

研究助成 2018 – 生活習慣病領域 – 研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	山口大学医学部附属病院 第一外科（器官病態外科学）
氏 名	齊藤寿郎
研 究 テーマ	オートファジー・ミトファジーを標的とした虚血性心疾患の新規治療法開発

<研究目的>

ミトコンドリアの品質管理は心臓にとって重要で、mitophagy（ミトコンドリアの autophagy）の破綻が心不全などの病態に関わることが示唆されていた。mitophagy を制御するには分子機構の解明が必要だが、不明な点が多かった。本研究では心臓の虚血において mitophagy の分子機構の詳細を解明することを目的とした。

<研究手法>

通常の autophagy に必須な Atg7、もう一つの autophagy とされる alternative autophagy に必須な Ulk1(図 1)の心筋特異的欠損マウス(Atg7cKO、Ulk1cKO)、Parkin 欠損マウス(Parkin KO)などを使用した。これらを mitophagy のレポーターを発現したマウス(Tg-Mito-Keima)と交配し、培養細胞でなく、心臓の病態において mitophagy を評価した。

<研究成果>

飢餓や心筋虚血において、Atg7cKO では通常の autophagy が完全欠損したが、mitophagy は誘導された。Ulk1cKO では通常の autophagy が誘導されたが、mitophagy は大きく欠損した(図 2)。以上から、飢餓や虚血では Ulk1 依存性 alternative autophagy が mitophagy の主要な分子機構と考えられた（一方で、安静時の mitophagy は Atg7cKO と Parkin KO で有意に損なわれており、通常の autophagy や Pink1-Parkin 経路が重要な分子機構と思われた）。

Ulk1cKO は野生型や Atg7cKO より有意に大きな心筋梗塞を示した。Ulk1 は mitophagy を介して心筋を保護すると考えられた。飢餓や虚血において alternative autophagy に重要な Rab9 陽性 autophagosome はミトコンドリアを包み、mitophagy のシグナルと一致した。

in vitro kinase assay と質量分析から、Ulk1 が Rab9 の serine179 をリン酸化することを見出し、このリン酸化がタンパク複合体を誘導してミトコンドリア分裂や mitophagy を起こすことを、size exclusion chromatography、*in situ* proximity ligation assay など示した。

リン酸化抵抗性 Rab9(S179A)ノックインマウスでは通常の autophagy は保たれたが、虚血による mitophagy は損なわれ、有意に大きな心筋梗塞を示した。Ulk1 による Rab9 のリン酸化は mitophagy を特異的に誘導して心筋を保護する、重要な分子機構と思われた(図 3)。

図1: 2種類のautophagyについて

	Conventional autophagy	Alternative autophagy
Molecular actors	LC3, Atg7, Ulk1/2 <small>Atg5, Atg12, Atg16, Atg9, Fip200, Beclin1, Vps34</small>	Rab9, Ulk1 <small>Fip200, Beclin1, Vps34</small>
Source of membrane	Endoplasmic reticulum (ER) <small>(Golgi), (Endosome) (Mitochondria) etc.</small>	trans-Golgi <small>Late endosome</small>

図2:

Mito-Keima の緑色ドットはmitophagyを示す。心筋虚血後のmitophagyは Ulk1cKOで有意に阻害された。

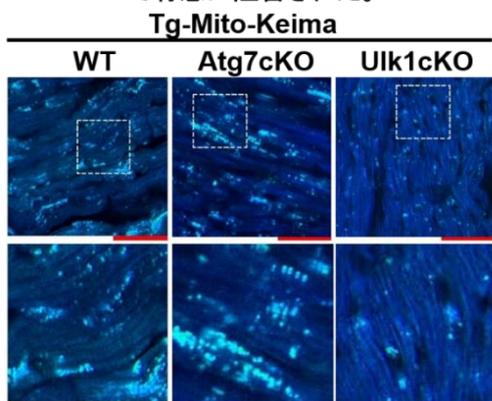
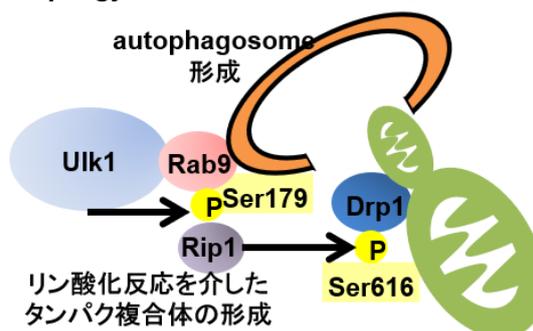


図3

Ulk1はRab9をリン酸化し、ミトコンドリアの断片化、mitophagyに重要なタンパク複合体を形成させる。



Rab9のリン酸化は通常のautophagyでなく、mitophagyに特異的な分子機構である。

研究助成 2018 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	山口大学医学部附属病院 第一外科（器官病態外科学）
氏	名	齊藤寿郎

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 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。 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<u>下線</u>を引く。 国内外雑誌を問わない。 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。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
1	Preserving the endothelium in saphenous vein graft with both conventional and no-touch preparation. Saito T , Kurazumi H, Suzuki R, Matsuno Y, Mikamo A, Hamano K. <i>J Cardiothorac Surg.</i> 2020 (in press) 査読あり
2	Nuclear β -catenin expression is positively regulated by JAB1 in human colorectal cancer cells. Nishimoto A, Takemoto Y, Saito T , Kurazumi H, Tanaka T, Harada E, Shirasawa B, Hamano K. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2020 Sep 23;S0006-291X(20)31745-9. 査読あり
3	Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models. Kaludercic N, Maiuri MC, Kaushik S, Fernández ÁF, de Bruijn J, Castoldi F, Chen Y, Ito J, Mukai R, Murakawa T, Nah J, Pietrocola F, Saito T , Sebti S, Semenzato M, Tsansizi L, Sciarretta S, Madrigal-Matute J. <i>Cardiovasc Res.</i> 2020 Mar 1;116(3):483-504. 査読あり
4	Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction. Fujita A, Ueno K, Saito T , Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K. <i>Eur J Cardiothorac Surg.</i> 2019 Dec 1;56(6):1062-1074. 査読あり
5	Mitophagy Is Essential for Maintaining Cardiac Function During High Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy. Tong M, Saito T , Zhai P, Oka SI, Mizushima W, Nakamura M, Ikeda S, Shirakabe A, Sadoshima J. <i>Circ Res.</i> 2019 Apr 26;124(9):1360-1371. 査読あり
6	Mitochondrial LonP1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury in vivo. Venkatesh S, Li M, Saito T , Tong M, Rashed E, Mareedu S, Zhai P, Bárcena C, López-Otín C, Yehia G, Sadoshima J, Suzuki CK. <i>J Mol Cell Cardiol.</i> 2019 Mar;128:38-50. 査読あり
7	An alternative mitophagy pathway mediated by Rab9 protects the heart against ischemia. Saito T , Nah J, Oka SI, Mukai R, Monden Y, Maejima Y, Ikeda Y, Sciarretta S, Liu T, Li H, Baljinnayam E, Fraidenraich D, Fritzky L, Zhai P, Ichinose S, Isobe M, Hsu CP, Kundu M, Sadoshima J. <i>J Clin Invest.</i> 2019 Feb 1;129(2):802-819. 査読あり

様式 4-2②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 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。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2020年3月	<学会名> 第97回日本生理学会大会（誌上開催） <発表者名> Toshiro Saito , Junichi Sadoshima <abstract #> 1P-016 <演題> The central role of Ulk1-dependent autophagy in mediating mitophagy in the heart during ischemia and reperfusion
2	2019年7月	<学会名> Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2019 <発表者名> Risa Mukai, Toshiro Saito , Peiyong Zhai, Junichi Sadoshima <abstract #> 437 <演題> PRMT5-induced Arginine Methylation Mediates Energy Stress-induced Autophagy in the Heart
3	2018年11月	<学会名> American Heart Association Scientific Sessions 2018 <発表者名> Mingming Tong, Toshiro Saito , Peiyong Zhai, Shinichi Oka, Wataru Mizushima, Michinaria Nakamura, Junichi Sadoshima <abstract #> 13331 <演題> Mitophagy is Essential for Maintaining Cardiac Function During High Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	論文 投稿中	Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Multiple Forms of Mitophagy in the Heart. Saito T , Hamano K, Sadoshima J. Cardiovasc Res. (in revision) 査読あり
2	論文 投稿中	Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis. Iwamoto K, Saito T (corresponding author), Takemoto Y, Ueno K, Yanagihara M, Furuya-Kondo T, Kurazumi H, Tanaka Y, Taura Y, Harada E, Hamano K. Am J Transl Res. (in revision) 査読あり
3	招待講演 (2020年12月)	<学会名> 第62回日本平滑筋学会総会 <発表者名> 齊藤寿郎 、藏澄宏之、鈴木亮、美甘章仁、濱野公一 <演題> 冠動脈バイパス術の大伏在静脈グラフト採取において、No-touch法がグラフト血管の長期開存をもたらす機序に関する研究