

mTOR を標的とした心不全治療の開発

矢野俊之

札幌医科大学 循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座

【研究の背景】

mTOR は、2 つの複合体(mTORC1, mTORC2)として存在し、増殖、代謝およびオートファジーの調節に重要な役割を果たす。申請者は mTORC2/Akt/mTORC1 経路の短時間の活性化が虚血再灌流障害による細胞死に対して保護的に働くことを明らかにした¹⁾。一方、mTORC1 阻害薬が成因の異なる心不全モデルにおいて心機能を改善することを考慮すると、mTORC1 の恒常的活性化はオートファジー抑制を介して心不全を増悪させる可能性がある。

ネクロプトーシスはプログラム細胞死の一つで様々な炎症性疾患の病態に関与することが報告されている。一方、心不全に対して保護的に作動するオートファジーは、細胞質内蛋白質やオルガネラを分解しエネルギーの維持やオルガネラの品質管理により細胞内恒常性を維持する機構であるが、ネクロプトーシスとオートファジーの関連は検討されていない。

【目 的】

mTORC1 活性の過剰な亢進によるオートファジー機能低下がネクロプトーシスを誘導する可能性を検証する。

【方 法】

【実験 1】 心筋細胞におけるネクロプトーシス誘導機構の検討

10%牛血清添加 DMEM 中で H9c2 ラット心筋芽細胞を培養した。培養液に溶媒(Vehicle)、TNF- α (TNF, 50 ng/ml)、pan-caspase 阻害薬である Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD, 20 mM)、TNF と zVAD (TNF/zVAD)を添加した。

【実験 2】 ネクロプトーシス誘導刺激がオートファジーに与える影響の検討

- 1) Vehicle、TNF、zVAD、あるいは TNF/zVAD 添加 8 時間後に細胞を回収し、LC3 と p62 の蛋白量をウェスタンブロット法で定量した。リソソーム機能阻害薬として、液胞型 H⁺-ATPase 阻害薬である bafilomycin A1 (100 nM)を用いた。
- 2) tandem RFP-GFP-LC3 プラスミドを導入し、24 時間後に Vehicle、TNF、zVAD、TNF/zVAD、mTORC1 活性阻害によりオートファジーを活性化させる rapamycin (10 nM)、あるいは TNF/zVAD + rapamycin を添加した。薬剤添加 1、4、8 時間後に LC3 のドット数を蛍光顕微鏡で観察した。オートファゴソームに導入された RFP-GFP-LC3 (黄色) がリソソームと結合しオートリソソームになると GFP のシグナルが退色し、赤色のドットに変化することを利用し、赤色のドット(全 LC3 量)に対する黄色のドット(オートファゴソーム LC3 量)の割合の低下をオートファジー進行の指標として、画像解析装置を用いて定量した。

【実験 3】 Rapamycin によるオートファジー促進がネクロプトーシス誘導機構に与える影響の検討

- 1) Vehicle、TNF、zVAD、TNF/zVAD、rapamycin、あるいは TNF/zVAD + rapamycin 添加 8 時間後に細胞を回収し、p62 と RIP1 及び LC3、RIP1 と RIP3 の結合量を共免疫沈降法で評価した。
- 2) Vehicle、rapamycin、TNF/zVAD、TNF/zVAD+rapamycin 添加 12、18、24 時間後に培養液を回収し、LDH 活性を測定した。

【結 果】

〔実験 1〕

TNF/zVAD では、vehicle と比較して有意にネクロトーシスが増加したが ($60.6 \pm 2.7\%$ vs. $16.6 \pm 4.3\%$)、TNF 単独では増加しなかった ($29.1 \pm 4.8\%$)。TNF/zVAD によるネクロトーシスは RIP1 活性阻害薬である necrostatin-1 ($29.4 \pm 4.0\%$) 及び RIP3 発現抑制 ($27.7 \pm 2.0\%$) により完全に抑制された。以上の結果から、心筋細胞における RIP1/RIP3 依存性ネクロトーシスの存在が明らかとなった。

〔実験 2〕

TNF/zVAD では、vehicle と比較して LC3-II の蛋白量が有意に増加していた。TNF/zVAD による LC3-II 増加は bafilomycin A1 によるリソソーム機能阻害の影響を受けなかったことから、TNF/zVAD がリソソームによるオートファゴソーム分解機構に障害を与えた可能性が示唆された。tandem-RFP-GFP-LC3 導入実験では、TNF/zVAD 添加 4、8 時間後にオートファゴソーム LC3 が有意に増加したが、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合は vehicle 群と同様であった。Rapamycin は、TNF/zVAD の有無にかかわらず、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合を低下させた。以上の結果から、TNF/zVAD はオートファゴソームからオートリソソームに進行する過程を障害している可能性が示唆された。

〔実験 3〕

TNF/zVAD により p62 と RIP1 の結合が増加し、p62 と LC3-II の結合が低下した。Rapamycin により TNF/zVAD による p62 結合タンパクの変化は遮断された。Rapamycin は TNF/zVAD 添加 18、24 時間後の細胞死を軽減し、TNF/zVAD による RIP1 と RIP3 の結合増加を抑制した。

【考 察】

LC3-II の蓄積は、オートファゴソーム形成の増加、リソソームによるオートファゴソーム分解の低下、またはその両方を反映する。本研究において、1) bafilomycin A1 によるリソソーム機能阻害下では、TNF/zVAD による LC3-II の更なる増加が確認できなかったこと、2) RIP1 活性抑制薬及び RIP3 発現抑制により TNF/zVAD による LC3-II 増加が軽減したこと、3) tandem RFP-GFP-LC3 プラスミド導入実験では、TNF/zVAD はオートファゴソームを増加させたが、オートリソソームへの移行はわずかであったことから、ネクロトーシス刺激はオートファゴソームとリソソームの融合を阻害し、オートファジーを減弱させることが示唆された。さらにネクロトーシス刺激によるこれらの変化は、mTORC1 阻害薬である rapamycin により遮断されることから、mTORC1 活性化はオートファジーを減弱し、ネクロトーシスを誘導する可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

mTORC1 が恒常的に活性化する遺伝子疾患である結節性硬化症の腎腫瘍に対して mTORC1 阻害薬は保険適応を取得している。申請者らは、結節性硬化症例に対して腎腫瘍の治療として mTORC1 阻害薬を投与したところ併存していた拡張型心筋症も改善した症例を報告した²⁾。さらに、非虚血性拡張型心筋症例において心筋 mTORC1 活性が顕著に亢進し、病理学的変化や予後と密接に関係していることが判明したことから³⁾、mTORC1 活性調節は心不全治療の新たな標的であると考えた。さらに今回の研究で、近年心不全進展との関連が示唆されているネクロトーシスを mTORC1 阻害薬が抑制することが明らかとなり、今後の臨床応用への足掛かりになるとと思われる。

【参考・引用文献】

1. Yano T, Ferlito M, Aponte A, Kuno A, Miura T, Murphy E, Steenbergen C. The pivotal role of mTORC2 and involvement of ribosomal protein S6 in cardioprotective signaling. *Circ Res* 114:1268-80, 2014.
2. Koyama M, Yano T, Kikuchi K, Miura T. Everolimus-responsive dilated cardiomyopathy in tuberous sclerosis. *Eur Heart J* 36:2338, 2015.
3. Yano T, Shimoshige S, Miki T, Tanno M, Mochizuki A, Fujito T, Yuda S, Muranaka A, Ogasawara M, Hashimoto A,

Tsuchihashi K, Miura T. Clinical impact of myocardial mTORC1 activation in nonischemic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 91:6-9, 2016.