HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	心不全におけるミトコンドリア機能の心筋治療法の確立に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	前川, 聡
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13466号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74742
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2480
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Satoshi_Maekawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

（様式９）

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　前川　聡

学 位 論 文 題 名

心不全におけるミトコンドリア機能の心筋治療法の確立に関する研究

(Studies on determination of regulatory factor of mitochondrial function and the development of new therapy based on the mitochondrial function in heart failure)

【背景と目的】人口の高齢化，生活習慣病に伴う冠動脈疾患の増加等に伴い，我が国の心不全患者は増加しており，今後もさらに増加すると予測されている．心不全に対する薬物治療や非薬物治療が普及してきたものの，死亡率のみならず再入院率の高さが依然として臨床的課題であり，効果的な治療法の確立が求められている．心不全の発症や進展に関わる因子として心室リモデリングが知られており，心室リモデリングを抑制することで心不全の発症を予防できることが報告されている．近年の研究から，心室リモデリングの進行に心筋ミトコンドリアの機能不全が関与すると考えられている．ミトコンドリアはエネルギー産生の中心的役割を担い，心臓や骨格筋のようなエネルギー需要の高い臓器ではその役割は特に重要である．ミトコンドリア内膜上には電子伝達系を構成するタンパク質複合体である complex I，II，III，IV が存在し，これらの複合体により内膜内外にプロトンの濃度勾配が作られ，この濃度勾配を利用して complex V により ATP が産生される．この反応を酸化的リン酸化と呼ぶ．電子伝達系のうち，complex I，III，IV はさらなる複合体である supercomplexes（SCs，超複合体）を構成し，効率的な電子伝達を行えると考えられている．Complex I は心不全の心筋ミトコンドリアにおいてこれまでに数多く研究され，心不全でその機能が低下することが報告されている．一方，complex II は SCs には含まれておらず，complex II に関する研究は complex I と比較して少ない．心不全において complex II の機能が低下することは報告されているものの，そのメカニズムは不明で，治療法もない．SCs は効率的に ATP 産生されると考えられているが，SCs に含まれている complex I と，SCs に含まれていない complex II がミトコンドリアの ATP 産生にそれぞれどの程度貢献しているかという観点で両者の機能を比較した研究はこれまでにない．これらのことから我々は complex II の機能に着目し，心筋，骨格筋ミトコンドリアにおいて complex I の機能と比較すること，心不全における心筋ミトコンドリア機能低下のメカニズムを明らかにすること，心不全のミトコンドリア機能低下に対する治療法を開発することを目的とした．

【材料と方法】C57BL/6J マウスの心筋や骨格筋と，培養細胞（H9c2 細胞，C2C12 細胞）から単離したミトコンドリアの呼吸能を OROBOROS 社製の Oxygraph-2k を使用して測定した．心不全モデルとして C57BL/6J マウスに心筋梗塞を作製し，偽手術をしたマウスをコントロール群とした．エコーにより心機能や心室内腔，壁厚を計測した．組織や細胞から単離したミトコンドリアや whole cell lysate におけるタンパク発現量をブルーネイティブ法やウェスタンブロット法により評価した．また，RNA を抽出し，PCR 法により mRNA レベルの発現量を評価した．

【結果】C57BL/6J マウスの心筋，骨格筋から単離したミトコンドリアで測定した

complex II 呼吸能は complex I 呼吸能に匹敵した．Complex II 呼吸能は複合体としての complex II の発現量と有意に相関したのに対して，complex II サブユニットの発現量とは相関しなかった．心不全群の心筋ミトコンドリアの complex II 呼吸能は，コントロール群と比較して心筋梗塞後早期（6 時間後），慢性期（28 日後）ともに有意に低下した．心筋梗塞後早期は，ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量が心不全群で低下し，complex II 発現量も低下した．慢性期は，心不全群のミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量はコントロール群と差はなかった．心不全群では心筋でのケトン代謝，ヘム合成が亢進し，心筋組織当たりのサクシニル CoA が減少し，ミトコンドリアタンパクのサクシニル化が低下した．心不全群の心筋ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えると complex II 呼吸能は改善した．培養液にグリシンを添加して培養した H9c2 細胞はミトコンドリアタンパクのサクシニル化が低下し，complex II 呼吸能が低下した．このミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化が増加し，complex II 呼吸能は改善した．

【考察】C57BL/6J マウスの心筋，骨格筋から単離したミトコンドリアの complex II 呼吸能が complex I 呼吸能に匹敵したことから，ミトコンドリアの ATP 産生において complex II は complex I と同等に重要な役割を果たしていることが示唆された．Complex II 呼吸能は complex II の発現量と有意に相関したのに対して，complex II サブユニットの発現量とは相関しなかったことから，complex II が機能するために complex II 複合体を形成することが重要であること，complex II サブユニットの一部は complex II の機能に直接関与していないことが示唆された．心不全群の心筋ミトコンドリアの complex II 呼吸能は，心筋梗塞後早期（6 時間後），慢性期（28 日後）いずれもコントロール群と比較して有意に低下したが，低下した原因は時期によって異なっていた．心筋梗塞後早期は，ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量が心不全群で低下しており，これが complex II 発現量の低下，complex II 呼吸能の低下の一因と考えられた．慢性期は，心不全群のミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量はコントロール群と同等まで改善しており，早期とは異なる要因があることが考えられた．心不全群では心筋におけるケトン代謝やヘム合成が亢進しサクシニル CoA が消費され，心筋組織当たりのサクシニル CoA が減少した．その結果，ミトコンドリアタンパクのサクシニル化が低下した．培養液にグリシンを添加して培養した H9c2 細胞はミトコンドリアタンパクのサクシニル化が低下し，complex II 呼吸能が低下した．このミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとサクシニル化が増加し，complex II 呼吸能は改善したことからミトコンドリアタンパクのサクシニル化低下が complex II 呼吸能低下の原因と考えられた．実際，心不全群のミトコンドリアにサクシニル CoA を添加してミトコンドリアタンパクのサクシニル化が増加し，complex II 呼吸能は改善した．サクシニル化の標的タンパクは本研究では明らかにならなかったが，complex I や complex IV の呼吸能はサクシニル CoA の添加によって変化しなかったことから complex II がサクシニル化の標的であることが示唆された．

【結論】マウスの心筋，骨格筋ミトコンドリアの ATP 産生において complex II は complex I と同等に重要であることが示唆された．心不全マウスの心筋ミトコンドリア complex II 呼吸能は早期，慢性期ともにコントロール群と比較して低下したが，低下した原因は異なっていた．早期には，ミトコンドリア当たりの complex II サブユニットや会合因子の発現量の低下が複合体としての complex II 発現量低下を招き，その結果 complex II 呼吸能が低下した．慢性期には，ヘム合成やケトン代謝の亢進によりサクシニル CoA が消費されて減少し，ミトコンドリアタンパクのサクシニル化が低下した．サクシニル化の低下により complex II 呼吸能は低下し，サクシニル CoA をミトコンドリアに添加することでミトコンドリアタンパクのサクシニル化，complex II 呼吸能は改善した．