

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K06597

研究課題名（和文）新規デスアシルグレリン受容体を介した化合物やペプチドを用いた抗がん剤心不全の抑制

研究課題名（英文）Inhibition of myocardial cell death by novel chemicals and peptides through desacyl-ghrelin dependent-pathway

研究代表者

小山 浩史（Koyama, Hirofumi）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40709656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗がん剤ドキソルビシンの心毒性をデスアシルグレリンというペプチドホルモンが軽減することに着目し、デスアシルグレリンの受容体を探索した。さらに、デスアシルグレリン受容体に結合する化合物やペプチドを探索して、複数の分子を同定した。デスアシルグレリンまたは下流のシグナル分子を刺激することで、ドキソルビシンを投与する際の心筋毒性を軽減し、安全に十分なドキソルビシン投与を行える可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドキソルビシンの毒性を抑えつつ、十分な量の投与を行うことができれば、がんの化学療法を心毒性のために途中で中止することなく最後まで実施でき、奏効する可能性が高くなり、がん患者のより良い生活に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We were inspired that a desacyl-ghrelin, a kind of peptide hormone can reduce the cardiotoxicity of the doxorubicin (anti-cancer drug). We explored and identified the receptor of the hormone. We further identified several chemicals and artificial peptides that interacted with the receptor of the hormone. Administration of these molecules with doxorubicin might lower the cytotoxicity of doxorubicin.

研究分野：分子生物学

キーワード：ドキソルビシン 心毒性 グレリン 受容体 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

心筋は、各種のストレスに対しオートファジーで対応出来ないときはアポトーシスで、アポトーシスを発動できないときはマクロファージや周囲の正常な心筋に自らの傷害を伝えるシグナル分子を放出し免疫系を動員する。そのように、心筋は細胞あるいは臓器全体として機能を維持しようとする頑強なシステムを持っているはずだが、抗がん剤として広く使われているドキソルビシンに対する耐性が低く、がん治療上は心毒性が大きな問題となる。抗がん剤ドキソルビシンでの心筋細胞死には、アポトーシスやフェロトーシス(鉄依存的細胞死) (Fangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 116, 2672-2680. (2019))、ミトファジー(ミトコンドリアオートファジー)、ネクロトーシス(制御されたネクローシス)などが関与する可能性が個別に報告されている。おそらく「各種のストレスに対して心筋が進化の過程で獲得してきた「防御システム」が、抗がん剤に対しては機能破綻を起こすのではないかと私共は考えている。これが、私共が検証しようとする大きな仮説である。

そこで、本計画では、抗がん剤であるドキソルビシンの副作用である心不全・心筋細胞死を抑制するペプチドホルモンであるデスアシルグレリンのシグナルに着目し、私共が発見したデスアシルグレリン新規受容体(未発表の為、遺伝子名は秘匿)を標的とした解析で、細胞死抑制の作用点の解明や受容体を刺激する化合物や人工ペプチドによる心不全治療薬開発につながる知見を検討した。

2. 研究の目的

心筋独自の生存を維持するための機構とその破綻のシグナルで起こると考えられる抗がん剤心毒性の発現機構を探り、さらにその心毒性を抑制する化合物やペプチドを探索するのが本研究の目的である。併せて、ゼブラフィッシュとマウスを使った実験系で、抗がん剤細胞死システムに関する仮説を検証し、私共が発見した新たなデスアシルグレリン受容体を介したシグナル伝達との関係を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(研究計画・方法1)

抗がん剤ドキソルビシンによる心筋細胞死を抑制するシグナルの作用機構の解析

(小山・上園担当)

これまでに心筋細胞の抗がん剤毒性に関わる分子や経路として、オートファジー、フェロトーシス、活性酸素産生を促進するカルシウムチャネルタンパク質 TRPC3 (西田ら、JCI insight, 2, e93358. (2017))やミトコンドリア由来 DNA による TLR9 の活性化などいくつかの報告がある。私共も食欲促進に働く 28 アミノ酸からなる

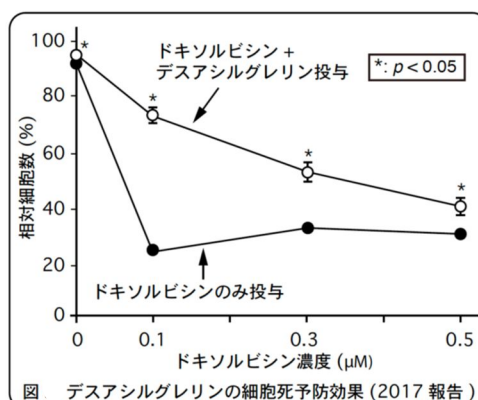
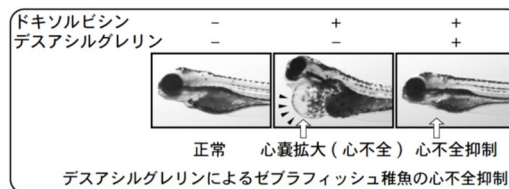


図 デスアシルグレリンの細胞死予防効果 (2017 報告)

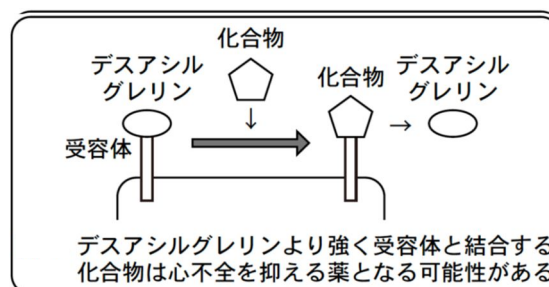
デスアシルグレリンというペプチドホルモン(グレリンの非脂肪酸修飾型である)がドキシソルピシン依存性の心筋細胞死を防ぐことを見出している(前ページ 図 Endocr. J., 64, S35-S39. (2017))が、デスアシルグレリンがどの心筋細胞死経路に作用しているかは明らかではない。既に、私共はデスアシルグレリンがゼブラフィッシュ稚魚へのドキシソルピシンによる心毒性をほぼ完全に抑制出来ることも見出している(右図)。このモデルでは、デスアシルグレリンが上述のオートファジーやフェロトーシス、カルシウムチャネル、TLR9 のシグナルなどに作用している可能性がある。そこで、上記のパスウェイの挙動を解析して、デスアシルグレリンによる心不全抑制の具体的なメカニズムの解析を行った。



(研究計画・方法2)

心毒性を抑える可能性がある化合物のスクリーニングと解析(上園担当)

私共は、新規デスアシルグレリン受容体に作用する薬剤が受容体に結合してリガンドと競合する可能性がある(右図)ことを利用し、デスアシルグレリン受容体の結合を阻害する化合物のスクリーニングを行った。



(研究計画・方法3)

受容体高親和性ペプチドによる心不全制御の試み(小山担当)

細胞でデスアシルグレリン受容体とランダムディスプレイライブラリーを発現させ、野生型デスアシルグレリンよりも強固に受容体と結合する人工ペプチドをスクリーニングした。

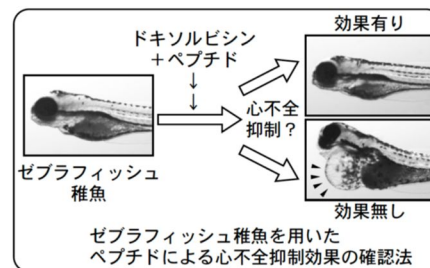
4. 研究成果

計画・方法1 に関して

私共は、ゼブラフィッシュ稚魚にドキシソルピシンを投与すると、フェロトーシスのマーカーであるシクロオキシゲナーゼ ptgs2a, b (COX2)をはじめとして数種類の遺伝子の発現量が、数倍増減することを RT-PCR で確認した。したがって、フェロトーシスによる細胞応答に注目し、デスアシルグレリン存在下で、これらの遺伝子発現量の変化を指標にして、デスアシルグレリンの心臓保護作用のメカニズムの解析を行っている。さらに、私共が樹立した心臓特異的デスアシルグレリン受容体ノックアウトマウスの、ドキシソルピシンまたはドキシソルピシン+デスアシルグレリン同時処理群を用いて心臓の遺伝子発現を RNA-Seq で比較して、デスアシルグレリンに反応する遺伝子を明らかにし、心臓保護効果の細胞内シグナルの検討を行っている。私共は、マウスモデルでもゼブラフィッシュ稚魚と同様、ドキシソルピシン投与による Ptgs2 などの発現量変化を確認しており、これらを指標にして解析を進めている。

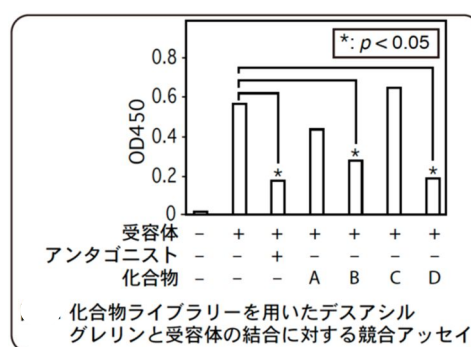
私共はデスアシルグレリン (Desacyl-ghrelin, DAG) がゼブラフィッシュ胚でのドキシソルピシン投与による心嚢拡大 (心毒性の表現型) を抑制できることを見出し、ゼブラフィッシュ胚にドキシソルピシンを投与した際に NPP などの心不全マーカーや炎症性サイトカイン類の遺伝子発現が亢進することを見出した。

しかし、デスアシルグレリンと結合する受容体の実体は不明だったため、スクリーニングを行い、デスアシルグレリン受容体の同定に成功した。また、デスアシルグレリン受容体ノックアウトマウスの作製も行った。デスアシルグレリン受容体ノックアウトマウスにドキシソルピシンを投与するとゼブラフィッシュ胚と同様の遺伝子発現の変化を確認した。



計画・方法 2 に関して

デスアシルグレリンを 96 ウェルプレートに固相化し、慶応大学より提供を受けた既存薬ライブラリーを用い、デスアシルグレリン受容体の結合を阻害する化合物のスクリーニングを始め、既に 26 種類の候補化合物を得た (右図 B, D)。これらの受容体と結合する薬剤は、アゴニストとして働きドキシソルピシン誘発心不全を抑制する薬剤となる可能性がある。そこで、ゼブラフィッシュやマウスモデルを用いて、スクリーニングで見出した化合物がドキシソルピシンの心毒性を抑制出来るか否かを、ゼブラフィッシュ胚にドキシソルピシンを投与した際に NPP などの心不全マーカーや炎症性サイトカイン類の遺伝子発現が亢進することを指標にして解析したが細胞保護的な作用のある化合物は今のところ特定できていない。



計画・方法 3 に関して

ランダムディスプレイライブラリーをスクリーニングして 600 万クローンから 30 種類程度デスアシルグレリン受容体と結合しうる人工配列ペプチドを得ることができた。これらの内、数種類は半定量的な *in vitro* の結合実験で野生型よりも強く受容体と結合し、リコンビナントタンパク質を用いて得られた配列と受容体間の解離定数 K_d を測定したところ、野生型デスアシルグレリンより低い K_d を示すものが得られた。これらのペプチドは受容体と結合してシグナルを強く活性化し、野生型デスアシルグレリンよりも強力にドキシソルピシンによる心不全を抑制出来る可能性がある。そこで、これらの変異型デスアシルグレリンや変異部分のみを含む短いペプチドを合成し、ゼブラフィッシュ稚魚やマウスにドキシソルピシンと同時に投与して、心不全抑制効果の有無を遺伝子発現と心嚢拡大像を指標に解析したところ、デスアシルグレリンと同程度の細胞保護効果を示すものが得られたため、現在、用量依存性などの定量的評価を進めている。

まとめ

ドキシソルピシンは現在でも化学療法の基本的な薬剤として多用されている抗がん剤で、乳がんや消化器がん、ユーイング肉腫など様々な悪性腫瘍に用いられているが、

副作用として不可逆的な心毒性を発症する点が使用上の大きな問題となる。総投与量に注意しながら、不整脈や心不全の兆候が見られた場合、化学療法は中止しなければならない。しかし、心毒性を適切に抑制できれば、悪性腫瘍に対する化学療法を中止せず完了できる可能性がある。私共はデスアシルグレリン (Desacyl-ghrelin, DAG) がゼブラフィッシュ胚でのドキソルビシン投与による心嚢拡大 (心毒性の表現型) を抑制できることを見出し、ゼブラフィッシュ胚にドキソルビシンを投与した際に NPP などの心不全マーカーや炎症性サイトカイン類の遺伝子発現が亢進することを見出した。しかし、デスアシルグレリンと結合する受容体の実体は不明だったため、スクリーニングを行い、デスアシルグレリン受容体と考えられる膜タンパク質 DAGR の同定に成功した。さらに、様々な DAGR の欠失変異体を作成し、DAGR のどの領域に DAG が結合するかを明らかにすることが出来た。DAGR を刺激するアゴニスト化合物を同定出来れば、DAG に類似の作用を示し、抗心不全作薬となる可能性があると考え、DAGR と結合する化合物を既存薬ライブラリーやペプチドライブラリーよりスクリーニングした。得られたいくつかの化合物やペプチドについて、ゼブラフィッシュ初期胚でのドキソルビシンによる心毒性に対する作用を検討した。これまでのところ、低分子化合物については心毒性を抑制するものは得られていないが、ペプチドについては心毒性に対し抑制的な作用を示すものをいくつか見出すことに成功した。現在、これらペプチドと DAGR の親和性の強さや、マウスでもゼブラフィッシュ胚と同様に心不全予防効果を示すことが出来るか否かの検証を進めている。

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 1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, Kishida Shosei	4. 巻 21
2. 論文標題 Interleukin 1 promotes matrix metalloproteinase 9 expression, cellular motility, and local invasiveness of ameloblastoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 112 ~ 120
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 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 Arai H, Maeda K, Wakabayashi H, Naito T, Konishi M, Assantachai P, Auyeung W T, Chalerm Sri C, Chen W, Chew J, Chou M-Y, Huang H-H, Hsu C-C, Hum A, Hwang I G, Kaido T, Kang L, Uezono Y, Chen L-K	4. 巻 14
2. 論文標題 Diagnosis and outcomes of cachexia in Asia: Working Consensus Report from the Asian Working Group for Cachexia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 1949 ~ 1958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13323	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 Karaki Fumika, Oki Tomoya, Sakao Yuma, Sato Noriko, Hirayama Shigeto, Miyano Kanako, Uezono Yasuhito, Fujii Hideaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Identification of a Putative Arrestin Superagonist of the Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 3463 ~ 3476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202100322	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上園保仁
2. 発表標題 グレリンシグナルの多様性を広げるシグナルエンハンサーたち～漢方薬、食品成分、新薬の上手な利活用～
3. 学会等名 第52回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上園保仁
2. 発表標題 がん悪液質の成因と症状およびその対策
3. 学会等名 第56回日本成人病(生活習慣病)学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤元秀、野中美希、丸山崇、石塚恒年、長谷川渉、溝上峻、上田陽一、上園保仁、上野晋
2. 発表標題 ヒト胃がん細胞移植マウスに出現する概日リズムの変化
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中美希、柿木亮、岸田昭世、大島佳織、後藤元秀、上園保仁、上野晋
2. 発表標題 がん悪液質モデルマウスに出現する心機能障害と自発運動負荷がもたらす治療的效果
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中美希、大島佳織、上園保仁
2. 発表標題 がん悪液質に関連する心機能障害に対する新規治療法の確立～自発運動を用いて～
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上園保仁、野中美希、宮野加奈子
2. 発表標題 健康寿命を延伸させる「グレリンシグナルエンハンサー」としての漢方薬六君子湯の作用とその機序解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野中美希、上野晋、上園保仁
2. 発表標題 がん患者における心機能低下のメカニズム　がん悪液質モデルマウスを用いた基礎的検討
3. 学会等名 第4回日本腫瘍循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上園保仁.
2. 発表標題 支持・緩和療法研究分野での創薬トランスレーショナルリサーチ：基礎研究のシーズをいかにして患者に届けることができるのか、その工夫は？（特別講演）
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2021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 分担者	上園 保仁 (Uezono Yasihito) (20213340)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

	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	岸田 昭世 (Kishida Shosei)		
研究 協力者	岸田 想子 (Kishida Michiko)		
研究 協力者	大石 一樹 (Oishi Kazuki)		

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