
研究助成業績報告集

2022 年度 公募自由課題研究助成
山内進循環器病研究助成

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	心血管疾患リスクを早期に予測可能なコレステロール引き抜き能測定法の開発と評価	大川 龍之介	1
2	中胚葉において循環器形成細胞が誘導される分子基盤解明	橋本 寿之	13
3	心臓弁形成を制御する「血流ベクトル」を認識した力学応答原理の解明	福井 一	18

心血管疾患リスクを早期に予測可能なコレステロール引き抜き能測定法の開発と評価

—ビリルビンによる正誤差の影響回避，分析装置に実装可能な新たな測定法の開発および臨床評価—

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
先端分析検査学分野・教授
大川 龍之介

I. 緒 言

虚血性心疾患、脳卒中は世界の死因の第一位、第二位を占め（WHO 2019）、その死亡者数は増加の一途を辿っている。これらの疾患の主な原因の一つとして脂質異常症が知られており、生活習慣の改善により大きな予防効果が認められることから、早期の病態把握が肝要である。高比重リポタンパク（high-density lipoprotein ; HDL）は多数の抗粥状動脈硬化機能を有することから、粥状動脈硬化症が引き起こす心血管疾患の発症リスクの予測として、HDL の量を反映する HDL コレステロール濃度（HDL-cholesterol ; HDL-C）の定量がなされてきた。しかしながら、近年、HDL-C が必ずしも実際の心血管疾患発症リスクを反映しないとの報告がなされている。この原因は、HDL が単一の粒子から成るのではなくタンパクや脂質組成の異なるヘテロジェニアスな粒子の集合であり、それぞれのサブクラスの持つ抗粥状動脈硬化機能が異なっているからである。したがって、HDL の“量”だけでなく“質”を評価する方法が模索されてきた。近年、HDL の抗粥状動脈硬化機能のうちコレステロール引き抜き能（cholesterol efflux capacity ; CEC）が注目を浴びている。CEC は粥状動脈硬化の原因となる泡沫細胞からコレステロールを受け取り、プラークの縮小に寄与する能力である。HDL の主要なタンパクであるアポリポタンパク A-I (apolipoprotein A-I; apoA-I) や HDL が泡沫細胞からコレステロールを引き抜くには主に 3 つの経路を介することが知られている。apoA-I は泡沫細胞上に発現する ATP 結合カセット輸送体（ATP-binding cassette transporter ; ABC）A1 を介して、HDL は ABCG1 や scavenger receptor class B type 1（SR-B1）を介して行う。Adorni らは、細胞に放射性標識コレステロールを取り込ませ泡沫細胞化した細胞に血清を添加し、コレステロール引き

抜き能を評価し、それぞれのトランスポーターを介したコレステロール引き抜きの割合（ABCA1（34%）、SR-B1（20%）、ABCG1 やそれ以外の 46%）を示した（1）。Khera らは、同様の細胞を用いた CEC 評価法にて、CEC が冠動脈疾患の進行度と逆相関することを示した（2）。さらに Rohatgi らは、2,924 名の患者を対象として CEC を評価し、CEC 高値群が CEC 低値群よりも CVD のリスクが 67% 減少しており、さらに HDL-C とは独立したリスクファクターになり得ることを報告した（3）。その後心血管疾患と CEC との関連が次々と報告されている（4, 5, 6）。したがって、CEC 測定の臨床応用が世界中から期待されているが、従来の CEC 測定法は、前述のように細胞や放射性同位元素標識コレステロールを用いるため、操作の煩雑さ、安全性など種々の課題が残されており、未だ普及していない。2018 年に当研究室では、細胞や放射性同位体を用いない新しい CEC 評価法である固相化リポソーム結合ゲルビーズ（immobilized liposome-bound gel beads ; ILG）法を開発した（7）。この方法では細胞のかわりにコレステロールを含むリポソームを固相化したゲルビーズを、放射性標識コレステロールのかわりに蛍光標識コレステロールを用いる。無細胞系の方法にもかかわらず、ILG 法による CEC は従来の細胞を用いた従来法と良く相関した。また、超遠心で時間をかけて分離する HDL ではなく、ポリエチレングリコールを用いてアポリポプロテイン B 含有リポタンパクを沈殿させた後の上清である BDS (apolipoprotein B-depleted serum) を用いるが、ILG 法では BDS が血清中の HDL をよく反映していることを示した（8）。また、細胞を用いないため、簡便で短時間で測定でき、精度は細胞法（CV10%以上）よりもはるかに優れている（本法、CV 3%以下）ことを実証している（9）。

一方、ILG 法を臨床に応用するにはいくつかの解決すべき課題がある。一つはビリルビンの影響である。血清にビリルビンを添加して CEC を ILG 法によるに測定すると、ビリルビン濃度依存的に CEC が増加することが認められた (10)。また、臨床応用するためには自動化が望ましいが、ILG 法は測定の過程で遠心操作が必要で自動分析装置への搭載が困難であった。そこで、本研究室では上記の ILG 法に用いたゲルビーズのかわりに磁気ビーズを用いた遠心操作不要な新たな CEC 評価法を開発した (”新規のコレストロール引き抜き能測定法” 特願 2021-94456)。しかしながら、この新しい測定法の妥当性確認が不十分であった。さらに、ILG 法は従来法と良く相関するものの、実際の患者検体を用いた検証は十分に行われていないことや、前述の細胞の各種トランスポーターを介したコレストロール引き抜きに関して、本法がどのトランスポーターを介したコレストロール引き抜きを反映するかも検証が必要である。

したがって本研究では、本法の臨床への実装を目指すべく、ビリルビンの影響の回避、磁気ビーズを用いた新たな方法 (immobilized liposome-bound magnetic beads assay, ILM 法) のさらなる検証、および臨床検体を用いた評価、細胞法 (各種トランスポーター) との比較を目的とした。

II. 対象・方法

II-1 ビリルビン影響の回避の検討

II-1(a) 対象試料

血液試料は本学で書面で同意を得られた健常者ボランティアより採取した。全血試料を採血管に採取後、室温で 15 分静置して血液を凝固させた。凝固後、血清を 2,000g, 15 分の条件で遠心分離し、血清を別のチューブに移し、 -80°C で凍結保存した。尚、本研究は本学医学部倫理委員会の承認の下、行った (承認番号: M2015-546)。

II-1(b) ビリルビン添加血清の作製

得られた血清に干渉チェック・A プラス (シスメックス) のビリルビン F (遊離ビリルビン) およびビリルビン C (抱合型ビリルビン) を添加し、ビリルビン濃度がそれぞれ、遊離ビリルビン: 0.0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/dL, 抱合型ビリルビン: 0.0, 2.4, 4.8, 9.7 mg/dL となるように調整した。

II-1(c) 沈殿法によるアポリポタンパク B 含有リポタ

ンパク除去血清 (apoB-depleted serum; BDS) の作製

沈殿法は Zimetti らの方法を参考に行った (11)。20% ポリエチレングリコール溶液 (200 mM glycine buffer; pH 7.4) を血清に対し 100:40 の割合で添加し、室温で 20 分間インキュベーションしたのち、 4°C , 10,000 rpm, 30 分間の遠心を行い、上清を BDS として回収した。

II-1(d) 固相化リポソーム結合ゲルビーズ (ILG) の作製

レシチン 10.6 mg とコレストロール 2.3 mg をクロロホルムに溶解した後、0.5 mM の蛍光標識コレストロールである BODIPY-C を 30 μL 添加した。窒素ガスでクロロホルムを蒸発させ、さらにジエチルエーテルを加え蒸発させる操作を 2 回行い、BODIPY-C 含有リポソームを作製した。作製したリポソームを BufferA 14 mL に溶解し、Sephacryl S-300 ゲルビーズを 0.70 g 加え、室温で 30 分静置した。その後、 -80°C にて凍結、室温にて融解の操作を 7 回繰り返し、リポソームをゲルビーズに固相化した。融解後、上清を捨てゲルビーズに BufferA を加え、室温、3,000 rpm, 5 分間の遠心による洗浄を 5 回行った。洗浄後、BufferA を 10 mL 加え、ILG 混濁液を作製し、 4°C , 遮光下で保存した。

II-1(e) CEC の測定

ILG 混濁液 100 μL に希釈した BDS を 150 μL 添加し、最終血清濃度 0.25%, 0.5%, 1%, 2% になるようにした。遮光条件下で室温にて 16 時間インキュベーションしたのち、上清を 75 μL 回収し蛍光強度を FLUOROSKAN ASCENT (Thermo Fisher Scientific) で測定した。測定毎に被検血清とは異なる血清 (reference 血清) を測定し、reference 血清の蛍光強度に対する被検検体の蛍光強度の比を CEC とした。

II-1(f) BODIPY-C とビリルビンの 3 次元蛍光スペクトルの測定

150 mM NaCl, 1 mM EDTA-2Na 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) (BufferA) に溶解した BODIPY-C 含有リポソームと、BufferA に溶解した干渉チェック・A プラス (シスメックス) のビリルビン F の蛍光スペクトルを Spectra Max iD5 (モレキュラーデバイスジャパン) で測定した。励起波長 455 nm から 500

nm における, 600 nm までの蛍光波長のスペクトルを測定した。蛍光波長のスペクトルを励起波長の順に並べることによって, BODIPY-C とビリルビンの 3 次元蛍光スペクトルを得た。

II-1(g) ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA の作製およびビリルビン酸化の確認

ビリルビン含有血清(遊離ビリルビン:10.0 mg/dL, 抱合型ビリルビン:9.7 mg/dL) からそれぞれ BDS を作製した後, BDS をビリルビンオキシダーゼ含有(旭化成, 25 μ g/L) および非含有 BufferA で希釈した。この際, BDS は血清で 3.3%になるように調整した。希釈した BDS を 16 時間室温でインキュベーションした後, 350~1,000 nm の波長で島津 UV-1280 を用いて吸収スペクトルを確認した。さらに, 同様に処理した試料を 450 nm および 675 nm の波長の吸光度を 20 分おきに 16 時間計測し, ビリルビンがビリルビンオキシダーゼによりビリベルジンへと変化することを確認した。上記のビリルビンオキシダーゼ処理後の BDS の蛍光強度(励起波長:485 nm, 蛍光波長:538 nm)を測定した。

II-1(g) HDL の精製

健常者より得られた血清を用いて, 既報の方法(12)を用いて超遠心によって HDL (1.063<d<1.210 g/mL)を分離した。得られた HDL は PBS を用いて 4℃で 24 時間透析した後, 4℃で保存した。

II-1(h) ビリルビンオキシダーゼによる HDL の粒子構造へ与える影響の確認

ビリルビンオキシダーゼが HDL の粒子構造に影響のないことを確認するために, ビリルビンオキシダーゼにより処理した HDL の構造を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した。ゲルは 8%に調整し, CBB 染色にて視覚化した。ポジティブコントロールとして, TritonX-100 で処理した HDL を同様に分析した。

II-2 自動分析装置への実装を目指した CEC 測定法の開発

II-2(a) 磁気ビーズへの BODIPY-C の固相化の確認

II-1(d)の方法と同様にして, BODIPY-C 含有リボソームをゲルビーズのかわりに多孔性磁気ビーズに固相化した。すなわち, 作製した BODIPY-C 含有リボソームを BufferA 14 mL に溶解し, 磁気ビーズを

2.45 g 加え, 室温で 30 分静置した。その後, -80℃にて凍結, 室温にて融解の操作を一定数繰り返し, リボソームを磁気ビーズに固相化した。融解後, 上清を捨てゲルビーズに BufferA を加え, 室温, 3,000 rpm, 5 分間の遠心による洗浄を 5 回行った。洗浄後, BufferA を 10 mL 加え, 上記の固相化磁気ビーズ混濁液を作製し, 4℃, 遮光下で保存した。

固相化された磁気ビーズの安定性を確認するために, 暗所 4℃にて最大 60 日間保管し, その後, 上清の蛍光強度を測定した。

II-2(b) 磁気ビーズを用いた CEC 測定における条件の検討, 妥当性確認

作製した磁気ビーズを用いて, 健常者から得られた BDS (2%, 3%, 4%) の CEC を II-1(e)と同様の方法で測定した。この際のインキュベーション温度を 4℃, 30℃, 37℃に変化させ, CEC の違いを調べた。

3 種類の血清から得られた BDS を用いて, 磁気ビーズを用いた CEC 測定をそれぞれ 20 重測定し, 併行精度を確認した。次に希釈によって濃度の異なる HDL (0.6~9.0 mg/dL) および BDS (0.2~5.0%) を作製, それぞれの CEC を測定し, その直線性を確認した。さらに, 15 名の健常者血清から得られた BDS の CEC を測定し, HDL-C 濃度および ILG 法による CEC と比較した。

II-3 患者検体を用いた CEC 測定の臨床的意義の評価

当院で同意を得られた心臓カテーテル検査を受けた 113 名の患者の静脈血を収集し, 得られた血清から, BDS を分離, ILG 法による CEC を測定した。そのうち, 光干渉断層法 (optical coherence tomography ; OCT) が実施できた 78 名の患者のうち, 30%以上の狭窄が認められた 61 名に関して, 臨床的背景, OCT や他の血清学的検査の結果と CEC を比較解析した。なお, 本研究は本学医学部倫理委員会の承認の下, 行った (M2018-266)。

IV 統計解析

統計解析には SPSS ver.25 (IBM) を用いた。2 群の差の検定には student の t 検定 (片側検定), 3 群以上のデータには一元配置分散分析を行った。相関の解析は Pearson により求めた。p < 0.05 を有意であるとした。

III. 結果

III-1 ビリルビンによる正誤差の影響回避の検討

III-1(a) BODIPY-C とビリルビンの 3 次元蛍光スペクトルの比較

ILG 法による CEC 測定の際のビリルビンによる偽陽性の原因を確認するために、BODIPY-C とビリルビンの 3 次元蛍光スペクトルを比較した。BODIPY-C は 520~540 nm で励起し、480~520 nm で蛍光を発することが観察された (図 1A)。ビリルビンの蛍光スペクトルは遊離型、抱合型共に広範囲に観察され、500~550 nm で励起、450~470 nm で特に蛍光を発した (図 1B, 1C)。このようにビリルビンの蛍光スペクトルは BODIPY-C のそれと重複しており、ILG 法の際の BODIPY-C の蛍光検出の際に、ビリルビンの蛍光様波長を測り込むことが示唆された。

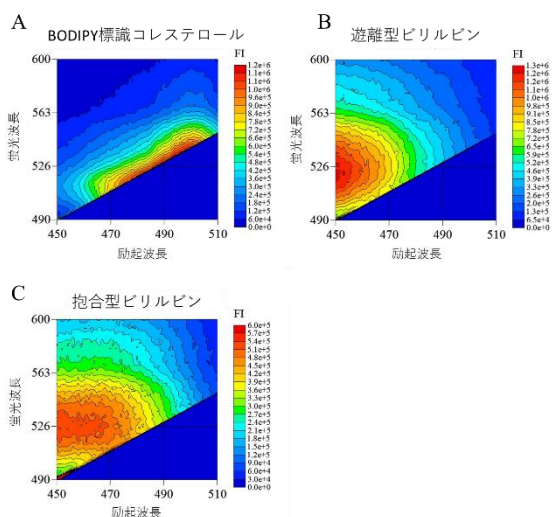


図 1. BODIPY 標識コレステロール、遊離型および抱合型ビリルビンの 3 次元蛍光スペクトル

III-1(b) 波長変更によるビリルビン偽陽性影響回避の効果

ビリルビンの影響を回避するために、3 次元蛍光スペクトルの結果に基づいて励起波長を 485 nm から 498 nm へ変更した。初めに、ビリルビン非含有血清を用いて上記の条件で CEC を測定し、励起波長の変更によって CEC の値に影響がないことを確認した (図 2A, 2B)。次にビリルビン含有血清を用いて同様に CEC を測定した。その結果、波長の変更により、遊離型ビリルビン (10 mg/dL) の CEC への影響を 70%、抱合型ビリルビン (9.7 mg/dL) の影響を 78% 回避することが明らかになった (図 2A, 2B)。回避が認められた一方で、上記の変更によってもビリルビン

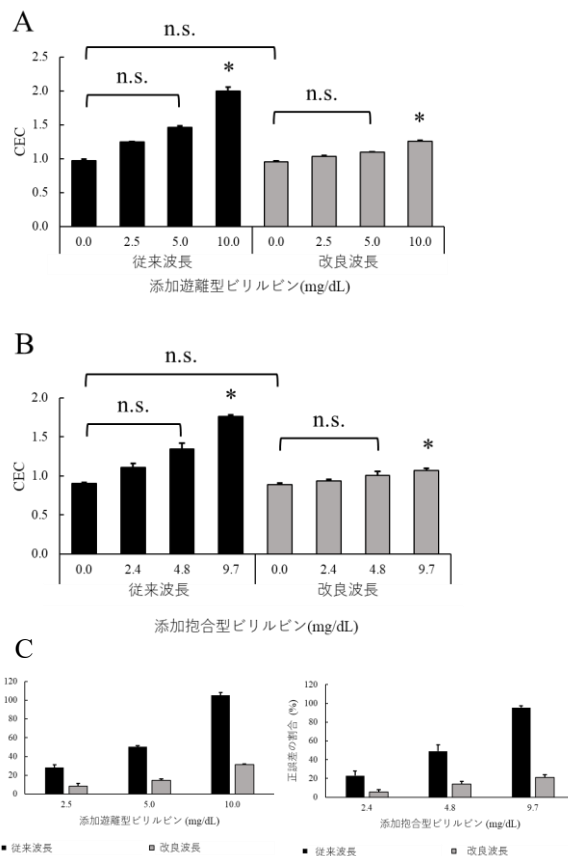


図 2. 波長変更後のビリルビンによる正誤差の影響

従来波長および改良波長にてビリルビン添加血清 (A: 遊離型ビリルビン, B: 抱合型ビリルビン) の CEC を測定、正誤差の割合を比較した (C)。* $p < 0.05$. n.s.: 有意差なし

の濃度依存的に、CEC の値は増加する傾向にあった (図 2C)。

III-1(c) ビリルビンオキシダーゼによるビリルビンの影響回避

波長変更では、ビリルビンの影響は完全には回避できないため、次に、ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA を用いて、影響の回避を試みた。初めに、濃度の異なるビリルビンオキシダーゼ (2.5, 5.0, 8.0, 13.3, 25, 40 $\mu\text{g/L}$) をビリルビンに作用させ、後述の吸光および蛍光スペクトルを確認し、ビリルビンオキシダーゼの濃度を 25 $\mu\text{g/L}$ に決定した。

25 $\mu\text{g/L}$ のビリルビンオキシダーゼを用いてビリルビンのビリベルジンへの変化を確認した。ビリルビン含有血清から分離された BDS 中には 450 nm に強い吸収が認められたが、ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA で処理することにより、450 nm の吸収帯は消失し、ビリベルジンのスペクトルである 350 nm~550 nm および 550 nm~750 nm の吸収帯へと変化

することが確認された (図 3A, 3B). このビリルビンオキシダーゼによるビリルビンの酸化が ILG 法におけるインキュベーション時間である 16 時間以内に終了することを確認するために, 上記の反応のタイムコースを観察したところ, 遊離型は 10 時間, 抱合型は

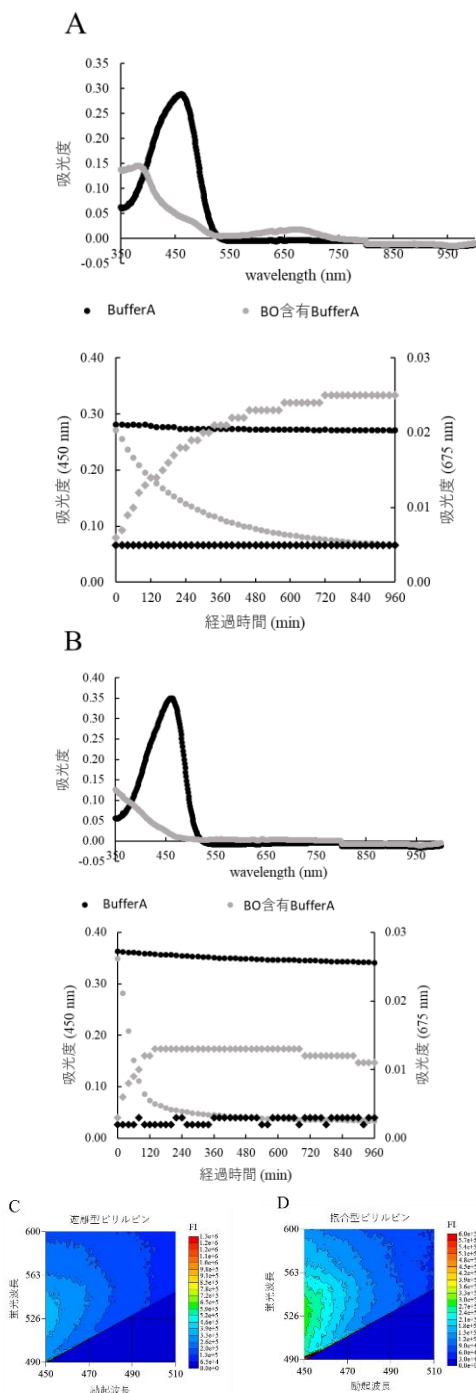


図 3. ビリルビンオキシダーゼによるビリルビンからビリベルジンの産生の確認および蛍光スペクトルの変化
BufferA および BO 含有 BufferA による遊離型ビリルビン (A, C) および抱合型ビリルビン (B, D) の吸収スペクトル・450nm における吸光度 (A, B) および蛍光 (C, D) スペクトルの変化.
BO ; ビリルビンオキシダーゼ

6 時間で消失し, ILG 法における 16 時間は十分な時間であることが明らかになった (図 3A, 3B). また, ビリルビンオキシダーゼを反応させた後の, 遊離型ビリルビンおよび抱合型ビリルビンの 3 次元蛍光スペクトルを分析した. 図 1B, C で観察された遊離型および抱合型ビリルビンの蛍光スペクトルは消失していた (図 3C, 3D).

III-1(c) ビリルビンオキシダーゼの HDL の粒子構造への影響

TritonX-100 で処理した HDL を非変性ゲル電気泳動で分析すると, HDL 粒子よりも小さいサイズである 8.2 nm 以下の粒子サイズにバンドが観察されたのに対し (図 4, 矢印), ビリルビンオキシダーゼで処理した HDL では同様の小粒子は観察されず, BufferA のみを添加した HDL と同様のプロファイルを示した (図 4). したがって, ビリルビンオキシダーゼは HDL の構造には影響を与えていないことが明らかになった.

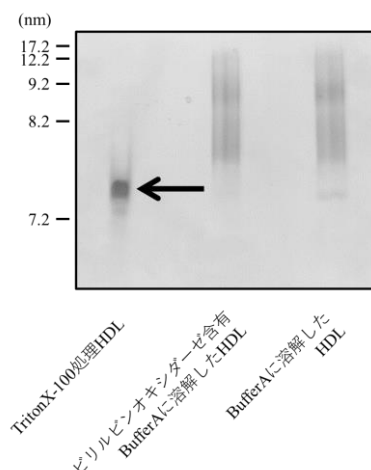


図 4. ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA による HDL の粒子構造へ与える影響の確認

III-1(d) ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA を用いたビリルビンによる偽陽性回避の確認

ビリルビンオキシダーゼによるビリルビンの蛍光の消失が確認できたため, ビリルビンオキシダーゼ含有 BufferA を用いてビリルビン含有血清から得られた BDS を測定し, CEC への偽陽性回避の効果を確認した. その結果, 遊離型ビリルビン (10 mg/dL) の CEC への影響は 88%, 抱合型ビリルビン (9.7 mg/dL) の影響は 80%回避された (図 5A, 5B, 5C).

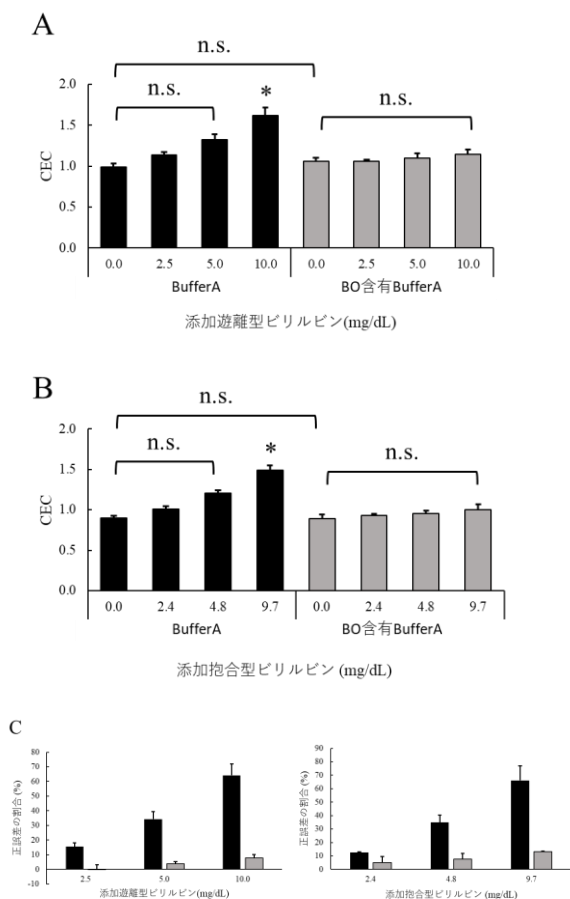


図5. ビリルビンオキシダーゼ添加によるビリルビンの正誤差の影響

従来波長および改良波長にてビリルビン添加血清 (A: 遊離型ビリルビン, B: 抱合型ビリルビン) の CEC を測定, 正誤差の割合を比較した (C). * $p < 0.05$. n.s: 有意差なし

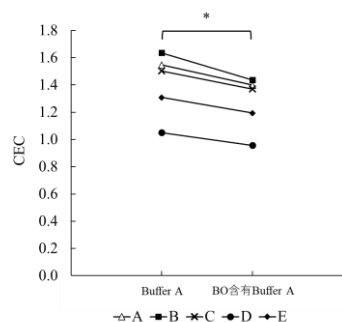


図6. 健康者血清から得られた BDS を用いた従来法および改良法の比較

5名の健康者血清から得られた BDS を用いて Buffer A を用いる従来法とビリルビンオキシダーゼ含有 Buffer A を用いた改良法で CEC を測定し比較した。

BO ; ビリルビンオキシダーゼ

III-1(e) 健康者血清を用いた従来の ILG 法と改良 ILG 法による比較

5名の健康者から血清を採取し, 従来法および改良法にて CEC を測定した. その結果, 改良法による CEC は従来法による CEC よりも有意に低値であり, ビリルビンによる偽陽性の回避が健康者でも確認できた (図 6).

III-2 自動分析装置への搭載を目的とした CEC 測定法の改良

III-2(a) 磁気ビーズへの BODIPY-C の固相化の確認

BODIPY-C 含有リポソームを磁気ビーズに添加し, 凍結融解処理を繰り返した. 処理した磁気ビーズを蛍光顕微鏡下で観察したところ, 緑色の蛍光が点状に観察され磁気ビーズの多孔にリポソームが入り込み, 固相化されていることが確認できた (図 7).

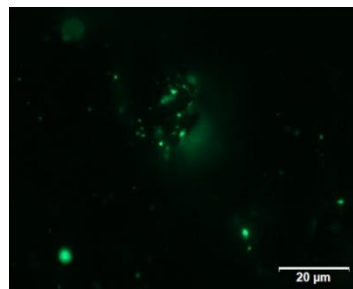


図7. 磁気ビーズへの蛍光標識リポソーム固相化の確認

作製した BODIPY-C 含有リポソームを固相化処理した磁気ビーズを蛍光顕微鏡にて観察した (励起波長フィルター: 460-480 GFP, 蛍光波長フィルター: 495-540 GFP).

*特許申請時資料

また, 固相化の際の凍結融解の回数を 3 回, 5 回, 7 回, 9 回に変化させた後, 処理後の上清の蛍光強度を測定した. 添加前のリポソーム溶液の蛍光強度から上清の蛍光強度を差し引いた値を磁気ビーズ内への固相化量として, 凍結融解回数による固相化の効果を調べた. その結果, 凍結融解回数 3 回から 7 回までは回数依存的に取り込み量は増加したが 7 回と 9 回では有意な差は認められなかった (図 8). また, 凍結融解回数 5 回の磁気ビーズ内への蛍光物質の取り込み量を ILG 法におけるゲルビーズ (凍結融解回数 7 回) と比較したところ, 同等であることが確認された。

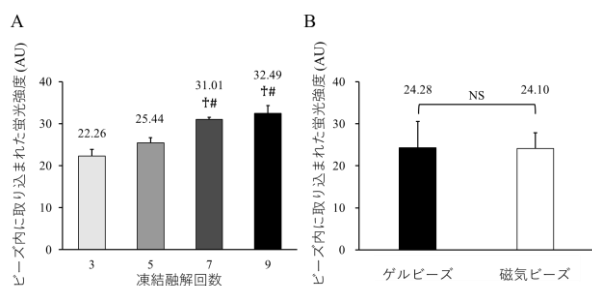


図8. 凍結融解回数の違いによる磁気ビーズへの蛍光標識リポソーム固相化量の検討

III-2(b) 磁気ビーズを用いた CEC 測定における条件の検討, 妥当性確認

作製した磁気ビーズを用いて, 健常者から得られた BDS (2%, 3%, 4%) の CEC を II-1(e) と同様の方法で測定した. この際のインキュベーション温度を 4°C, 30°C, 37°C に変化させ, CEC の違いを調べた. 4°C の条件では上清の蛍光強度はどの BDS 濃度においてもほとんど上昇しなかった (図 9A). また, 30°C および 37°C では蛍光強度が有意に増加し, 蛍光標識コレステロールの引き抜きを確認できた. 算出した CEC では 30°C と 37°C に違いはなかったため (図 9B), 以降の CEC 測定には ILG 法に近い 30°C の条件で行った.

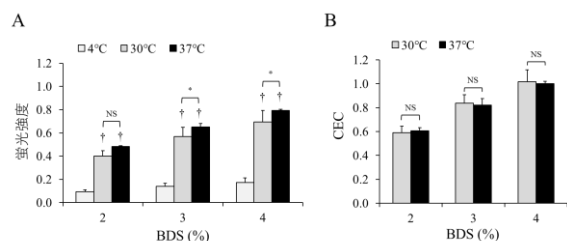


図9. インキュベーション温度の違いによる CEC の比較

BDS (2%, 3%, 4%) の CEC を異なる温度条件 (4°C, 30°C, 37°C) によって磁気ビーズ法にて測定し, 上清の蛍光強度および CEC を比較した.

次に, 3 種類の血清から得られた BDS を用いて, 磁気ビーズを用いた CEC 測定をそれぞれ 20 重測定し, 併行精度を確認した. また, 同様に濃度の異なる BDS 試料を 20 日間測定し, 日差の再現性を調べた. その結果, 日内併行精度は CV7% 以内, 日差併行精度は 10% 以内に収まった (表 1).

表 1. ILM 法による CEC 測定の併行精度の確認

	日内併行精度			日差併行精度	
	CEC	CV		CEC	CV
1	0.756±0.044	5.8	4	0.806±0.063	7.7
2	0.839±0.051	6.1	5	0.873±0.080	9.2
3	0.952±0.063	6.6	6	0.872±0.080	9.2

CEC (平均±2SD), CV (%) で示す. 1~6 は異なる健常者由来の血清

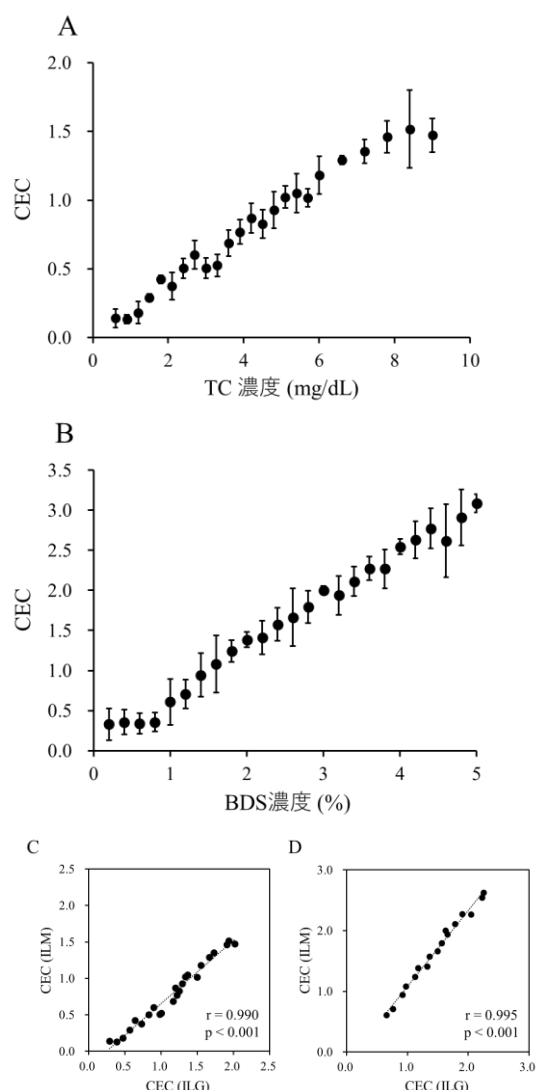


図10. 濃度の異なる HDL および BDS を用いた直線性の確認. 健常者血清の CEC の測定.

希釈により様々な濃度の HDL (0.6-9.0 mg cholesterol/dL) を作製し, CEC を測定した (A). 同様に, BDS (0.2-5.0%) についても CEC の直線性を確認した (B). 同じ試料を用いて, ILG 法によっても測定し, ILM 法との CEC の相関性を確認した (C: HDL, D: BDS).

次に HDL および BDS を希釈し、濃度の異なる HDL (0.6~9.0 mg/dL) および BDS (0.2~5.0%) を調整し、それぞれ CEC を測定して直線性を確認した。HDL においては、1.2~7.8 mg cholesterol/dL の範囲で、BDS では 1.0~5.0% 範囲で直線性が認められた (図 1 10A, 10B)。また、これらの直線性が認められた濃度範囲の HDL および BDS 試料を用いて、ILG 法との相関性を確認した。その結果、ILM 法による CEC は、HDL、BDS とともに ILG 法と良好な相関性が認められた (図 10C, 10D)。

さらに、15 名の健常者血清から得られた BDS の CEC を測定し、HDL-C 濃度および ILG 法による CEC と比較した。CEC は HDL-C 濃度と有意な正の相関性を示したが、同程度の HDL-C 濃度においても CEC が大きく異なる検体も見受けられた (図 11A)。また、ILG 法とでは良好な相関性を示した (図 11B)。

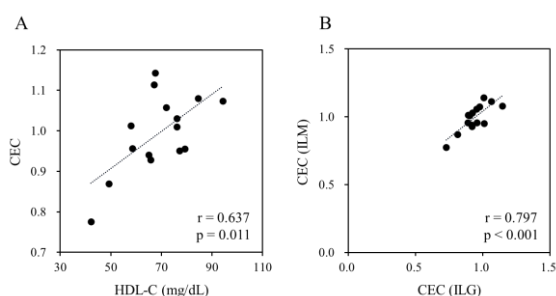


図 1 1. 健常者血清の CEC の測定および ILG 法との相関性の確認

15 名の健常者血清の CEC を ILM 法で測定し、HDL-C との相関性を確認した (A)。また、同様に ILG 法によっても測定し、ILM 法における CEC との相関性を確認した。

III-3 患者検体を用いた CEC 測定の臨床的意義の評価

OCT により狭窄が見られた 61 名の患者血清中の CEC を測定し、各パラメータと比較した。患者の背景および脂質検査の結果および CEC との相関関係を表 2 に示す。

CEC は年齢と負の相関性を示し、加齢とともに低下した。また予想通り、CEC は総コレステロール、遊離型コレステロール、HDL コレステロールと正の相関性を示した。興味深いことに、apoE 含有 HDL コレステロールや小型 HDL である HDL₃ コレステロールとも正の相関性を示した ($r = 0.780, p < 0.001$, $r = 0.746, p < 0.001$)。一方、LDL コレステロールや small dense LDL コレステロールとの相関性は認められな

かった。

apoE 含有 HDL コレステロールと正の相関性が認められたため、全 HDL コレステロールあたりの apoE 含有 HDL コレステロールの割合 (apoE-HDL%) を求めた。61 名の患者をこの apoE-HDL% の平均値 (9.0 ± 1.1 (%)) で 2 群に分け、apoE-HDL% 低値群と高値群の CEC を比較した。その結果、両群には有意な差 ($p < 0.001$) が認められ、apoE-HDL% 低値群よりも、apoE-HDL% 高値群において、CEC は有意に高い値を示した (図 12)。

表 2. 患者の背景および脂質検査の結果および CEC との相関関係

項目	平均±SD (範囲)	CEC との 相関係数	P 値
年齢, 年	68 (59 - 75.5)	-0.288	0.024
性別, (%)	男 (83.6)		
身長, cm	165.5 ± 7.5	-0.062	0.633
体重, kg	69 (62.7 - 77.3)	0.191	0.139
BMI, kg/m ²	25.6 ± 4	0.241	0.061
CEC	0.753 ± 0.078		
FC, mg/dL	40.6 ± 8.1	0.288	0.025
sdLDL, mg/dL	19.2 (13.4 - 26.9)	0.173	0.181
ApoE-HDL-C, mg/dL	3.7 ± 1.1	0.780	<0.001
HDL ₃ -C, mg/dL	16.4 ± 2.9	0.746	<0.001
TC, mg/dL	140.6 ± 28	0.392	0.002
HDL-C, mg/dL	40.4 ± 8.5	0.766	<0.001
LDL-C, mg/dL	75.2 ± 25.7	0.138	0.290
TG, mg/dL	98 (79 - 153.5)	-0.021	0.875

FC: 遊離型コレステロール, sdLDL: small dense LDL, ApoE-HDL: アポリポプロテイン E 含有 HDL, TC: 総コレステロール

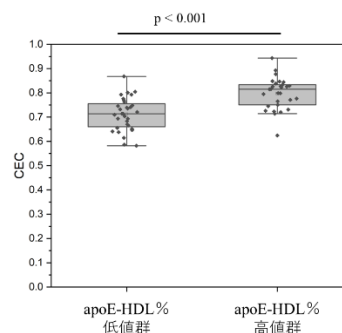


図 1 2. apoE-HDL 低値群と高値群の CEC の比較

OCTにより求めた脂質性プラークの長さおよび角度から、脂質に富むプラーク (Large lipid-rich plaque, 角度 > 180, 長さ > 5 mm) を定義すると、61名のうち26名が脂質に富むプラークを有していた。この脂質に富むプラークの有無で2群に分け、各パラメータを比較したところ (表3)、HDL-Cは有意差が認められなかった ($p=0.105$) のに対し、CECでは有意な差が認められ ($p=0.029$)、脂質に富むプラークを有している群の方がCECが5.7%低値であった。また、apoE含有HDLも同様に有意な差があり ($p<0.013$)、脂質に富むプラーク有している群では7.4%低値を示した。また、LDLコレステロールや中性脂肪に関しては2群で差は認められなかった。

表3. 脂質に富むプラークの有無による各種パラメータの比較

項目	Large lipid-rich plaque (-)	Large lipid-rich plaque (+)	p-value
n	35	26	
年齢	61 (56.5 - 73.5)	71 (66 - 78)	0.021
男性 (%)	29 (82.9)	22 (84.6)	1.000
BMI	26.1 $\pm$ 3.9	24.9 $\pm$ 4.0	0.232
糖尿病	17 (48.6)	7 (26.9)	0.115
高血圧	22 (62.9)	22 (84.6)	0.085
喫煙歴	22 (62.9)	15 (57.5)	0.793
CEC	0.771 $\pm$ 0.08	0.727 $\pm$ 0.07	0.029
HDL-C	41.9 $\pm$ 8.1	38.3 $\pm$ 8.8	0.105
%apoE	9.5 (8.8 - 10.0)	8.8 (7.9 - 9.4)	0.013
%HDL ₃	42.9 (39.8 - 44.5)	41.9 (38.4 - 44.6)	0.620
LDL-C	79.6 $\pm$ 23.6	69.31 $\pm$ 27.6	0.188
TG	101 (86.5 - 165)	94 (78 - 138)	0.314

%apoE : apoE含有HDL割合 (%), %HDL₃ : HDL₃割合 (%)

IV. 考 察

今回、われわれは開発した無細胞系のコレステロール引き抜き能評価法の社会実装を目指すべく、課題であったビリルビンの影響の回避、自動分析装置への搭載を見据えた磁気ビーズを用いた新たな測定方法 (ILM法) のさらなる検証、患者検体の臨床評価を実施した。その結果、ビリルビンの影響を大幅に取り除くことに成功し、またILM法に関しても良好な成績を得た。さらに、臨床評価に関してもHDLコレステロールよりも優れた結果を示した項目もあり、本法が

さらに一步、臨床応用へ近づいたと言える。上記以外にも、細胞法 (各種トランスポーター) との比較や本法の意義を裏付けるためのコレステロール引き抜き能に及ぼす因子の解析なども実施したがこちらはまだ進行中であるため、それ以外について報告させていただいた。以下に結果に対する考察を述べる。

IV-1 ビリルビンによる正誤差の影響回避の検討

初めにBODIPY-Cとビリルビンの3次元蛍光スペクトルを測定した。その結果、ビリルビンにも広範囲な蛍光スペクトルが認められ、その一部はBODIPY-Cのスペクトルと重なっていた。ビリルビンの蛍光に関しては報告がないが、ビリルビンの化学構造を考えると蛍光を発する可能性は十分に考えられる。ビリルビンはビリベルジンが還元されることによって生じ、ビリベルジンはヘムを構成するプロトポルフィリンから生じる物質であり、このプロトポルフィリンは蛍光を発することが知られている (13)。プロトポルフィリンが蛍光を発するのは炭素間単結合と二重結合の繰り返しである共役構造が存在することによって考えられる。共役構造をもつ物質では基底状態と最低励起状態のエネルギー差が小さく、可視光によって励起されやすいことが知られている。最低励起状態において分子構造や周囲の環境の変化によりエネルギー変化が起こると、最低励起状態から基底状態に戻る際に励起光より長波長の光を蛍光として放出する。プロトポルフィリンから生じる物質であるビリルビンにも同様に共役構造が見られるため、可視光によって励起され、蛍光を発する可能性は十分に考えられる。これがBODIPY-Cを検出する際に測り込まれるため正誤差になると考えられた。BODIPY-Cはわれわれの無細胞系の測定だけではなく、細胞を用いた従来法にも用いられている (3, 14)。したがって、このビリルビンの影響を回避することは、コレステロール引き抜き能測定の改良に広く貢献することと考えられる。

初めに、ビリルビンの蛍光が比較的弱く、かつBODIPY-Cの蛍光が十分検出できる波長への変更を試みた。その結果、ビリルビンの測り込みを避けることができ、影響を小さくすることができた。他の材料を必要とせず、波長の変更だけであるため簡便な改良である一方、高濃度のビリルビンではまだ有意な差が認められた。

したがって、次にビリルビンオキシダーゼによるビリルビンの消去を試みた。ビリルビンの酸化によって

変化したビリベルジンは、ほとんど蛍光を発しないため、BODIPY-C 測定の際の測り込みの回避には有用であることが予想された。実際、ビリルビンを追加した血清において、80%以上のビリルビンによる正誤差の回避に成功した。コレステロール引き抜き能測定の目的はHDL-Cでは発見することができない残余リスクを検出することであり、また、将来、健診などで利用されることを想定している。したがって、今回添加したビリルビンの最大濃度である10 mg/dLほどの高ビリルビン血症の検体を測定する機会は稀である。その一方、ビリルビンは健常者にも存在し、この測り込みがコレステロール引き抜き能の値にばらつきを与えていることも間違いない。実際に、健常者の血清を用いて、ビリルビンの消去の有無によるコレステロール引き抜き能の値を比較すると、有意な差が認められた。したがって、より正確なコレステロール引き抜き能を測定するには、健常者であってもビリルビンの消去が必要であると考えられる。

IV-2 自動分析装置への搭載を目的とした CEC 測定法の改良

ILG 法では、コレステロール引き抜き後の上清の分離のために遠心操作を行ってゲルビーズを沈殿させる必要がある。したがって、この方法をそのまま自動化することは困難であった。そこで、広く免疫学的測定法に用いられる磁気ビーズに着目した。また、リポソームを固相化できるように多孔性の磁気ビーズを選び、ゲルビーズのかわりにコレステロール引き抜きを行う方法を提案した。期待通り、ゲルビーズと同様に BODIPY-C を含むリポソームを磁気ビーズに添加して、凍結融解を繰り返すと磁気ビーズの多孔質の中に蛍光標識リポソームが入り込んでいることが観察できた。予備実験では、この磁気ビーズを用いた ILM 法においても HDL 濃度依存的な CEC が見られ、従来の ILG 法とも相関性が認められた。したがって、今回、さらに ILM 法の性能を確認するために、凍結融解回数と固相化量の比較、固相化効率の従来法

(ILG 法) との比較、引き抜き時のインキュベーション温度の影響、本法における CEC の再現性、濃度の異なる HDL や BDS を用いた直線性、健常者血清の評価を行った。ビーズへの固相化の検討では、ゲルビーズが 7 回の凍結融解が必要であるのに対し、今回用いた磁気ビーズでは 5 回の凍結融解で同等の量のリポソームが取り込まれることが明らかになった。測定精度に関して、ILG 法には劣るものの (9)、CV10%

は下回った。今後、再現性をさらに改善するには、含有する BODIPY-C の量を増やす、磁気ビーズ間の固相化の均一化などの工夫が必要である。測定範囲に関しては、実試料中の HDL-C 濃度で 1.2–7.8 mg/dL の範囲で測定可能であった。本法は血清から BDS 作製後、希釈して測定する。3.5%の BDS (今回の最適な濃度) で測定した場合、上記の直線性の結果は、血清中の HDL-C 濃度に換算すると 34–223 mg/dL まで直線性を示すことになり、ILM 法は健常者から患者検体まで広い範囲で測定できることが確認できた。15 名の健常者血清の測定では、CEC は HDL 濃度と正の相関性を示したが、大変興味深いことに、HDL-C が 66 mg/dL、67 mg/dL と同程度の 2 名の健常者血清において、CEC は 0.93 と 1.11 となり、19%の差が認められた。これは、検査によって同程度の HDL においても、その機能に大きな差があることを示唆し、コレステロール引き抜き能が残余リスクの発見に利用可能であることを示唆した。

このように、われわれは簡便で高精度であり、自動分析装置に搭載可能なコレステロール引き抜き能測定法を実現した。その一方で、細胞法との違いも確認している。以前、ILG 法において、HDL の亜分画である HDL₂ と HDL₃ を CEC を測定した場合、その値は細胞法と同様に HDL の性質をよく反映していた (9)。しかしながら、特殊な HDL である apoE 含有 HDL では異なる挙動を示した。細胞法では apoE 含有 HDL と apoE 非含有 HDL の CEC に差が認められなかったのに対し、ILG 法では apoE 含有 HDL の CEC は apoE 非含有 HDL よりも低値に測定された。われわれは以前、THP-1 マクロファージを用いた CEC 測定において、apoE-HDL は通常の HDL と異なり ABCG1 経路ではなく、ABCA1 経路を介してコレステロールの引き抜きが行われることを報告している (15)。通常、ABCA1 を介したコレステロール引き抜きは主に apoA-I によって行われる。ILG 法では apoA-I による引き抜きはほとんど反映されないため (9)、同様に ABCA1 を介する apoE 含有 HDL の CEC も本法では反映されていない可能性がある。循環血液中では、遊離の apoA-I はすぐに腎臓から尿へと排泄されるため、血清中には遊離の apoA-I はわずしか含まれていない。また、apoE 含有 HDL は全 HDL 中の 10%以下であり、上記の細胞法との差は、大きな影響はないと考えられる。その一方で、apoE 含有 HDL の CEC が生体内の抗粥状動脈硬化能として重要であるという報告もあり、本法においても臨床検

体を用いた実際の評価が必要であると考えられた。また、前述のように、本法におけるコレステロール引き抜きが、細胞表面のどのトランスポーターを経由したコレステロールの引き抜きを反映するかに関しては、今後さらに詳細に解析する必要がある。

IV-3 患者検体を用いた CEC 測定の臨床的意義の評価

前述の背景の下、本法における臨床的有用性を明らかにするために、本学病院循環器内科との共同研究によって、カテーテル検査時に採血された 113 名の患者血清の CEC を評価した。OCT による解析の結果、冠動脈に狭窄が見られた 61 名の患者の各種パラメータと CEC の結果を比較したところ、apoE 含有 HDL に関して矛盾した結果が得られた。前述した以前われわれが行った apoE 含有 HDL の CEC の研究では、apoE 含有 HDL はセファロースカラムを用いて分離した試料であった。今回の apoE 含有 HDL コレステロールは、株式会社デンカが製造している試薬によって測定されたものであり、その原理は、界面活性剤により、他の apoE 非含有と区別してコレステロールを酵素によって酸化する方法である。この apoE 含有 HDL の選別の違いによって、このような矛盾が生じた可能性がある。あるいは、前者の試料は健常者から採取し、分離した apoE 含有 HDL であるが、今回は患者血清のみの結果であることも原因の一つであるかもしれない。いずれにしても、本法におけるコレステロール引き抜き能力が apoE 含有 HDL と関連性があるかについては、基礎研究も含めたさらなる解析が必要である。

OCT による結果との比較により、脂質に富むプラークとの関連が認められた。繊維性プラークなどの他のプラークと比較して、脂質に富むプラークは不安定であり、その性質を把握することはイベント発症のリスク予測に繋がる可能性があり重要である。今回、本法における CEC がわずかではあるが HDL-C よりも有意にプラークの性質を検出できたことは重要な発見であると考えている。また、コレステロール引き抜き能力という観点から、CEC が低い＝脂質に富むプラークの増加、も理にかなっていると言える。今回のデータをさらに解析するとともに、今後はさらに多数の患者検体を測定や CEC と粥状動脈硬化の進展や治療の効果など時系列を解析することが必要である。

V. 結 論

本研究により、測定法の改良に成功し、大きな問題点であったビリルビンによる正誤差の問題を解決した。また、自動分析装置に実装可能なコレステロール引き抜き能力評価法を確立し、さらには、実際の患者検体で有用な結果も得られた。今後は、本法を自動分析装置に搭載し、より多くの臨床検体を評価することで、本法の有用性をさらに示すとともに、残余リスクを発見し、より多くの粥状動脈硬化症に伴う虚血性心疾患や脳卒中に対する医療に貢献していきたい。

本助成により、非常に多くの有用な成果を得ることができた。公益財団法人 循環器病研究振興財団に厚く御礼申し上げたい。

本研究成果の一部 (ILM 法の確立と基礎性能の確認) を Bioscience Reports 誌に報告した。(Mutsuda Y., Miyakoshi T., Horiuchi Y. et al. Development and validation of novel automatable assay for cholesterol efflux capacity. Bioscience Reports 2023; 43 (2): BSR20221519). また、ビリルビン回避の検討に関しては、現在、投稿中であり、循環器疾患のデータに関しては投稿準備中である。

VI. 研究協力者

米津 太志・東京医科歯科大学病院 循環器内科・准教授

亀田 貴寛・東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科先端分析検査学分野・助教 (2023 年 4 月より帝京大学・医療技術学部・講師)

陸田 優芽・東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科先端分析検査学分野・大学院生

宮腰 恒広・東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科先端分析検査学分野・大学院生

VII. 参考文献

- 1) Adorni, M.P., Zimetti, F., Billheimer, J.T. et al. 2007; The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. J. Lipid Res. 48, 2453–2462, <https://doi.org/10.1194/jlr.M700274-JLR200>
- 2) Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M. et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. N. Engl. J. Med 2011; 364, 127–135. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001689>

- 3) Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J.D. et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N. Engl. J. Med* 2014; 371, 2383–2393, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409065>
- 4) Khera A.V., Demler O.V., Adelman S.J. et al. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Particle Number, and Incident Cardiovascular Events: An Analysis From the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation* 2017; 135(25): 2494-2504. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025678.
- 5) Saleheen D., Scott R., Javad S. et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015; 3(7):507-513. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00126-6.
- 6) Shea S., Stein J.H., Jorgensen N.W. et al. Cholesterol Mass Efflux Capacity, Incident Cardiovascular Disease, and Progression of Carotid Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39(1):89-96. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311366.
- 7) Horiuchi Y, Lai S.J, Yamazaki A. et al. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. *Biosci Rep.* 2018; 38(2). pii: BSR20180144, doi: 10.1042/BSR20180144.
- 8) Horiuchi Y., Ohkawa R., Lai S.J., et al. Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assays using immobilized liposome-bound gel beads. *Biosci Rep.* 2019; 39(4). pii: BSR20180144, doi: 10.1042/BSR20180144.
- 9) Horiuchi Y., Lai S.J., Kameda T. Comparison of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads with the conventional method. *Biosci Rep.* 2020; 40(8). BSR20201495, DOI: 10.1042/BSR20201495.
- 10) Horiuchi Y., Lai S.J., Kameda T. Novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads: Confirmation and improvement for application in clinical laboratory. *Ann Clin Biochem.* 2022; 59(2):134-143. doi: 10.1177/00045632211054406.
- 11) Zimetti F., Weible G.K., Duong M. et al. Measurement of cholesterol bidirectional flux between cells and lipoproteins. *J Lipid Res.* 2006; 47: 605-613. doi: 10.1194/jlr.M500466-JLR200.
- 12) Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34, 1345-1353, 10.1172/JCI103182. doi: 10.1172/JCI103182.
- 13) Guo X.J., Li X.Z., Xu S.K. et al. Study of autofluorescence spectra of protoporphyrin IX in human serum. 2007; 27(5): 995-998.
- 14) Ferraz-Amaro I., Delgado-Frias E., Hernandez-Hernandez V. et al. HDL cholesterol efflux capacity and lipid profile in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2021; 23, 62, doi: 10.1186/s13075-021-02443-9
- 15) Horiuchi Y., Ohkawa R., Lai S.J. et al. Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells. *BiolChem.* 2019; 400 (2):209-218. doi: 10.1515/hsz-2018-0284.

中胚葉において循環器形成細胞が誘導される 分子基盤解明

慶應義塾大学医学部・特任講師
橋 本 寿 之

I. 緒 言

近年、心臓発生に重要な複数の転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5)を強制発現させることにより線維芽細胞を心筋様細胞(iCM)に直接分化転換できることが報告された¹。我々は約1000個のヒトORFライブラリーを用いて無作為なスクリーニングを行った結果、多能性幹細胞の分化に関わる転写因子 Zinc Finger Protein 281(Zfp281/ZNF281)に非常に強い心筋分化転換誘導作用がある事を見出した²。また、我々はマルチオミクス解析を用いたエピゲノム解析の結果、*in vitro*心筋分化転換と*in vivo*心臓発生の転写制御機構には多くの共通点がある事を見出した³(図1; 文献3より引用改変)。

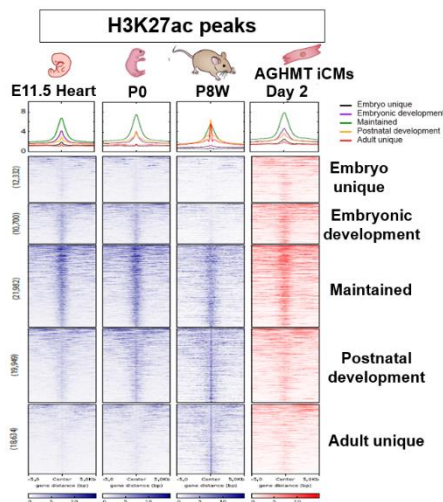


図1 心臓とiCMのエピゲノム解析比較・両者には共通する活性化エンハンサーが多く存在する

このような知見から、今度は逆に分化転換の研究成果を参考にして、心臓発生を司る新たな転写制御機構を解明することができるのではないかと考え、我々はZfp281に着目した。

次に、心臓発生におけるZfp281の機能を解析するために、我々はCRISPR/Cas9システムを用いてZfp281KO多能性幹(ES)細胞及び遺伝子改変マウス

を作製した。その結果、Zfp281KO-ES細胞では心筋細胞への分化が観られず、Zfp281KOマウスも胎生致死であることが確認された。しかし器官形成期の胎仔シングルセル解析の結果、Zfp281は個体において遍在的に発現しているため、我々は次にZfp281floxマウスを作製し、中胚葉特異的にCreリコンビナーゼを発現するMesp1-Creマウスと交配して中胚葉特異的Zfp281cKOマウスを作製した。その結果、このマウスは胎生致死で、観察すると心奇形を認めた(図2)。

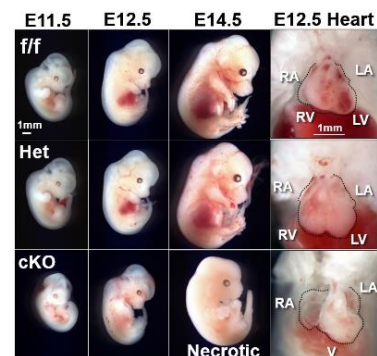


図2 中胚葉特異的Zfp281cKO胎仔マウス・Zfp281cKOマウスに心奇形を認める

よって、本研究ではこのZfp281と心臓発生の予想外な関連性を基に、様々な遺伝子改変マウス及び遺伝子発現・エピゲノム解析を用いて、遍在的に発現する幹細胞因子Zfp281が胎生期にどのように循環器形成細胞特異的に情報を伝達し、転写制御に寄与しているかを明らかにする。そして、最終的には研究成果を心疾患の新たな分子機序解明や心臓再生技術の開発へと発展させることを目指す。

II. 対象・方法

本研究では幹細胞因子Zfp281に着目し、生体において循環器形成細胞が誘導される新たな転写制御

機構を解明するために以下の実験を行った。

1) Zfp281 が心臓形成に寄与する時期及び組織の解明

1-1) Zfp281 組織特異的欠損(cKO)マウスの作成・遺伝子型解析

器官形成期の胎仔シングルセル解析の結果、Zfp281 は個体において遍在的に発現しているため、Cre リコンビナーゼを心臓中胚葉(Mesp1-Cre)、心筋前駆細胞(Nkx2-5-Cre)、心筋細胞(Myh6-Cre)特異的に発現するマウスと Zfp281flox マウスを交配し、各発生段階の Zfp281cKO マウスを作製した⁴ (図3; 文献4より引用改変)。これらマウス産仔の遺伝子型を解析することにより、心臓中胚葉から心筋細胞へと分化する際の発生過程において Zfp281 が必須であるかを検証した。

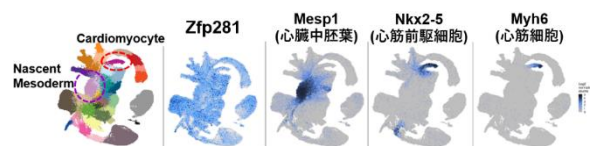


図3 マウス原腸形成期のシングルセル解析・原腸形成期に Zfp281 は遍在的に発現する

1-2) Zfp281cKO マウス心臓の形態・組織解析

次に、各 Zfp281cKO マウスの心臓の形態や組織学的解析を行った。これらの解析により、Zfp281 欠損が循環器形成細胞において構造的、機能的にどのような影響を与えるかを検証した。

2) Zfp281 が寄与する心臓形成転写ネットワークの解明

2-1) Zfp281cKO マウス心臓の遺伝子発現解析

心臓形成における Zfp281 の機能を解析するために、心臓に表現型が観察された Zfp281cKO マウス系統の心臓サンプルを用いて異なるステージにて RNA-seq 解析を行った。この解析により、Zfp281 欠損により変動する遺伝子群・パスウェイを明らかにした。

2-2) マルチオミクス解析による Zfp281 標的遺伝子の解明

上記 RNA-seq と我々の先行研究のエピゲノム解析のデータを統合し、Zfp281 が直接的に転写制御する遺伝子群を検討した。この変動遺伝子群と既知の心臓転写ネットワークを比較解析し、Zfp281 がどのような心臓関連遺伝子群を制御しているかを検討した。

III. 結果

1) Zfp281 は心臓発生において心臓中胚葉期に必須の因子である

心臓中胚葉 (Mesp1-Cre)、心筋前駆細胞 (Nkx2-5-Cre)、心筋細胞 (Myh6-Cre) という心臓発生過程の各分化段階特異的に Zfp281 を欠損したマウスを作製した。その結果、心臓中胚葉特異的に Zfp281 を欠損したマウスは胎生致死であったが、心筋前駆細胞、心筋細胞特異的に欠損したマウスは出生し、成獣期まで生存した (図4)。

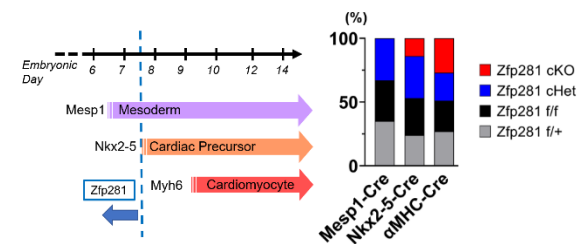


図4 産仔マウスのジェノタイプ解析・心臓中胚葉 Zfp281cKO は確認できず、胎生致死であることが確認できた

また、心筋前駆細胞、心筋細胞特異的 Zfp281cKO マウスにおいては心臓の形態や機能に特記すべき異常を認めなかった。よって、Zfp281 は心臓中胚葉から心筋前駆細胞に分化するタイミングで必須の因子であることが明らかになった (図5)。

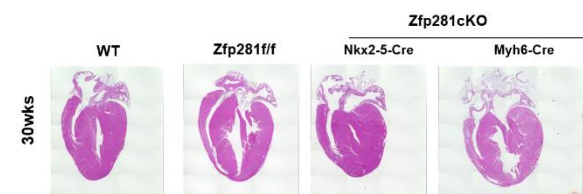


図5 30週齢 Zfp281cKO マウスの心臓組織解析・心筋前駆細胞、心筋細胞特異的 Zfp281cKO 心臓に構造異常を認めなかった

次に、心臓中胚葉 Zfp281cKO マウスの表現型を解析するために、各発生段階での胎仔マウスの心臓を解析した。その結果、Zfp281cKO マウスは E8.5-9.5 の段階から発達遅延や胎仔奇形を認め、Zfp281flox マウスとの鑑別が可能であった。そして E12.5 以降は心臓の自律拍動を認めず、胎生致死であった (図6)。

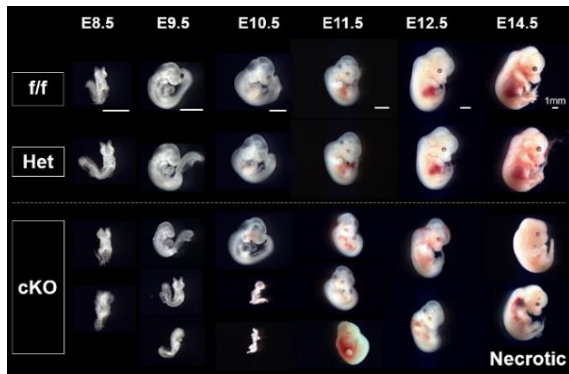


図6 心臓中胚葉 Zfp281cKO マウスの表現型解析・E8.5 から発達遅延や奇形を認めた

さらに、心臓中胚葉 Zfp281cKO 胎仔の心臓を詳細に観察すると、右室流出路系の低形成や心筋の菲薄化等を認めた (図7)。

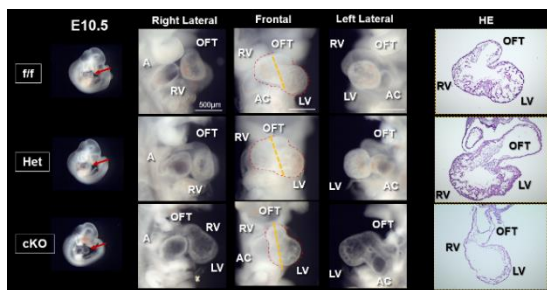


図7 心臓中胚葉 Zfp281cKO マウス心臓の表現型解析・右室流出路の低形成を認めた

また、心臓中胚葉 Zfp281cKO では胎仔心不全を示唆する心嚢液貯留や卵黄嚢血管網の萎縮を認めた (図8)。

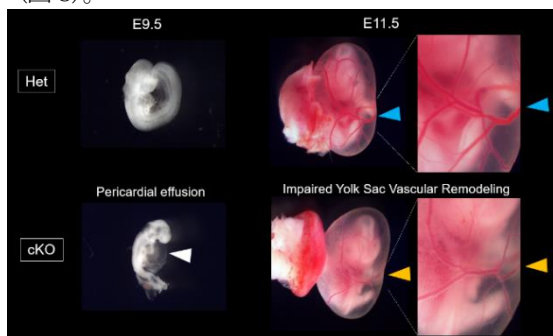


図8 心臓中胚葉 Zfp281cKO マウスの観察・胎仔心不全を示唆する表現型を認めた

以上より、心臓中胚葉 Zfp281cKO は E12.5 までに胎生致死となる事が明らかとなり、その原因として右室流出路系の形成不全による胎仔心不全が示唆された。

2) Zfp281 は心臓中胚葉において運命決定因子の発現を調節する

次に Zfp281 がどのような遺伝子群を操り心臓発

生に寄与するかを明らかにするため、E9.5 の心臓中胚葉 Zfp281cKO と Zfp281floxed マウスの心臓を用いてトランスクリプトーム解析を行った (図9)。

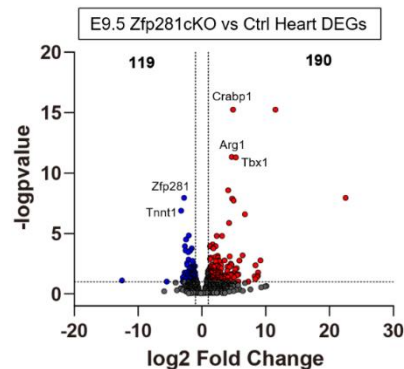


図9 E9.5 心臓中胚葉 Zfp281cKO と Zfp281floxed マウスの心臓の遺伝子発現解析

その結果、Zfp281 を欠損したマウスにおいては心臓や心筋に関連した遺伝子群の発現低下を認めた。しかし、より興味深い事に、中胚葉由来臓器である心臓には本来発現していないはずの内胚葉や非心臓領域の運命決定に重要な遺伝子群の異所性発現上昇を認めた (図10・表1)。

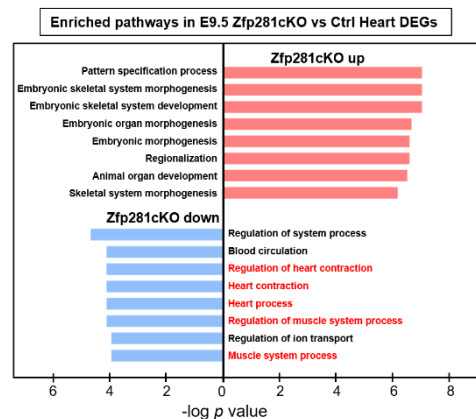
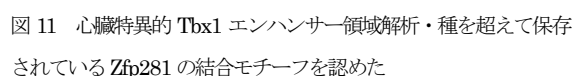


図10 発現変動遺伝子群のパスウェイ解析・心臓に関連する遺伝子群の発現低下及び非心臓関連遺伝子群の発現上昇を認める

表1 E9.5 心臓中胚葉 Zfp281cKO 心臓で発現上昇している代表的な非心臓領域の運命決定遺伝子群

log2 FC	Adj.Pval	Symbol	Related Lineages
4.91	5.48E-11	<i>Tbx1</i>	Craniopharyngeal Mesoderm
4.11	9.85E-02	<i>Lhx2</i>	
5.75	1.43E-02	<i>Dlx5</i>	Neural Crest Cell
4.53	5.85E-10	<i>Crabp1</i>	
3.40	4.31E-02	<i>Dlx2</i>	
3.16	2.29E-02	<i>Hoxa2</i>	
4.03	8.23E-02	<i>Hoxb1</i>	Lateral plate mesoderm
4.66	4.08E-04	<i>Hoxb5</i>	
2.95	2.49E-07	<i>Foxf1</i>	Kidney Nephrogenesis
5.90	9.99E-04	<i>Six2</i>	
2.74	2.74E-02	<i>Lix1</i>	Skeletal Limb progenitor
9.50	3.21E-06	<i>Vtn</i>	Hematopoietic-fated Mesoderm
8.38	4.34E-02	<i>Foxa3</i>	Anterior axial Mesoderm
3.85	1.46E-06	<i>Epcam</i>	Endoderm

よって、我々は過去に報告されている **Tbx1** の発現を制御する心臓特異的な **Tbx1** エンハンサー領域を解析した⁶ (図 11)。その結果、同領域に **Zfp281** の結合モチーフを認めた。



Construct	Relative Luciferase activity (approx.)
Ctrl	1.2
ZNF281 250g	0.6
ZNF281 1000g	0.4
ZNF281 2500g	0.3
ZNF281_binding motif deletion	2.4

以上より、心臓中胚葉 **Zfp281cKO** マウスの心臓流出路発生異常の原因の一つとして、**Zfp281** による **Tbx1** 転写抑制作用の欠如に起因する、心臓における **Tbx1** 発現上昇が考えられた。

我々は先行研究の成果を基に、心筋分化転換誘導因子 Zfp281 には心臓発生においても重要な働きがあると推測して研究を開始した。そして、本研究成果では当初の予測通り、遺伝子可変モデルマウスを用いて Zfp281 が心臓中胚葉から心臓が形成される際に必須の因子であることを明らかにした。しかし、意外にも Zfp281 は心筋細胞の分化誘導に必須ではない事が判明した。また、驚くべきことに Zfp281 は右室流出路の形成に必須であった。線維芽細胞から心筋様細胞を分化転換誘導する Zfp281 が心筋細胞の分化誘導ではなく特定の心臓領域の形成に必須であることは興味深い知見である。

今までで心臓発生における転写制御の研究においては、心臓で顕著に発現している転写因子(Mef2c, Gata4 等)に着目して解析する研究手法が主流であった。しかし、このような心臓マスター因子の遺伝子異常を原因とする先天性心疾患の表現形は多種多様である。今後は本研究成果を基に、心臓形成に寄与する新たな転写制御機構を解明し、先天性心疾患等の病態解明に応用することも検討している。

心臓中胚葉において **Zfp281** を欠損するマウスは胎生致死であり、右室流出路を中心とした様々な心奇形を認めた。よって、心筋分化転換誘導因子 **Zfp281** は心臓発生に必須の因子であることが明らかとなった。

小室仁・慶應義塾大学・助教
中村貴裕・慶應義塾大学・助教

- 1) Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375-386.
- 2) Zhou, H., Morales, M. G., Hashimoto, H. *et al.*

- al.* ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression. *Genes Dev* 2017; 31: 1770-1783.
- 3) Hashimoto, H., Wang, Z., Garry, G. A. *et al.* Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers. *Cell Stem Cell* 2019; 25: 69-86 e65.
 - 4) Pijuan-Sala, B., Griffiths, J. A., Guibentif, C. *et al.* A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. *Nature* 2019; 566: 490-495.
 - 5) Xu, H., Morishima, M., Wylie, J. N. *et al.* Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* 2004; 131: 3217-3227.
 - 6) Maeda, J., Yamagishi, H., McAnally, J., Yamagishi, C. & Srivastava, D. Tbx1 is regulated by forkhead proteins in the secondary heart field. *Dev Dyn* 2006; 235: 701-710.

心臓弁形成を制御する「血流ベクトル」を認識した力学応答原理の解明

国立循環器病研究センター研究所・細胞生物学部室長
福井 一

I. 緒言

心拍動・血流の開始後、心臓管腔を構成する心内膜内皮細胞は恒常的に高値の物理的ストレスを受ける。本申請者らはゼブラフィッシュ胚を用いた研究から、弁形成時期に特異的かつ心臓弁領域の心内膜内皮細胞に局限した「力」に直接応答する生体化学機構 (Ca^{2+} -Nfat シグナル活性化) が存在し、弁形成を制御することを見出した (1)。しかしながら拍動・血流が常に生じる心臓で、いかにして弁形成時の弁領域に限って力学応答 Ca^{2+} -Nfat シグナルが規定されるのかは未だに不明である。

本課題研究は、物理情報が心内膜内皮細胞に作用して心臓弁組織形成に至る力学応答シグナル作動原理の詳細解明を目指すものである。本課題では目的の達成に向け、血流から生じる「どの」情報が心内膜内皮細胞の力学応答性 Ca^{2+} -Nfat シグナルを制御し、心臓弁形成をするのか明らかにする検討を行った。さらに、「どのような」機構が血流ベクトルの差異を認識するのか実証するための手法を開発している。以上をふまえた成果を報告する。

II. 対象・方法

検討にはゼブラフィッシュ胚を用い、心内膜内皮細胞を可視化するトランスジェニック系統：*Tg(fli1a:mCherry)*、血球を可視化する系統：*Tg(gata1a:dsRed)*、力学依存性 Nfat レポーター系統：*Tg(4xnfr:d2EGFP)*、心内膜内皮細胞質内または細胞膜にて Ca^{2+} 蛍光センサーを発現する系統：それぞれ *Tg(fli1a:galf);(uas:GCaMP7a)*、または *Tg(fli1a:galf);(uas:myr-GCaMP7a)* を用いた。拍動する心臓の血流と、心内膜内皮細胞の Ca^{2+} 流入変化について、正立型スピニングディスク共焦点顕微鏡 (Dragonfly, Andor) を用いて 100 frame/sec の時間分解能でデータ取得を行った。力学応答レポーター発現は正立型共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000,

Evident/Olympus) を用いて観察・撮影した。

カベオラ形成を阻害するための検討では、カベオリン 1 (Cav1) を標的とした guide RNA を作成し、Cas9/CRISPR システムによる変異体作製を行った。磁性流体の検討では、ゼブラフィッシュ 3 日胚心臓管腔内へ Femtojet (Eppendorf) を用い任意量の磁性流体を注入した。磁性体の操作に用いる磁気プローブは、銅線を巻き付け先端を旋盤で鋭利に研磨したものに可変電圧機が繋がる電磁石を用い、倒立型蛍光顕微鏡 (Eclipse Ti2, Nikon) で 20 frame/sec の速度で撮影した。胚観察、胚操作の際はトリカイン溶液による麻酔下条件で、1%低融点アガロース中に仰向けにして包埋した。

III. 結果

まず房室弁領域の血流情報と Ca^{2+} -Nfat シグナルの各パラメーター変動相関に着目した。心臓弁形成早期は弁葉形態が構築されておらず、弁領域で「双方向性」ベクトルの血流が認められる (2, 3)。その後、機能的弁形成の進行に伴い「順方向性」の血流ベクトルへと変化するが、この時期と相関して、心内膜内皮細胞の Ca^{2+} -Nfat シグナル活性が低下・消失する。観察結果を踏まえた仮説として、『血流ベクトルに依存した弁領域の流体特性が、弁形成を制御する心内膜内皮細胞の時空間特異的シグナルを司る』を考えた。 Ca^{2+} -Nfat シグナル活性が消失する機能的弁形成後に「双方向性」の血流ベクトルを人為的に誘導した結果、心内膜内皮細胞の Ca^{2+} -Nfat シグナル活性が再開することを見出した。この際、血球を蛍光可視化することで、血流方向性が変化する領域と Ca^{2+} 応答活性化に相関が認められることを明確にした。

続いて高速イメージングを活用した弁領域の精密な血流測定と血流操作から、「どの」力学情報が心内膜内皮細胞の頑健な力学応答性 Ca^{2+} -Nfat シグナル

活性に関わるのか検討した。細胞は全領域で外部からの力学刺激を感知している。これまで得ている力学刺激に対する細胞質内の Ca^{2+} 流入変化では、どの領域の力に対する応答が明らかでなかった。そこで、心内膜内皮細胞の細胞膜に局在する Ca^{2+} センサーを作製し、細胞膜上の変化を検証した。100 frame/sec で拍動心臓のイメージングを行った結果、心臓管腔面に位置する膜を起点として Ca^{2+} 流入が開始し、その後全体へと伝播することが明らかとなった (図 1)。

細胞膜 Ca^{2+} , 心内膜内皮, 54時間胚

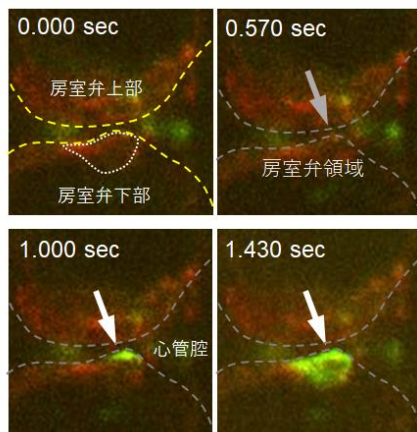


図 1 拍動心臓における弁領域に着目し、細胞膜局在 Ca^{2+} センサー活性の経時的変化・拍動心臓の同一焦点面を経時的に観察した結果、心内膜内皮細胞 (赤) では、心臓管腔面に面する細胞膜で Ca^{2+} 流入 (緑、矢印) が開始し、1 秒以内に細胞全体へと伝播した。黄色点線は心臓管腔輪郭、白色点線は矢印で示す心内膜内皮細胞の輪郭を示す。100 frame/sec で撮影。

続いて、血流ベクトルの差異を認識する物理情報の処理機構を明らかにするための実験系開発に取り組んだ。細胞内部の力学情報解析を専門とする横浜市立大学理学研究科の谷本博一准教授の協力を仰ぎ、ゼブラフィッシュ胚心臓内部での人為的血液操作法を新たに考案した。管腔面に作用する血流作用を評価するため、心臓管腔内へ磁性流体を注入し、胚体外より磁気プローブで操作する手法を新たに開発した。磁性流体は直径 10 nm 程度の界面活性成分で被膜化された酸化鉄などの磁性金属 (マグネタイト) が分散したコロイド溶液であり、磁力作用により変形する特徴を持つ。注入した磁性流体は、サイズに依存して磁気ビーズと同様に心臓管腔内に留まり、血流を介して心臓管腔内を移動した。また心房腔内に留まる磁性流体に対して、心室側の胚体外より磁力を与えることで磁性流体の変形に成功した (図 2)。本

結果を基に、磁力誘導の開始と停止に応答した磁性流体変形から非拍動条件下の心室心臓管腔内で方向性をもつ人為的な血流を誘導する系を確立中である。そして血流方向による力学応答シグナル作用の検証を行い、定量的解析から力作用の切り分けと生体機構の解明をすすめている。

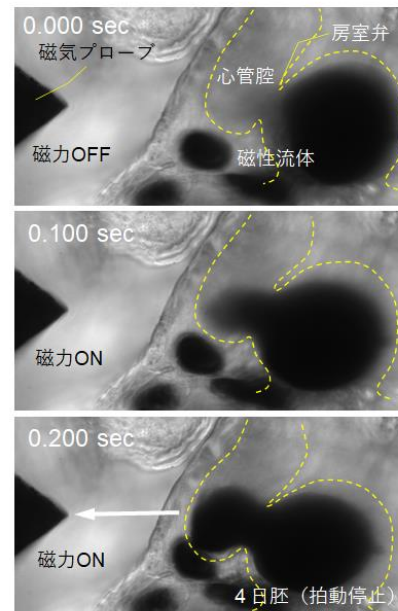


図 2 心臓管腔内に留置した磁性流体の操作・胚体外に設置した磁気プローブ/電磁石により心臓管腔内へ留置した磁性流体の操作を試みた。磁力に応じて磁性流体が変形し (白矢印方向への変形)、管腔内では血液が押し出されることで人為的な流れを作り出した。黄色点線は心臓管腔輪郭を示す。20 frame/sec で撮影。

細胞膜は力に応じてひずみ変形を引き起こす。我々は膜張力が低下する II 型ミオシンの阻害剤であるプレバスタチンの添加胚では Ca^{2+} 流入が減弱する先行結果を得ている。心臓管腔の力学シグナル活性の起点は管腔に面する細胞膜であるため、続く検討では細胞膜構造に着目した。膜脂質の密度が高く丸底フラスコ様の構造をとるカベオラは、構成成分、形態ともに特殊な細胞膜ドメインであり、細胞外からの力感知の場として重要である (4)。我々はカベオラ形成因子である Cav1 (カベオリン 1) を標的とする guideRNA を用いて、CRISPR/Cas9 システムで発現を抑制すると、心内膜内皮細胞弁領域における力学応答シグナル活性が抑制されることを見出した (図 3)。

力学応答シグナル, 心内膜内皮, 74 時間胚

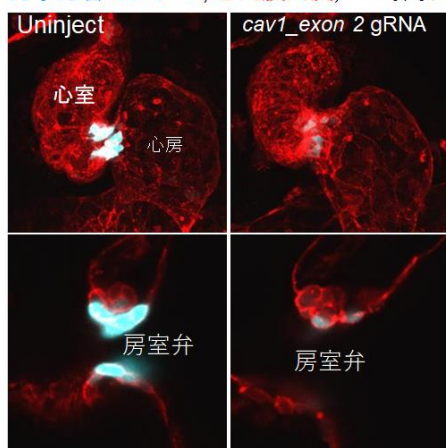


図3 Cav1 発現抑制による力学応答レポーター活性抑制・心内膜内皮細胞 (赤) の弁領域でみられる力学応答シグナル (シアン) が *cav1* 発現抑制 (右側) により抑制される。パネル上部は心臓全体像、下部は弁領域拡大像を示す。

本結果は心管腔面のカベオラ近傍に「双方向血流から生じる力」を認識する因子が存在することを示唆する。本結果を基に、力を感知する実体の同定に向けて近位依存性ビオチン化酵素を活用した検討を開始した。心内膜内皮細胞のカベオラを可視化する個体: *Tg(fli1a:cav1-EGFP)*と、過酸化水素存在下でビオチン標識する APEX2 と GFP 結合タンパク質 (GFP-binding protein, GBP) 複合体が全身で発現する個体: *Tg(beta-act:APEX2-GBP)*を樹立し、心内膜内皮細胞のカベオラ近傍に局在するタンパク質を網羅的にビオチン標識する検討をすすめている。今後はプロテオミクス解析を行い、血流応答因子の候補に迫る計画である。

IV. 考 察

心内膜内皮細胞では、心内腔で発生する双方向性の血流を認識して力学応答シグナルが活性化することが明らかになった。双方向血流は早期弁形成時におきる力学的特性である。弁石灰化や弁閉鎖不全時、異常な血流が生じて心内膜で異常シグナルが認められることが知られる (5)。適切な部位と時期で物理学情報に応答する本力学シグナルは正確な形態調節に必須である可能性が考えられる。また本結果を基にすると、心内膜内皮細胞膜自体または力覚センサーが力の極性変化を認識する機構により、力学応答性 Ca^{2+} -Nfat シグナルが調節されると示唆される。ソフトマター研究では、力の極性を区別する材料が

開発され (6)、生体組織の構築でも心内膜が類似の生体メカニズムを構築・保有する可能性が考えられる。血管内皮細胞では大動脈湾曲部などの血流方向が変化する領域において、細胞応答が異なることが知られ (7)、乱流発生領域では動脈硬化の要因となる。しかしながら、未だに細胞調節機構による説明はできない。圧力刺激に応答する代表的な因子として Piezo 分子が知られるが (8)、我々が観察している Ca^{2+} -Nfat シグナル応答は Piezo に依存しない (1)。今後も血流から生じるせん断応力の極性を認識する機構の解明に近づく研究を継続する。

本研究では生体化学情報である Ca^{2+} 流入に着目している。常に拍動する心臓では多様な力学情報が発生しており、他の生体シグナルによるアウトプットも十分に考えられる。例えば、心筋や心線維芽細胞では拍動に依存する伸展張力を介した Hippo シグナルの活性調節機構が報告されている (9)。各力学情報を切り分け、各自の応答を検討することで全容理解に向かうと期待される。

V. 結 論

力学レポーターを活用したゼブラフィッシュ胚イメージングより、心内膜内皮細胞は心臓管腔形成時に生じる双方向血流を特異的に認識する力学応答機構が存在することを見出した。本研究期間中、我々は新たに個体管腔内の磁性流体操作から心管腔内でせん断応力を操作する方法を開発した。本手法は心管腔内で発生する力学作用を切り分けて定量的に理解し、生体シグナル機構を実証する系へと進展することが期待できる。また細胞レベルで力学応答機構を捉える検討では、細胞膜のカベオラ構造が力学応答に重要であることが明らかとなり、力覚センサーの探索・同定に向かう有用な知見が得られた。本結果を基にすることで、力に応答する生体原理の解明へ向かうことが期待できる。

VI. 研究協力者

谷本 博一 (TANIMOTO Hirokazu)
横浜市立大学理学部・准教授
折井 良太 (ORII Ryota)
横浜市立大学理学部・博士院生

VII. 参考文献

- 1) Fukui H, Chow RW, Xie J, et al. Bioelectric signaling and the control of cardiac cell

- identity in response to mechanical forces. *Science* 2021;374:351-354.
- 2) Schertz PJ, Huisken J, Sahai-Hernandez P et al. High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function. *Development* 2008;135:1179-1187.
 - 3) Vermot J, Forouhar AS, Liebling M et al. Reversing blood flows act through *klf2a* to ensure normal valvulogenesis in the developing heart. *PLoS Biol* 2009;7:e1000246.
 - 4) Sinha B, Köster D, Ruez R et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 2011;144:402-413.
 - 5) Dutta P and Lincoln J. Calcific aortic valve disease: a developmental biology perspective. *Curr Cardiol Rep* 2018;20:21.
 - 6) Wang X, Li Z, Wang S et al. Mechanical nonreciprocity in a uniform composite material. *Science* 2023;380:192-198.
 - 7) Tanaka K, Joshi D, Timalina S et al. Early events in endothelial flow sensing. *Cytoskeleton* 2021;78:217-231.
 - 8) Coste B, Mathur J, Schmidt M et al. *Piezo1* and *Piezo2* are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010;330:55-60.
 - 9) Tsai CR and Martin JF. Hippo signaling in cardiac fibroblasts during development, tissue repair, and fibrosis. *Curr Top Dev Biol*. 2022;149:91-121.