

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16028

研究課題名(和文)ドキシソルビシン心筋症における細胞死誘導シグナル相互連関の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the cell death signal interconnections in doxorubicin-induced cardiomyopathy.

研究代表者

大和田 渉 (Ohwada, Wataru)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70896589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスドキシソルビシン心筋症モデルにおいて左室駆出率と生存率の低下を認め、フェロトーシスの活性化やオートファジー障害に加え、ネクロトーシスの最終調節蛋白であるMLKL活性化を認め、ネクロトーシスの誘導も示唆された。これはネクロトーシス誘導シグナルであるRIPK1の阻害で改善しなかったため、RIPK1非依存性経路であることが示唆された。mTOR阻害薬であるラパマイシンの投与は有意にMLKL活性を低下させ、左室駆出率と生存率を改善させた。以上の結果からドキシソルビシン心筋症におけるRIPK1非依存性ネクロトーシスの関与が示唆され、ラパマイシンが新規治療薬となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドキシソルビシンは投与量依存性に心不全を引き起こすものの、特異的治療方法は未だ確立していない。その病態に鉄沈着や活性酸素、アポトーシスやフェロトーシスの関与が想定されているが、ネクロトーシスが関与するかは未だ解明されていない。またラパマイシンなどのmTOR阻害薬はがんの縮小に寄与することが示唆されている。本研究におけるドキシソルビシン心筋症へのRIPK1非依存性ネクロトーシスを中心とした細胞死機序連関の関与およびラパマイシンによる心機能、生存率の改善とネクロトーシス抑制機序の解明はドキシソルビシン心筋症の発症機序とその治療法の解明に寄与し、さらにはがん治療への応用も期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our doxorubicin-induced cardiomyopathy mouse model showed a significant decrease in left ventricular ejection fraction and survival rate. Correspondingly, we observed substantial upregulation of ferroptosis, disturbance of autophagy, and an increase in the activity of MLKL, a crucial regulatory protein involved in necroptosis, indicating the induction of necroptosis. The administration of rapamycin, an mTOR inhibitor, notably reduced MLKL activity and enhanced both the left ventricular ejection fraction and survival rate, but not those induced by RIPK1 inhibitor. From these findings, we infer the participation of RIPK1-independent necroptosis in doxorubicin-induced cardiomyopathy. Moreover, our results highlight that rapamycin may become a novel therapeutic agent for this condition.

研究分野：腫瘍循環器

キーワード：ネクロトーシス ドキシソルビシン心筋症 MLKL ラパマイシン オートファジー アポトーシス フェロトーシス ミトコンドリア

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

悪性腫瘍の化学療法は飛躍的に進歩し、生命予後の更なる延長が期待されているが、一方で「がんサバイバー」の増加と抗がん剤・放射線治療による心障害が注目されている。ドキソルビシンに代表されるアントラサイクリン系抗がん剤は造血管腫瘍や乳癌などの固形癌に極めて有効であるが、投与量依存性に心機能が低下し、3~26%で致死性心不全を発症する(J Am Coll Cardiol. 2009)。ドキソルビシン心筋症の治療は従来からの一般的な心不全治療に対するRAS阻害薬やβブロッカーなどに終始しており一定の効果は挙げているものの、特効薬とは言い難く、今後ドキソルビシン心筋症の病態解明とその特異的治療方法の開発が急務であると考えられる。

ドキソルビシン心筋障害の機序として、トポイソメラーゼII阻害による核、ミトコンドリアDNAの障害、活性酸素種(ROS)で誘導されるミトコンドリア透過性遷移孔(mPTP)開口による細胞死、ミトコンドリア鉄過剰およびグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)低下によるプログラム細胞死(フェロトーシス)の誘導、などが想定されており(Circ Res. 2020, Eur J Pharmacol. 2020)ミトコンドリアはドキソルビシン心筋障害の主座である。mPTP開口によるミトコンドリア機能障害はさらなるROS産生とミトコンドリアDNA(mtDNA)の細胞質への放出を誘導する。

申請者は核に局在するERK1/2特異的脱リン酸化酵素であるDUSP5がROSによりミトコンドリア移行し、Akt特異的脱リン酸化酵素であるPHLPP-1との協調的作用を介してmPTP開口を促進することを解明した(Ohwada, et al. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020.)。mPTP開口は複数のリン酸化酵素によって調節されているが、ドキソルビシンがミトコンドリア内リン酸化・脱リン酸化酵素の局在・活性に与える影響は不明である。mtDNAがToll-like receptor(TLR)9刺激を介してRIPK3依存性プログラム細胞死であるネクロプトーシスを誘導することが報告されており、ドキソルビシンによるmPTP開口はmtDNA細胞質放出やROS過剰産生を介してネクロプトーシスやフェロトーシスを誘導する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は「プログラム細胞死制御機構を標的としたドキソルビシン心筋症治療の開発」である。今回の研究はドキソルビシン心筋症におけるネクロプトーシスを中心とした細胞死機序の活性化の有無、DUSP5やPHLPP-1の発現レベルと細胞死誘導シグナルの関与、ミトコンドリア内リン酸化酵素(Akt、ERK1/2、GSK-3β)及び脱リン酸化酵素(DUSP5、PHLPP-1)の局在、活性に与える影響とmPTP開口閾値との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ラット心筋芽細胞(H9c2)にドキソルビシン0~20 μmol/L添加し24時間後にLDHを測定し、細胞死を評価した。ネクロプトーシスの評価のためRIPK1阻害薬であるネクロスタチン1 50 μmol/Lをドキソルビシン投与1時間前から投与しLDHを測定した。またsiRNAによりRIPK3とMLKLをノックダウンしてLDH活性を評価した。

(2)C57BL/6マウスへドキソルビシン10 mg/kgをday 0、2、4に投与することでドキソルビシン心筋症モデルを作成した。心臓MRIを用いることでcine MRI画像から左室駆出率(LVEF)を計測し、また生存率についても評価した。Day 5に心臓を抽出し、ウェスタンブロットでネクロプトーシス、フェロトーシス、アポトーシス、オートファジー誘導蛋白を評価した。また、ネクロスタチン1を6 mg/kg、mTOR阻害薬であるラパマイシンを0.25 mg/kg、ドキソルビシン投与1時間前に投与し、同様にLVEF、生存率、蛋白測定を行った。Day 5に抽出した心筋からcDNAを抽出し、MLKLの変化を観察した。

(3)C57BL/6マウスへのドキソルビシン、ラパマイシンを投与後day 5に抽出した心筋において、MLKLの活性体であるリン酸化MLKL(Ser345)の免疫染色を評価した。

4. 研究成果

2021年の研究開始から2023年3月31日までの期間における主な研究成果は以下の通りである。

(1)H9c2ラット心筋芽細胞へのドキソルビシン投与により、LDH活性は濃度依存性に上昇し、5 μmol/Lから有意な上昇が確認され、ドキソルビシン投与によるネクロトーシスが示唆された。siRNAを使用することでRIPK3、MLKLは有意に抑制された。このときRIPK3では有意差はなかったものの、両者ともにドキソルビシン投与によるLDH活性は抑制された。しかしながらRIPK1の阻害薬であるネクロスタチン1の投与ではLDHに変化は認めなかった。以上からドキソルビシンは心筋芽細胞においてネクロトーシスを誘導し、ネクロプトーシスの関与が示唆され

たが、これは古典的ネクロプトーシス経路に必要な RIPK1 に非依存的であることが考えられた。

(2) ドキソルビシン投与マウスにおいて生存率と左室駆出率は有意に低下した。このことからドキソルビシン心筋症モデルマウスが作成できていると考えられた。抽出した左室心筋においてフェロトーシスの亢進傾向、オートファジーフラックス障害、DUSP5 の上昇が確認された。興味深いことに C57BL/6J マウスではドキソルビシン投与群で cleaved-caspase 3 は有意に上昇したが、C57BL/6N マウスにおいては有意な上昇は確認できなかった。これらは系統の違いによる可能性が示唆された。また、RIPK3、MLKL はドキソルビシン投与群にて有意に上昇を認め、ネクロプトーシスが活性化していると考えられた。ネクロスタチン 1 の投与により、生存率、左室駆出率は変化がなく、同様に RIPK3、MLKL にも変化を認めなかった。このことから RIPK1 非依存性ネクロプトーシスが関与していると考えられた。科研費計画当初は予定していなかったが、当研究室では細胞実験においてラパマイシンの投与によりネクロプトーシスの活性を抑制することを報告しており (Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019)、続いてラパマイシン投与による影響を観察した。ラパマイシン投与群のドキソルビシン心筋症マウスにおいて生存率、左室駆出率は有意に改善し、さらに左室心筋の MLKL の上昇も抑制した。これらのことからラパマイシンは MLKL の活性を抑制することで心筋障害を改善させることが示された。

(3) 同心筋の免疫組織染色で、ドキソルビシン投与マウスにおいて活性型であるリン酸化 MLKL が心筋にて有意に蓄積していた。さらにラパマイシンはこれを有意に抑制した。以上からラパマイシンによるネクロプトーシス抑制がドキソルビシン心筋症の抑制に寄与する可能性が示唆された。

なお、科研費申請当初に計画していたミトコンドリア内の細胞保護シグナルや脱リン酸化酵素の検討、心筋代謝の検討、ドキソルビシン心筋症患者におけるネクロプトーシスの評価は本研究期間内には施行が困難であったため、次回以降の課題とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shibata Satoru, Moniwa Norihito, Kuno Atsushi, Kimura Ayumu, Ohwada Wataru, Sugawara Hirohito, Gocho Yufu, Tanaka Marenao, Yano Toshiyuki, Furuhashi Masato, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Miura Tetsuji	4. 巻 25
2. 論文標題 Involvement of necroptosis in contrast-induced nephropathy in a rat CKD model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02048-1	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 -

1. 著者名 Ino Shoya, Yano Toshiyuki, Kuno Atsushi, Tanno Masaya, Kouzu Hidemichi, Sato Tatsuya, Yamashita Tomohisa, Ohwada Wataru, Osanami Arata, Ogawa Toshifumi, Toda Yuki, Shimizu Masaki, Miura Tetsuji	4. 巻 151
2. 論文標題 Nuclear translocation of MLKL enhances necroptosis by a RIP1/RIP3-independent mechanism in H9c2 cardiomyoblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 134 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.12.009	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 Ogawa Toshifumi, Kouzu Hidemichi, Osanami Arata, Tatekoshi Yuki, Sato Tatsuya, Kuno Atsushi, Fujita Yugo, Ino Shoya, Shimizu Masaki, Toda Yuki, Ohwada Wataru, Yano Toshiyuki, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Miura Tetsuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Downregulation of extramitochondrial BCKDH and its uncoupling from AMP deaminase in type 2 diabetic OLETf rat hearts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15608	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 Osanami Arata, Sato Tatsuya, Toda Yuki, Shimizu Masaki, Kuno Atsushi, Kouzu Hidemichi, Yano Toshiyuki, Ohwada Wataru, Ogawa Toshifumi, Miura Tetsuji, Tanno Masaya	4. 巻 14
2. 論文標題 Adenosine monophosphate deaminase in the endoplasmic reticulum/mitochondria interface promotes mitochondrial Ca ²⁺ overload in type2 diabetes rat hearts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 560 - 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13982	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 清水将輝、大和田渉、矢野俊之、神津英至、佐藤達也、長南新太、小川俊史、伊野祥哉、戸田悠貴、久野篤史、丹野雅也
2. 発表標題 ネクロプトーシスはドキシソルピシンによる心筋障害に寄与する
3. 学会等名 第4回 日本腫瘍循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Shimizu, Wataru Ohwada, Toshiyuki Yano, Hidemichi Kouzu, Tatsuya Sato, Arata Osanami, Toshifumi Ogawa, Shoya Ino, Yuki Toda, Atsushi Kuno, Masaya Tanno, Tetsuji Miura.
2. 発表標題 MLKL, an executor of necroptosis, is involved in doxorubicin-induced cardiotoxicity.
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Shimizu, Wataru Ohwada, Hidemichi Kouzu, Tatsuya Sato, Arata Osanami, Toshifumi Ogawa, Shoya Ino, Yuki Toda, Atsushi Kuno, Masaya Tanno, Toshiyuki Yano
2. 発表標題 Nuclear accumulation of MLKL induces necroptosis in cardiomyocytes: potential implication in Doxorubicin-induced cardiotoxicity.
3. 学会等名 ESC congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Shimizu, Wataru Ohwada, Toshiyuki Yano, Hidemichi Kouzu, Tatsuya Sato, Arata Osanami, Toshifumi Ogawa, Yuki Toda, Atsushi Kuno, Masaya Tanno, Masato Furuhashi
2. 発表標題 Rapamycin ameliorates doxorubicin-induced cardiomyopathy: potential role of necroptosis.
3. 学会等名 第87回 日本循環器学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Shimizu, Wataru Ohwada, Toshiyuki Yano, Hidemichi Kouzu, Tatsuya Sato, Arata Osanami, Toshifumi Ogawa, Yuki Toda, Atsushi Kuno, Masaya Tanno, Masato Furuhashi
2. 発表標題 Rapamycin ameliorates doxorubicin-induced cardiomyopathy through suppression of RIPK1-independent necroptosis.
3. 学会等名 ESC congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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