



Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction

Ito, Masaaki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7052号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007052>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Selective interference of mTORC1/RAPTOR protects against human disc
cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism
with Akt and autophagy induction

ヒト椎間板細胞における mTORC1/RAPTOR の選択的干渉は
Akt とオートファジーの誘導を介した細胞死, 細胞老化
および細胞外基質変性に対する保護作用を有する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
(指導教員: 黒田 良祐教授)

伊藤 雅明

【目的】

腰痛は生涯の有訴率が 80%を超える非常に頻度の高い症候であり、米国では関連する経済損失が年間 1,000 億ドルに達すると報告されている。腰痛の独立した危険因子として椎間板変性が挙げられるが、その詳細な発生機序は明らかでない。椎間板は周囲にある線維輪を中心の髓核を取り囲み、軟骨終板によって脊椎椎体と隔てられた構造をとる人体最大の無血管組織であり、椎間板への栄養供給は軟骨終板を介した椎体からの拡散に依存している。結果、椎間板細胞は低栄養、低酸素、高酸性といった非常に過酷な環境下に存在することとなり、生存のための何らかの特殊な機構を有する可能性が推測される。自己貪食「オートファジー」は低栄養などのストレス条件下で細胞が自己の余剰蛋白や老廃物を分解、再利用して生存を図る細胞内恒常性維持機構である。このオートファジーは The mammalian target of rapamycin (mTOR) により抑制されている。mTOR は細胞分裂・成長に重要な役割を果たしている。mTOR は RAPTOR と複合した mTORC1 と RICTOR と複合した mTORC2 を形成し、mTORC1 は Akt に、Akt は mTORC2 に制御を受ける。mTORC1 は蛋白合成に関わる p70/S6K を調節し、オートファジーを抑制する。そこで今回、我々はヒト椎間板細胞ではオートファジーや mTOR シグナルが恒常性維持に重要な役割を果たしていると仮設し、mTOR シグナルに対する RNA 干渉法を用いた解析を行った。

【方法】

細胞実験には 2 種類の細胞を用いた。まず、不死化ヒト椎間板髓核細胞を用い mTOR, RAPTOR, RICTOR に対する siRNA をリポフェクション法で導入し、ウエスタンプロット法 (WB) で mTOR 経路とオートファジー活性を検討した。また、各 siRNA 導入時の細胞増殖について CCK-8 を用いて検討した。次に IL-1 β 刺激を加え、24 時間後にアポトーシス、セネッセンス (細胞老化)、細胞外基質分解度の評価を TUNEL 染色、WB、定量 PCR で検討した。また、MMP の評価については細胞培養液上清を濃縮したものを用いて WB を施行し評価した。次にヒト手術検体椎間板髓核組織の初代培養細胞 (n=40: 年齢 60.8±4.7 歳 [25–82 歳]、

男性 20 例、女性 20 例、Pfirrmann 変性度 3.5 ± 0.2 [3-4] に RAPTOR に対する siRNA をリポフェクション法で導入し、同様の検討を行なった。

また、腰椎手術により得られたヒト椎間板髓核組織 (n=8: 年齢 58.6 ± 12.4 歳 [27-80 歳]、男性 5 例、女性 3 例、Pfirrmann 変性度 3.1 ± 0.6 [2-4]) をホモジエナライズし直接蛋白質を抽出した。これにより得られた蛋白を用いて WB を行ない年齢による mTOR シグナル関連蛋白の発現について検討した。

【結果】

使用した不死化ヒト椎間板髓核細胞およびヒト椎間板髓核細胞は WB においていずれも椎間板髓核マーカーである ブラキュリと CD24 の発現を認め細胞の特性は保たれていることを確認した。まず不死化ヒト椎間板髓核細胞で各 siRNA が標的蛋白の発現を特異的に抑制することを確認した (mTOR 56%, RAPTOR 63%, RICTOR 53%: $P < 0.01$)。リン酸化 Akt は mTOR と RICTOR 干渉群で減少し mTORC2 以下の広範な抑制が示唆された。一方で RAPTOR 干渉群ではリン酸化 Akt の増加を認めた。またリン酸化 p70/S6K は全群で減少していた。さらに全群でオートファジーマーカーである LC3-II は増大し、基質である p62/SQSTM1 は減少しており、全群でオートファジー活性は増加していた。細胞生存率は mTOR および RICTOR 干渉群で減少していたが、RAPTOR 干渉群では維持されていた。次に IL-1 β 刺激により TUNEL 陽性細胞を増加させたが、RAPTOR 干渉群でのみその増加を抑制していた ($P < 0.01$)。また、WB で評価した IL-1 β 刺激による細胞外基質分解酵素 MMP-3, -13 の誘導は全群で抑制されていた。

以上より RAPTOR 干渉の有用性が示唆され、ヒト椎間板髓核細胞に対する検討を行った。まずヒト椎間板細胞でも RAPTOR-siRNA が標的蛋白の発現を特異的に抑制し、リン酸化 Akt の増大とリン酸化 p70/S6K の抑制効果を認めたことを確認した。さらに LC3-II の増大と、p62/SQSTM1 の減少を認め、オートファジー活性は増加していた。IL-1 β 刺激によるアポトーシス関連 cleaved PARP, caspase-9 (WB)、セネッセンス関連 p16/INK4A (WB)、細胞外

基質分解酵素 MMP-2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 (WB、定量 PCR) の誘導が RAPTOR 干渉により抑制された。また、定量 PCR にて collagen type 2 の発現は RAPTOR 干渉で増大しており ($P=0.02$)、RAPTOR 干渉は椎間板細胞に対する保護作用を有する可能性が示唆された。

最後に腰椎手術により得られたヒト椎間板髓核組織による WB では、年齢とリン酸化 Akt および Akt の発現には負の相関があることが示唆された (リン酸化 Akt: $r=-0.716$, $P=0.046$, Akt: $r=-0.709$, $P=0.049$)。

【考察】

本検討によりヒト椎間板における mTOR シグナル経路の関与が明らかとなった。mTOR, RAPTOR, RICTOR のいずれの RNA 干渉でも p70/S6K のリン酸化は抑制され、オートファジーは促進されたが、RAPTOR 干渉でのみ上流のリン酸化 Akt の増大を伴っていた。細胞増殖は mTOR 及び RICTOR 干渉で減少していたが、RAPTOR 干渉では保たれていた。炎症刺激による細胞老化及び細胞外基質異化はいずれの RNA 干渉でも抑制されていたが、アポトーシスは RAPTOR 干渉でのみ抑制されていた。この RAPTOR 干渉によるアポトーシスの抑制効果は p70/S6K の抑制による class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介したネガティブフィードバックにより Akt を活性化させたことが原因であると考えられる。

これまでにも関節軟骨特異的な mTOR 欠損マウスが、関節軟骨におけるオートファジーを誘導しアポトーシスおよび MMP-13 の抑制効果があるとの報告や、mTORC1 の抑制剤であるラバマイシンがヒト軟骨細胞においてオートファジーを誘導しアポトーシスの抑制や関節症関連の遺伝子発現を抑制するとの報告がある。本研究結果はこれらの報告と一致しているが、本研究ではオートファジーの誘導のみならず Akt の活性化も重要である可能性を示唆している。

【結論】

RAPTOR 干渉による選択的な mTORC1 の抑制は椎間板細胞の保護作用を有しており、椎間板変性疾患への治療対象となる可能性が示唆された。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|----|-------|
| 受付番号 | 甲 第 2746 号 | 氏名 | 伊藤 雅明 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Selective interference of mTORC1/RAFTOR protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism with Akt and autophagy induction</p> <p>ヒト椎間板細胞における mTORC1/RAFTOR の選択的干渉は Akt とオートファジーの誘導を介した細胞死、細胞老化 および細胞外基質変性に対する保護作用を有する</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主査 Chief Examiner 福本 功</p> <p>副査 Vice-examiner 石田 達郎</p> <p>副査 Vice-examiner 森信 晴生</p> | | |

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

自己食食「オートファジー」は低栄養などのストレス条件下で細胞が自己の余剰蛋白や老廃物を分解、再利用して生存を図る細胞内恒常性維持機構である。このオートファジーは The mammalian target of rapamycin (mTOR) により抑制されている。mTOR は RAPTOR と複合した mTORC1 と RICTOR と複合した mTORC2 を形成し、mTORC1 は Akt に、Akt は mTORC2 に制御を受ける。mTORC1 は蛋白合成に関わる p70/S6K を調節し、オートファジーを抑制する。そこで今回研究者らは低栄養、低酸素といった過酷な環境下に存在する椎間板細胞ではオートファジーと mTOR シグナルが恒常性維持に重要な役割を果たしていると仮説し、mTOR シグナルに対する RNA 干渉法を用いた解析を行った。

方法

まず、不死化ヒト椎間板髄核細胞を用い mTOR, RAPTOR, RICTOR に対する siRNA をリポフェクション法で導入し、ウエスタンプロット法(WB)で mTOR 経路とオートファジー活性を検討した。次に IL-18 刺激を加え、24 時間後にアポトーシス、セネッセンス(細胞老化)、細胞外基質分解度の評価を TUNEL 染色、WB、定量 PCR で検討した。次に手術で得られたヒト椎間板髄核組織の初代培養細胞に RAPTOR に対する siRNA をリポフェクション法で導入し、同様の検討を行なった。また、手術により得られたヒト椎間板髄核組織より直接蛋白質を抽出し、WB にて mTOR シグナル関連蛋白の発現を検討した。統計学的解析には反復測定分散分析もしくは対応のある t 検定を用いて、 $P < 0.05$ を基準として統計学的有意差を検討した。

結果

まず不死化ヒト椎間板髄核細胞で各 siRNA が標的蛋白の発現を特異的に抑制することを確認した ($P < 0.01$)。リン酸化 Akt は mTOR と RICTOR 干渉群で減少していた一方で RAPTOR 干渉群ではリン酸化 Akt の増加を認めた。また全群でオートファジー活性は増加していた。次に IL-18 刺激により TUNEL 陽性細胞を増加させたが、RAPTOR 干渉群でのみ、その増加を抑制していた ($P < 0.01$)。以上より RAPTOR 干渉の有用性が示唆され、ヒト椎間板髄核細胞に対する検討を行った。IL-18 刺激によるアポトーシス関連 cleaved PARP, caspase-9 (WB), セネッセンス関連 p16/INK4A (WB), 細胞外基質分解酵素 MMP-2, -3, -9, -13 (WB) の誘導が RAPTOR 干渉により抑制された。また、定量 PCR にて collagen type 2 の発現は RAPTOR 干渉で増大していた ($P=0.02$)。

最後に手術により得られたヒト椎間板髓核組織による WB では、年齢とリン酸化 Akt および Akt の発現には負の相関があることが示唆された（リン酸化 Akt : $r=-0.716$, $P<0.05$, Akt : $r=-0.709$, $P<0.05$ ）。

考察および結論

本検討によりヒト椎間板における mTOR シグナル経路の関与が明らかとなった。ヒト椎間板髓核組織で Akt が発現し、加齢によりその活性が減少する可能性が示唆された。また椎間板髓核細胞における実験では mTOR, RAPTOR, RICTOR のいずれの RNA 干渉でも p70/S6K のリン酸化は抑制され、オートファジーは促進されたが、RAPTOR 干渉でのみ炎症刺激によるアポトーシスの誘導が抑制されていた。この RAPTOR 干渉によるアポトーシスの抑制効果は p70/S6K の抑制による class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を介したネガティブフィードバックにより Akt を活性化させたことが原因であると考えられた。

これまでにも関節軟骨特異的な mTOR 欠損マウスが、関節軟骨におけるオートファジーを誘導しアポトーシスおよび MMP-13 の抑制効果があるとの報告がある。本研究結果はこれらの報告と一致しているが、本研究ではオートファジーの誘導のみならず Akt の活性化も重要である可能性を示唆している。

本研究は、mTORC1 の選択的抑制による椎間板変性の抑制作用を研究したものであるが、従来行われていない椎間板変性と mTOR シグナル経路の関係を検討し、ヒト椎間板組織における Akt の発現を初めて証明した報告である。椎間板変性に対して mTOR シグナルの抑制が、新たな治療アプローチと成り得るとした点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。