

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06885

研究課題名(和文)薬物誘発性致死性心筋症の分子機序解明 オートファジー・膜輸送制御系Rabの関与

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of drug-induced lethal cardiac myopathy; participation of autophagic process and the rab, intracellular membrane transport system

研究代表者

佐藤 岳哉 (SATO, TAKEYA)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10312696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ドキシソルビシンは、有効な抗がん剤であるが、心臓に対する致死的毒性を示す。その分子機構は不明な点が多い。本研究ではドキシソルビシンがオートファジーを阻害する分子機構を検討した。ドキシソルビシンはオートファジーを活性化する。活性化オートファジーは途中で阻害され、オートファジーは完結しない。ドキシソルビシンによるオートファジー阻害部位はオートファゴソームとリソソームの融合阻害であった。さらにミトコンドリア機能も障害する。そのため、機能障害ミトコンドリアを除去するオートファジーがドキシソルビシンで阻害され、そのために機能障害ミトコンドリアの細胞内蓄積・酸化ストレス亢進による心筋細胞死が誘導される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤であるドキシソルビシンの副作用である心筋障害にオートファジー障害がある。しかしながらその分子機構の詳細は、これまで不明であった。本研究においてドキシソルビシンはオートファジーを活性化するが、その途中過程を阻害するために、オートファジーが完結せず、オートファジー不全を起こすことを見出した。今後、この問題に着目して、ドキシソルビシンのオートファジー不全を改善する方法を見出すことにより、ドキシソルビシン誘発心筋障害を軽減することができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Doxorubicin is an effective anticancer drug against various cancers. However, it shows lethal toxicity to the heart, and the molecular mechanism remains unclear. In this study, we found that doxorubicin inhibited autophagy and investigated its molecular mechanism. We found that doxorubicin activated autophagy; however, activated autophagy was inhibited midway, and autophagic flux was not completed. This study revealed that the site of inhibition of autophagy by doxorubicin is the fusion inhibition of autophagosomes and lysosomes. In addition, mitochondrial function was impaired. Therefore, autophagy, which removes dysfunctional mitochondria, is inhibited by doxorubicin, which induces myocardial cell death due to the increased oxidative stress caused by the intracellular accumulation of dysfunctional mitochondria.

研究分野：分子細胞薬理学

キーワード：オートファジー 薬物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**オートファジーおよびRab**：オートファジーは、様々な生体分子（タンパク質、脂質、オルガネラ等）をオートファゴソームに取り込んだ後、リソソームと融合して内容物を、加水分解することで細胞内生体分子の品質管理を行うことで、細胞内環境の恒常性を維持するために重要なプロセスである。オートファジーの進行にはAutophagy (ATG)ファミリータンパク質など多数の因子が関与することが知られている。オートファジーは、細胞の恒常性維持に関与するため、オートファジー障害は、様々な疾患（神経変性疾患、心筋障害など）を誘発する。

オートファジーにおいてLC3-IIはATG7によってLC3-Iに変換された後、Autophagosomeに組み込まれるので、LC3-IIの生成量がオートファジーの進行度を測定する尺度として用いられている。

抗ガン治療、抗ウイルス治療、分子標的治療法成功とともに、薬物の副作用である“心毒性”（薬物誘発性心筋症）が問題となってきた抗がん剤(Doxorubicin: Dox)などはミトコンドリア障害という副作用を誘発し、致死性心筋症を発症する。DoxやNRTI（アジドチミジン:AZTを含む）などは、酸化ストレス亢進によるミトコンドリア機能障害を誘発する。このミトコンドリア機能障害は酸化ストレスを悪化させ、過度の酸化ストレス亢進により細胞死が誘導される。

今回の申請で着目した薬物は、それぞれオートファジーを阻害することが報告されているが、これらの薬物がオートファジーにどのように影響を与えているかについては十分な検討が行われておらず、未解明な点も多い。

## 2. 研究目的

これらの薬物を例として、生体内環境維持に重要なオートファジー阻害による薬物誘発性心毒性発現において、どのようなメカニズムで、オートファジーに影響をあたえているかを検討することを目的とした。

## 3. 研究方法

本申請研究は、オートファジーを阻害して、薬物誘発心筋症を発症することが報告されている抗がん剤Doxorubicinが、オートファジーにどのように阻害し、またミトコンドリア機能にどのように影響を与えているかを検討することで、薬剤誘発心筋症の分子機構を解明する。ラット心筋由来H9c2細胞を評価系として用いる。以下の項目A-Cについて検討を行う。

### 薬物のオートファジー経路に対する影響の評価

#### (1) オートファジー活性の評価

薬物によるオートファジー阻害の確認には、オートファゴソームマーカーLC3-IIの量的変化を指標としてLC3に対する特異抗体を用いるWestern blot法で評価した。また、オートファジー開始マーカーのATG16L1についてもATG16L1に対する特異抗体を用いるWestern blot法で評価した。

オートファゴソームマーカーStx17、リソソームマーカーVAMP8、さらにStx17とVAMP8の相互作用を介するSNAP29に対する抗体を用いて、Western blot法でSNAP29を用いて免役沈降物に含まれるStx17とVAMP8の量を定量し、ドキシソルピシンによるStx17とVAMP8の相互作用に対する影響を評価した。

### **(2) 薬物により障害されたミトコンドリアの細胞内蓄積量の評価**

オートファジーが障害されると薬物により障害を受けたミトコンドリアが細胞内に蓄積する。ミトコンドリアを特異的に染色するMitotracker Greenを用いて細胞を染色した後、細胞あたりのミトコンドリア量(Mitochondrial mass)をFACSにより定量した。

### **(3) 薬物障害ミトコンドリア産生活性酸素分子種(ROS)の評価**

薬物障害ミトコンドリアはROS産生が亢進する。ミトコンドリア産生ROSと特異的に反応するDHR123で細胞を染色し、DHR123の特異的な蛍光量を蛍光プレートリーダーあるいはFACSを用いて定量した。

### **(4) 薬物処理によるリソソーム機能への影響の評価**

薬物がリソソーム機能に影響を与えると内部の酸性化(pHの低下)が阻害され、リソソーム内の加水分解酵素活性発現が阻害され、オートファジー活性が低下する。薬物処理した細胞を、pH感受性蛍光色素アクリジンオレンジで細胞を染色後、FACSあるいは蛍光プレートリーダーを使用して蛍光強度を測定した。

### **(5) qPCR法によるオートファジー関連LC3Bの遺伝子発現変化の検討**

薬物誘導性オートファジー障害に関連するLC3B分子の発現変化を検討するため薬物処理したH9c2細胞から調製したcDNAを用いてオートファジー関連LC3Bに対するqPCRを行い、発現量を定量した。

## **4. 研究結果**

### **薬物のオートファジー経路に対する影響の評価**

#### **(1) オートファジー活性の評価**

H9c2細胞を種々の濃度のDoxorubicinで24時間培養を行った。H9c2細胞は用量依存的生細胞数の減少を示し、DoxorubicinのH9c2に対するIC50濃度は447 nMであった。また、1 μM Doxorubicinで48時間培養すると24時間の培養に比して、細胞死が亢進し、ほとんどの細胞が死滅したので、今後の実験系ではDoxorubicin 1 μM, 24時間の条件で行うことにした。

この条件下で培養した細胞のオートファジー活性についてWestern blotで評価した。H9c2細胞を1 μM Doxorubicinで処理するとオートファジーマーカーであるLC3B-IIの発現が亢進し、オートファジー基質のp62が蓄積する現象が観察された。さらにLC3Bに対する抗体を用いる免疫染色においてもWestern blotと同じ結果が観察された。さらにLC3BのqPCRやオートファジー開始因子ATG16L1のWestern blotでは、DoxorubicinはH9c2細胞においてオートファジーを活性化すること、さらにDoxorubicinはオートファジーの進行を途中で阻害していることを見出した。

オートファゴソームは、リソソームと融合してオートリソソームを形成、その後オートファゴソームの内容物をリソソーム加水分解酵素で加水分解し、構成物を細胞質にリサ

イクルする。オートファゴソームとリソソームの融合にはオートファゴソーム上の Stx17、リソソーム上 VAMP8 が、SNAP29 を介して Stx17 と VAMP8 の相互作用することで進行する。そのため、ドキシソルビシンによるオートファジー障害の作用部位として Stx17 と VAMP8 の相互作用が減弱している可能性を SNAP29 を用いる免役沈降法で検討を行った。その結果、ドキシソルビシンは SNAP29 を介する Stx17 と VAMP8 の相互作用を減弱し、そのためにオートリソソーム形成が低下する。その結果、オートファジー障害が起きていることが明らかになった。

#### (2) 薬物により障害されたミトコンドリアの細胞内蓄積量の評価

Doxorubicin 処理後の細胞の mitochondrial mass について評価した。Doxorubicin 処理により、Mitotracker のシグナルは有意に増加し、ミトコンドリアが細胞内に蓄積していることを見出した。さらにミトコンドリア内膜の膜電位を JC-1 で測定したところ、対照に比して有意に低下していたことから、Doxorubicin はミトコンドリア機能不全を誘発していることが判った。

#### (3) 薬物障害ミトコンドリア産生活性酸素分子種(ROS)の評価

(2)の結果より Doxorubicin はミトコンドリア機能不全を誘発することが明らかになったので、ミトコンドリア由来活性酸素の産生も亢進すると予測された。そこでミトコンドリア ROS 特異的 DHR123 で細胞を染色し、DHR123 蛍光を測定した。その結果、Doxorubicin はミトコンドリア ROS 産生を亢進させることが明らかとなった。

#### (4) 薬物処理によるリソソーム機能への影響の評価

(1)で見出した Doxorubicin によるオートファジー障害はリソソームの酸性化障害である可能性がある。そこで、リソソームの酸性化についてアクリジンオレンジを用いて定量した。その結果、リソソーム酸性化障害薬であるバフィロマイシンでは酸性化障害が観察されたが、Doxorubicin では観察されなかった。

以上の検討結果より、Doxorubicin によるオートファジー障害には、文献的にはオートファジー-過程の様々な点に作用する。本研究で見出したオートファゴソームとリソソームの融合を障害する点は新規な発見で、特にドキシソルビシンが Stx17 と VAMP8 の相互作用を減弱することでオートリソソーム形成するという新規の分子機構を提唱した。本研究結果は、これまでにない Doxorubicin 誘発心筋障害の一つの標的部分として、新規の治療法の標的であることを提唱する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Masaki Saito, Linran Cui, Marina Hirano, Guanjie Li, Teruyuki Yanagisawa, Takeya Sato and Jun Sukegawa	4. 巻 96
2. 論文標題 Activity of Adenylyl Cyclase Type 6 Is Suppressed by Direct Binding of the Cytoskeletal Protein 4.1G	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 441-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/mol.119.116426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 斎藤 将樹、佐藤 岳哉	4. 巻 153
2. 論文標題 シグナル受容器・一次繊毛研究の現状：繊毛病の病因解明にむけた基礎研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.153.117.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 斎藤将樹、佐藤岳哉	4. 巻 153
2. 論文標題 シグナル受容器・一次繊毛研究の現状：繊毛病の病因解明にむけた基礎研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.153.117.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito M, Sakaji K, Otsu W, Sung CH.	4. 巻 8
2. 論文標題 Ciliary assembly/disassembly assay in non-transformed cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e2773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.2773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Noriko Toda, Takeya Sato, Mikio Muraoka, Delan Lin, Masaki Saito, Guanje Li, Qui Chao Song, Teruyuki Yanagisawa, Masanori Yamauchi	4. 巻 195
2. 論文標題 Doxorubicin induces cardiomyocyte death owing to the accumulation of dysfunctional mitochondria by inhibiting the autophagy fusion process	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 47-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito M, Chiba A, Sato T, Moriya T, Sukegawa J, Nakahata N.	4. 巻 145
2. 論文標題 Tctex-1 augments G protein-coupled receptor-mediated G(s) signaling by activating adenylyl cyclase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci.	6. 最初と最後の頁 150-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.11.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito M, Hirano M, Izumi T, Mori Y, Ito K, Saitoh Y, Terada N, Sato T, Sukegawa J	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytoskeletal Protein 4.1G Is Essential for the Primary Ciliogenesis and Osteoblast Differentiation in Bone Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2094-2108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 李冠傑、戸田法子、斎藤将樹、山内正憲、谷内一彦、佐藤岳哉
2. 発表標題 ドキシソルビシン誘発心筋症の分子機構 オートファジー融合過程の阻害
3. 学会等名 第13回リトリート大学院生研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李冠傑、戸田法子、山内正憲、斎藤将樹、佐藤岳哉
2. 発表標題 致死性心筋症を誘発する薬物性オートファジー障害の分子機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤岳哉、斎藤将樹、吉川雄朗、長沼史登、中村正帆、岡村信行、柳澤輝行、谷内一彦
2. 発表標題 医学部学生に対してイオントラップの概念を理解するためのアスピリンを用いた薬物動態学実習
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤将樹、崔林然、平野鞠菜、李冠傑、柳澤輝行、佐藤岳哉、助川淳
2. 発表標題 膜裏打ちタンパク質4.1Gはアデニル酸シクラーゼ6に直接結合しPTH受容体のGsシグナルを抑制する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李冠傑、斎藤将樹、戸田法子、山内正憲、谷内一彦、佐藤岳哉
2. 発表標題 ドキシソルピシン誘発心筋症の原因は、オートファジーの融合過程の阻害のためである
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sara Ebrahimi Azar, Kenji Sakaji, Takeya Sato, Masaki Saito
2. 発表標題 MAST4, a function-unknown protein, promotes cell cycle progression through accelerating primary ciliary resorption
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sara Ebrahimi Azar, Kensuke Sakaji, Takeya Sato, Masaki Saito
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms of Primary Ciliary Resorption and Cell Cycle Progression by a Dynein Light Chain, Tctex-1
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaki Saito, Sara Ebrahimi Azar, Kenji Sakaji, Takeya Sato
2. 発表標題 "Regulatory mechanisms of cell cycle progression through primary ciliary resorption."
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤岳哉、野村亮介、斎藤将樹、助川淳、久志本茂樹、柳澤輝行
2. 発表標題 Mitochondrial nonspecific channel is crucial for the manintenance of their function.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 佐藤岳哉
2. 発表標題 Mitochondrial quality control system and autophagy
3. 学会等名 43th SNUH R&D SEMINAR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 岳哉、李 冠傑、斎藤 将樹、助川 淳、柳澤輝行
2. 発表標題 融合タンパク質プローブを用いるAutophagic flux定量方法確立
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeya Sato, Ryosuke Nomura, Shigeki Kushimoto, Teruyuki Yanagisawa
2. 発表標題 Disruption of mitochondrial dynamics by azidothymidine-triphosphate causes lethal cardiomyopathy
3. 学会等名 第91回日本薬理学会年会 第18回 国際薬理学・臨床薬理学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田法子、村岡幹夫、荒木峻、山内正憲、柳澤輝行、佐藤岳哉
2. 発表標題 Autophagic fluxの阻害によるドキシソルピシン誘発性心筋障害の分子機構
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Toda, Guanjie Li, Masanori Yamauchi, Teruyuki Yanagisawa
2. 発表標題 Anthracycline antibiotics, doxorubicin impacts on the fusion of autophagosome with lysosome on the autophagy flux
3. 学会等名 第91回日本薬理学会年会 第18回 国際薬理学・臨床薬理学会議(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeya Sato, Mikio Muraoka, Noriko Toda, Guanjie Li, Masanori Yamauchi, Masaki Saito, Teruyuki Yanagisawa
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Doxorubicin-induced cardiomyopathy, involvement in the impairment of mitophagy
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guanjie Li, Delan Lin, Noriko Toda, Masaki Saito, Masanori Yamauchi, Kazuhiko Yanai, Takeya Sato
2. 発表標題 EGFP-tagged Syntaxin 17 (STX17) localized on autophagosome is increased by Doxorubicin
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Saito, Ayano Chiba, Takeya Sato, Jun Sukegawa
2. 発表標題 Tctex-1 augments parathyroid hormone receptor-mediated Gs signaling by activating adenylyl cyclase
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Saito, K. Sakaji, S. EbrahimiAzar, T. Sato, C. Sung
2. 発表標題 Mechanism of primary ciliary resorption by phosphorylated Tctex-1
3. 学会等名 ASCB 2020 virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sara Ebrahimi Azar、阪路 健祐、佐藤 岳哉、斎藤 将樹
2. 発表標題 MAST4 accelerates primary ciliary resorption and cell cycle re-entry through activation of Cdc42
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤岳哉、斎藤将樹、野村亮介、助川淳
2. 発表標題 ミトコンドリア特異脂質カルジオリピンとミトコンドリア代謝に対する酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第70回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeya Sato , Ryosuke Nomura, Masaki Saito, Jun Sukegawa, Teruyuki Yanagisawa.
2. 発表標題 Mitochondrial nonspecific channel has crucial roles for maintaining of their function and cell 's survival.
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸田 法子 (Toda Noriko) (50375052)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師  (11301)	
研究分担者	斎藤 将樹 (Saito Masaki) (50400271)	東北大学・医学系研究科・助教  (11301)	
研究分担者	野村 亮介 (Nomura Ryosuke) (90400358)	東北大学・大学病院・助教  (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------