

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07150

研究課題名(和文)ドキシソルビシン心筋症の新規病態機序解明と治療法開発

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanism of doxorubicin cardiomyopathy and development of therapeutic method

研究代表者

タン コウ (ZHAN, Hong)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80625632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は負荷に対する適応として心筋リモデリングを生ずる。すでに多くの心肥大誘導因子が知られているが、心不全に至る適応破綻の機構は十分に解明されていない。本研究は細胞修復反応に関わるATM(血管拡張性失調症の原因遺伝子)を中心としたシグナル伝達経路に着目し、ドキシソルビシン心筋症に対する治療法開発の糸口とする。特に、ドキシソルビシン心筋症の予防薬となる可能性のあるデクスラゾキサンの作用機序の解明および、心筋症の予防ないし治療効果を明らかにした。今後はファーマコプロテオミクスを用いて負荷適応と破綻の際にin vivoで相互作用する因子を単離し、心不全への新しい治療標的を同定する。

研究成果の概要(英文)：The heart causes myocardial remodeling as an adaptation to the load. Many cardiac hypertrophy inducing factors are already known, but the mechanism of adaptive failure leading to heart failure has not been sufficiently elucidated. This study focuses on the signal transduction pathway centered on ATM (the causative gene of ataxia telangiectasia mutated) involved in the cell repair reaction, and it is a clue to the development of a treatment for doxorubicin cardiomyopathy. In particular, we clarified the mechanism of action of dexrazoxane which may be a prophylactic drug for doxorubicin cardiomyopathy and clarified the preventive or therapeutic effect of cardiomyopathy. In the future we will isolate factors that interact in vivo during load adaptation and failure using pharmacoproteomics and identify new therapeutic targets for heart failure.

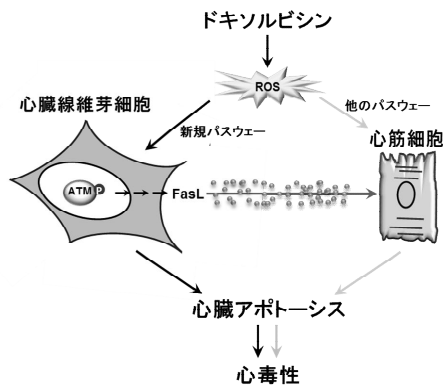
研究分野：循環器

キーワード：循環器

1. 研究開始当初の背景

心血管細胞は代謝的、虚血、物理的負荷などによる傷害を受けた際、適応・修復のための機転としてリモデリングを生じ、その破綻は心血管組織の機能不全を来す。すでに多くの心肥大誘導因子が知られているが、心不全に至る適応破綻の機構は十分に解明されていない。

我々は、DNA 損傷と慢性疾患との関連にも着目してきた。細胞の DNA 修復能力はその正常な機能と個体の恒常性の維持にとって重要である。細胞が老化状態に達し、DNA 修復機能の効率低下をもたらすような遺伝子発現調節の変化が起こると、結果として疾患が発症する。我々は、最近プロテオミクスを用いて心血管病態制御に重要な転写因子 KLF5 の相互作用因子の包括的単離手法を開発し、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、および 2



本鎖 DNA の損傷センサーとして知られるヒストン H2AX (histone H2A variant) 等の DNA 損傷応答に重要な因子群が複合体に含まれること、マウスモデルを用いて、ATM は血管の負荷応答に重要であり、血管保護の治療標的となり得ること (*J Biol Chem* 2010)、さらに、最近では、ATM はドキシソルピシン心筋症や圧負荷心肥大等の心臓の負荷応答においても重要であることを相次いで見いだした (*Circ Res*. 2016)。さらに、ATM の基質である H2AX の欠損マウスでは心肥大が減弱する予備データも得ている。

2. 研究の目的

本研究では、この修復反応の主要な構成因子と考えられる ATM、および H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) 等により形成される DNA 損傷修復シグナル伝達経路に注目する。この機構の異常な活性化ならびに制御は従来から発癌の分子メカニズムとして注目されていたが、我々により、代謝ストレス下で老化やアポトーシス制御において、また、我々のノックアウトマウスを用いた予備検討により、ATM は心筋線維化を抑制する作用を有することが示唆された。一方で、DNA 損傷センサーと考えられている H2AX は心肥大を促進する可能性があり、ATM と異なる反応が認めら

れた。本研究では、DNA 損傷応答因子 (ATM、H2AX 等) に着目し、種々の遺伝子改変マウスを用いて、心不全に至る適応破綻の機構を明らかにする。心肥大等の心筋リモデリングにおける増殖シグナル及び DNA 修復の役割を解明し、心不全に至る適応破綻の機構を明らかにする。さらに心不全への病態変化を抑制する新たな治療標的の同定を目指す。すでに H2AX 欠損マウスは作成済みであり、いずれも心臓の発達や肥大に異常を生ずるとい

予備データを得ている。心筋リモデリングにおける細胞修復反応に関わる ATM、H2AX を中心とした DNA 損傷応答シグナルの関与があるか明らかにする。ATM はリン酸化により活性化されるため、リン酸化酵素を標的とした阻害薬等を用いれば心不全発症を防止できる可能性がある。前述したように、我々はすでに ATM 遺伝子欠損マウスおよび ATM 特異的阻害薬を用いて、ATM の抑制が血管内皮細胞機能およびを改善することを示した。また、最近では、ATM がドキシソルピシン心筋症の発症に重要であり、特に、心筋間質細胞の ATM が重要な役割を果たすことも示した。そこで、本シグナルカスケードの心肥大形成および心不全発症における新たな役割を解明し、これらの因子と結合する蛋白を薬理学にプロテオミクス手法を導入したファーマコプロテオミクスアプローチより単離することにより、心不全への病態変化を抑制する新しい治療標的を同定する。さらに、負荷適応と破綻時の ATM・H2AX の複合体を包括的に同定する。これらの同定された因子を標的として、臨床へのトランスレーションを目指したバイオマーカー開発 (エクソソーム解析など) ないし創薬による新規治療法開発も目指す。

3. 研究の方法

本研究では、DNA 損傷応答反応の主要な構成因子と考えられる ATM (ataxia telangiectasia mutated)、および 2 本鎖 DNA の損傷センサーとして知られるヒストン H2AX (histone H2A variant) のリン酸化等により形成される DNA 損傷応答シグナルを解析する。この機構の異常な活性化ならびに制御は従来から発癌の分子メカニズムとして注目されていたが、非癌領域では不明だった。我々により、代謝ストレス下で老化やアポトーシス制御においても重要な役割を有することが近年明らかにされつつある。また、ドキシソルピシン心筋症における重要な役割を果たすことも明らかになった。さらに、ATM 欠損マウスを用いた予備検討により、心臓においては、圧負荷心肥大時に ATM が心筋線維化を抑制する作用を有する予備データも得ている。一方で、ATM の基質であり、DNA 損傷センサーと考えられている H2AX は心肥大を促進する可能性があり、ATM と異なる反応が認められた。また、ATM 欠損マウスではアンジオテンシン

II による心臓線維化が促進する。一方、H2AX 欠損マウスではアンジオテンシン II による心臓肥大が抑制される。

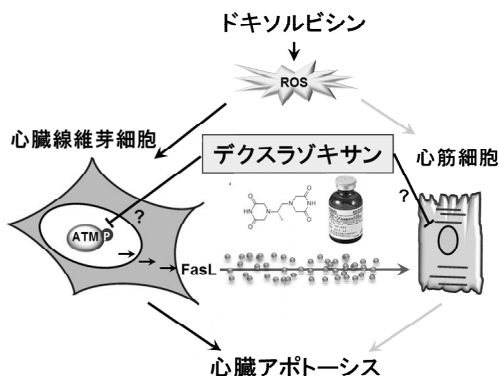
具体的には、心肥大、心筋梗塞モデルマウスを用いて、心臓の負荷適応と破綻に DNA 修復因子が関与するか明らかにする。また、シグナルの特異的な阻害薬が心不全発症を防止するかを明らかにする。さらにファーマコプロテオミクスを用いて負荷適応と破綻の際にこれらと相互作用する因子を単離することにより、新しい治療標的を同定する。

4. 研究成果

(1) デクスラゾキサン (dexrazoxane) のドキシソルビン心筋症の予防ないし治療効果

デクスラゾキサンは、ドキシソルビンをはじめとするアントラサイクリン系抗悪性腫瘍薬が血管外漏出に対する新規治療薬である。その作用機序は、血管外漏出した際の細胞障害を抑制するものと推測されている。新規治療薬として、2014 年に抗悪性腫瘍薬の血管外漏出治療薬として商品名サビーンが製造承認を取得した。適応は「アントラサイクリン系抗悪性腫瘍薬の血管外漏出」であり、血管外漏出後 6 時間以内に可能な限り速やかに 1~2 時間かけて点滴静注する薬物である。ドキシソルビン心筋症の予防ないし治療薬として期待されているものの、現状では適応がない。作用機序は、トポイソメラーゼ II の作用を阻害するものと考えられているが、完全に解明されていない。これは、ドキシソルビン心筋症の原因が十分に明らかになっていないことに加えて、適切なモデルがないことによる。

我々は心臓線維芽細胞および心筋細胞特異的な ATM ノックアウトマウスを樹立し、心臓線維芽細胞特異的 ATM ノックアウトがドキシソルビン心筋症を軽減することを明らかにした。このモデルマウスを利用しドキシソルビン投与下でデクスラゾキサンが ATM の活性化を抑制するか評価する。抑制する場合は心臓線維芽細胞を介するか、あるいは心筋細胞を介するか明らかにする。ATM 阻害薬である KU59403 は期待されているが、バイオアベイラビリティが不十分のため、現状ではヒトに用いることが出来ないが、バイオアベイラビリティが改善され、臨床使用が可能と



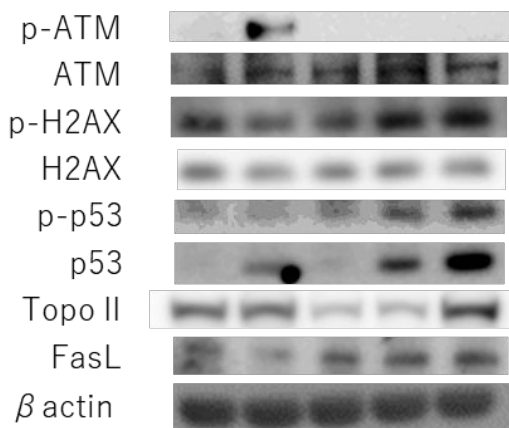
なれば、心臓線維芽細胞特異的 ATM の抑制が期待される。KU5933 が心臓線維芽細胞に作用する一方、デクスラゾキサンが心筋細胞に作用することが明らかになれば、両者を併用することにより、治療効果が高く有害反応が低いドキシソルビン心筋症の予防ないし治療効果が期待される。

(2) 臨床へのトランスレーション

本研究で得られた知見を診断・治療法へとトランスレーションする。血中エクソソーム蛋白解析を行い、健全ないし心不全患者血液から DNA 修復因子(ATM, H2AX) の定量評価を行い、心不全と関連があるかを明らかにする。さらに、ドキシソルビン投与患者において、DNA 修復因子(ATM, H2AX) と心筋症発症との関連を明らかにする。

1 日齢の Sprague-Dawley ラットから心臓線維芽細胞を単離培養し、100 μ M デクスラゾキサン(Dex)で 30 分間刺激後、10⁻⁶M ドキシソルビン(Doxorubicin)を培養液中に添加し 2 時間インキュベートした。RIPA バッファーで回収したタンパク中のトポイソメラーゼ II、アクチン、リン酸化 ATM(p-ATM)、H2AX(p-H2AX)、p53(p-p53)とトータル ATM、H2AX、p53 の発現量をウエスタンブロットにより解析した結果、以下の現象が明らかになった。

| | | | | | |
|-------------|---|---|-----|-----|----|
| Pre Tx | - | - | Dex | Dex | KU |
| Doxorubicin | - | + | - | + | + |



1. デクスラゾキサンは心臓線維芽細胞内のトポイソメラーゼ II (Topo II) の発現を阻害する。

2. デクスラゾキサンはドキシソルビン刺激による ATM のリン酸化を阻害するが、H2AX のリン酸化阻害効果は示さない。

3. ドキシソルビン刺激による p53 の発現上昇はデクスラゾキサンによって抑制される。

4. KU59403 はトポイソメラーゼ II 阻害とは別の作用機序により、ATM のリン酸化を阻害する

以上の結果から、ドキソルビシン投与下でデクスラゾキサンは心臓線維芽細胞において、トポイソメラーゼ II のみならず、ATM の活性化を抑制した。今回、デクスラゾキサンが心筋細胞に作用することが明らかになったことにより、両者を併用することにより、治療効果が高く有害反応が低いドキソルビシン心筋症の予防ないし治療効果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

詹紅(ZHAN, Hong), 相澤健一. アントラサイクリン心筋症のメカニズムを知る. がん診療における心血管合併症 onco-cardiology アップデート. 診断と治療. 106 巻 8 号

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.jichi.ac.jp/medicine/about/department/basic_clinical/pharmacology/clinic/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

タン コウ (ZHAN, Hong)

自治医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80625632

(2)研究協力者

相澤 健一 (AIZAWA, Kenichi)

自治医科大学・医学部・准教授