

生体磁気共鳴法による 酸化ストレス疾患の無侵襲解析

*Non-invasive analysis of oxidative stress model
using in vivo magnetic resonance technique*

Key point

◎生体をみる；ものを観測するには、対象物に観測する電磁波が透過し、その変化を検出する。したがって、ヒトや動物個体を観測するには透過できる電磁波を使う。この電磁波にはX線と400 MHz以下のラジオ波が有効である。

◎MRI；400 MHz以下の電磁波で検出できる物理現象は磁気共鳴とエコー（音波）である。MRIは磁気共鳴画像化法で水や脂肪の水素原子を検出する。

◎ESR；ラジカルは水素原子の650倍の磁力をもっており、MRIと同様磁気共鳴法で検出できる。ただし、共鳴を起こすには同じ強さの磁場を用いたときにはMRIの650倍高周波の電磁波（400 MHzのMRIに対し、ESRでは260,000 MHz）を使う。

◎画像化；IR/UVあるいはESRやNMRなどの多くの検出装置では、試料のあるところは均一にする。画像化するには、この均一性を崩し、一定の角度で傾斜をつけて検出することで空間情報をもたせる。磁気共鳴ではこのことを「傾斜磁場」あるいは「磁場勾配」とよぶ。

◎OMRI；Overhauser博士は電子スピンと共鳴することで結合している核磁気共鳴を数百倍に高感度化できることを50年前に示した。この原理を用いてラジカルを共鳴させ周りの水分子をMRIで画像化し間接的にラジカル画像を得る方法がOMRIである。非常によい画質が得られる特徴を持っている。

生体内では酸化ストレスに曝されると、種々の活性酸素、活性窒素が生成し、相互に作用・変換しつつ生体成分と作用し、疾患を惹起する。したがって、生体内でのフリーラジカル動態を無侵襲解析できれば、酸化ストレス病態の機序や抗酸化医薬品の生体作用がいつそう明らかになる。本稿では、生体計測電子スピン共鳴（ESR）およびオーバーハウザー効果MRIとスピンプローブ法を併用した生体内フリーラジカル反応の無侵襲解析手法について概説する。

内海英雄 九州大学大学院薬学研究院機能分子解析学分野
Hideo UTSUMI

生体計測 ESR

活性酸素や活性窒素の多くはフリーラジカルである。フリーラジカルは対をなさない電子（不対電子）をもっており、磁場中におくと磁石としての性質を示す。そのため、静磁場中でフリーラジカルはエネルギー的に安定な状態と不安定な状態のいずれかの状態をとる（このことをゼーマン分裂という）。この2つの状態のエネルギー差に相当するマイクロ波を照射すると共鳴現象が起こり、不対電子が安定状態から不安定状態に遷移する。このことを電子スピン共鳴（ESR）といい、その分光装置をESRスペクトロメーターという。

ところで、生体内のフリーラジカル反応を直接解析するには身体に侵入できる電磁波を用いなければならない。通常のESR分光器で用いられている電磁波は、約9 GHzのマイクロ波で、その電界成分が誘電率の大きい水と相互作用するために体に侵入できない。そこで、生体計測ESR分光器では300 MHzのラジオ波や1 GHz程度の低周波のマイクロ波を用いている。

さらに、電磁波の磁界成分を効果的に取り出すために、ループギャップ共振器やリエントラント型共振器が用いられている（前者は日本電子の、後者はブルッカーの生体計測ESR分光器に使われている）。最近では、この生体計測ESR分光器に画像化装置を組み込んだ生体計測ESR画像解析システムも市販されている（「サイドメモ」参照）。

スピンプローブ法

生体計測ESR分光器の感度は通常のESR分光器と比べ1/10ないし1/100程度である。したがって、その利用は通常のESRと異なった工夫が必要である。種々の活性酸素の同定に用いられているスピントラップ法は、そのスピニアダクト自体が生体内で不安定（レドックス酵素による代謝や排泄などによる）であるため、スピントラップ法で生体計測した報告はほとんどない。多くの場合、生体内でスピントラップした後、血液や胆汁中に出てきたスピニアダクトを通常のESR分光器で観測している。そこで、著者らはニトロキシル

サイド
メモ

ESRによるフリーラジカルの 画像化

生体計測ESRの外部磁場内に三次元磁場勾配コイルを設置し、種々の角度での投影スペクトルを得る。各投影スペクトルよりデコンボリューション法で位置情報を抽出し、フィルタ補正逆投影法により空間画像を再構成する。

ラジカルをスピンプローブとして、そのESRシグナルの変化から生体内フリーラジカル反応を解析する方法を提唱してきた¹⁾。常磁性物質であるニトロキシラジカルは、ヒドロキシラジカルと拡散律速の速さ ($3 \sim 4 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) で反応し、そのESRシグナルを失う性質を有する。また、還元型グルタチオンやNAD(P)Hが存在するとスーパーオキシドとも反応し、そのESRシグナルを消失する。生体内に投与されたニトロキシラジカルは医薬品などと同様代謝や排泄などにより消失するが、活性酸素などがあるとこの消失速度がさらに亢進される(図1)。この消失速度の亢進から活性酸素の生成を解析するのが生体計測ESR・スピンプローブ法である。活性酸素種の同定は特異的消去剤(マンニトール、ジメチルチオ尿素、ジメチルスルフォキシドなど)を用いて、生体内シグナル消失の亢進が抑制されるか否かで評価できる。また、スーパーオキシドディスムターゼ、TIRON、カタラーゼ、鉄キレート剤、キサンチンオキシダーゼ阻害剤、フラビン酵素阻害剤などを併用すると、その活性酸素の産生機序も明らかにすることができる。

生体計測ESR/スピンプローブ法に用いられているおもなニトロキシラジカルを図2に示す。これらのプローブはそれぞれ特徴的な生体内動態を示すので、その特徴に応じて使い分けることで生体内部位特異的にラジカル反応を解析することができる。とくに、われわれが開発したcarboxyl-PROXYLのアセトキシメチルエステル体(CxP-AM)は細胞内のカルボキシエステラーゼにより加水分解されCxPに変換することで細胞内に蓄積する性質を有する。興味深いことに、このエステル体は血中では分解されないために、静脈内投与後、血液脳関門を通過し脳実質細胞内に長時間滞留する。Carboxyl-PROXYLおよびcarboxyl-PROXYLのメチルエステル、アセトキシメチルエステルの尾静脈内投与後のマウス頭部における分布画像を図3に示す²⁾。このように、carboxyl-PROXYLのアセトキシメチルエステルは脳質部分に高濃度で滞留していることから、種々の脳疾患における活性酸素動態の解析に有効なプローブである。

生体内フリーラジカル反応の解析と 抗酸化医薬品の薬効評価

著者らはこの生体計測ESR・スピンプローブ法により、種々の酸化ストレス性病態モデルでの活性酸素動態を無侵襲解析してきた³⁻⁷⁾。これらを通じて、本方法(活性酸素産生をESRシグナルの生体内消失の亢進から解析)が種々の酸化ストレス疾患での活性酸素動態の解析に有効であるばかりでなく、抗酸化医薬品の無

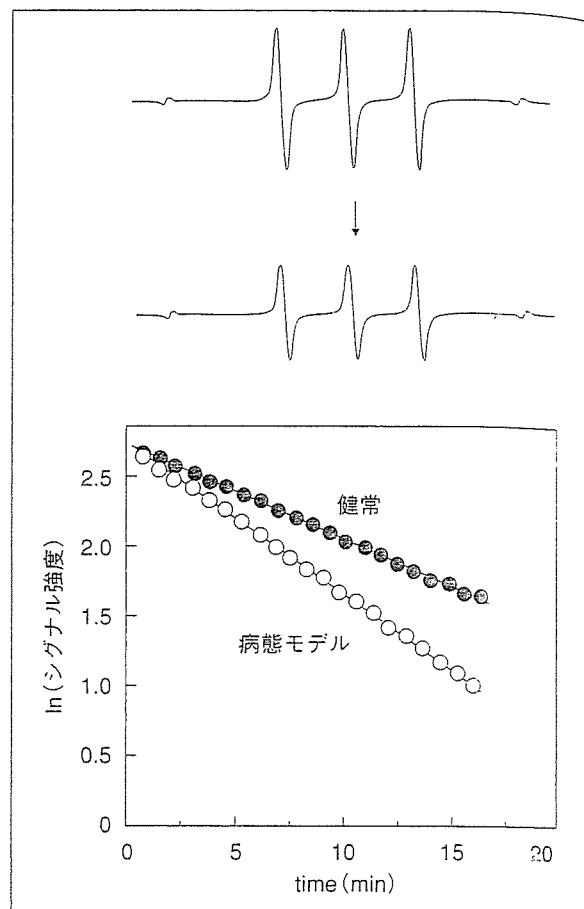


図1 生体に投与されたニトロキシラジカルのESRシグナルとその減衰曲線

侵襲評価にも不可欠の方法となるであろう。そこで、生体計測ESR・スピンプローブ法の一例として、酸化ストレスによる肺胞内活性酸素生成と肺浮腫形成に関する研究を紹介する³⁾。

ディーゼルエンジンの排気ガスが肺癌や肺浮腫を引き起こす可能性が報告されている。この肺障害に関し、活性酸素の関与が示唆されているものの、直接的証拠はなく、生体内での活性酸素動態もまったく明らかになっていない。そこで、ディーゼルエンジンの排気ガス粒子(DEP)を肺胞内に投与し、肺胞内で、たしかにヒドロキシラジカルが産生すること、その産生機構はフェントン反応であることを生体計測ESR・スピンプローブ法で明らかにした。図4は、DEP懸濁液をマウス気管内に投与し、24時間後に膜非透過性のニトロキシラジカルであるCAT-1をふたたび気管内に投与したときの胸部でのシグナル減衰速度定数を示したものである。DEP投与群ではシグナル減衰速度は有意に亢進され、この亢進はヒドロキシラジカルの消去剤で対象群レベルまで抑制されている。さらに、カタラーゼや鉄キレート剤の同時投与によっても抑制さ

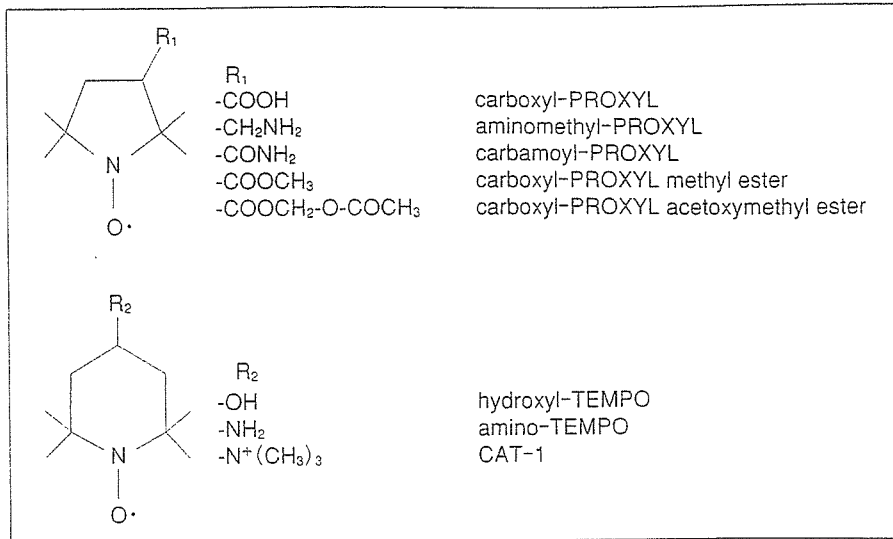


図2 生体計測ESR・スピンプローブ法に用いられるニトロキシルラジカル種

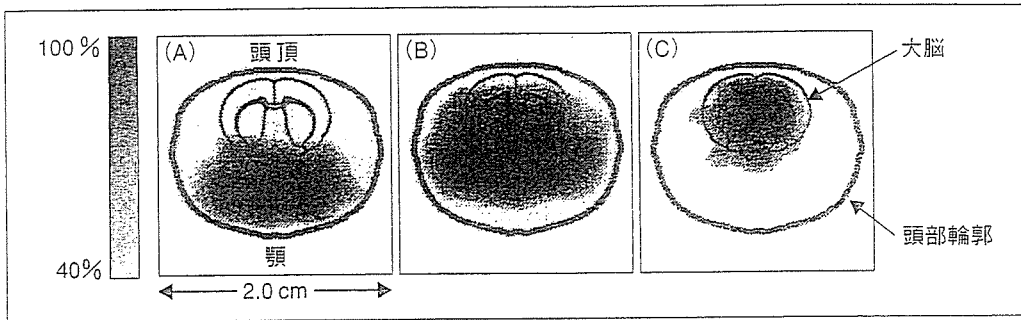


図3 マウス頭部の二次元ESR-CT画像

A : carboxyl-PROXYL, B : carboxyl-PROXYLメチルエステル体, C : carboxyl-PROXYLアセトキシメチルエステル体.

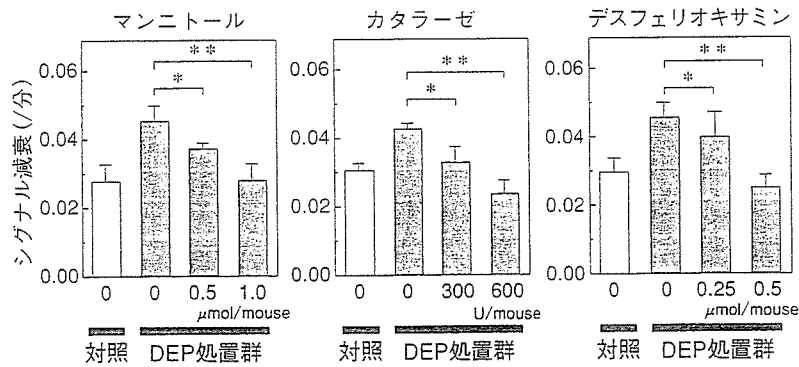


図4 ディーゼルエンジンの排気ガス粒子 (DEP) を気管内投与されたマウスにおけるマンニトール, カタラーゼおよびデスフェリオキサミンのシグナル減衰速度への影響

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$.

ることから、フェントン反応に従って、肺胞内でヒドロキシルラジカルが産生していることが明らかとなった。このときのヒドロキシルラジカルの産生量を推測するために、フェントン試薬を肺内に投与し、試験管内反応の結果と比較したところ、マイクロモルのフ

ェントン試薬相当であることが示唆された。

オーバーハウザー効果MRI

最近、オーバーハウザー効果を利用したフリーラジカル画像化装置OMRIが開発された^{8,9)}。オーバーハウ

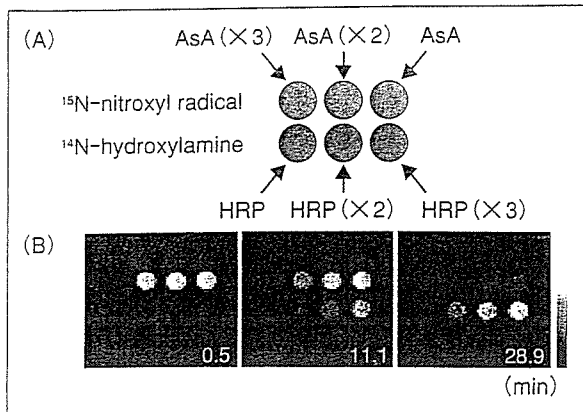


図5 酸化・還元反応の分離画像

ザー効果はNMRではNOEとして広く知られているが、オーバーハウザーの発見は「電子スピンを飽和させた際の核スピンのシグナル増加」である。OMRIはフリーラジカルの電子スピンを飽和させることでオーバーハウザー効果による水プロトンの画像を増強させフリーラジカルの分布画像を得る方法で、MRIと同様に高い空間分解能をもち、短時間測定が可能という特徴がある。

われわれは、このオーバーハウザー効果を利用したフリーラジカル画像化装置OMRIにニトロキシラジカルを組み合わせて、①生体内局所集積性をもたせたスピンプローブ（ニトロキシラジカル、およびその還元体）を合成し、それぞれ ^{14}N 、 ^{15}N で標識し、② ^{14}N 、 ^{15}N ラジカルを交互にESR共鳴させOMRI撮像することで、フリーラジカルやレドックス動態をナノメートルスケールで画像を得る方法を開発した¹⁰⁾。

この方法を用いて、酸化反応と還元反応を区別して可視化できる。図5-Aに示すように ^{14}N 標識ニトロキシラジカルを含む試験管にアスコルビン酸を、 ^{15}N 標識ヒドロキシラミン体を含む試験管に過酸化水素とワサビペルオキシダーゼの混合液をそれぞれ添加し、OMRIを用いて同時分離画像化を行った結果、図5-Bに示すように酸化反応と還元反応の同時分離画像が得られた¹⁰⁾。In vivo ESR解析でのシグナル減衰速度算出と同様、OMRI画像輝度から反応速度が画像化された。

また、プローブ剤の特性を生かすことでナノメートルスケールでの可視化も可能である。図6-Aに示すように、アスコルビン酸(AsA)封入リポソームを作成し、膜透過プローブ ^{14}N -MC-PROXYLと非膜透過プローブ ^{15}N -carboxy-PROXYLを添加し、リポソーム

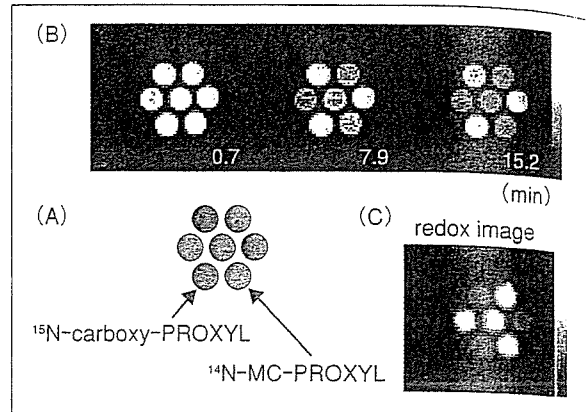


図6 リポソーム膜内・外の同時分離画像

内・外での同時分離画像化を行った結果、図6-Bに示すように、非膜透過性プローブではほとんど画像強度は変化しないのに対し、膜透過性プローブでは、リポソーム内のアスコルビン酸によって還元され、減衰速度の可視化(図6-C)から、ナノメートルスケールでの識別が可能であることが示された。

おわりに

生体計測ESR・OMRI・スピンプローブ法は、生体内のフリーラジカル反応を無侵襲解析しうる非常に有効な手法で、ナノメートルスケールでの可視化も可能であることから、医療、創薬など広範囲な分野で、その重要性がますます高まるであろう。

文献

- 1) Utsumi, H. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 416 : 1-8, 2003.
- 2) Sano, H. et al. : *Free Radic. Biol. Med.*, 28 : 959-969, 2000.
- 3) Han, J. Y. et al. : *Free Radic. Biol. Med.*, 30 : 516-525, 2001.
- 4) Kasazaki, K. et al. : *Free Radic. Res.*, 37 : 757-766, 2003.
- 5) Yamato, M. et al. : *Free Radic. Biol. Med.*, 35 : 1619-1631, 2003.
- 6) Yasukawa, K. et al. : *Free Radic. Res.*, 38 : 147-155, 2004.
- 7) Utsumi, H. et al. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317 : 228-235, 2006.
- 8) Lurie, D. J. et al. : *Phys. Med. Biol.*, 43 : 1877-1886, 1998.
- 9) Krishna, M. C. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 2216-2221, 2002.
- 10) Utsumi, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 1463-1468, 2006.

* * *

日本臨牀 65 卷 増刊号 4 (2007 年 4 月 28 日発行) 別刷

心不全 上

—最新の基礎・臨床研究の進歩—

IV. 成因・病態に関する基礎的研究

活性酸素種 (ROS) ・酸化ストレスによる
心不全の病態形成の機序

ROS のミトコンドリア DNA 傷害

井手友美 砂川賢二

IV. 成 因 ・ 病 態 に 関 す る 基 礎 的 研 究

活性酸素種 (ROS) ・ 酸化ストレスによる心不全の病態形成の機序

ROS の ミ ト コ ン ド リ ア DNA 傷 害

ROS and disorder of mitochondrial DNA

井手友美 砂川賢二

Key words : 活性酸素, リモデリング, ミトコンドリア DNA, 電子伝達系

はじめに

心不全の治療は、レニン・アンジオテンシン・アルドステロンの阻害および β 遮断薬の使用がその中心である。しかし、それでもなおやはり心不全は、すべての心疾患の終末像として予後不良の疾患としての位置づけにあり、今日更なる予後ならびに自覚症状の改善を目指して新たな治療法の開発が求められている。

本稿では、酸化ストレスの観点から、心不全の病態形成、増悪のメカニズムについて、活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) に着目して、その産生源としてのミトコンドリア傷害について概説する。

1. エネルギー産生の場合としてのミトコンドリア由来の酸化ストレス

不全心筋の酸化ストレスが増大していることは、心不全の患者ならびに心不全モデル動物における近年の精力的な研究によって明らかにされている^{1,2)}。更に、酸化ストレス消去剤の投与や抗酸化酵素の過剰発現が、心筋リモデリングを抑制することも証明されている。これらの基礎研究の結果から、不全心筋では酸化ストレスが増大していること、心不全の増悪機転に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明

らかとなった。では、それらの酸化ストレスは、どこから生じているのであろうか。

酸化ストレスの産生源は、一般的に、NADPH oxidase, xanthine oxidase (X/XO), そしてミトコンドリア電子伝達系が報告されている。なかでも、ミトコンドリアは、エネルギー代謝を行う細胞内小器官であり、酸化的リン酸化によって ATP を生合成する (図 1)。心筋細胞には多くのミトコンドリアが含まれている。近年、心不全においても、その病態形成・進展に、スーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシラジカル ($OH\cdot$) などの酸素ラジカルによるミトコンドリア機能不全が関与していることが明らかとなり、更に病態形成においてミトコンドリア DNA が重要な役割を果たしていると考えられている。

2. ミトコンドリアでの酸化ストレス産生の証明

生体内ラジカルは寿命が短いため、それらの測定にはスピントラップ法と呼ばれる方法が用いられる。これは活性ラジカルと容易に反応して安定ラジカルを生成する物質 (スピントラップ剤) を用い、安定ラジカルへ変換した後に電子スピン共鳴法 (ESR) にて測定する方法である。心筋よりミトコンドリアを分離し、ミトコンドリア呼吸鎖に必要な基質を添加すると、 O_2^- が

Tomomi Ide, Kenji Sunagawa: Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Hospital 九州大学病院 循環器内科

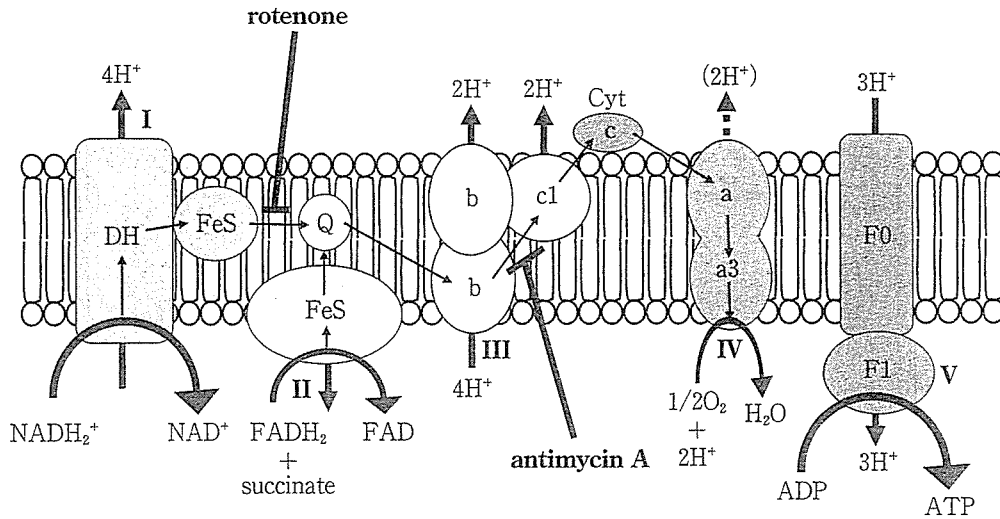


図1 ミトコンドリア電子伝達系と電子の流れ

産生され、これは、不全心筋において亢進している。一方で、ミクロソーム分画、膜分画で同様に O_2^- の産生をみると、不全心筋と正常心筋とでは差が認められず、ミトコンドリア電子伝達系は、不全心筋における主要なROSの産生源であると考えられる³⁾。ミトコンドリア由来の O_2^- は、ミトコンドリア内のMn-SODによって過酸化水素に変換され、一部は更に、Harber-Weiss反応またはFenton反応により更に反応性の高い $OH\cdot$ が産生される⁴⁾。

3. 心不全におけるミトコンドリアDNA傷害

ミトコンドリアDNAは、16.5kbの小さな環状二本鎖DNAで、その中に、ミトコンドリアDNAの翻訳に必要な22個のtRNA遺伝子、rRNA遺伝子(12S, 16S)、および電子伝達系を構成する13個のサブユニットがコードされている。そして酸化リン酸化に必要な呼吸鎖酵素群複合体は、ミトコンドリアDNAと核DNAと両方にコードされたサブユニットから構成されている。

酸素ラジカルがターゲットとするのは、通常、脂質、蛋白、DNAである。不全心筋のミトコンドリアで産生されたROSは、その産生がミトコンドリア電子伝達系であることから、やはりミトコンドリア内膜およびミトコンドリアDNAが傷害を受けやすいと考えられる。

a. ミトコンドリアDNAの質的傷害

ミトコンドリアDNAの傷害に伴って心筋症を生じることは、いわゆる突然変異型ミトコンドリアDNAの蓄積によるミトコンドリア病によって知られている。例えば、特定のtRNA遺伝子のA8344G変異によるものは、MERRF (myoclonic epilepsy, myopathy, and ragged red fiber)と呼ばれ、複合体IおよびIVの減少を認める。Kearns-Sayre症候群では、欠失型突然変異型ミトコンドリアDNAの蓄積が原因となって生じる。これらミトコンドリア遺伝子疾患の発症は、ミトコンドリアDNAの突然変異の蓄積によることが知られており、心筋症を含め、脳症や家族性糖尿病など、多彩な病態を示す。現時点では、後天性の心不全における突然変異型ミトコンドリアDNAの蓄積に関する検討は報告されていないが、老化個体や一部の糖尿病でごく少量の突然変異型DNAの検出がなされたことから、ミトコンドリア遺伝子疾患としての心筋症以外にも、ミトコンドリアDNAの突然変異の蓄積が、慢性疾患の病態に関与している可能性も示唆されている。

b. ミトコンドリアDNAの量的傷害

ミトコンドリアDNAは、個々のミトコンドリア内に複数存在するが、不全心筋のミトコンドリアDNAをサザンブロットにより定量すると、ミトコンドリアDNAコピー数は減少し、更にミトコンドリアDNAでコードされている

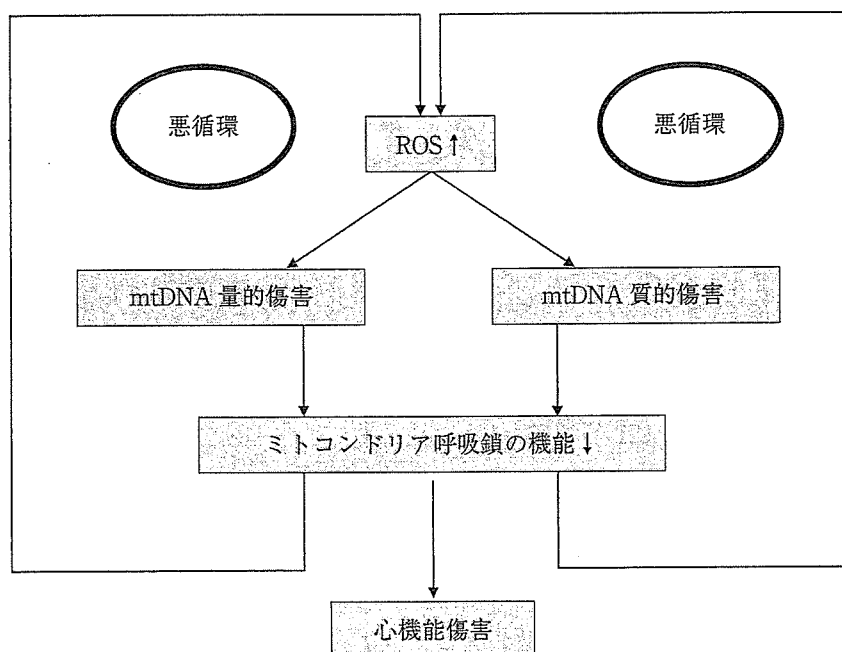


図2 ミトコンドリア DNA(mtDNA)の質的・量的傷害により、ミトコンドリア機能が低下し、更なる ROS を産生する

電子伝達系複合体サブユニットの mRNA の低下および複合体酵素活性の低下を認める。一方で、核 DNA でのみ構成される複合体 II は、その活性低下を認めないことから、ミトコンドリアにおける ROS のターゲットは、ミトコンドリア DNA であることが示されている。ミトコンドリア電子伝達系の複合体酵素の活性低下は、電子の伝達傷害を来し、更なる ROS の発生、という悪循環を形成すると考えられ、ROS による心不全の病態形成の機序の一つと考えられる(図2)。また、不全心筋において増加しているサイトカインである TNF α は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性を低下させることが示されている⁵⁾。そのほか、カテコールアミン、アンジオテンシン II も、更に ROS を増加させることも示唆されており、これらのサイトカイン、液性因子も含めて、ミトコンドリア機能傷害を中心として心不全の病態発症・進展へ関与している可能性が示唆されている。

4. ミトコンドリアでの ROS を特異的に消去する—peroxiredoxin-3 過剰発現マウスによる検討—

Prx(peroxiredoxin)-3 は、thioredoxin を電子

供与体としてミトコンドリアに局在する、H₂O₂ 消去酵素である。これまでに Prx-1 から Prx-6 までが同定されており、著者らは Prx-3 過剰発現マウスに心筋梗塞を作製し、予後およびリモデリングの抑制を検討した。Prx-3 過剰発現マウスでは、ミトコンドリア分画での脂質過酸化を抑制し、ミトコンドリア機能が維持され、リモデリングを抑制することが明らかとなった⁶⁾。この結果から、ミトコンドリア局所で産生された活性酸素を消去することが、新たな治療へのターゲットとなり得ると考えられる。

5. Tfam 過剰発現による心不全抑制効果

しかし、更に効率良くミトコンドリア局所での酸化ストレス産生を抑制できれば、更に優れた予後改善効果も期待できる。そこで著者らは、ミトコンドリア転写因子 A(mitochondrial transcription factor A: Tfam)に注目した。Tfam は、ミトコンドリア DNA の transcription factor として Fisher らによって最初にクローニングされた。当時、Tfam はミトコンドリアあたり 15 分子程度しか存在しないと信じられてきたが、実は Tfam はその約 100 倍量存在すること、その大部分がミトコンドリア DNA と安定的に結合し

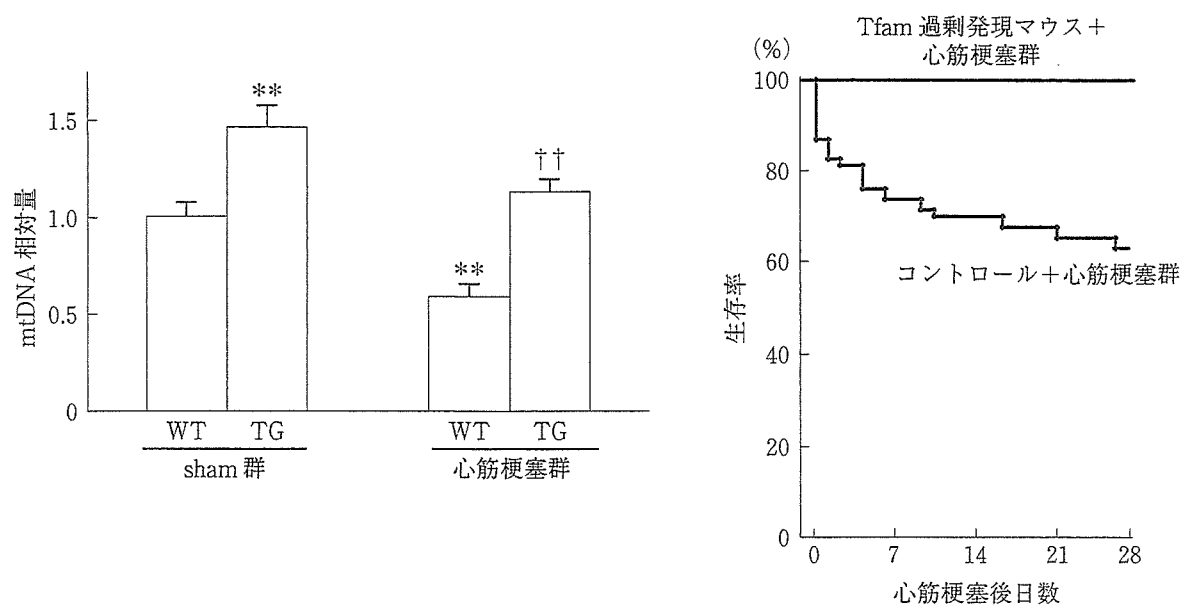


図3 Tfam の過剰発現により、ミトコンドリア DNA が増加し、心筋梗塞後の予後を改善した(文献⁸⁾より改変)

**p<0.01 vs sham-WT, ††p<0.01 vs 心筋梗塞群-WT

ていることがその後の研究からわかってきた。Tfam は、mitochondrial transcription factor B (TFB1M, TFB2M) および mitochondrial RNA polymerase (POLRMT) とともに、ミトコンドリア DNA の転写に働くことが知られている。Larsson らは、*Tfam*^{loxP} を使い、Tfam ノックアウトマウスを作製し、*Tfam*^{-/-} では、ミトコンドリア DNA の完全な消失が生じ、胎生 8.5-10.5 日で死亡することを報告している。それらのミトコンドリアは、サイズの拡大、異常クリスタを有し、サブユニットのすべてが核でコードされた succinate dehydrogenase (SDH) 活性は保たれ、ミトコンドリア DNA でコードされた cytochrome c oxidase (COX) 活性は消失していたことから、Tfam は心不全の形成・進展過程において重要な役割をもつことが示唆された⁷⁾。一方で、 β アクチンをプロモーターにヒト Tfam を過剰発現させたマウスを作製したところ、ヒト Tfam の発現とともに、約 40% のミトコンドリア DNA の増加を認めるが、この Tfam 過剰発

現マウスに心筋梗塞を作製し、心筋リモデリングを観察すると、心筋梗塞後もミトコンドリア DNA コピー数およびミトコンドリア電子伝達系酵素活性が維持され、心筋リモデリングを改善、更にはその生存率を著しく増加させる (WT 66%, Tfam-TG 100%) ことが明らかとなった (図 3)⁸⁾。つまり、心筋リモデリングの過程でミトコンドリア DNA の低下、ミトコンドリア機能の低下が関与しているのに対し、Tfam は、ミトコンドリア DNA を維持し、心筋リモデリングを抑制するうえで重要な働きをもつといえる。

おわりに

心不全の新たな治療ターゲットとして、ミトコンドリア局所での酸化ストレス産生増大のしくみと、ミトコンドリア局所での ROS 抑制による、リモデリング改善効果について概説した。ミトコンドリア DNA の維持をより選択的に行うことが、今後の新たな治療ターゲットとなり得るであろう。

■ 文 献

- 1) Mallat Z, et al: Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F₂alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 97: 1536-1539, 1998.
- 2) Dhalla AK, et al: Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 506-514, 1996.
- 3) Ide T, et al: Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85(4): 357-363, 1999.
- 4) Wallace DC: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283(5407): 1482-1488, 1999.
- 5) Suematsu N, et al: Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 107: 1418-1423, 2003.
- 6) Matsushima S, et al: Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 113(14): 1779-1786, 2006.
- 7) Larsson NG, et al: Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18: 231-236, 1998.
- 8) Ikeuchi M, et al: Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorate mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation* 112: 683-690, 2005.

ミトコンドリアにおける活性酸素産生

Reactive Oxygen Species in Mitochondria

井手 友美・砂川 賢二

Ide Tomomi Sunagawa Kenji

Key words

free radicals, mitochondrial DNA, oxidative damage, heart failure

要約

ミトコンドリアは、大量の酸素を消費し、エネルギーを産生する場であると同時に、その副産物として、スーパーオキシドを産生する細胞内小器官である。

superoxideに由来する H_2O_2 やhydroxyl radicalsは、ミトコンドリア構成蛋白、特に電子伝達系酵素およびミトコンドリアDNAを障害し、さらなるミトコンドリア機能不全から、さらに活性酸素種が産生されるという悪循環を形成することになる。種々の慢性疾患では、ミトコンドリア由来の活性酸素が増悪因子と考えられ、活性酸素の消去系の活性化あるいは、ミトコンドリア自身のsuperoxide産生の抑制が治療のターゲットとなりうると考えられる。特に心不全においては、その心筋リモデリングに活性酸素が重要な役割を果たしており、ミトコンドリア由来のスーパーオキシド産生を抑制することで、心不全の進展を抑制、予後の改善につながる事が明らかとなっている。

はじめに

ヒトは、1日平均約2,000~2,500kcalものエネルギーを主にミトコンドリアの呼吸によって得ている。つまり、ミトコンドリアは細胞のエネルギー代謝を支える「発電所」に相当するところであり、ほ乳類では、ATPの80~90%はミトコンドリアでの酸化リン酸化により生成され、細胞の生を維持している。しかし、一方で、そのATP産生のためにミトコンドリアは大量の酸素を代謝しており、それに伴って常に微量(酸素代謝の1~5%)の活性酸素が産生されている。つまりATP合成に直接関わる呼吸鎖電子伝達酵素群は、活性酸素産生源ともなる

わけである。種々の病的な状態では、それによる活性酸素の産生が、内因性の活性酸素処理能力を超え、病態の進行や増悪に関わる因子として重要であることが示唆されている。

本稿では、主に、ミトコンドリアにおける活性酸素産生のしくみ、ならびにそれに伴ったと考えられる各種疾患について考察する。

ミトコンドリアのスーパーオキシド産生

ほ乳類ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は、つぎの5つの酵素複合体から構成されている。(図1)

- ①NADH-UQ酸化還元酵素(Complex I)
- ②コハク酸-UQ酸化還元酵素(Complex II)
- ③ユビキノール-CytC酸化還元酵素(Complex III)
- ④Cytochrome C酸化酵素(Complex IV)
- ⑤ATP合成酵素(Complex V)

これらの複合体のうち、電子伝達反応に共役してプロトンポンプする酵素は、complex I, III, IVの3つの複合体であり、ポンプされたプロトンによってミトコンドリア内膜を介して電気化学ポテンシャル勾配が形成され、complex VによるATP合成の駆動力となる。細胞内において、酸素濃度が急激に上昇した場合や、呼吸鎖が遮断された場合には、電子の流れが制限されることにより電子がリークしやすくなり、酸素分子が一電子還元されて、ミトコンドリアからのsuperoxide産生は、著しく増加する。老化を含む種々の疾患でこれらの酵素活性の低下がこれら電子伝達系由来のsuperoxideの産生増加に関係

九州大学大学院医学研究院循環器内科学：Department of Cardiovascular medicine
Kyushu University Graduate School of Medical Sciences
〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1
Fax：092-642-5374 E-mail：tomomi_j@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

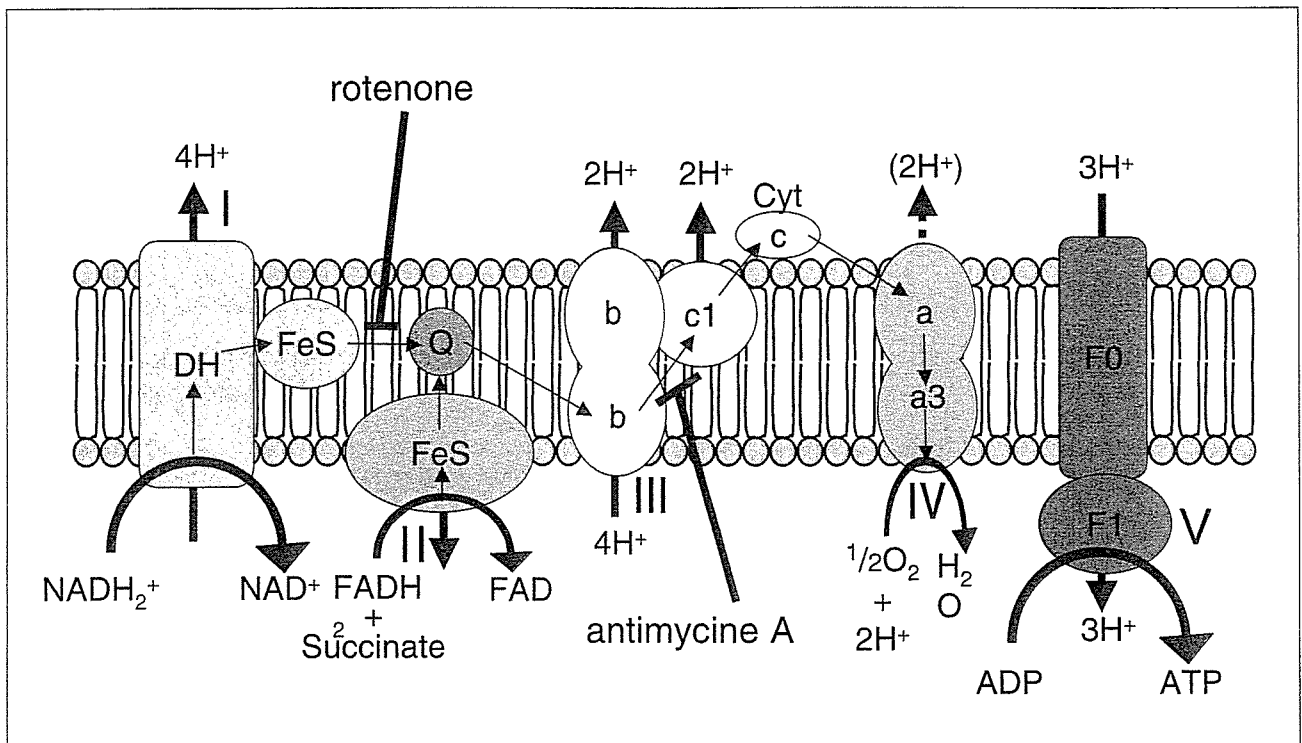


図1 ミトコンドリア電子伝達系と電子の流れ

していることが示唆されている。

実際に、ミトコンドリア亜粒子を用いて superoxide が産生されることは、電子スピン共鳴法 (ESR: Electron Spin Resonance Spectroscopy) によって検出される。ミトコンドリア亜粒子に complex I の基質である NADH および complex I の阻害剤である rotenone を加えると、スピントラップ剤である DMPO は、産生された superoxide をトラップするため、DMPO-OH シグナルが検出される。また、同様に、NADH または complex II の基質であるコハク酸存在下に complex III の阻害剤である antimycin A を加えると、やはり superoxide の産生が検出される。(図2) 特に、ヒトでは複合体 I の機能障害がパーキンソン病や遺伝性視神経萎縮症などの疾病の原因となることが示されており、その機能障害を防止することが、疾病の予防あるいは治療につながる可能性も示唆されているが、具体的な方法は未だにないのが現実である。

ミトコンドリアによる NO 産生

ミトコンドリア内には、NO 合成酵素があることが報告されている。しかし、ミトコンドリア内で発

生した NO の役割について詳細は不明である。内臓局所で産生された superoxide は NO と反応して、より細胞・組織障害性の高い peroxynitrite に変換されることが予想され、疾病との関連も示唆されている。

ミトコンドリア由来の活性酸素による各種疾患

ミトコンドリア内膜で産生された superoxide は、過酸化水素に変換される。ミトコンドリア内で superoxide を消去する酵素は、Mn-SOD として知られ、この酵素欠損により、*C. elegans* は短命となり、抗酸化剤の投与により、寿命を延長することができることから、Mn-SOD がミトコンドリア内の活性酸素消去に必須であることがわかる。しかし、Mn-SOD は、superoxide を H₂O₂ に変換し、遷移元素存在下ではさらに反応性の高い hydroxyl radicals が産生される可能性をもつ。従って、ミトコンドリア内では、H₂O₂ を消去する glutathione peroxidase (GPx) や、peroxyredoxin (Prx) が重要な抗酸化酵素であると考えられている。心筋梗塞後の心不全マウスにおいては、その心筋において活性酸素が増加していることが明らかとなっているが、GPx 過剰発現マウスや Prx 過剰発現マウスでは、心筋ミトコンドリアの脂

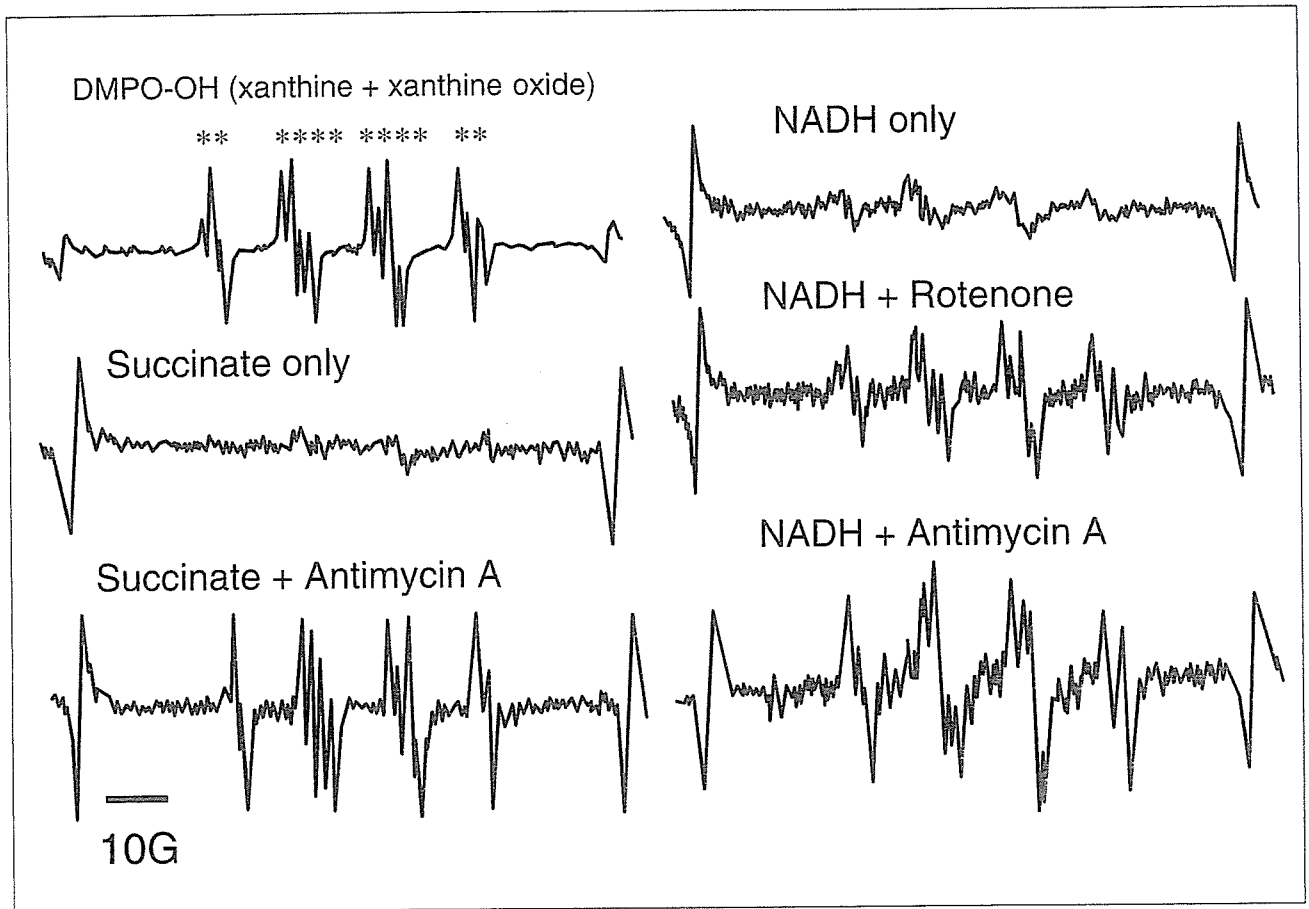


図2 DMPO-OHのESR シグナル

ミトコンドリア亜粒子に基質を加え、さらに rotenone あるいは antimycin A を加えると、superoxide が産生される。

質過酸化が抑制され、その心筋リモデリングが抑制され、特に GPx 過剰発現マウスでは心筋梗塞後の予後を改善することが示された⁷⁾。

また、ミトコンドリア病として知られている病態の中にもこのミトコンドリア由来の酸化ストレスが関与していることが示されている。

つまり、活性酸素が重要な役割を果たしていると考えられる疾患では、ミトコンドリア内部で、活性酸素消去系と産生系のバランスが破綻し、産生系優位になった状態が、その病態形成、増悪因子として作用し、その過剰な活性酸素を消去する系を活性化あるいは増加させることが、治療への足がかりになると考えられる。

ミトコンドリア電子伝達系酵素活性と活性酸素

ミトコンドリアにおける活性酸素は、電子伝達系そのものの機能不全や、種々の理由で電子の授受が

うまくいかない場合に産生される。また、電子伝達系複合体の活性低下によっても superoxide が産生されることが知られていること、Fe-S を活性中心にもつ酵素は、活性酸素により失活しやすく、また、活性酸素が関連していると考えられる疾患で電子伝達系複合体の酵素活性が低下していることから、このミトコンドリア呼吸鎖と活性酸素産生は大変密接な関わりがあると考えられている。

adenine nucleotide translocator isoform 1 (ANT1) は核 DNA でコードされているが、この遺伝子欠損によって、mtDNA の変異を増加させ、古典的なミトコンドリアミオパチーおよび心筋肥大を生じる⁸⁾。ANT1 欠損マウスでは、血中の乳酸、アラニン、コハク酸、クエン酸などが上昇し、ミトコンドリア電子伝達系および TCA サイクルの阻害が生じた結果、ミトコンドリアの機能不全から活性酸素が産生され、近傍に存在する mtDNA の変異を増加させ、さらなるミトコンドリア機能不全から活性酸素産生へ

と悪循環が形成されると考えられる。

TFAMによる活性酸素産生抑制

心筋梗塞後心不全マウスの心筋では、核DNAでのみコードされている complex IIを除き、ミトコンドリアの電子伝達系酵素の活性が低下し、またミトコンドリアDNAのコピー数の減少が認められた³⁾。

また、心不全には、種々のサイトカイン・液性因子が関与してその病態形成および増悪に寄与しているが、TNF α (Tumor necrotizing factor α) を心筋細胞に暴露させると、電子伝達系複合体の活性低下およびミトコンドリアDNAのコピー数の減少、それに伴う、活性酸素の産生を認めている³⁾。これまで多くのミトコンドリア研究から、ミトコンドリアDNAは、ヒストン構造を持たない遺伝子であり、活性酸素産生のごく近傍に存在するために、酸化ストレスによる障害を受けやすいとされてきた。そのような中、Fisherらによって最初にクローニングされたTFAM (Transcription factor A) は、HMG蛋白であり、ミトコンドリアDNAの転写因子として知られている¹⁾が、これはミトコンドリアDNAの周囲に多量に存在し、ミトコンドリアDNAの維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった²⁾。TFAM遺伝子の骨格筋および心筋特異的な欠損マウスでは、ミトコンドリアDNAの減少に伴って、complex IIをのぞく電子伝達系酵素の活性低下および心拡大、心筋収縮不全を認め⁶⁾、誕生後早期に死亡する。また、TFAM過剰発現マウスでは、心筋梗塞後の左室リモデリングおよび心筋アポトーシスを抑制し、その生存率を改善した⁴⁾。

また、膵臓での β 細胞特異的なTFAM欠損では、糖尿病を発症ことも報告されており、ミトコンドリア

アそのものの役割を明らかにする手段として、TFAMおよびミトコンドリアDNAの役割の解明は、極めて重要である。

まとめ

以上のように、ミトコンドリア呼吸鎖の機能とミトコンドリアDNA、およびミトコンドリアでの酸化ストレスは、密接な関係を有している。それらが、種々の疾患の病態形成および増悪過程に果たす役割について考察した。ミトコンドリアをターゲットにした酸化ストレスの制御が、今後種々の疾患の治療への足がかりとなることが期待される。

文献

- 1) Fisher RP, and Clayton DA.: Mol Cell Biol 8: 3496-3509, 1988
- 2) Graham BH, Waymire KG, Cottrell B: Nat Genet 16: 226-234, 1997
- 3) Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, and Takeshita A.: Circ Res 88: 529-535, 2001
- 4) Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, and Tsutsui H.: Circulation 112: 683-690, 2005
- 5) Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, and Kang D.: Mol Cell Biol 24: 9823-9834, 2004
- 6) Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, and Clayton DA.: Nat Genet 18: 231-236, 1998
- 7) Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, and Takeshita A.: Circulation 109: 544-549, 2004
- 8) Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, and Takeshita A.: Circulation 107: 1418-1423, 2003

<細胞ニュース>

第15回日本がん転移学会 (第11回国際転移学会合同)

日本がん転移学会では下記の日程にて学術集会を開催いたします。

会期：2006年9月3日(日)～6日(水) 会場：徳島市・ホテルクレメント徳島
会長：曾根 三郎 (徳島大学分子制御内科学)

講演：Cancer Genomics: From Bench to Bedside./ Stromal and Epithelial TGF-beta Signaling in Cancer./ The Organ Microenvironment in Metastasis: Biology and Therapy./ Critical Determinants of Organ Specific Lung Cancer Metastasis./ Matrix Metalloproteinases in Cancer Metastasis./ Superoxide and Metastasis./ BRMS1 Metastasis Suppressor Differentially Regulates Growth Factor Responses: Mechanism for Differential Tissue Proliferation. 他

お問い合わせ先 徳島大学医学部分子制御内科学 TEL: 088-633-7127

※本誌バックナンバーも各会場にて展示販売の予定です。お気軽にお立ち寄り下さい。

レドックス制御におけるTfamの役割

Roles of mitochondrial transcription factor A (Tfam) in redox regulation



井手友美(写真) 砂川賢二 筒井裕之

Tomomi Ide¹ and Kenji SUNAGAWA¹ and Hiroyuki Tsutsui²

九州大学大学院医学研究院循環器内科学¹, 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学²

◎ミトコンドリアは、大量の酸素からエネルギーを産生する場であると同時に、その過程においてスーパーオキシドを産生する細胞内小器官である。Tfam は核でコードされる蛋白であるが、近年ミトコンドリア DNA の転写および複製だけでなく、その維持にも重要であることが明らかとなってきた。心不全モデル動物ではミトコンドリア由来の活性酸素が増加していることが示唆されているが、Tfam を過剰発現させることで、心筋リモデリングおよび心不全を抑制し、その予後が改善される。Tfam の制御機構を明らかにすることがレドックス制御を可能とし、種々の慢性疾患の治療へとつながる可能性が示唆されている。



Key word

ミトコンドリアDNA, 心不全, 酸化ストレス, ミトコンドリア電子伝達系, Tfam

ミトコンドリアは、その内膜に存在する呼吸鎖でもって酸素と水素を反応させ、ATP を合成し、生物のエネルギーを産生する細胞内小器官である。同時に、その電子伝達系で電子のリークが生じる結果、数%の酸素からスーパーオキシドが産生される。したがって、何らかの理由により電子伝達系の機能が障害された場合はエネルギー産生が低下するのみならず、より多くのスーパーオキシドが産生され、組織障害、ミトコンドリア内に存在するミトコンドリア DNA(mtDNA)に障害をもたらし、さらにその結果として、さらなるスーパーオキシドを産生するという悪循環を生じることになる(図1)。したがって、mtDNA を質的・量的に保つことが、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが関与しているとされる種々の慢性疾患のあらたな治療ターゲットとなる可能性が示唆されている。

ミトコンドリア DNA は、電子伝達系に必要なサブユニットの一部をコードしている、16.5 kbp の環状二本鎖 DNA である。近年、ミトコンドリアに豊富に存在する蛋白である mitochondrial transcription factor A(Tfam)が、その mtDNA の転写酵素であると同時に、維持に不可欠であること

が明らかとなり、ミトコンドリア機能維持にきわめて重要な役割を果たしていることがわかってきた。Tfam のこれまでに得られた知見、その果たす役割について考察する。

Transcription factorとしてのTfam

Tfam は mtDNA の transcription factor として、Fisher らによって最初にクローニングされた蛋白である¹⁾。Tfam は transcription factor B(TFB1 M, TFB2 M)および mitochondrial RNA polymerase (POLRMT)とともに、mtDNA の転写に働くことが知られている。3種類の転写因子はいずれも核 DNA でコードされ、とくに、Tfam(以前には mtTF-1 あるいは mtTFA ともよばれていた)はミトコンドリアの転写・複製だけでなく、mtDNA の維持にも重要であることが明らかとなってきた。

NucleoidとしてのTfam

mtDNA はこれまで、核 DNA と異なり、ヒストン構造を有さず、それゆえにときとして“裸の遺伝子”とも考えられ、ストレスに対して脆弱である理由ともとらえられてきた。しかし、Tfam は 2つの HMG box を有する HMG 蛋白であり、

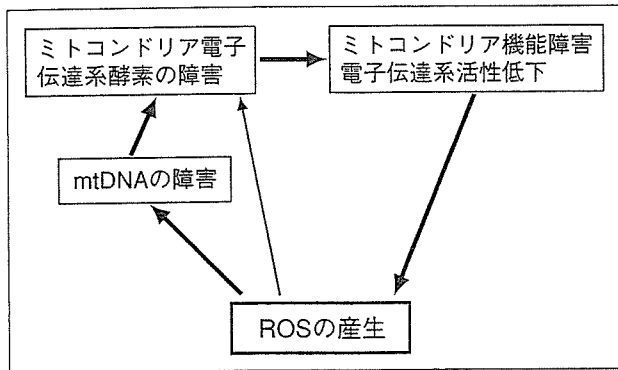


図 1 ミトコンドリアにおける活性酸素産生

DNA の配列によらず DNA に結合する特性を有する。しかも、mtDNA 当り約 900 分子の TFAM が存在すると考えられている。Tfam は、mtDNA のプロモーター領域にはより強い親和性をもつことも明らかとなっているが、正常の状態ではその量的関係から mtDNA は Tfam にすっぽりと包まれていることが予想される。

siRNA により Hela 細胞を用いて Tfam 発現を減少させると、Tfam 蛋白の減少に比例して mtDNA 量も減少する。またその後、数日以内に Tfam は増加に転じるが、これも mtDNA は mtDNA 同様の増加を示す²⁾。つまり mtDNA は Tfam の HMG ドメインと結合することで安定化し、維持されていると考えられる。

TFAM欠損マウスおよび過剰発現マウス

Tfam そのものの機能をみるために、遺伝子改変マウスを用いた研究が報告されている。Larsson らは Tfam^{loxP} を使い、Tfam ノックアウトマウスをそれぞれ作製した³⁾。Tfam^{-/-}では mtDNA の完全な消失が生じ、胎生 8.5~10.5 日で死亡し、それらのミトコンドリアはサイズの拡大、異常クリスタを有し、サブユニットのすべてが核でコードされた succinate dehydrogenase (SDH) 活性は保たれていたが、mtDNA でコードされた cytochrome c oxidase (COX) 活性は消失していた。

また、骨格筋および心筋特異的に Tfam 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、拡張型心筋症様の病態を呈し、20 日ほどで死に至る。このマウスは QT 延長および房室伝導障害を伴い、心臓での mtDNA のコピー数は 26% まで低下していることが報告されている。電子伝達系複合体の I および IV は低下を示すが、II は保たれており、COX で心筋組織を免疫染色すると一部の心筋では COX の欠落が生じ、モザイク用のパターンを示すことから、Tfam は心不全の形成・進展過程において何らかの役割をもつことが示唆される。

著者らは以前に、マウスを用いた心筋梗塞後の不全心筋モデルにおいてサザンブロットによる心筋 mtDNA のコピー数の減少、Tfam の減少、ならびにミトコンドリア電子伝達系酵素活性の低下を

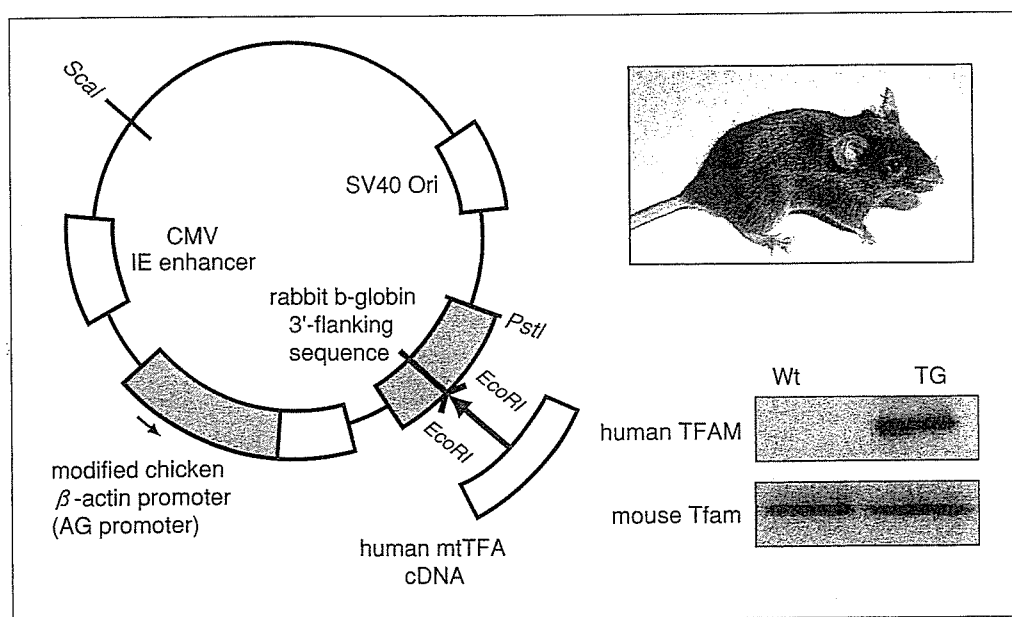


図 2 Tfam過剰発現マウス

ヒト Tfam を過剰発現させたマウスには内因性 Tfam の量的変化は認められない。

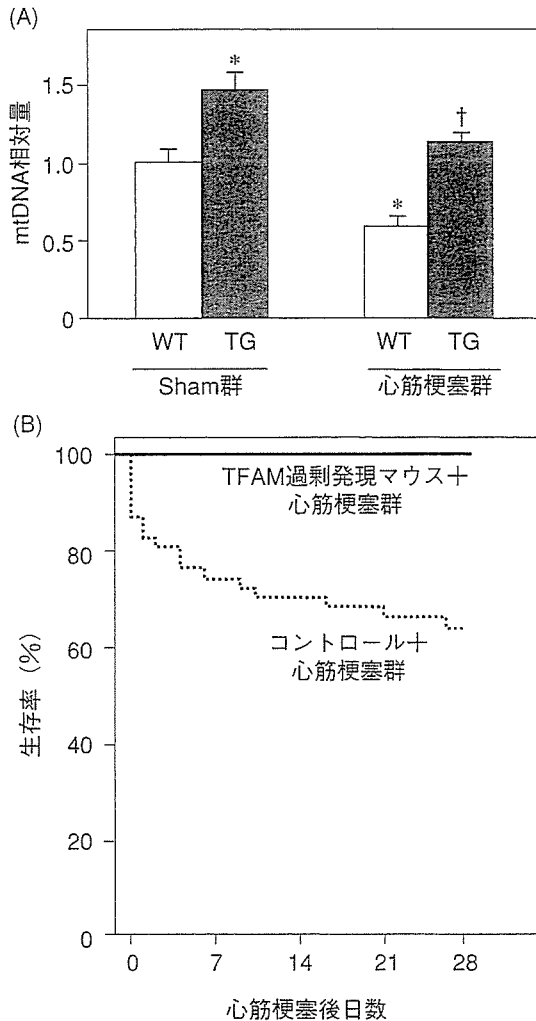


図3 Tfamの過剰発現によりmtDNAが増加し(A), 心筋梗塞後の予後を改善させた(B) (文献²⁾より改変)
 * : $p < 0.01$ vs. WT-Sham, † : $p < 0.01$ vs. WT-心筋梗塞

認めることを報告した⁴⁾。そこで、図2に示すように、 β -アクチンをプロモーターに Tfam を過剰発現させたマウスを作製すると、Tfam の発現とともに、約 40% の mtDNA の増加を認めた。このトランスジェニックマウスに心筋梗塞を作製し、心筋リモデリングを観察すると、心筋梗塞後も mtDNA コピー数およびミトコンドリア電子伝達系酵素活性が維持され、心筋リモデリングを改善し、さらにはその生存率を増加させることが明らかとなった(図3)。さらに、このモデルでは心筋梗塞後の非梗塞部における脂質過酸化が抑制され、アポトーシスの抑制も観察された。つまり心筋リモデリングの過程で mtDNA の低下、ミトコンドリア機能の低下が関与しているのに対し、

Tfam は mtDNA を維持し、心筋リモデリングを抑制するうえで重要な働きをもつといえる。

そのほか、膵における Tfam の役割も注目されており、膵 β 細胞特異的に Tfam 遺伝子を欠損させたマウスでは生後7日目ではほとんどの β 細胞の Tfam が消失し、糖尿病を呈することが明らかとなっている⁵⁾。

Tfamの発現および制御と核-ミトコンドリアのinteraction

ヒトの Tfam は 25 kDa の核でコードされた蛋白で、204 アミノ酸で構成される。アミノ末端に第1の high mobility group (HMG) ドメイン、リンカー領域、そして第2の HMG ドメイン、転写に不可欠な 25 アミノ酸を有するカルボキシ末端領域をもつ。Tfam の発現は、トランス作動性蛋白である主要な 2 つの転写因子、nuclear respiratory factor (NRF)-1 および 2 によって調節されている。さらに、Tfam プロモーターの NRF-1 転写機能は peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1a (PGC-1) によって活性化される。

以前よりミトコンドリアと核におけるコミュニケーションは、エネルギーのホメオスタシスを維持するために必要不可欠であることが示唆されていた⁶⁾。過剰な活性酸素によって mtDNA が減少し、電子伝達系の機能障害が生じる可能性があるが、その刺激によってどのような機構で核 DNA へ情報が伝わりストレスに対抗するための転写が開始されるのかは長い間不明であった。Wu らは細胞内に増加した cAMP が PGC-1 の発現を増加させ、それによってから NRF-1 および 2 の発現が誘導され、それらに制御されたミトコンドリア電子伝達系酵素および Tfam の発現が促進されるメカニズムを明らかにした(図4)⁷⁾。また、Piantadosi らは H4IIE ラット hepatoma 細胞に t-BOOH を用いた酸化ストレス刺激を与えると、NRF-1 のリン酸化を生じ、Tfam が増加することを示している。さらに、その反応には PI3K/Akt の活性化を介して NRF の核への translocation が引き金になっていることが示され、比較的穏やかな酸化ストレスに際しての核からミトコンドリアへの制御機構がしだいに明らかとなりつつある⁸⁾。NRF-1

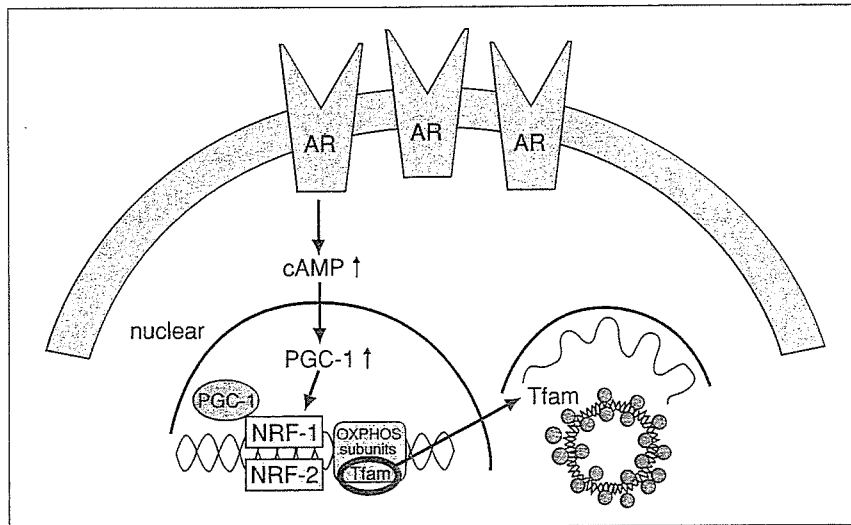


図 4 Tfam発現はNRFおよびPGC-1によって制御されている

は電子伝達系の各複合体のサブユニットの大部分を制御し、さらには Tfam だけでなく、TFB1 M, TFB2 M, POLRMT といった mtDNA の転写制御因子の調節も行っていることが明らかとなり、最近のクロマチン免疫沈降(ChIP)を用いた研究では、これらの遺伝子のプロモーターは *in vivo* において NRF-1 に占拠されていることも報告されている⁹⁾。

しかし、PGC-1 が coactivator としてターゲットとされている NRF は、電子伝達系複合体サブユニットや Tfam 以外に数百の他のまったくミトコンドリア呼吸鎖に関係していない遺伝子発現にも関与していることから、Tfam を特異的に増加させる機構はいまだ不明である。Tfam 欠損マウスは、胎生 8.5~10.5 日は生存するのに対し、NRF-1 欠損マウスは胎生初期 3.5~6.5 日しか生き延びることはできない。その理由として、NRF-1 が mtDNA だけではなく、細胞の成長や発達に不可欠である遺伝子をターゲットとしているからであると考えられる。

おわりに

生体内のレドックス制御にはその余剰な活性酸素産生源へのアプローチが不可欠である。そのなかで、Tfam は mtDNA の維持に重要であり、ミトコンドリア由来の酸化ストレスを制御する key molecule である可能性がある。しかし、その制御

機構に関してはいまだ不明な点が多く、また今後、Tfam の役割もその全貌が明らかになることで、多くの慢性疾患の治療への発展が期待される。

文献

- 1) Fisher, R. P. and Clayton, D. A. : Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, **8** : 3496-3509, 1988.
- 2) Kanki, T. et al. : Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **24** : 9823-9834, 2004.
- 3) Larsson, N. G. et al. : Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.*, **18** : 231-236, 1998.
- 4) Ide, T. et al. : Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ. Res.*, **85** : 357-363, 1999.
- 5) Silva, J. P. et al. : Impaired insulin secretion and β -cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat. Genet.*, **26** : 336-340, 2000.
- 6) Scarpulla, R. C. : Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29** : 109-119, 1997.
- 7) Wu, Z. et al. : Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98** : 115-124, 1999.
- 8) Piantadosi, C. A. and Suliman, H. B. : Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J. Biol. Chem.*, **281** : 324-333, 2006.
- 9) Cam, H. et al. : A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol. Cell*, **16** : 399-411, 2004.

ミトコンドリア由来の酸化ストレスの制御による あらたな心不全治療

A new strategy for heart failure by mitochondrial redox regulation



井手友美(写真) 筒井裕之

Tomomi Ibe¹ and Hiroyuki Tsutsui²

九州大学大学院医学研究院循環器内科学¹, 北海道大学大学院医学研究科循環器内科学²

○レニン-アンジオテンシンおよび各種サイトカインに加えて近年、心不全・リモデリングの進展に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが知られている。著者らは、心不全における酸化ストレスの産生の原因はミトコンドリア DNA が障害を受け、ミトコンドリア呼吸鎖の機能低下が原因であることを明らかにした。つまりミトコンドリア DNA を保護する、あるいは局所で産生された酸化ストレスを即座に消去する、といった方法があらたな心不全治療として考えられる。とくにミトコンドリア内に豊富に含まれるミトコンドリア転写因子 A(Tfam)は、その過剰発現によりミトコンドリア DNA を保護し、心筋梗塞後のリモデリングを抑制し、マウスの予後を改善した。あらたな細胞内小分子をターゲットとしたレドックス制御による治療戦略を紹介する。



ミトコンドリア, DNA, Tfam, 酸化ストレス, 心不全, リモデリング

心不全において心筋の酸化ストレスが増大していることは、心不全の患者ならびに心不全モデル動物における近年の精力的な研究によって明らかにされている¹⁻³⁾。さらに、酸化ストレス消去剤の投与や、抗酸化酵素の過剰発現によって心筋リモデリングが抑制されることも証明されている^{4,5)}。これらの結果から心不全において酸化ストレスが増大し、その病態形成に重要な役割を果たしていることは明らかとなった。今後は、何をどのタイミングでターゲットとして酸化ストレスを制御し、あらたな心不全の治療戦略とできるかが注目されている。

心不全における酸化ストレスの細胞内産生源としては、NADPH oxidase, xanthine oxidase, そしてミトコンドリア電子伝達系が報告されている。とくに、心筋細胞はエネルギー代謝を行う細胞内小器官であるミトコンドリアを豊富に含むが、このミトコンドリア呼吸鎖の機能不全によって電子のリークを生じ、スーパーオキシドを産生する。このためミトコンドリアは心不全における主要な

酸素ラジカルの産生源であると考えられる。

本稿ではミトコンドリア由来の酸化ストレス制御という観点から、あらたな治療法への展開を提案する。



ミトコンドリアDNAの低下と酸化ストレスの産生

ミトコンドリアの機能不全にはさまざまな理由があるが、ミトコンドリア DNA(mtDNA)はミトコンドリア電子伝達系酵素のサブユニットをコードしており、mtDNA の異常はミトコンドリア電子伝達系酵素の活性低下をもたらし、さらなるミトコンドリア内膜付近でのスーパーオキシド産生を引き起こし、ミトコンドリアの機能不全の原因となり悪循環を生じるであろう(図1)。

ひとつのミトコンドリア内には通常、mtDNA が複数存在し、心筋細胞では数百の mtDNA が存在すると考えられている。不全心筋では mtDNA コピー数は減少し、さらに mtDNA でコードされている電子伝達系複合体サブユニットの mRNA の低

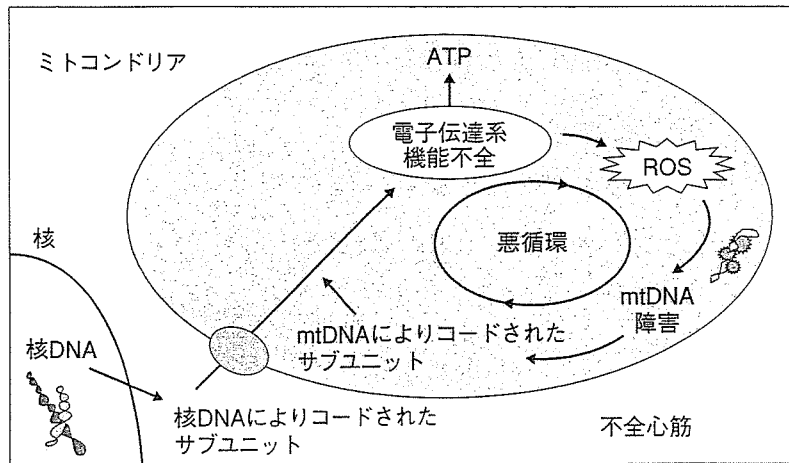


図 1 ミトコンドリアにおけるROSの産生とmtDNA障害が形成する悪循環

下および複合体酵素活性が低下している。核 DNA でのみ構成される複合体 II はその活性低下を認めないことから、ミトコンドリアにおける活性酸素種(ROS)のターゲットは mtDNA であることが示されている⁶⁾。ミトコンドリア電子伝達系の複合体酵素の活性低下は電子の伝達障害をきたし、さらなる ROS の発生、という悪循環を形成すると考えられ、ROS による心不全の病態形成の機序のひとつと考えられる(図 1)。また、不全心筋において増加しているサイトカインである TNF- α はミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性を低下させることが示されている⁷⁾。そのほか、カテコールアミン、アンジオテンシン II もさらに ROS を増加させることが示唆されており、これらのサイトカイン、液性因子も含めてミトコンドリア機能障害を中心として、心不全の病態発症・進展へ関与している可能性が示唆されている。

ミトコンドリアの機能不全を生じるものは、ほかにも核 DNA でコードされたミトコンドリア電子伝達系サブユニットの異常のほか、mtDNA の質的異常に基づくものが存在する。たとえば、MERRF (myoclonic epilepsy, myopathy, and ragged red fiber) は tRNA 遺伝子の A8322G 変異によるものであり、そのために complex I および IV の活性低下を認める。Kearns-Sayre 症候群では欠失型突然変異型 mtDNA の蓄積が原因として知られている。これらミトコンドリア遺伝子疾患の発症は mtDNA の突然変異の蓄積によることが知られており、心筋症を含め、脳症や家族性糖尿病など多彩な病態を示す。現時

点では後天性の心不全での突然変異型 mtDNA の蓄積に関する検討は報告されていないが、老化個体や一部の糖尿病でごく少量の突然変異型 DNA の検出がなされたことから、ミトコンドリア遺伝子疾患としての心筋症以外にも、mtDNA の突然変異の蓄積が慢性疾患の病態に関与している可能性も考えられている⁸⁾。

したがって、心不全におけるミトコンドリア由来の ROS をターゲットとしてリモデリングの抑制をめざすには、①ミトコンドリア局所で産生された ROS を消去する、②ミトコンドリア DNA の減少を防ぎ、ミトコンドリアからの ROS 産生を抑制する、といった方法が考えられる。

ミトコンドリアでの ROS を特異的に消去する—— Peroxiredoxin-3 過剰発現マウスによる検討

Peroxiredoxin (Prx)-3 は、thioredoxin を電子供与体としてミトコンドリアに局在する H₂O₂ 消去酵素である。Prx は Prx-1 から Prx-6 までがこれまで同定されており、著者らはこのマウスに心筋梗塞を作製し、予後およびリモデリングの抑制を検討した。Prx-3 過剰発現マウスではミトコンドリア分画での脂質過酸化を抑制し、ミトコンドリア機能が維持され、リモデリングを抑制することが明らかとなった⁹⁾(図 2)。この結果から、ミトコンドリア局所で産生された活性酸素を消去することがあらたな治療へのターゲットとなりうると思われる。