

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860228

研究課題名(和文) 活性酸素種による心筋障害の病態形成におけるユビキチン転移酵素Itchの機能解析

研究課題名(英文) The Ubiquitin E3 Ligase ITCH Interacts with Thioredoxin-Interacting Protein and Ameliorates Reactive Oxygen Species-Induced Cardiotoxicity

研究代表者

高橋 大(Hiroki, Takahashi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90400548

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)：ITCHは、ユビキチン-プロテアソームシステムによる翻訳後修飾において重要な役割を担っており、細胞内の活性酸素種(ROS)調整システムであるthioredoxin systemの重要な構成因子であるThioredoxin-interacting protein (TXNIP)をユビキチン化する。ITCHを心筋細胞内で過剰発現させたところ、TXNIPが減少してROSによる細胞障害が抑制された。同様に、心筋特異的にITCHを過剰発現させたマウスではROSによる心機能低下が抑制され、生存率も改善した。ITCHは心筋細胞でTXNIPをユビキチン化し、ROSに対して細胞保護的に機能することが示された。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin E3 ligase ITCH is an enzyme that plays a pivotal role in posttranslational modification by ubiquitin proteasomal protein degradation. Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) is a negative regulator of thioredoxin system, which is an endogenous reactive oxygen species (ROS) scavenger. We focused on the functional role of ITCH and its interaction with TXNIP to elucidate the mechanism of cardiotoxicity induced by ROS. Overexpression of ITCH increased proteasomal TXNIP degradation and augmented thioredoxin activity, leading to inhibition of ROS generation and subsequent cardiomyocyte apoptosis in ROS-induced cardiotoxicity. In transgenic mice with cardiac-specific overexpression of ITCH, cardiac dysfunction and remodeling were restored compared with wild-type mice after ROS-induced cardiotoxicity. We demonstrated that ITCH targets TXNIP for ubiquitin-proteasome degradation in cardiomyocytes and ameliorates ROS-induced cardiotoxicity through thioredoxin system.

研究分野：細胞内シグナル伝達、ユビキチン・プロテアソームシステム

キーワード：ユビキチン転移酵素Itch 活性酸素種 ユビキチン・プロテアソームシステム TXNIP

## 1. 研究開始当初の背景

生体内において、活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)は細胞内シグナル伝達に関わっているだけでなく、その異常発生は酸化ストレスの増加につながりうる。酸化ストレスとは、ROSの異常発生に対する抗酸化機構とのバランスが破綻した状態であり、酸化ストレスの増加が病態に関与すると報告されている心血管疾患は少なくない。例えば、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抗悪性腫瘍薬のドキソルビシンによる心筋障害(ドキソルビシン心筋症)は不可逆的な心筋障害を引き起こすことが知られており、ひとたびドキソルビシン心筋症を発症するとその予後は悪く、致命的となる。このドキソルビシン心筋症の発症メカニズムとして、ROSの増加によるミトコンドリア機能の障害や心筋細胞のアポトーシスの増加の関与が報告されている。また、心筋梗塞発症後の非梗塞部心筋のリモデリング形成(心筋細胞の代償性肥大から線維化への進行)についても、アンジオテンシンIIにより心筋細胞のNADPH oxidaseが活性化され、細胞内ROSの増加がその病態に関与すると報告されている。

このように、ROSの増加は様々な心疾患の病態に関与しているが、ROSの生体内におけるhomeostasisを維持するための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。外部からの刺激などにより細胞内のROSが増加すると、反応性にThioredoxinの発現が増加して細胞内のROSを減少させ、ROSのhomeostasisを維持する方向に作用する。一方、TXNIPはThioredoxinに結合することで、前述のThioredoxinの抗酸化作用を抑制する作用があり、Thioredoxinの内在性のinhibitorとして機能することが報告されている。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が、心筋細胞でTXNIPの発現を検討した研究や、ドキソルビシン心筋症の発症機序および心筋梗塞後のリモデリング形成機序におけるTXNIPとThioredoxin systemとの関連について検討した研究報告はない。

この研究の中で我々は、TXNIPの細胞内発現を調節する系としてユビキチン-プロテア

ソームシステムに着目した。ユビキチンは他のタンパク質の修飾に用いられ、タンパク質の分解やDNA修復、翻訳調節などの様々な生命現象に関わっている。特に複数のユビキチンが付加された(ユビキチン化)タンパク質はプロテアソームと呼ばれる酵素複合体により分解される。このように、ユビキチン化は細胞内タンパク質の発現調節に重要な役割を担っている。ユビキチン化は、E1,E2,E3という3つの酵素の段階的な作用により進み、その中でもE3(ユビキチン転移酵素)は最終的に標的タンパク質にユビキチンを付加させる重要な役割を担っている。近年、293T cellやU2OS cellといったcell lineを用いたin vitro実験系において、TXNIPはユビキチン転移酵素Itchの標的タンパクであり、Itchとの相互作用でユビキチン化を受けることによりその細胞内発現が調節されていることが報告された。さらにこの報告の中で、細胞のアポトーシス誘導がTXNIPとItchの相互作用により調節を受けることも示されていた。これら過去の研究結果をふまえ、「ドキソルビシン心筋症の発症や心筋梗塞後のリモデリング形成などのROSの異常増加を伴う病的刺激が加わった場合、Itchとの相互作用を介してTXNIPのユビキチン化が進み、心筋細胞内でTXNIPの発現が低下することでThioredoxinを活性化させ、細胞内ROSのhomeostasisを維持しようと生体内のfeedbackが働くものの、そのみではThioredoxinによるROSの処理が追い付かないためにアポトーシスへの誘導が進み、各種病態を発症する」との仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスによる心筋障害発症のメカニズムを、細胞内の活性酸素種の調節系であるThioredoxin systemとユビキチン転移酵素Itchに着目してin vitroおよびin vivoの実験系において検討することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

ROSの増加が関与する心疾患の発症機序を証明するために、新生仔ラット培養心筋細胞を用いたin vitroの実験と、ドキソルビシン心筋症モデルマウス、および心筋梗塞モデルマウスを用いたin vivoの実験の2つの実験系で研究を行った。

In vitroの実験系においては、ドキソルビシンやH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激などにより、TXNIPがItchを介したユビキチン化によって発現の調節を受けることを薬剤(プロテアソーム阻害薬)や心筋細胞への遺伝子導入を用いて検討した。

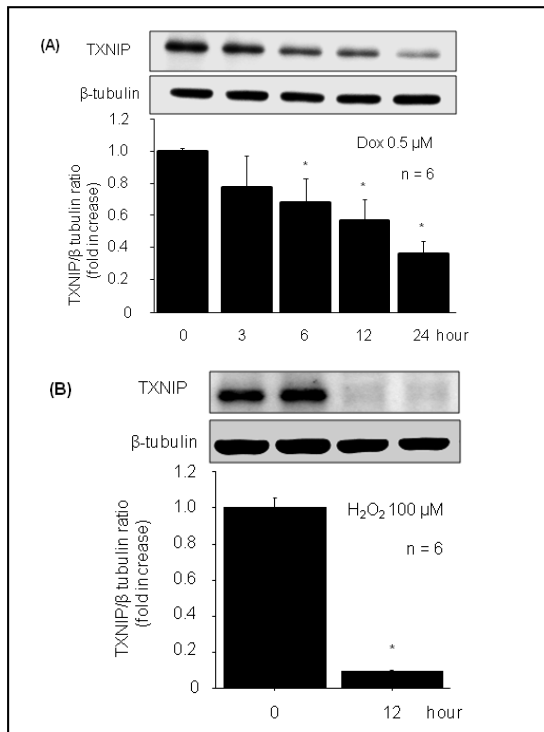
In vivoの実験系においては、Itchを心筋特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作製し、同マウスをドキソルビシン心筋症モデル、および心筋梗塞モデルとすることで、生存率や心機能などに与えるItchの

機能や, Itch が TXNIP のユビキチン化を介して Thioredoxin system に与える影響について解析した。

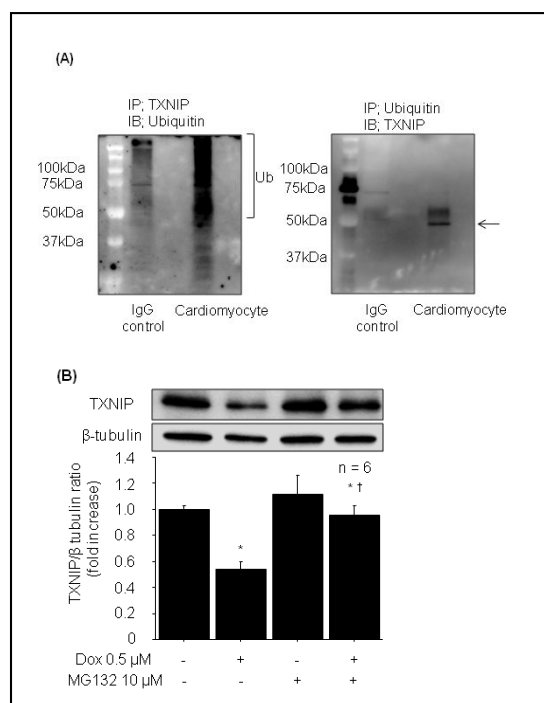
#### 4. 研究成果

ROS 刺激 (ドキシソルピシンや H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激) により, 心筋細胞中の TXNIP の発現が低下する (図 1 A,B) が, この低下には Itch を介して TXNIP に対するユビキチンの付加が関係しており, プロテアソーム阻害薬(MG132)によって ROS 刺激による TXNIP の発現低下は抑制された (図 2 A,B)。

[ 図 1 ]

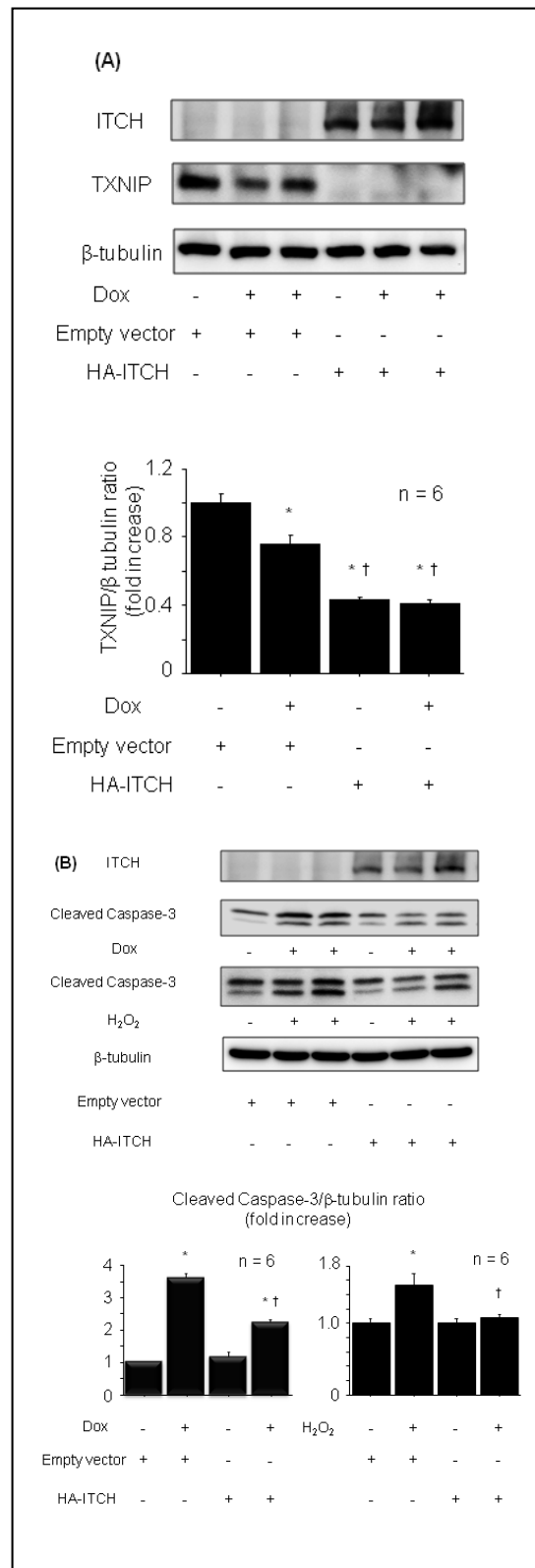


[ 図 2 ]

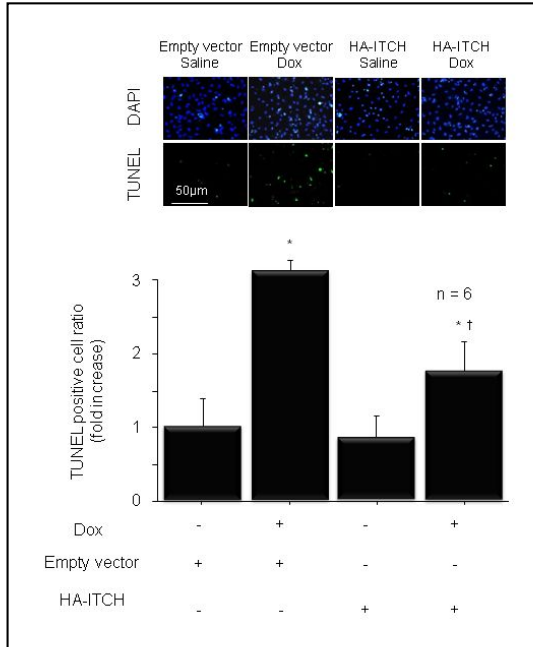


そこで, Itch を過剰発現した心筋細胞に ROS 刺激を行ったところ, TXNIP の発現低下は抑制され (図 3 A), 引き続いて起こる Cleaved-Caspase-3 の増加も抑制された (図 3 B)。さらに, TUNEL 染色にて, ドキシソルピシンによるアポトーシス誘導に対する Itch の機能を解析したところ, Itch を過剰発現させた心筋細胞では, ドキシソルピシンによるアポトーシスも有意に抑制された (図 4)。

[ 図 3 ]

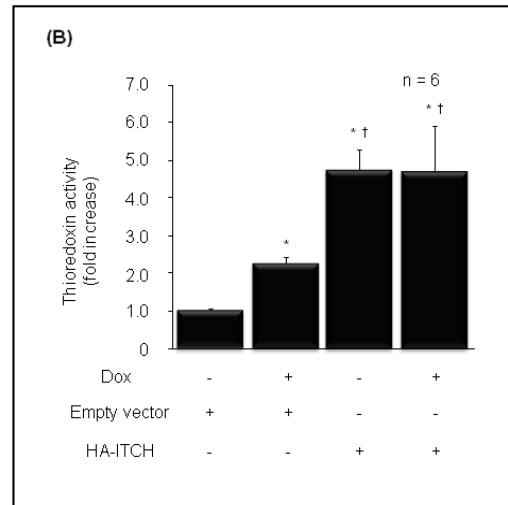
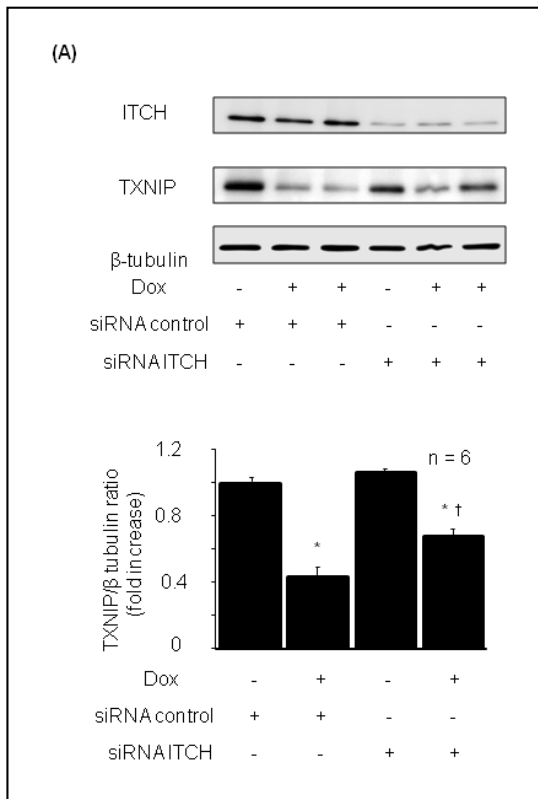


[ 図 4 ]



次に、ROS 刺激の際に siRNA にて Itch を knock down したところ、Cleaved Caspase-3 の増加が抑制された (図 5A)。さらに、Itch を過剰発現させた心筋細胞では、ROS 刺激の有無にかかわらず thioredoxin 活性が高いことを証明することができた (図 5B)。これは Itch の過剰発現により細胞内の TXNIP が高度に低下することに起因しており、これによってアポトーシスの抑制につながっていることが示唆された。

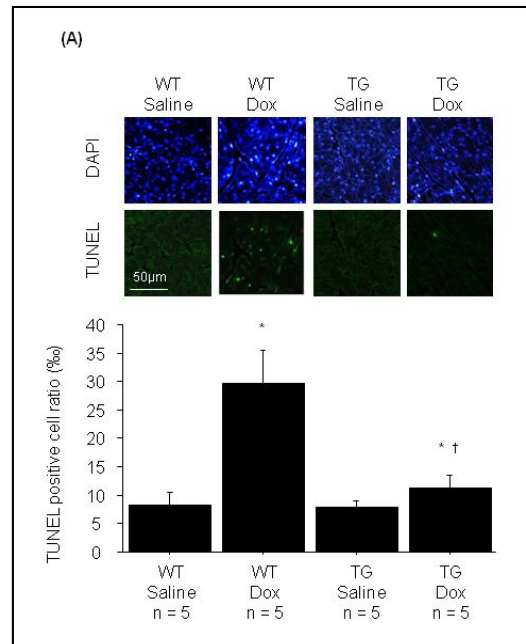
[ 図 5 ]

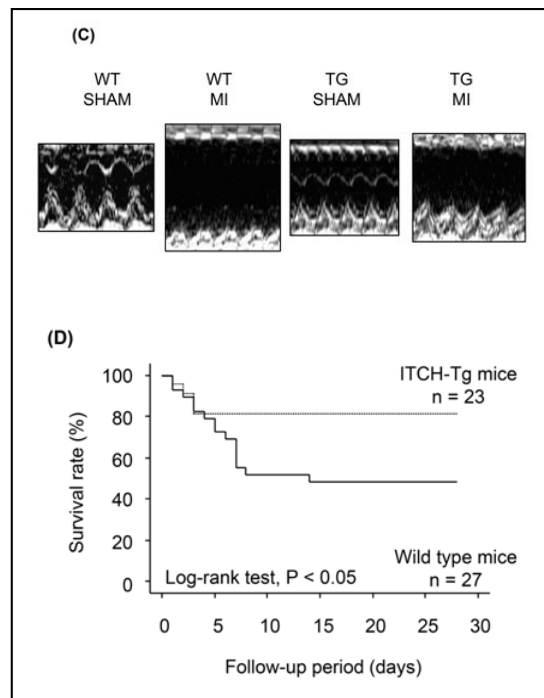
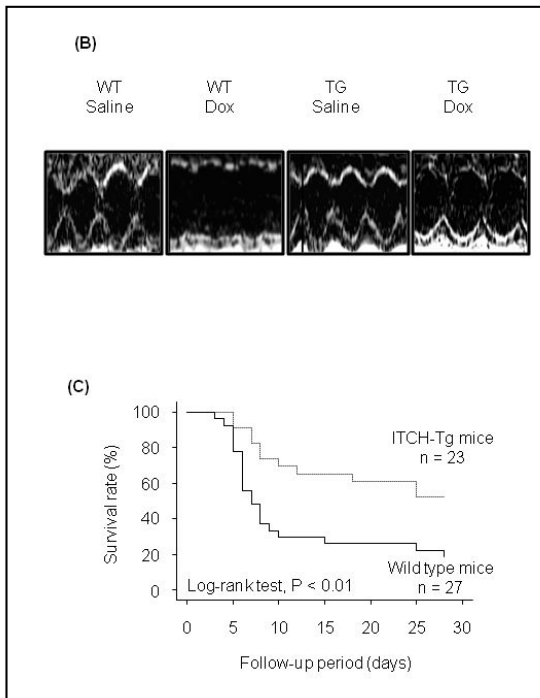


これらのことから、Itch は ROS による心筋障害に対して TXNIP をユビキチン化して分解することにより、細胞保護的に機能していることが示唆された。

これらの 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 を心筋特異的に過剰発現させたマウス (Itch TG マウス) を作成した。ドキシソルピシンを腹腔内投与したドキシソルピシン心筋症モデル、および心筋梗塞を作成した心筋梗塞モデルを、野生型マウスと Itch TG マウスそれぞれに作成し、心機能や生存率に与える影響を検討した。図 6A, B に示すように、ドキシソルピシンにより心筋組織中の TUNEL 陽性細胞が有意に増加してアポトーシスが進み、エコーで評価した心機能も有意に低下が見られるが、Itch TG マウスではアポトーシスの増加や心機能低下が有意に抑制された。また、Kaplan-Meier 法で評価した生存率も、Itch TG マウスではドキシソルピシンの腹腔内投与による生存率低下も有意に抑制した (図 6C)。

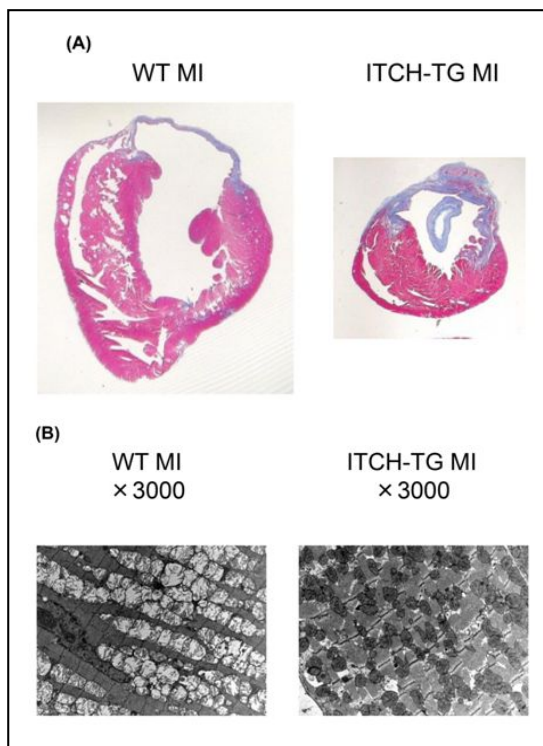
[ 図 6 ]





同様に、心筋梗塞モデルマウスにおいても検討を行った。Itch TG マウスでは、心筋梗塞後のリモデリングが抑制されており（図 7 A）、電子顕微鏡で非心筋梗塞部のミトコンドリアを評価したところ、Itch TG マウスではミトコンドリアの空胞化が有意に抑制されていた（図 7 B）。また、ドキソルビシン心筋症モデルと同様に、Itch TG マウスでは心筋梗塞後の心機能低下が有意に抑制されており、Kaplan-Meier 法で評価した生存率も、Itch TG マウスで有意に生存率低下が有意抑制されていた（図 7 C, D）。

[ 図 7 ]



以上の結果から、ドキソルビシン心筋症の発症や心筋梗塞後のリモデリング形成などの ROS の異常増加を伴う病的刺激が加わった場合、Itch は TXNIP をユビキチン化して心筋細胞内の TXNIP の発現を低下させることが示された。しかし、通常の Itch レベルでは病的な ROS 刺激を中和することができず、アポトーシスが進んでしまう。そこで、Itch を遺伝子的に過剰発現させることで、心筋細胞内に十分な Itch 量を確保することで TXNIP は十分にユビキチン化されて減少する。そのことによって Thioredoxin が活性化し、アポトーシスへの誘導を抑制することができるものと考えられた。これらのことから、Itch は心筋梗塞後やドキソルビシン心筋症のような ROS による病態の進行に対する新しい治療ターゲット分子となり得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 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

- 1) Otaki Y, Watanabe T, Takahashi H, Narmi T, Kadowaki S, Honda Y, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kubota I: The HECT Type E3 Ligase ITCH Ameliorates Left Ventricular Remodeling and Mortality after Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific session 2014, Chicago (USA); November 2014

2)Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Narmi T, Kadowaki S, Honda Y, Arimoto T, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Kubota I: Ubiquitin E3 Ligase ITCH Ameliorates Reactive Oxygen Species-Induced Cardiotoxicity through Interacting with Thioredoxin- Interacting Protein. American Heart Association Scientific session 2013, Dallas (USA); November 2013

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