種類の DNase II 発現トランスジェニックマウスを作製し、表現型を検討した。
- ・ 心筋特異的プロモーターである  $\alpha$ Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ MHC)プロモーターの下流に DNase II 遺伝子を組み込んだトランスジーンを用いたトランスジェニックマウス
  - ・ CAG プロモーターの下流に loxP 配列で挟まれたスペーサー配列を持ちその下流に DNase II 遺伝子を組み込んだトランスジーンを有するトランスジェニックマウスとタモキシフェン誘導性に心筋特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配し、タモキシフェン誘導性に心筋特異的に DNase II を発現するトランスジェニックマウス

**【結果】**

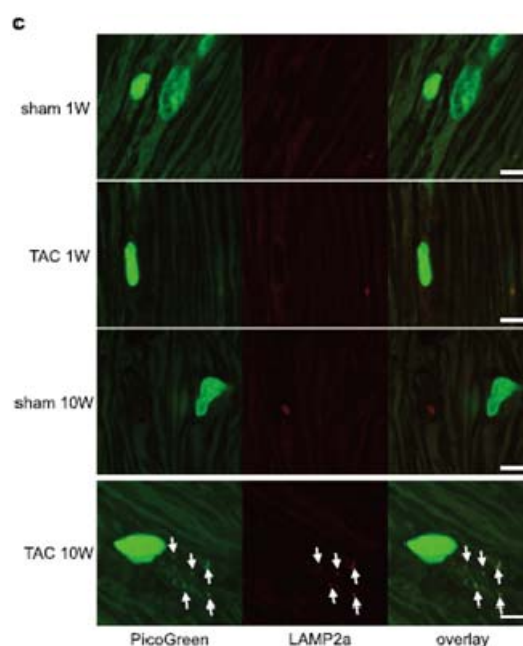
**1. 心筋慢性炎症ならびに心不全におけるミトコンドリア DNA の関与の検討**

- ① 野生型マウスにおいて、圧負荷による心肥大が生じている時期では炎症像は認められなかったが、心不全となった心筋ではマクロファージを中心とした炎症細胞の浸潤が認められた。
- ② マウス心不全の心筋において、リソソームおよびオートファゴソームに一致する DNA の蓄積が認められた(図1、TAC 10W、白矢印)。
- ③ 心筋における DNase II 活性は、肥大心筋では増加しているが、心不全の心筋では低下していた。

**2. ミトコンドリア DNA の蓄積が心筋に及ぼす影響の検討**

- ① 心筋特異的 DNase II 欠損マウスでは、コントロールマウスと比較し、圧負荷により容易に心不全を発症し、生存期間の短縮が認められた。また欠損マウスの心筋ではマクロファージおよび好中球の著明な浸潤が認められ、炎症性サイトカインである IL-6 が有意に増加するなど、著明な炎症を生じていた。

図 1 心不全の心筋における DNA 蓄積



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

- ② 欠損マウスの圧負荷後の心筋では、リソソームおよびオートファゴソームに一致して著明なミトコンドリア DNA の蓄積が認められ、その存在箇所は TLR9 と一致していた。また、電子顕微鏡では、欠損マウスの心筋では変性したミトコンドリアが蓄積しており、さらに免疫電子顕微鏡によりオートファゴソーム内にミトコンドリア DNA が充満していることが確認された。
- ③ TLR9 を阻害するオリゴヌクレオチドの投与により、DNase II 欠損マウスにおける圧負荷後の心機能が改善し、死亡率も改善した。さらに、TLR9 欠損マウスとの交配により得られた二重欠損マウスでも圧負荷後の心機能の改善が認められた。
- ④ DNase II 欠損マウスの心筋細胞を単離し CCCP で刺激したところ、炎症性サイトカインの増加、細胞死の増加が認められたが、これらは TLR9 阻害により抑制された。

3. ヒト不全心における、DNase II 活性ならびに DNA 蓄積の検討

ヒトの心不全心筋における DNase II 発現が低下傾向にあることを確認できた。また、同じく、ヒトの特発性拡張型心筋症の心不全の心筋において、ミトコンドリア DNA の蓄積と考えられる所見を見出した。

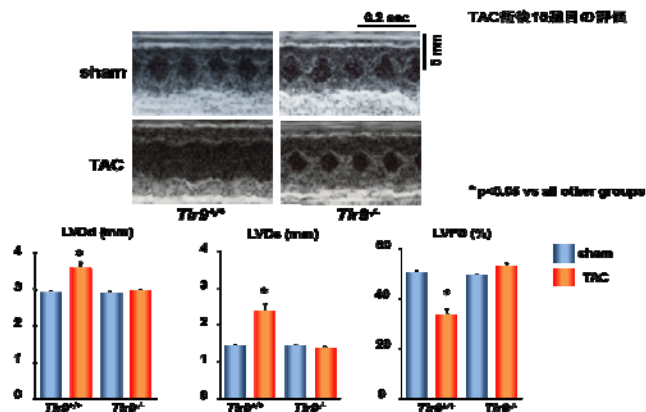
4. 心筋慢性炎症の制御による心不全治療の可能性の検討

- ① TLR9 欠損マウスに圧負荷をかけたところ、コントロールマウスと比較して、心機能低下の有意な抑制が認められた(下図)。
- ② TLR9 阻害オリゴヌクレオチドの投与により、圧負荷による野生型マウスの心機能低下が有意に抑制された。
- ③ 2 種類の心筋特異的 DNase II 発現トランスジェニックマウスの作成に成功した。定常状態における心臓の表現型を検討し、定常状態では心臓の状態に大きな変化がないことを見出した。

TLR9欠損マウスは圧負荷後心不全に対して抵抗性を示した

【考察】

- マウスでの圧負荷による心不全発症に、心筋細胞内に蓄積したミトコンドリア DNA による TLR9 を介した自然免疫活性化が関与していることが示された。ミトコンドリア DNA の蓄積には DNase II の作用不足が関係している可能性が考えられた。
- ヒトの心不全においても同様の機序が関与していることが示唆された。
- TLR9 の阻害が、心不全の発症抑制に有効である可能性が示唆された。
- 今後、DNase II 活性化が心不全抑制に有効であるかどうかを検証するとともに、TLR9 阻害によるヒト心不全治療の可能性について検討を続ける方針である。



**Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—**  
**研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>**

所	属	大阪大学大学院医学系研究科
氏	名	彦惣俊吾

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>・ 国内外雑誌を問わない。</li> <li>・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	<p>Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K.            Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.  <i>Nature</i>. 2012;485(7397):251-5. 査読有</p>
2	<p>Tamai T, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Uno Y, Horie K, Nishida K, Sonenberg N, Shah AM, Takeda J, Komuro I, Otsu K.            Rheb (Ras Homologue Enriched in Brain)-dependent mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation becomes indispensable for cardiac hypertrophic growth after early postnatal period.  <i>Journal of Biological Chemistry</i>. 2013;288(14):10176-87. 査読 有</p>
3	<p>Oyabu J, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Murakawa T, Yasui H, Ueda H, Nakayama H, Taneike M, Omiya S, Shah AM, Nishida K, Otsu K.            Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading.  <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 2013; 441(4):787-92 査読 有</p>
4	<p>Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K.            Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation.  <i>Nat Commun</i>. 2015;6:7527. 査読 有</p>
② <論文 PDF 添付なし>	
1	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2012 年 12 月	日本分子生物学会、山口修、岡崇史、小室一成、大津欣也 「不全心炎症反応におけるミトコンドリア DNA 分解異常の意義」
2	2013 年 2 月	日本心脈管作動物質学会、山口修、 「オートファジー性ミトコンドリア DNA 分解異常の心筋炎症ならびに心不全発症への意義」
3	2013 年 6 月	第 17 回日本適応医学会学術集会、山口修 「心臓病態における適応から破綻 ミトコンドリアを中心とした細胞死制御機構」
4	2014 年 10 月	第 87 回日本生化学会大会、山口修 「心疾患発症進展におけるオートファジーの関与」
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	現在のところ未定	
2		
3		
4		