

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461133

研究課題名(和文) 心筋細胞のネクロプトーシスにおけるミトコンドリア透過性遷移の役割

研究課題名(英文) Role of mitochondrial permeability transition in necroptosis of the cardiomyocyte

研究代表者

三浦 哲嗣 (Miura, Tetsuji)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞において、ネクローシスとは大きく異なり、ネクロプトーシスではミトコンドリア透過性遷移(MPT)が直接的な心筋細胞死の機序として大きな役割を担っていないが、MPTとも関連するオートファジーがネクロプトーシスシグナルにより修飾され、ネクロプトーシスの一部はオートファジー抑制によるものであることが明らかとなった。また、ネクロプトーシスがオートファジーを抑制する機序として、p62-RIP1結合の増加によりp62とLC3-IIの結合が減少すること、またオートファゴソームとリソソームとの融合が阻害されることが重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, in contrast to its role in necrosis, mitochondrial permeability transition (MPT) does not directly trigger cell death in necroptosis of cardiomyocytes and that necroptotic signals significantly inhibit autophagy, which is potentially modulated by MPT, leading to exaggeration of necroptotic cardiomyocyte death. Sequestration of p62 from p62-LC3-II interaction by increased p62-RIP1 interaction and inhibition of fusion of autophagosomes with lysosomes were proposed to be mechanisms by which necroptotic signals inhibits autophagy.

研究分野：循環器病学

キーワード：mitochondria cell death necroptosis autophagy signal transduction

1. 研究開始当初の背景

従来、細胞死は受動的あるいは事後的な細胞死 (accidental cell death) であるネクローシス (necrosis) と能動的あるいはプログラムされた細胞死であるアポトーシス (apoptosis) に分類され、両者には形態的にも大きな違いがあることが示されていた。しかし近年、アポトーシスのように細胞内シグナルによってプログラム化されているがネクローシスの形態をとる細胞死が存在することが明らかになり、ネクロプトシス (necroptosis) と呼ばれている。心筋梗塞や心不全における心筋細胞死にはネクローシス、アポトーシスがそれぞれの程度関与しているのかについて、これまで数多くの研究がなされてきたにも関わらず未だ確立した答えが得られていないが、その理由としてネクロプトシスの評価がされていなかったことが挙げられる。

我々は、これまでネクローシスの機序として重要なミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore [mPTP]) の開口に注目し、心筋細胞における mPTP の制御機構を蛋白キナーゼ、特に glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) に焦点を当てて解析を進めてきた。ネクロプトシスにはアポトーシスと共通した細胞内シグナルの起動があり、またネクローシスと共通して細胞内 ATP の減少が寄与することから、mPTP がネクロプトシスに大きく関与している可能性が考えられる。また、蛋白質管理ならびにエネルギー代謝のための分子リサイクルに重要なオートファジー (autophagy) が注目され始めていたがネクロプトシスとの関連についての報告はなかった。

2. 研究の目的

(1) 近年新たに同定された細胞死の基本的機序であるネクロプトシス (necroptosis) において、ネクローシス (necrosis) の機序として注目されてきた mPTP の開口がどのような役割を有するかを心筋細胞を対象として解明すること、(2) ネクロプトシスシグナルとオートファジーとの関連を解析しその関連に焦点を当てて解析し、新たな心筋保護法への手がかりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養心筋細胞 (H9c2 細胞) を用い、TNF- α /zVAD 処置によりネクロプトシスを誘導し、mPTP 開口とネクロプトシスとの関連、ネクロプトシスに関与するシグナル分子の解析を行った。

(2) 培養心筋細胞にネクロプトシスを誘導した際のオートファジーへの影響を、オートファジー制御蛋白の発現、オートファゴソーム、オートリソソームの可視化 (tandem RFP-GFP-LC3 protein)、により解析した。

(3) ラットの冠動脈閉塞再灌流により心筋梗塞を作成し、心筋梗塞領域における mPTP 制御蛋白、ネクロプトーシス制御蛋白ならびにオートファジー制御蛋白の相互関連を解析した。

4. 研究成果

(1) TNF- α /zVAD 処置により誘導した心筋細胞のネクロプトーシスは、mPTP の直接的阻害薬である cyclosporine A, sangliferin A によって抑制されず、また mPTP 開口を促進する GSK-3 β に対する 3 種類の阻害薬 SB216763, lithium chloride, and AR-A014418)、さらには p38MAPK 阻害薬 (SB203580) のいずれにもネクロプトーシスの抑制効果が見られなかった。これらのことから、mPTP は心筋細胞のネクローシスとは異なりネクロプトーシスでは直接的な細胞死誘導に寄与していないと考えられた。

(2) 心筋細胞のネクロプトーシス誘導は、LC3-II の蓄積、オートファゴソームからオートリソソームへの変換の障害、またオートファゴソームと LAMP2 の共局在の抑制を伴っていた。ネクロプトーシス誘導によるオートファジー障害は、オートファジー阻害薬の追加によってさらに増悪することではなく、一方オートファジー促進薬である rapamycin 処理によりネクロプトーシスによる細胞死が軽減することが観察された。さらに、その rapamycin の効果は Atg5 のノックダウンによって減弱したことから、オートファジー促進を介したものであることが確認された。ネクロプトーシスがオートファジーを抑制する機序についての解析では、オートファジー制御の主要なシグナル分子である Akt, p70s6K, AMPK, ULK1, Akt のリン酸化に変化がみられず、一方、LC3-II と p62 の結合が減少し、それと同時に p62-RIP1 結合の増加が認められた。さらに rapamycin は p62-RIP1 結合を抑制していた。以上の成績から、ネクロプトーシスの誘導は p62-RIP1 結合によって p62-LC3-II 相互作用が減少し、その結果オートファジーの抑制をもたらす細胞死を増悪していることが示唆された。

(3) ラットの急性心筋梗塞モデルを用い、心筋梗塞サイズの規定因子として再灌流時の Akt 活性化レベルが重要であること、またこの in vivo のネクロプトーシス誘導モデルにおいても p62-LC3-II 相互作用が再灌流後に有意に増加していることが確認された。

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4件)

1. 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 contributes to enlargement of infarct size by chronic kidney disease. Basic Res Cardiol. 2017 May;112(3):31 (査読あり).
2. 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 Receptor Ligand Prevents Chronic Kidney Disease-Induced Enlargement of Myocardial Infarct Size. Hypertension. 2016 Sept;68(3):697-706 (査読あり).
3. Cabrera-Fuentes HA, Aragonés J, Bernhagen J, Boening A, Boisvert WA, Bøtker HE, Bulluck H, Cook S, Di Lisa F, Engel FB, Engelmann B, Ferrazzi F, Ferdinandy P, Fong A, Fleming I, Gnaiger E, Hernández-Reséndiz S, Kalkhoran SB, Kim MH, Lecour S, Liehn EA, Marber MS, Mayr M, Miura T, Ong SB, Peter K, Sedding D, Singh MK, Suleiman MS, Schnittler HJ, Schulz R, Shim W, Tello D, Vogel CW, Walker M, Li QO, Yellon DM, Hausenloy DJ, Preissner KT. From basic mechanisms to clinical applications in heart protection, new players in cardiovascular diseases and cardiac theranostics: meeting report from the third international symposium on "New frontiers in cardiovascular research". Basic Res Cardiol. 2016 Nov.;111(6):69 (査読あり).
4. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Cabrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inzerle J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. Basic Res Cardiol. 2016 Nov.;111(6):70 (査読あり).

〔学会発表〕(計3件)

1. Yano T, Ogasawara M, Miki T, Tanno M, Kuno A, Nishizawa K, Owada W, Mizuno M, Sugawara H, Tatekoshi Y, Nakata K, Ishikawa S, Miura T. Sequestration of p62 by RIP1 promotes necroptosis through suppression of autophagic flux in cardiomyocytes; a novel cross-talk between autophagy and necroptosis. European Society of Cardiology Congress 2016, Rome, Italy, Aug 27-31, 2016
2. Miura T. Role of mitochondria in cell death. The mPTP and its regulatory kinases in cardioprotection. XXII ISHR World Congress, Buenos Aires, Argentina, April 18-21, 2016
3. Miura T. Diabetes and cardioprotection. Ischemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. Barcelona, Spain, May 12-13, 2016

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
三浦 哲嗣 (MIURA, Tetsuji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：9019951

(2)研究分担者

三木 隆幸 (MIKI, Takayuki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00336405

丹野 雅也 (TANNO, Masaya)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：00398322

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()