



# Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by ECE-1 ablation through Prevention of Mitochondrial Biogenesis Impairment

宮川, 一也

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4966

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004966>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 宮川 一也  
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 博い第 4966 号  
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
学位授与の 日 付 平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by ECE-1 ablation through Prevention of Mitochondrial Biogenesis Impairment(エンドセリン変換酵素-1 の発現抑制はミトコンドリア機能低下を抑制することによりドキソルビシン心筋症を軽減する)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 博信  
教 授 平井 みどり  
教 授 久野 高義

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by ECE-1 ablation  
through Prevention of Mitochondrial Biogenesis Impairment

エンドセリン変換酵素-1 の発現抑制はミトコンドリア機能低下を  
抑制することによりドキシソルビシン心筋症を軽減する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻  
循環器内科学  
(指導教員：平田 健一 教授)

宮 川 一 也

ドキシソルビシンは有用な抗腫瘍薬であり、白血病を含む血液腫瘍や乳癌、肉腫などの固形腫瘍の治療に汎用される薬剤であるが、その臨床的有用性はドキシソルビシンの持つ心筋毒性により制限されている。ドキシソルビシン心筋症は非可逆的な左室機能障害やうっ血性心不全を特徴とし、一旦発症すれば予後が非常に悪いことが知られている。現在のところ、ドキシソルビシン心筋症に対する有効な治療法は確立されていない。近年、ミトコンドリアの機能低下がドキシソルビシン心筋症の発症に関与しているとする報告がなされた。ミトコンドリア機能不全によるエネルギー産生の低下や活性酸素種の産生亢進がドキシソルビシン心筋症の病因として考えられている。

エンドセリン-1(ET-1)は 21 アミノ酸からなる血管収縮性ペプチドであり、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞などさまざまな細胞で発現している。ET-1 は血管収縮以外にも様々な機能を有していることが知られている。心不全においては、血中 ET-1 濃度が上昇し、心不全患者の予後を反映する。また、心筋特異的 ET-1 過剰発現マウスにおいては、拡張型心筋症を発症することが知られている。これらの知見は、ET-1 が心不全の進行や心筋症の発症に密接に関与していることを示している。

エンドセリン変換酵素-1(ECE-1)は膜結合型メタロプロテアーゼであり、ET-1 の非活性型である big ET-1 を活性型の ET-1 に変換する酵素である。ホモ接合型 ECE-1 欠損マウスでは ET-1 の欠乏により、顎顔面、心・大血管の発生異常が生じ、胎生致死あるいは生後 30 分以内に死亡することが知られている。慢性心不全において ECE-1 は主要な ET-1 産生酵素となり、その阻害は心不全を改善する効果がある。ECE-1 はエンドセリン系の主要な制御因子であると言える。

エンドセリン系とドキシソルビシン心筋症の関連としては、ドキシソルビシン治療患者では、血中 ET-1 濃度が上昇するといわれている。また、ET-1 は心筋のミトコンドリア機能を低下させるという報告もあり、これらの知見から ET-1 によるミトコンドリア機能低下がドキシソルビシン心筋症の発症に関与していることが推測された。

そこで私たちは、ECE-1 の阻害が ET-1 産生を抑制することにより、ドキシソルピシン心筋障害に対し心保護作用をもたらすという仮説を立て、検証を行った。また、ECE-1 は big ET-1 だけでなく、心房性利尿ペプチド (ANP) などの心保護作用を持つ生理活性物質も分解する作用を持っていることが知られており、ECE-1 の阻害によってこれらのペプチドの分解が抑制され、心保護作用を呈する可能性を考えた。心血管疾患における ECE-1 阻害の有用性は、エンドセリン受容体阻害と異なり十分な検討がなされていない。私たちは、ヘテロ接合型 ECE-1 欠損マウス (ECE-1<sup>+/-</sup> mice) を用いドキシソルピシン心筋症に対する ECE-1 阻害の効果を検討した。

本研究では ECE-1<sup>+/+</sup>群、ECE-1<sup>+/-</sup>群、ドキシソルピシン投与群、非投与群で振り分け、4 群での検討を行った (control ECE-1<sup>+/+</sup>群、control ECE-1<sup>+/-</sup>群、DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群)。ドキシソルピシン心筋症は 15mg/kg のドキシソルピシン単回腹腔内投与により導入し、投与 5 日後に解析を行った。ドキシソルピシン投与 5 日後の血圧、脈拍に差はなかった。心エコー図検査上、DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群で有意に心収縮能が低下していたが DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では保たれていた。組織学的検討では、ドキシソルピシン治療群で心筋細胞における心筋細線維の減少、細胞質空泡変性を認めたが、これらの変化は DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比較し軽度であった。また、心筋細胞のサイズも DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比較し大きく、心筋障害が軽度であると考えられた。電子顕微鏡での検討においても DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群の心筋障害は DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比較し軽度であった。

次に、ドキシソルピシン心筋症におけるエンドセリン系についての検討を行った。ECE-1<sup>+/-</sup>群では ECE-1 の遺伝子発現レベルは ECE-1<sup>+/+</sup>群の約 2 分の 1 であった。ECE-1 蛋白量に関しては ECE-1<sup>+/-</sup>群では ECE-1<sup>+/+</sup>群の約 70% であり、ECE-1 活性においてもほぼ同様の結果であった。これらはドキシソルピシン治療による変動を認めなかった。一方、ET-1 の前駆体である preproET-1 の遺伝子発現レベルはドキシソルピシン治療により上昇し、血中、心筋 ET-1 濃度も上昇した。PreproET-1 の遺伝子発現レベルは ECE-1<sup>+/+</sup>群、ECE-1<sup>+/-</sup>群間で差はな

かったのに対し、血中、心筋 ET-1 濃度に関しては、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比較し低値であった。control ECE-1<sup>+/+</sup>群、control ECE-1<sup>+/-</sup>群間には差はなかった。これらの結果から、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群における血中、心筋 ET-1 濃度の低下は、ドキシソルピシン治療による基質の増加に対し、酵素量が十分でなかったことによるという機序が考えられた。また、このことがドキシソルピシン心筋症の抑制をもたらしていると考えられた。

次に、ドキシソルピシンによる心筋ミトコンドリア障害を解析した。心臓 ATP 含有量、mitochondrial superoxide dismutase (SOD2) 量を検討したところ、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比べ有意に高値であった。また、過酸化脂質量の検討においては、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比べ有意に低く、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群ではミトコンドリア障害が軽減されていると考えられた。

DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群においてミトコンドリア障害が軽減される機序として、ミトコンドリア機能に関する転写調節因子 (PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1、Tfam) の発現量を検討したところ、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群において転写調節因子の発現が有意に低下していたのに対し、DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群では保たれていた。また、心臓におけるミトコンドリア DNA 含有量を検討したところ、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群と比較し DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群では有意に低下していた。これらのことから、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群においてはミトコンドリア機能に関する転写調節因子の発現が保たれており、その結果、心筋ミトコンドリア機能が維持され、ミトコンドリア障害が軽減される機序が考えられた。

次に、ECE-1 発現抑制による ET-1 レベルの低下がミトコンドリア機能の維持、さらにはドキシソルピシン心筋症の抑制に関与しているかを検討するため、エンドセリン受容体拮抗薬のドキシソルピシン心筋症に対する効果を検討した。心エコー図検査、組織学的検討においてエンドセリン受容体拮抗薬はドキシソルピシン心筋障害を有意に抑制した。また、ミトコンドリア機能に関する転写調節因子の遺伝子発現についても維持されていることが明らかになった。ECE-1 発現抑制による ET-1 の低下が直接ミトコンドリア機能の保持さらには

ドキソルビシン心筋症の抑制をもたらすと考えられた。

ミトコンドリア機能調節の一部は cyclic GMP (cGMP) によることが知られている。私たちのモデルにおいては、心筋 cGMP 濃度が DOX+ECE-1<sup>-/-</sup>群で DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群と比較し高値であることが示された。心臓においては cGMP の産生は ANP などにより増加することが知られており、ANP-cGMP 経路は心保護作用をもたらすと言われている。私たちは血中 ANP 濃度が DOX+ECE-1<sup>-/-</sup>群と比較し、心機能が良好な DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群にて高値であることを見出した。これらのことから、ECE-1<sup>-/-</sup>マウスにおいては ANP-cGMP 経路の活性化がドキソルビシン心筋障害に対する心保護作用を部分的に担っていることが考えられた。

本研究において、私たちは ECE-1 の発現抑制がミトコンドリア機能障害を抑制し、ドキソルビシン心筋症を軽減することを示した。ECE-1 の発現抑制は心機能低下、心筋細胞障害を抑制し、ミトコンドリア機能やその転写調節因子の発現を維持した。その機序としては、ECE-1 の発現抑制が ET-1 の産生低下に加え、ANP-cGMP 経路を活性化することによると考えられた。また本研究では ECE-1 が *in vivo* モデルにおいて、病態生理学的状態では ET-1 産生の律速酵素として機能することを確認した。このことは、ECE-1 の抑制が ET-1 の発現の増強が関与する疾患において有用な治療手段であることを示唆している。

近年、ECE-1 を含めたペプチダーゼの阻害薬の有用性が臨床試験等で示されつつある。ペプチダーゼ阻害薬はうっ血性心不全の治療に有用であるということが示されている。エンドセリン系の阻害には、肺高血圧症治療で用いられているエンドセリン受容体拮抗薬のボセンタンがあり、これまでにドキソルビシン心筋症を抑制するという報告がある。確かにエンドセリン受容体拮抗薬はドキソルビシン心筋症において有用な治療であると考えられるが、私たちは、ECE-1 の阻害が ET-1 産生を抑制するだけでなく、心保護作用をもつ ANP-cGMP 経路を活性化することにより効果的な治療法となりうる可能性を示した。

ECE-1 の阻害は、今後ドキソルビシン心筋症の新たな治療手段となる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2081号	氏名	宮川一也
論文題目 Title of Dissertation	<p>エンドセリン変換酵素-1の発現抑制はミトコンドリア機能低下を抑制することによりドキシソルビシン心筋症を軽減する</p> <p>Attenuation of doxorubicin-induced cardiomyopathy by ECE-1 ablation through prevention of mitochondrial biogenesis impairment</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 南 博 信 Chief Examiner</p> <p>副 査 久野高義 Vice-examiner</p> <p>副 査 平井みどり Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ドキシソルビシンは様々な悪性腫瘍に有用な抗腫瘍薬であるが、その有用性はドキシソルビシンの持つ心筋毒性により制限されている。発症メカニズムは不明であるが、近年、ミトコンドリアの機能低下がドキシソルビシン心筋症の発症に関与しているとする報告がなされた。エンドセリン-1(ET-1)は21アミノ酸からなるペプチドであり、非活性型の big ET-1 からエンドセリン系の調節因子であるエンドセリン変換酵素(ECE)により産生される。産生された ET-1 は2種類の受容体を介し、血管の収縮、弛緩に関与するが、他にも様々な機能を有していることが知られており、心筋特異的 ET-1 過剰発現マウスにおいては、拡張型心筋症を発症することが知られている。

エンドセリン系とドキシソルビシン心筋症の関連としては、ドキシソルビシン治療患者では、血中 ET-1 濃度が上昇するといわれている。これらの知見からエンドセリン系がドキシソルビシン心筋症の発症に関与していることが推測された。そこで私たちは、エンドセリン系の主要な調節因子である ECE-1 の阻害が、ドキシソルビシン心筋症に及ぼす効果をヘテロ接合型 ECE-1 欠損マウス (ECE-1<sup>+/-</sup> mice) を用い検討した。

ドキシソルビシン心筋症は 15mg/kg のドキシソルビシン単回腹腔内投与により導入し、投与5日後に解析を行った。心エコー図検査上、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群で有意に心収縮能が低下していたが DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では保たれていた。組織学的検討では、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群に比較し心筋障害が軽度であった。

次に、ドキシソルビシン心筋症におけるエンドセリン系についての検討を行った。ECE-1<sup>+/-</sup>群では ECE-1 の遺伝子発現、ECE-1 蛋白量、酵素活性が ECE-1<sup>+/+</sup>群と比較し低値であることを確認した。血中、心筋 ET-1 濃度に関しては、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群に比較し低値であった。これらの結果から、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では ECE-1 酵素量の不足により ET-1 産生が抑制され、ドキシソルビシン心筋症の抑制をもたらす可能性が考えられた。

次に、ドキシソルビシンによる心筋ミトコンドリア障害を解析した。心筋 ATP 含有量、mitochondrial superoxide dismutase (SOD2) 量、過酸化脂質量の検討においては、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群では ECE-1<sup>+/+</sup>群と比較しミトコンドリア障害が軽減されていることが明らかになった。

次に、ミトコンドリア機能に関する転写調節因子 (PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, Tfam) の発現量を検討したところ、DOX+ECE-1<sup>+/-</sup>群において転写調節因子の発現が有意に低下していたのに対

し、DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群では保たれていた。また、心臓におけるミトコンドリア DNA 含有量も DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群で保たれていることが明らかになった。これらのことから、DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群においてはミトコンドリア機能調節因子の発現が保たれており、その結果、ミトコンドリア障害が軽減される機序が考えられた。

次に、エンドセリン受容体拮抗薬のドキソルピシン心筋症に対する効果を検討した。エンドセリン受容体拮抗薬はドキソルピシンによる心機能低下、心筋障害、PGC-1 $\alpha$  遺伝子発現の低下を抑制した。これらの結果から、ECE-1 発現抑制による ET-1 の低下が直接ミトコンドリア機能の保持さらには心筋症の抑制をもたらすと考えられた。

最後に、当モデルにおける ANP-cGMP 経路について検討を行った。ECE-1 は big ET-1 だけでなく、心房性利尿ペプチド (ANP) などの心保護作用を持つ生理活性物質も分解する作用を持っていることが知られている。ANP はミトコンドリア機能を維持する cyclic GMP (cGMP) を介し、心保護作用をもたらすことが知られている。今回のモデルにおいては、血中 ANP 濃度、心筋 cGMP 濃度が DOX+ECE-1<sup>+/+</sup>群で DOX+ECE-1<sup>-/-</sup>群と比較し高値であることが示された。ECE-1<sup>+/+</sup>マウスにおいては ANP-cGMP 経路の活性化が心保護作用を部分的に担っていることが考えられた。

本研究において、ECE-1 の発現抑制がミトコンドリア機能障害を抑制し、ドキソルピシン心筋症を軽減することを示した。ECE-1 の発現抑制は心機能低下、心筋細胞障害を抑制し、ミトコンドリア機能やその転写調節因子の発現を維持した。その機序としては、ECE-1 の発現抑制が ET-1 の産生低下に加え、ANP-cGMP 経路を活性化することによると考えられた。

ECE-1 の阻害は、今後ドキソルピシン心筋症の新たな治療手段となる可能性が考えられた。

本研究はドキソルピシンによる心筋障害の発症機序に関する重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士の学位を得る資格があると認める。