



Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction

Kakiuchi, Yuji

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7539号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007539>

※ 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

Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction

mTORC2ではなくmTORC1のみの薬理学的阻害はAktとオートファジーを誘導し、ヒト椎間板髄核細胞の細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する

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)

垣内 裕司

【背景】

腰痛は生涯で約85%以上の人人が経験すると報告されている。また腰痛の原因は心理的要因、社会的要因など多くの因子が関与していると考えられている。

椎間板は髓核組織と、その周囲の線維輪からなる人体最大の無血管組織であり、細胞は低栄養に曝されている。椎間板変性は細胞死や細胞外基質代謝の不均衡を特徴とした退行性変化であり、腰痛の主たる原因の1つとされる。一方、オートファジーは細胞内の異常蛋白質や過剰細胞質などを自己分解することで新たな蛋白質やエネルギー源を生み出す仕組みの事であり、生体内の恒常性維持に関与していると報告されている。mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路は細胞の成長・維持に関する栄養情報を統合しており、オートファジーはその制御を受けている。我々は低栄養、低酸素等のストレス下にある椎間板髓核細胞においてオートファジーが細胞生存に寄与すると仮説し、椎間板細胞へのmTOR経路の関与について検討し、mTORへの遺伝子干渉が椎間板保護作用を来すことを報告した。しかし、どのような作用機序かは未だ不明である。また臨床応用には安全性の面から薬物による介入が望ましい。そこでmTORC1阻害薬ラバマイシン (Rap)、テムシロリムス (Tem)、エペロリムス (Eve)、クルクミン (Cur) の治療効果について比較検討を施行した。更にその有用性をもたらす機序を解明すべく、mTORC1・C2阻害薬INK128 (INK)、PI3K・mTOR阻害薬BEZ235 (BEZ)、TemとAkt阻害薬MK-2206 (MK)を併用し、解析を進めた。

【方法】

手術時に採取したヒト椎間板髄核28例を使用した。平均年齢は65±13.8歳 [27-83]、男性12例、女性16例、疾患は腰部脊柱管狭窄症15例、腰椎椎間板ヘルニア13例。Pfirrmann degeneration gradeで中等度変性進行群である3と4を使用した。ヒト椎間板髄核細胞を単層培養し、CCK-8法で各薬剤の細胞毒性を評価した。次にmTORC1阻害剤Rap、Tem、Eve、Curを添加し、ウエスタンプロット法でmTOR経路とその制御を受けるオートファジーの活性度を検討した。さらにIL-1 β 刺激下に4剤が細胞死、細胞老化、基質代謝へ及ぼす影響についてウエスタンプロット法、PCR法、TUNEL染色、SA- β -gal染色により検討した。統いて手術時に採取したヒト椎間板髄核より細胞を培養し、INK、BEZ、MKを添加し、ウエスタンプロット法でmTOR経路とその制御を受けるオートファジーの活性度を検討した。またIL-1 β 刺激下にINK、BEZ、MKが細胞死、細胞老化、基質代謝へ及ぼす影響についてウエスタンプロット法で評価した。

また手術時に採取したヒト椎間板髄核組織より直接蛋白検体を抽出し、mTOR関連シグナルの発現とリン酸化についてウエスタンプロット法で検討した。

【結果】

ラバマイシン、テムシロリムス、エペロリムスはいずれも1 μ M以上で、クルクミンは50 μ Mで細胞生存率が低下した($p<0.05$)。そのため4剤とも100nMで以後の検討を行った。ラバマイシン、テムシロリムス、エペロリムスではmTOR、p70/S6Kリン酸化の抑制とAktリン酸化の増大を認め、mTORC1阻害が確認された。これら3剤でオートファジーの亢

進を示し ($p < 0.05$)、テムシロリムスで最も顕著だった。IL-1 β 刺激下で 3 剤により細胞死マーカー cleaved PARP、cleaved caspase-9、細胞老化マーカー p16/INK4A の発現が抑制されたが ($p < 0.05$)、クルクミンでは差がみられなかった。TUNEL 法、SA- β -gal 法でも同様の傾向を認め ($p < 0.05$)、テムシロリムスで最も顕著だった。基質分解酵素 MMP2、3、9、13 の放出はラパマイシン、テムシロリムス、エペロリムスで抑制された ($p < 0.05$)。定量 PCR 法では IL-1 β により 2 型コラーゲンの発現が抑制されたが、Rap、Tem で有意の改善を認めた ($p < 0.05$)。

テムシロリムス、INK、BEZ は 1 μ M、MK は 10 μ M 以上で細胞生存率が低下したため ($p < 0.05$)、各々 100 nM と 5 μ M を用いることとした。テムシロリムスの投与により mTOR とその下流の p70/S6K のリン酸化の抑制と mTOR の上流に位置する Akt リン酸化の増大を認めたが、INK、BEZ、MK 単剤とテムシロリムス+MK 併用ではいずれも mTOR、p70/S6K、Akt リン酸化の抑制を認めた。Tem でオートファジーの亢進を示したが ($p < 0.05$)、INK、BEZ、MK、テムシロリムス+MK では亢進を認めなかった。IL-1 β で誘導された細胞死マーカー cleaved PARP、cleaved caspase-9、細胞老化マーカー p16/INK4A の発現が Tem で抑制されたが ($p < 0.05$)、INK、BEZ、MK、Tem+MK では増大していた。基質分解酵素 MMP2、3、9、13 の放出も Tem で抑制されたが、INK、BEZ、MK、Tem+MK では亢進していた ($p < 0.05$)。

さらに in-vivo でヒト椎間板髄核組織において、12 検体全ての組織でウエスタンブロット法により mTOR、Akt、p70/S6K の発現及びリン酸化を認めた。年齢は 19 から 81 歳、Pfirrmann degeneration grade は 2 から 5 であった。Pfirrmann degeneration grade 3 において mTOR、Akt、p70/S6K の発現及びリン酸化は最も顕著であった。

【考察】

ラパマイシン、テムシロリムス、エペロリムスによる mTORC1 阻害で Akt とオートファジーの亢進を認め、椎間板細胞保護作用が確認された。テムシロリムスはラパマイシン、エペロリムスの 2 剤に比べより強力な作用を認めたが、テムシロリムスの高親水性による影響と考えられた。また、その高親水性により投与方法に利点があり、椎間板変性治療薬としての Tem の有用性が示唆された。

しかし、INK、BEZ による mTORC1、C2 の阻害では Akt のリン酸化は抑制され、細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の亢進を認めた。

さらにテムシロリムスの椎間板保護効果は MK の添加により Akt を阻害することで抑制された。椎間板細胞保護にはオートファジーと Akt の活性が重要であり、またシグナル上流からの広範な抑制は細胞恒常性を破綻させる可能性が示唆された。

また椎間板髄核組織において、過去に我々は Akt の発現及びリン酸化は年齢とともに減少することを報告した。今研究ではさらに mTOR、Akt、p70/S6K の発現とリン酸化は中等度の変性度である Pfirrmann degeneration grade 3 において増加することを報告した。これらの結果により、年齢と変性度による mTOR シグナル経路の発現が椎間板組織の状態に影響する可能性が示唆された。

本研究の limitation としては in-vivo におけるデータの欠如が認められ、現在動物モデルを用いた実験を施行中である。

他の limitation としては単層細胞培養であり、三次元培養ではないことが挙げられる。また使用検体の年齢、性別、変性度が限定されており、今後検討すべき課題と考えられた。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|---------------------------------|------|
| 受付番号 | 甲 第 2883 号 | 氏名 | 垣内裕司 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Pharmacological inhibition of mTORC1 but not mTORC2 protects against human disc cellular apoptosis, senescence, and extracellular matrix catabolism through Akt and autophagy induction</p> <p>mTORC2ではなくmTORC1のみの薬理学的阻害はAktとオートファジーを誘導し、ヒト椎間板髄核細胞の細胞死、細胞老化、細胞外基質分解を抑制する</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> | <p>小川 透 伊藤 有理 井上 茂亮</p> | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

椎間板変性は細胞死や細胞外基質代謝の不均衡を特徴とした退行性変化であり、腰痛の主たる原因の一つとされる。一方、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路は細胞の成長・維持に関する栄養情報を統合しており、オートファジーはその制御を受けている。研究者らのグループは低栄養、低酸素等のストレス下にある椎間板髄核細胞においてオートファジーが細胞生存に寄与すると仮説し、椎間板細胞への mTOR 経路の関与について検討し、mTOR への遺伝子干渉が椎間板保護作用を来すことを報告した。しかし、その機序はまだ不明であり、今回研究者らは mTOR 阻害薬を用いて治療効果の比較検討し、その作用機序の解析を施行した。

手術時に採取したヒト椎間板髄核 28 例を使用した。ヒト椎間板髄核細胞を単層培養し、CCK-8 法で mTORC1 阻害薬ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、クルクミンの細胞毒性を評価した。次に各薬剤を添加し、ウエスタンプロット法で mTOR 経路とその制御を受けるオートファジーの活性度を検討した。さらに IL-18 刺激下に各薬剤が細胞死、細胞老化、細胞外基質代謝へ及ぼす影響についてウエスタンプロット法、PCR 法、TUNEL 染色、SA- β -gal 染色により検討した。続いてヒト椎間板髄核細胞を単層培養し、mTORC1・C2 阻害薬 INK128 (INK)、PI3K・mTOR 阻害薬 BEZ235 (BEZ)、テムシロリムスと Akt 阻害薬 MK-2206 (MK)を添加し、前述と同様の検討を施行した。

ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムスでは mTOR とその下流の p70/S6K のリン酸化の抑制と mTOR の上流に位置する Akt のリン酸化の増大を認め、mTORC1 阻害が確認された。これら 3 剤でオートファジーの亢進を示し、テムシロリムスで最も顕著であった。また同 3 剤で IL-18 刺激下による細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の亢進は抑制され、テムシロリムスで最も顕著だった。定量 PCR 法では IL-18 により 2 型コラーゲンの発現が抑制されたが、ラパマイシン、テムシロリムスで有意に改善を認めた。テムシロリムスの投与により mTOR、p70/S6K のリン酸化の抑制と Akt のリン酸化の増大を認めたが、INK、BEZ、MK 単剤とテムシロリムスと MK 併用では mTOR、p70/S6K、Akt のリン酸化の抑制を認めた。またテムシロリムスでオートファジーの亢進を示したが ($p < 0.05$)、INK、BEZ、MK 単剤、テムシロリムスと MK 併用では亢進を認めなかった。IL-18 刺激下による細胞死、細胞老化、細胞外基質分解の亢進に対してテムシロリムスによりその抑制を認めたが、INK、BEZ、MK 単剤、テムシロリムスと MK 併用ではむしろより亢進していた。

本研究では mTORC1 のみの阻害で Akt とオートファジーの亢進を認め、椎間板細胞保護作用が確認された。テムシロリムスはラパマイシン、エベロリムスの 2 剤に比べより強力な作用を認めたが、テムシロリムスの高親水性による影響と考えられた。椎間板細胞保護にはオートファジーと Akt の活性が重要であり、またシグナル上流からの広範な抑制は細胞恒常性を破綻させる可能性が示唆された。

本研究は、mTOR 阻害薬のヒト椎間板髄核細胞に対する作用機序及び保護作用を研究したものであるが、椎間板細胞保護にはオートファジーと Akt の活性が重要であることを初めて証明した報告である。椎間板変性に対して mTORC1 阻害薬を用いることが、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。