

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：34606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460350

研究課題名(和文) がん化学療法における心筋オートファジーの制御による心筋保護と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research for heart protection during cancer chemotherapy via regulating cardiac autophagy

研究代表者

金井 恵理 (Iwai-Kanai, Eri)

天理医療大学・医療学部・教授

研究者番号：20372584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、抗がん剤による心筋障害モデルマウスにおいて、Curcumineを投与すると心筋オートファジーが惹起されることで心筋アポトーシスや心機能の低下が抑えられ、死亡率を劇的に改善することを示した。また、自律神経過緊張状態では心筋オートファジーが心保護に働くと共に、その過程にはmTOR非依存性御のAktシグナルが関わることを発見した。さらに、心不全の進展においてミトコンドリアタンパクの関わる脂質代謝やアミノ酸代謝が変化することを見出した。以上の成果は、心筋のオートファジーやエネルギー代謝の制御が、心不全の発症を抑える新しいがん化学療法の開発につながることを示す。

研究成果の概要(英文)：Using GFP-LC3 transgenic mice or neonatal rat cardiac myocytes, we demonstrated that Curcumine inhibited both cardiac apoptosis and cardiac dysfunction induced-by Doxorubicin. Curcumine significantly improved mortality in mice with anti-cancer chemotherapy (Clin Exp Card.2015). Also, we showed that cardiac autophagy was activated and acted as cardioprotection by through mTOR-independent Akt signal in the heart failure with sympathicotonia (Biochem Biophys Res Commun.2014). In addition, defect in metabolism of lipid and amino acid was revealed to be a key for the progress of heart failure (Am J Physiol Heart Circ Physio.2016, Sci Rep 2017). These findings indicated that regulating energy metabolism and autophagy would be a novel therapeutic target for heart failure with cancer chemotherapy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 抗がん剤 ミトコンドリア オートファジー エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、生体の恒常性を維持するための、酵母からヒトまで高度に保存された“自食”による自己修復のメカニズムである。近年、心不全の心筋でもオートファジーが亢進することが様々な臨床および動物モデル研究でわかってきた。しかしながら、心不全で亢進するオートファジーが、心筋障害を引き起こす原因か、逆に心筋障害に対する保護反応現象であるのか、病因における役割は議論の分かれるところであった。我々は、独自に開発した心筋オートファジーの評価方法により、心筋オートファジーはむしろ心筋保護に働くことを報告した (Am J Physiol Heart Circ Physiol.2008; 296(2):H470-9, J Mol Cell Cardiol. 2012;52(1): 175-84)。また、心筋のミトコンドリアエネルギー代謝が心不全の進展に重要な役割を示すことを報告し、心筋オートファジーを惹起するとミトコンドリアの質が維持され、心不全の進展を阻止することを報告した (J Mol Cell Cardiol. 2012;52(1): 175, Nat Commun. 2013;4:2308。)

一方、がん化学療法における抗がん剤の心筋障害は、抗がん剤の容量規制因子となり、がん患者の予後を左右する。クルクミンはウコンに含まれる生薬であるが、がん細胞で活性化する NF-kappaB や Stat3 などの転写因子を抑制し抗腫瘍効果を示すことが申請者らのものを含む 1000 以上の研究論文に報告されており (Gastroenterology. 2001;121(1):56-67) 臨床応用が期待されてきた (Cell 2007)。しかしながら、クルクミンが抗がん剤による心筋障害にどのように影響するのかについては、臨床のみならず動物実験においても明らかではない。

2. 研究の目的

まず、抗がん剤による心筋障害を、心筋オートファジーを惹起させるクルクミンや G-CSF が抑止できるかどうかを検討することを目的とした。また、抗がん剤による心筋障害のメカニズムを、オートファジーやミトコンドリアの関与する代謝の観点から解明し、がん患者における新規治療法の開発につながる実験的裏付けの獲得を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

抗がん剤による心筋障害モデルをふくめ、まずは次のような実験系を用意した。

in vivo; 抗がん剤によるマウス心筋障害モデル、ミトコンドリア代謝調節因子の遺伝子改変マウス、オートファジーを検出するための mCherry-LC3 マウスや GFP-LC3 マウス、ヌードマウス等を用いたがんモデル動物

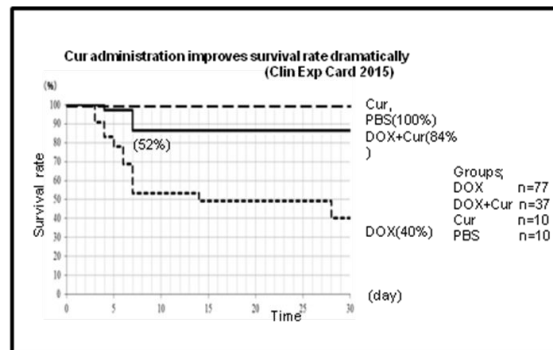
in vitro; 初代培養心筋細胞、HL-1 心筋細胞、各種がん細胞 cell line などに遺伝子導入やノックダウン法を用いた培養細胞

次に、これらを用いて、クルクミンと G-CSF による次の点の影響を、主に分子生物学的手法と循環器学的手法を用いて解析した。

(1) 心筋オートファジー、心筋細胞アポトーシスに対する影響と心不全の進展に関する解析 (2) 抗がん剤の抗腫瘍効果への影響 (3) 心筋オートファジー惹起による、細胞内シグナル伝達とミトコンドリアの質的管理への影響 (4) 脂肪酸代謝、糖代謝、アミノ酸代謝の変化 (5) 抗がん剤モデル動物の生存率等への影響

4. 研究成果

ラット新生児心筋細胞において、Curcumin を投与すると、JNKシグナル伝達を通して心筋オートファジーが惹起され、抗がん剤による心筋アポトーシスが抑えられた。in vivo での心不全モデルマウスでは、Curcumin の投与は抗がん剤による心機能の低下を抑え、死亡率を劇的に改善した (Clin Exp Card 2015 5;9:1000337. 下図)。



心不全が進行すると交感神経過緊張状態になることが知られるが、GFP-LC3 を遺伝子導入した心筋細胞および浸透圧ポンプを植え込んだトランスジェニックマウスを使って、自律神経過緊張状態では心筋オートファジーが心保護に働くと共に、その過程には mTOR 非依存性御の Akt シグナルが関わることを発見した (Biochem Biophys Res Commun. 2015;456(1):250-6。)

次に、ミトコンドリアの関与する心筋エネルギー代謝を検討するために、横行大動脈結紮による心不全動物モデル (TAC mice model) を用意した。ここでは、心不全の進展とともに脂質代謝を制御する転写因子 PPAR- α の発現が減少することがわかった。そこで次に、Tet-off system を使って PPAR- α を惹起させたところ、心機能の有意な改善を認めた (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017;312(2):H305-H313。)。これらの心不全実験の過程において、あるミトコンドリアタンパクが減少することを発見した。メタボローム実験などにより、このタンパクが心筋のアミノ酸代謝に関与することを突き止め (Sci Rep. 2017 Mar 7;7:43911。)、心筋エネルギー代謝改善の新しいターゲットとしての可能性

を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Katamura M, Iwai-Kanai E, Nakaoka M, Okawa Y, Mita Y, Nakamura A, Ikeda K, Ogata T, Uwyama T, Matoba S. Curcumine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inducing autophagy via the regulation of JNK phosphorylation. Clin Exp Card 2015 5;9:1000337. Doi: org/10.4172/2155-9880.1000337.

Nakaoka M, Iwai-Kanai E, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Matoba S. An alpha-adrenergic agonist protects hearts by inducing Akt1-mediated autophagy. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 2;456(1):250-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.067. Epub 2014 Nov 25.

Kanai M. Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2014 Jul 28;20(28):9384-91. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9384. Review.

Kaimoto S, Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Tateishi S, Ono K, Uchihashi M, Fukai K, Iwai-Kanai E, Matoba S. Activation of PPAR- α in the early stage of heart failure maintained myocardial function and energetics in pressure-overload heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017 Feb 1;312(2):H305-H313. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2016. Epub 2016 Dec 23.

Iwai-Kanai E. Cardiac cellular fate in the adrenergic overload. Bul Tenri Heal Car 2016. 4;1,33-36. review.

Kanai M, Kawaguchi T, Kotaka M, Shinozaki K, Touyama T, Manaka D, Ishigure K, Hasegawa J, Munemoto Y, Matsui T, Takagane A, Ishikawa H, Matsumoto S, Sakamoto J, Saji S, Yoshino T, Ohtsu A, Watanabe T, Matsuda F. Large-scale prospective pharmacogenomics study of oxaliplatin-induced neuropathy in colon cancer patients enrolled in the JFMC41-1001-C2 (JOIN Trial). Ann Oncol. 2016 Jun;27(6):1143-8. doi: 10.1093/annonc/mdw074. Epub 2016 Feb 18

Ariyoshi M, Katane M, Hamase K, Miyoshi Y, Nakane M, Hoshino A, Okawa Y, Mita Y, Kaimoto S, Uchihashi M, Fukai K, Ono K, Tateishi S, Hato D, Yamanaka R, Honda S, Fushimura Y, Iwai-Kanai E, Ishihara N, Mita M, Homma H, Matoba S. D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria. Sci Rep. 2017 Mar 7;7:43911. doi: 10.1038/srep43911

Kou T, Kanai M, Yamamoto Y, Kamada M, Nakatsui M, Sakuma T, Mochizuki H, Hiroshima A, Sugiyama A, Nakamura E, Miyake H, Minamiguchi S, Takaori K, Matsumoto S, Haga H, Seno H, Kosugi S, Okuno Y, Muto M. Clinical sequencing using a next-generation sequencing-based multiplex gene assay in patients with advanced solid tumors. Cancer Sci. 2017 Apr 25. doi: 10.1111/cas.13265.

[学会発表](計 10 件)

Kaimoto S, Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa

Y, Tateishi S, Ono K, Uchihashi M, Fukai K, **Iwai-Kanai E, Matoba S** Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic β -cell function in diabetes. American Heart Association Scientific Sessions 2014. (米国心臓病学会) 2014 Chicago, IL, USA.

桑野和代 中村文彦 松尾収二 **金井恵理** 心臓超音波における左室拡張不全のスクリーニングに関する技術的検討 第79回日本循環器学会 2015 大阪

的場聖明 金井恵理 星野温 有吉真 内橋基樹 立石周平 Oxidative post-translational modification of lonprotease homologu(LONP1) contributes to the development of heart failure. 第79回日本循環器学会学術集会 2015 大阪

Uchihashi M, Tateishi S, Hoshino A, Ariyoshi M, Ono K, Kaimoto S, Fukai K, **Iwai-Kanai E, Matoba S.** Bdh1 reduced oxidative stress and cardiac remodeling in pressure overload heart failure. 第79回日本循環器学会学術集会 2015 大阪

片村真紀 **金井恵理** 山中亮悦 波東大地 立石周平 大野和則 内橋基樹 深井那剛 中岡幹彦 大川善文 有吉真 三田雄一郎 **的場聖明** クルクミンはJNKの活性化を抑制しドキシソルピシン心筋障害を改善する 第24回日本 Cell Death 学会 2015 大阪

Tateishi S, Uchihashi M, Hoshino A, Ariyoshi M, Ono K, Kaimoto S, Fukai K, **Iwai-Kanai E, Matoba S.** Ketone body metabolizing enzyme 3-hydroxybutylate

dehydrogenase 1(Bdh1) American Heart Association Scientific Sessions 2015.(米国心臓病学会) 2015 Orlando, FL, USA.

Uchihashi M, Tateishi S, Hoshino A, Ariyoshi M, Ono K, Kaimoto S, Fukai K, **Iwai-Kanai E, Matoba S.** Ketone body metabolizing enzyme-D-beta hydroxybutylate dehydrogenase 1 (Bdh1) attenuates oxidative stress and cardiac remodeling in pressure overload heart failure 第80回日本循環器学会学術集会 2016 仙台

立石周平 有吉真 内橋基樹 波東大地 山中亮悦 **金井恵理 的場聖明** B D H 1 は心筋酸化ストレスを軽減し心不全悪化を軽減する 第25回日本 Cell Death 学会 2016 東京

Ariyoshi M, Katane M, Hamase K, Miyoshi Y, Nakane M, Hoshino A, Okawa Y, Mita Y, Kaimoto S, Uchihashi M, Fukai K, Ono K, Tateishi S, Hato D, Yamanaka R, Honda S, Fushimura Y, **Iwai-Kanai E,** Ishihara N, Mita M, Homma H, **Matoba S.** Age related cardiac dysfunction and pancreatic beta-cell function in diabetes were improved by p53 inhibition through parkin-mediated mitophagy. American Heart Association Scientific Sessions 2016(米国心臓病学会) 2016 New Orleans, LA, USA.

Ohno K, Kojima S, Ariyoshi M, Kaimoto S, Uchihashi M, Kaneda H, Kagimura T, fukushima M, **Iwai-Kanai E, Matoba S.** Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis by basic fibroblast growth factor with atecollagen aolution in patients with critical limb ischemia. American

Heart Association Scientific Sessions 2016.
(米国心臓病学会)2016 New Orleans,
LA, USA.

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/med2/group/cardio/k-enkyu-01.html> にて研究内容を説明

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金井恵理 (IWAI-KANAI ERI)
天理医療大学・医療教育・研究センター・教授
研究者番号: 20372584

(2)研究分担者

的場聖明 (MATOBA SATOAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 10305576

金井雅史(KANAI MASASHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70432416