

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860551

研究課題名(和文)心不全におけるミトコンドリア制御・保護因子の探索と病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Research of Mitochondrial Protection Reagent and Examination of the Effect

研究代表者

吉沢 隆浩 (YOSHIZAWA, Takahiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：40713392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤治療の際には、がん細胞を死滅させるだけでなく、健康な臓器にダメージ(副作用)が及ぶことがある。例えば、ドキソルビシン(DOX)の副作用として、致死性の心不全が知られている。DOXは心臓のミトコンドリアを傷害することが知られており、ミトコンドリアを保護することで、副作用軽減が期待できる。本研究では、ミトコンドリア制御・保護作用が示唆されているアドレノメデュリン(AM)を、DOX心筋症マウスに投与したところ、生存率改善、臓器障害軽減、心臓細胞死抑制、ミトコンドリア障害改善が認められた。このことから、DOX心筋症に対するAMの治療効果と、ミトコンドリアを標的とした治療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Doxorubicin (DOX) is one of the best known anticancer drugs, and is used in the treatment widely. However, DOX has some serious side effects, the worst being lethal heart failure. Mitochondrial injury is known as the cause of heart failure in DOX treatment. Adrenomedullin (AM) is a peptide hormone secreted by many organs. It is known that AM has organ-protective effect. Recent study suggested that AM regulates and/or protects mitochondria. In this study, mice were treated with DOX and/or exogenous AM. Exogenous AM improved the survival ratio of DOX-treated mice. In addition, AM reduced serum LDH (organ injury marker) levels following DOX treatment. On pathological examination, AM was shown to inhibit DOX-induced cardiac tissue damage, mitochondrial abnormality, and cell death. These findings suggest that AM has a protective effect against DOX-induced cardiac damage through mitochondria protection.

研究分野：実験動物学

キーワード：抗がん剤の副作用軽減 ドキソルビシン心筋症 ミトコンドリア アドレノメデュリン 臓器保護

1. 研究開始当初の背景

心臓は、全身の内でも特にATP 需要が高い臓器である。ミトコンドリアでのATP 産生時には、酸素分子への電子の引き渡しが行われるが、この反応は活性酸素種 (ROS) を生じやすく、生体反応に必須であると同時に細胞障害の原因にもなり得るといった二面性を持つ。このため、生体の細胞では、様々なミトコンドリア制御因子を介した、厳密な機能制御が行われている。ミトコンドリア制御機構に異常が生じると、ATP 産生障害、脂質代謝異常、ミトコンドリア由来ROS 増大などが生じ、細胞障害へと発展する。ミトコンドリア制御因子PGC-1 の遺伝子欠損マウスでは、圧負荷時の心臓で障害を生じやすいという報告 (Zoltan A et al. PNAS. 2006) がある。一方で、PGC-1 の過剰発現マウスにおいても心臓障害が惹起されやすいといった報告 (Jennifer G et al. Circulation. 2010) がある。これらのことは、ミトコンドリア機能の適正な制御が生体の恒常性維持に重要であることを示すと同時に、心不全時のミトコンドリア関連因子の適正な制御バランスが病態の進展に大きく影響することを示唆している。

心筋梗塞などによる急性障害では、虚血により電子伝達系が障害され、ミトコンドリア由来ROS が多く産生されることが知られている。この時産生されたミトコンドリア由来ROS は、組織障害の原因になるだけでなく、ミトコンドリア自体にも障害を与え、さらなる病態悪化を招く悪循環を発生させる。心筋梗塞モデルマウスを用いた研究では、PGC-1 の下流因子であり、内因性ミトコンドリア保護因子であるTFAM が、心筋梗塞後の心臓障害の軽減に重要であるとの報告があり (Ikeuchi M et al. Circulation. 2005)、病態進展におけるミトコンドリア制御の重要性が示唆されている。一方で、薬剤性心筋症や、慢性心不全などの心疾患においても、心筋ミトコンドリア機能低下に伴う脂肪酸 酸化の低下と、代償

的な解糖系 (非ミトコンドリア性反応) の亢進が認められる。特に抗がん剤の一種であるドキソルビシン (DOX) では、副作用として致死性の心不全が知られており、DOXによるミトコンドリア障害が病態形成に関与することが知られている。

ミトコンドリア機能が低下した状態では、心筋細胞の代謝機能を維持することができず、これが直接的な心筋障害の原因となるだけでなく、ATP の不足/枯渇は組織障害に対する代償機能の低下を引き起こし、病態の慢性化や進展にも関与すると考えられる。さらに、障害を受けたミトコンドリアからは多くのROS が漏出することが知られており、心筋細胞の機能維持および障害軽減のためには、ミトコンドリア機能を適切に維持することが重要である。これらのことから、ミトコンドリアに着目した治療法の開発は、心疾患の発症や病態進行抑制効果が期待でき、将来的な応用展開が期待できる。

2. 研究の目的

PGC-1 を始めとする、細胞内ミトコンドリア関連因子による制御機構については、近年多くの報告がなされているが、細胞外生理活性物質による刺激に対する応答機構については未だ不明な点が多い。最近、代表者は心不全の病態形成とミトコンドリア機能破綻の関連性を発見し、心臓の恒常性維持における細胞外生理活性物質によるミトコンドリア制御の重要性を報告した (Yoshizawa T et al. Hypertension. 2013)。この研究により、細胞外生理活性物質であるアドレノメデュリン (AM) と、その受容体システム (AM-RAMP2系) を介したPGC-1 の制御が、心筋ミトコンドリアの機能維持に重要であることが明らかとなった。さらに、細胞外生理活性物質によるミトコンドリア制御機構が明らかとなれば、ミトコンドリア制御機構の新たな発見に繋が

ることに加えて、心不全に対するミトコンドリアの制御・保護の重要性を明らかにすることが期待できる。

本研究では、(1)心筋ミトコンドリア保護作用が期待される化合物の評価と、(2)心不全改善効果の検討および、(3)ミトコンドリア障害時やミトコンドリア保護物質投与により心臓で変動するミトコンドリア制御機構の解明を行う。それによって、未だ明らかではない心不全時のミトコンドリア制御機構が示されることで、心不全に対するミトコンドリア制御・保護機構の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究における動物実験は、信州大学動物実験委員会の審査・承認の下、関連法規制及び信州大学動物実験等実施規程を遵守して適正に行われた。

(1) 心筋ミトコンドリア保護因子の検討

ミトコンドリアに対する影響が先行研究で報告されている物質について、評価を行った。特に、その物質が心臓ミトコンドリアに対する影響(生理活性)を有するかを調べるために、マウスへの投与を行い、心臓におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現と、ミトコンドリア DNA 量の定量評価を行った。

実験は、対照群(生理食塩水投与群)と候補物質投与群の2群で行った。

ミトコンドリア関連遺伝子の発現は、心臓から抽出・精製した mRNA を RT-リアルタイム PCR で定量した。ミトコンドリア DNA 量は、心臓から抽出・精製した DNA をリアルタイム PCR で定量した。

(2) ミトコンドリア障害を伴う心不全に対する改善効果の評価

前項(1)の検討の結果、ミトコンドリアに対する生理活性が示唆された物質について、

心不全に対する治療効果を検討した。本研究では、ミトコンドリア障害が病態の形成に関与することが知られているドキシソルピシン(DOX)心筋症モデルマウスを用いた検討を行った。

実験は、生理食塩水投与群(S 群)、生理活性物質投与群(A 群)、DOX 心筋症群(DOX 群)、DOX 心筋症 + 生理活性物質投与群(治療実験群)(DA 群)の4群で行った。

各群のマウスについて、生存率の評価、血中生化学マーカーの測定、心臓組織障害に関する病理学的解析を行い、DOX 心筋症モデルマウスに対する生理活性物質の治療効果を評価した。

(3) ミトコンドリア制御機構の解析

前項(2)の結果、DOX 心筋症に対する治療効果が認められた物質について、ミトコンドリア制御・保護機構の解析を行った。ミトコンドリア障害については、透過型電子顕微鏡による心筋ミトコンドリアの評価を行い、ミトコンドリア制御遺伝子については、RT-リアルタイム PCR による定量評価を行った。

4. 研究成果

心筋ミトコンドリア保護因子の検討を行ったところ、AM が、ミトコンドリア DNA 量およびミトコンドリア関連遺伝子の発現に影響を与えることが示唆された。

AM は全身の様々な臓器で産生されるペプチドホルモンで、血管拡張作用や利尿作用を有することが知られている。また、ヒトの心不全や腎不全時に血中 AM 濃度の上昇が認められることが報告されており、疾患との関連性が知られている。さらに、外因性の AM 投与によってヒト心不全に対して一定の治療効果を認めることが報告されており、心不全治療に有用な物質であると考えられている。

代表者による最近の報告では、AM 受容体の

受容体活性調節タンパク (RAMP2) がミトコンドリア機能に影響を与えることが報告されており、本研究による検討結果とこれらの知見から、AM 投与によるミトコンドリア保護が期待できると考えられた。

次に、ミトコンドリア障害を伴う心不全に対する AM による改善効果の評価を行った。本研究では、ミトコンドリア障害が病態の進行と深く関わることが知られている、DOX 心筋症モデルマウスを用いた検討を行った。DOX 投与後 14 日目の生存率では、D 群(グラフ)が 10%であるのに対して、DA 群(グラフ)が 30%といった結果が得られ、AM 投与による有意な生存率の改善効果が認められた(図 1)。

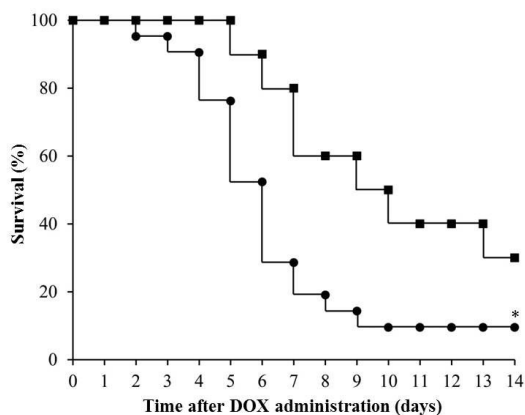


図 1 . DOX 投与群と DOX+AM 投与群の生存率

DOX 誘発性の臓器障害に対する外因性 AM 投与による保護作用を調べるために、血清生化学マーカーである乳酸脱水素酵素(LDH)とクレアチンキナーゼ(CK)の測定を行った。LDH や CK は、細胞中に存在する酵素の一種で、細胞が破壊されると細胞外に放出されるため、それらの血清中濃度の増減は、体内の臓器・組織の傷害の指標として用いられる。LDH は様々な細胞に広く存在し、CK は心筋を含む筋肉に多く存在する。本研究による検討では、S 群や SA 群と比較して、D 群で有意な血清 LDH と血清 CK の増加が認められたが、DA 群では投与 7 日目と 14 日目においてこれらの細胞障害マーカーの増加は抑制された。このこと

から、DOX による臓器・組織障害に対して、外因性に投与した AM が保護的に作用することが明らかとなった。

心臓に対する障害の程度を病理学的に解析したところ、H&E 染色から心臓組織障害の軽減とシリウスレッド染色から心線維化の抑制が、D 群と比較して DA 群で認められた。更に、心室組織の細胞死を TUNEL 染色で評価したところ、S 群や SA 群と比較して D 群では有意な細胞死の増加が認められた。一方で、D 群と比較して DA 群では有意な細胞死の抑制が認められ、DOX による心筋傷害に対する AM の心臓組織保護作用が明らかとなった。

次に、心臓ミトコンドリアに関する評価を行った。透過型電子顕微鏡(TEM)による観察を行ったところ、D 群では特に DOX 投与後 7 日後と 14 日後に、心筋ミトコンドリアの空胞変性を認めたのに対し、DA 群ではこのようなミトコンドリアの変性が抑制されていた。このことから、外因性の AM 投与は、DOX によって誘発されるミトコンドリア障害を軽減することが示唆された(図 2)。

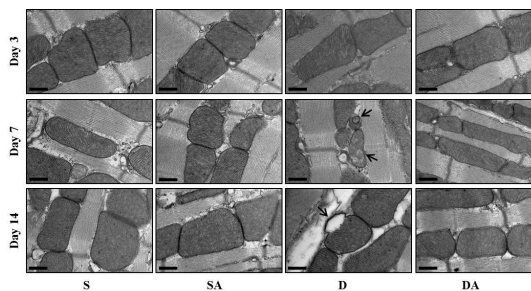


図 2 . 心筋の透過型電子顕微鏡写真

次に、DOX 心筋症に対する AM 投与によって変動するミトコンドリア関連遺伝子の変化を解析した。その結果、D 群では S 群や SA 群と比較して、DOX 投与 7 日目において、ミトコンドリア制御遺伝子である PGC-1 の遺伝子発現の有意な減少が認められた。それに対して、DA 群では PGC-1 の遺伝子発現の有意な回復(減少の抑制)が認められ、S 群や SA 群と同等の遺伝子発現量を認めた。このことから、外因性に投与された AM は、PGC-1 の

遺伝子発現の制御を介して、ミトコンドリア保護作用を発現することが示唆された。

本研究によって得られたこれらの結果をまとめると、外因性の AM 投与は DOX 心筋症に対して、(1)生存率の改善効果、(2)臓器障害や心筋細胞死の抑制効果、(3)ミトコンドリア制御因子の制御を介したミトコンドリア保護効果、を有することが明らかとなった(図3)。

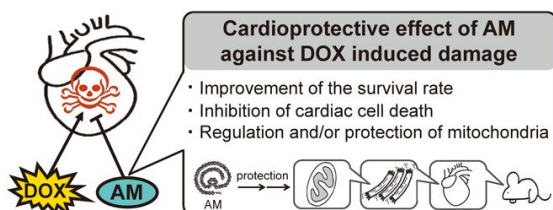


図3 . DOX 心筋症に対する AM 投与の効果

これらのことから、がん化学療法における DOX の副作用(致死性心不全)の軽減に、外因性の AM 投与が有用である可能性が示唆された。さらに、将来的な、新たな副作用治療法として、心筋ミトコンドリアやその制御因子をターゲットとした治療法の開発が有用である可能性が示唆された。

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1件)

Takahiro Yoshizawa, Sho Takizawa, Shin Shimada, Takeshi Tokudome, Takayuki Shindo, and Kiyoshi Matsumoto.

Effects of Adrenomedullin on Doxorubicin-induced Cardiac Damage in Mice.

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 39(5) 2016. 査読有

DOI: 10.1248/bpb.b15-00832

[学会発表](計2件)

吉沢 隆浩、ドキシソルビシン心筋症マウスに対するアドレノメデュリンの効果、日本心脈管作動物質学会(2016年2月5日)、阿波観光ホテル(徳島県徳島市)、ポスター、査読有

吉沢 隆浩、ドキシソルビシン心筋症モデルマウスに対するアドレノメデュリンの心保護効果、日本毒性学会学術総会(2015年6月30日)、石川県立音楽堂(石川県金沢市)、ポスター、査読有

[その他]

ホームページ等

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.0CyUumkh.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉沢 隆浩 (YOSHIZAWA, Takahiro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：40713392