

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790751

研究課題名(和文) 心筋オートファジー制御による左室リモデリング改善効果と治療応用

研究課題名(英文) The New Therapeutic Approach to Left Ventricular Remodeling Progression via Cardiac Autophagy

研究代表者

金森 寛充 (KANAMORI, Hiromitsu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20456502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：心筋オートファジーは生理的なエネルギー代償機構として心筋梗塞急性期・慢性期に心保護的に働くことが報告されているがこれまでにオートファジーを介した治療は臨床応用されていない。レスベラトロールは抗酸化作用の他に強力なオートファジー誘導作用が知られ、赤ワインなどに含まれるポリフェノールの一種で安全性が高い。そこでマウス心筋梗塞モデルを用い心筋梗塞後慢性期におけるレスベラトロールの左室リモデリング効果を検討した。有害な副作用なくオートファジーを促進し、心筋内ATPを産生することで心筋梗塞後左室リモデリングを抑制し心不全を改善した。レスベラトロールはオートファジーを介した心不全治療の手段と成り得る。

研究成果の概要(英文)：Autophagy compensate the lack of energy in cardiomyocyte suffering from acute or old myocardial infarction. However there is no clinical therapeutic approach via cardiac autophagy yet. Then we investigated the effect of resveratrol, a popular natural polyphenolic compound with antioxidant and proautophagic actions, on postinfarction heart failure using mouse myocardial infarction model. Resveratrol reversed left ventricular dilatation (reverse remodeling) and significantly improved cardiac dysfunction. Autophagy was augmented in those heart as shown autophagy related protein expression and ultrastructure findings including autophagic vacuoles. Resveratrol enhanced the activity of AMPK and suppressed the activity of mTOR and p70S6 kinase. Myocardial ATP production was increased in those heart. In conclusion, resveratrol is a beneficial pharmacological tool that augments autophagy to bring about reverse remodeling in the post infarction heart.

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：オートファジー リモデリング 心筋梗塞 心不全 レスベラトロール 心保護

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは飢餓状態に自己細胞内蛋白や小器官を自己消化する自己生存への生理的機構として知られてきた。近年では様々な疾患の病態形成において大きく関与していることが報告されている。循環器領域では心不全における心筋オートファジーは、エネルギー産生の代償機構として働き心保護的な役割を持つことが報告されてきている。これまで心筋オートファジーについて急性虚血における心保護的役割を報告したものは多いが、慢性期不全心筋における心保護や左室リモデリング効果についての報告は少ない。またオートファジー系を利用した臨床的な治療応用はいまだ確立していない。

## 2. 研究の目的

マウス陳旧性大型心筋梗塞後心不全モデルを用いてオートファジーを制御することによる左室リモデリングへの影響を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究はオートファジーを制御(この場合は促進)することは心保護に働くといういわゆる“オートファジー善玉説”が仮説である。そこでオートファジーを誘導する薬剤としてレスベラトロールを用いた。レスベラトロールはブドウ、赤ワイン、ピーナッツなどに含まれるポリフェノールの一種である。これまでの報告から抗酸化作用やSIRT 遺伝子系の活性化からアンチエイジングや寿命延長などの効果が知られている。さらに近年では強力なオートファジー誘導作用をもつことが知られてきた注目の化合物である。その機序はmTOR (mammalian target of rapamycin) 活性の調節を介している報告はあるが不明な点が多い。またレスベラトロールはもともと自然界に存在し、経口摂取が可能な化合物であり臨床応用しやすいと考えられる。

マウス大型心筋梗塞を作成し4週間後よりレスベラトロールを浸透圧ミニポンプにより2週間投与する: コントロール群に対し、投与量は低用量、高用量として5, 50mg/kg/dayとした。さらにレスベラトロールのオートファジーへの特異性を検討するため、オートファジー抑制剤としてクロロキン単独投与群に加え、レスベラトロールとクロロキン同時投与群を作成した。心機能評価は心エコー・心臓カテテル法を用いて検討した。心不全についてはANPを免疫染色・western blot法を用いた。組織学的評価、さらに心筋におけるオートファジー関連シグナルについては免疫組織染色、western blot法を用いた。透過型電子顕微鏡を用いて超微形態を観察した。心筋細胞内エネルギー評価にはAMPK活性を

western blot法で、ATPをルシフェラーゼ活性により測定した。またアポトーシス評価にはTUNEL法とwestern blot法によるCaspase 3の発現を用いた。さらにin vitroでマウス幼若心筋細胞を用いた検討を行った。in vivoで考えられたレスベラトロールのオートファジーへの作用機序についてシグナル阻害剤を用いて直接的に確認した。

## 4. 研究成果

### レスベラトロールによる心筋梗塞後左室リモデリング進行の抑制・抗心不全効果

心筋梗塞後6週間の経過で左室リモデリングが進行し、心機能低下、心不全を認めた。レスベラトロール高用量50 mg/kg投与により心筋梗塞後の左室径は縮小し左室リモデリングは抑制され、左室収縮能・拡張能は改善し、心体重比、肺体重比の増加も抑制された。さらに心筋でのANP発現も抑制を認めた。一方、レスベラトロール低用量5 mg/kg投与ではこれらの効果は得られなかった。逆にクロロキン投与では左室リモデリングが進行し左室腔拡大、心機能の低下、心不全増悪を認めたと、レスベラトロールの同時投与では左室リモデリングや心不全は抑制されコントロールとほぼ同等のレベルであった(図1)。以上の結果よりレスベラトロールの抗心不全効果には高用量が適当であることが示されたのでシグナルや組織学的検討ではレスベラトロール50 mg/kgについて行った。

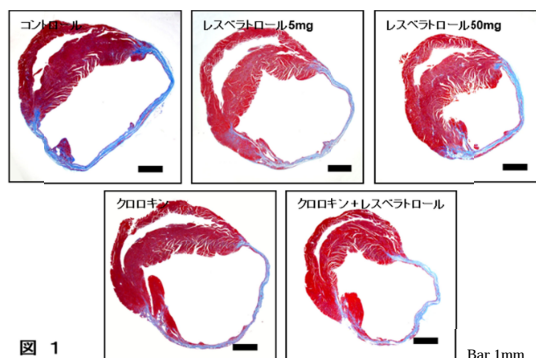


図 1 Bar 1mm

### レスベラトロールによるオートファジー誘導効果

LC3の免疫染色によりautophagic vacuoleの数を計測したところレスベラトロール投与により有意な増加を認め、また電子顕微鏡による超微形態の観察ではオートファゴソーム、リソソームの増加を確認した。オートファジーの活性を比較するためwestern blot法でLC3、p62を検討したところ、心筋梗塞によりオートファジー活性は亢進しレスベラトロール投与によりさらに有意な亢進を認めた。一方、クロロキンにより抑制され、同時投与ではオートファジー活性は相殺されコントロール群と同等であった。

## レスベラトロールによるオートファジー誘導の機序

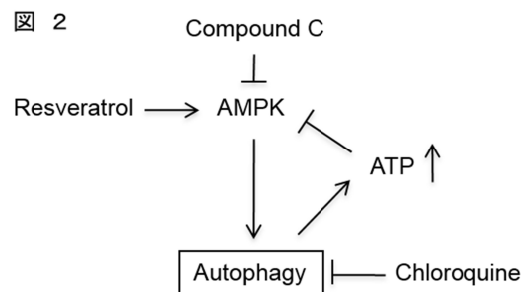
オートファジーはもともと細胞内のエネルギー環境に影響する機構なので次に心筋のエネルギー状態を検討するため心筋内 ATP 測定と AMPK 活性を検討した。レスベラトロール投与では有意に心筋内 ATP 含有量が増加し、一方、クロロキン投与では減少し、また同時投与ではコントロール群と同等であった。AMPK 活性を western blot 法で検討したところ心筋梗塞により増加を認め、レスベラトロール投与、クロロキン投与のいずれにおいてもコントロールと比較し有意な増加を認めた。一般に AMPK は細胞内のエネルギー需要状態を反映し、エネルギーの減少に伴い活性化しエネルギー産生に働くと考えられる。これまで申請者が心筋梗塞後心不全においてクロロキンと同様にリソソームの融合を阻害しオートファジーを抑制する bafilomycin A1 を投与した際も AMPK 活性は上昇していた。またオートファジーシグナルである mTOR について検討したところレスベラトロールによりリン酸化は抑制され、一方、クロロキンにより増加を認めた。以上よりレスベラトロールは直接的もしくは間接的に AMPK 活性を亢進し mTOR を抑制しオートファジーを誘導しエネルギー(ATP)産生に寄与したと考えられた。

オートファジーとアポトーシスの関連報告があるが、今回の TUNEL 法と caspase 3 活性の検討からは心筋梗塞によりアポトーシス細胞は増加していたがレスベラトロール投与、chloroquine 投与のいずれも有意差を認めなかった。またアポトーシス細胞の内訳は主として非心筋細胞(control 平均 0.66%)であり、心筋細胞(control 平均 0.058%)は極めて少ないことから本研究での心機能の変化にアポトーシスが関与したとは考えにくい。

さらに in vitro において compound C を用いた AMPK 阻害試験を行った。レスベラトロールは幼若心筋細胞で AMPK 活性を増加しオートファジー誘導し、心筋内 ATP 産生を増加したが、compound C により AMPK 活性は阻害されオートファジーは誘導されなかった。クロロキンは AMPK 活性を増加させたがオートファジーの誘導はなく心筋内 ATP 産生も不変であったことに加えて compound C による AMPK 阻害は認めなかった。このことからレスベラトロールは直接に AMPK-mTOR 経路を介しオートファジーを誘導したことが確認された(図 2)。

またレスベラトロールは Sirt1 遺伝子系活性化や抗酸化作用を持つことがこれまでに報告されている。本研究(心筋梗塞後心不全モデル)ではレスベラトロールは Sirt1 遺伝子系を活性化したがオートファジーへの直接作用は否定的であった。心不全への直接的な抗酸化作用についても

MnSOD の検討からは否定的であった。



## 結論

以上の結果からレスベラトロールは AMPK 経路に作用しオートファジーを亢進し心筋内エネルギー産生を増加することで、心筋梗塞後左室リモデリングを抑制し心機能を改善したと考えられた。レスベラトロールは心筋梗塞後左室リモデリング抑制の有効な治療薬となりうることを示唆された。

## 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 1 件)

Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Morishita K, Kawasaki M, Mikami A, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP Kinase pathway. *Am J Pathol.* 2013;182(3):701-13. 査読有

### [学会発表](計 5 件)

Resveratrol Displays Cardioprotection in Postinfarction Remodeling Through Autophagic Activation Associated with AMPK but not Sirt1 Pathway. American Heart Association Scientific Sessions 2012 11.3-7 Los Angeles USA

Resveratrol Mitigates Postinfarction Left Ventricular Adverse Remodeling and Cardiac Dysfunction via Autophagy Activating AMP Kinase Pathway. 第 15 回日本心不全学会・学術集会 2011.10.13-15 鹿児島

Resveratrol Promotes Reverse Remodeling and Mitigates Heart Failure of Post-Myocardial Infarction via Autophagy Activating AMP Kinase Pathway. 第 76 回日本循環器学会・学術集会 2012.03.16-18. 福岡

Resveratrol Brings About Reverse

Remodeling in the Heart with a Large Old  
Myocardial Infarction Through Autophagy  
Activating AMP Kinase Pathway.  
American Heart Association  
Scientific Sessions 2011 11.13-16  
orlando USA  
Resveratrol Promotes Postinfarction Left  
Ventricular Reverse Remodeling via  
Autophagy activating AMP Kinase  
Pathway independent of Sirt 1. 第 16 回  
日本心不全学会・学術集会  
2012.11.30~12.2 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金森 寛充 (KANAMORI, Hiromitsu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20456502

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：