



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 [全文の要約]
Author(s)	前川, 聡
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2480 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13466号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74743
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Maekawa_summary.pdf



学位論文（要約）

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)**

2019 年 3 月

北海道大学

前川 聡

学位論文（要約）

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)**

2019 年 3 月

北海道大学

前川 聡

【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．**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** におけるタンパク質発現量をブルーネイティブ電気泳動法やポリアクリルアミドゲル電気泳動法により評価した．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 呼吸能と complex I 呼吸能に有意差はなく、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 の発現量と有意に正の相関を示したのに対して、complex II 呼吸能と complex II サブユニットの発現量に有意な相関関係はなかった。

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有意に低下し、complex II 発現量も有意に低下した。

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。一方、複合体としての complex II の発現量は心不全群で有意に低下した。心不全群では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質のサクシニル化が低下した。心不全群では心筋でのケトン代謝、ヘム合成が亢進した。心不全群の心筋ミトコンドリアにサクシニル CoA を加えるとミトコンドリアタンパクのサクシニル化は増加し、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質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。SCsに含まれない complex II の呼吸能が SCs の構成要素である complex I の呼吸能と同等であることは興味深い結果であり、呼吸能が同等である理由については今後さらなる評価が必要と考える。Complex II 呼吸能は complex II の発現量と有意に正の相関を示したのに対して、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。Complex II サブユニットの一部は単独で存在する、もしくは他のタンパク複合体の構成要素であると考えられた。

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** 複合体の発現量は低下したものの、**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質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質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質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質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質は本研究では明らかになっておらず、今後の検討課題である。

また、慢性期に **complex II** 複合体の発現量が低下するメカニズムは十分に解明できなかったが、これまでの先行研究等からカルジオリピンが関与している可能性が考えられた。この点についても今後の検討課題である。

【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質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質のサクシニル化、**complex II** 呼吸能は改善した。