

氏名（本籍）	徳山 剛士(神奈川県)
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第97号
学位授与の日付	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLの心機能維持における 役割の解析
論文審査委員	(主査) 柳 茂 教授 多賀谷 光男 教授 渡部 琢也 教授 松下 暢子 准教授

## 論文内容の要旨

### [序論]

虚血性心疾患とは、冠動脈が狭まる（狭心症）・閉塞する（心筋梗塞）ことで心臓への血流が滞り、心臓の機能が低下する疾患である。心機能低下には、心臓にエネルギーを供給する心筋のミトコンドリア機能異常と、その結果として起こる心筋細胞死が大きく寄与する。衆知の通り心臓にはミトコンドリアが多く含まれており、ミトコンドリアの機能不全が直接心臓の機能へ影響することが予測される。このミトコンドリアは融合と分裂のバランスをもって自身の形態を維持している。そしてこのバランスが崩壊し機能不全ミトコンドリアが増加すると、心疾患を引き起こすことが報告されている。この結果と関連し、心疾患患者の心臓を観察すると異常な形態を持ったミトコンドリアが観察されることも分かっている。これらより、ミトコンドリア形態と心不全の間には密接な関連があると考えられる。しかしながら、ミトコンドリアの形態異常が「なぜ・どのようにして」心疾患を引き起こすかは多くが明らかにされておらず、根本的な治療法開発のためにはより多くの関連因子の同定が不可欠である。

このミトコンドリアを調節する因子として MITOL が発見された。MITOL は当研究室で同定されたミトコンドリアユビキチンリガーゼである。現在までに我々研究室は細胞内において MITOL がミトコンドリアの形態制御や機能維持、細胞内の毒性回避、オルガネラネットワークにおいて重要な役割を担うことを明らかにした。しかしながら、その生体レベルにおける役割については未知な部分が多く、MITOL の *in vivo* における生理的機能を明らかにすることが課題となっている。

私はミトコンドリア分裂因子 Drp1 (dynamin-related protein 1) に着目し、MITOL の心機能維持における役割の解析をした。Drp1 はミトコンドリアの外膜上で多量体を形成し、リング様構造を構築してミトコンドリアを締めつけるように分裂させる。MITOLはこの Drp1 を分解することでミトコンドリアへ対するストレスを減弱させる役割があると考えられる。本研究では、心筋特異的に MITOL を欠損したマウス (MITOL cKO) を作製し解析した結果、Drp1 の蓄積によりミトコンドリア機能不全が亢進して、最終的に心不全を発症することを見出した。さらに、虚血性心疾患の原因である心筋梗塞という病態においてこれらの機序が破綻し、毒性を引き起こすこと、そして MITOL を標的にした治療の可能性を報告する。

[結果]

#### MITOL心筋特異的欠損マウス心筋細胞中のミトコンドリアは断片化している

これまでの自身の修士研究成果より、MITOL cKOが心不全を発症することが明らかになっている。MITOLはミトコンドリアの形態を制御することでミトコンドリア機能を維持している。そこで、MITOL欠損による心不全の原因を解明するため、MITOL cKOにおける心筋細胞中のミトコンドリア形態を観察した。通常、心筋細胞中のミトコンドリアは筋原線維に沿って埋め尽くされるように配置されている。電子顕微鏡観察の結果、MITOL cKOのミトコンドリアはコントロール群と比較して面積が小さく、断片化していることが分かった (図1)。フローサイトメトリーを用いたミトコンドリア形態評価によっても同様の結果が得られた。従って、MITOL cKOの心筋細胞中ミトコンドリアは小さく断片化していることが分かった。ミトコンドリアの断片化は唯一のGTPaseであるDrp1によって制御されている。そこで、MITOL cKO心臓中のDrp1量を評価したところ、コントロール群と比べて顕著な蓄積を確認した。よって、MITOL cKOによる心筋細胞中のミトコンドリア断片化は、Drp1の蓄積による過剰なミトコンドリア切断の亢進によるものと推測された。

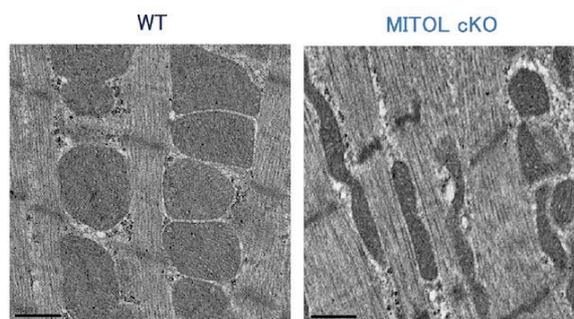


図1) 電子顕微鏡観察によるミトコンドリア形態観察

#### ミトコンドリア分裂因子Drp1による影響によってMITOL cKOは心不全をきたす

MITOL cKOにおいてミトコンドリアの断片化が確認されたことから、Drp1によるミトコンドリア形態異常によって、MITOL cKOは心不全を起していると考えた。そこで、これを証明するためDrp1の特異的阻害剤であるMdivi-1をMITOL cKOに投与し、心不全の表現型が回復するかどうかを確認した。心不全がまだ発症していないノックアウト後3ヶ月のマウスに心不全を誘起させるため、強心薬であるイソプロテレノールによる刺激を行った。この心不全がMdivi-1によって回復するかをイソプロテレノールとMdivi-1の同時投与によって比較した。その結果、コントロール群ではイソプロテレノール

ルによる心臓の肥大に伴う重量の増加や、細胞死に伴う膠原線維の増加が確認された。一方のMdivi-1投与群では心臓重量や線維化の割合が顕著に低下していた（図2）。また、心不全に伴って現れる心筋細胞の肥大化も回復した。従って、MITOL cKOによる心不全はDrp1による影響である可能性が示唆された。

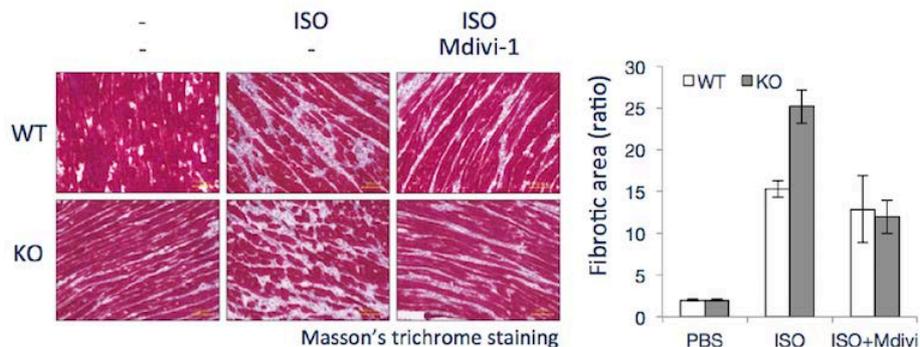


図2) Drp1抑制剤によってMITOL cKOの線維化が一部抑制される

心筋梗塞中の心臓ではMITOLがダウンレギュレーションされる

ここまでの MITOL と心臓の役割が病態生理的に起きているものかどうかを確認するため、心不全の主要原因である心筋梗塞に着目して実験を行った。まず始めに、ヒト心筋梗塞患者の心臓中の MITOL 量をウェスタンブロットによって確認したところ、驚くべきことにコントロール群と比べて劇的に MITOL がなくなっていることが明らかとなった。同様に、心筋梗塞モデルマウス・心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域においても同じような MITOL の劇的な量の低下が確認された（図3）。従って、MITOL は生理的な心筋梗塞という状況においてその量が劇的に低下し、心臓における MITOL 機能が顕著に低下することが分かった。また、このときのミトコンドリア形態をフローサイトメトリーによって測定した所、MITOL cKO と同様にサイズの小さいミトコンドリアが増加していることが分かった。従って、MITOL cKO で見られた表現型が心筋梗塞時にも観察されたことから、より心筋梗塞時の MITOL 量低下が実際の心筋梗塞という病気において重要であることが示唆された。

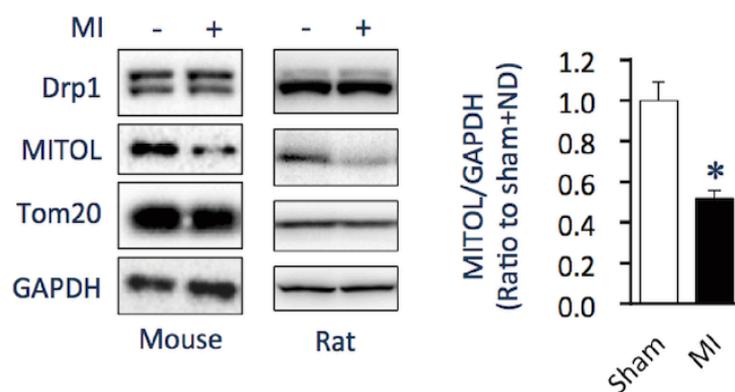


図3) 心筋梗塞によってMITOLはダウンレギュレーションされる

心筋梗塞時におけるMITOLの機能低下が心機能低下を引き起こす

心筋梗塞の際にMITOL量が減少し心機能が低下することから、心筋梗塞時の心機能低下がMITOLの低下によってもたらされている可能性を考えた。そこで、AAV (Adeno-associated virus) によるMITOLの過剰発現によって心筋梗塞時のMITOL量の低下を抑制させた場合に、心機能が維持されるかどうか

を確認した。MITOL AAVによってMITOLは若干量の増加を維持することができた。左冠状動脈前下行枝を永久結紮させた心筋梗塞モデルラットにこのウィルスを肺腔に投与し、2週間後に解析した。解析の結果、心筋梗塞にともなう線維化はウイルス投与群で回復していた。よって、心筋梗塞によるMITOL量の低下が、心機能低下の原因の1つであることが明らかとなった。

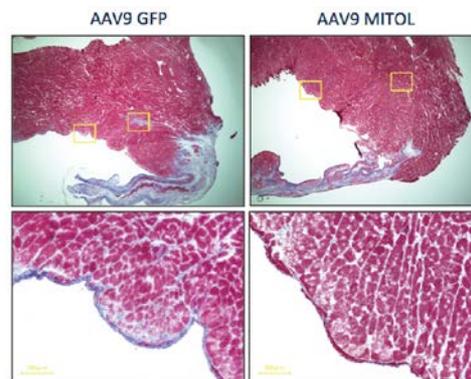


図4) 心筋梗塞による線維化がMITOL AAVによって一部回避できている

[結論]

MITOLを通じた心機能維持機構の模式図を図5に示した。本研究をまとめると、MITOLはミトコンドリア分裂因子 Drp1 を分解することで心臓に対するミトコンドリアストレスを減弱させているといえる。また、実際の心筋梗塞という病態においてMITOLの機能が低下し、これが一部の心筋梗塞による心機能低下の要因であることを証明した。この新たな知見は心筋梗塞による心機能低下に対する、MITOLを用いた治療の可能性を示唆している。

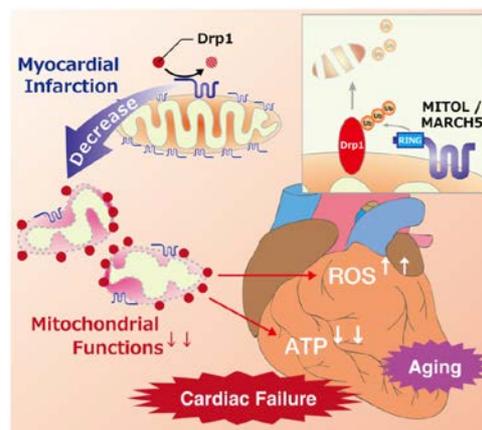


図5) MITOLを通じた心機能維持機構の模式図

## 審査結果の要旨

申請者は、ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL と Drp1 の関係について、培養細胞を使用した *in vitro* の実験系と、疾患モデル動物やコンディショナルノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験系を用いて、生理的意義の解明を行った。はじめにタモキシフェン誘導型 MITOL 欠損 MEF 細胞において、MITOL の急性的なノックアウトにより Drp1 依存的なミトコンドリアの断片化と ROS の上昇を明らかにした。MITOL の生理的条件下における機能を解析した結果、虚血状態・心筋虚血において MITOL の発現がダウンレギュレーションされることにより基質である Drp1 の蓄積と細胞毒性を引き起こすことを示した。また、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて MITOL の発現を人為的に誘導することにより、心筋虚血による心筋細胞死の一部を抑制したことから、MITOL が心筋梗塞の創薬標的になる可能性を示した。一方、慢性的な MITOL 欠損細胞の解析の結果、急性的 MITOL 欠損細胞と同様に Drp1 の蓄積を伴うミトコンドリア断片化と細胞老化の亢進を明らかにした。同様に、タモキシフェン誘導型心筋特異的 MITOL 欠損マウスにおいても、心臓老化が亢進して心不全を発症することを示した。さらにミトコンドリア断片化における ROS の漏洩メカニズムを詳細に検証した結果、ミトコンドリアの断片化に伴うクリステの構造変化が、内膜に存在する呼吸鎖複合体等の活性の低下を誘導して ROS の発生を増大させることを示唆した。したがって、本論文は Drp1 が MITOL の生理的基質であることを明らかにし、この関係が急性的な虚血状態や心筋虚血などの生理条件下において重要であることを示した。またコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、MITOL 機能低下が心臓老化を引き起こすことを明らかにした。本研究は、これまで解析が進んでいなかった生体内における MITOL の役割を明らかにすると同時に、ミトコンドリアの断片化による ROS 漏洩のメカニズムにおいて、ミトコンドリア断片化-クリステ異常-内膜呼吸鎖複合体変化という経路を示唆したことは、ミトコンドリアと疾患との関連において新しい病態を提唱するものであり、博士論文として十分に値する有意義な研究であると判断される。