

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09570

研究課題名(和文) 選択的オートファジーによるインフラマソーム分解を標的とした心不全発症機序の解明

研究課題名(英文) The role of selective autophagy for the degradation of inflammasome in the progression of heart failure

研究代表者

前嶋 康浩 (Yasuhiro, Maejima)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40401393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は「選択的オートファジーによりインフラマソームを分解するメカニズム機能不全に陥ることが心不全の原因のひとつである」という仮説を検証するための検討を行った。圧負荷モデルマウスを用いた検討を行ったところ、対照群やプロテアソーム阻害群と比較してオートファジー阻害群では有意に心機能が低下しており、インフラマソームの量や活性が亢進していた。また、TRIM20とNLRP3の間に相互作用があることやTRIM20をノックダウンした培養心筋細胞では選択的オートファジーが抑制されてインフラマソームの活性が有意に上昇することを見だし、仮説が正しいことを実験的に証明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の申請研究では、培養心筋細胞を用いたin vitro実験ならびに実験的心筋梗塞モデルを用いて、心不全の病態において微細なタンパク複合体を特異的に分解する選択的オートファジーが関与しているのかどうかと、この選択的オートファジーの制御系が心不全の病態ではどのような影響を受けるのかについて明らかにした。特に、インフラマソームを特異的に分解する選択的オートファジーの分子機序を明らかにし、このメカニズムの破綻がインフラマソームの機能亢進を惹起して心不全の病態を悪化させているのかどうかを明らかにし、新規の心不全治療法の開発につながるような知見を見いだせた点に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a novel target of heart failure therapy by elucidating the role of selective autophagy that degrade inflammasome in the hearts. We found that suppression of autophagy machinery enhances accumulation of inflammasome in cardiomyocytes, thereby abrogating cardiac function in response to pressure overload in the hearts of the mice. We also demonstrated that there is the physically interaction between TRIM20 and NLRP3. In addition, we have shown that knockdown of TRIM20 enhances inflammasome activity in cardiomyocytes by suppressing selective autophagy for the degradation of inflammasome. Thus, we concluded that selective autophagy for the degradation of inflammasome would be a possible target for establishing novel therapeutic strategy against heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 インフラマソーム オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは変性タンパク質や劣化した細胞小器官を除去して細胞内環境を適切に維持する役割を担っており、その機能異常は心不全をはじめとする様々な疾患の発症・病状進展に深く関与している (Levine et al. Cell 2008)。オートファジーには心筋を保護する働きがあることがこれまでの研究により示唆されているが、そのメカニズムは心筋細胞における細胞内タンパクの品質管理の促進、心筋細胞内の危険シグナルの除去、という2点に大別される。

近年、オートファジーの分子制御システムについての解明が目覚ましく進み、それに伴ってオートファジー制御を標的とした臨床応用が急速に進行し、海外では悪性腫瘍や神経変性疾患などに対してオートファジーを制御する薬剤の臨床治験が開始されている。その一方、心血管疾患の発症や病状進展におけるオートファジーの関与についての解明は悪性腫瘍や神経変性疾患の場合と比較して充分に進んでおらず、オートファジーの分子機序を標的とした新規の心不全治療法の開発に結びついていないのが現状である。

私たちは以前に Mst1 キナーゼがオートファジー促進因子 Beclin1 のリン酸化によりその機能を阻害してオートファジーを抑制するために心機能を低下させていること (Maejima, Isobe et al. Nat Med 2013) を報告し、オートファジーによる心筋細胞内のタンパク品質管理が心筋細胞の機能維持に不可欠であることを示した。また、私たちはオートファジーによる心筋保護作用のうち、心筋細胞内の危険シグナルの除去を主に司っている選択的オートファジーの機序解明にも取り組み、ダメージを受けたミトコンドリアを選択的に分解するオートファジー機構であるマイトファジーが正常に機能するためにはミトコンドリアの分裂促進因子 Dynamin-related protein 1 (Drp1) が極めて重要な役割を果たしており、心機能維持に欠かせない分子であることを明らかにした (Ikeda, Maejima, et al. Circ Res 2015; Shirakabe, Maejima, et al. Circulation 2016)。近年、選択的オートファジーは細胞小器官や外来微生物などにとどまらず、さらに微細なタンパク複合体を特異的に分解することができることも明らかになってきた。インフラマソームは自然免疫の制御を司る分子複合体であるが、心筋組織の炎症を促進するなど心不全の発症にも深く関与していることが示唆されている (Kawaguchi, et al. Circulation 2011)。最近、インフラマソームがユビキチンリガーゼ MARCH7 (Yan, et al. Cell 2015) や TRIM20 蛋白 (Kimura, et al. J Cell Biol 2015) を介して選択的オートファジーで分解されることが明らかにされた。これらの事実を踏まえて、私たちは「インフラマソーム選択的オートファジーの制御異常がインフラマソームの機能亢進を惹起して心不全の病態を悪化させているのではないか？」という仮説を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

上述のような背景及びこれまでの研究成果をもとに、本研究は選択的オートファジーによりインフラマソームを分解する分子機序を解明し、心不全の発症および病状進展の過程に子のメカニズムの機能不全が関与していることを示した上で、新規の心不全治療法の開発に資する基礎データを得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

選択的オートファジーによってインフラマソームを特異的に分解する分子機序を解明し、このメカニズムが機能不全に陥ると心不全の発症および病状進展をきたすかどうかについて検討するため、本研究計画では、以下の研究項目を予定した。

インフラマソーム選択的オートファジーの活性化と心不全の病態の関与について、オートファジーやインフラマソームの機能が欠損した慢性心不全動物モデルを用いて解析する。

インフラマソーム選択的オートファジーにおける鍵分子の同定および機序の解明を行う。

遺伝子改変を施した慢性心不全動物モデルを用いて、インフラマソーム選択的オートファジー制御因子の機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1)心不全マウスモデルにおける検討

マウスに大動脈縮窄術を施して作成した圧負荷モデルマウスを用いた検討を行った。圧負荷モデルマウスは手術直後からクロロキン投与を開始してオートファジーを阻害する群と手術直後からMG132投与を開始してプロテアソームを阻害する群と非投与群に分けた。そして、6週間後に血圧・脈拍・心機能評価を行い屠殺し、心機能の変化についてクロロキン投与群、MG132投与群と非投与群の間で比較・検討を行った。検討内容としては、各群間における心機能や組織学的な変化、またウエスタンブロッティングなどによる分子生物学的検討を行った。その結果、オートファジー阻害群とプロテアソーム阻害群は対照群と比較して有意に心機能が低下し、心筋のダメージや線維化が悪化していた。また、オートファジー阻害群とプロテアソーム阻害群を比較したところ、オートファジー阻害群の方でよりインフラマソームの量や活性が抑制されており、インフラマソームの分解にはユビキチン・プロテアソーム系よりもオートファジーの方がより重要な役割を果たしている可能性を示唆するデータが得られた。

##### (2)in vitro実験による検討

次に、Flag-NLRP3リコンビナントタンパクを各々磁気ビーズが結合した抗Flag抗体と反応させた上で、上記で作成した圧負荷モデル由来の心筋組織抽出液と免疫沈降反応を行ったところ、MARCH7やTRIM20とNLRP3の間に相互作用があることが明らかとなった。shRNA-MARCH7、shRNATRIM20ならびにshRNA-Scrambleをコードしたレンチウイルスを新生仔ラット培養心筋細胞に感染させ、これらの細胞にインフラマソーム活性化剤であるLPSを添加してインフラマソーム活性におよぼすMARCH7やTRIM20の影響について検討したところ、これらの分子をノックダウンした心筋細胞ではインフラマソームの活性が有意に上昇することが明らかとなった。また、MARCH7およびTRIM20をノックダウンした心筋細胞では、選択的オートファジーの活性が低下することも示された。

##### (3) TRIM20ノックアウトマウスの作成

TRIM20のノックアウトマウスをCRISPR/Cas9システムにて作成するため、これらの遺伝子を標的としたguide RNAおよびCas9発現ベクターを構築し、guide RNAおよびCas9発現ベクターの活性確認まで行うことができた。

今後は、このノックアウトマウスを用いた解析を行い、目的達成に向けた実験を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamura Natsuko, Maejima Yasuhiro, Matsumura Takayoshi, Vega Rick B., Amiya Eisuke, Ito Yusuke, Shiheido-Watanabe Yuka, Ashikaga Takashi, Komuro Issei, Kelly Daniel P., Hirao Kenzo, Isobe Mitsuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-Nucleotide Polymorphism of the MLX Gene Is Associated With Takayasu Arteritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.118.002296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yusuke, Maejima Yasuhiro, Tamura Natsuko, Shiheido-Watanabe Yuka, Konishi Masanori, Ashikaga Takashi, Hirao Kenzo, Isobe Mitsuaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Synergistic effects of HMG-CoA reductase inhibitor and angiotensin II receptor blocker on load-induced heart failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 799 ~ 816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maejima Yasuhiro	4. 巻 75
2. 論文標題 The critical roles of protein quality control systems in the pathogenesis of heart failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 219-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2019.09.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maejima Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 SGLT2 Inhibitors Play a Salutary Role in Heart Failure via Modulation of the Mitochondrial Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2019.00186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito Toshiro, Nah Jihoon, Oka Shin-ichi, Mukai Risa, Monden Yoshiya, Maejima Yasuhiro, Ikeda Yoshiyuki, Sciarretta Sebastiano, Liu Tong, Li Hong, Baljinnyam Erdene, Fraidenaich Diego, Fritzy Luke, Zhai Peiyong, Ichinose Shizuko, Isobe Mitsuaki, Hsu Chiao-Po, Kundu Mondira, Sadoshima Junichi	4. 巻 129
2. 論文標題 An alternative mitophagy pathway mediated by Rab9 protects the heart against ischemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 802-819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI122035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasuhiro Maejima, Yuka Shiheido-Watanabe, Natsuko Tamura, Yusuke Ito, Kenzo Hirao, Mitsuaki Isobe.
2. 発表標題 Critical role for dipeptidyl peptidase-4 activity in the pathogenesis of experimental autoimmune myocarditis.
3. 学会等名 Heart Failure Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Maejima.
2. 発表標題 The single nucleotide polymorphism of MLX gene is involved in the development of Takayasu Arteritis.
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Maejima, Shun Nakagama, Yuka Shiheido-Watanabe, Yusuke Ito, Natsuko Tamura, Kenzo Hirao, Mitsuaki Isobe.
2. 発表標題 SGLT2 inhibitor directly protects oxidative stress-mediated cardiomyocyte injury by suppressing mitochondrial damage-mediated apoptosis.
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Maejima.
2. 発表標題 The critical role of protein quality control against heart failure.
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前嶋康浩.
2. 発表標題 血液凝固第X因子による動脈硬化進展作用の機序の解明.
3. 学会等名 第4回Pan-Pacific Primary Angioplasty Conference（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	小西 正則  (Konishi Masanori)  (70792018)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教   (12602)	
研究分担者	磯部 光章  (Isobe Mitsuaki)  (80176263)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師   (12602)	