

## DNA 損傷修復系を標的とした新たな心血管病態機序の解明と治療法の開発

相澤健一<sup>1)</sup>, 鈴木 亨<sup>2)</sup>

- 1) 自治医科大学医学部  
2) レスター大学医学部

### 【研究の背景】

心血管系細胞は種々の病態刺激を受けると細胞機能を維持するために修復反応が活性化される。具体的には、圧負荷やアンジオテンシン等による心血管細胞の病態刺激ならびに虚血等は心血管細胞の傷害を引き起こす一方、これら細胞傷害を修復するためのシグナル伝達カスケードを同時に活性化する。DNA 損傷修復系は、DNA に生じた傷により複製の停止が生じ、センサー蛋白が活性化され、老化・アポトーシス・クロマチンリモデリング、等様々な細胞応答反応につながることが示されつつある。本経路は従来、癌領域で注目されていたが、近年、我々により、非癌領域においても重要であることが示された。

本研究では、この修復反応の主要な構成因子と考えられる ATM (ataxia telangiectasia mutated、血管拡張性失調症の原因遺伝子) 等により形成される DNA 損傷修復シグナル伝達経路に注目する。この機構の異常な活性化ならびに制御は従来から発癌の分子メカニズムとして注目されていたが、我々により、代謝ストレス下で老化やアポトーシス制御においても重要な役割を有することが近年明らかにされつつある。また、我々のノックアウトマウスを用いた予備検討により、ATM は心筋線維化を促進する作用を有することが示唆された。

### 【目的】

ドキソルビシンは強力な抗癌薬であり、多様な癌に対する治療薬として広く臨床使用されている。しかし、用量依存的な心毒性の有害反応を有するため、使用には制限がある。そのメカニズムは酸化ストレスが関与していることが示唆されているが、明らかにはなっていない。ATM は細胞内酸化ストレスの制御に重要であることが示唆されている。研究は、細胞修復反応に関わる ATM を中心としたシグナル伝達経路に着目し、生活習慣病に対する治療法開発の糸口とする目的とする。特に、心肥大等の心臓病態における修復機構としての役割の解明を目指す。我々はすでに ATM シグナルが血管内皮細胞機能において重要である知見を得ており、ドキソルビシン心筋症等の心臓病態で活性化される予備知見も得ている。このように、心血管系細胞における新たな傷修機序の存在が示唆されており、本シグナルの阻害剤等を用いて新たな治療法開発の糸口となる介入も試みる。

### 【方 法】

本研究では、心血管病態において細胞修復に関わる DNA 損傷修復シグナル伝達経路を解明する。具体的には、ドキソルビシン心筋症における、ATM を介するシグナル伝達経路の解析並びにこれらによる細胞修復活性の解析、さらにこのパスウェーの特異的な阻害を通した介入を試み、治療法開発の糸口とする計画である。具体的には、動物ならびに生化学、細胞のレベルでこれらを検討する。

#### ・動物レベルでの検討:

ATM ノックアウトマウスを用いて、心臓病態における役割を解析する。具体的には、アドリアマイシン心筋症の病態モデルを作製し、心臓病態の機能解析を行う。ATM-Akt-p53-H2AX 経路の発現分布および量変化を免疫染色法で解析する。重要な因子についてはさらに阻害化合物を投与し、介入が可能かを検討する。阻害剤は局所・全身投与等さらに反復投与の

必要性等の予備検討を行い、最適なデリバリーを行う条件検討が必要である。加えて、既に ATM コンディショナルノックアウトマウスを用いて、心筋細胞および心筋線維芽細胞特異的ノックアウトを行い、心臓病態における細胞特異的な ATM の役割を追求する。

・生化学実験ならびに細胞レベルでの検討：

細胞レベルにおける上記修復反応に関わるシグナル伝達経路の解析を行う。具体的には、アドリアマイシン投与により上記パスウェーが活性化されるか、リン酸化抗体を用いたウエスタンプロット、および免疫細胞染色法等を用いて検討する。細胞分離し、心筋細胞および心筋線維芽細胞特異的な反応性の特異性と多様性を明らかにする。ATM が活性化された場合は細胞核内でフォーカスを形成するのが特徴であるが、活性化された場合は、さらに各因子に対する特異的な阻害剤(化合物ならびに脱リン酸化酵素)を用いることで、シグナル伝達への影響をみる。

## 【結 果】

ATM ノックアウトマウスではドキソルビシンによる心毒性(心機能の抑制、アポトーシスの増加、死亡率の増加)が減弱していた。ATM は主に心臓線維芽細胞に発現しており、心臓線維芽細胞特異的 ATM ノックアウトマウスを用いた解析により、心臓線維芽細胞が ATM を介したドキソルビシンによる心毒性に重要であることが明らかになった。そのメカニズムとして、ドキソルビシンにより ATM が Fas リガンドを活性化し、その結果、心筋細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、ATM 特異的かつ選択的阻害薬である KU55933 を投与することにより、ドキソルビシンによる心毒性を抑制することを明らかにした。

## 【考 察】

ドキソルビシン心筋症の新規メカニズムおよび治療法の可能性を明らかにした。損傷を受けた DNA を修復するために活性化される反応として本 ATM シグナル経路が発見され、生存ならびにホメオスタシスを保つうえで必須の制御機構である。この DNA 損傷修復機構の異常な活性化ならびに制御は従来から発癌の分子メカニズムとして注目されていたが、老化やアポトーシス制御においても重要な役割を有することが近年明らかにされつつあり、生活習慣病を始めとする病態の発症機序の鍵となる可能性がある。臓器リモデリングに関するこのような転写因子制御機構は他に報告がなく、独創性が高い。動脈硬化を端緒とした心血管リモデリングにおける病態生理の解明、ひいては新規治療薬開発につながる可能性を有する期待がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

ドキソルビシン心筋症に対する新しい治療標的因子および線維芽細胞を対象とした新しい治療法開発につながる可能性がある。新規細胞の作製ないし植え付けが開発目標となっている再生医学が盛んな昨今においては、細胞の修復、活性化を促進するという、本来の細胞生存、ホメオスタシス維持の機構の活性化を通じた細胞治療法の開発は、心血管病の治療のみならず、医学全体に一石を投じる期待がある。

## 【参考・引用文献】

1. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem.* 2010; **285**: 29662-29670.
2. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; **49**: 330-352.
3. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012; **18**:1639-1642.