

令和元年6月5日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09505

研究課題名(和文)mTORシグナル異常制御による心不全治療の開発

研究課題名(英文)The role of aberrant mTOR activation in heart failure

研究代表者

矢野 俊之(Yano, Toshiyuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40444913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心不全症例の心筋生検組織を用いて、心不全症例では細胞増殖及び成長のmaster regulatorとして知られている哺乳類ラパマイシン標的蛋白質(mTOR)が恒常的に活性化していることを解明した。さらに、心筋細胞を用いた検討では、ネクロプトーシスシグナル活性化が心不全に対して保護的に働いているオートファジーを抑制すること、mTOR活性阻害薬はネクロプトーシスシグナルを抑制しオートファジーを回復させることが明らかとなった。mTOR活性阻害薬のこれらの効果は、RIP1の抑制的リン酸化を介していた。以上の結果から、mTORの恒常的活性化は心不全治療の新たな標的であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC1が恒常的に活性化する遺伝子疾患である結節性硬化症の腎腫瘍に対してmTORC1阻害薬は保険適応を取得している。申請者らは、非虚血性拡張型心筋症例において心筋mTORC1活性が顕著に亢進し、病理学的変化や予後と密接に関係していることを明らかにしており、mTORC1活性調節は心不全治療の新たな標的であると考えた。

オートファジー機能不全が心機能低下へ導く分子機構は不明なままである。本研究により解明されたオートファジーとネクロトーシスの直接的分子機構連関は新たな心不全治療法開発への足がかりになる。

研究成果の概要(英文)：Significant roles of mTOR complex 1 (mTORC1) in heart failure have been shown in animal models of heart failure. However, contribution of mTORC1 to pathogenesis of human heart failure has not been characterized. By use of endomyocardial biopsy specimens, we found that mTORC1 activity was higher in patients with heart failure than in controls. Furthermore, autophagy in cardiomyocytes was impaired by activation of necroptotic signals via suppression of autolysosome formation. Inhibition of mTORC1 by rapamycin restored the autophagic flux in cardiomyocytes. The effect of rapamycin was mediated by novel inhibitory phosphorylation of RIP1 and led to cardiomyocyte protection from necroptosis. Taken together, the findings suggest that aberrant mTORC1 activation is a therapeutic target in heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 分子心臓病学 ネクロプトーシス オートファジー mTOR

1. 研究開始当初の背景

β受容体遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬等の神経体液性因子の修飾による心不全治療は一定の成果を挙げた。しかし、慢性心不全症例の5年生存率は50~60%と今なお不良であり、新たな治療法の開発が課題となっている(*Vasc Health Risk Manag* 2008;4:103)。

哺乳類ラパマイシン標的蛋白質(mTOR)は、2つの複合体(mTORC1, mTORC2)として存在し、増殖、代謝の調節に重要な役割を果たすことが知られている。mTORC2はAktの活性化を介してmTORC1を活性化し、mTORC1はリボソームの活性化によりタンパク合成を促進する一方で、心不全に対して保護的に働くオートファジーを抑制する。最近、我々はmTORC2/Akt/mTORC1経路の短時間の活性化が虚血再灌流障害による細胞死に対して保護的に働くことを明らかにした(*Circ Res* 2014;114:1268)。一方、mTORC1阻害薬が成因の異なる心不全モデルにおいて心機能を改善すること(*Circulation* 2004;109:3050, *Sci Transl Med* 2012;4:144ra102, *Sci Transl Med* 2012;4:144ra103, *Nat Genet* 2014;46:635)を考慮すると、mTORC1経路の恒常的活性化はむしろ心不全を増悪させる可能性がある。

最近の申請者らの臨床例における最近の報告はその仮説を支持している。

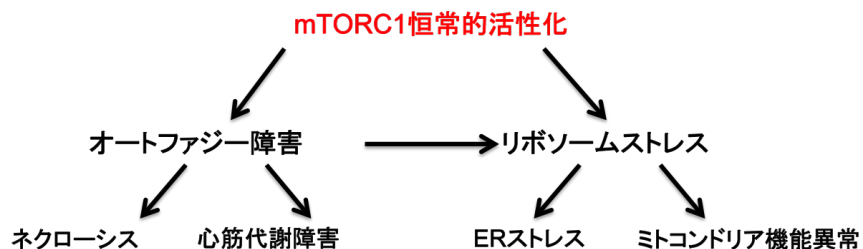
- 1) mTORC1 活性抑制蛋白である tuberous sclerosis complex(TSC)の遺伝子異常により mTORC1 が恒常的に活性化する結節性硬化症に合併した拡張型心筋症例において、mTORC1 阻害薬投与により左室機能が正常化した(*Eur Heart J* 2015;36:2338)。
- 2) 左室機能低下症例(臨床例)の心筋生検組織では、mTORC1 活性が顕著に亢進しており、心筋細胞の脱落による置換性線維化と密接な関係があった(*Circulation* 2014, abstract)。

しかし、mTORC1の恒常的活性化が左室機能障害をもたらす分子機構は明らかにされていない。オートファジーは心不全において保護的に働いていることが知られており(*Nat Med* 2007;13:619)、mTORC1 恒常的活性化によるオートファジーの過剰な抑制が機序の一つとして想定される。さらに、mTORC1 恒常的活性化はリボソームへ過剰な負荷をかけることが予想されるが、心不全とリボソーム過剰負荷との関係を検討した報告はない。

2. 研究の目的

mTORC1 活性の過剰な亢進によるオートファジー機能低下もしくはリボソームストレスがネクローシス、心筋代謝異常、ER ストレス及びミトコンドリア機能異常を惹起する可能性を検証する。

mTORC1恒常的活性化による左室機能障害の分子機構(仮説)



- 1) **ネクロプトーシス**
 - ネクロプトーシス
 - ミトコンドリア透過性遷移孔開口

とオートファジーの分子機構連関

mTORC1 活性調節によるオートファジー機能亢進及び低下が RIP1/RIP3 依存性ネクロプトーシスに与える影響を解明する。オートファジーが RIP1/RIP3 結合に与える影響を網羅的に解析するとともに、蓄積した異常タンパクと RIP1/RIP3 の関係に注目する。

2) ミトコンドリア透過性遷移孔(mPTP)とオートファジーの分子機構連関

mTORC1 依存性オートファジー機能低下による mPTP 構成蛋白の発現と複合体形成への影響、mPTP 機能への効果を明らかにする。特に、申請者らが mPTP 開口制御に重要であることを明らかにしてきた GSK3 β (*J Biol Chem* 2014;289:29285)のオートファジーによる修飾に注目する。

3 . 研究の方法

[実験1] 心筋細胞におけるネクロプトーシス誘導機構の検討

10%牛血清添加DMEM 中でH9c2 ラット心筋芽細胞を培養した。培養液に溶媒(Vehicle)、TNF- α (TNF、50 ng/ml)、pan-caspase 阻害薬であるZ-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD、20 mM)、TNF とzVAD (TNF/zVAD) を添加した。

[実験2] ネクロプトーシス誘導刺激がオートファジーに与える影響の検討

1) Vehicle、TNF、zVAD、あるいはTNF/zVAD 添加8 時間後に細胞を回収し、LC3 とp62 の蛋白量をウェスタンブロット法で定量した。リソソーム機能阻害薬として、液胞型H⁺-ATPase 阻害薬であるbafilomycin A1 (100 nM) を用いた。

2) tandem RFP-GFP-LC3 プラスミドを導入し、24 時間後にVehicle、TNF、zVAD、TNF/zVAD、mTORC1 活性阻害によりオートファジーを活性化させるrapamycin(10 nM)、あるいはTNF/zVAD + rapamycin を添加した。薬剤添加1、4、8 時間後にLC3 のドット数を蛍光顕微鏡で観察した。

[実験3] mTORC1阻害薬がネクロプトーシスに与える影響

mTORC1活性阻害薬であるrapamycinがネクロプトーシスを抑制する分子機構をRIP1の活性制御に注目して検討した。

4 . 研究成果

[実験1]

TNF/zVAD では、vehicle と比較して有意にネクローシスが増加したが (60.6 \pm 2.7% vs. 16.6 \pm 4.3%)、TNF 単独では増加しなかった (29.1 \pm 4.8%)。TNF/zVAD によるネクローシスはRIP1 活性阻害薬であるnecrostatin-1 (29.4 \pm 4.0%)及びRIP3 発現抑制(27.7 \pm 2.0%)により完全に抑制された。一方、2種類のmPTP開口抑制薬はTNF/zVADによるネクローシスに影響を与えなかった。

[実験2]

TNF/zVAD では、vehicle と比較して LC3-II の蛋白量が有意に増加していた。TNF/zVAD による LC3-II 増加は bafilomycin A1 によるリソソーム機能阻害の影響を受けなかったことから、TNF/zVAD がリソソームによるオートファゴソーム分解機構に障害を与えた可能性が示唆された。tandem-RFP-GFP-LC3 導入実験では、TNF/zVAD 添加 4、8 時間後にオートファゴソーム LC3 が有意に増加したが、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合は vehicle 群と同様であった。Rapamycin は、TNF/zVAD の有無にかかわらず、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合を低下させた。一方で、RIP1 阻害薬である necrostatin-1 は TNF/zVAD 存在下において、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合を低下させた。以上の結果から、TNF/zVAD は RIP1 活性化によりオートファゴソームからオートリソソームに進行する過程を障害している可能性が示唆された。

[実験 3]

TNF/zVAD は RIP1-Ser166 のリン酸化を増加させたが、RIP1-Ser320 のリン酸化に影響を与えなかった。Rapamycin あるいは Ku 添加により TNF/zVAD による RIP1-Ser166 のリン酸化レベルが部分的に低下し、RIP1-Ser320 のリン酸化レベルが増加した。一方、PF 添加により RIP1-Ser166 リン酸化レベルは rapamycin あるいは Ku 添加と同程度まで低下したが、RIP1-Ser320 リン酸化レベルには影響を与えなかった。Rapamycin は TNF/zVAD によるネクローシスおよび RIP1-RIP3 結合を軽減したが、抑制的リン酸化部位を置換した RIP1-Ser320A プラスミド導入細胞では rapamycin による効果は消失していた。以上の結果から、rapamycin は RIP1-Ser320 の抑制的リン酸化を誘導し、RIP1 活性化によるオートファジー障害を抑制する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件) 全て査読あり

1. **Yano T***, Yamamoto M, Mochizuki A, Ogawa T, Nagano N, Fujito T, Nishida J, Nagahara D, Abe K, Miki T, Suzuki C, Takahashi H, Ishibashi-Ueda H, Miura T. Successful Transcatheter Diagnosis and Medical Treatment of Right Atrial Involvement in IgG4-related Disease. *Int Heart J* 59:1155-1160, 2018. (* **Corresponding author**)
2. Mizuno M, Kuno A, **Yano T**, Miki T, Oshima H, Sato T, Nakata K, Kimura Y, Tanno M, Miura T. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts. *Physiol Rep* 6:e13741, 2018.
3. Tatekoshi Y, Tanno M, Kouzu H, Abe K, Miki T, Kuno A, **Yano T**, Ishikawa S, Ohwada W, Sato T, Niinuma T, Suzuki H, Miura T. Translational regulation by miR-301b upregulates AMP deaminase in diabetic hearts. *J Mol Cell Cardiol* 119:138-146, 2018.
4. Tanaka M, Moniwa N, Mita T, Tobisawa T, Matsumoto T, Mochizuki A, Yamashita T, **Yano T**, Furuhashi M, **Miura T**. A Case of Crescentic Glomerulonephritis Complicated with Hypocomplementemic Urticarial Vasculitis Syndrome and ANCA-Associated Vasculitis. *Case Rep Nephrol Dial* 7:144-153, 2018.
5. **Yano T***, Abe K, Tanno M, Miki T, Kuno A, Miura T, Steenbergen C. Does p53 inhibition suppress myocardial ischemia/reperfusion injury? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 23:350-357, 2018. (* **Corresponding author**)
6. Nakata K, Miki T, Tanno M, Ohnishi H, **Yano T**, Muranaka A, Sato T, Oshima H, Tatekoshi Y, Mizuno M, Abe K, **Miura T**. Distinct impacts of sleep-disordered breathing on glycemic variability in patients with and without diabetes mellitus. *PLoS One* 12(12):e0188689, 2017.
7. **Yano T***, Takahashi R, Yamashita T, Nagano N, Ishikawa A, Sakurai A, Maruyama H, Miura T. Detection of Urinary Mulberry Bodies Leads to Diagnosis of Fabry Cardiomyopathy: A Simple Clue in the Urine Sediment. *Circ Heart Fail* 10:e004538, 2017. (* **Corresponding author**)
8. Ohno K, Kuno A, Murase H, Muratsubaki S, Miki T, Tanno M, **Yano T**, Ishikawa S, Yamashita T, Miura T. Diabetes increases the susceptibility to acute kidney injury after myocardial infarction through augmented activation of renal Toll-like receptors in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 313:H1130-H1142, 2017.
9. Muratsubaki S, Kuno A, Tanno M, Miki T, **Yano T**, Sugawara H, Shibata S, Abe K, Ishikawa S, Ohno K, Kimura Y, Tatekoshi Y, Nakata K, Ohwada W, Mizuno M, Miura T. Suppressed autophagic response underlies augmentation of renal ischemia/reperfusion injury by type 2 diabetes. *Sci Rep* 7:5311, 2017.

10. Sato T, Miki T, Ohnishi H, Yamashita T, Takada A, **Yano T**, Tanno M, Tsuchida A, Miura T. Effect of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors on impaired ventricular repolarization in people with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 34:1367-1371, 2017.
11. Ogasawara M*, **Yano T***, Tanno M, Abe K, Ishikawa S, Miki T, Kuno A, Tobisawa T, Muratsubaki S, Ohno K, Tatekoshi Y, Nakata K, Ohwada W, Miura T. Suppression of autophagic flux contributes to cardiomyocyte death by activation of necroptotic pathways. *J Mol Cell Cardiol* 108:203-213, 2017. (* **OM and YT equally contributed to this work**).
12. Tobisawa T*, **Yano T***, Tanno M, Miki T, Kuno A, Kimura Y, Ishikawa S, Kouzu H, Nishizawa K, Yoshida H, Miura T. Insufficient activation of Akt upon reperfusion because of its novel modification by reduced PP2A-B55 α contributes to enlargement of infarct size by chronic kidney disease. *Basic Res Cardiol* 112:31, 2017. (* **TT and YT equally contributed to this work**).
13. Koyama M, **Yano T***, Kikuchi K, Nagahara D, Ishibashi-Ueda H, Miura T. Lethal heart failure with anti-mitochondrial antibody: an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mimetic. *Eur Heart J* 38:123, 2017 (* **Corresponding author**)
14. Nishizawa K, **Yano T**, Tanno M, Miki T, Kuno A, Tobisawa T, Ogasawara M, Muratsubaki S, Ohno K, Ishikawa S, Miura T. Chronic treatment with an erythropoietin ligand receptor ligand prevents chronic kidney disease-induced enlargement of myocardial infarct size. *Hypertension* 68:697-706, 2016.
15. Koyama M, **Yano T***, Kikuchi K, Mizuno M, Nagano N, Hashimoto A, Miura T. Favorable response to an endothelin receptor antagonist in mitomycin-induced pulmonary veno-occlusive disease with pulmonary capillary hemangiomatosis. *Int J Cardiol* 212:245-247, 2016. (* **Corresponding author**)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 2016 年 第 64 回日本心臓病学会シンポジウム“ 拡張型心筋症の心筋生検ガイド下分子標的療法：mTORC1 阻害薬の可能性 ”
2. 2016 年 ヨーロッパ心臓病学会 “ Sequestration of p62 by RIP1 promotes necroptosis through suppression of autophagic flux in cardiomyocytes: a novel crosstalk between autophagy and necroptosis”
3. 2018 年 第 82 回日本循環器学会学術集会プレナリーセッション“ Crosstalk between Aberrant mTORC1 Activation and Necroptotic Pathway: a Novel Therapeutic Target in Ischemic Heart Disease”
4. 2019 年 第 83 回日本循環器学会学術集会プレナリーセッション “Detection of Cardiomyocyte mTORC1 Activation in Myocardial Biopsy Samples of Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: a Novel Prognostic Marker and Therapeutic Target”

〔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：
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：丹野雅也

ローマ字氏名： Masaya Tanno

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00398322

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。