

機関番号：13701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790714

研究課題名 (和文) オートファジー制御による新しい心不全治療の開発

研究課題名 (英文) Development of new strategy by manipulating autophagy against cardiac failure

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

研究成果の概要 (和文)：飢餓ストレス誘発による心筋オートファジーは自己細胞内蛋白や細胞内小器官を分解しエネルギー産生を代償することで心機能を維持した。急性心筋梗塞においてオートファジーはエネルギー産生を代償し心筋細胞死を抑制することで梗塞サイズを縮小した。また慢性心筋梗塞においてリモデリング抑制と心機能改善に関与した。すなわちオートファジーは心保護的作用がありこれを促進させることは心筋梗塞の新しい治療手段となりうる事が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Starvation-induced autophagy compensated energy by digesting own constituents and maintained cardiac function. Autophagy emerged in acute myocardial infarction and suppressed cardiomyocyte death and limited infarct expansion. Autophagy protected progression of postinfarction cardiac remodeling and improved cardiac dysfunction. These present findings suggest that autophagy is innate and potent protective mechanism and augmenting autophagy could be a useful new therapeutic strategy for myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心不全とオートファジーとの関連が報告されているが、未だオートファジーの心不全における病態生理や役割についての結論が出ていない。不全心においてオートファジー心筋細胞死が見出されるとの報告がある。オートファジー細胞死はタイプ1のプログラム細胞死であるアポトーシスに比しタイプ2

のプログラム細胞死とも呼ばれアポトーシス同様に本来個体発生の段階における不要な細胞の生理的除去機構として重要である。この細胞死は形態学的に細胞質内にミトコンドリアなどの細胞内小器官を取り込んだオートファゴソームならびにそれらがリソソームと融合したオートリソソームなどの autophagic vacuole が充満していることで特

徴付けられる。また一方でオートファジーはユビキチン・プロテアソームと並ぶ細胞内での蛋白分解系を示す用語でもある。後者の場合は、細胞が飢餓などのストレスに曝された時に自己の細胞内小器官を分解してエネルギーとして細胞生存のために再利用するという代償機構として働く。従ってオートファジーの形態学的同定だけではそれが死に向かうものか生存を目指すものかという役割の意味が全く不明である。すなわち不全心における心筋細胞オートファジーはプログラム細胞死なのかあるいはストレスに対する代償機構が失敗した心筋細胞死なのかという根本的な問題すら分かっていない。この判別は極めて重要な意味を持つ。すなわち前者であればオートファジープロセスそのものを阻害することが治療につながるが、後者の場合は逆に同プロセスを促進することが細胞保護になるからである。

2. 研究の目的

心筋オートファジーは心不全のエネルギー代償機構の主要な経路と考えられ種々の病態モデルにおいてオートファジーの効率を上げることによって心機能が改善されることを検証する。

具体的な仮説

- 1) 成体の心筋細胞におけるオートファジー変性は代償機構でありオートファジー細胞死はその破綻像である。
- 2) 心筋細胞におけるオートファジーの効率を上げれば心不全の進行を阻止できる。

3. 研究の方法

I：急性ストレスとしてマウスを用いた①飢餓誘発、②急性心筋梗塞下での心筋細胞オートファジーの病態生理・分子機構解明。

II：慢性心不全としてマウス大型陳旧性心筋梗塞モデルを用いた心筋オートファジーの病態生理・分子機構解明。

4. 研究成果

I：急性ストレス下での心筋オートファジー

① 飢餓誘発性心筋オートファジー

申請者はまず心筋オートファジーの動態を検討するため、オートファジーが飢餓状態で亢進することを一般的に知られていることから、マウスを3日間絶食とし心筋オートファジーを誘導し心機能、心筋形態、分子生物学的シグナル等を検討した。絶食12時間後にはリソソーム顆粒が早くも心筋細胞内に絶食期間依存性に増加し、さらに次第に内部にミトコンドリアなどの細胞内小器官を含む典型的なオートファゴリソソームへの形態変化を電子顕微鏡・免疫組織電子顕微鏡下にて確認した。またWestern blot法においてオートファジー関連蛋白である

LC3-II、カテプシンD、ユビキチンの発現は絶食時間依存性に増加することを確認した。さらに我々はBafilomycin A1 (BafA1)投与により心筋におけるオートファジー阻害を検討した。BafA1を投与した給餌群では心機能に影響を与えなかった。しかしBafA1を投与下に3日間絶食した群では著しい心機能の低下と心拡大を認めた。組織学的には心筋内にリソソームや autophagic vacuole の著明な蓄積を認めた。絶食マウスにおいてBafA1投与によりカテプシンDとユビキチンの蛋白発現が増加したがLC3-IIは減少していた。絶食群において血中アミノ酸濃度は有意差を認めなかったが心筋組織においてBafA1投与により有意にアミノ酸低下を認めた。さらに心筋内ATPを定量したところ絶食3日間にBafA1を投与した群では有意にATPが減少していた。これらのことから飢餓ストレス下でBafA1は心筋において特異的にオートファジーを阻害しアミノ酸代謝・ATP産生を抑制し心機能低下に関与したと考えられた。以上より飢餓ストレス下においてオートファジーは心機能維持に重要であることが示唆された。

② 急性虚血下での心筋オートファジー

飢餓誘発心筋オートファジーは細胞の生存を指向する代償機構と考えられた。そこで申請者はさらにマウス急性心筋虚血モデルを用い虚血心筋におけるオートファジーの動態と役割に注目した。まずマウス心筋梗塞モデルを作成し心筋梗塞4日後までの梗塞領域、非梗塞領域におけるオートファジーのプロセスを検討した。オートファジーは結紮後急性期には心室全体で亢進し、次第に梗塞境界領域に限局して亢進を認めた。LC3-II、カテプシンD、ユビキチンは梗塞後時間経過とともに発現増加を認めた。次にオートファジーの心筋梗塞への影響を検討するため心筋梗塞コントロール群に対し心筋梗塞前にオートファジー促進剤としてrapamycinを投与した群とオートファジー阻害剤としてbafilomycin A1を投与した群を作成した。1日後の血中トロポニンIと2日後の心筋梗塞サイズを比較するとコントロール群と比較し有意にrapamycin投与群ではいずれも減少、縮小を認め、bafilomycinA1投与群ではいずれも上昇、拡大を認めた。他のオートファジー促進方法として梗塞前1日間絶食の上心筋梗塞を作成した群を作成し同様に検討したところ有意な梗塞サイズ縮小を認めた。心筋内のアミノ酸、ATP含有量はコントロール群と比較しrapamycin投与群や絶食群では有意に増加していたが、bafilomycinA1投与群ではATP含有量低下を認めた。さらに虚血心筋細胞におけるオートファジーの特異的効果を

検討するため *in vitro* での実験を行った。マウス幼若心筋細胞を単離し、ATG5、LAMP-2の siRNA を導入することでオートファジーを特異的に阻害し、培養液、酸素条件により虚血状態をシミュレーションした。コントロールと比較しオートファジーを阻害された細胞の生存率は有意に低下し ATP 産生も低下していた。これらの結果から虚血心筋細胞においてオートファジーは保護的に作用し、エネルギー産生を代償することで虚血細胞死を抑制し心筋梗塞サイズを縮小させたと考えられた。

II : 慢性心不全におけるオートファジー

不全心筋にオートファジー細胞死が見出されることは報告されているがオートファジーの役割は不明であるためマウス大型陳旧性心筋梗塞モデルを用い心筋梗塞後1週から4週後における心筋オートファジーを検討した。心筋梗塞後亜急性期(1週)には心筋全体でオートファジーが亢進し、特に梗塞境界領域の心筋は空泡変性が目立ち電子顕微鏡下に巨大な vacuole が確認されオートファジーの亢進を認めた。その後慢性期へ移行すると境界領域のオートファジー亢進は低下し逆に梗塞遠隔領域での亢進を認めた。さらに慢性心不全での心筋オートファジーの役割を検討するため、心筋梗塞後3週より7日間 bafilomycin A を投与しオートファジーを阻害した群、rapamycin を投与しオートファジーを促進した群を作成した。心エコー、心カテーテル法による心機能評価では rapamycin 投与により左室の縮小、収縮能・拡張能の改善を認め、ANP の発現も抑制されていた。これらの心筋では autophagic vacuole は増加し LC3 は強く発現しておりオートファジーの亢進を認めた。一方、bafilomycin A1 の投与により左室は拡大し収縮能・拡張能の低下を認め、心筋ではオートファジーの抑制を認めた。心筋のエネルギー状態に注目し AMPK を評価したところ心筋梗塞による慢性心不全状態でリン酸化は亢進していたが、rapamycin により抑制され、一方 bafilomycin A1 によりさらに亢進していた。このことか rapamycin により不全心筋においてオートファジーが亢進し、エネルギー産生が代償されたことが示唆された。以上より心筋梗塞後慢性心不全において心筋オートファジーはエネルギー産生を代償的に亢進し左室リモデリングを抑制し心機能・心不全を改善していることが示唆された。

これまでの結果から心筋におけるオートファジーは心保護的作用がありこれを促進させることは心筋梗塞の新しい治療手段となりうるということが示唆された。

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4件)

1. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Ono K, Nagao K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Kawasaki M, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011. in press (査読あり)
2. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. The role of emerging autophagy in postinfarction cardiac remodeling. *Cardiovascular Research* 2011. in press. (査読あり)
3. Takemura G, Kanamori H, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. Autophagy maintains cardiac function in the starved adult. *Autophagy* 5(7): 1034-6, 2009. (査読あり)
4. Kanamori H, Takemura G, Maruyama R, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Li L, Kawamura I, Takeyama T, Kawaguchi T, Nagashima K, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. *Am J Pathol* 174: 1705-1714, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

1. Autophagy Limits Expansion of Acute Myocardial Infarction Induced by Permanent Coronary Artery Occlusion Hiromitsu Kanamori, Genzou Takemura, Rumi Maruyama, Kazuko Goto, Akiko Tsujimoto, Koh Ono, Kazuya Nagao, Atsushi Ogino, Itta Kawamura, Toshiaki Takeyama, Tomonori Kawaguchi, Takatomo Watanabe, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara, Mitsuru Seishima, and Shinya Minatoguchi
第14回日本心不全学会・学術集会, 東京, 2010. 10. 7-9

2. 急性心筋梗塞におけるオートファジーのプロセスと心筋保護的役割
金森寛充、竹村元三、清島満、湊口信也
第19回日本 Cell Death 学会学術集会,
名古屋, 2010. 7. 31-8. 1.
3. Cardiomyocyte Autophagy is an Innate Protective Mechanism against Progression of Postinfarction Cardiac Remodeling
Hiromitsu Kanamori, Genzou Takemura, Kazuko Goto, Rumi Maruyama, Akiko Tsujimoto, Itta Kawamura, Toshiaki Takeyama, Tomonori Kawaguchi, Takatomo Watanabe, Atsushi Ogino, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara, Mitsuru Seishima, Shinya Minatoguchi
第74回日本循環器学会・学術集会, 京都, 2010. 3. 5-7.
4. Autophagy Limits Acute Myocardial Infarct Expansion.
Hiromitsu Kanamori, Genzou Takemura, Tomonori Kawaguchi, Toshiaki Takeyama, Itta Kawamura, Kazuko Goto, Longhu Li, Hisayoshi Fujiwara, Mitsuru Seishima, Shinya Minatoguchi
17th Asia Pacific Congress of Cardiology. Kyoto, Japan, 2009. 17th
APCC Kyoto Japan 2009

[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：