

機関番号：34517

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790101

研究課題名（和文） オートファジーを伴う非アポトーシス型細胞死の分子機構と病態における機能的意義

研究課題名（英文） Molecular regulation of non-apoptotic programmed cell death in pathological process

研究代表者

中瀬 朋夏（高谷朋夏）（TAKATANI-NAKASE TOMOKA）

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：40434807

研究成果の概要（和文）：病態形成に関与する細胞死にはアポトーシスが重要な役割を担うと考えられている。一方、アポトーシスだけでは説明のつかない現象も多数報告され、細胞死を標的とした創薬・治療法の開発において、非アポトーシス型細胞死の存在は無視できない。本研究では、虚血心筋において、Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)の活性増加を伴う Caspase 非依存性非アポトーシス型細胞死機構を明らかにした。さらに、ニューロペプチド Urocortin とペプチドホルモン Leptin の非アポトーシス型細胞死に対する抑制効果を見出した。一方、虚血心筋細胞死の過程において、オートファジー機構は、グルコース濃度に応答して虚血ストレスの回避に重要な役割を果たしており、17-β-estradiol の抗アポトーシス効果発揮に必要である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Non-apoptotic cell death in ischemic heart disease is considered to be one of the important therapeutic targets, however, the detailed mechanisms of this cell death process is not clear. In this study, we found that hypoxic myocyte death was independent of caspases and involved with calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>). The potent cardioprotective corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin and peptide hormone leptin suppress caspase-independent, non-apoptotic death in myocytes exposed to ischemia. On the other hand, autophagy prevents ischemic injury dependent on glucose concentration and is required for cardioprotective activity of 17-β-estradiol.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞死、オートファジー、アポトーシス、心筋、虚血

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患の基礎病態は心筋細胞死であるが、虚血による細胞死の分子機序について未だに詳細は不明である。これまで、研究

代表者は、病態形成に関与する細胞死にはアポトーシスが重要な役割を担うことを報告し、アポトーシス関連分子を標的とした治療への応用が注目されている。一方、アポトー

シスだけでは説明のつかない現象も多数存在し、非アポトーシス型細胞死の存在は無視できない。近年、ある種の神経疾患や心疾患による細胞死において、明らかにアポトーシスやネクローシスの場合とは異なった、細胞質に多数の特徴的なオートファゴソームを形成するオートファジーを伴った細胞死の亢進を認めるタイプ2細胞死が注目されている。研究代表者も、虚血誘発心筋細胞死において、オートファゴソームの出現を確認している。しかし、細胞内分解系機構の一つであるオートファジーが細胞死において何らかの役割を果たしていることが推測されるものの、分子機構はもとより、機能的意義についてもほとんど明らかにされていない。オートファゴソーム形成の分子機構については、出芽酵母変異体の遺伝子学的・形態学的解析から、オートファジー関連遺伝子(ATG遺伝子)にコードされる Atg タンパク質の作用が複雑に絡み合うことにより引き起こされ、ダイナミックな膜動態を伴う過程であることが明らかになりつつある。これは、オートファジーを伴う細胞死の場合、既知の輸送システムとは様々な点で異なる、細胞死シグナル伝達とリンクした新規の膜動態によるオートファジー制御機構が関与する可能性が考えられる。さらに、近年、酵母で同定されたオートファゴソーム形成遺伝子をノックアウトしたマウスの解析から神経変性疾患や心疾患との関連が解析され、オートファジーが病態形成に重要であることが示唆された。しかし、オートファジーと細胞死を結びつけるシグナル伝達経路やオルガネラを介した細胞内ネットワークを同定するまでには至っていない。研究代表者は、これまで、非アポトーシス型細胞死関連遺伝子のスクリーニングに関する研究に携わり、オートファジーを伴った虚血心筋細胞死において、既知のアポトーシス誘導シグナル伝達以外のシグナル経路が存在する可能性を見いだした(平成18、19年度若手研究スタートアップ)。これは、細胞死におけるオートファジーの過程は厳密に制御されていることを予測させ、その制御因子の同定は、虚血誘発細胞死機構におけるオートファジーの機能的意義を提唱し、細胞死過程において細胞の運命を決定する重大な分子機構の存在を明らかにすると考える。さらに、同定した制御分子の動態と疾患への寄与を評価することで、

非アポトーシス型細胞死の病因的役割を明らかにできるものとする。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、細胞死制御による治療ストラテジーを構築するには、アポトーシスと非アポトーシス細胞死の両者を視野に入れ、疾患をより詳細に解明する必要があると考える。アポトーシスに関しては、分子機構の全体像やその病理的意義が解明されつつある一方、非アポトーシス型細胞死に関しては上記のように未知の部分が多い。本研究では、非アポトーシス型細胞死を制御する因子の解析を行い、新たな細胞死機構とオートファジーの機能的意義を明らかにし、非アポトーシス型細胞死を標的とした細胞死保護薬の作用機構を解明することを目的とした。まず、オートファゴソームの出現を確認している虚血誘発心筋細胞死について、(1)オートファジーの誘導と細胞死を結びつける因子に関する検討ならびに病態モデルを用いた非アポトーシス型細胞死を抑制できる心筋保護薬の探索、および(2)細胞内のダイナミックな膜動態と(1)で明らかとなった新規分子の細胞内局在を可視化する系を確立し、新規分子について、細胞内局在と機能から、非アポトーシス型細胞死機構におけるオルガネラを介した細胞内ネットワークや膜動態との関わりや相互作用するタンパク質・脂質の両面からの機能解析により明らかにすることとした。本報告書では、(1)を中心に結果を述べる。

## 3. 研究の方法

虚血による細胞死は、ATPのレベル低下によるエネルギー代謝の障害が主な原因である。本研究では、生物にとって重要なエネルギー源であり、生体のエネルギー状態を伝えるシグナル分子として重要な働きをしているグルコースに焦点を当て、低酸素条件下、培地中グルコースの濃度変化による細胞死のタイプとオートファジー誘導への影響を評価し、虚血心筋細胞の細胞死機構におけるオートファジーの誘導意義について検討した。

### 1) 細胞培養

心筋細胞は、生後1日目の新生児ラットから酵素法により調製し、培養には5%仔牛血清を含むDMEM/F12培地を用いた。ヒト乳

がん株細胞 MCF-7 は、10%牛胎児血清を含む MEM 培地で培養した。

## 2) 虚血処置

新生児ラット由来心筋細胞をアネロパックによる低酸素条件下、各種グルコース濃度で 6 から 48 時間培養することにより、細胞死を誘導した。

## 3) 細胞死の解析

アポトーシス阻害剤には 100 $\mu$ M zVAD-fmk を、オートファジー阻害剤には 10mM 3-methyl adenine を用いた。核の形態変化は Hoechst33342 による可視化により観察し、アポトーシスは、ウエスタンブロットによる Caspase-3 活性化体の検出と DNA ラダーにより解析した。細胞生存率は MTT assay により測定し、細胞障害性は、Propidium iodide の取り込みと LDH assay により評価した。

## 4) オートファジーの検出

オートファジーの形成に重要な役割を果たしているオートファジーマーカー蛋白質 LC3 をウエスタンブロットにより検出した。また、LC3 の局在を観察するため、GFP-LC3 を遺伝子導入し、GFP-LC3 の細胞内局在を指標にオートファジー細胞の出現率を測定した。

## 5) 心筋保護薬の検討

Urocortin (10nM) と Leptin (6nM) は、虚血処置前に 1 時間投与し、17- $\beta$ -estradiol (10nM) は、虚血処置同時投与することで、細胞死を評価した。

## 4. 研究成果

### 虚血心筋における Caspase 非依存性非アポトーシス型細胞死

低酸素条件下、培地中のグルコースと血清を欠乏させて、虚血誘発細胞死について解析したところ、オートファジーは誘発されず、虚血 6 時間後からクロマチンはいびつに凝縮し、塊状化した著しい核の収縮が観察された。この核収縮反応では、アポトーシス時に見られる核やクロマチンの分割は起こらないことを確認した。また、アポトーシスによる核の形態変化は、Caspase inhibitor により完全に抑制されるのに対し、虚血誘発核収縮は全

く影響を受けなかった。これらのことから、グルコースと血清欠乏による虚血誘発心筋細胞死は Caspase 非依存性非アポトーシス型細胞死であることが明らかとなった。Caspase 非依存性非アポトーシス型細胞死のメカニズムの詳細は不明であるが、核収縮因子として iPLA<sub>2</sub> (Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>) が同定されている。本虚血誘発非アポトーシス型細胞死においても iPLA<sub>2</sub> の発現量と活性が増加した。さらに、iPLA<sub>2</sub> 阻害剤を添加すると、iPLA<sub>2</sub> の活性低下とともに、核の収縮は著明に抑制された。以上のことから、虚血心筋において、iPLA<sub>2</sub> の発現増加を伴う Caspase 非依存性非アポトーシス型の新規細胞死機構を明らかにした。

### Caspase 非依存性非アポトーシス型細胞死に対する心筋保護薬の効果

ニューロペプチド Urocortin は、アポトーシスの抑制を介して虚血心筋を保護することが報告されているが、非アポトーシス型細胞死への影響については検討されていない。そこで、Urocortin が、非アポトーシス型細胞死を抑制するか否かを検討した。Urocortin (10nM) を虚血処置前 1 時間投与したところ、虚血誘発核収縮は消失し、LDH の遊離を有意に抑制した。さらに、この細胞死抑制の機序として、Urocortin 前投与による iPLA<sub>2</sub> の活性抑制作用を見出し、非アポトーシス型心筋細胞死を回避できることを明らかとした。また、Leptin についても同様の処置により、iPLA<sub>2</sub> の発現・活性抑制を介した非アポトーシス型心筋細胞死の抑制作用が示された。

### 虚血心筋におけるオートファジーを伴う細胞死

培地中のグルコース濃度に依存して、虚血 24 時間後からアポトーシスと Beclin-1 を介したオートファゴソームの形成増加が観察された。Caspase 阻害剤 zVAD-fmk を処置しておくことでオートファジーの誘導が促進するとともに虚血障害を抑制したが、オートファジーの阻害により、アポトーシス型細胞死の亢進が観察された。MCF-7 においても、高グルコース負荷によりオートファジーの誘導を介して虚血耐性能を獲得することを確認した。このことから、虚血におけるオートファジーの誘導は培地中グルコース濃度に応答し、虚血スト

レスの回避に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、上記の条件下において、オートファゴソームの形成は、Caspaseに依存しないことが明らかとなり、既知のアポトーシス誘導シグナル伝達以外の経路が存在する可能性も示唆された。

#### 17-β-estradiolの抗アポトーシス作用に対するオートファジー機構の関わり

17-β-estradiolは、循環器疾患の予防・治療において、有益な役割を果たすことが知られているが、詳細は不明である。特に、虚血心筋における保護作用については、アポトーシスの抑制が関わっていることが報告されているが、その機序については、未知の部分が多い。虚血誘発心筋細胞死においては、上記に示したようにアポトーシスだけでなく、オートファジーを伴うことから、17-β-estradiolの抗アポトーシス作用とオートファジー機構の関連を検討した。17-β-estradiol (10nM)を処置したところ、虚血 24 時間後、アポトーシスを著しく抑制し、虚血障害を改善した。しかし、オートファジーを減弱した状態では、17-β-estradiolの抗アポトーシス効果は消失し、アポトーシスの亢進が観察された。このことから、17-β-estradiolの抗アポトーシス作用には、オートファジーの制御が関与している可能性が示唆された。

本研究において、グルコース応答性の変化がオートファジー誘導の一因として関与している可能性を示し、虚血心筋における新規細胞死機構と、それを抑制する Urocortin、Leptin、17-β-estradiolの新たな心筋保護効果発現機序を見出した。現在、オートファジー誘導による細胞死抑制に関わる分子の同定及び、虚血心筋細胞死機構の関連性を詳細に検討している。以上の結果は、非アポトーシス型細胞死を標的とした心筋保護が可能であることを示し、疾患の診断や疾患治療のための薬剤の開発に対する重要な知見となりうると強く考えられる。

#### 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 5 件)

1. Tomoka Takatani-Nakase, Koichi Takahashi. Cardioprotective activity of urocortin by

preventing caspase-independent, non-apoptotic death in cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to ischemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2010) 402, 216-221. (査読あり)

2. Tomoka Takatani-Nakase, Koichi Takahashi. Urocortin prevents caspase-independent, non-apoptotic death in cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to ischemia. *Journal of the Society of Japanese Women Scientists* (2010) 11, 75. (査読あり)

3. Koichi Takahashi, Megumi Komai, Natsumi Kinoshita, Emi Nakamura, Xiao-Long Hou, Tomoka Takatani-Nakase and Masaya Kawase. Application of hydrotropy to transdermal formulations: hydrotropic solubilization of polyol fatty acid monoesters in water and enhancement effect on skin permeation of 5-FU. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (in press). (査読あり)

4. Xiao-Long Hou, Emi Hayashi, Tomoka Takatani-Nakase, Ken Tanaka, Kyoko Takahashi, Katsuko Komatsu and Koichi Takahashi. Curdione Plays an Important Role in the Inhibitory Effect of Curcuma aromatica on CYP3A4 in Caco-2 Cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (in press). (査読あり)

5. Ikuhiko Nakase, Byron Gallis, Tomoka Takatani-Nakase, Steve Oh, Eric Lacoste, Narendra P. Singh, David R. Goodlett, Seigo Tanaka, Shiroh Futaki, Henry Lai and Tomikazu Sasaki. Transferrin Receptor-Dependent Cytotoxicity of Artemisinin-Transferrin Conjugates on Prostate Cancer Cells and Induction of Apoptosis. *Cancer Letters* 274 (2009) 290-298. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. 虚血心筋障害に対する新たな治療標的としての非アポトーシス型細胞死

中瀬朋夏、高橋幸一

日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 28-31 日、静岡)

2. 糖尿病の病態に起因する腎プロスタグランジントランスポーターの発現変動

山口実希、中瀬朋夏、林和行、西浦昭雄、高橋幸一

日本薬学会第 131 年会 (2011 年 3 月 28-31 日、

静岡)

3. ハイドロトロピーを利用した経皮吸収製剤の経皮ワクチンデリバリーへの応用  
樹下彩香、中瀬朋夏、徳山恵利香、西村恵、高橋幸一

日本薬学会第131年会 (2011年3月28-31日、静岡)

4. Urocortin suppresses caspase-independent, non-apoptotic death on cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to ischemia.

Tomoka Takatani-Nakase, Koichi Takahashi

第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2010年11月27日、東京大学)

5. Urocortin prevents caspase-independent, non-apoptotic death in cultured neonatal rat cardiomyocytes exposed to ischemia.

Tomoka Takatani-Nakase, Koichi Takahashi

日本女性科学者の会 (2010年10月30日、仙台)

6. 非アポトーシス型細胞死の抑制作用を指標とした新規虚血心筋保護薬の探索

中瀬朋夏、富田奈津子、西田京子、賀来あかね、高橋幸一

医療薬学フォーラム2009第17回クリニカルファーマシーシンポジウム (2010年7月11日、京都)

7. 非アポトーシス型細胞死機構の制御を治療標的とした虚血心筋保護薬の有効性

中瀬朋夏、高橋幸一

日本薬学会第130年会 (2010年3月28-30日、岡山)

8. 黄金由来配糖体成分 baicalin の小腸CYP3Aへの影響

侯曉瓏、文加奈、中村江美、中瀬朋夏、高橋幸一

日本薬学会第130年会 (2010年3月28-30日、岡山)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中瀬 朋夏 (高谷朋夏)

(TAKATANI-NAKASE TOMOKA)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：40434807