

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893025

研究課題名(和文) 虚血性心筋症におけるユビキチン転移酵素ITCHの機能解明

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

研究代表者

大瀧 陽一郎(Otaki, Yoichiro)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80732693

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)：ユビキチン転移酵素ITCHは、Thioredoxin-interacting protein(TXNIP)をユビキチン化し、タンパク質分解を促した。TXNIPは酸化ストレスとアポトーシスの増悪因子である。培養心筋細胞において、ITCHを過剰発現し、TXNIPを強力に抑制することで、活性酸素種刺激に対して、酸化ストレスやアポトーシスを抑制した。更に、心筋特異的ITCH過剰発現マウスを用いて、ドキシソルピシン心筋症や急性心筋梗塞モデルを検討したところ、心保護効果や生存率の改善を認めた。ITCHは、酸化ストレスやアポトーシスの内在性調節因子であり、新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The HECT-Type 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. We focused on the functional role of ubiquitin E3 ligase ITCH and its interaction with TXNIP to elucidate the mechanism of cardiotoxicity induced by ROS. Protein interaction between TXNIP and ITCH was confirmed by immunoprecipitation assays. Overexpression of ITCH increased proteasomal TXNIP degradation and inhibited ROS generation, p38 MAPK, p53, and subsequent intrinsic pathway apoptosis in ROS-induced cardiotoxicity. We generated ITCH transgenic mouse. In ITCH-Tg mice, cardiac dysfunction and remodeling were restored compared with wild-type littermates after Dox injection and myocardial infarction surgery. ITCH targets TXNIP for ubiquitin-proteasome degradation and ameliorates ROS-induced cardiotoxicity through the thioredoxin system.

研究分野：心不全

キーワード：酸化ストレス ユビキチン ITCH

1. 研究開始当初の背景

生活様式の変化や人口の高齢化に伴い急性心筋梗塞は増加している。治療法の進歩により、急性心筋梗塞の死亡率は著明に改善したが、広範な心筋梗塞は、低心機能や左室のリモデリングにより心不全を発症する。東北 CHART 心不全レジストリーで、虚血性心筋症が増加していることが報告されている。心筋梗塞は梗塞領域において、心筋細胞がネクローシスやアポトーシスによる細胞死を来し、心筋細胞が減少し心収縮能を失う (Circ Res 2001; 89:198-200)。他方、心筋梗塞の非梗塞領域は、心筋がリモデリングし (心筋細胞の代償性肥大から線維化への進行)、心機能が低下する (Circulation 2001; 101: 2981-2988)。

このように、心筋梗塞はさまざまな機序が複雑に絡み合い不全心に至る。本研究では、細胞内のシグナル伝達を行うタンパク質が異なるが、それらに關与するタンパク質がユビキチン修飾を受けることに注目した。ユビキチン・プロテアソームシステムはユビキチン活性化酵素・ユビキチン結合酵素・ユビキチン転移酵素の3つの酵素により標的タンパク質にユビキチンを付加し、タンパク質分解を促す。HECT 型ユビキチン転移酵素は、現在数十種類が同定されているが、いずれも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。また、標的タンパク質を分解することで細胞内の恒常性維持・シグナル伝達・細胞死・細胞形態を調節することが示された。しかしながら、未だ心血管領域で HECT 型ユビキチン転移酵素の機能を検討した報告はない

2. 研究の目的

虚血性心筋症は、心筋梗塞後にさまざまな細胞内シグナルが複雑に絡み合い発症する。HECT 型ユビキチン転移酵素は、タンパク質をユビキチン修飾することで分解し、細

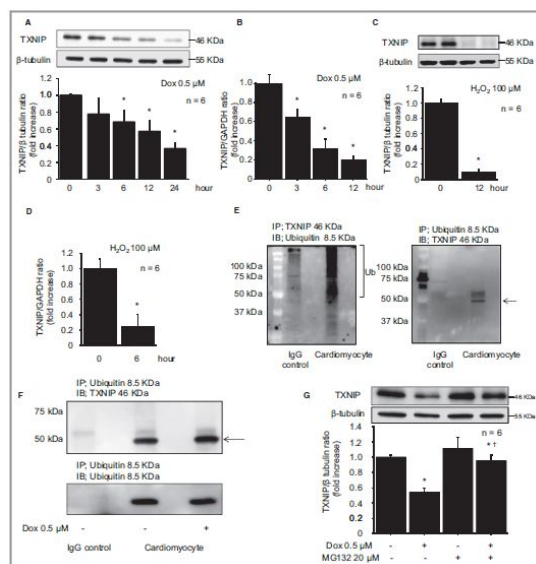
胞内シグナルを調節することが報告された。HECT 型ユビキチン転移酵素 ITCH は、標的タンパク質を分解することで、細胞死や細胞形態を調節する。本研究では、ITCH が標的タンパク質を分解することで、心筋細胞内シグナルに与える影響を検討するとともに、マウス心筋梗塞モデルや虚血再灌流モデルを作成し、心保護的に働くか検討を行う。ITCH を標的した薬物・遺伝子介入により、心筋梗塞の梗塞巣縮小や心筋リモデリング抑制を介した新たな治療法の開発が期待される。

3. 研究の方法

新生仔ラット心筋細胞を培養し、ITCH を過剰発現またはノックダウンして、基質のユビキチン化を促進するか、酸化ストレスやアポトーシスに与える影響を検討した。また、心筋特異的 ITCH 過剰発現マウスに対して、ドキシソルピシン心筋症や心筋梗塞を作成し、心機能や予後に与える影響を検討した。

4. 研究成果

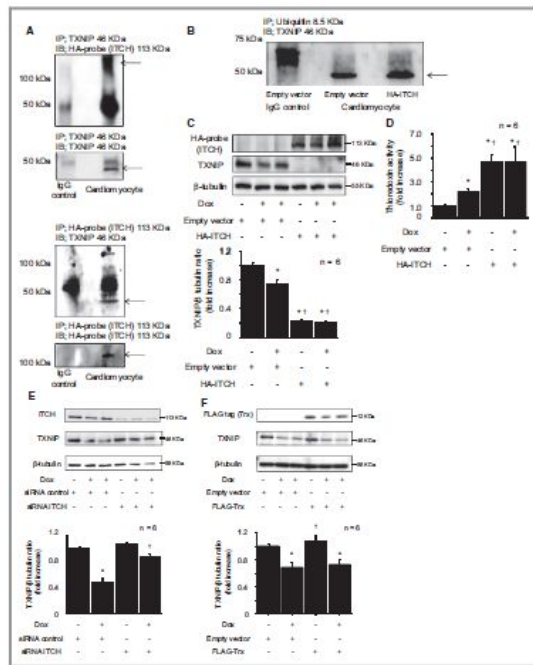
(図 1)



まず、新生仔ラット心筋細胞培養を施行し、ドキシソルピシン刺激および H2O2 刺激を施行した際に、ITCH の標的タンパク質であ

る TXNIP の発現量の変化を検討した。TXNIP は上記の図 1 のように、刺激を受けた際には、発現量が有意に減少した。また、TXNIP はユビキチン化が促進されており、プロテアソーム阻害剤で、TXNIP 分解が抑制されたことから、ユビキチン・プロテアソームシステムに依存したタンパク質分解により調整されることが示された。

(図 2)

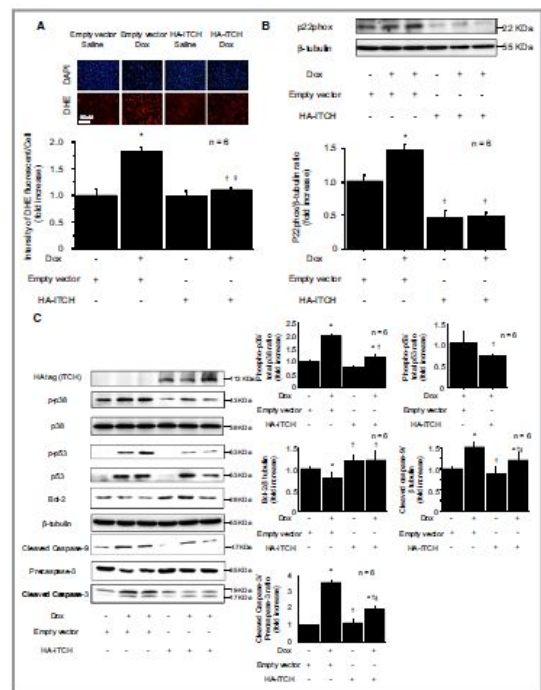


次に、TXNIP のユビキチン化が ITCH に依存するか検討した。免疫沈降反応により、ITCH と TXNIP が直接結合することを示した。ITCH を過剰発現すると、TXNIP のユビキチン化が促進され、タンパク質発現は有意に減少した。更に、ITCH を過剰発現すると、TXNIP 分解を介してチオレドキシシンが有意に活性化した。(図 2)

ITCH の機能をより詳細に検討する目的に、ジヒドロエチジウム染色を行った。ドキシソルビシン刺激に対して、スーパーオキシドの増加は有意に抑制された。また、NADPH oxidase の産生を抑制しており、活性酸素種の産生を抑制することが示された。アポトーシスに与える影響を検討する目的に intrinsic pathway を検討したところ、ITCH を過剰発現すると、p53, p38 のリン酸

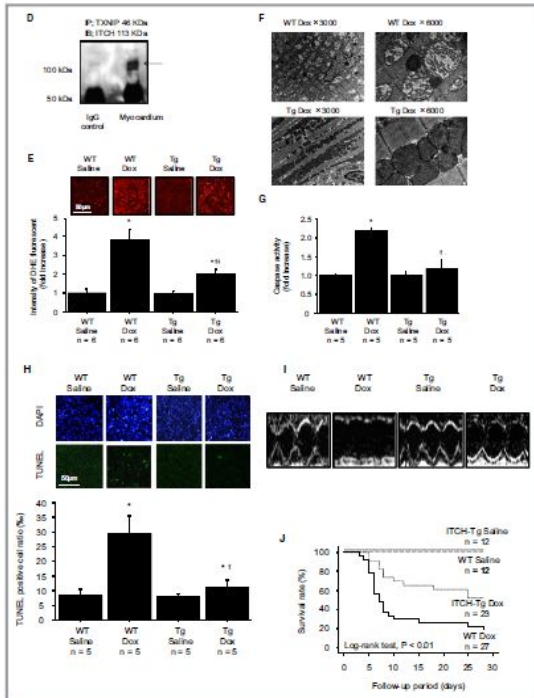
化が抑制され、Caspase9, Caspase3 が有意に抑制された。以上の結果から、ITCH を過剰発現すると、ドキシソルビシンや H2O2 刺激に対して、活性酸素種を抑制し、intrinsic pathway のアポトーシスを抑制することが示された(図 3) 以上の結果を踏まえて、ITCH 過剰発現マウスを作成する方針とした。

(図 3)



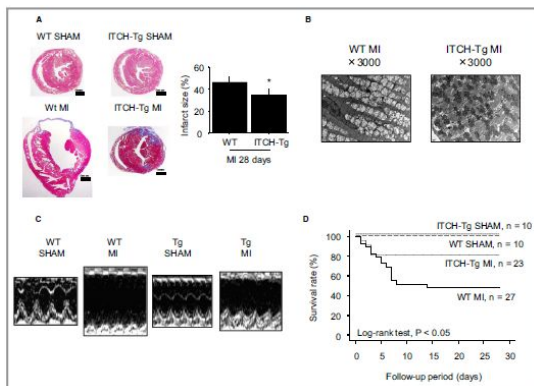
ITCH 過剰発現マウスは in vitro の結果と同様に TXNIP を抑制した。ドキシソルビシン心筋症を作成したところ、ジヒドロエチジウム染色の結果から、スーパーオキシドの産生が抑制されており、タネル染色でアポトーシスを抑制することを示した。酸化ストレスの評価として、ミトコンドリアの形態を観察したところ、野生型マウスではクリステが分解されていたのに対して、ITCH 過剰発現マウスではクリステは保たれており、ミトコンドリア由来の酸化ストレスを抑制する可能性が示唆された。心臓超音波検査では、ITCH 過剰発現マウスは心機能が保持されていた。 Kaplan-Meier 法で生存率を比較したところ、ITCH 過剰発現マウスは有意に生存率が高率であった。(図 4)

(図4)



最後に、心筋梗塞モデルを作成した。ITCH 過剰発現マウスは野生型マウスに比較して、心筋梗塞巣は有意に縮小していた。酸化ストレスの評価として、ミトコンドリアの形態を観察したところ、野生型マウスではクリステが分解されていたのに対して、ITCH 過剰発現マウスではクリステは保たれており、ミトコンドリア由来の酸化ストレスを抑制する可能性が示唆された。心臓超音波検査では、ITCH 過剰発現マウスは心機能が保持されていた。カプランマイヤー法で生存率を比較したところ、ITCH 過剰発現マウスは有意に生存率が高率であった。(図5)

(図5)



ユビキチン転移酵素 ITCH は、TXNIP を標的

タンパク質とし、ユビキチン分解を促し、酸化ストレスおよびアポトーシスを調節した。更に、ドキシソルピシン心筋症や心筋梗塞モデルにおいて、心保護的に働いており、ITCH を標的とした新たな治療薬の開発の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Funayama A, Netsu S, Honda Y, Narumi T, Kadowaki S, Hasegawa H, Honda S, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kamata H, Nakajima O, Kubota I. Hect-type ubiquitin E3 ligase ITCH interacts with thioredoxin-interacting protein and ameliorates reactive oxygen species-induced cardiotoxicity. *J Am Heart Assoc.* 2016 Jan 21;5(1). pii: e002485. doi: 10.1161/JAHA.115.002485. [査読・有](#)

Otaki Y, Watanabe T, Takahashi H, Funayama A, Kinoshita D, Yokoyama M, Takahashi T, Nishiyama S, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Konta T, Kubota I. Comorbid renal tubular damage and hypoalbuminemia exacerbate cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2016;105(2):162-171. doi: 10.1007/s00392-015-0899-z. [査読・有](#)

Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Yamaura G, Funayama A, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kubota I. Cystatin c-based eGFR is a superior prognostic parameter to creatinine-based eGFR in

post-endovascular therapy
peripheral artery disease patients.

Circ J. 2015;79(11):2480-2486

doi: 10.1253/circj.CJ-15-0762.

査読・有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大瀧 陽一郎 (OTAKI, Yoichiro)

山形大学・医学部・医員

研究者番号 : 80732693