

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04817

研究課題名(和文)オートファジー機能異常による心不全発症機構を制御標的とする創薬をめざした研究

研究課題名(英文) Exploring the novel compounds targeting dysregulated autophagy-mediated cardiac dysfunction

研究代表者

磯部 光章 (ISOBE, Mitsuaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：80176263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心不全の発症および病状進展に深く関わっているオートファジーの機能不全はBeclin1の賦活化により改善させることが可能であることを踏まえて、Beclin1を活性化できる新規化合物による心不全治療を確立することを目的とした研究を行った。Beclin1のBH3ドメインに結合しうるBcl-xLのHis117周囲の構造に類似した、Beclin1とBcl-2/xLのタンパク質間相互作用を標的とした阻害低分子化合物を複数見出したが、そのうちのひとつの低分子化合物Xが効果的にBeclin1とBcl-2/xLのタンパク質間相互作用を阻害しオートファジーを効果的に促進する作用があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Based on our previous result that cardiac function is mediated through suppression of autophagy by phosphorylating Beclin1 by Mst1, we explored novel low molecular compounds which can competitively inhibit Beclin1-Bcl2/xL interaction that is enhanced by phosphorylation of Beclin1. As a result, we could identified such a compound. According to in vivo experiments, that compound could effectively alleviates cardiac disfunction in transverse aortic constriction mouse models.

研究分野：循環器内科学

キーワード：オートファジー 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは変性したタンパク質や障害をうけた細胞小器官を除去して細胞における恒常性を維持する役割を担っており、オートファジーの機能異常は様々な疾患の発症および病態の進展に深く関与している。オートファジー促進因子である Atg5 遺伝子の欠損マウスの心筋では蛋白質の凝集が蓄積して心臓の機能が低下することや、「外的ストレスにより活性化したリン酸化酵素 Mst1 はオートファジー促進因子 Beclin1 の活性を阻害してオートファジーを抑制し、心筋細胞内のタンパク品質管理を低下させて心機能低下の一因となっている」という申請者らの報告より、生理的レベルおよびストレスにより活性化するオートファジーは、非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に不可欠であることが明らかとなった。近年、オートファジーの分子制御システムについての解明が目覚ましく進み、それに伴ってオートファジー制御を標的とした臨床応用が急速に進行し、海外では悪性腫瘍、肝硬変、筋萎縮性側索硬化症などに対してオートファジーを制御する薬剤の臨床治験が開始されている。心血管疾患に対するオートファジーの制御を標的とした臨床応用はまだ開始されていないが、心不全に対するオートファジーを標的とした前臨床試験では、メトホルミン、ラパマイシン、クロラムフェニコール(などがオートファジーの活性化を介した心機能の改善効果のある薬剤として報告されている。しかしながら、これらはいずれも既存薬剤の多面的作用を応用したものであり、心不全の病態をより効率的に改善させることができ副作用のリスクが低いオートファジーの分子機序を標的とした新規の薬剤開発が望まれている。最近、Beclin1 の機能の特異的に活性化することのできる Tat-Beclin1 というペプチド薬剤が開発された。Tat-Beclin1 は Beclin1 を

負に制御する GAPR-1 の Beclin1 結合部位へ特異的に結合し、オートファジーを強力に誘導することでハンチントン病の病因であるヒト変異型 Huntingtin タンパクの凝集塊を減少させる作用があることが報告された。申請者らはこの知見ならびに Beclin1 の機能低下が慢性心不全における心機能低下の一因になっているという自らの報告より、特異的に Beclin1 を賦活化してオートファジーを活性化させることを標的とした創薬が、心不全における新規の有効な治療法になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究計画は、心不全の発症および病状進展に深く関わっているオートファジーの機能不全は Beclin1 の賦活化により改善させることが可能であることを踏まえて、Beclin1 を活性化できる新規化合物による心不全治療法を確立することを目的とした研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1)慢性心不全モデル動物における Beclin1 の賦活化による心機能の改善効果についての検証

a.Tg-CryAB(R120G)マウスにおける Beclin1 賦活化の効果についての検討

Tg-CryAB(R120G)マウスは低分子ストレスタンパク質の一つである  $\alpha$ - $\beta$  クリスタリン (CryAB) の点変異タンパク質 CryAB (R120G)を心筋細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスであり、デスミン心筋症のモデルマウスである。Tg-CryAB (R120G)マウスにおいて、オートファジー促進因子 Atg7 を過剰発現させるとオートファジーの賦活化により老廃タンパクの凝集塊であるアグリソームが除去されて心機能が改善することが報告されている。

Tg-CryAB(R120G)マウスと Tg-Beclin1 (Tet-on)マウスの交配マウスにおいて、テトラサイクリン投与により Beclin1 の活性を

上昇させることでオートファジーが賦活化され、アグリソームが除去されて心機能が改善するかどうかについて検討する。6週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心筋の病理学的変化につき免疫染色法などを用いて検討する。心機能については心エコーにて経時的に観察し、最終的には観血的に左室内圧曲線を求めて、収縮・拡張機能を測定する。また、血漿BNP値など血中バイオマーカー測定による評価も行う。また、Tg-CryAB(R120G)マウスに既報の強力なオートファジー誘導ペプチド Tat-Beclin1 (YGRKKKRRQRRR-GG-VGNDEFINHETTGFATEW) を投与して、薬剤によるオートファジーの賦活化による心機能改善効果が見られるかどうかについて検討する。

#### b. 疾患モデルマウスにおける Beclin1 賦活化の効果についての検討

圧負荷モデルマウスや慢性心筋梗塞モデルマウスにおいても心筋のアグリソーム量が増加して心機能を低下させていることが報告されている。Tg-Beclin1(Tet-on)に大動脈縮窄術もしくは冠動脈結紮術を施して圧負荷モデルマウスおよび慢性心筋梗塞モデルマウスを作成する。手術直後からテトラサイクリン投与を開始して Beclin1 の発現を上昇させて、6週間後に上記 a と同様に心機能の変化についてテトラサイクリン非投与群と比較・検討を行う。

(2)Beclin1 と Bcl-2/xL のタンパク質間相互作用を標的とした阻害低分子化合物の探索 Beclin1 を賦活化することでオートファジーを活性化することが不全心筋における蛋白質管理を改善して心機能の改善につながるのではないかと想定し、そのような低分子化合物の取得を目指す。Bcl-xL と 20 アミノ酸からなる Beclin1 の BH3 ドメインとの共結晶構造解析より、Beclin1 の BH3 ドメインは Bcl-xL の形成する疎水性の高

いポケットの辺縁を形成する  $\alpha 3$  ヘリックスと相互作用していることが明らかとなり、低分子化合物によるタンパク質間相互作用阻害の可能性が示された。特に、Bcl-xL の His117 が Beclin1 の BH3 ドメインと相互作用する主要なアミノ酸残基であることが同定された。この構造に基づき、Bcl-xL の His117 の構造を模した化合物を化合物ライブラリーから探索する。具体的には、Beclin1 の BH3 ドメインに結合しうる Bcl-xL の His117 の構造を模した化合物を予測および収集したフォーカスライブラリーから、*in silico* スクリーニングを経て、まずは *in vitro* における Beclin1 の BH3 ドメインに対する結合性について表面プラズモン共鳴法および  $^3\text{H}$  により標識した低分子化合物を用いた結合アッセイにより検討する。さらに、結合能の高かった上位の化合物について、Beclin1-Vps34 複合体の活性化に対する効果を評価することにより、より効果的に Beclin1 を活性化する低分子化合物の取得を目指す。

#### (3)慢性心不全モデル動物における Beclin1 の活性化を標的とした新規化合物の有効性についての検討

上記(2)(3)で取得・確認された Beclin1 と Bcl-2/xL のタンパク質間相互作用を標的とした阻害低分子化合物の *in vivo* における有効性について、Tg-CryAB(R120G)マウス、圧負荷モデルマウスや慢性心筋梗塞モデルマウスを用いて検討する。6週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心筋の病理学的変化につき免疫染色法などを用いて検討する。心機能については心エコーにて経時的に観察し、最終的には観血的に左室内圧曲線を求めて、収縮・拡張機能を測定する。また、血漿BNP値など血中バイオマーカー測定による評価も行う。

#### 4. 研究成果

デスミン心筋症のモデルマウスである低分

子ストレスタンパク質 $\alpha$ - $\beta$ クリスタリン (CryAB) の点変異タンパク質CryAB (R120G) を心筋細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスTg-CryAB(R120G)マウスとTg-Beclin1(Tet-on)マウスを交配させて、テトラサイクリン投与によりBeclin1の活性を上昇させることでオートファジーが賦活化され、心筋内のアグリソームが除去されて心機能が改善するかどうかについて検討した。具体的には、テトラサイクリン投与6週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心筋の病理学的変化につき免疫染色法などを用いて検討した。心機能については心エコーにて経時的に観察し、最終的には観血的に左室内圧曲線を求めて、収縮・拡張機能を測定した。血漿BNP値など血中バイオマーカー測定による評価も行った。

Beclin1を賦活化することでオートファジーを活性化することが不全心筋における蛋白質管理を改善して心機能の改善につながるのではないかと想定し、そのような低分子化合物の取得を目指してBcl-xLのHis117周囲の構造に類似した化合物を化合物ライブラリーから探索した。具体的には、Beclin1のBH3ドメインに結合しうるBcl-xLのHis117周囲の構造に類似した化合物を予測して収集したフォーカスライブラリーからin silicoスクリーニングを経てin vitroにおけるBeclin1のBH3ドメインに対する結合性について表面プラズモン共鳴法および3Hにより標識した低分子化合物を用いた結合アッセイにより検討し、候補となる分子を複数見出した。これらの低分子化合物の有効性について、クロロキンやBafilomycin A1などオートファジー阻害剤を添加した培養心筋細胞を用いて検証した。具体的には、細胞生存率、アグリソームの定量、長寿命蛋白分解アッセイ、脂質キナーゼ活性測定のうち4つの指標を用いて新規低分子化合物の効果

判定を行った。その結果、ひとつの低分子化合物が効果的にBeclin1とBcl-2/xLのタンパク質間相互作用を阻害し、オートファジーを効果的に促進する作用があることをみいだした。この低分子化合物のin vivoにおける有効性について、心不全モデルマウス(圧負荷モデルマウス)を用いて検討した。6週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心筋の病理学的変化につき電子顕微鏡、免疫染色法やウエスタンブロッティング法を用いて検討した。心機能については心エコーにて経時的に観察し、観血的に左室内圧曲線を求めて収縮・拡張機能を測定した。血漿BNP値測定による評価も行った。その結果、低分子化合物は心不全モデルマウスにおいて、非投与の心不全モデルマウスと比較して有意に心機能の低下や心不全の悪化を抑制することが判明した。また、低分子化合物はin vivoモデルにおいてもオートファジーを効果的に促進することを確認した。今後は、デスミン心筋症心不全モデルマウスや心筋梗塞モデルマウスでも同様の事象が確認できるかどうか検討する予定である。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Sciarretta S, Maejima Y, Zablocki D, Sadoshima J. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol* 80: 1-26 (2018) [査読有り] doi: 10.1146/annurev-physiol-021317-121427, URL: <https://www.annualreviews.org/loi/physiol>

Ito Y, Maejima Y, Tamura N, Shiheido-Watanabe Y, Konishi M, Asikaga T, Hirao K, Isobe M. Synergistic Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitor

and Angiotensin II Receptor Blocker on Load-induced Heart Failure. *FEBS Open Bio* 8(5): 799-816 (2018) [査読有り] doi: 10.1002/2211-5463.12416, URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/journal/22115463/>

Das A, Reis F, Maejima Y, Cai Z, Ren J. mTOR Signaling in Cardiometabolic Disease, Cancer, and Aging. *Oxid Med Cell Longev* 2017:6018675 (2017) [査読有り] doi: 10.1155/2017/6018675, URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/>

Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction. *Sci Rep* 7: 43920 (2017) [査読有り] doi: 10.1038/srep43920, URL: <https://www.nature.com/srep/>

Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki JI, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol* 99: 123-137 (2016) [査読有り] doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.017, URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology>

Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 95: 19-25 (2016) [査読有り] doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.032, URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology>

Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 95: 19-25 (2016) [査読有り] doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.032, URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology>

[journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology](https://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-and-cellular-cardiology)

Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Nomura M, Egashira K, Levine B, Sadoshima J. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure-overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure. *Circulation* 133: 1249-1263 (2016) [査読有り] doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502, URL: <http://circ.ahajournals.org>

Nakamura M, Zhai P, Del Re DP, Maejima Y, Sadoshima J. Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. *JCI Insight* 1: e86217 (2016) [査読有り] pii: e86217, URL: <https://insight.jci.org>

Maejima Y, Chen Y, Isobe M, Gustafsson ÅB, Kitsis RN, Sadoshima J. Recent Progress Regarding Molecular Mechanisms of Autophagy Research in the Heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308: H259-268 (2015) [査読有り] doi: 10.1152/ajpheart.00711.2014, URL: <https://www.physiology.org/journal/ajpheart>

Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M, Sadoshima J. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. *Circ Res* 116: 264-278 (2015) [査読有り] doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303356, URL: <http://circres.ahajournals.org>

Sciarretta S, Zhai P, Maejima Y, Del Re DP, Nagarajan N, Yee D, Liu T, Magnuson MA, Volpe M, Frati G, Li H, Sadoshima J. mTORC2 Regulates

Cardiac Response to Stress by Inhibiting MST1. *Cell Rep* 11: 125-136 (2015) [査読有り] doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.010, URL: <https://www.cell.com/cell-reports/home>

〔学会発表〕(計8件)

Maejima Y, Tamura N, Isobe M. Single Nucleotide Polymorphism of MLX Gene Plays a Crucial Role in the Pathogenesis of Takayasu Arteritis Through Facilitating Inflammasome Formation of the Aorta. Basic Cardiovascular Sciences 2015 Scientific Sessions of American Heart Association 2015, New Orleans, USA.

Maejima Y, Ito Y, Tamura N, Watanabe R, Isobe M. Dipeptidyl peptidase-4 deteriorates cardiac function during autoimmune myocarditis by facilitating cathepsin-G activity. (2015, Nov.) American Heart Association Scientific Sessions 2015, Orlando, USA.

Maejima Y, Ito Y, Tamura N, Watanabe R, Isobe M. Dipeptidyl peptidase-4 suppression leads to attenuation of cardiac dysfunction caused by autoimmune myocarditis through inhibiting cathepsin-G activity. 第19回日本心不全学会学術集会, 大阪, 2015年10月

Maejima Y, Nagarajan N, Zhai P, Isobe M, Sadoshima J. GSK-3 $\beta$  inhibits cardiac hypertrophy by phosphorylating FoxO1. American Heart Association Scientific Sessions 2016 2016.11.15 New Orleans, LA, USA

Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. GSK3 $\beta$  alleviates cardiac hypertrophy and LV dysfunction through modulation of FoxO1 activity in response to pressure overload. 第20回日本心不全学会学術

集会 2016.10.7 北海道札幌市  
前嶋康浩. The role of autophagy in the progression of heart failure.

Cardiovascular Metabolic Week 2017  
2017.12.9 大阪府大阪市

前嶋康浩. The Critical Role of Autophagy in the Progression of Heart Failure. 第81回日本循環器学会学術集会 2017.03.18 石川県金沢市

前嶋康浩. オートファジーの制御異常による心不全発症機構の解明. 第90回日本薬理学会年会 2017.3.15 長崎県長崎市

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 光章 (ISOBE, Mitsuaki)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師  
研究者番号: 80176263

(2)研究分担者

前嶋 康浩 (MAEJIMA, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 40401393

秦野 雄 (HATANO, Yu)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00736407