

論文の内容の要旨

論文題目 がん由来因子によるアントラサイクリン心筋症の増悪機構

氏名 門脇 裕

【序文】

アントラサイクリン系薬剤は主要な抗がん剤であり、多くのがん患者の生存率や QOL の向上に貢献してきたが、代表的な有害事象であるアントラサイクリン心筋症の病態機序の全容は未解明であり有効な治療はない。アントラサイクリン心筋症の病態形成では、トポイソメラーゼ 2 β 阻害作用とミトコンドリア内鉄沈着作用に伴う酸化ストレスや細胞死が重要であると考えられてきた。しかし、これら 2 つの分子機序に拮抗する薬理学的作用を持つ治療薬デクスラゾキサンの大規模臨床試験のメタアナリシスでは、**event-free survival** に改善が認められなかった。また、デクスラゾキサンはがんに対するアントラサイクリン系薬剤の抗腫瘍効果の抑制や 2 次性の発がん作用が懸念されており、本邦での保険適用はない。さらに近年、アントラサイクリン心筋症ではさまざまな病態機序の提唱が相次いでなされており、非常に不均一な疾病構造を有していることが判明している。以上より、現在のアントラサイクリン心筋症の治療手段は十分でなく、今後の病態学的研究と創薬研究において重要な点は、病態全体を包括的に改善し、かつアントラサイクリン系薬剤の抗腫瘍効果を抑制しない新たな治療ターゲットを発見することである。

がんは、がん由来の RNA やタンパクによってさまざま臓器と相互連関をしている。特にがん由来の細胞外小胞エクソソームは内部の miRNA による RNA 間相互作用によって遠隔臓器の標的遺伝子の発現量を調節する働きを持つ。アントラサイクリン心筋症の基礎研究では、代表的薬剤であるドキソルビシンをマウスへ腹腔内投与することによって心機能障害を誘導したアントラサイクリン心筋症モデルマウスを用いた研究が行われてきた。しかし、(1) 重度の心機能障害を呈するアントラサイクリン心筋症患者と比較して、アントラサイクリン心筋症モデルマウスは大部分が軽度の心機能障害に留まること、(2) アントラサイクリン心筋症モデルマウスはがん患者と異なり担がんではないこと、の 2 点から実際のアントラサイクリン心筋症患者を完全に再現できていない可能性がある。そのため、我々はこれまでのアントラサイクリン心筋症の研究では、がん由来する要因が検討されていないのではないか、という仮説を立てた。

本研究の目的は、がん存在下にドキソルビシンを投与したマウスや培養心筋細胞を解析することで、がん由来因子によるアントラサイクリン心筋症の増悪機構の存在を検討することである。

【方法】

実験初日にマウスのがん細胞株を培養し、野生型マウスへ皮下移植することによって担

がんマウスを作成した。実験 16 日目に担がんマウスにドキソルビシン 20 mg/kg 腹腔内投与によってアントラサイクリン心筋症を誘導した担がん心筋症マウス (Ca/DOX) を作成した。実験 21 日目に経胸壁心臓超音波検査実施した後に、心筋検体の採取あるいは生存率の解析を行った。心筋組織において PI3K/Akt/FOXO の心筋萎縮関連シグナル経路の下流にある *MAFbx/atrogen-1* と *MuRF1* 遺伝子の発現量と、心不全のバイオマーカーである *Nppa* 遺伝子の発現量を定量的 real-time PCR 法を用いて測定した。さらに各心筋細胞を蛍光免疫染色し鏡検し、組織学的形態や細胞死を定量的に評価した。

がん培養上清とドキソルビシンの共添加する実験を培養心筋細胞に対して行うため、新生仔ラットより心筋細胞を単離し培養した。培養心筋細胞に対してがん培養上清とドキソルビシンを共添加後に Operetta high contents imaging system を用いて多数の視野を客観的に自動解析した。また培養心筋細胞について *MuRF1* および *MAFbx/atrogen-1* と遺伝子の発現量を定量的 real-time PCR 法で測定した。

がん由来因子の候補として担がん心筋症マウス (Ca/DOX) 血清に含まれるエクソソーム EXO Ca/DOX の精製を行い、エクソソーム精製液の特異的表面抗原マーカーである CD63 抗原を、抗 CD63 抗体を用いたウエスタンブロット法で検出した。また NanoSight LM10 を用いて粒子数や粒子濃度を測定した。その後、EXO Ca/DOX とドキソルビシンの共添加を濃度や条件を揃えた後に培養心筋細胞に共添加し、Operetta high contents imaging system を用いて解析した。

【結果】

さまざまな悪性度を有するがん細胞株を用いて担がん心筋症マウス (Ca/DOX) の作成を試みた。悪性度が高いがん細胞株を用いたマウスでは実験 21 日目までの生存が困難である一方で、悪性度が低いがん細胞株を用いたマウスではがんの生着が認められなかった。中等度の悪性度を持つ乳がん細胞株 4T07 を用いた担がんマウスは全例で腫瘍の生着を認め、実験 16 日目にドキソルビシン投与した場合でも実験 21 日目以降にほぼ全例で生存が確認されたことから、乳がん細胞株 4T07 をその後の実験に用いた。がん存在下にアントラサイクリン心筋症の心毒性が増強されるかを検討するため、野生型マウス (WT/Veh)、担がんマウス (Ca/Veh)、心筋症マウス (WT/DOX)、担がん心筋症マウス (Ca/DOX) の 4 群で心臓表現型の比較を行った結果、担がん心筋症マウス (Ca/DOX) マウスでは著明な心機能障害と生存率の低下を認めた。一方、左室壁厚の肥大や内腔の拡大は伴っていなかった。また、担がん心筋症マウス (Ca/DOX) マウスでは明らかな心臓重量の低下を認め、心筋の組織学的な形態評価を行うと各心筋細胞では著明に横直径や断面積が縮小していた。さらに *MuRF1*、*MAFbx/atrogen-1*、および心不全マーカーである *Nppa* の遺伝子発現がいずれも上昇している傾向が示された。

続いて、がん細胞にドキソルビシン 100 μ M を添加した培養液を回収し、培養心筋細胞へ添加すると、がんの培養上清が含まれていないドキソルビシン 100 μ M を添加した群と

比較して著明な障害作用を示した。さらに同様の実験をがん細胞にドキソルビシン 1 μM を用いて行い定量的 real-time PCR 法を行うと、*MuRF-1* および *MAFbx/atrogin-1* 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。一方、がん細胞にドキソルビシンを前もって添加せず、回収した培養液にあとからドキソルビシン 100 μM を混和した培養液を培養心筋細胞に添加しても、明らかな障害作用の増強を示さなかった。これらの結果は、傷害を受けた場合のがんの培養上清に含まれるがん由来因子が、心臓委縮のメカニズムを介してドキソルビシン関連心毒性の悪化要因となることを示唆している。

以上の結果から、がん由来因子は体液中を循環し遠隔臓器である心臓組織に作用し、がん細胞自体の傷害により性質が変化する特徴を持つことが想定されたことから、がん細胞に由来する細胞外小胞エクソソームがアントラサイクリン心筋症の増悪要因となり得るか、について評価した。担がん心筋症マウス (Ca/DOX) 血清よりエクソソーム EXO Ca/DOX を精製し、ウエスタンブロット法と NanoSight LM10 にて粒子径や粒子濃度などを確認した。最終的に、培養心筋細胞に対して EXO Ca/DOX とドキソルビシン 100 μM との共添加実験を行うと、野生型マウス (WT/Veh) 由来のエクソソームを用いた場合、エクソソームを用いない場合と比較して、培養心筋細胞に対して著明な障害作用をもたらすという結果を得た。

【考察】

これまでがん側の要因がアントラサイクリン心筋症の表現型に関わるという報告はなく、本研究の結果はアントラサイクリン心筋症の新たな病態機序を提唱するものである。近年、アントラサイクリン心筋症の病態形成において心臓委縮が重要であることが報告されている。本研究においても、担がん心筋症マウス (Ca/DOX) に心機能障害を認めた一方で左室拡大や左室肥大などの代償性リモデリングは認められず、組織学的評価では各心筋細胞の委縮を認めた。さらに心筋萎縮との関連が特に深い筋萎縮関連遺伝子 *MuRF1* や *MAFbx/atrogin-1* の発現上昇を認めた。培養心筋細胞を用いた実験系においても、傷害を受けたがん細胞の培養上清と共添加した場合ドキソルビシン関連心毒性が増強され、*MuRF-1* および *MAFbx/atrogin-1* の発現上昇を認めた。これらの結果はがん由来因子が PI3K/Akt/FOXO シグナル伝達経路を抑制したことで、その下流で負の制御を受けていた *MuRF1* や *MAFbx/atrogin-1* の発現が上昇し、ユビキチン・プロテアソーム系を介した亢進した可能性を示している。

細胞外小胞エクソソームは親細胞の性質によって決定され、さらに親細胞に傷害が加わった場合には内部の miRNA の種類や発現量も変化する。本研究では、傷害を受けていないがん細胞の培養上清がドキソルビシン関連心毒性を増強しなかった点は、がん由来因子がエクソソームであると考えれば矛盾はない。またエクソソーム内部の miRNA はアントラサイクリン心筋症 (miR-1、miR-31-5p、miR-146a など) や筋萎縮 (miR-29b など) の表現型を増強する報告が多数あることから、がん由来因子がエクソソームである可能性を検討

した。担癌心筋症マウス血清から精製した EXO Ca/DOX とドキソルビシンの共添加は培養心筋細胞に強い障害作用を示したことから、がん由来因子がエクソソームである可能性が示唆された。

がん由来因子によるアントラサイクリン心筋症の増悪機構の技術応用としては、エクソソーム内部の miRNA の発現量解析はアントラサイクリン心筋症の診断や発症予測のためのバイオマーカーとして有用な可能性がある。また miRNA を阻害する RNA 干渉剤、筋萎縮機序を抑制するユビキチンリガーゼ阻害剤やプロテアソーム阻害剤などはアントラサイクリン心筋症の病態機序を包括的に改善する分子ターゲットとなる可能性があり、アントラサイクリン系薬剤の作用機序への影響が想定されないことから、抗腫瘍効果を抑制しない治療として期待される。

【結論】

本研究の結果より、がん由来因子によるアントラサイクリン心筋症の増悪機構の存在が示唆された。がん由来エクソソームは、アントラサイクリン心筋症の新たな治療ターゲットや補助診断のためのバイオマーカーとしての有用性が期待されるが、一連の分子機序については不明な点も多く残されており更なる検討が必要である。