

## 論文内容の要旨

論文提出者名 中岡 幹彦

論文題目

An alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy.

論文内容の要旨

心疾患は世界の死因の主要因であり、その終末期像である心不全の進展には多くの神経体液性因子が関与する。とりわけ交感神経系については、血中ノルエピネフリン濃度が高ければ高いほど心不全患者の予後が悪化することがわかっている。我々は過去に、交感神経β経路が心筋アポトーシスを惹起させる一方で交感神経α経路は逆にこれを抑え心保護に働くことを報告した。このことは、いまや交感神経β遮断薬が心不全治療薬の第一選択とされる説明の一助となっている。

一方、オートファジーは全ての真核生物に保存された細胞内分解系で、異常タンパクや不要な細胞内小器官を除去してタンパク質のリサイクルを行い、生体の恒常性維持に働く。近年、このオートファジーが重症心不全患者の心筋で観察されることがわかってきた。しかしながら、不全心におけるオートファジーが細胞障害の結果なのかもしれないのか、特にはアポトーシスとオートファジーの機能的関連は十分にわかっていない。本論文では、*in vitro*、*in vivo* 両方の動物実験系を用いて、交感神経が惹起される心不全の進展においてオートファジーがどのような役割を果たすのか、またその詳しい細胞伝達経路について検討した。

まずラット新生仔心筋細胞を培養し、オートファジーのマーカーとなる GFP-LC3 を薬物的心筋細胞に遺伝子導入した。それにα刺激薬である phenylephrine(以下 PE)、β刺激薬である isoproterenol(以下 ISO)、norepinephrine(以下 NE)を投与しオートファゴソーム形成をみたところ、いずれの薬物でもオートファジー特異的である autophagic flux を介してオートファジーが亢進していた。アポトーシスに関しては以前の報告通り ISO はアポトーシスを亢進し、PE は ISO によるアポトーシスを抑制したが、Autophagy-related 5 遺伝子のノックダウンによるオートファジー抑制は ISO によるアポトーシス、PE によるアポトーシス抑制を低下させた。これによりアドレナリン刺激によるオートファジーは心保護的に働くことが示された。

次にオートファジーを調整するシグナル経路について PI3K-Akt(以下 Akt 経路)と MEK-1/2-ERK-1/2 (以下 ERK 経路)を調べた。Akt 経路を抑制しても ERK 経路を抑制しても PE のアポトーシス抑制は解除されたが、オートファジーについては ERK の抑制のみが PE のオートファジーを解除した。これより二つの経路は共に PE によるアポトーシス抑制において正の相関を示したが、オートファジーには Akt のみが相関していたことが示された。Akt には Akt1、Akt2、Akt3 のアイソフォームがあり、これらは心筋細胞に発現し

刺激により異なった機能を持つことが示されている。Akt アイソフォームを RNAi 法を用いてノックダウンを行ったところ、PE によるオートファジーにおいて、Akt1 の抑制のみが Westernblot 法においてオートファゴソーム形成と正の相関を示す LC3-II/I 比を抑制した。mTOR を抑制することによりオートファゴソームが亢進することが広く証明されているが、本実験でも mTOR 経路を抑制することにより LC3-II 発現が上昇したことより、心筋細胞においても通常の mTOR 経路によるオートファジーが存在していることが示された。一方で Akt1 の抑制により mTOR 経路の活性は変化しなかったことより、PE によるオートファジー亢進は mTOR 非依存性の経路であることが示された。

最後に in vivo においてアドレナリン刺激によるオートファジー亢進と不全心との関係を調べた。雄 8 週齢マウスを PE 群、ISO 群、NE 群に分け、それぞれの薬剤を 15mg/kg/日 で浸透圧ポンプを用いて 4 週間連日腹腔内持続投与した。ISO 群、NE 群のマウスの心筋組織はマッソン・トリクローム染色にて有意な線維が見られた。心エコー図検査の結果 ISO 群では 4 週間で不全心へ移行する初期相である心肥大を示し、NE 群では著しい心機能低下、心室壁菲薄化を認めたが、PE 群では心機能も壁厚も維持され、組織学的に線維化も認めなかった。GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いてオートファジーの発現を検討したところ ISO 群、NE 群においてはオートファゴソームの亢進を認めなかったが、PE 群においては心筋組織にオートファゴソームの亢進を認め、Westernblot 法においても LC3-II/I 比は PE 群においてのみ亢進した。これらの結果より PE 投与にて心不全の亢進の兆候なくオートファジーの亢進を認めたことより、PE の  $\alpha$ -アドレナリン刺激は心保護的に働くことが示された。

以上よりアドレナリン刺激においてオートファジーは心保護的に働き、また Akt がアポトーシス抑制に働くオートファジーを制御しているが、それは mTOR 非依存性の経路であった。これより今後 mTOR 非依存性のオートファジー調節経路のさらなる研究が心不全進展の解明の一つのターゲットとなると考える。