

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08079

研究課題名(和文)心不全の病態における心筋ネクロトーシスの役割とオートファジーの関連

研究課題名(英文)Cross-talk of cardiomyocyte necroptosis and autophagy in heart failure

研究代表者

三浦 哲嗣(Tetsuji, Miura)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞のネクロトーシスが、慢性心不全の病態に関与している可能性と、その機序にリソソーム制御障害が関与する可能性を検討した。ネクロトーシスを誘導する生物活性物質のスクリーニング、ネクロトーシス誘導シグナルの詳細とそのミトコンドリアならびにリソソーム制御分子への影響を解析するとともに、心不全症例でのシグナル分子発現を免疫染色により解析した。それらの結果から、慢性心不全における心筋細胞のネクロトーシスの機序では、炎症性サイトカインによって起動するシグナルが、細胞膜の障害だけでなくリソソームを制御する転写因子の抑制を介してオートファジーを阻害することが重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性心不全における心筋細胞死は心不全を不可逆的に進行させる原因であり、心筋細胞死の抑制は重症心不全に対する新たな治療の開発に極めて重要である。本研究は、慢性心不全で増加する複数の生物活性物質のうち炎症性サイトカインが心筋細胞のネクロトーシス(プログラム細胞死)を誘導するものとして重要であることと、ネクロトーシスの機序としてこれまで知られていた細胞膜障害に加えリソソーム機能制御の障害が重要であることを示した。この成果は、心筋細胞ネクロトーシス抑制のための治療標的分子に示唆を与えると同時に、細胞死を制御するオルガネラとしてのリソソームの新たな機能を明らかにした意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study examined if necroptosis of cardiomyocytes contributes to progression of chronic heart failure and if dysregulation of lysosomes in autophagy is involved in necroptotic death of cardiomyocytes. Results of experiments using isolated cardiomyocytes indicated that inflammatory cytokines, but not other humoral factors, mainly trigger necroptotic signaling and that there are two mechanisms of necroptotic cell death downstream of the signaling, cell membrane damages and suppression of autophagy via inhibition of a master transcriptional factor of lysosomes, in cardiomyocytes. Involvement of necroptotic signaling in chronic heart failure was supported by results of immunohistochemical analysis of endomyocardial biopsies from patients.

研究分野：循環器内科

キーワード：細胞死 細胞内情報伝達 ネクロトーシス オートファジー

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は、循環器疾患による死亡原因として現在最も重要な疾患であり、これまでその病態は、心筋収縮蛋白の異常、心筋エネルギー代謝の障害、神経体液性調節因子の影響、などの側面から解析されてきた。現在の心不全治療（薬物ならびにデバイス治療）によっても進行性に心不全が増悪して死に至る症例も多い。心筋細胞死は心筋間質の線維化とともに心不全の非可逆的な進行の機序と考えられている。しかし、心不全にともなう心筋細胞死の機序については、アポトーシス以外には十分に検討されておらず、ネクローシスと同様の病理形態を呈するプログラム細胞死の一種であるネクロプトーシスが心不全の病態にどのように寄与しているのかは不明である。細胞保護的に機能するオートファジーが慢性心不全の病態にどのように関与しているのかも十分明らかにされていない。

2. 研究の目的

現在、心筋細胞のネクロプトーシスについての研究報告は少なく、慢性心不全の病態におけるネクロプトーシスの役割は殆ど解明されていない。オートファジーの阻害がネクロプトーシスによる心筋細胞死に寄与していることを見出した我々の既報 (Ogasawara M, et al. J Mol Cell Cardiol. 2017;108:203-213) の研究結果を踏まえ、本研究では「心筋細胞においてネクロプトーシス誘導シグナルがオートファジーを阻害し、オートファジー障害がネクロプトーシス誘導シグナルを増幅するという悪循環が存在し、慢性心不全の進行に寄与している」という作業仮説の検証を目的とした。心筋細胞ネクロプトーシスの機序と心不全の進行への関与を明らかにすることにより、新たな心不全治療薬の開発への手がかりを得ることを目指した。

3. 研究の方法

培養心筋細胞株、ラット単離心筋細胞、慢性心不全患者の心筋生検標本を用いて、以下の解析を行った。

a) 心不全においてネクロプトーシスに関与するリガンドの探索

標準的なネクロプトーシス誘導リガンドとして TNF-alpha が知られているが、他の受容体リガンドも心筋細胞のネクロプトーシスに寄与する可能性がある。培養心筋細胞株である H9c2 細胞とマウスの培養心筋細胞を用い、TNF-alpha + Z-VAD-FMK 処置を positive control として用い、ネクロプトーシス誘導リガンドの候補として、神経体液性因子 (norepinephrine, angiotensin II 他)、酸化ストレス誘導刺激 (hydrogen peroxide)、炎症性サイトカイン (RANKL 他)、DAMPs (high-mobility group box 1) に注目し、それぞれのネクロプトーシス誘導効果を評価した。

b) ネクロプトーシスにおける Ser166/Ser321 リン酸化を介した RIP1 活性制御の解析

TNF-alpha 受容体刺激によって形成される complex 1 (TNF-alpha receptor, TRADD, RIP1, TRAF2, cIAP2) からネクロプトーシスを誘導する necrosome (RIP1, FADD, RIP3, inactive caspase-8) の形成を制御する機序として、RIP1-Ser166/Ser321 リン酸化機構と、caspase-8 の活性抑制機序に焦点を当てて解析した。Necrosome 形成に重要と考えられている RIP1-Ser321 の持続的なリン酸化に関与する分子として、TAK1、TAB2、A20、mTORC1 を想定し、心筋細胞のネクロプトーシス制御での役割を解析した。

c) ネクロプトーシスによるオートファジー阻害の機序の解析：リソソーム膜蛋白ならびにリソソーム制御のマスター転写因子 (TFEB) の解析

オートファゴソームとオートリソソームの癒合に関与する蛋白である Stx17、SNAP29、VAMP7、VAMP8、リソソーム制御のマスター転写因子である TFEB のネクロプトーシス誘導シグナルによる変化を解析した。

d) ネクロプトーシス誘導シグナルによるミトコンドリア生合成の変化

ストレス下の心筋細胞におけるオートファジーの標的として重要なミトコンドリアに対してネクロプトーシス誘導シグナルが及ぼす影響を、ミトコンドリア形態、ミトコンドリアの癒合・分裂を制御する蛋白 (mitofusion 1, mitofusin 2, Drp, Opa-1) の変化ならびに細胞死量の変化から解析した。

e) 不全心筋におけるネクロプトーシス制御シグナル分子の発現と心機能との関連

拡張型心筋症の臨床例を対象に、心筋生検標本におけるネクロプトーシス制御シグナル分子と心機能指標との関連を解析した。

4. 研究成果

心筋細胞におけるネクロプトーシス誘導シグナルの起動は、RIP1-RIP3-p-MLKL シグナルによる細胞死の誘導と同時に、リソソームのマスター転写因子である TFEB の核移行を RIP1 活性依

存性に抑制することによってオートファジーを阻害することが示された。重症慢性心不全症例では、心筋のオートファジー障害や mTORC1 活性の亢進が報告されているが、今回の研究では、mTORC1 の抑制によって、RIP1-Ser166 リン酸化低下だけでなく、活性抑制の機能を有する RIP1-Ser320 のリン酸化が亢進し、RIP1 活性の顕著な低下がもたらされることを初めて見出し、またその結果心筋ネクロプトーシスが抑制されることを観察した。この知見から、TFEB 機能回復を介してオートファジーの回復と細胞死を抑制することが可能であることが示された。

ミトコンドリアへのネクロプトーシス誘導シグナルの影響を解析した結果、mitofusin(Mfn)の発現低下、Drip1 リン酸化によって分裂が亢進することが示唆された。その Mfn 発現の低下は経時的に亢進へと転じ、ミトコンドリア癒合の促進はネクロプトーシスへの耐性を高めたことから、ネクロプトーシス誘導シグナルがオートファジーを阻害する一方で、ミトコンドリア・ダイナミクスを介して心筋細胞の適応を誘導すると考えられた。

ネクロプトーシス誘導リガンドとして、これまで知られている TNF- α 以外の候補として RANKL, TGF- β , HMBG1, 交感神経 α -受容体アゴニスト、活性酸素を対象に、培養心筋細胞におけるネクロプトーシス誘導効果の用量依存性、時間依存性を解析したが、TNF- α 以上の効果を認めたものはなかった。一方、TNF- α によるネクロプトーシス誘導シグナル活性化は、TNF- α mRNA 発現を有意に増加させ、シグナル増幅能があることが示唆された。

拡張型心筋症の心室筋には caspase-8 と p-MLKL の発現が確認され、p-MLKL 発現レベルと細胞内局在は左室機能障害やリモデリングと関連することが示唆された。

本研究の結果から、慢性心不全における心筋細胞死には、TNF-a をリガンドとしたネクロプトーシスが関与しており、その機序には p-MLKL の移行による細胞膜障害に加え TFEB の機能抑制を介したリソソーム機能の抑制がオートファジーを阻害することが重要な役割を有していることが示唆された。拡張型心筋症では mTORC1 活性が亢進し予後と関連することを示した我々既報の成績 (Yano et al. J Mol Cell 2016;91:6-9) と、今回の知見を総括すると、mTORC1、TFEB とミトコンドリア・ダイナミクスが心筋ネクロプトーシス抑制のための新たな治療標的となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugawara Hirohito, Moniwa Norihito, Kuno Atsushi, Ohwada Wataru, Osanami Arata, Shibata Satoru, Kimura Yukishige, Abe Koki, Gocho Yufu, Tanno Masaya, Miura Tetsuji	4. 巻 145
2. 論文標題 Activation of the angiotensin II receptor promotes autophagy in renal proximal tubular cells and affords protection from ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 187 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.12.001	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 Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Miura T, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	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 Igaki Yusuke, Tanno Masaya, Sato Tatsuya, Kouzu Hidemichi, Ogawa Toshifumi, Osanami Arata, Yano Toshiyuki, Kuno Atsushi, Miki Takayuki, Nakamura Takashi, Miura Tetsuji	4. 巻 154
2. 論文標題 Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.01.002	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 Ohwada Wataru, Tanno Masaya, Yano Toshiyuki, Ong Sang-Bing, Abe Koki, Sato Tatsuya, Kuno Atsushi, Miki Takayuki, Sugawara Hirohito, Igaki Yusuke, Miura Tetsuji	4. 巻 1866
2. 論文標題 Distinct intra-mitochondrial localizations of pro-survival kinases and regulation of their functions by DUSP5 and PHLPP-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 165851 ~ 165851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.165851	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 Abe K, Yano T, Tanno M, Miki T, Kuno A, Sato T, Kouzu H, Nakata K, Ohwada W, Kimura Y, Sugawara H, Shibata S, Igaki Y, Ino S, Miura T.	4. 巻 1865
2. 論文標題 mTORC1 Inhibition Attenuates Necroptosis Through RIP1 Inhibition-Mediated TFEB Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis .	6. 最初と最後の頁 165552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.165552.	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 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	4. 巻 119
2. 論文標題 Translational regulation by miR-301b upregulates AMP deaminase in diabetic hearts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 138-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2018.05.003	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 Mizuno M, Kuno A, Yano T, Miki T, Oshima H, Sato T, Nakata K, Kimura Y, Tanno M, Miura T	4. 巻 6
2. 論文標題 Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13741	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 Yano T, Abe K, Tanno M, Miki T, Kuno A, Miura T, Steenbergen C.	4. 巻 23
2. 論文標題 Does p53 Inhibition Suppress Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 350-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1074248418763612	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsuji Miura
2. 発表標題 Alterations in Mitochondrial Function by SGLT2 Inhibitors
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kouzu H, Katano S, Yano T, Ohori K, Honma S, Shimomura K, Inoue T, Takamura Y, Takahashi R, Nishikawa R, Nagano N, Koyama M, Fujito T, Hashimoto A, Miura T.
2. 発表標題 Plasma valine-to-glycine ratio is a novel prognostic maker for adverse events in patients with heart failure.
3. 学会等名 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujita Y, Yano T, Nagano N, Nishikawa R, Kamiyama N, Fujito T, Mochizuki A, Koyama M, Kouzu H, Muranaka A, Nagahara D, Tanno M, Miki T, Miura T.
2. 発表標題 Phosphorylated MLKL, an Executor of Necroptosis, Localized in the Nucleus and Intercalated Disc Plays Distinct Roles in Nonischemic Dilated Cardiomyopathy.
3. 学会等名 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuji Miura
2. 発表標題 Cardioprotection-Autophagy and Mitochondrial Signaling pathways in cardioprotection
3. 学会等名 2019 XXIII ISHR World Congress, Beijing, China.
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Fujita Y, Yano T, Abe K, Nagano N, Kamiyama N, Fujito T, Mochizuki A, Koyama M, Kouzu H, Muranaka A, Nagahara D, Tanno M, Miki T, Miura T
2 . 発表標題 Activation of necroptotic pathway by downregulated caspase-8 expression is associated with progression of left ventricular remodeling in nonischemic dilated cardiomyopathy.
3 . 学会等名 ESC congress 2019. Paris, France.
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Abe K, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Mizuno M, Miura T.
2 . 発表標題 mTORC1 inhibition suppresses necroptosis through restoration of autophagic flux by inhibitory phosphorylation of RIP1 in cardiomyocytes.
3 . 学会等名 European Society of Cardiology Congress (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Abe K, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Miura T.
2 . 発表標題 Inhibition of mTORC1 suppresses necroptosis of cardiomyocytes in a p70S6K-independent mechanism by suppression of p62-RIP1 interaction.
3 . 学会等名 日本循環器学会学術集会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yano T, Abe K, Ogasawara M, Kuno A, Tanno M, Miki T, Miura T.
2 . 発表標題 Crosstalk between Aberrant mTORC1 Activation and Necroptotic Pathway: a Novel Therapeutic Target in Ischemic Heart Disease
3 . 学会等名 日本循環器学会学術集会
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe K, Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Miura T.
2. 発表標題 mTORC1 suppresses cardiomyocyte necroptosis through autophagy and RIP1 inhibition
3. 学会等名 日本循環器学会基礎医学フォーラム
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	三木 隆幸 (MIKI Takayuki) (00336405)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	丹野 雅也 (TANNO Masaya) (00398322)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	矢野 俊之 (YANO Toshiyuki) (40444913)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------