

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790684

研究課題名（和文）

ドキシソルビシン心筋症発症におけるユビキチン転移酵素 Itch の機能の検討

研究課題名（英文）

Functional analysis of Ubiquitin ligase Itch in doxorubicin-induced cardiomyopathy

研究代表者

高橋 大（TAKAHASHI HIROKI）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90400548

研究成果の概要（和文）：

ドキシソルビシン心筋症の発症メカニズムを、ユビキチン転移酵素 Itch と thioredoxin-interacting protein (TXNIP)に着目して検討した。Itch の knockdown により、ドキシソルビシンによる心筋細胞のアポトーシスがさらに悪化し、Itch の overexpression によってドキシソルビシンによる心筋細胞のアポトーシスは抑制された。これらの結果から、Itch はドキシソルビシン心筋症の発症予防や治療における重要な標的タンパクとなりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we focused on the interaction of ubiquitin E3 ligase Itch (a member of Ubiquitin-Proteasome system) and TXNIP to elucidate the mechanism for doxorubicin-induced cardiotoxicity. Knockdown of Itch attenuated doxorubicin-induced TXNIP degradation and subsequent increase in cleaved caspase-3. Furthermore, overexpression of Itch augmented doxorubicin-induced TXNIP degradation and resulted in reduction of cleaved caspase-3. These results suggest that Itch is one of potential target protein to prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ドキシソルビシン心筋症、ユビキチン転移酵素 Itch

## 1. 研究開始当初の背景

アントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質であるドキシソルビシンは30年以上前から

使用されており、現在においても悪性リンパ腫や肺癌などの治療の first line として用いられている非常に有用な抗悪性腫瘍薬である。

しかし、ドキシソルビシンはその重篤な副作用として不可逆的な心筋障害を引き起こすことが知られており、ひとたびドキシソルビシンによる心筋障害（ドキシソルビシン心筋症）を発症するとその予後は非常に悪く、致命的となる（*New Engl J Med* 1998,339,900-905）。

過去の報告によると、標準的なドキシソルビシン投与量である 550 mg/m<sup>2</sup> の投与であっても、ドキシソルビシン心筋症によるうっ血性心不全の発症率は約 10%と高いものになっている（*British Heart Journal* 1993,70,499-502）。このドキシソルビシン心筋症発症のメカニズムには、これまでフリーラジカルなどの増加によるミトコンドリアの障害（*Biochem Pharmacol* 1999,57,481-489）や心筋細胞のアポトーシスの関与などが報告されているが（*Cancer Res* 2002,62,4592-4598）、未だ十分な発症メカニズムの解明がなされておらず、同疾患の予防や治療には結びついていない。

以前、我々のグループは、ドキシソルビシン刺激により心筋細胞内で活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)が増加し、ROSにより心筋細胞アポトーシスが誘導されることで心筋細胞の脱落が起こることがドキシソルビシン心筋症の発症と関連していることを報告した（*Cardiovasc Res* 2003,57,119-128）。しかし、ドキシソルビシンにより細胞内の ROS turnover の恒常性が失われアポトーシスへと進んでいく機序については不明なままである。

## 2. 研究の目的

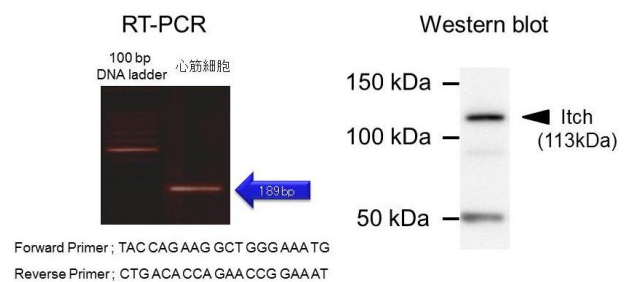
ドキシソルビシン心筋症発症のメカニズムを、ユビキチン転移酵素の Itch に着目し、Itch の機能と Itch の Thioredoxin system への関わりを解明することがこの研究の目的である。その結果、Itch を標的とした薬物・遺伝子介入により、ドキシソルビシン心筋症の発症予防や治療に結びついていくことが期待される。

## 3. 研究の方法

新生仔ラット培養心筋細胞を用いて Itch の loss/ gain of function の in vitro の実験を進め、その結果をもとに心筋特異的遺伝子改変マウスを作製し、in vivo での解析を行う。

## 4. 研究成果

Itch は、マウスにおける茶色の毛色（agouti）の遺伝子座を同定する研究の中で発見された。Itch 欠損マウスは、B リンパ球が増加するため IgE と IgM の産生が増加し、持続的に搔痒行動をとるうえに、慢性的な肺間質の炎症や肺胞蛋白症などの自己免疫性疾患を発症し、約 6~8 月齢で死亡する（*Nat Genet.* 1998,18,143-146）。その後の研究で Itch はユビキチン転移酵素の機能をもつことが明らかにされたが、これまで心臓・血管分野での研究はなく、培養心筋細胞において Itch の発現を検討した報告もなかった。そこでまず我々は、新生仔ラットより心筋細胞を単離・培養し、Itch の発現が見られるかを検討した。



< 図 1 >

上記の図 1 に示すように、培養心筋細胞に Itch の発現を認めることを mRNA および、タンパクレベルで確認した。

次に、ドキシソルビシン刺激（0.5 μM）による Itch タンパクの発現変化を、Itch 抗体を用いた Western blotting にて検討した。図 2 に示すように、Itch タンパクの発現は、ドキシソルビシン刺激により 6 時間後に一過性に増加することがわかった。しかし、その増加は 24 時間後には元の状態に戻っていた。

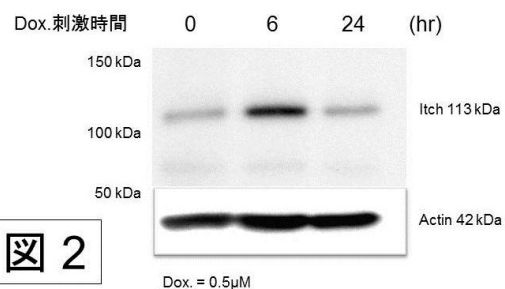
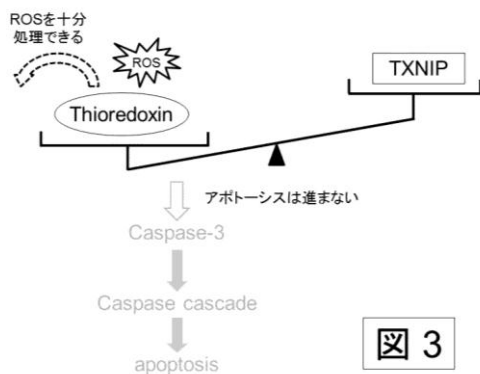


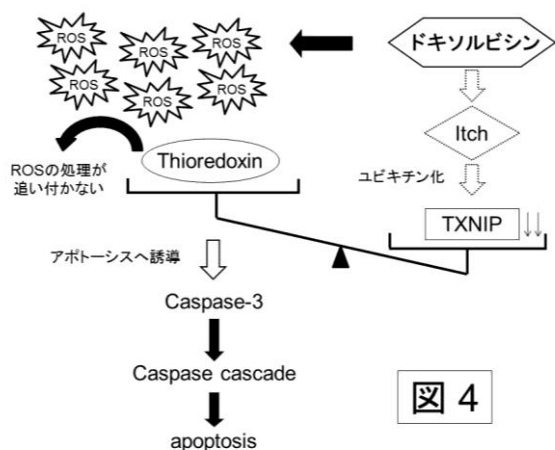
図 2

当初の実験計画では、Itch が Ubiquitination を行う標的タンパクで、かつアポトーシスにかかわるタンパクとして、抗アポトーシスタンパクである FLICE inhibitory protein (FLIP) に着目して検討を行った。しかし、ドキシソル

ビスン刺激によっても、FLIPには有意なタンパク発現の低下は見られなかった。そこでItchの新たな標的タンパクとして候補に挙げられたタンパクは、Thioredoxin-interacting protein (TXNIP)である。細胞内の活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS)のhomeostasisを維持するROS-scavenging systemの一つにThioredoxin systemがある。Thioredoxin systemは真核生物において高度に保存されており、多くの細胞で普遍的に機能している。このsystemを構成する重要な細胞内タンパクにThioredoxinとThioredoxin-interacting protein(TXNIP)がある。細胞内で生理的に生じるROSは相対的に少なく、Thioredoxinにより効率よく除去されるが(図3)、外部からの刺激により細胞内のROSが増加すると、反応性にThioredoxinの発現が増加し、Thioredoxinのアミノ酸構造中の2つのCysteine残基(Cys-32, Cys-35)に存在するチオール(R-SH)がROSによって酸化されることで細胞内のROSを減少させROSのhomeostasisを維持する方向に作用する(*Free Radic. Biol. Med.* 2007,43,861-868)。



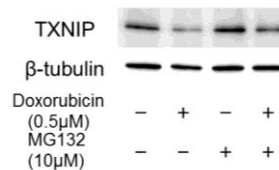
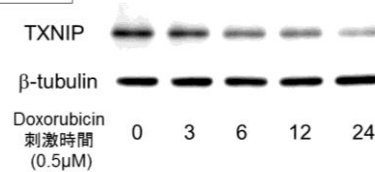
しかし、ROSの発生量によってはThioredoxinの抗酸化作用が不十分となる(図4)。



一方、TXNIPはThioredoxinのCystein残基に結合することで、Thioredoxinの抗酸化作用を抑制する作用があり、Thioredoxinの内在性のinhibitorとして機能していることが報告されている(*J Immunol* 2000,164,6287-95)。他にもTXNIPは、細胞増殖やアポトーシスといった多様な細胞内プロセスに関連していると報告されている(*Cell Mol. Immunol* 2007,4,345-351)。ドキシソルビスン刺激によるTXNIPの発現調節や、ドキシソルビスン心筋症の発症機序におけるTXNIPとThioredoxin systemとの関連について検討した研究はない。そこで、まずTXNIPの発現がドキシソルビスン刺激により変化するかを検討した、

図5に示すように、TXNIPはドキシソルビスン刺激により有意に発現の低下がみられ、そ

図5



の発現の低下はプロテアソーム阻害薬のMG132によって抑制された。さらに、免疫沈降により、ItchとTXNIPの間にはタンパク相互作用があり、bindingすることも確認できた。

次に、Itchの心筋細胞における機能を解析するために、loss of function、およびgain of functionの実験をin vitroにて行った。図6に示すように、siRNAにより心筋細胞中でItchをknock downしたところ、cleaved caspase-3がさらに増加し、それに伴い心筋細胞のアポトーシスも亢進することが判明した。

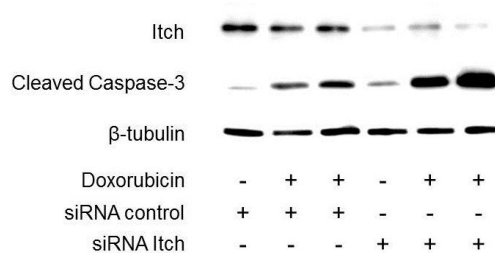


図6

さらに、Itch plasmidをtransfectionさせ、心筋細胞にoverexpressionさせたところ、図7に示すように、ドキソルビシン刺激の有無にかかわらずTXNIPの発現は低下し、ドキソルビシンによるcleaved caspase-3の発現の亢進も抑制された。このことから、Itchはドキソルビシン心筋症の発症に対してprotective、anti-apoptoticに機能していることが示唆された。

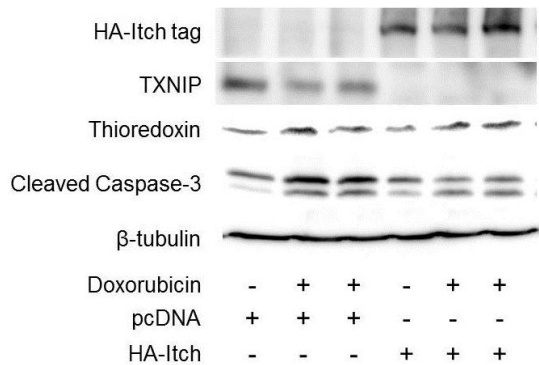
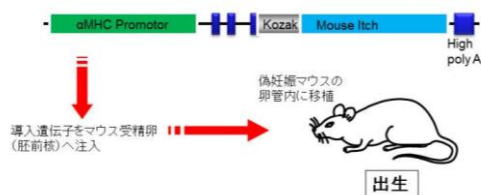


図 7

#### 心筋特異的Itch過剰発現マウスの作成

上記のin vitroでの実験結果をもとに、Itchの機能をin vivoで解析するために、Itchを心筋特異的に発現させたマウス(Itch TGマウス)の作成にとりかかった。α-MHC promoterの下流にItchを組み込んだ下図のようなTransgeneを作成し、constructの完成を経てItch TGマウスの作成に成功した。



現時点でF0が誕生し、3系統のItch TGマウスが得られ、遺伝子改変マウスの作成に成功したが、まだin vivo実験には移行できていない。

以上のように、報告書提出時点ではまだin vivoでの十分な検討はなされていないが、新生仔ラット培養心筋細胞を用いたin vitroの実験系では、ドキソルビシン心筋症の発症メカニズムにはItchとTXNIPを介する細胞内のThioredoxin systemの調節が関与しているこ

とが示唆された。Itchはドキソルビシン心筋症の発症予防や治療における重要な標的タンパクとなりうることが示唆された。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 大 (TAKAHASHI HIROKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90400548