循環器疾患とオートファジー

たね いけ まなぶ むら かわ とも かず おお つ きん や
種池 学¹⁾，村川 智一¹⁾，大津 欣也²⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学

2) 国立循環器病研究センター

はじめに

あらゆる心疾患が最終的に到達する症候群である心不全は、日本を含む先進国において、死因の上位を占める。また、高齢者では心不全罹患率が高いため、高齢化が進む日本において今後も心不全患者数が増加することが懸念されている。慢性心不全患者に対する現代の内服治療は、数々のエビデンスに基づいて行われているが、心不全患者の5年生存率は約50%と非常に高いままで推移している。そのため、新たな治療ターゲットの発掘とそれらに対する新規治療戦略および治療薬の開発が喫緊の課題となっている。本稿では、われわれの研究の中心テーマであるオートファジーに焦点を当て、心不全に対する新規治療法開発のターゲットとなる可能性について述べる。

オートファジー

1. 心臓における細胞内恒常性維持

心筋細胞は終末分化細胞であり、ストレスにより障害を受けた細胞を細胞死によって排除したり、分裂によって補完したりすることができない。そこで、心筋細胞や心臓が構造や機能を保つためには、細胞内の恒常性を維持することが重要となる。その役割を担っているのが細胞内分解機

構であり、そのうちのひとつがオートファジーである。オートファジーにはミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー、マクロオートファジーが知られている。その中で最も研究が進んでいるマクロオートファジー（以後、オートファジー）は、研究当初、飢餓時に非選択的に細胞内タンパク質や小器官を隔離膜内に取り込み、リソソームと融合して内容物を分解することにより、分解産物を再利用して生存に必要なタンパク質やエネルギーを生合成する役割を担っていると考えられていた。しかし、その後、ウイルスや細菌 (xenophagy)、小胞体 (ERphagy)、ペルオキシソーム (pexophagy)、ミトコンドリア (mitophagy) など、不要物や傷害を受けた細胞内小器官を選択的に分解する選択的オートファジーが報告され、細胞内構造物の品質管理および細胞内恒常性維持における重要な役割やそのメカニズムについて、活発な研究が行われている。

2. オートファジーと心不全

以前より、げっ歯類の心不全モデルや心不全患者の心筋組織において、オートファゴソーム数が増加することは知られていた。しかし、この増加が心不全の原因であるのか結果であるのかは、長年不明のままであった。そこで、われわれはオートファゴソーム形成に必須の分子である Atg5 の

[Key words] 心不全, ミトコンドリア, オートファジー, マイトファジー

心筋細胞特異的ノックアウトマウスを用いて解析した。その結果、心臓においてオートファジーは、定常状態でも横行大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷条件下でも、サルコメアやミトコンドリアといった細胞内構造物の恒常性を維持することで、心臓保護的に作用していることを明らかにした¹⁾。また、当該ノックアウトマウスでは、心不全を示す10ヵ月齢の時点のみならず、心エコー図検査上、明らかな異常を認めない3ヵ月齢の時点でもミトコンドリア異常をすでに有していることが観察され、オートファジーは心臓における老化にも関与している可能性が示唆された²⁾。さらに、圧負荷解除後のリパースリモデリングによる心肥大の改善においても、オートファジーによるタンパク質分解が重要であることを報告している³⁾。

3. オートファジーと無菌性心筋炎

ミトコンドリアはもともと原核生物であり、進化の過程上、真核生物に取り込まれた共生オルガネラである。そのため、ミトコンドリアは独自のDNA (ミトコンドリア DNA) を内包している。ミトコンドリア DNA は、核 DNA と異なり、細菌の DNA と同様、ほとんどの CpG 配列はメチル化されていない。この非メチル化 CpG 配列が Toll 様受容体 (TLR) 9 に認識されると、炎症誘導性サイトカインの発現が誘導され、炎症が強く惹起される。ミトコンドリア DNA の分解を担っているのが、リソソーム内の DNA 分解酵素 (DNase) II である。我々はミトコンドリア DNA 誘導性炎症の心臓における役割を解析するため、心筋細胞特異的 DNaseII ノックアウトマウスを作製し、TAC を施行した⁴⁾。すると、対照群では心肥大のみ呈する時期に、ノックアウトマウスは著明な炎症反応を伴う左心不全を呈した。さらに、電子顕微鏡検査にてミトコンドリアの大小不同・配列異常、内部構造の破壊などを認め、免疫電子顕微鏡検査にてオートリソソーム様構造物の中に DNA が蓄積していることが観察された。さらに、DNaseII と TLR9 のダブルノックアウト

マウスでは TAC 後の表現型が著明に改善したこと、TLR9 シングルノックアウトマウスでは圧負荷誘導性心不全モデルでも炎症が抑えられ心不全を発症しなかったことより、オートファジー・リソソーム機構において分解しきれずに残ったミトコンドリア DNA が TLR9 を介して無菌性炎症を惹起することが心不全発症進展の一つのメカニズムであることが明らかとなった。

マイトファジー (ミトコンドリア選択的オートファジー)

1. 心臓におけるミトコンドリア分解の重要性

心筋細胞では体積の3分の1程度をミトコンドリアが占めており、心筋細胞の機能はミトコンドリアの恒常性と密接に関連している。細胞内のほとんどの ATP 産生はミトコンドリアにより賄われているが、他の細胞では糖の分解が主なエネルギー源となるのに対し、心筋細胞のミトコンドリアでは脂肪酸酸化によりほとんどのエネルギーが産生されている。ミトコンドリアは細胞内のカルシウム動態にも関わるなど重要な働きをする一方、ROS の主な供給源となる。ROS は呼吸鎖で酸素が部分的還元によって超酸化物になることで産生され、細胞死の経路を活性化するほか DNA に重大な障害を与える。また、前述のように、非メチル化 CpG 配列を有するミトコンドリア DNA は強い炎症惹起性を持つ。

障害ミトコンドリアでの ATP 産生低下および ROS 産生増加やミトコンドリア DNA の不十分な分解により惹起される炎症は心機能低下の原因となり、不全心では障害ミトコンドリアが蓄積していることが知られている。したがって、心筋細胞の恒常性を維持するためには障害ミトコンドリアを選択的・効率的に除去するシステムが不可欠であると考えられる。

2. マイトファジー

ミトコンドリアは一般的に分裂と融合を繰り返しており (ミトコンドリアダイナミクス)、障害

図1 マイトファジー制御の分子機序

障害を受けたミトコンドリアは膜電位の保たれた正常ミトコンドリアと膜電位の低下した障害ミトコンドリアに分裂し、障害ミトコンドリアはその後マイトファジーによって分解される。マイトファジーは、Parkin および PINK1 を介する系（図下段）とミトコンドリア外膜に局在するマイトファジー関連タンパク質を介する受容体介在性マイトファジー（図上段）に大別される。Ub：Ubiquitin, LC3：Microtubule-Associated Proteins 1A/1B Light Chain 3, HOAC6：Histone Deacetylase 6, NBR1：Next to BRCA gene 1 protein, Mfn1/2：Mitofusin1/2, VDAC1：voltage dependent anion channel 1, ①：リン酸化

ミトコンドリアは膜電位の保たれたミトコンドリアと、膜電位の低下したミトコンドリアに分裂し、膜電位の低下したミトコンドリアはその後マイトファジーによって分解され则认为されている。マイトファジー特異的分子は最初に酵母で報告された。酵母の遺伝子ノックアウトライブラリーを用いてマイトファジー不能株の同定が試みられ、この結果 Atg32が同定された⁵⁾。Atg32は、マイトファジーには必須であるが、マクロオートファジーや他の選択的オートファジーには不要であることから、初めて同定されたマイトファジー特異的遺伝子である。Atg32はミトコンドリア外膜タンパク質であり、マイトファジーの誘導とともに Atg8 および Atg11と結合しミトコンドリアを隔離膜に局在化させることがわかっている。哺乳類細胞においても、マイトファジー関

連分子がいくつも報告されており、分子機序は cytosolic E3 ubiquitin ligase Parkin (Parkin) および PTEN-induced putative kinase protein1 (PINK1) を介する系とミトコンドリア外膜に局在するマイトファジー関連タンパク質を介する受容体介在性マイトファジーに大別される（図1）。

3. Parkin 依存性マイトファジー

Parkin および PINK1 によるマイトファジーは哺乳類細胞において最もよく研究されているマイトファジー経路である。Parkin および PINK1 は遺伝性パーキンソン症候群の原因遺伝子として知られる。これらを介するマイトファジーはミトコンドリアの障害による膜電位の低下により誘導される⁶⁾。正常なミトコンドリアでは PINK1 は細胞質で matrix processing peptidase により

切断されたのち、ミトコンドリア内膜に輸送され、presenilin-associated rhomboid-like (PARL) proteaseにより速やかに分解されるが、障害ミトコンドリアではPINK1のミトコンドリア内膜への局在および分解が阻害されることによりPINK1は安定化し、ミトコンドリア外膜に蓄積する。これは、PARLの活性がミトコンドリアATPレベルに依存していることによる。Parkinは細胞質からミトコンドリア外膜上に移動し、安定化したPINK1と結合してリン酸化を受け活性化する。活性化したParkinにより様々なミトコンドリア外膜タンパク質がユビキチン化される結果、p62・HDAC6・NBR1などのユビキチン結合型アダプターを介したMicrotubule-Associated Proteins 1A/1B Light Chain 3 (LC3) との結合により障害ミトコンドリアは選択的にオートファゴソームに取り込まれる。

PINK1 ノックアウトマウスは2ヵ月齢までに左室機能低下と病的な心肥大を示すことが報告されているが、ParkinはPINK1の下流であるにも関わらずParkin ノックアウトマウスは12ヵ月齢まで明らかな表現型を呈しない。一方、マウス心筋梗塞モデルではParkin ノックアウトマウスは顕著な心臓リモデリングおよび心不全を示す⁷⁾。Parkinの発現とマイトファジーは特に非梗塞虚血領域において亢進しており、心筋虚血時のストレス応答において重要であることが示唆されている。また、PINK1 ノックアウトマウスにおいても、冠動脈結紮術後にParkinがミトコンドリアに局在していることが分かっており、心筋梗塞後のマイトファジーではParkinとPINK1は独立して機能していることが示唆される⁸⁾。

4. 受容体介在性マイトファジー

受容体介在性マイトファジーでは、ミトコンドリア外膜に局在するマイトファジー受容体タンパク質がオートファゴソーム上のLC3と直接結合することで障害ミトコンドリアが選択的に除去される。これらには、Nip3-like protein X (NIX)⁹⁾、Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting

protein 3 (Bnip3)¹⁰⁾、Fun14 Domain containing 1 (FUNDC1)¹¹⁾、Bcl-2-like protein 13 (Bcl2-L-13)¹²⁾などがある。これらの分子はミトコンドリア外膜に局在し、LC3 interacting region と呼ばれるモチーフによりLC3と結合する。

a) NIX, Bnip3

NIX および Bnip3 はいずれも BH-3 only タンパク質であり、50%の相同性を有する。NIXは赤血球成熟の最終段階でのミトコンドリア除去に関わる。Bnip3はhypoxia-inducing factor-1 (HIF1)の標的分子であり、低酸素下でマイファジーを促進し、活性酸素種に対して保護的に働く。

心筋特異的NIX ノックアウトマウスおよび心筋特異的NIX/BNIP3 ダブルノックアウトマウスはそれぞれ生後15ヵ月、8ヵ月齢で異常ミトコンドリアの蓄積を認め、著明な心機能低下を示した。しかし、心筋特異的NIX ノックアウトマウスでは冠動脈結紮術およびTACによる心室リモデリングはむしろ抑制される¹³⁾。これらは、BNIP3とNIXがアポトーシス促進分子としての機能も併せ持つことが要因と考えられる。

b) FUNDC1

FUNDC1も低酸素刺激によりマイトファジーを誘導することが報告されており、Atgの一つであるULK1などによるリン酸化/脱リン酸化により活性が調節されている。また、FUNDC1はミトコンドリアの分裂・融合を制御する機能も併せ持つことが知られている。FUNDC1の心筋特異的ノックアウトマウスは10週齢で著明な心機能低下を示すほか、心筋梗塞モデルにおいて野生型マウスに比し梗塞領域の拡大を認める¹⁴⁾。FUNDC1 ノックアウトマウスでは心筋におけるミトコンドリアサイズの増大が見られ、ミトコンドリアの分裂とそれに続くマイトファジーの障害による表現型であることが示唆された。また、虚血再灌流により、血小板におけるFUNDC1誘導性マイトファジーが惹起され、プレコンディショニング様の作用により心筋保護的に作用するという報告もある。

図2 心不全におけるフェリチノファジー

圧負荷などのストレスを受けた心筋細胞では、フェリチンがNCOA4を介したフェリチノファジーで分解され、放出された鉄イオンが脂質膜を障害することでフェロトーシスが誘導され、心不全に至る。LC3B：オートファゴソームマーカー、LAMP2a：リソソームマーカー、PLOOH：リン脂質脂肪酸ヒドロペルオキシド、PLOO[•]：リン脂質脂肪酸ペルオキシラジカル、GSH：グルタチオン、GPX4：グルタチオンレダクターゼ、GSSG：グルタチオンジスルフィド。

c) Bcl2-L-13

われわれは、Atg32の構造および機能が哺乳類ホモログにおいても保存されているであろうとの仮説のもとスクリーニングを行い、新規のミトファジー関連タンパク質としてBcl2-L-13を見いだした¹²⁾。Atg32欠失酵母ではミトファジーは誘導されないが、Bcl2-L-13の外因性の発現によりミトファジーを部分的に回復したことからBcl2-L-13はAtg32の機能的ホモログと考えられ

た。哺乳類細胞では、Bcl2-L-13は過剰発現によりミトコンドリアの分裂及びミトファジーを誘導可能で、Bcl2-L-13はミトコンドリアダイナミクスとミトファジーの両方に関わる分子であると考えられた。さらにわれわれは、ATG欠失酵母を用いた検討から、ULK1複合体がBcl2-L-13依存性ミトファジーの開始に利用されていることを報告した¹⁵⁾。Bcl2-L-13は心、骨格筋、脳、脾などで発現が多くみられる。現在、われわれは

図3 心臓におけるオートファジー

定常状態における細胞内の恒常性維持に加え、圧負荷などのストレス条件下でのリモデリング、炎症、細胞死などを防ぐタンパク質やミトコンドリアの品質管理、さらには減負荷後のリバースリモデリングを促進するタンパク質量削減など、心臓においてオートファジーは多彩な役割を有し、心保護効果を発揮している。

Bcl2-L-13の *in vivo* での役割について解析を進めている。Bcl2-L-13ノックアウトマウスを用いた圧負荷誘導性心不全モデルによる予備的検討においては、Bcl2-L-13ノックアウトマウスはTACによる圧負荷により野生型マウスに比して有意な心機能の低下を認め、Bcl2-L-13が心臓の恒常性維持に重要な働きをしていることを示唆する結果を得ている。

フェリチノファジー（フェリチン選択的オートファジー）

鉄イオンは通常細胞内フェリチン複合体の中に貯蔵されている。Nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) はフェリチンのサブユニットであるFTH1と結合し、オートファゴソームへの輸送を促進することでフェリチンを分解する（図2）。鉄欠乏もしくは鉄需要が増加した状態では、フェリチンはフェリチノファジーにより分解され、利用可能な鉄イオンが供給される。一方で、遊離2価鉄イオンによりフェントン反応を介したヒドロキシラジカルの産生、リン脂質脂肪酸ペルオキシ

ラジカルなどの脂質活性酸素種（ROS）の増加がもたらされ、リン脂質障害や細胞膜破壊に続く、フェロトーシスと呼ばれるネクローシス性細胞死が誘導される。

心不全患者の多くで鉄代謝異常や鉄欠乏が認められ、鉄の経静脈的投与により鉄欠乏を伴う心不全患者の症状を改善することが報告されている¹⁶⁾。そこで、鉄代謝異常と心不全の関連性について理解するため、我々は心臓におけるNCOA4依存性フェリチノファジーの重要性を検討することとし、心臓特異的NCOA4ノックアウトマウスを作製した¹⁷⁾。TACによる心不全モデルにおいて、対照群ではFTH1のタンパク質発現量が減少し、フェリチノファジーが増え、酸化ストレスや脂質ペルオキシドが増えた結果、細胞死が増えていることが明らかとなった。一方で、ノックアウト群では心肥大のみを呈し、対照群で見られたいずれの病態生理学的変化も抑制されていた。また、脂質ROSの蓄積を抑制することでフェロトーシスを阻害するFerrostatin-1を用いると、野生型マウスにおけるTACによる圧負荷誘導性心不全の表現型が改善した。つまり、NCOA4を

介したフェリチノファジーによる鉄イオンの放出がフェロトシスを誘導することにより、圧負荷誘導性心不全の発症進展に関わっていることが明らかとなった。

おわりに

オートファジーやマイトファジーによって、不要なタンパク質や障害ミトコンドリアなどが適切に除去されることにより心筋細胞の恒常性は維持され、心臓はさまざまなストレスから保護されている(図3)ことから、オートファジーやマイトファジーは心不全に対する新規治療ターゲットとなりうると考えられる。一方で、フェリチノファジーで見られるように、細胞種、病態、病期などによってその活性や役割は異なる可能性がある。今後、これらの分子制御機構をさらに詳細に理解することで、これらを標的とした心不全に対する新たな治療が早期に臨床応用されることが期待される。

著者の COI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T et al: The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007; **13**: 619-624
- 2) Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A et al: Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* 2010; **6**: 600-606
- 3) Oyabu J, Yamaguchi O, Hikoso S et al: Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **441**: 787-792
- 4) Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O et al: Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012; **485**: 251-255
- 5) Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y et al: Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 2009; **17**: 87-97
- 6) Narendra D, Tanaka A, Suen DF et al: Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; **183**: 795-803
- 7) Dorn GW 2nd: Parkin-dependent mitophagy in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2016; **95**: 42-49
- 8) Kubli DA, Cortez MQ, Moyzis AG et al: PINK1 is dispensable for mitochondrial recruitment of Parkin and activation of mitophagy in cardiac myocytes. *PLoS One* 2015; **10**: e0130707
- 9) Novak I, Kirkin V, McEwan DG et al: Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010; **11**: 45-51
- 10) Zhang H et al: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; **283**: 10892-10903
- 11) Liu L, Feng D, Chen G et al: Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 177-185
- 12) Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A et al: Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun* 2015; **6**: 7527
- 13) Dorn GW 2nd: Mitochondrial pruning by Nix and BNIP3: an essential function for cardiac-expressed death factors *J Cardiovasc Transl Res* 2010; **3**: 374-383
- 14) Wu S, Lu Q, Wang Q et al: Binding of FUN14 Domain Containing 1 With Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Maintains Mitochondrial Dynamics and Function in Hearts in Vivo. *Circulation* 2017; **136**: 2248-2266
- 15) Murakawa T, Okamoto K, Omiya S et al: A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell Rep* 2019; **26**: 338-345. e6
- 16) Ghafourian K, Shapiro JS, Goodman L et al: Iron and Heart Failure: Diagnosis, Therapies, and Future Directions State-Of-The-Art Review. *JACC Basic Transl Sci* 2020; **5**: 300-313
- 17) Ito J, Omiya S, Rusu MC et al: Iron derived from autophagy-mediated ferritin degradation induces cardiomyocyte death and heart failure in mice. *Elife* 2021; **10**: e62174