

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19590837
 研究課題名 (和文) オートファジー性心筋細胞死の病態生理学的意義の検討、及び治療への応用
 研究課題名 (英文) Role of myocyte autophagy on cardiac diseases and search for therapeutic target associated with autophagy
 研究代表者
 小原 幸 (KOBARA MIYUKI)
 京都薬科大学・薬学部・准教授
 研究者番号 80275198

研究成果の概要：

心不全時の病態にかかわる神経体液性因子や、チロシンキナーゼ阻害抗がん剤は、心筋細胞にオートファジーを誘導した。少量のオートファジーは細胞保護的に働き、心筋アポトーシス回避効果を有するが、大量のオートファジーは細胞死を誘導する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋細胞、アポトーシス、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全は依然予後不良の病態であるが、最近不全心筋にオートファジー性細胞死を認めたとの報告がなされ、ネクローシス、アポトーシスに続く細胞死として注目されている。

(2) 細胞飢餓時に誘導されるオートファジーは本来細胞保護機構のひとつであるが、最近オートファジーの細胞保護的、あるいは細胞障害性役割が注目されている。

(3) 心不全の病態進展に関与する神経体液性因子と心筋オートファジーの関連は報告されていない。

(4) 慢性骨髄性白血病治療薬であるイマチニブは治療濃度において心毒性、心筋アポト

ーシスを来たすことが報告されているが、オートファジーに対する影響は報告されていない。

2. 研究の目的

(1) 心不全増悪因子である酸化ストレス、および心不全の病態進展に関わる神経体液性因子であるノルエピネフリン、アンジオテンシン II、アルドステロン、エンドセリンは心筋細胞オートファジーを誘導するか否か、またオートファジーと細胞死との関連を検討する。

(2) 分子標的薬イマチニブは心筋オートファジーを誘導するか否か。またオートファジーが誘導された場合細胞保護的か、障害的かを

検討する。

3. 研究の方法

- (1) ラット新生仔培養心筋細胞を用いた。
- (2) 酸化ストレス付与として H_2O_2 (10^{-4} M) を 4 - 24 時間心筋細胞に投与した。
- (3) 神経体液性因子としてノルエピネフリン (10^{-7} M)、アンジオテンシン II (10^{-7} M)、アルドステロン (10^{-7} M)、エンドセリン (10^{-9} M) を 6 時間投与した。
- (4) イマチニブ ($1-50 \mu M$) を 6 時間、心筋細胞に投与した。
- (5) オートファジーの検出は、monodancylcadaverin (MDC) によるオートファゴソームの観察と LC-3 II 発現の検討により行った。
- (6) 心筋アポトーシスの検討は核の形態変化と caspase 3 活性測定により行った。
- (7) 心筋ミトコンドリア膜電位は JC1 染色により検討した。
- (8) 心筋細胞内 ROS は ROS 感受性蛍光指示薬である DCF を用いて検討した。また ROS 産生源の検討のため、アポニン (NADPHoxidase 阻害薬)、BHA (ミトコンドリア ROSs 除去薬) を用いて阻害実験を行った。
- (9) 心筋細胞死は培養液中の LDH 活性及びトリパンブルー-exclusion assay にて行った。
- (10) オートファジー阻害薬として 3MA を、アポトーシス阻害薬として Z-VAD FMK を前投与した。

4. 研究成果

- (1) H_2O_2 は濃度依存的、時間依存的にオートファゴソーム形成を促進し、LC3-II 発現を増加させ、心筋細胞にオートファジーを誘導することが示された。

H_2O_2 10^{-4} M、6 時間付与は培養上清中の LDH 濃度を有意に増加させ、細胞障害性に働いた。また同条件の H_2O_2 付加は断片化心筋細胞核、Caspase 3 活性化を伴っており、心筋アポトーシス誘導も認められた。

H_2O_2 投与に先立ちアポトーシス阻害役の Z-VAD やオートファジー阻害役の 3MA を投与した群を作成した。Z-VAD は心筋アポトーシスを非投与群レベルに抑制し、LDH 放出も有意に抑制した。一方 3MA はアポトーシス、LDH 放出とも有意な影響を与えなかった。

以上より H_2O_2 は心筋細胞オートファジーを誘導し、同じ刺激条件下で心筋細胞死、アポトーシスを来す。 H_2O_2 依存性心筋細胞死はアポトーシスによる関与が大きいことが示され、オートファジーの関与は少ないことが示された。

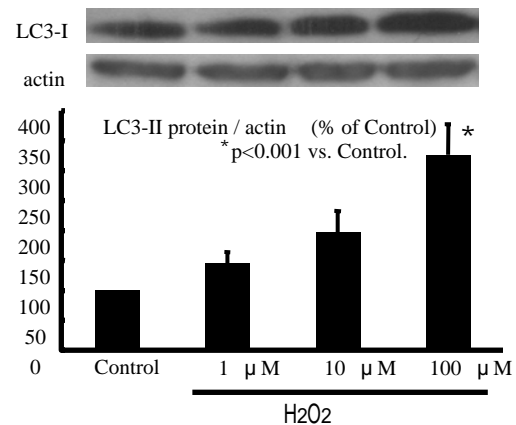


図 1 H_2O_2 によるオートファジー誘導

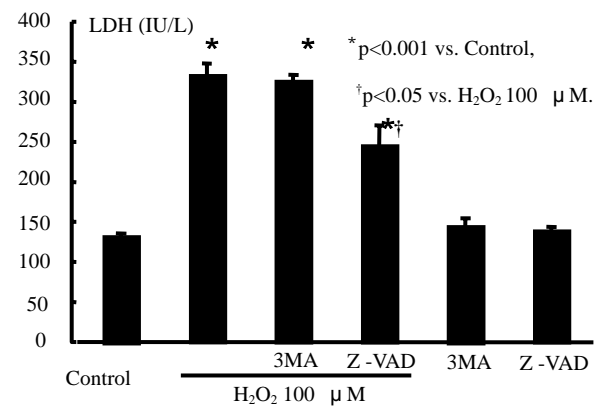


図 2 H_2O_2 誘導性細胞死に対するアポトーシス・オートファジー阻害薬の影響

- (2) ノルエピネフリン、アンジオテンシン II は軽度オートファジーを誘導する傾向にあったが有意ではなかった。一方アルドステロン、エンドセリンは濃度依存性にオートファジーを誘導した。いずれも心不全時の血中/心筋組織中濃度のレベルでオートファジーを誘導することがわかった。

- (3) イマチニブは濃度依存的に、また時間依存的にオートファジーを誘導した。6 時間の薬物投与で $10 \mu M$ 、 $50 \mu M$ で有意なオートファジー誘導を認めた。

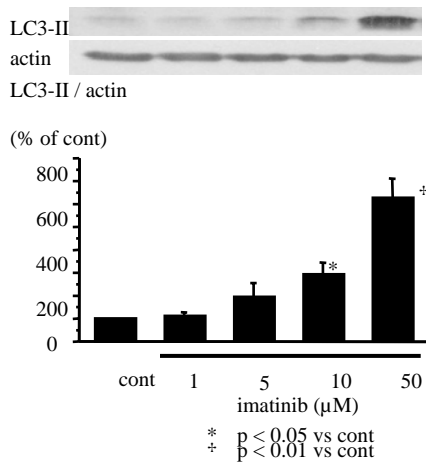


図3 LC3-II 発現に対するイマチニブの影響

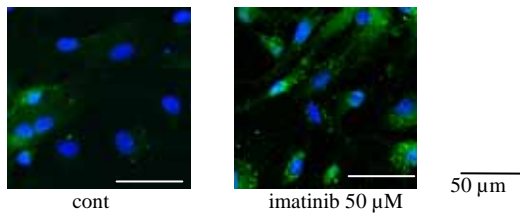


図4 LC3 免疫染色

イマチニブ 10 μM、50 μM は JC-1 染色で評価したミトコンドリア膜電位の低下が濃度依存性に認められ、ミトコンドリアからのチトクローム c 放出も合致する結果であった。

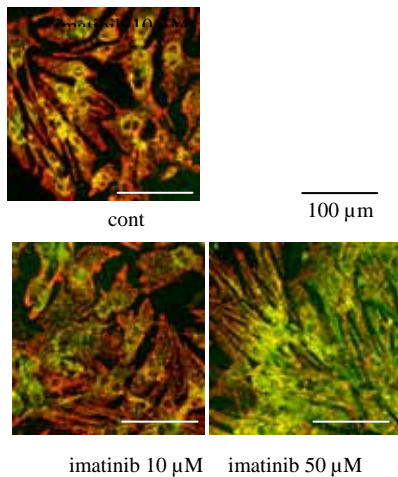


図5 ミトコンドリア膜電位に対するイマチニブの影響

イマチニブは DCF 染色で検討した細胞内活性酸素種 (ROS) レベルを増加させ、阻害薬を用いた検討よりこの ROS の産生源はミトコンドリアであった。

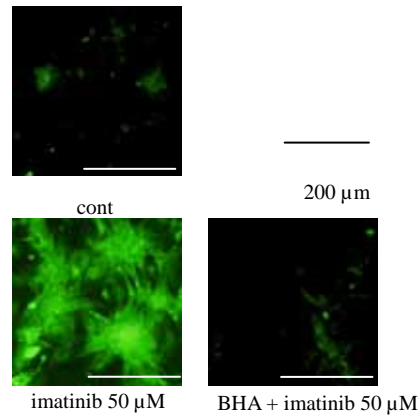


図6 心筋細胞内 ROS 産生

ROS は前述の様にオートファジーを誘導する因子であるが、イマチニブ誘導性のオートファジーは ROS 消去薬により減弱を認めなかった。

イマチニブ 10 μM は心筋アポトーシスを約 2 倍に増加させた。一方 50 μM 投与ではアポトーシスの有意な増加は認めなかった。一方培養上清中への LDH 放出及びトリパンプルーによる細胞死の検討では、10 μM イマチニブは有意な影響を与えず、50 μM 投与は有意な細胞死誘導を確認した。

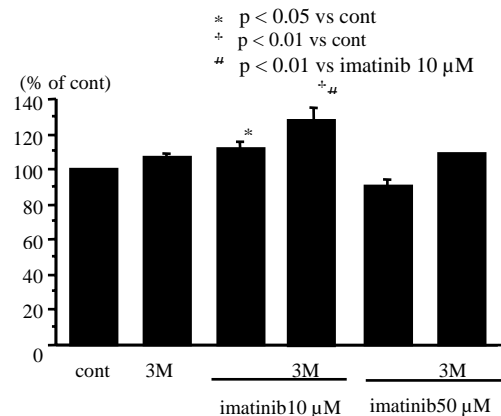


図7 Caspase 3 活性

3MA は、イマチニブ 10 μ M による心筋アポトーシスには増強作用を示し、一方イマチニブ 50 μ M による心筋細胞死に対しては抑制的に働いた。

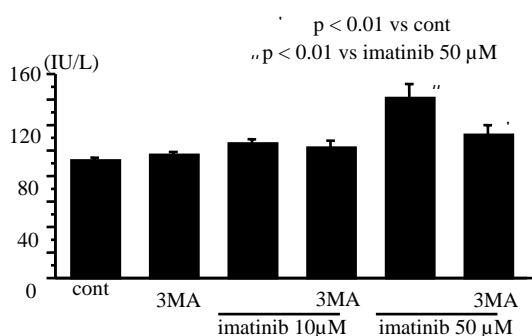


図8 培養上清中 LDH 濃度

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 3 件)

1) Taira M, Toba H, Murakami M, Iga I, Serizawa R, Murata S, Kobara M, and Nakata T: Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal rennin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 589: 264-271, 2008. (査読有り)

2) Hayashi H, Kobara M (他 8 人、2 番目): Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens. Res.*, 31:363-375, 2008. (査読有り)

3) Kobara M, Sunagawa N, (他 8 人、1 番目): Apoptotic myocytes generate monocyte chemoattractant protein-1 and mediate macrophage recruitment. *J. Appl. Physiol.*, 104: 601-60, 2008. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

(1) Miyuki Kobara, Shota Tsujimoto, Yugo Uchida, Kenta Tanaka, Makoto Ohigashi, Hiroe Toba, Tetsuo Nakata. Imatinib Induces Autophagy-Mediated Cell Death in Cardiac Myocytes. The 73rd Annual Scientific Meeting of the

Japanese Circulation Society, 2009年3月21日、大阪。

(2) Miyuki Kobara, Mihoko Matsumura, Akiko Furumori, Junichi Hamada, Miho Kitamura, Kazuki Noda, Hiroe Toba, Hiroaki Matsubara, and Tetsuo Nakata: Short-Term caloric restriction improves mitochondrial oxidative stress and myocyte apoptosis in cardiac pressure-overload hypertrophy. The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2008年3月28日、福岡。

(3) Makoto Ohigashi, Miyuki Kobara, Hironori Hayashi, Yuugo Uchida, Kenta Tanaka, Nana Tanaka, Masaki Abe, Hiroe Toba, Hiroaki Matsubara, and Tetsuo Nakata: Aldosterone activates apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK-1) through nongenomical ROS production and induces myocyte apoptosis. The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2008年3月28日、福岡。

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 幸 (KOBARA MIYUKI)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号 80275198

(2) 研究分担者

的場 聖明 (MATOBA SATOAKI)
京都府立医科大学・医学系研究科・助教
研究者番号 10305576

(3) 連携研究者