

三浦 哲嗣 教授 (循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座)



略歴

[学歴・職歴]

- 昭和 49 年 3 月 北海道夕張北高等学校卒業
- 昭和 55 年 3 月 札幌医科大学医学部医学科卒業
- 昭和 55 年 4 月 在日米国海軍医療センター 研修医
- 昭和 56 年 4 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 研究生
- 昭和 59 年 5 月 南アラバマ大学医学部生理学教室 研究員
- 昭和 61 年 7 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 研究生
- 昭和 62 年 1 月 北海道立江差病院 内科医長
- 昭和 62 年 5 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 助手
- 平成 4 年 1 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 講師
- 平成 8 年 12 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 助教授
- 平成 19 年 4 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 准教授
- 平成 22 年 11 月 札幌医科大学医学部内科学第二講座 教授 (～平成 25 年 3 月 31 日)
- 平成 24 年 4 月 札幌医科大学附属病院臨床研修センター長 (～平成 28 年 3 月 31 日)
- 平成 25 年 4 月 札幌医科大学医学部循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座 (講座名改称) 教授
- 平成 26 年 4 月 札幌医科大学医学部副学部長 (～平成 28 年 3 月 31 日)
- 平成 28 年 4 月 札幌医科大学附属病院副院長 (～平成 30 年 3 月 31 日)
- 平成 30 年 4 月 札幌医科大学医学部長、大学院医学研究科長 (～令和 3 年 3 月 31 日予定)
- 令和 3 年 3 月 札幌医科大学退職予定

[資格・免許]

医師免許証取得（昭和 55 年）
医学博士の学位授与（平成元年 札幌医科大学）
日本内科学会認定内科医・指導医、日本内科学会総合内科専門医、
日本循環器学会専門医

[主な研究分野]

循環器病学（虚血性心疾患、心不全）、循環生理学

[所属学会・主な学会活動等]

日本心不全学会（理事）、日本循環器学会（理事、Fellow）、国際心臓研究学会
（International Committee Member）、日本内科学会（評議員）、日本循環制御学
会（理事）、日本心臓病学会（Fellow）、アメリカ心臓協会（Fellow）、アメリカ心臓
学会（Fellow）、ヨーロッパ心臓学会（Fellow）、アメリカ生理学会、日本腎臓学会、
日本糖尿病学、日本高血圧学会

[主な公職歴]

- ・一般社団法人全国医学部長病院長会議理事
- ・公立医科歯科大学学長会会長
- ・一般社団法人日本医学教育評価機構理事
- ・公益財団法人医学教育振興財団理事

[受賞歴]

平成 24 年 北海道医師会賞、北海道知事賞
平成 29 年 Janice Peffer 賞（国際心臓研究学会）
令和 元年 北海道科学技術賞

抄録

Biology of cardiomyocyte death and its clinical translation

三浦哲嗣

循環器・腎臓・代謝内分泌内科学講座

最終講義では、これまで取り組んだ多くのプロジェクトに共通するテーマである心筋細胞死の規定因子とその制御について、研究成果の紹介と今後を展望する。研究成果は以下の4点に要約することができる：1) 急性心筋梗塞の大きさを規定する因子を血行動態的パラメーターを含め解明した、2) 心筋細胞のネクローシスを誘導する効果器としてギャップ結合とミトコンドリア透過性遷移孔の役割を解明するとともに、それらを制御する主要なシグナル伝達経路を同定した、3) 虚血プレコンディショニングの機序の解析をとおして、心筋細胞死を回避させる細胞内シグナル伝達経路を解明するとともに、それらの保護シグナル経路が、心疾患の危険因子や合併症である糖尿病、高血圧、心不全、

慢性腎臓病によって障害を受けること、その結果、それらの病態の存在下では、心筋梗塞の拡大や、虚血プレコンディショニングや心筋保護薬の効果の消失がおこることを見出した、4) ネクローシスと同様の形態でありながらプログラム細胞死であるネクロプトーシスが慢性心不全に関与するという新たな仮説を設定し、支持する実験ならびに臨床データを得た。これらの知見を踏まえると、心不全発症やその不可逆的な進行を阻止するための新たな治療法を構築するためには、心筋細胞死を血行動態、細胞保護シグナルのリガンド、細胞保護シグナル伝達経路を阻害する因子、そして複数存在する細胞死のメカニズムの観点から包括的に理解することが必要と考えられる。

講義内容



Retirement Lecture
March 12, 2021

Biology of cardiomyocyte death and its clinical translation

Tetsuji Miura, MD, PhD, FACC, FAHA, FESC
Department of Cardiovascular, Renal and Metabolic Medicine
Sapporo Medical University School of Medicine
Sapporo Japan

最終講義として「心筋細胞死のバイオロジーと臨床応用」というタイトルでお話しをしたいと思います。これまで学内、学外の研究者と取り組んだ研究課題が多数ありますので、講義のテーマとして何を選択するかについて悩みましたが、多くのプロジェクトの中心にある心筋細胞死を取り上げました。大学院の学生諸君を想定してまとめましたが医学部の学生諸君にも、基本的な内容は理解してもらえるのではと思います。なお本稿では紙面が限られていますので、講義でのデータの説明を省略した概説となっていることをご了解いただきたいと思います。

Major research subjects in the past three decades.

- Factors that determine myocardial infarct size
- Mechanism of ischemic preconditioning (transient ischemia-induced delay in infarction)
- Cardiomyocyte death as a cause of irreversible progression of chronic heart failure
- Diabetic cardiomyopathy – a growing etiology of chronic heart failure
- Mechanism of cardio-renal syndrome

• [Google scholar \(Jan 18, 2021\)](#)

Total citation = 12,392, H-index = 65, i10 index = 183

図 1

これまで取り組んだ主な研究テーマ（図 1）を挙げましたが、これらを心筋細胞死の機序解析と治療の探索という観点でまとめるかたちでお話ししたいと思います。

なお、研究業績の全体としては、今年 1 月の時点で、total citation が 12,000 あまり、H-index 65 でするので、研究者としてはある程度の貢献はできたように思いますが、これも教室員はじめ学内の多くの方々ご支援ご協力の賜物と感謝しております。

これは（図 2）心筋細胞の細胞死の病態上の意義を、疾患分類から整理したものです。これら病態によって細胞死の機序だけでなくその表現型が異なります

A major role of cardiomyocyte death in cardiovascular diseases

- Ischemic Heart Disease
 - Acute myocardial infarction
 - Ischemic cardiomyopathy
- Non-ischemic chronic heart failure
 - Primary cardiomyopathies
 - Specific cardiomyopathies
 - Myocarditis

-- Different etiologies and different phenotypes of cell death in these cardiac diseases

図 2

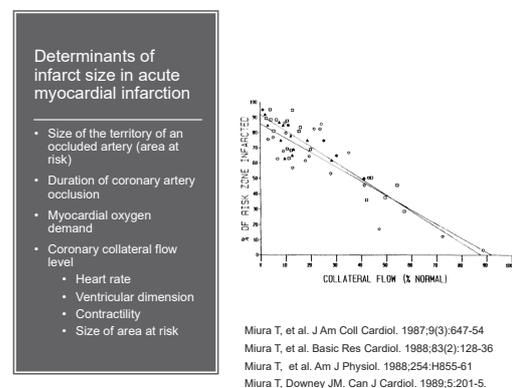
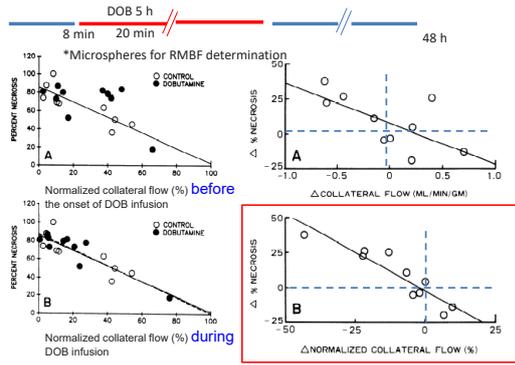


図 3

が、このうち、急性心筋梗塞と一次性心筋症を主な対象とした我々の知見を中心にお話ししたいと思います。

梗塞心筋量がどのように規定されているのかは、1980年代まで明確にされていませんでした。その理由は組織血流の測定や心筋梗塞の範囲を正確に定量することができなかったことにあります。臓器局所の組織血流を radioactive microsphere によって測定可能となり、心筋梗塞を比較的早期に染色する方法の検証がされて研究が進みました。スライド（図3）のように、心筋梗塞サイズの規定因子として、閉塞冠動脈の支配領域（リスク領域）、冠動脈の閉塞時間のほかに、虚血心筋での酸素需要量、そして虚血領域の心筋を灌流する側副血流量が重要であることが示されました。側副血流量は冠動脈閉塞後の経過で変化し得るため、血行動態の変化が側副血流の変化を介して心筋梗塞サイズを変化させる可能性があります。

冠動脈閉塞の直後の組織血流と、 β 1 受容体作動薬である dobutamine (DOB) の持続投与を開始後に心筋組織血流測定を行うと、この図（図 4）のように側副血流の増加や減少に伴って心筋梗塞の拡大が抑制あるいは促進されたことを見出しました。この知見は、急性心筋梗塞症例の管理にあたっては側副血流を減少



Miura T, Yoshida S, Iimura O, Downey JM. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 2):H855-61.

図 4

させないような循環管理、すなわち心拍数の過剰な増加や左室拡大の抑制、冠動脈灌流圧の維持が、重要であることを示唆しています。

心筋虚血についてはエネルギー代謝と細胞内イオンのホメオスタシスの観点から研究が進められ、その後、小胞体ストレスや複数の細胞死誘導機構といった観点で、病態生理の見直しがなされています。こうした研究を大きく推進するきっかけとなったのが1986年に報告された虚血プレコンディショニング (ischemic preconditioning, IPC) という現象です (図5)。

Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium

CHARLES E. MURRY, B.S., ROBERT B. JENNINGS, M.D., AND KEITH A. REIMER, M.D., Ph.D.

ABSTRACT We have previously shown that a brief episode of ischemia slows the rate of ATP depletion during subsequent ischemic episodes. Additionally, intermittent reperfusion may be beneficial to the myocardium by washing out catabolic products. To test this hypothesis, we proposed that multiple brief ischemic episodes followed by a single 40 min occlusion. In the set, one group of dogs ($n = 7$) was pre-separated by 5 min of reperfusion, followed by a single 40 min occlusion. In the set, followed, and animals ($n = 9$) then received a single 3 hr occlusion. Animals who received a single 3 hr occlusion and were related the anatomic area at risk and collateral blood flow were not significantly different in the between infarct size in the preconditioned and in the 40 min study may have been due to accumulation during the sustained occlusion. These results suggest that the multiple anginal episodes that often precede myocardial infarction in man may delay cell death after coronary occlusion, and thereby allow for greater salvage of myocardium through reperfusion therapy. *Circulation* 74, No. 5, 1124-1136, 1986.

- High reproducibility across various animal species
- Extrapolation of the concept to other organs such as the brain, artery and kidney
- A work that led to discovery of myocardial salvage by intracellular signaling mechanisms.
- Citation more than 6,000 times to date

図 5

IPC は心筋を一旦短時間の虚血に暴露すると、その後の長時間虚血による心筋梗塞の進行が遅延するという適応現象です。つまり短時間の虚血によって心筋細胞は虚血障害への耐性を獲得するという現象です。この論文が大きな影響を与えた理由として IPC が心臓以外の臓器にも認められ、臓器保護全般の研究者に注目されたことにあります。そして IPC の研究から、虚血障害保護法の探索の方向が、エネルギー代謝への介入から、細胞内シグナル伝達への介入へと転換が起きました。これまでこの論文の引用回数が 6,000 回を超えていることから影響力の大きさがうかがわれます。

Ischemic preconditioning in patients with coronary artery disease

- Preinfarction angina reduces infarct size.
 - Lønborg J, et al. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2012;13:433-43, Reiter R, et al. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013;6:52-8.
- Preinfarction angina reduces ventricular dysfunction after infarction.
 - Klöner RA, et al. *Circulation.* 1995;91:37-45, Noda T, et al. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1966-74.
- Preinfarction angina attenuates post-infarct ventricular remodeling.
 - Solomon SD, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1511-4, Papadopoulos CE, et al. *Cardiovasc Revasc Med.* 2011;12:286-91.

図 6

IPC は心筋梗塞の臨床例でも存在することを示す成績が数々報告されました (図6)。なおこの Noda et al. の研究は国内の多施設共同臨床研究で、研究の計画段階から我々も参加したものです。

IPC の機序に関して我々が行った研究の主な成果は、次のスライド (図7) のように要約することができます。

Mechanisms of ischemic preconditioning

- Activation of multiple receptors that trigger intracellular signal pathways: adenosine A1 and A2b, bradykinin B1, angiotensin II type 1, δ -opioid and TNF- α receptors.
 - Miura et al. *Circulation* 1992, Tsuchida *Cardiovasc Res* 1992, Miki et al. *J Am Coll Cardiol* 1996, Miura et al. *Cardiovasc Res* 1998, Ichikawa *Cardiovasc Res* 2004, Miura et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007.
- Presence of multiple and compensatory signal pathways leading to protection afforded by IPC.
 - Miki et al. *Circulation* 2000, Tsuchida et al. *Basic Res Cardiol* 2001, Ohnuma et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, Nozawa et al. *Basic Res Cardiol* 2003, Nishino et al. *Cardiovasc Res* 2004, Miki et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2006
- Targets of pro-survival signaling: connexin-43 in the gap junction and GSK-3 β that interact with the mitochondrial permeability transition pore.
 - Miura et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, Naitoh et al. *Cardiovasc Res* 2006, Nishihara et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, Nishihara et al. *J Mol Cell Cardiol* 2007, Naitoh et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009, Miura et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, Terashima et al. *J Mol Cell Cardiol* 2010, Hotta et al. *Circ Res* 2010.

図 7

IPC による心筋細胞保護を誘導するシグナル伝達には複数の G- 蛋白連関受容体のほか、TNF- α 受容体がシグナルの起動に関わり、それぞれの役割は IPC のプロトコールによって異なることを明らかにしました。このような受容体の redundancy (余剰性) は IPC の実効性を高める仕組みであるように思われます。また、受容体の redundancy から予測されるように IPC によって活性化される細胞内シグナル伝達経路は複数存在し、またその経路にはクロストークによる代償機能があることを見出しました。そして、細胞内シグナル伝達経路の標的としてギャップ結合とミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) - これらについては後で説明します - が関与することを仮説として、それぞれ connexin-43 と GSK-3 β の役割に注目しました。

IPC により起動される主なシグナル伝達経路とそ

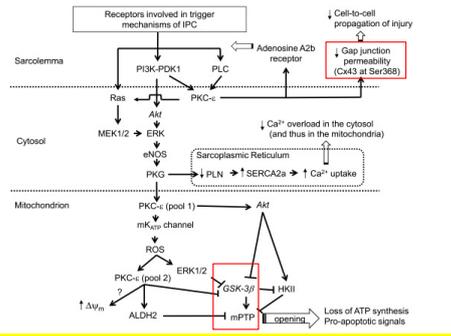


図 8

の標的をスライド (図 8) に示します。心筋細胞の再灌流障害が軽減する機序として、ギャップ結合透過性の抑制、筋小胞体でのカルシウム保持の増強、mPTP 開口の抑制を示していますが、我々は特にギャップ結合とミトコンドリア透過性遷移孔 (mPTP) の役割の解明に取り組みました。まずギャップ結合についてお話しします。

心臓の虚血再灌流障害にギャップ結合機能が関与することは Garcia-Dorado が最初に報告していて、彼らは心筋障害の主要な因子である Na⁺ 過負荷がギャップ結合を介して隣接する心筋細胞に伝搬することを示す研究成果を報告していました。そうした報告から、IPC によってギャップ結合の閉鎖 (透過性の低下) が促進することが心筋細胞死抑制に関与しているのではないかと着想し、検証を行いました。

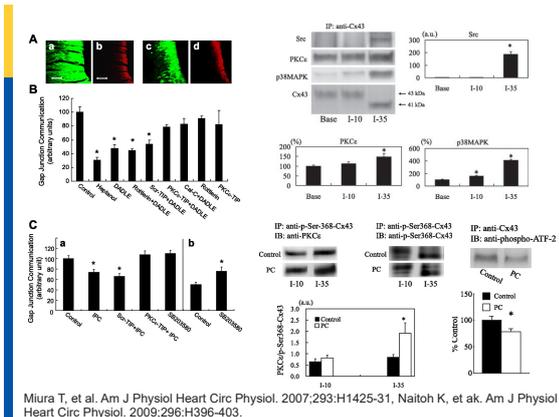


図 9

ギャップ結合の透過性の測定には Lucifer yellow の細胞間輸送を指標として ex vivo の心筋で測定し、IPC を誘導するシグナルを起動する受容体の作動薬や阻害薬、また伝達物質の特異的な阻害薬の影響を評価するとともに、心室筋細胞の connexin-43 のリン酸化、また蛋白キナーゼと connexin-43 の相互作用を解析しました (図 9)。これらデータならびに、他の複数の論文に発表したデータを基に次のスライド

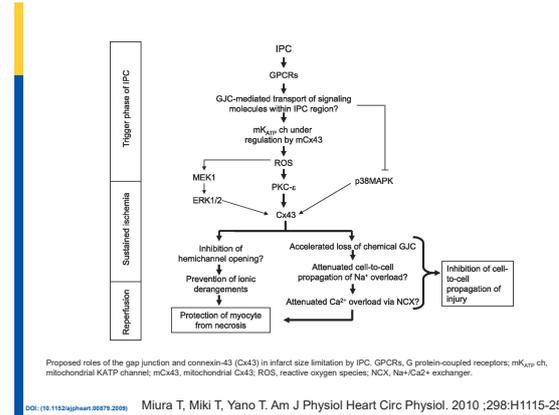
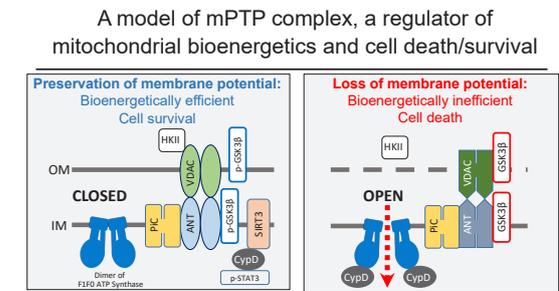


図 10

(図 10) のようなモデルを作成することができました。

IPC によって G 蛋白連関受容体の活性化、ミトコンドリア ATP 感受性 K⁺ チャネルの開口、シグナル伝達物質としての活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) の産生、虚血障害時の PKC-ε と ERK による connexin-43 リン酸化、その結果ギャップ結合透過性の低下という一連の機序が示されました。ギャップ結合透過性の低下は、再灌流時の Na⁺ 過負荷やそれに引き続く Na⁺-Ca²⁺ 交換系を介した Ca²⁺ 過負荷の抑制によって、細胞死を抑制すると考えられます。また細胞膜上で hemichannel の抑制も心筋細胞保護に関与する可能性があります。一方、p38-MAPK は IPC によってむしろ抑制され、ギャップ結合透過性の低下が過剰とならないような微調整の機序も存在することが示唆されました。この研究成果は IPC の機序解明の点で貢献できたと思いますが、ギャップ結合抑制は、不整脈の誘発や左室収縮の非同期といった問題を引き起こしえることなどから、治療方法への応用は困難でした。

IPC シグナルの標的としてギャップ結合とともに注目したのは mPTP で、このミトコンドリア内膜に存在する非選択的チャンネルの開口は、心筋細胞に限らず細胞のネクロシスの直接的な機序であることが多くの研究で示されています。



• Dimers of F₀F₁ ATP synthase form an mPTP channel, while cyclophilin D and GSK-3β play regulatory roles in its opening. Miura and Tanno, Cardiovasc Res 2012;94:181-9, Giorgio V et al. PNAS 2013;110:5887

図 11

このスライド (図 11) は我々の mPTP 複合体のモデルで、2012 年に報告したものを Paolo Bernardi らの知見を基に改訂したものです。我々は、この mPTP 開口閾値を直接的に制御する分子として GSK-3β に注目しその役割の解明を試みました。

GSK-3β regulates the mPTP and cardiomyocyte necrosis after ischemia/reperfusion

- Thresholds for mPTP opening in cardiomyocytes were elevated by knockdown of GSK-3β or by inhibitory phosphorylation of GSK-3β at Ser9 (Juhászová et al. *J Clin Invest* 2004).
- Level of p-Ser9-GSK-3β at 5 min after reperfusion predicted infarct size 2 h after reperfusion (Nishihara et al. *Am J Physiol* 2006)
- Phosphorylation of GSK-3β at Ser9 was associated with infarct size limitation by ischemic preconditioning and multiple protective agents (Tong et al *Circ Res* 2002, Gomez et al. *Circulation* 2008 et al.)

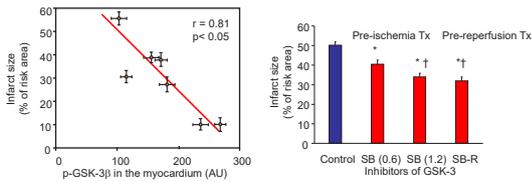


図 12

GSK-3β という蛋白キナーゼが mPTP 制御に関与することを初めて報告したのは Steve Sollott らです。彼らは、単離心筋細胞を用いた実験で、GSK-3β のノックダウンやその活性を抑制する Ser9 リン酸化が mPTP 開口閾値を上昇させることを示しました。我々は、Ser9-GSK-3β リン酸化をもたらす複数の受容体刺激を組み合わせて、Ser9-GSK-3β リン酸化レベルが異なる条件を設定したところ、再灌流 5 分後の p-Ser9-GSK-3β レベルと再灌流 2 時間後の心筋梗塞サイズの逆相関が観察されました (図 12)。さらに再灌流時の GSK-3β 阻害薬 (SB-216763) 投与は心筋梗塞サイズを縮小し、p-Ser9-GSK-3β レベルと心筋梗塞サイズの関係が因果関係にあることを確認することができました。

そこで、心筋細胞における GSK-3β の動態、特に細胞質からミトコンドリアへの移行について解析を行いました。その結果、恒常活性型のキナーゼである GSK-3β のミトコンドリア移行は、そのキナーゼ活性を必要としていること、さらに、GSK-3β ミトコンドリア移行の際に、相互作用する蛋白をスクリーニングした結果、VDAC2 と結合することが必要であり、ミトコンドリア移行した GSK-3β はミトコンドリアでの ROS 産生を亢進させることが明らかとなりました (図 13)。

こうした GSK-3β の役割を鑑み、ミトコンドリア内に存在し、GSK-3β リン酸化を制御する蛋白キナーゼ系の解明を目指しました。その結果の要点のみ示したいと思います。

ミトコンドリア内には酸化的リン酸化に関わる分子のほか、ミトコンドリア内外への分子の輸送や分解に関与する分子、さらにそのリン酸化に関わるキナーゼ

Effects of VDAC2 knockdown on mPTP opening and cell necrosis by oxidant stress.

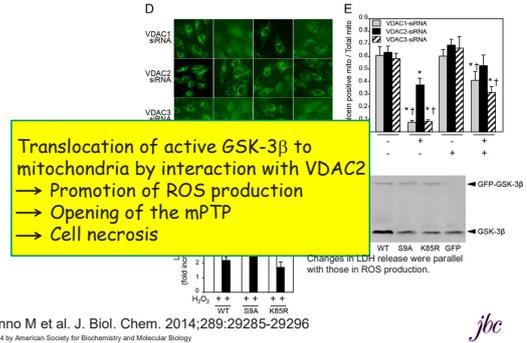


図 13

Effects of suppression of DUSP5 expression or PHLPP1 expression on phosphorylation of Akt, ERK and GSK-3β.

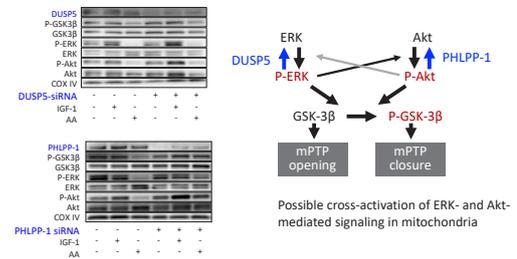


図 14

が存在することが知られていましたが、GSK-3β の制御についてはこれまで報告がありませんでした。そこで、GSK-3β の上流の三つのキナーゼとそれらの脱リン酸化酵素の解析を目指した結果、ERK のホスファターゼとして核にのみ存在すると考えられていた DUSP5 がミトコンドリア外膜に存在することを見出しました。

また Akt の特異的なホスファターゼである PHLPP1 がミトコンドリアに存在することを追試確認するとともに、PHLPP1、DUSP5 それぞれのノックダウン実験から、ミトコンドリアのなかで Akt を介した GSK-3β リン酸化と、ERK を介した GSK-3β リン酸化の経路に cross activation があることが示されました (図 14)。ミトコンドリア内での GSK-3β リン酸化の機構には、その上流の蛋白キナーゼに redundancy があるだけでなく相互の増幅によってリン酸化レベルの確保と mPTP 開口抑制をさらに確実にしているのかも知れません。

このスライド (図 15) はミトコンドリアを内膜、外膜、マトリックスに分画して蛋白キナーゼとホスファターゼのレベルを解析した実験の結果を要約して図示したものです。それぞれのシンボルの大きさは蛋白量を表しています。このモデルから、ネクローシスの直接的な機序である mPTP の制御には、GSK-3β

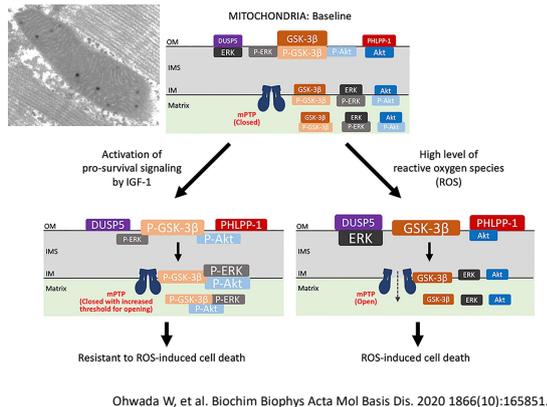


図 15

とその上流のキナーゼのミトコンドリアへの移行と分配、ミトコンドリア外膜上でのホスファターゼによる制御といった、重層的な機序が存在することが理解できると思います。

心筋細胞を保護するシグナル伝達系の詳細をミトコンドリア内のキナーゼ系まで追跡することに何か臨床的な意義があるのか、と疑問に思われる方もおられると思います。その理由について次にお話しします。

Modification of pro-survival signal pathways by concurrent diseases

- Different co-morbidities impair different steps in signal transduction pathways.
 - Post-infarct remodeling (Miki et al. Circulation 2000, Miki et al. Basic Res Cardiol 2007), diabetes (Miki et al. Diabetes 2009, Hotta et al. Circ Res 2010), hypertension (Yano et al. Hypertens 2011), chronic kidney disease (Nishiazawa et al. Hypertens 2016, Tobisawa et al. Basic Res Cardiol 2017)
- Impairment of pro-survival signaling reduces myocardial tolerance to ischemia/reperfusion injury and/or induces resistant to protective agents.

図 16

IPCによる心筋保護の機序を解析しているなかで、気づいたことのひとつに、細胞保護的なシグナル伝達経路には、心肥大や代謝調節と深く関連している分子が多いことがあります。また、これまでほとんどの心筋梗塞の実験には、正常の健康な動物や細胞が用いられており、臨床での患者背景とは大きな違いがあります。さらに、そうした動物実験で有望視された薬剤のほとんどが臨床試験では有効性が認められず、臨床応用されていません。そこで、臨床でしばしば遭遇する疾患病態が、心筋細胞を保護するシグナル伝達そのものを修飾し機能不全に陥らせているのではないかと考えました。

この考えの検証のため、梗塞後の慢性心不全、糖尿病、高血圧、慢性腎機能障害のモデル動物を用いて、細胞保護シグナル経路の変化を解析してみると、確か

に、これらの疾患それぞれに特徴的なステップで、細胞保護シグナルの障害があり、心筋梗塞の拡大や、IPC効果の消失などといった悪影響と関連していることがわかりました(図16)。従って、これらいわゆる心血管イベントの危険因子や合併疾患を背景にもつ患者では、健康な動物で有効な細胞保護シグナルをその上流で起動しても心筋保護が期待できないということになります。

Cardiomyocyte death as a major cause of irreversible progression of heart failure

- Loss of contractile units in the ventricle
- Limited adaptation by hypertrophy of viable cardiomyocytes
- Response of interstitial cells to dead cardiomyocytes
- Roles of necroptosis, autophagy, and their crosstalk in progression of chronic heart failure

図 17

さて、ここからは慢性心不全の進行における心筋細胞死に移りたいと思います。慢性心不全の患者数は高齢化や急性心不全の救命率の向上などの理由によって世界的にも近年増加しており「心不全パンデミック」という言葉も使われるようになってきました。心不全はまず無症候の時期をへて急性心不全が発症し、それを治療によって乗り越えた後にも増悪と追加治療による緩解を繰り返しながら徐々に増悪して死に至るという経過をとります。この慢性心不全の進行の原因を理解し、新たな治療法を確立することが求められています。

慢性的かつ不可逆的な心不全の進行の機序として、スライド(図17)のようなものが挙げられます。

我々が心不全におけるネクロトーシスの役割を考えるきっかけになったJutta Schaperの報告では、アポトーシスよりも、autophagic deathやネクロトーシスの形態の細胞死がはるかに多いことを見出しています。この論文が発表されたころはネクロトーシス、すなわち形態はネクロトーシスと同様のプログラム細胞死、はまだ見出されていませんでした。その後、ネクロトーシスの概念が現れ、ネクロトーシスが炎症性サイトカインやダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns, DAMPs)によって誘導されるプログラム細胞死であることが明らかにされました。そこで、慢性心不全で炎症性サイトカインの血中濃度が上昇するなどの報告を考え併せると、重症心不全でネクロトーシスとされている心筋細胞死の多くが実はネクロトーシスではなくネクロトーシスではないか、という着想を得たわけです。

Necroptosis pathways and hypothesis of their crosstalk with autophagy

• Miura T, a grant proposal 2018

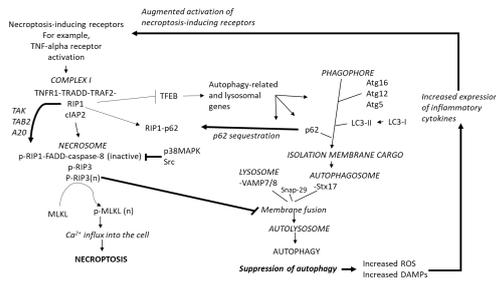


図 18

このスライド (図 18) に現在の我々の作業仮説を示します。ネクロプトースス経路の活性化が、オートファジーを阻害することによって、DAMPs の処理や ROS を過剰産生するミトコンドリアの処理を遅らせ、さらにネクロプトーススを促進するという悪循環が形成される、という仮説を設定しました。

Necroptosis was not inhibited by inhibitors of mPTPs, though a RIP1 inhibitor and RIP3 knockdown were protective.

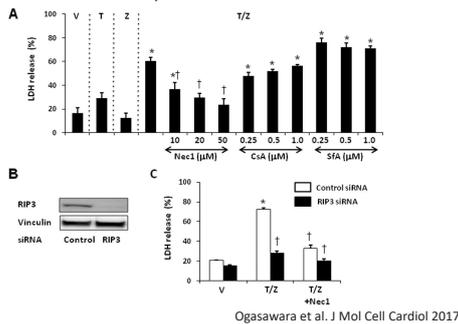
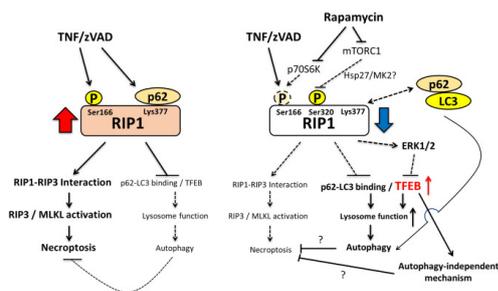


図 19

心筋細胞のネクロプトーススには mPTP が寄与しないというネクローシスとの違いがあります。ネクロプトーススは、RIP1 抑制や RIP3 のノックダウンによって抑制されますが、特異的 mPTP 阻害薬には影響は見られませんでした (図 19)。こうしたことから、心筋ネクロプトーススを標的とした治療としては、ネ

Proposed mechanism by which mTORC1 inhibition suppresses necroptosis



Abe K, et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019;1865(12):165552.

図 20

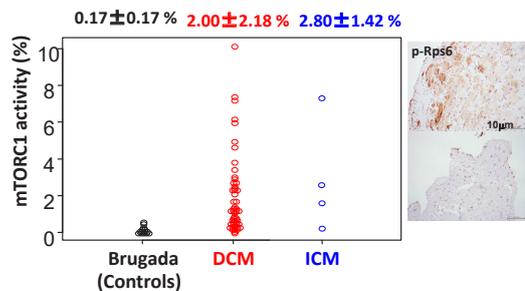
クローシスと全く異なるアプローチが必要となることとなります。

このスライド (図 20) は、TNF- α /zVAD 処理によるネクロプトースス誘導がオートファジーを阻害する機序と、そのオートファジー阻害が rapamycin で回復する機序を総括したものです。TNF- α /zVAD 処理によって RIP1-Ser166 リン酸化が起こり、活性亢進の結果、オートファジーに重要なアダプター蛋白である p62 が RIP1 に結合し、オートファゴソーム蛋白である LC3 から p62 を隔離すること、またリソソームの biogenesis や機能調節に重要な転写因子である TFEB の核移行が阻害すること、これらによってオートファジーが抑制されると考えられます。

Rapamycin は、RIP1 活性化をもたらすその Ser166 リン酸化を抑制するだけでなく、活性抑制に働く Ser320 のリン酸化を亢進させることが分かりました。この二つの変化によって RIP1 活性を強力に抑制することが、p62 を RIP1 による sequestration から解放させ、TFEB の抑制を解除し、オートファジーを回復させることが示されました。

なお、このように mTORC1 活性の抑制は心筋のネクロプトースス制御に重要であることが実験から示されたわけですが、臨床例の解析からは、この mTORC1 活性の亢進が慢性心不全に寄与していることを示唆する成績があります。

mTORC1 activity was higher in patients with DCM and ICM than in controls.



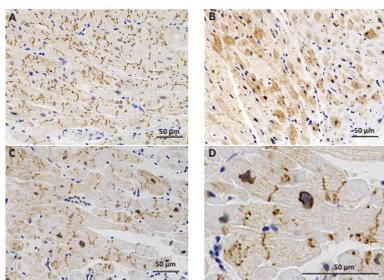
Yano T, et al. J Mol Cell Cardiol 2016 and unpublished data

図 21

心機能低下のない対照群と比較すると、拡張型心筋症の心筋生検標本では mTORC1 活性が亢進し (図 21)、その活性の高値いほど、予後が不良であることも観察されました。mTORC1 活性が亢進した病態では、心筋ネクロプトーススが誘導され易い状態にある可能性が考えられます。

ネクロプトーススによる細胞死を直接誘導する分子として知られるリン酸化 MLKL は介在板と核に高発現し、介在板でのリン酸化 MLKL は左室壁厚と、核のリン酸化 MLKL は左室拡張機能との関連が見られました (図 22)。さらに、核のリン酸化 MLKL レベ

Representative images of immunohistological staining for p-MLKL in endomyocardial samples from DCM patients



Fujita Y, et al. JCS 2020, manuscript under review

図 22

ルが高い症例では、イベントのない生存率が有意に低いことが示されました(未発表)。最近の実験研究では、リン酸化 MLKL が細胞質から核内に移行して修飾を受けることがネクロプトーシスの実行に必要であることを示唆する実験成績もあり、そうした知見と拡張型心筋症における mTORC1 活性の亢進を考え併せると、この心筋生検標本についての成績は、心筋のネクロプトーシスが拡張型心筋症の進行に関与することを支持するものと考えられます。

Summary and Conclusion

- Hemodynamic parameters that determine the extent of myocardial necrosis have been fully characterized.
- We have characterized roles of two necrosis-inducing effectors of anti-survival signaling, the gap junction and the mitochondrial permeability transition pore, and their regulatory mechanisms in cardiomyocytes.
- Pro-survival signaling pathways in cardiomyocytes are impaired by diabetes mellitus, hypertension, heart failure and chronic renal failure. The impairments lead to augmentation of injury and/or loss of response to protective interventions in the heart.
- We have just started to understand the role of necroptosis in progression of heart failure in animal models and patients with cardiomyopathy.
- An understanding of cardiomyocyte loss in the heart from the viewpoints of hemodynamics, cytoprotective ligands, intracellular pro-survival signal pathways, modification of the signaling by risk factors or drugs, and multiple mechanisms of cell death is crucial for designing a novel therapy to arrest progression of heart failure.

図 23

今日の講義の要約をスライド(図 23)に示します。結論として、心筋細胞死を、血行動態、細胞内シグナル伝達を起動するリガンド、細胞内シグナル伝達経路を阻害する因子、そして複数存在する細胞死のメカニズム、を包括的に理解することが必要であると考えます。こうした知見を基にすると、細胞保護シグナル経路のうち心臓病の危険因子や合併症によって障害されるステップより下流の分子を標的として、ネクローシス、ネクロプトーシスそれぞれを抑制する薬剤の組み合わせが新たな治療法になることが予想されます。果たしてこの予想が正しいのは現時点では分かりませんが、本学を退職後も後輩の研究を応援しつつ、自身も可能な範囲で研究を続けたいと思っています。

文献

1. Miura T, Yoshida S, Iimura O, Downey JM. Dobutamine modifies myocardial infarct size through supply-demand balance. *Am J Physiol* 1988; 254(5 Pt 2): H855-861.
2. Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc Res* 2012; 94:181-189.
3. Miura T. HASF, a PKC- ϵ activator with novel features for cardiomyocyte protection. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 69: 1-3.
4. Miura T, Miki T, Yano T. Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H1115-1125.
5. Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Horio Y, Miura T. Translocation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), a trigger of permeability transition, is kinase activity-dependent and mediated by interaction with voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2). *J Biol Chem* 2014; 289: 29285-29296
6. Ohwada W, Tanno M, Yano T, Ong SB, Abe K, Sato T, Kuno A, Miki T, Sugawara H, Igaki Y, Miura T. Distinct intra-mitochondrial localizations of pro-survival kinases and regulation of their functions by DUSP5 and PHLPP-1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165851. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165851.
7. 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 α contributes to enlargement of infarct size by chronic kidney disease. *Basic Res Cardiol* 2017; 112:31. doi: 10.1007/s00395-017-0621-6.
8. 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* 2016; 91: 6-9
9. 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. mTORC1 inhibition attenuates necroptosis through RIP1 inhibition-mediated TFEB activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865: 165552. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165552.