

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K08035

研究課題名（和文）心筋細胞ネクロプトーシスを制御する細胞内シグナル系の解明

研究課題名（英文）Intracellular signal transduction regulating necroptosis of cardiomyocytes

研究代表者

三浦 哲嗣（Miura, Tetsuji）

札幌医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：90199951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞においてネクロプトーシス・シグナルの起動は、従来知られていた細胞膜上のMLKLオリゴマーを介した細胞死のほかに、核に蓄積したリン酸化MLKLを介したRIP1/RIP3非依存性の細胞死の機序が存在することが明らかとなった。また、慢性心不全の慢性的ストレス下で活性化されるネクロプトーシス・シグナルは、リン酸化MLKLの介在板移行を誘導し、伝導障害や収縮機能障害の増悪を惹起していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、核に移行したリン酸化MLKLを介した新たなネクロプトーシスの機序が明らかにされ、慢性心不全の病態で特徴的に加わる介在板リン酸化MLKL発現亢進の障害性も示された。さらにそうしたMLKLを介した心筋障害の抑制にはRIP1/RIP3の阻害では不十分であり、MLKLを直接標的とした治療が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that phosphorylated MLKL (p-MLKL) translocated to nuclei by activation of necroptotic signals mediate cell death via a RIP1/RIP3-independent mechanism, while disruption of the cell membrane by p-MLKL translocated to the membrane occurs a RIP1 and/or RIP3-dependent mechanisms. In chronic heart failure, p-MLKL was found to additionally translocate to intercalated discs, where it may play a role in conduction and contraction abnormalities.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 細胞死 ネクロプトーシス

## 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国内外ともに最も重要な疾患である。しかし、慢性心不全の進行を止めることは未だ困難であり、その主な原因として心筋細胞死がある。心筋細胞死の機序としてアポトーシスが従来重視されてきた。しかし、近年の臨床病理学的研究では重症心不全症例での心筋細胞死はネクローシスの形態を呈する心筋細胞死がアポトーシスよりもはるかに多いことが報告されている。我々はそうした心筋細胞死が、ネクローシスと同様の形態を呈するプログラム細胞死のネクロプトーシスである可能性を考え、解析を進めてきた。これまでにネクロプトーシスとネクローシスにおけるミトコンドリア透過性遷移の役割の違い、ネクロプトーシスとオートファジーとのクロストークなどを明らかにして報告してきた。さらに、拡張型心筋症(DCM)症例の心筋生検標本の予備的な解析では、ネクロプトーシス・シグナルで重要な役割を担うリン酸化 MLKL (mixed lineage kinase domain-like) の細胞内分布と心筋病態との関連が示唆された。ネクロプトーシスにおける MLKL の機能としては、細胞膜移行のほかに核への移行の意義についての研究が心筋細胞以外の細胞について報告が散見されるのみで、心筋細胞に特徴的な構造である介在板への MLKL 移行に関する報告はなかった。

## 2. 研究の目的

心筋細胞ではこの細胞種に特徴的な構造である介在板の構成蛋白が、ネクロプトーシス・シグナルの制御に関与すると同時にネクロプトーシス・シグナルによって障害をうける場として慢性心不全の進行に寄与している可能性を考え、心筋細胞のネクロプトーシス制御シグナルを、リン酸化 MLKL の細胞内移行と介在板構成蛋白との関連に焦点を当てて解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 慢性心不全の進行と関連するリン酸化 MLKL 細胞内移行の解析

DCM から得た心室筋生検サンプル、正常心筋の剖検サンプル、DCM のモデル動物であるサルコグリカン(DSG)欠損マウスの心筋を用い、心筋細胞におけるリン酸化 MLKL の発現レベルとその分布を免疫組織化学的に評価し、心エコーで計測した左室機能ならびに心事故との関連を解析した。

### (2) 心筋ネクロプトーシスにおける MLKL 核移行の機序と意義の解析

ラット心筋細胞株である H9c2 細胞と変異 MLKL を用い、ネクロプトーシス・シグナル活性化による MLKL の核移行の機序と意義を解析した。ネクロプトーシス・シグナルの活性化ならびにその修飾は各シグナル蛋白のウエスタンブロット、細胞死は培養液中への LDH 逸脱量で測定した。MLKL の核移行シグナル、核外移行シグナルの領域を推測し、それぞれに対して3種の変異 MLKL を作成してネクロプトーシスへの影響を解析した。また、Ran-GTP/importin 経路による輸送の阻害に GppNhp を用いた。

### (3) 慢性心不全における MLKL の介在板移行と心機能障害との関連の解析

DSG 欠損マウス、亜急性心不全モデルであるドキシソルピシン心筋障害マウスを用い、介在板蛋白であるデスミン、カドヘリンの発現の変化とネクロプトーシス・シグナル蛋白である RIP1、RIP3 発現との関連を免疫組織学的に解析した。入手可能な複数の抗 RIP1 抗体、抗 RIP3 抗体の特異性について、マウス臓器のライセートならびに熱ショック後のマウス細胞のウエスタンブロットで評価を行い、最適なものを選択した。

## 4. 研究成果

DCM 臨床例と同様に DSG 欠損マウスでは、リン酸化 MLKL の増加が、細胞質のほかに核、介在板に認められ、核のリン酸化 MLKL 発現レベルは左室拡張機能障害ならびに予後と関連することが示された。一方、介在板におけるリン酸化 MLKL 発現レベルは左室壁厚の減少と関連し、細胞死ならびに左室リモデリングへの関与が示唆された。

H9c2 細胞を用いた検討では、ネクロプトーシス・シグナル起動によってリン酸化 MLKL は経時

的に核に Ran/importin 経路を介して移行し、その核移行は RIP1 活性依存性であること、MLKL の核外移行シグナルは 280-284 アミノ酸領域に存在し、この領域の変異によって核内リン酸化 MLKL レベルは上昇し、細胞死が増加することを明らかにした。この核内リン酸化 MLKL による細胞死は、RIP1、RIP3 のいずれの活性にも依存しておらず、細胞膜障害を誘導する細胞質リン酸化 MLKL とは独立した機序であることが示された。

介在板のリン酸化 MLKL は、DCM 臨床例と同様に DSG 欠損マウスでそのレベル亢進が認められ、介在板構造の障害への関与が示唆された。また、介在板でのカドヘリン発現の亢進と形態の変化が観察され、心筋細胞間の伝導障害に寄与することが示唆された。ドキソルピシンで誘発の亜急性心不全モデルではリン酸化 MLKL の介在板移行が見られなかったが、MLKL が直接的に左室収縮障害に関与することが MLKL ノックアウトマウスでの成績から明らかにされた。ラット心筋ならびにラット心筋由来である H9c2 細胞とは異なり、マウスの心筋細胞では RIP1 蛋白の発現は極めて低く、MLKL リン酸化は RIP1 非依存性の RIP3 活性化によって誘導されるというこの動物種の特徴が見いだされた。

以上の結果から、心筋細胞においてネクロプロトシス・シグナルの起動は、従来知られていた細胞膜上の MLKL オリゴマーを介した細胞死のほかに、核に蓄積したリン酸化 MLKL を介した RIP1/RIP3 非依存性の細胞死の機序が存在し、さらに細胞死を介さない収縮機能障害をも誘導する可能性がある。また、慢性心不全の慢性的ストレス下では、リン酸化 MLKL の介在板移行が加わり、伝導障害や収縮機能障害の増悪を惹起していると考えられた。これらの知見は、ネクロプロトシスの抑制には RIP1/RIP3 の阻害では不十分であり MLKL を直接標的とした治療が必要であることを支持するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Fujita Y, Yano T, Kanamori H, Nagahara D, Muranaka A, Kouzu H, Mochizuki A, Koyama M, Nagano N, Fujito T, Nishikawa R, Kamiyama N, Tanaka M, Kuno A, Tanno M, Miura T	4. 巻 9
2. 論文標題 Enhanced nuclear localization of phosphorylated MLKL predicts adverse events in patients with dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 3435-3451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.14059	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 Ino S, Yano T, Kuno A, Tanno M, Kouzu H, Sato T, Yamashita T, Ohwada W, Osanami A, Ogawa T, Toda Y, Shimizu M, Miura T.	4. 巻 151
2. 論文標題 Nuclear translocation of MLKL enhances necroptosis by a RIP1/RIP3-independent mechanism in H9c2 cardiomyoblasts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 134-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.12.009.	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 Shibata S, Moniwa N, Kuno A, Kimura A, Ohwada W, Sugawara H, Gocho Y, Tanaka M, Yano T, Furuhashi M, Tanno M, Miki T, Miura T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Involvement of necroptosis in contrast-induced nephropathy in a rat CKD model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 708-717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02048-1	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 Miura T, Kuno A, Tanaka M.	4. 巻 322
2. 論文標題 Diabetes modulation of the myocardial infarction-acute kidney injury axis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol	6. 最初と最後の頁 H394-H405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00639.2021	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 Miura T, Sato T, Yano T, Takaguri A, Miki T, Tohse N, Nishizawa K.	4. 巻 36
2. 論文標題 Role of Erythropoiesis-Stimulating Agents in Cardiovascular Protection in CKD Patients: Reappraisal of Their Impact and Mechanisms.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cardiovasc Drugs Ther.	6. 最初と最後の頁 1175-1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10557-022-07321-3	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 Miura Tetsuji, Kouzu Hidemichi, Tanno Masaya, Tatekoshi Yuki, Kuno Atsushi	4. 巻 479
2. 論文標題 Role of AMP deaminase in diabetic cardiomyopathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	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) 10.1007/s11010-024-04951-z	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yano T, Fujita Y, Ino S, Ohwada W, Kouzu H, Kuno A, Tanno M, Furuhashi M, Miura T.
2. 発表標題 Enhanced nuclear localization of MLKL promotes necroptosis of cardiomyocytes and predicts prognosis in dilated cardiomyopathy.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miura T
2. 発表標題 mTORC and cardiomyocyte necroptosis
3. 学会等名 International Society for Heart Research World Congress 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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	丹野 雅也  (Tanno Masaya)  (00398322)	札幌医科大学・保健医療学部・教授   (20101)	
研究 分担者	矢野 俊之  (Yano Toshiyuki)  (40444913)	札幌医科大学・医学部・准教授   (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
---------	---------