

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06227・19K21327

研究課題名（和文）Rubiconによる心臓オートファジーの制御機構解明と創薬への応用

研究課題名（英文）The regulatory mechanism of autophagy by Rubicon in the heart

研究代表者

種池 学（TANEIKE, Manabu）

大阪大学・キャンパスライフ健康支援センター・助教

研究者番号：30609756

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスの表現型は、野生型と比較して、明らかな差を認めなかった。そこで圧負荷手術を施行したところ、Rubicon欠損マウスは心不全を呈し、受容体が減少していることを確認した。さらに、ラット新生児単離初代培養心筋細胞においてRubiconをノックダウンすると、刺激後の受容体減少が促進されることを確認した。これらの結果より、Rubiconはエンドサイトーシス性分解を抑制し、刺激後にダウンレギュレーションを受けた受容体をリサイクルして細胞膜上に返還することにより、心筋細胞膜上の受容体を維持するという、心臓保護的作用を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果から、オートファジー抑制分子として知られていたRubiconが、エンドサイトーシス性分解の抑制による受容体の維持というメカニズムを介して、心臓保護作用を有する可能性があることが示唆された。心不全では心筋細胞膜上に存在する受容体が減少することが知られているが、これまで、心不全において受容体が減少するメカニズムは明らかになっていない。その一端を明らかにした本研究は、エビデンスに基づいた治療を行っているにも関わらず、長年予後の劇的な改善が見られていない心不全治療において、新たな治療標的を提示できる可能性があり、今後の治療法や治療薬の開発に重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cardiac specific-Rubicon knockout mice showed no significant phenotypes compared to wild type mice under the baseline condition. However, the knockout mice exhibited heart failure with the reduced protein expression level of beta1 adrenergic receptor after pressure-overload by means of transverse aortic constriction surgery. Furthermore, we detected the upregulation of a reduction in the expression level of the adrenergic receptor after the treatment with beta stimulant in isolated rat neonatal cardiomyocytes with knockdown of Rubicon. Those results suggested the protective role of Rubicon in the heart, that Rubicon maintains beta 1 adrenergic receptor on the cell membrane of cardiomyocytes by recycling the receptor, downregulated by prolonged beta stimulation, from endosome to plasma membrane through the inhibition of endocytotic degradation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 受容体 エンドサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エビデンスに基づいた先進医療をもってしても、慢性心不全の5年生存率は約50%であり、他の慢性疾患と比べても極めて予後の悪い疾患である。さらに有病率は65歳以上で10%と非常に高く、近年高齢化が進む我が国でも罹患率は上昇傾向にあり、心不全に対する新たな治療法を開発することが急がれる。しかし、心不全の病態に関わる分子機構は未だに解明されておらず、新規治療薬創薬への分子標的すら定まっていないのが現状である。

オートファジー現象は細胞内分解機構のひとつであり、酵母から哺乳類まで広く保存されている。オートファジーは飢餓時のエネルギー産生やタンパク質合成などへの再利用だけでなく、ミトコンドリアなどのオルガネラを含めた細胞内浄化機構としても細胞内環境維持の役割を担っている。血行動態負荷による心不全発症におけるオートファジーの役割が報告されたのち、私たちは心臓における老化と心機能維持(Autophagy 2010)、ミトコンドリアDNAの分解不全によって誘導される心筋炎症と心不全の関わり(Nature 2012)、ミトコンドリア特異的オートファジー新規関連因子としてのBcl2L13経路(Nat. Commun. 2015)などを報告し、心臓・心筋細胞内において恒常性維持および血行動態的負荷に対する臓器・細胞保護的な機能をオートファジーが有していることを明らかにしてきた。しかし、まだオートファジー活性の操作による心不全治療の方法を完全に明らかにするに至っていない。これは、オートファジー活性に特異的な介入が難しいことや、これまでオートファジーを促進させる方向に制御する分子が主な解析の対象であったことが原因である。

2009年に最初のオートファジー抑制因子としてBeclin1と結合するタンパク質であるRubiconが報告されたことから、Rubiconおよびその関連蛋白質を解析することにより、オートファジーによる心筋細胞内恒常性維持のシステムについての基礎的検討を行うことで、新規創薬につながる分子標的を明らかにすることができると考えた。本研究に先立ち予備的検討を行った結果、圧負荷ストレスによってRubicon発現量がマウス心臓において増加し、その結果LC3-IIで評価される心臓におけるオートファジー活性が抑制されていることを見出した。

2. 研究の目的

不全心ではオートファジーの活性が上昇していることから、心不全状態において誘導されているオートファジーは十分に機能していないとの仮説をたて、本研究では心不全の発症進展においてオートファジーがどのように制御され、保護的な役割を果たしているか、という問いに対し、オートファジー誘導に関わる分子機構の解析を行うこととした。すなわち、Rubicon経路がストレス応答性に心臓オートファジーに及ぼす影響とその制御機構を明らかにすることを通じて、心筋細胞および心臓においてオートファジーを誘導することが心臓保護的に機能しうるか否か、の解明を行うことを目的とする。本研究においてオートファジーによる心筋細胞内恒常性維持のシステムについてのさらなる基礎的検討を行うことにより新規創薬につながる分子標的が解明されれば、新しい心不全治療への応用が可能となることに加え、さらにはオートファジーという普遍的細胞内機構が病態に及ぼしている影響が解明されるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 血行動態負荷におけるRubiconの機能解析

野生型マウスや初代培養心筋細胞を用いて、圧負荷や心筋梗塞などの病態モデルなどの種々の負荷が、Rubiconの発現量に及ぼす影響を解析し、オートファジーへの影響については生化学的、病理学的検討を行う。

(2) 心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスを用いた病態モデルにおける表現型の解析

心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスを用いて病態モデルを作製し、表現型を解析するとともに、オートファジーの評価や各種バイオマーカー、生理学的・病理学的評価を行う。

(3) 心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスを用いた病態モデルにおける β 1アドレナリン受容体の動態解析

上記で用いた病態モデルにおける β 1アドレナリン受容体の動態を生化学的手法を用いて評価する。また、刺激に対する反応性について血行動態評価を用いて解析する。

(4) 初代培養心筋細胞を用いた刺激条件下における β 1アドレナリン受容体の動態解析

初代培養心筋細胞における刺激条件下における β 1アドレナリン受容体の動態を解析する。さらに、shRNAを用いたRubiconノックダウンの有無による変化を検討する。

4. 研究成果

(1) 血行動態負荷におけるRubiconの機能解析

野生型マウスに横行大動脈縮窄術(TAC)を行い、圧負荷による心肥大モデルを作製した。これらのマウスから心臓を摘出し、その抽出液を用いてウエスタンブロッティングでRubiconのタンパク質発現量を評価したところ、有意に上昇を認めた。また、LC3-IIで評価したオートファジー活性は有意に低下していた。

ラット新生児から単離した初代培養心筋細胞に刺激を加えたところ、Rubiconの明らかな

発現量の変化を認めなかった。成獣と新生児の違い、もしくは圧負荷と薬剤刺激の違いのため、初代培養心筋細胞では圧負荷条件下の心臓における Rubicon の発現量の変化を再現することが難しいと考えられた。

(2) 心筋細胞特異的 Rubicon 欠損マウスを用いた病態モデルにおける表現型の解析

心筋細胞特異的 Rubicon 欠損マウス (CKO) はモデルの法則に従って生まれ、8 週齢において心エコー上、明らかな構造的および機能的異常を認めなかった (図 1)。また、定常状態では LC3-II および p62 で評価したオートファジー活性は Rubicon 欠損マウスと対照群の間で顕著な差はなかった。この結果は、心臓での定常状態におけるオートファジーの制御は Rubicon による影響が小さいことを示唆している。この結果を受け、TAC 手術を施行したところ、対照群において心肥大のみを呈する時期に、Rubicon 欠損マウスは左室の拡大および収縮能の低下を認めた (図 2)。また肺重量の増加を認め、心不全を呈することが明らかとなった。この心臓サンプルを用いた解析にて炎症や細胞死については両群間に大きな差を認めなかった。さらに、オートファジー活性も明らかな上昇を認めなかった。

つまり、Rubicon の欠損によりオートファジー活性が上昇し、それが圧負荷誘導性心臓リモデリングに保護的に作用する、という当初の仮説と全く異なる結果であり、Rubicon がオートファジーとは異なるメカニズムで心臓保護作用を有する可能性があることが示唆された。そのため、当初の実験計画を変更する必要があった。

図1 心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスの心エコー図

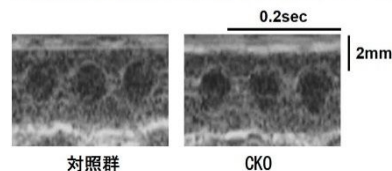
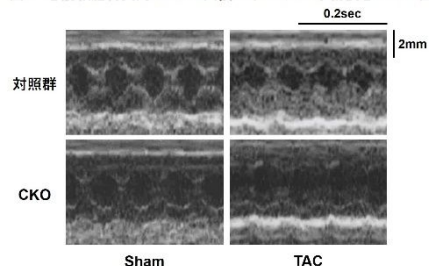


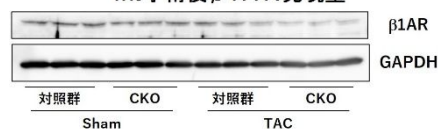
図2 心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスのTAC手術後心エコー図



(3) 心筋細胞特異的 Rubicon 欠損マウスを用いた病態モデルにおける β 1 アドレナリン受容体の動態解析

Rubicon の役割の一つとしてエンドサイトーシスを抑制すること (引用文献 1) また、持続する刺激によりインターナリゼーションされた後に心筋細胞膜上にリサイクルされる β 1 アドレナリン受容体 (AR) が心不全では減少することが知られている。そのため、Rubicon ノックアウトマウスの心臓において、TAC 後の β 1AR の発現量について評価することとした。すると、野生型に比べて、圧負荷後に受容体が減少していることを確認した (図 3)。今後、心不全を呈する前の時点での β 1AR の評価を行う予定である。

図3 心筋細胞特異的Rubicon欠損マウスのTAC手術後 β 1AR 発現量



(4) 初代培養心筋細胞を用いた 刺激条件下における β 1 アドレナリン受容体の動態解析

ラット新生児単離初代培養心筋細胞において Rubicon をノックダウンすると、刺激後の β 1AR 減少が促進されることを確認した。今後、本条件において、 β 1AR のリサイクリングの動態や、 β 1AR 減少が心筋細胞の機能におよぼす影響について、多角的に評価する予定である。

本研究の結果より、Rubicon はエンドサイトーシス性分解を抑制し、刺激後にダウンレギュレーションを受けた β 1AR をリサイクルして細胞膜上に返還することにより、心筋細胞膜上の受容体を維持するという、心臓保護的作用を有することが示唆された。これまで、心不全において受容体が減少するメカニズムは明らかになっておらず、その一端を明らかにした本研究は今後の心不全治療開発に重要な意味を持つと考えられる。

< 引用文献 >

1. Kohichi Matsunaga, et al. Two Beclin 1-binding Proteins, Atg14L and Rubicon, Reciprocally Regulate Autophagy at Different Stages. Nat Cell Biol. 2009;11(4):385-96.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	赤澤 康裕 (Akazawa Yasuhiro)		