

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08399

研究課題名(和文)小胞体選択的オートファジーの制御システムを標的とした心不全発症機序の解明

研究課題名(英文)Endoplasmic reticulum selective autophagy alleviates chronic heart failure

研究代表者

前嶋 康浩(MAEJIMA, YASUHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40401393

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(DOX)は小胞体(ER)ストレスの誘導によっても心毒性を發揮する。我々は本研究において小胞体選択的オートファジー(ER-phagy)によるERストレスの軽減作用がDOXによる心毒性を低減していることを見いだした。具体的には、心筋細胞におけるER-phagyをモニタリングするためのin vitroおよびin vivoの実験系を確立し、さらにはER-phagyの鍵分子であるCCPG1の機能喪失実験を行うことによって、DOXによってERストレスが増加して心筋傷害が惹起される機序にはCCPG1を介したER-phagyの活性化が深く関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見いだすことのできたERファジーの制御異常による心不全の発症および病状進展を引き起こす分子機序の解明は、難治性疾患である慢性心不全の治療のみにとどまらず、動脈硬化症、神経変性疾患、悪性腫瘍などERストレスが重要な役割を果たしていると考えられている疾患全般の治療に応用可能な治療法の開発の端緒になり得る重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Administration of Doxorubicin (Dox) induces progressive and dose-related cardiac damage through several cytotoxic mechanisms, including endoplasmic reticulum (ER) stress. We aimed to clarify whether ER-selective autophagy machinery (ER-phagy) serves as an alternative system to protect cardiomyocytes from ER stress caused by anthracycline drugs. Dox-induced cardiomyopathy models of ER-phagy reporter mice showed marked activation of ER-phagy in the myocardium compared to those of saline-treated mice. Dox enhanced the expression of CCPG1 in H9c2 cells and ablation of CCPG1 in H9c2 cells resulted in the reduced ER-phagy activity, accumulation of pro-apoptotic proteins and deterioration of cell survival against Dox administration. CCPG1-hypomorphic mice developed more severe deterioration in systolic function in response to Dox compared to wild-type mice. Our findings highlight a compensatory role of CCPG1-driven ER-phagy in reducing Dox toxicity.

研究分野：循環器内科学

キーワード：がん治療関連心筋障害 アントラサイクリン系抗がん剤 慢性心不全 小胞体ストレス 小胞体選択的オートファジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ER ストレスとは、虚血や酸化ストレスをはじめとする各種ストレスによって ER で起こるタンパクの折りたたみが攪乱される状態であるが、心不全の発症や病状進展に深く関与していることが知られている (Okada K, et al. *Circulation* 2004)。ER ストレスが生じると、それに対する防御機構である小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response: UPR) が誘導されるが、UPR で対応不能な場合には ER からアポトーシスを促進するシグナルが発信されて細胞死が生じる。最近、このような状態に陥った ER が選択的オートファジーのひとつである小胞体選択的オートファジー (ER ファジー) によって除去される機構が存在することが明らかにされた (Smith MD, et al. *Dev Cell* 2018)。心筋細胞や神経細胞のような非増殖細胞は長寿命を保つ必要があるため、アポトーシスを回避することができるシステムである ER ファジーに大きく依存している可能性が高く、ER ファジーのシステムが破綻すると心筋細胞は深刻なダメージを被ることが容易に想像されるが、現状では心筋細胞における ER ファジーの役割やその制御システムについては全く解明されていない。Cell cycle progression gene 1 (CCPG1) は ER ストレス時に働く ER ファジーの受容体であるが、オートファジー制御分子 FIP200 と LC3 の両方のタンパクに結合し、ER がオートファゴソームにより選択的に包み込まれるのを促進する役割を果たしている。しかしながら、ER ストレス下で CCPG1 がどのようにして活性化するのかについては全くわかっていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景及びこれまでの研究成果をもとに、本研究は ER ファジーによりダメージを受けた ER が分解される分子機序を解明し、心不全の発症および病状進展の過程にこのメカニズムの機能不全が関与していることを示した上で、新規の心不全治療法の開発に資する基礎データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

ER-phagy レポーター蛋白をコードする ssRFP-GFP-KDEL 遺伝子を心筋細胞に導入し、ER-phagy 活性をモニタリングすることが可能なレポーター細胞を作成するとともに、心筋特異的にレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらレポーターモデルの ER-phagy 活性については、蛍光顕微鏡およびウエスタンブロット法を用いて評価した。DOX による ER-phagy 誘導機構を検証するために、DOX 投与前後の心筋細胞における ER-phagy 制御分子の遺伝子発現量を qRT-PCR により解析し、発現変化が見られる分子に注目した。標的分子が ER-phagy の誘導に及ぼす影響を検討するために、レンチウイルス発現ベクターを用いた RNA 干渉法と遺伝子改変技術によって標的分子の機能喪失心筋細胞および蛋白低発現マウスを樹立した。これらの機能喪失モデルに DOX を投与した際の ER-phagy 活性を評価し、さらに心筋細胞の表現系と心筋組織の表現系についても解析した。標的分子を組み込んだレンチウイルスベクターを作成して心筋細胞に導入し、蛋白強制発現細胞での ER-phagy 活性の評価と細胞の表現型解析を行った。標的分子の相互作用蛋白を探索するために、磁気ビーズを用いた免疫沈降法と質量分析を組み合わせて網羅的な蛋白解析を実施した。

4 . 研究成果

レポーター細胞とトランスジェニックマウスの解析から、DOX によって ER-phagy 活性が上昇することが明らかとなった。また、心筋細胞に DOX を投与することで CCPG1 の遺伝子発現レベルが上昇することが分かり、CCPG1 の機能喪失により DOX による ER-phagy 誘導が著明に抑制されることを確認した。さらに、CCPG1 機能を喪失した心筋細胞では DOX による小胞体ストレスマーカー（CHOP、リン酸化 eIF2 α ）の発現が上昇し、アポトーシスシグナル（Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-12）が有意に増加することを見出した。さらに、CCPG1 低発現マウスを樹立後にドキシソルピシン心筋症を誘導したところ、野生型マウスに比べて CCPG1 低発現マウスで有意な心機能低下と心筋間質の繊維化の有意な増悪が引き起こされることを見出した（左室駆出率：野生型 vs. CCPG1 低発現マウス：54.4 \pm 1.8% vs. 47.2 \pm 1.5%、 $P < 0.05$ ）。CCPG1 を強制発現した心筋細胞では、ER-phagy の活性化は観察されず、DOX に対する心筋傷害の抑制効果も無かった。CCPG1 を介した ER-phagy の発現制御機構を詳細に調べるために、HEK293 細胞を用いて CCPG1 と相互作用する蛋白質の網羅的解析を実施した。解析結果から TBK1 を同定し、in vitro の実験系で CCPG1 と TBK1 が直接結合することを立証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakagama S, Maejima Y, Fan Q, Shiheido-Watanabe Y, Tamura N, Ihara K, Sasano T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum selective autophagy alleviates anthracycline-induced cardiotoxicity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC CardioOncol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Maejima Y, Zablocki D, Nah J, Sadoshima J.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 The role of the Hippo pathway in autophagy in the heart.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovasc Res.	6. 最初と最後の頁 cvac014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvac014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ito Y, Maejima Y, Nakagama S, Shiheido-Watanabe Y, Tamura N, Sasano T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Rivaroxaban, a Direct Oral Factor Xa Inhibitor, Attenuates Atherosclerosis by Alleviating Factor Xa-PAR2-Mediated Autophagy Suppression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	6. 最初と最後の頁 964-980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2021.09.010.	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 Chen Y, Maejima Y, Shirakabe A, Yamamoto T, Ikeda Y, Sadoshima J, Zhai P.	4. 巻 1
2. 論文標題 Ser9 phosphorylation of GSK-3 promotes aging in the heart through suppression of autophagy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cardiovasc Aging.	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20517/jca.2021.13.	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 Tamura N, Maejima Y, Shiheido-Watanabe Y, Nakagama S, Isobe M, Sasano T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasma apolipoprotein C-2 elevation is associated with Takayasu arteritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98615-3.	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 Shiheido-Watanabe Y, Maejima Y, Kasama T, Tamura N, Nakagama S, Ito Y, Hirao K, Isobe M, Sasano T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Linagliptin, A Xanthine-Based Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	6. 最初と最後の頁 527-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2021.04.006.	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 前嶋康浩	4. 巻 35
2. 論文標題 小胞体選択的オートファジーの分子機構および疾患の関わり	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1149-1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shun Nakagama, Yasuhiro Maejima, Tetsuo Sasano
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum (ER)-selective autophagy alleviates ER stress-mediated myocardial injury
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中釜瞬、前嶋康浩、渡辺由佳、田村夏子、笹野哲郎
2. 発表標題 The critical role of endoplasmic reticulum (ER)-selective autophagy in response to ER stress-mediated myocardial injury
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------