

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07293

研究課題名(和文) 抗がん剤の心毒性を抑制する新薬の開発～新規グレリン受容体を介したアプローチ～

研究課題名(英文) Development of molecules which suppress cytotoxicity by anti-cancer drug through novel Ghrelin receptor signaling

研究代表者

岸田 昭世 (Kishida, Shosei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：50274064

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)：ドキソルビシンは多くの悪性腫瘍に使用される抗がん剤だが、致命的な心不全へと進行することが知られている。我々は、ラット心筋由来のH9c2細胞をドキソルビシンで処理したときの細胞毒性をデスアシルグレリンが抑制することを見出してきた。我々はデスアシルグレリンと相互作用するタンパク質DAGRを見出したが、そのKd(解離定数)は200～1000nM程度であった。デスアシルグレリンはH9c2細胞には結合したが、DAGRノックアウト細胞株には、結合しなかった。DAGRのノックアウトマウスを作製して、心筋組織を採取してリアルタイムPCRや免疫染色を行ったところ、心筋でのDAGRの発現の消失を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多数の新しい分子標的薬が実用化され、がんの化学療法は新時代を迎えたと言っても良い状況であるが、依然としてドキソルビシンなど古典的な抗がん剤も標準治療として使用され続けている。ドキソルビシンの副作用である不可逆的な心不全を軽減して化学療法を行えば、化学療法を受ける多くのがん患者にとっては、安全な化学療法を十分に行えるという利点がある。今後、デスアシルグレリンの心不全予防効果の分子機構が明らかとなり、その受容体を刺激する手段が見つかれば、ドキソルビシンと併用してその心毒性を抑える補助療法への開発に発展させられる可能性があり、将来的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Doxorubicin, an anticancer drug used for many malignancies, is known to progress to fatal heart failure. We have found that desacylghrelin suppresses the cytotoxicity of rat myocardium-derived H9c2 cells treated with doxorubicin. We have found DAGR protein that interacts with desacylghrelin, which showed mild the mild affinity to desacylghrelin with 200 to 1000 nmol/l of Kd (dissociation constant). Desacylghrelin bound to plasma membrane of H9c2 cells but not to the DAGR knockout cell line. Real-time PCR and immunostaining of the myocardial tissues obtained from DAGR knockout mice revealed that the expression of DAGR in the myocardium was lost.

研究分野：生化学

キーワード：ドキソルビシン 心毒性 ゼブラフィッシュ 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初の背景---グレリンは本邦の児島、寒川らが発見した 28 アミノ酸の食欲増進作用を示すペプチドホルモンである。グレリンには 2 種類あり、脂肪酸修飾を受けたアシルグレリンと脂肪酸修飾がないグレリン(デスアシルグレリン)の両者が体内を循環している。アシルグレリンには、その脂肪酸部分を認識する受容体 GHSR の存在が知られているが、GHSR の発現しない心筋細胞にも、右図のようにグレリンは結合する。アシルグレリンも脂肪酸修飾がないグレリン(デスアシルグレリン)もドキシソルピシンによる心筋細胞死を抑制することから、グレリンの細胞死抑制効果は GHSR とは無関係と考えられる(代表者岸田ら Endocrin J 64 S35-39, 2017 年)。私共は GHSR と異なる新たな受容体がグレリンの細胞死抑制効果のシグナルを伝えると考え、GHSR と異なるグレリン受容体膜たんぱく質 DAGR を同定した。

## (2) 研究課題の核心をなす学術的「問い」-「抗がん剤の副作用を抑えることはできないのか？」 「グレリンの作用を使えば解決できるかもしれない」

多くのがんの治療は化学療法、放射線療法や手術法が進歩して、人々は以前よりも長く健康な生活ができる時代が到来している。ところが、中には化学療法の途中で副作用出現のため、治療を中断せざるを得ない症例がある。ドキシソルピシン(商品名アドレアシンなど)では投与例の 5% に心機能異常が観察されており、放置すると重篤な心不全へと進行するので注意すべきとの記載が公共の KEGG データベースに認められる。患者にとっては心不全も、ドキシソルピシンの十分な抗腫瘍効果が期待できなくなることも大変不利益である。

ドキシソルピシンは化学療法の基本的な薬剤であり、安価で悪性リンパ腫や肺がん、消化器癌各種、乳がん、膀胱腫瘍、骨肉腫、多発性骨髄腫、小児悪性固形腫瘍と実に広範囲な悪性腫瘍に対して効能が認められている。つまり、これらの多種の腫瘍でドキシソルピシン投与を受けている人たちの 5% は治療途中で心機能異常出現のために化学療法を中断しているということになる。私共は、ドキシソルピシンの心毒性を弱めるような処置があればそれを併用して化学療法を完遂できれば治療効果が上がり、多くの心リスクのある癌患者にとって福音になり得ると考えた。

私共が見つけたグレリン受容体膜たんぱく質 DAGR (未発表) を使って、アゴニストを探索、同定して、グレリン様のシグナル伝達を起こす細胞死の抑制薬を見いだせれば、ドキシソルピシンの心毒性問題を解決できるかもしれない。

## 2. 研究の目的

### (1) 本研究の目的および学術的独自性と創造性

私共が見つけた新規グレリン受容体膜たんぱく質 DAGR (未発表) に着目し、受容体アゴニストを探索、同定して、グレリン様のシグナル伝達を起こさせ、抗がん剤による心不全防止薬として用いることである。このようにホルモンの作用を利用して抗がん剤による心毒性の作用を抑制する薬は知られておらず、学術的にも独自性と創造性の高い試みであると考えた。

### (2) 本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか

本研究では、我々が見出した新規グレリン受容体結膜たんぱく質 DAGR が、受容体としてグレリンのシグナルを細胞内に伝え、抗がん剤ドキシソルピシンによる心筋細胞や心臓毒性を防止するステップに関与していることを明らかにし、受容体を刺激するアゴニストを見つけることを

目的とした。

### 3. 研究の方法

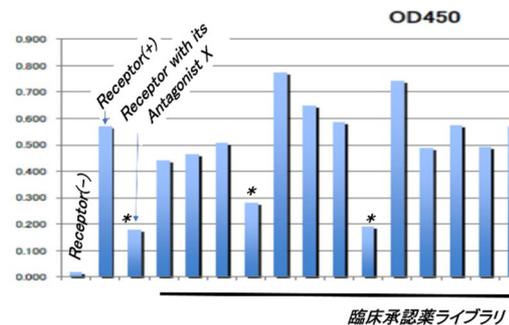
#### (1) 受容体を介したシグナルの証明

我々が見出した新しいグレリン受容体 DAGR のノックアウトマウスを作製し、抗がん剤ドキソルピシン投与による心不全に対し、グレリンを投与することで症状改善がみられるか否かを心エコーで評価する。我々の予想通りなら、受容体 DAGR ノックアウトにより、グレリンの抗心不全効果は無くなるはずである。さらに、DAGR をノックアウトした心筋培養細胞株を用いて、ドキソルピシン処理群とドキソルピシン+グレリン処理群で遺伝子発現を比較して、グレリンに反応する遺伝子発現の変化を明らかにしてグレリンによる細胞保護効果の細胞内シグナルを確定する。ドキソルピシン処理で心筋細胞の活性酸素報告に関わる NADPH オキシダーゼ量が増加するという生理研からの報告 (JClinsight, 2017 年) があるため、デスアシルグレリン投与で同酵素の発現量についても検討した。

#### (2) グレリンと新規グレリン受容体結膜たんぱく質 DAGR との結合に干渉する化合物のスクリーニング

新規グレリン受容体結膜たんぱく質 DAGR に作用する薬剤は受容体に結合してリガンドと競合する可能性があることを利用し、現在 96 ウエルマイクロプレートで化合物スクリーニングを行った。確かに競合する化合物はあるようだ (右図は予備実験中データ)。化合物ライブラリーは慶応大から提供を受けている。

Chemical libraryを用いたDAG/受容体競合assay (予備実験中)

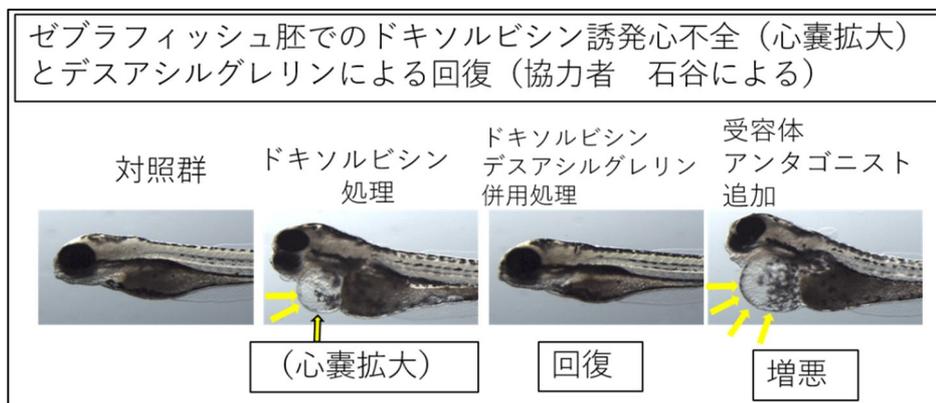


#### (3) ゼブラフィッシュやマウスを使った作用の検証

ゼブラフィッシュは脊椎動物で薬品投与や観察が容易であり本計画に適している。右下図のように、現在はドキソルピシンによる心不全 (心嚢の拡大) をデスアシルグレリンで軽減でき、さらにその受容体 DAGR に結合するアンタゴニストペプチドの投与でデスアシルグレリンの作用が解除できることまで確認した (下の写真参照)。

研究方法 (2) で得られた候補化合物をゼブラフィッシュ胚に投与して、グレリンと同様にドキソルピシンによる心不全 (心嚢拡大) を防げるか否かを検証した。

ゼブラ胚にヒト腫瘍細胞を移植してこのアッセイを行うこともできるので、ドキソルピシン



の抗腫瘍効果を保持しながら、心嚢拡大を起こさせないことを目安にさらに絞り込みも可能である。ゼブラフィッシュでの検証で効果が確認された薬物をマウスに投与し、ドキソルピシンによる心不全を防ぐか検証する。この際、研究方法(1)で同定したグレリンの細胞内シグナルの変化に類似の効果があるかどうか、再びDNAアレイで比較した。

現在、臨床使用を承認された化合物のライブラリーをスクリーニングしているので、この後は直ちに臨床試験へステップアップすることが可能であるが、それは別の研究計画として行っている。

#### 4. 研究成果

##### (1) デスアシルグレリンによるドキソルピシンの心筋毒性の抑制

ドキソルピシンは乳がん、消化器癌、軟部腫瘍など多くの悪性腫瘍に使用される抗がん剤だが、投与例の数パーセントで心電図異常が認められ、中断しない場合致命的な心不全へと進行するので注意すべきであることが知られている。ドキソルピシンの心毒性を弱めるような処置があれば化学療法と併用し安全性も治療効果も改善すると考えられる。これまでに、我々は、ラット心筋培養細胞をドキソルピシンで処理したときの細胞毒性をデスアシルグレリンが抑制することを見出し発表しているが、今回デスアシルグレリン全長でなくてもドキソルピシンの心筋毒性を抑制できることを確認した。

##### (2) デスアシルグレリン受容体タンパク質の同定

本研究では、デスアシルグレリンと相互作用する膜タンパク質 DAGR を見出し、その作用の解析を行った。デスアシルグレリンは DAGR に対して  $K_d$  (解離定数) が 200 ~ 1000 nM 程度と中程度の親和性を示すことが明らかとなった。アシルグレリンはデスアシルグレリンと DAGR の結合に対して競合的に阻害することが判明した。したがって、DAGR はアシルグレリンとデスアシルグレリンの両方のシグナルを受容できる可能性が明らかとなった。ビオチン標識デスアシルグレリンでラット心筋由来 H9c2 細胞を処理した後、洗浄操作を行った後で、デスアシルグレリンを染色したところ、細胞表面へのデスアシルグレリンの結合を観察することが出来たが、crisper/CAS9 を用いて作製した DAGR のノックアウト細胞株では、細胞表面へのデスアシルグレリンの結合を検出することが出来なくなった。したがって、DAGR は心筋細胞でのグレリン類の受容体として機能している可能性があると考えられた。

##### (3) デスアシルグレリン受容体タンパク質のノックアウトマウスの作製

DAGR のノックアウトマウスを作製するための交配を行い、ホモ接合体のノックアウト個体から心筋組織を採取してリアルタイム PCR や免疫染色を行ったところ、心筋での DAGR の発現は消失していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Yusuke, Fuchigami Takao, Kishida Michiko, Koyama Hirofumi, Iijima Mikio, Oishi Kazuki, Kibe Toshiro, Ishihata Kiyohide, Nishizawa Yoshiaki, Kiyono Tohru, Nakamura Norifumi and Kishida Shosei	4. 巻 -
2. 論文標題 Interleukin-1 promotes matrix metalloproteinase-9 expression, cellular motility, and local invasiveness of ameloblastoma cell.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Science International	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) 10.1002/osi2.1193	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 Fujii Shinsuke, Fujimoto Tatsufumi, Hasegawa Kana, Nagano Ryoko, Ishibashi Takuma, Kurppa Kari J., Mikami Yurie, Kokura Megumi, Tajiri Yudai, Kibe Toshiro, Wada Hiroko, Wada Naohisa, Kishida Shosei, Higuchi Yoshinori, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 153991 ~ 153991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.153991	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 Chairani Elissa, Fuchigami Takao, Koyama Hirofumi, Ono Yusuke, Iijima Mikio, Kishida Michiko, Kibe Toshiro, Nakamura Norifumi, Kishida Shosei	4. 巻 30
2. 論文標題 Intercellular signaling between ameloblastoma and osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101233 ~ 101233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101233	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 Bakkalci Deniz, Jay Amrita, Rezaei Azadeh, Howard Christopher A., Haugen Havard Jostein, Pape Judith, Kishida Shosei, Kishida Michiko, Jell Gavin, Arnett Timothy R., Fedele Stefano, Cheema Umber	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioengineering the ameloblastoma tumour to study its effect on bone nodule formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-03484-5	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 Tellez Carmen S, Juri Daniel E, Phillips Loryn M, Do Kieu, Thomas Cindy L, Willink Randy, Dye Wendy W, Wu Guodong, Zhou Yue, Irshad Hammad, Kishida Shosei, Kiyono Tohru, Belinsky Steven A	4. 巻 184
2. 論文標題 Comparative Genotoxicity and Mutagenicity of Cigarette, Cigarillo, and Shisha Tobacco Products in Epithelial and Cardiac Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 67 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfab101	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 Fuchigami Takao, Ono Yusuke, Kishida Shosei, Nakamura Norifumi	4. 巻 57
2. 論文標題 Molecular biological findings of ameloblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 27 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2020.12.003	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 Tellez Carmen S, Juri Daniel E, Phillips Loryn M, Do Kieu, Yingling Christin M, Thomas Cindy L, Dye Wendy W, Wu Guodong, Kishida Shosei, Kiyono Tohru, Belinsky Steven A	4. 巻 179
2. 論文標題 Cytotoxicity and Genotoxicity of E-Cigarette Generated Aerosols Containing Diverse Flavoring Products and Nicotine in Oral Epithelial Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 220 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfaa174	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 Hook Sharon C., Chadt Alexandra, Heesom Kate J., Kishida Shosei, Al-Hasani Hadi, Tavare Jeremy M., Thomas Elaine C.	4. 巻 10
2. 論文標題 TBC1D1 interacting proteins, VPS13A and VPS13C, regulate GLUT4 homeostasis in C2C12 myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-74661-1	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 該当する

1. 著者名 Alshargabi Rehab, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Takano Aiko, Sanada Taiki, Iwashita Misaki, Shinjo Takanori, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Kishida Shosei, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 SPOCK1 is a novel inducer of epithelial to mesenchymal transition in drug-induced gingival overgrowth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-66660-z	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 FUCHIGAMI Takao, SUZUKI Hajime, YOSHIMURA Takuya, KIBE Toshiro, CHAIRANI Elissa, KIYONO Tohru, KISHIDA Michiko, KISHIDA Shosei, NAKAMURA Norifumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Ameloblastoma cell lines derived from different subtypes demonstrate distinct developmental patterns in a novel animal experimental model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	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) 10.1590/1678-7757-2019-0558	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 Al-Tayar Badr Abdullah, Ahmad Azlina, Yusoff Mohamad Ezany, Abdullah Siti Fadilah, Mohamad Noor Khairiena, Md Hashim Siti Nurnasihah, Kishida Shosei, Kishida Michiko, Nakamura Norifumi, Kibe Toshiro, Harun Masitah Hayati	4. 巻 21
2. 論文標題 Cytotoxic Effects of Betel Quid and Areca Nut Aqueous Extracts on Mouse Fibroblast, Human Mouth-Ordinary-Epithelium 1 and Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31557/APJCP.2020.21.4.1005	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Miki Nonaka, Susumu Ueno, Ryo Kakigi, Shosei Kishida, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Kanako Miyano, Kiyoshi Terawaki, Takashi Sakurai, Yasuhito Uezono
2. 発表標題 Therapeutic effects of voluntary wheel running on cancer cachexia-induced cardiac dysfunction: Approach from the perspective of Cardio-oncology
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022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
研究協力者	上園 保仁  (UEZONO Yasuhito)		
研究協力者	石谷 太  (ISHITANI Tohru)		
研究協力者	西澤 芳明  (NISHIZAWA Yoshiaki)		
研究協力者	大石 一樹  (OISHI Kazuki)		
研究協力者	岸田 想子  (KISHIDA Michiko)		

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