
研究助成業績報告集

第 32 回（2024 年度）バイエル循環器病研究助成
『心不全と分子機構』

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	in vivo 代謝・酸化脂質モニタリング・イメージング技術を用いた心血管疾患の病態解明	勝俣 良紀	1
2	非心筋細胞の心不全病態及び多臓器連関における役割の全貌解明とそれに基づく新規治療法開発	小室 仁	11
3	心筋細胞の4倍体化を忠実に再現する iPS 細胞心筋症モデルの開発	宮岡 佑一郎	16
4	単球の圧力受容体 GPR68 に着目した新規心不全発症機構の解析と治療薬シーズ導出 -CryoEM を活用した電子レベルの分子機構解析-	吉田 優哉	21

in vivo 代謝・酸化脂質モニタリング・イメージング技術を用いた心血管疾患の病態解明

慶應義塾大学医学部・専任講師
勝俣良紀

I. 緒言

急性心筋梗塞などの急性の致死的な虚血性疾患は、発症の数時間後の治療開始でも、細胞死・組織障害を抑制し、生存だけではなく社会復帰や病前と同様の社会生活を可能にするような治療法の開発が不可欠である。これまで、虚血再灌流障害(IR) 障害の研究は、虚血時または IR 後早期の病態解明と治療法の開発が中心であったため、実臨床における新しい治療法にはなりにくかった。例えば、シクロスポリンは、心臓における IR 直後に生じるミトコンドリアの mPTP の開口を防ぎ、細胞死の抑制が期待されたが、ヒトを対象とした第3相試験では、その効果が得られなかった¹⁾。一方、我々は、水素ガスの効果を検証した二重盲検無作為化比較試験で、心筋梗塞に対する発症の数時間後から水素ガスの吸入投与を開始しても、長期の心機能低下を抑制したことを報告した²⁾。つまり、水素ガスは、IR 数時間後からの投与であっても、臓器障害の進行を抑制していることが示唆される。これは、虚血再灌流障害に伴う細胞障害の一部は、虚血時・IR 直後ではなく、再灌流後の遅いタイミング(数時間後以降)に存在していることが想定される。

そこで、水素ガスの IR 抑制のメカニズムを解明するために、本研究では、IR 後の遅延相(IR 後6時間以降)に生じる細胞死・組織障害のメカニズムを検証することを目的とする。

II. 対象・方法

1. モデル動物

心筋梗塞の *in vivo* 実験には、8週齢の雄性 C57BL/6J マウス(22-26 g; Clea Japan, 東京, 日本)または、Wistar 系雄性ラット(12-14週齢、体重 280-320g)を用いた(三共ラボサービス株式会社、東京、日本)。動物には常に餌と水を自由摂取させた。動物は温度 22±1℃、湿度 55±5%、12:12:12 時間の明暗サイクルで飼育した。動物は到着後少なくとも 5 日間、環境

に順応させた。本試験は動物実験委員会(慶應義塾大学 No.12094)の承認を得た。すべての動物実験は ARRIVE ガイドラインに準拠して行われた。

2. *in vivo* 心筋虚血再灌流モデル

胸腔切開を行い、心膜を剥がして心臓を露出させた。左冠動脈前下行動脈(LAD)を 5-0 絹縫合糸で囲み、小さなプラスチックチューブに通した。チューブを心臓表面に密着させて虚血を誘発した。30 分間の虚血後、心筋梗塞に使用したチューブを外し、胸郭を閉鎖した。

心臓における低分子代謝産物マップの開発と新規の IR 時の代謝フローの発見

3. ¹³C 標識代謝物の投与

グルコースの代謝動態を追跡する実験のために、マウスは LAD 結紮の 10 分前に ¹³C₆-グルコース(1mg/g 体重、生理食塩水中)を腹腔内投与した。¹³C₃-乳酸(27 μg/g 体重、生理食塩水中)は、LAD 結紮の 1 分前に眼窩後注射で投与した。この時点で血中乳酸濃度が 7~8mM に上昇し、生理的範囲内にあることを確認した。

4. FMW(マイクロ波)による心臓代謝物の固定化
実験用マウスとラットの安楽死用に設計された実験用マイクロ波装置(MMW-05 室町機械、東京)を使用した。この装置は、特に最大出力(5kW)とマイクロ波ビームがきつく絞られている点で台所用装置と異なっている。全ての装置は、マイクロ波エネルギーを動物の特定の解剖学的位置に向ける。マウスをイソフルランで麻酔し、透明なウォータージャケットホルダー(室町機械、MH28-HZ)に入れた。マイクロ波エネルギーを使って心臓の温度をできるだけ均一に上昇させるために、ホルダーの円錐部分には 1mL の水を入れた。気泡が入らないように注意した。次に、マ

マイクロ波照射が脳と心臓の両方に照射されるような位置で、これを装置に挿入した。信頼できる固定のためには、動物を正しい位置に維持することが非常に重要である；すなわち、マウスは鼻がコーンの上部に触れるようにまっすぐでなければならない。ホルダーの後端は B6/J マウス（8 週齢の雄）に最適であった、挿入溝の入り口から 43mm の位置にセットした。5kW で 0.96 秒のマイクロ波照射は、心臓の温度を 80°C 以上に上昇させ、アセチルコリンエステラーゼのような代謝酵素を不活性化するのに十分である。米国獣医師会の勧告（AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition）によると、高エネルギーマイクロ波照射は、100 ミリ秒未満で意識がなくなり、1 秒未満で脳機能が完全に失われる小型実験用げっ歯類を安楽死させる人道的な方法である。FMW 固定法の有効性を評価するため、他の 2 つの方法と比較した：i) 急速凍結：開胸直後に心臓を分離し、液体窒素中で凍結（全処置時間は～20 秒）ii) 遅延凍結：頸椎脱臼の 10 分後に心臓を分離し、死後の分解を待つ。

5. メタボロームおよび MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) 画像解析のための組織切片の調製

FMW 後、心臓を室温で手術用ナイフで剥離し、超低温包埋培地 (SCEM、株式会社セクションラボ、広島県) に包埋後、液体窒素中で凍結し、-80°C で保存した。短軸（横方向）組織切片を 5 セット作製し、各セットは、代謝産物定量用の厚さ 450 μ m の「ブロック」と、MALDI イメージング分析用の隣接する 8 μ m の薄い「切片」で構成された。対照群の左心室の頂部 3 分の 2 を 4 つの短軸ブロックに細分した。

薄切片はクライオミクロトーム (CM3050、Leica Microsystems) で切り出し、-16°C でインジウム薄酸化物コーティングしたスライドガラス (Bruker Daltonics、ドイツ) に融解マウントした。FMW で処理された心臓組織は、他の方法で処理された組織よりもろくなる傾向があり、しばしば組織の切片化が困難になる。しかし、代謝物のイオン化効率を妨げない SCEM (Super Cryoembedding Medium) 培地で組織を包埋することで、うまく切片化することができた。

6. キャピラリー電気泳動-エレクトロスプレーイオン化 (CE-ESI) -MS

定量的なメタボローム解析は CE-MS を用いて行った。組織から代謝物を抽出するために、SCEM 培地に包埋した凍結組織ブロックを内部対照化合物（下記参照）とともに、手動ホモジナイザー（フィンガーマッシャー (AM79330) ; Sarstedt、東京、日本）を用いて氷冷メタノール (500 μ L) 中でホモジナイズし、次いで等容量のクロロホルムと 0.4 倍量の超純水 (LC/MS グレード; 和光) を加えた。懸濁液を 15,000 g、4°C で 15 分間遠心した。遠心後、水相を限外ろ過チューブ (Ultrafree-MC, UFC3 LCC NB; Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan) を用いて限外ろ過した。濾液を真空濃縮機 (SpeedVac; Thermo, Yokohama, Japan) で濃縮した。この濃縮プロセスは微量代謝物の定量に役立つ。濃縮ろ液は 50 μ L の超純水に溶解し、CE-MS に使用した。すべての CE-MS 実験は、空気圧ポンプ、Agilent 6520 Accurate Q-ToF 質量分析計、Agilent 1200 シリーズアイソクラティック高性能 LC ポンプ、7100 CE-システム、G1603A Agilent CE-MS アダプターキット、G1607A Agilent CE-MS スプレイヤーキット (Agilent Technologies) を備えた Agilent CE システムを使用して実施した。

7. マトリックスコーティングと MALDI-IMS 測定
マトリックスコーティングの前に、組織スライスを乾燥剤中に 10 分間置き、室温に平衡化させた。マトリックスとして 9-アミノアクリジンを用い (10 mg/mL、80% エタノールに溶解)、アーティスティック・エアブラシ (プロコンボーイ FWA プラチナ 0.2 mm 口径エアブラシ、ミスターホビー、東京、日本) を用いて、この溶液を組織切片に手動でスプレーコートした。マトリックスコーティング中は、エアブラシとターゲットの距離を 5cm 程度に保ち、コーティングサイクルの間に切片を乾燥させることで、ターゲット化合物の非局在化を最小限に抑えた。

MALDI-IMS は、Nd:YAG レーザーを装備した Ultra Flextreme MALDI-飛行時間型 (TOF) 質量分析計 (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) を用いて行った。正確な MS および MS/MS 分析は、プロトタイプの「Mass microscope」(島津製作所、京都、日本) を用いて行った。どちらの装置でも、レーザー出力はリン酸ヌクレオチドのソース内減衰を最小限に抑えるように最適化された。データは、100 μ m のピッチでラスターキャンを行い、ネガティブリフレクトロンモードで取得した。各マススペクトルは、各データ

ポイントで 300 回のレーザーショットを行った結果である。 m/z 50 から 1000 までのシグナルが収集された。画像再構成は FlexImaging 4.0 software (Bruker Daltonics) を用いて行った。特定の代謝物分子のピークは、MALDI-IMS の実験およびプレゼンテーションガイドラインに従って、イオントラップ TOF 装置を用いた正確な MS 分析、および組織上の MS/MS 分析によって割り当てられた。組織切片の光学画像は、光学顕微鏡によって得られ、その後、同じ切片の MALDI-TOF MS イメージングが行われた。

代謝の *in vivo* 代謝モニタリング手法開発と新しい IR 障害によって進行する細胞死の解明

8. 心筋梗塞組織の TTC/エバンスブルー染色

再灌流から 24 時間後に開胸し、冠動脈周囲の縫合を戻し、心筋梗塞の危険部位を適切的に描出するために 2%エバンスブルー色素を左室腔内に注入した。心臓を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、1mm 厚の切片に順次スライスした。切片を 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (3%) で染色し、梗塞部 (白)、非梗塞部 (赤)、非虚血部 (青)、危険部位 (白と赤) を測定した。

9. 心臓マイクロダイアリシス法

動物を側臥位とし、左側の第 3 肋骨と第 4 肋骨を部分的に切除して心臓を露出させた。LAD の周囲に 5-0 絹縫合糸を通し、後で閉塞させた。

透析プローブの材質と特性については、半透膜からなる透析ファイバー (長さ: 6mm、外径: 310 μ m、内径: 200 μ m、分子量カットオフ: 50,000、PAN-1200、旭化学工業、東京、日本) の両端をポリエチレンチューブ (長さ: 25cm、外径: 500 μ m、内径: 200 μ m) に取り付け、透析プローブを細いガイド針で左室壁に横向きに留置した。

プローブにはリンゲル液 (147.0mM NaCl、4.0mM KCl、2.25mM CaCl₂) を灌流した。120 分間のベースライン透析液サンプリング (定常状態) の後、30 分間の LAD 閉塞と 120 分間の再灌流を行い、10 分間隔で透析液を採取した。透析液サンプル中の代謝物は質量分析を用いて分析した。

すべての実験プロトコルの終了時に、LAD を再閉塞し、Evans blue 溶液を静脈内注射して、透析プローブが留置された心室壁の虚血領域を確認した。ラットを安楽死させ、心臓を解剖して透析プローブが心室腔を貫通していないことを確認した。

10. マイクロ透析液と心臓組織の質量分析に基づくメタボロミクス

微量透析で得られた透析液はタンパク質含量が低いいため、前処理を行わずに直接メタボローム解析に供した。メタボローム解析のための心臓組織からの代謝物抽出は、前述の方法 6 と同様に行った。内部標準物質は抽出溶媒 (MeOH) に添加し、陰イオン測定には 2-モルフォリノエタンスルホン酸を、陽イオン測定には L-メチオニンスルホン酸を内部標準物質として用いた。試料調製中の内因性代謝物の損失は、IS を用いて各試料測定の回収率 (%) を計算することにより補正した。

11. 液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析法による酸化ホスファチジルコリンの検出

ラット心臓サンプルは直ちに液体窒素で凍結した。脂質抽出のために、100 μ M ジブチルヒドロキシトルエン、100 μ M エチレンジアミン四酢酸、および 5mM ギ酸アンモニウムを含む抽出溶液 (1-ブタノール: メタノール=1:1) 1mL を凍結組織サンプル (湿重量: 約 50mg) に加え、Minilys ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、抽出液を氷浴中で 5 分間超音波処理した。遠心分離 (15,000 $\times$ g、10 分、4 $^{\circ}$ C) 後、500 μ L の上清を回収し、液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析 (LC/HRMS) 分析前に -80 $^{\circ}$ C で保存した。

LC/HRMS 分析は、UltiMate 3000 システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) とオービトラップ型質量分析計 (Q Exactive focus, Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて行った。質量分析計はエレクトロスプレーイオン化源を備えていた。

LC 条件は以下の通り: 注入量=8 μ L、オートサンプラー温度=4 $^{\circ}$ C、カラム=Accucore C18 (2.1 $\times$ 150 mm、粒子径=2.6 μ m、Thermo Fisher Scientific)、カラム温度=35 $^{\circ}$ C、移動相=10 mM ギ酸アンモニウム、アセトニトリル/H₂O (1:1, v/v) (A) および 2 mM ギ酸アンモニウム、アセトニトリル/イソプロパノール/H₂O (10:88:2, v/v) (B)、流速=0.4mL/min、グラジエント=35%B、0-1.0 分; 35-60%B、1.0-4.0 分; 60-85%B、4.0-12.0 分; 85-100%B、12.0-21.0 分; 100%B、21.0-24.0 分; 100-35%B、24.0-24.1 分; および 35%B、24.1-28.0 分。

イオン化条件は、イオン化モード=ポジティブ、シーイングスガス流量=60 任意単位、補助ガス流量=20 任意単位、

スプレー電圧=3000 V、キャピラリー温度=285 °C、S レンズレベル=45、ヒーター温度=370 °C。

フルスキャン MS の実験条件は次の通り：分解能=70,000、自動利得制御ターゲット=1×10⁵、トラップフィルタイム=80 ms、スキャン範囲=m/z 250-1200。LC/HRMS/MS 分析は、Xcalibur ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を用いて制御した。

1 2. 細胞培養

新生児ラット心筋細胞の初代培養については以下の方法で行った。1~2 日齢の Wistar ラットから得た新生児心室心筋細胞は、断頭して犠牲にし、心臓を直に取り出して Percoll 勾配遠心分離とディファレンシャルレーティングを行い、心筋細胞集団を濃縮し、非心筋細胞を除去した。心筋細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10%ウシ胎児血清 (FBS) を加えた混合培地で培養した。

1 3. 心筋細胞の無酸素・再酸素化モデル

細胞を低酸素ストレスに曝すために、アネロパック (三菱ガス化学) を入れた嫌気ジャーを使用した。心筋細胞の培養に使用した培地は、細胞を低酸素ストレスに曝す前にグルコースを含まない DMEM に交換した。低酸素に 5 時間暴露した後、培地を 10%FBS 含有 DMEM (すなわち再酸素化培地) に交換した。

1 4. siRNA オリゴヌクレオチドとトランスフェクション

siRNA オリゴヌクレオチドのトランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Invitrogen) を用いて行った。

1 5. RNA 抽出とリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のために、マウス左心室または新生児ラット心室心筋細胞 (NRVM) から得た全 RNA サンプルを Sepasol-RNAi Super G (Nacalai tesque) を用いて調製した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて、全 RNA サンプル (0.2~0.5µg) を逆転写した。定量的 mRNA 発現は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いたリアルタイム PCR で評価した。サンプルは ViiA7 (Applied Biosystems) で実行し、データはデルタデルタ CT 法で解析した。内部コントロールとしてハウ

スキーピング遺伝子 GAPDH を用いた。プライマーペアの配列は Primer3 plus を用いて設計した。

1 6. *in vitro*での細胞内および細胞外グルタチオン測定

GSH-GSSG-Glo グルタチオンアッセイキット (プロメガ社製) を用いて、製造元の説明書に従って、NRVM の細胞内および細胞外の GSH およびグルタチオンジスルフィド (GSSG) 濃度を測定した。GSH および GSSG 濃度は標準曲線を用いて算出し、各サンプルの総タンパク質量に対して正規化した。

1 7. *in vivo*での細胞内グルタチオン測定

マウス心臓サンプルを 0.5-1.0 mL の 5% 5-スルホサリチル酸でホモジナイズした。その後、ホモジナイズした心臓サンプルを 8000 g で 10 分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、二重脱イオンした H₂O を加え、スルホサリチル酸濃度を 0.5%まで低下させた。総グルタチオンおよび酸化グルタチオン含量は、総グルタチオン定量キット (同仁堂モレキュラーテクノロジーズ、熊本、日本) を用いて、メーカーの説明書に従って測定した。GSH および GSSG 濃度は標準曲線を用いて算出した。

1 8. 共焦点顕微鏡観察

NRVM 細胞をガラス底ディッシュ (マツナミ) で培養した。ミトコンドリア由来の活性酸素の蓄積を検出するため、細胞を 5µM MitoSOX (同仁堂) で 10 分間前処理した。脂質ペルオキシダーゼの蓄積とその局在を検出するために、細胞を 10µM Liperfluo (同仁堂) で 30 分間前処理し、その後 MitoTracker red (Thermo fisher scientific) で 15 分間インキュベートした。その後、核を 1µg/mL Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate solution (Thermo fisher scientific) で 5 分間染色した。すべてのスライドを FV3000 蛍光顕微鏡 (オリンパス) で可視化し、画像化した。MitoSOX または Liperfluo の強度は、Olympus cellSensTM Entry ソフトウェアを用いて評価した。

1 9. 細胞生存率アッセイ

細胞生存率は、LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit (L3224; Invitrogen) を用いて測定した。LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay Kit は、細胞内エステラーゼ活性と細胞膜の完全性にそれぞれ

特異的なカルセイン AM プローブとエチジウムホモダイマー-1 プローブを用いて、生細胞と死細胞を同時に測定するものである。細胞の蛍光イメージングを蛍光顕微鏡 (BZ-9000 ; Keyence) で行った：生細胞は緑色に、死細胞の核は赤色に標識された。

20. ウェスタンブロッティング

細胞抽出液は、培養細胞またはラット左心室細胞を、ホスファターゼ阻害剤 (ナカライ)、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを添加し、1mM ジチオスレイトール、100nM MG132、プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク、京都、日本) を加えた放射免疫沈降バッファー (ナカライ) で溶解した。タンパク質濃度は、ビシンコニン酸タンパク質アッセイ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、等重量のタンパク質を12%プレキャストポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) に結合させ、ニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。タンパク質のついたニトロセルロース膜は、0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline で洗浄した後、22°Cで1時間ブロッキング (Blocking one; Nacalai) し、その後4°Cで一次抗体 (1:1000 希釈) と一晩インキュベートした。洗浄後、膜を二次抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体 (1:2000) (NA931V, GE Healthcare) または抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体 (1:2000) (NA934, GE Healthcare) と22°Cで1時間インキュベートした。タンパク質の発現は、enhanced chemiluminescence (Chemi-Lumi One; Nacalai) を用いて可視化し、LAS-3000 luminoimage analyzer (富士フイルム) を用いて検出した。実験には以下の一次抗体を用いた： β -アクチンに対するマウスモノクローナル抗体 (A5316, Sigma-Aldrich)、GPx4に対するウサギポリクローナル抗体 (bs-3884R, Bioss)。

21. 統計解析

データは平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差で表した。生存率の差はKaplan-Meier 解析を用いて評価した。生存率の比較には log-rank 検定を用いた。一元配置分散分析、続いて Tukey-Kramer 多重比較検定を、群間の変数の比較に用いた。変数間の相関の評価には Spearman 順位相関係数を用いた。P 値 0.05 を有意とした。すべてのデータは、SPSS 25.0 統計ソフト (SPSS Inc, Chicago, Ill) または R 3.4.4 を用いて解析した。

III. 結果

心臓における低分子代謝産物マップの開発と新規のIR 時の代謝フローの発見

質量分析法の改良が進み、2007 年には imaging mass spectrometry (imaging MS) を応用し、低分子代謝産物を空間的に解析する技術が開発され、低分子代謝産物を中心とする未知の物質の組織内での局在を代謝イメージングで評価することが可能となった。そこで、我々は、心臓における虚血再灌流障害後に遅発性に生じる細胞障害の実態を解明するために、まずは虚血再灌流障害後の急性期における代謝の時空間分布の変化に注目した研究を進めてきた。しかし、心臓の正確な代謝マップを作成する際に、死後の低分子代謝産物の分解が急速であるため、急速冷却によるサンプル収集方法では重要な代謝産物が損失する問題があった。そこで、代謝産物の分解酵素を瞬時に死活化させ、低分子代謝産物を安定化させる処理方法として、マイクロ波を用いたサンプルの処理を心臓に応用し、マウス心臓における高い空間解析度の代謝イメージング技術の開発を進めた。マイクロ波を心臓に照射すると、瞬時に酵素活性が死活し、代謝活動が停止することを利用した解析で、いわゆる心臓代謝のスナップショットを可視化できる。まず、代謝アーチファクトを防ぐという点で、マイクロ波を用いた方法が従来のサンプル調製法よりも優れているかどうかを調べた。3つの異なる方法 (マイクロ波法、急速凍結法 (従来のサンプル調製法)、遅延凍結法 (サンプル処理後10分間放置)) で得られた心臓の代謝物をキャピラリー電気泳動/質量分析計 (CE-MS) で定量すると、急速凍結による従来のサンプル調製では、マイクロ波法と比較して、乳酸産生がかなり増加し、TCA 中間体 (アセチル-CoA、クエン酸、イソクエン酸、コハク酸、リンゴ酸) が蓄積した。特に重要なことは、急速凍結法で得られた心臓の NADH/NAD⁺比は、遅延凍結法で得られた心臓と同じレベルまで上昇していたことである。対照的に、NADH/NAD⁺比はマイクロ波法では急速凍結法で得た心臓よりも著しく低いままであった。これらの所見を総合すると、死後の虚血性変化を最小限に抑えるためには、マイクロ波による処理が不可欠であることがわかった。

そこで、心筋梗塞を作成したのち10分後にマイクロ波法で処理した心臓を、左心室を短軸連続スライスに細分し、キャピラリー電気泳動質量分析とマトリッ

クス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析で代謝物を空間的に分析した(図1)。マイクロ波法によるサンプル調整では、心臓の構造が保たれ、また代謝産物の解像度のいいマッピングを得ることができた。虚血部位に一致してNASHが蓄積し、ATPが減少、乳酸はコハク酸の上昇を認めた。さらに、これらの手法を応用し、外因的に投与された炭素13(^{13}C)でラベルした基質($^{13}\text{C}_6$ -グルコースと $^{13}\text{C}_3$ -乳酸)を用いることで、代謝産物の流れを可視化することを試みた。これらのラベルした基質を用いた心筋梗塞モデルのグルコースおよび乳酸のトレースイメージングでは、虚血の中心部ではグルコースを乳酸に変換するとともに、乳酸を積極的にTCAサイクルで代謝していること、虚血の周辺部位ではグルコースを積極的にTCAサイクルで代謝していることが明らかとなった(図2)³⁾。

代謝の *in vivo* 代謝モニタリング手法開発と新しいIR障害によって進行する細胞死の解明

しかし、心筋障害部位での超急性期の代謝の継時的な変化については、代謝がドラスティックかつ急速に変化するため、前出の代謝のスナップショットのみでは、代謝の変化を正確に評価することが困難であった。特に、個体によって程度の異なってしまう虚血再灌流障害の代謝変動マップを作成するためには、*in vivo*での同一個体の局所の代謝変化を連続的に解析する必要がある。そこで、透析膜を用いた同一個体での細胞外の代謝変化を連続的に測定する技術である心臓マイクロダイアリシス法を開発した。これは、半透膜の特性を利用して、心筋間質に存在する低分子生体内物質を、中空糸状透析膜を介して灌流液中に分離採取する方法である(図3)。

秋山らは、マイクロダイアリシスを用いて、心筋の虚血・再灌流時における局所のセロトニン(5-HT)、ミオグロビン、ヒドロキシラジカルの挙動を検討し、虚血から再灌流時の変化を追跡した結果、セロトニンが心臓における虚血再灌流障害に抵抗性があることを証明した⁴⁾。我々は、このマイクロダイアリシス技術と質量分析計を組み合わせることで、心筋局所の代謝産物の時間的変化を網羅的に評価した。Wistar ラットの心筋内に透析膜を中央に配したカテーテルを留置し、冠動脈閉塞・再灌流中の、細胞外の代謝産物を経時的に質量分析器にかけ、各時相での代謝産物を網羅的に解析し、IR時の代謝のダイナミクスな変化を明らかにした(図4：心筋局所の代謝産物のIR時の

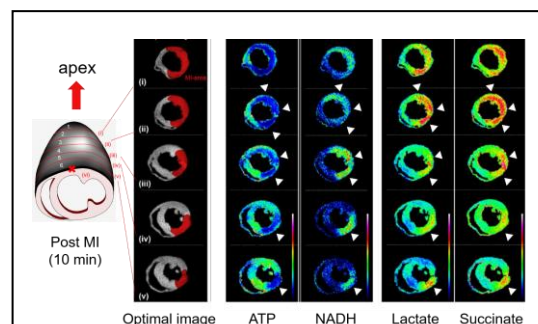


図1 心筋梗塞作成10分後のマウス心臓の代謝マップ

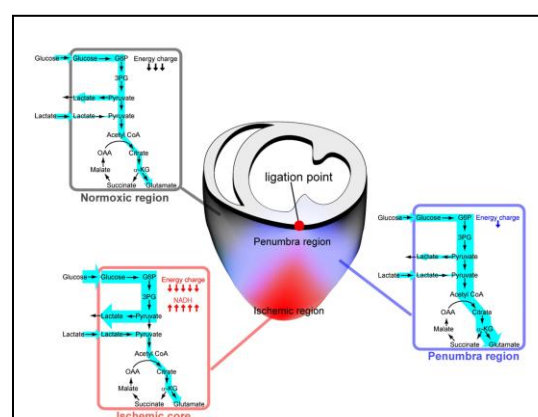


図2 心筋梗塞10分後の代謝

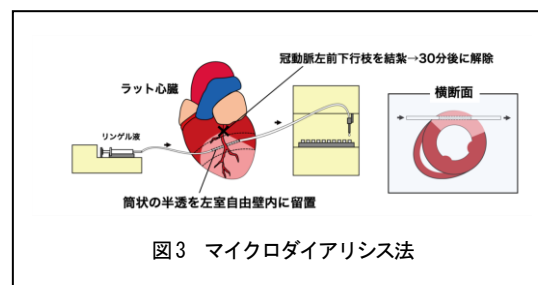


図3 マイクロダイアリシス法

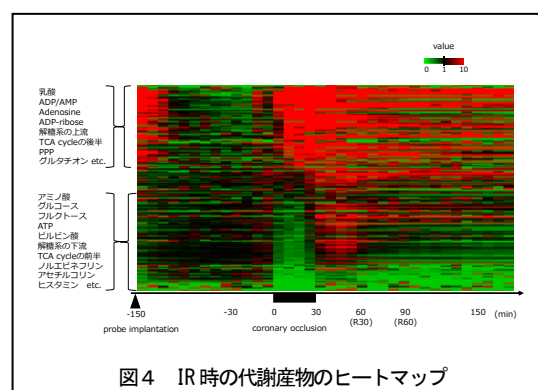


図4 IR時の代謝産物のヒートマップ

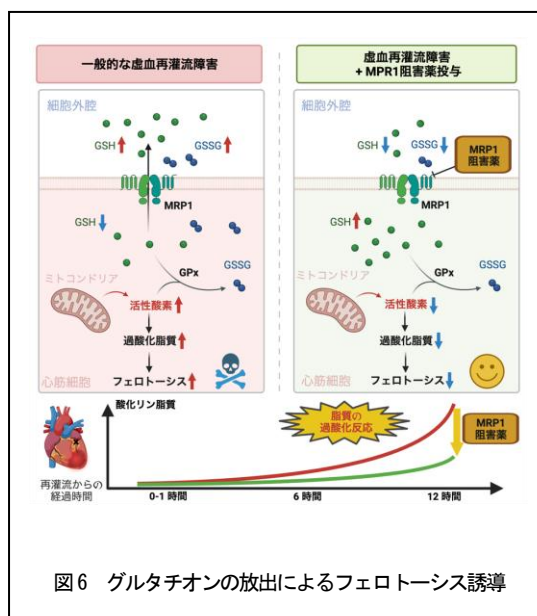
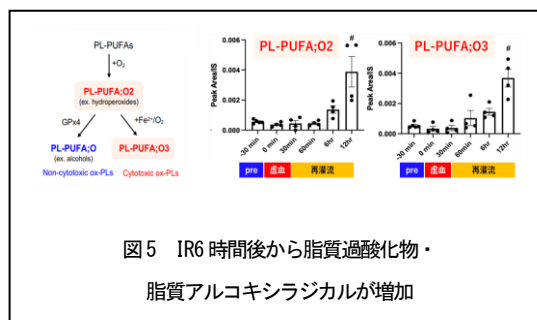
時間的変化。赤が代謝量の増加、緑が低下)。これまでの報告とおり、乳酸、アデノシン2リン酸(ADP)、アデノシン1リン酸(AMP)、アデノシン、解糖系の代謝産物、クエン酸サイクルの一部(リンゴ酸、フマル

酸、コハク酸など)は虚血で上昇した。これらの物質は再灌流後数時間以上も細胞外の濃度が高めに維持されていることが観察された。一方で、アミノ酸、グルコース、フルクトース、アデノシン三リン酸(ATP)、ピルビン酸、クエン酸サイクルの一部(オキサロ酢酸、クエン酸、磯クエン酸、 α ケトグルタル酸、スクシニル CoA など)、アセチルコリン、ノルエピネフリンなどは、虚血時には上昇せず、再灌流後から細胞外濃度が上昇することが観察された。同一生体における虚血再灌流障害時の代謝変化をモニタリングすることに世界で初めて成功した。

その中で、生体における抗酸化剤として、主要な働きを持つグルタチオンが、虚血領域から細胞外腔へ虚血時から再灌流後に有意な放出が明らかになった。特に、再灌流直後は、急激な再酸素化が生じ、細胞内の ROS の産生が上昇し、それが再灌流障害(細胞死など)の原因といわれているが、細胞内ではその ROS を除去するためのグルタチオンが細胞外に漏出するという矛盾が生じていた。グルタチオンの細胞外腔への放出とそれに伴う細胞内グルタチオン濃度の低下は、*in vitro* 心筋細胞モデルにおける無酸素-再灌流時にも観察された。この細胞外グルタチオン放出は、MRP1 (Multidrug resistance-associated Protein 1) の化学的阻害または遺伝的抑制によって阻止された。MRP1 阻害剤を投与すると、細胞内の活性酸素種レベルと脂質過酸化が減少し、細胞死が抑制された。これらの技術を通して、虚血及び IR 早期に、還元型グルタチオンが、MRP1 を通して積極的に細胞外に放出されていることが判明した。逆に細胞内のグルタチオンは再灌流後早期に枯渇し、連鎖的脂質過酸化反応の防御機構として働く GPX4 の活性が急速に低下し、Liperfluo を用いた酸化脂質の蓄積は確認された。

さらに、我々が保有する 465 種の酸化脂質ライブラリを用いて、虚血再灌流障害の過程でどのような種類の酸化脂質が、どの時相で、どれほどの量生成し、心筋細胞死にどの程度寄与するのかを高分解能質量分析(HRMS)により包括的に解析した。その結果、心臓では、IR6 時間以降と遅発性のタイミングで、フェロトーシスにつながる脂質アルコキシルラジカル(図5)が蓄積することが確認された。Fer-1 というフェロトーシスを抑制することが知られている物質を IR 作成前に投与すると、IR 障害は抑えられたが、特記すべきは、IR 後 3 時間という遅れたタイミングで投与しても IR 障害が抑えられることであった。この事実は、フェロトーシスが IR 直後ではなく、IR 後数時間以上

たった後に顕在化し、その抑制のためには IR 後しばらくたったタイミングでの介入が可能であることを示している。さらに、この効果は、MRP1 の薬理的な阻害によっても、*in vivo* での細胞内グルタチオン枯渇を緩和し、ox-PC の生成を有意に減少させ、さらには、IR 損傷後の梗塞サイズを有意に減少させた(図6) 5)。



IV. 考 察

心臓という、代謝産物の分解が急速に進む臓器における正確な代謝の状態の空間的かつ時間的把握を確立するために、マイクロ波によるサンプル処理やマイクロダイアリス法の開発を進めてきた。これらの方法と、高分解能質量分析を組み合わせることで、虚血再灌流という、代謝変化が瞬時に代わる病態における代謝を正確に評価することができ、そのメカニズムの解明を進めることができた。特に、これまで不明であった、虚血時、再灌流時の代謝産物の放出、遅延相にのみ起こる酸化脂質の蓄積などから、新しい治療標的の同定に成功した。

グルタチオンは一般的なチオール含有代謝産物であ

り、細胞内で合成され、GPx4などの酵素を介して還元系で利用される。最近、細胞外グルタチオン輸送機構の生物学的重要性が示唆されている⁶⁾。

細胞外グルタチオンは、免疫系^{7,8)}や中枢神経系^{9,10,11)}における生理機能の維持に重要な役割を果たす一方、呼吸器疾患の病態¹²⁾や腫瘍細胞の微小環境¹³⁾における相互作用にも関与している。

しかし、心臓における細胞外グルタチオン輸送を報告した研究はない。我々は、心筋細胞がグルタチオンを細胞外に放出するメカニズムが、IR中に著しく亢進することを証明した。さらに、再灌流後の細胞内GSHの枯渇は、活性酸素と脂質過酸化に対する細胞防御機構の崩壊につながる。これらの結果は心筋細胞に限ったものであり、放出されたグルタチオンが周囲の非心筋細胞の機能を変化させるかどうかは、まだ解明されていない。

IR誘導心筋細胞グルタチオン輸送を担うMRP1は、当初、がん細胞に多剤耐性を付与する因子として同定された^{14,15)}。MRP1の主な輸送基質は、かつてはグルクロン酸抱合体のようなゼノバイオティクスであると考えられていたが、GSHやGSSGの細胞排出にも一役買っている¹⁶⁾。

MRP1トランスポーター活性を亢進させる様々な異生物質(バラパミル、ビンクリスチン、抗ウイルス剤)が示されているが¹⁵⁾、生理的・病的状態においてGSH輸送を活性化する内因性分子は不明である。

MRP1に対する化学的阻害剤であるMK571は広く使用されており、喘息における気道過敏性¹⁷⁾やアテローム性動脈硬化ストレス下の内皮細胞に対する有益な効果が証明されている^{18,19)}。ミトコンドリア透過性移行孔を直接標的とする従来の治療法(シクロスポリンA、シクロフィリンDなど)とは治療ポイントが異なるため、これらの治療法を併用することで治療成績の向上が期待される^{20,21)}。

フェロトーシスは、心筋梗塞の原因の一つとして関与しており、鉄依存性の脂質過酸化によって駆動される制御された細胞死の一形態として正統的に定義されている²²⁾。フェロトーシスの病因における鉄の重要な役割のため、鉄キレート剤と鉄輸送タンパク質の阻害は、心筋梗塞の際のフェロトーシスの抑制に効果的であると報告されている²³⁾。

それにもかかわらず、鉄代謝を標的とした介入は、貧血などの副作用を誘発する可能性もある²⁴⁾。したがって、活性酸素防御系を標的とすることも、IR傷害の治療に有益である可能性がある。本研究では、

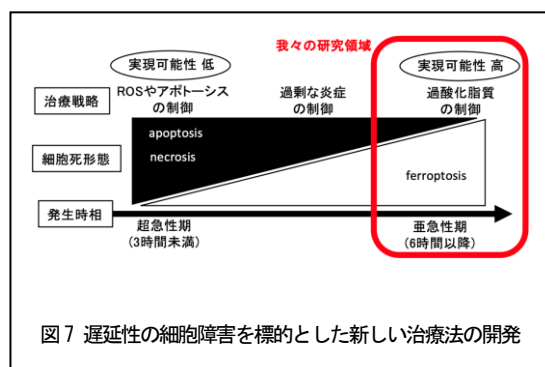
MRP1依存性のグルタチオン放出に着目し、MRP1阻害剤による細胞内グルタチオン濃度の維持がフェロトーシスの抑制に有効であることを解明した。また、GPx4活性の障害は、酸化脂質の除去効率を低下させることにより、フェロトーシスを引き起こすことが報告されている²⁵⁾。心筋梗塞は、GPx4活性の障害を誘発し、虚血の24時間後にフェロトーシスを誘導する²⁶⁾。したがって、細胞内のGSH保持によるGPx4活性の維持とGPx4タンパク質の存在量は、脂質過酸化を防止する2つの重要なメカニズムである。

水素ガスは、新しいタイプの抗酸化物質として作用し、細胞を酸化ストレスから守る現象が報告されてきた²⁷⁾。水素は、ヒドロキシラジカルを選択的に消去するだけではなく、連鎖的脂質過酸化反応を抑制する効果があることも報告された^{28,29)}。さらに、我々は、水素ガスの効果を検証した二重盲検無作為化比較試験で、心筋梗塞に対する発症の数時間後から水素ガスの吸入投与を開始しても、長期の心機能低下を抑制したことを報告した²⁾。つまり、水素ガスは、IR数時間後からの投与であっても、臓器障害の進行を抑制していることが示唆される。これまでに我々がおこなってきたマウス・ラットの研究を踏まえると、虚血再灌流障害で持続的にグルタチオンが細胞外に放出され、細胞内GPX4活性が落ちても、水素ガスの再灌流後からの投与が、酸化脂質の生成を抑え、フェロトーシスが関与する遅延相の細胞死を抑制している可能性が示唆される。しかし、水素ガスは、無触媒の生体内条件下では、酸素ガスを含むいかなる生体化合物とも反応しない、反応性に乏しい物質で、生体内における有機触媒の存在が示唆されてきたが、その具体的な機序は不明である。

本研究では、脳や心臓に豊富に存在する多価不飽和脂肪酸をターゲットとする、IR障害後の遅延相(6時間以降)に生じる連鎖的脂質過酸化反応に注目した。連鎖的脂質過酸化反応は、ラジカル存在に加え、Fe(鉄)やヘム(鉄ポリフィリン)が重要な役割を担っている。鉄、特にヘムは、酸素ガスの有機触媒としての役割を持っており、水素ガスの有機溶媒としての役割を同時に担っている可能性がある。我々は、これまでの検証結果から、水素ガスがヘムの酸化を抑制する(ヘムの還元状態を維持する)ことで、酸化力の強い鉄(Fe²⁺やヘム)を介した脂質の連鎖的過酸化反応とそれに続く細胞死(フェロトーシス)を抑制し、細胞死や組織障害に抵抗性を示す可能性を考え、さらなる研究をすすめている。

V. 結論

心臓という、代謝産物の分解が急速に進む臓器における正確な代謝の状態の空間的かつ時間的把握を確立するために、マイクロ波によるサンプル処理やマイクロダイアリシス法の開発を進めてきた。これらの方法と、高分解能質量分析を組み合わせることで、虚血再灌流という、代謝変化が瞬時に代わる病態における代謝を正確に評価することができ、そのメカニズムの解明を進めることができた。特に、これまで不明であった、虚血時、再灌流時の代謝産物の放出、遅延相にのみ起こる酸化脂質の蓄積などから、新しい治療標的の同定に成功した。これらの成果を踏まえ、臨床現場で実現可能な治療となりうる薬物または医療機器の開発につなげる研究を継続することが重要である(図7)。



VI. 研究協力者

市原元気・慶應義塾大学・助教

VII. 参考文献

1. Cung TT, Morel O, Cayla G, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015; 373:1021-31.
2. Katsumata Y, Sano F, Abe T, et al. The Effects of Hydrogen Gas Inhalation on Adverse Left Ventricular Remodeling After Percutaneous Coronary Intervention for ST-Elevated Myocardial Infarction - First Pilot Study in Humans. *Circ J*. 2017; 81:940-947.
3. Sugiura Y, Katsumata Y, Sano M, et al. Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. *Sci Rep*. 2016; 32361.
4. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, et al. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312:H60-H67.
5. Ichihara G, Katsumata Y, Sugiura Y, et al. MRP1-Dependent Extracellular Release of Glutathione Induces Cardiomyocyte Ferroptosis After Ischemia-Reperfusion. *Circ Res*. 2023;133:861-876.
6. Pompella A, Corti A. Editorial: the changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Front Pharmacol*. 2015;6:98.
7. Kwon DH, Lee H, Park C, et al. Glutathione Induced Immune-Stimulatory Activity by Promoting M1-Like Macrophages Polarization via Potential ROS Scavenging Capacity. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8.
8. Bailey CP, Figueroa M, Gangadharan A, et al. Scaffolding LSD1 Inhibitors Impair NK Cell Metabolism and Cytotoxic Function Through Depletion of Glutathione. *Front Immunol*. 2020;11:2196.
9. Wang XF, Cynader MS. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem*. 2000;74:1434-1442.
10. Huang SF, Othman A, Koshkin A, et al. Astrocyte glutathione maintains endothelial barrier stability. *Redox Biol*. 2020;34:101576.
11. Angelini G, Gardella S, Ardy M, et al. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:1491-1496.
12. Han L, Hiratake J, Kamiyama A, et al. Design, synthesis, and evaluation of gamma-phosphono diester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*. 2007;46: 1432-1447.
13. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, et al. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 2020;10.
14. Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, et al.

- The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8822-8826.
15. Cole SP. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54:95-117.
 16. Zhang YK, Wang YJ, Gupta P, et al. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *AAPS J*. 2015;17:802-812.
 17. Wu NC, Tong SP, Yang YC, et al. MK-571 attenuates kidney ischemia and reperfusion-induced airway hypersensitivity in rats. *Transplant Proc*. 2014;46:1127-1130.
 18. Mueller CF, Wassmann K, Widder JD, et al. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. *Circulation*. 2008;117:2912-2918.
 19. Jehle J, Muller CFH, Aksoy A, et al. Genetic disruption of multidrug resistance-associated protein 1 improves endothelial function and attenuates atherosclerosis in MRP1(-/-) LDLr(-/-) double knockout mice. *Arch Med Sci*. 2017;13:930-936.
 20. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61:372-385.
 21. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:100-106.
 22. Li JY, Liu SQ, Yao RQ, et al. Novel Insight Into the Fate of Cardiomyocytes in Ischemia-Reperfusion Injury: From Iron Metabolism to Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:799499.
 23. Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:2672-2680.
 24. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, et al. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2016;10:239-247.
 25. Anegawa D, Sugiura Y, Matsuoka Y, et al. Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived alpha-tocopherol. *Commun Biol*. 2021;4:796.
 26. Park TJ, Park JH, Lee GS, et al. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Dis*. 2019;10:835.
 27. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):688-94.
 28. Iuchi K, Nishimaki K, Kamimura N, et al. Molecular hydrogen suppresses free radical induced cell death by mitigating fatty acid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019 Oct;97(10):999-1005.
 29. Ohta S. Direct Targets and Subsequent Pathways for Molecular Hydrogen to Exert Multiple Functions: Focusing on Interventions in Radical Reactions. *Curr Pharm Des*. 2021;27(5):595-609.

非心筋細胞の心不全病態及び多臓器連関における役割の 全貌解明とそれに基づく新規治療法開発

東京大学医学部附属病院循環器内科 特別研究員

小室 仁

I. 緒 言

心不全（HF）の患者数は世界的に増加しており、HFは加齢による死因の中で最も多いものの一つである¹。心肥大は血行力学的過負荷に対する代償反応として形成され、壁応力を減少する。しかし、長期にわたる過負荷は、左室の拡張や線維化などの心筋リモデリングを伴う心機能障害を誘発し、最終的にはHFに至る。カルシウム動態の異常²、アドレナリン受容体の過剰活性化³、アポトーシス⁴、心筋細胞

（CM）におけるDNA損傷^{5,6}など、HFのメカニズムに関する研究は数多くなされているが、HFの複雑な病態生理はまだ完全には解明されていない。

CMは心臓を形成する細胞の20～30%を占めるに過ぎず、70%以上は内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、血液細胞などの非心筋細胞である⁷。このことは、非心筋細胞がHF発症において極めて重要な役割を果たす可能性を示唆している。非心筋細胞の中でも、心臓線維芽細胞（CF）は、CMを含む複数の細胞種と強く相互作用している⁸。しかし、CFは、特に心筋梗塞（MI）後の線維化という観点から主に研究されてきた。CFは心筋梗塞後に活性化され、瘢痕を安定化させるために多くの種類の細胞外マトリックスタンパク質を発現する⁹。著明な線維化は不全心においても観察され¹⁰、左室の硬

さを増加させることによって拡張機能障害に関与していることが報告されているが¹¹、CFがCMに影響を与えるか、あるいは収縮機能障害を引き起こすかどうかは不明である。本研究では、マウスの心臓に圧負荷を与え、単一細胞RNA-seq（scRNA-seq）を行ったところ、不全心においてCFは不均一であり6つのサブグループに分かれることが判明した。その中で心不全期に特異的に出現するCFが存在すること、さらにそのCFにのみ転写因子c-Mycが高発現していることを発見した。そこでこの心不全特異的線維芽細胞におけるc-Mycの役割を明らかにするために、CF特異的c-Myc KOマウスとc-Myc OEマウスを作成した。圧負荷による心不全を誘導したところ、WTマウスに比較してOEマウスにおいて心機能の低下が顕著となり、逆にKOマウスでは心機能の低下が抑制された。次に、c-Mycを発現するこの心不全特異的線維芽細胞が心不全の病態に関与するメカニズムを解明するためにWT shamマウスとWT TACマウス、CF特異的c-Myc KO TACマウスの心臓のRNA-seqを行い、発現変動遺伝子のパスウェイ解析の結果からCFとCMのinteractionが病態に関与していることが示唆された。そこで、RNA-seqのデータとscRNA-seqのデータと合わせて液性因子の絞り込みを行い、Xというケモカインが候補因子として見

つまり、ChIP qPCR や *in vitro* の実験を行うことで c-Myc が X を CF 内で直接のターゲットとして発現を上昇させ CF から分泌させることで、CM に発現する X の受容体に作用して心不全を引き起こすことを示した。

そこで申請者は、上記の結果をヒトの検体（心不全患者）でも検証することとし、さらに、心不全期に CF においてどのようなメカニズムで c-Myc の発現が上昇するのか、また、CF と CM の間での interaction の後、どのようにして心不全の病態に関与するのかなど CF による心不全病態への関与の全貌を解明し、新たな心不全の治療法を開発することを目的とした。

II. 対象・方法

1) ヒトにおける c-MYC-X 経路の検証

これまでマウスで示された、c-Myc-X 経路を介した CF と CM の interaction が心不全の病態に関与することをヒトの心不全患者においても認められることを検証するため、健常者と拡張型心筋症(DCM)患者の心筋生検サンプルを用いて、単核 RNA-seq (snRNA-seq) と単一分子蛍光 In-situ ハイブリダイゼーション (smFISH) を行った。

2) 心臓線維芽細胞において c-Myc を発現する上流機序探索

不全心における CF で c-Myc の発現が上昇するメカニズムとしては、メカニカルストレスや酸化ストレス、アンジオテンシン II やエンドセリンなどの神経体液性因子やサイトカインによるものが考えられる。そこでメカニカルストレスによる影響を見るため、CF を初代培養し、1.5ml チューブに回収後、2000rpm 20 分で遠心して機械的なストレスを与え (Arch Oral Biol. 2016 Oct;70:158-164.)、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。また、低張ストレスで物理的に細胞膜を膨張させる方法 (Adv Sci (Weinh). 2019 Jul 22;6(18):1900865.) でも同様に RNA を回収して遺伝子発現を検証し

た。さらに、酸化ストレスについては H₂O₂、神経体液性因子についてはアンジオテンシン II とエンドセリンを CF に添加し、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。最後に、炎症に関与する細胞が分泌するサイトカインのうち線維芽細胞に作用しうるもので、既報にて c-Myc を発現上昇する可能性あるサイトカインを絞り込み、CF に添加し、その後 RNA を回収して遺伝子発現を検証した。

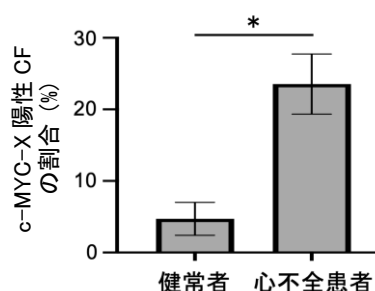
3) 心臓線維芽細胞と心筋細胞の間での interaction 後の経路探索

X の受容体は G タンパク質共役受容体の Gai/o と結合することが知られているので、X は X の受容体を介して Src/Ras/Raf/MEK/ERK 経路を活性化することが予想されたので、リン酸化 ERK の活性化を western blot で検証した。

III. 結果

1) ヒトにおける c-MYC-X 経路の検証

snRNA-seq では、マウスと同様に、ヒトのサンプルでも心不全患者の CF には不均一性を認め、健常者と比較して CF のうち c-MYC を発現している細胞の割合は心不全で増加した。また、smFISH と免疫染色にて c-MYC-X 陽性 CF を確認したところ、心不全の心臓では有意に c-MYC-X 陽性 CF の割合が多かった (図①)。

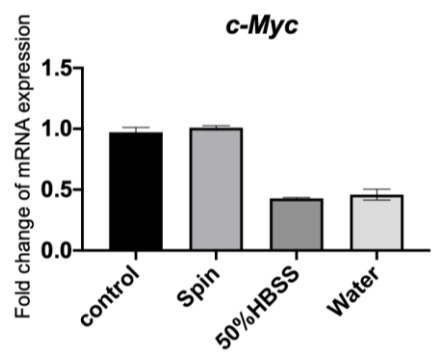


図① smFISH による健常者の心臓組織と心不全患者の心臓組織における c-MYC-X 陽性心臓線維芽細胞の割合評価

2) 心臓線維芽細胞において c-Myc を発現する上流機序探索

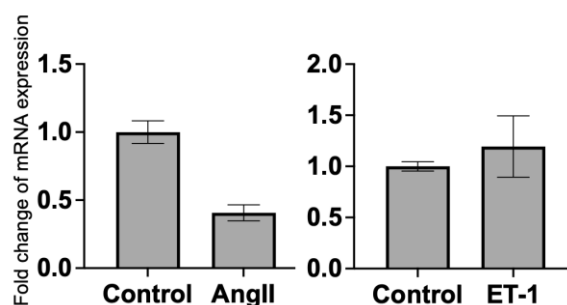
まず、我々は心臓線維芽細胞を遠心する

(Spin)、低張液 (50%HBSS) または水 (Water) で培養することによってメカニカルストレスを与えたが、下図②の通り、c-Myc の発現は control の CF に比べて有意な上昇は認められなかった。



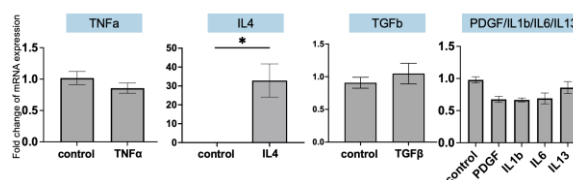
図② 心臓線維芽細胞における c-Myc の発現変化

次に、酸化ストレスを与えるために H₂O₂ 0.6mM を (データなし)、神経体液性因子による影響をみるために Ang II 5uM, ET-1 1uM を CF に添加したところ、下図③の通り、いずれの条件でも有意に c-Myc の発現は上昇しなかった。



図③ 心臓線維芽細胞における c-Myc の発現変化

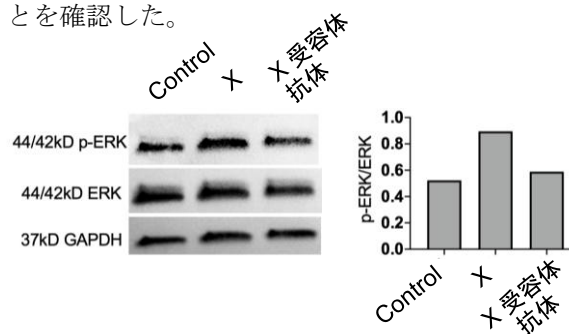
最後に、炎症に関与する細胞が分泌するサイトカインのうち線維芽細胞に作用しうるものとして TNF- α 、TGF- β 、PDGF、IL-4、IL-6、IL-13 を CF に添加したところ、下図④の通り、IL-4 のみ有意に c-Myc の発現を上昇させることがわかった。



図④ 心臓線維芽細胞における c-Myc の発現変化

3) 心臓線維芽細胞と心筋細胞の間での interaction 後の経路探索

新生仔ラットの初代培養心筋細胞に X を添加し 24 時間後にタンパク質を回収したサンプルと、X と共に X の受容体の中和抗体を添加し 24 時間後にタンパク質を回収したサンプルを用いて western blot を行った。結果は、下図⑤の通り、X によって pERK の活性化が起こり、X の受容体の中和抗体でその活性化が抑制されることを確認した。



図⑤ 心筋細胞に X 及び X+X 受容体中和抗体を添加した際の p-ERK/ERK/GAPDH の発現変化

IV. 考 察

ここまでの研究によって、心臓への負荷に反応して心臓線維芽細胞で c-Myc の発現が上昇する結果、発現上昇し分泌された X が心筋細胞の X の受容体に作用して心不全が惹起される。c-Myc の発現上昇の原因としては、何らかの細胞が分泌する IL-4 の可能性が考えられた。

これまで心不全の研究では、心筋細胞に着目して研究が行われることが多かったが、このように不全心では心筋細胞だけではなく、線維芽細胞などの非心筋細胞も相互作用しながら心不全の病態に関与していることが示唆された。今後は、心不全時に IL-4 を分泌している細胞を

同定するとともに、抑制することによって IL-4 の心不全における役割を解明していく予定である。

V. 結 論

IL-4 に刺激を契機として、c-Myc-X 経路を介して心臓線維芽細胞と心筋細胞は相互作用し、心筋細胞内で ERK の活性化が起こり心不全が進行することが示唆された。

VI. 研究協力者

橋本寿之・慶應義塾大学循環器内科・特任講師
勝木俊臣・さいたま市立病院・医長
楠本大・慶應義塾大学循環器内科・専任講師
加藤愛巳・東京大学大学院先端循環器医科学講座・特任助教
候聡志・東京大学大学院先端循環器医科学講座・特任助教
伊藤正道・東京大学循環器内科・助教
片桐美香子・東京大学循環器内科・病院診療医
窪田雅之・東京大学循環器内科・病院診療医
山田臣太郎・ワシントン大学・ポスドク
中村貴裕・平塚市民病院・医長
秋葉庸平・慶應義塾大学循環器内科・助教
クーカズッカ・慶應義塾大学循環器内科
小室薫子・慶應義塾大学循環器内科・助教
木村舞・慶應義塾大学循環器内科・助教
伊藤章吾・久留米大学循環器内科・助教
野村征太郎・東京大学大学院先端循環器医科学講座・特任准教授
小室一成・東京大学大学院先端循環器医科学講座・特任教授
福田恵一・慶應義塾大学循環器内科
湯浅慎介・岡山大学循環器内科・教授
家田真樹・慶應義塾大学循環器内科・教授

VII. 参考文献

1. Braunwald, E. The war against heart failure: The Lancet lecture. *The Lancet* 385, 812–824 (2015).
2. Kho, C., Lee, A. & Hajjar, R. J. Altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling - Targets for heart failure therapy. *Nat Rev Cardiol* 9, 717–733 (2012).
3. Mudd, J. O. & Kass, D. A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919–928 (2008).
4. R. Sanders Williams, M. D. APOPTOSIS AND HEART FAILURE. *N Engl J Med* 341, 759–760 (1999).
5. Higo, T, Naito, A, Sumida, T. *et al.* DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun* 8, 2–5 (2017).
6. Nakada, Y, Nhi Nguyen, N, Xiao, F. *et al.* DNA Damage Response Mediates Pressure Overload-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation* 139, 1237–1239 (2019).
7. Pinto, A. R, Ilinykh, A, Ivey, M. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. *Circ Res* 118, 400–409 (2016).
8. Ko, T, Fujita, K, Nomura, S. *et al.* Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- β -IGFBP7 axis. *Nat Commun* 13, 1–17 (2022).
9. Fu, X, Khalil, H, Kanisicak, O. *et al.* Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *Journal of Clinical Investigation* 128, 2127–2143 (2018).
10. Aghajanian, H, Kimura, T, Rurik, J. *et al.* Targeting cardiac fibrosis with engineered T cells. *Nature* 573, 430–

- 433 (2019).
11. González, A, Schelbert, E. B, Díez, J. *et al.* Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 71, 1696–1706 (2018).

心筋細胞の4倍体化を忠実に再現する iPS細胞心筋症モデルの開発

公益財団法人東京都医学総合研究所 再生医療プロジェクト・プロジェクトリーダー
宮岡 佑一郎

I. 緒言

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) は、従来のマウスなどの実験動物モデルと異なり、ヒト細胞により心筋症を再現できる点で極めて有用である¹。特に、ゲノム編集により遺伝子改変した iPS-CM は、遺伝性心筋症発症の詳細な分子機序の解析を可能にした。しかしながら、一般的に iPS-CM は未熟であることが、iPS 細胞心筋症モデルにおいて常に課題である。iPS-CM は胎児期の心筋細胞に近く、成人になってから発症する心筋症を再現できるかについては、常に議論の対象となっている。生体における心筋細胞の成熟過程においては、思春期に入る頃に、細胞分裂を伴わない DNA 複製を介して、2倍体から4倍体へと染色体数が倍加することが大きな転換点である。成人の心筋細胞は、実にその80%以上が4倍体以上に多倍体化している²。しかし、通常の iPS-CM は約10%しか4倍体化せず、生体の心筋細胞を全く再現できていない。真に心筋症を iPS 細胞を用いてモデルするには、生体の心筋細胞の染色体数を再現する必要があると考えられる。しかしこれまで、小分子やサイトカインの添加など、様々な手法で iPS-CM の成熟度を高める試みがなされてきたが、倍数性を増加させるほどの成熟を促すことはできていない³。

そこで申請者は、2倍体 iPS 細胞同士の融合により、4倍体 iPS 細胞を樹立してから心筋細胞へと分化誘導を行うことで、4倍体 iPS-CM を得ることに世界で初めて成功した (国際特許申請済み PCT/JP2024/080141)。本研究では、この4倍体 iPS-CM がより忠実に成人の心筋細胞を再現し、心筋症モデルとして優れていることを全世界に示すことを目的とした。4倍体 iPS-CM の有用性を明らかにすることで、心筋症の発症機序解析技術を革新するとともに、創薬スクリーニングへの活用も促し、治療薬開発にも貢献したい。

II. 対象・方法

(1) 健常者由来 iPS 細胞同士の融合により樹立された4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の成熟度評価

健常日本人男性由来 iPS 細胞 (WTC11)⁴ の融合により4倍体 iPS 細胞を樹立した。この4倍体 iPS 細胞から分化させた心筋細胞について、2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞との比較を下記の通り実施して、その成熟度を評価した。まず、CardioExcyte 96 (Nanion Technologies) を用いて、心筋細胞の電気抵抗値を測定し、収縮力、収縮速度、心拍数を評価した。次に、カリウムチャネル阻害効果が知られている抗アレルギー薬である Terfenadine を、900 nM まで濃度を調整しながら培地に添加し、電気抵抗値を測定することで心筋細胞の薬剤に対する抵抗性を評価した。

(2) RBM20 R636S ヘテロ点変異を持つ iPS 細胞同士の融合による4倍体 iPS 細胞の樹立

ゲノム編集によって、拡張型心筋症の原因である RBM20 R636S 点変異をヘテロで導入済みの WTC11 iPS 細胞⁵ 同士を融合し、RBM20 R636S 変異をヘテロで有する4倍体 iPS 細胞株を、下記の通り樹立した。まず、RBM20 R636S ヘテロ変異2倍体 iPS 細胞に、レンチウイルスベクターを用いて Puromycin 耐性遺伝子と Blasticidin 耐性遺伝子を、それぞれ導入した株を樹立した。次に両細胞株を、センダイウイルス粒子を用いて融合し、Puromycin と Blasticidin の二重薬剤選択を行い、RBM20 R636S ヘテロ変異4倍体 iPS 細胞を樹立した。

III. 結果

(1) 4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも収縮力が向上していた

通常の2倍体 iPS 細胞である WTC11 と、WTC11 同士を融合して樹立した4倍体 iPS 細胞を、それぞれ心筋細胞へと分化誘導し、その電気抵抗値を測定した。その結果、4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、より

電気抵抗値の変化量が大きく、またその状態がより長期間にわたって持続されることが明らかとなった(図1A, B)。生体心筋細胞も成熟に伴って収縮力が向上するため、4倍体iPS細胞由来心筋細胞の方がより成熟しているという、期待通りの結果が得られた。

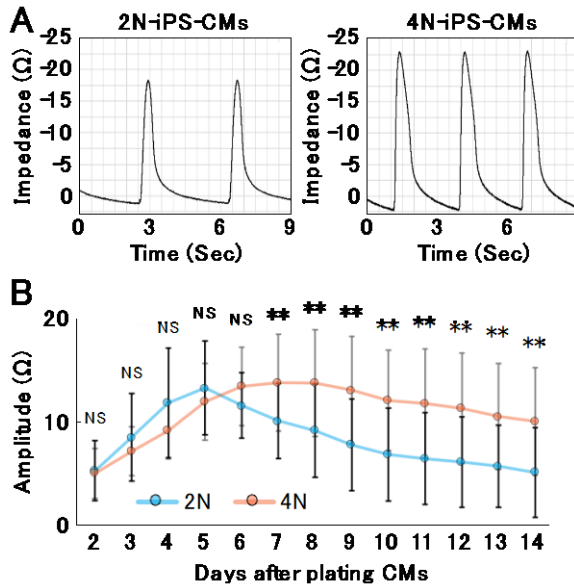


図1. 2倍体および4倍体iPS細胞由来心筋細胞の電気抵抗値
(A) 2倍体iPS細胞由来心筋細胞(2N-iPS-CMs)と4倍体iPS細胞由来心筋細胞(4N-iPS-CMs)の電気抵抗値の時間変化。細胞を電気抵抗値測定用プレートに播種してから、7日後の典型的な波形。4N-iPS-CMsの方が、電気抵抗値の振幅が大きく、より強い収縮力を持つことが明らかとなった。(B) 電気抵抗値の細胞播種後の経時変化。播種後6日目までは、2倍体および4倍体iPS細胞由来心筋細胞の間に有意な差はないが、播種後7日後から4倍体iPS細胞由来心筋細胞の方が、より強い収縮力を維持することが明らかとなった(NS: not significant, $P>0.05$; $^{**}P<0.01$ determined by Student's t-test, $n=15$ for 2N-iPS-CMs, $n=11$ for 4N-iPS-CMs)。

(2) 4倍体iPS細胞由来心筋細胞は、2倍体iPS細胞由来心筋細胞よりも収縮速度が向上していた

次に、電気抵抗値の収縮に伴う変化の速度を計算したところ、4倍体iPS細胞由来心筋細胞の方が、2倍体iPS細胞由来心筋細胞よりも、有意に速い収縮を示すことが明らかとなった。その傾向は、細胞を電気抵抗値測定用プレートに播種後5日目から観察され、その後も維持された(図2A)。一方で、弛緩速度については2倍体および4倍体iPS細胞由来心筋細胞の間に有意な差は観察されなかった(図2B)。その結果、両者の電気抵抗値の波形を重ね合わせると、異なる形状となることが明確に示された(図2C)。これは、4倍体iPS細胞由来心筋細胞が、より成熟した心筋細胞

としての特徴を示すことを端的に表している。

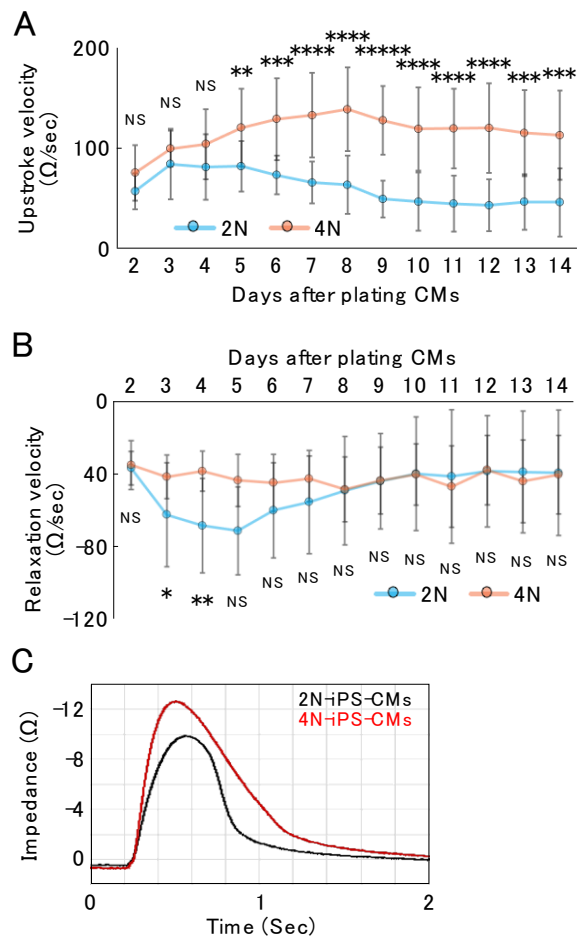


図2. iPS細胞由来心筋細胞の収縮・弛緩速度

(A) 2倍体iPS細胞由来心筋細胞(2N-iPS-CMs)と4倍体iPS細胞由来心筋細胞(4N-iPS-CMs)の収縮速度。細胞を電気抵抗値測定用プレートに播種してから、14日間収縮速度を電気抵抗値変化から測定した。4N-iPS-CMsの方が、より速く収縮することが明らかとなった。(B) 2倍体iPS細胞由来心筋細胞(2N-iPS-CMs)と4倍体iPS細胞由来心筋細胞(4N-iPS-CMs)の弛緩速度。両者の間で弛緩速度にはほとんど有意な差がないことが明らかとなった(NS: not significant, $P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$, $^{*****}P<0.00001$ determined by Student's t-test, $n=15$ for 2N-iPS-CMs, $n=11$ for 4N-iPS-CMs for both A and B). (C) 2倍体iPS細胞由来心筋細胞(2N-iPS-CMs, 黒)と4倍体iPS細胞由来心筋細胞(4N-iPS-CMs, 赤)の典型的な電気抵抗値波形の重ね合わせ。収縮力と収縮速度の相違により、異なる波形となった。

(3) 4倍体iPS細胞由来心筋細胞は、2倍体iPS細胞由来心筋細胞と比較して、より強い心毒性に対する対抗性を示した

心筋細胞は、成熟とともに心毒性を持つ薬剤などにより強い抵抗性を示す⁶。また、iPS細胞由来心筋細胞を創薬に活用するためには、心毒性を持つ薬剤に対

する反応性は非常に重要な特性となる。そこで、2倍体および4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞に、カリウムチャネル阻害効果を持つ Terfenadine を異なる濃度で添加し、電気抵抗値測定によって拍動に対する影響を評価した。

その結果、2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、500 nM の Terfenadine 添加により、拍動を完全に停止したが、4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、900 nM の Terfenadine 存在下でも拍動を維持することが明らかとなった(図3)。この結果は、心毒性への抵抗性という観点でも、期待した通りに4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、より成熟した特性を持つことを示している。

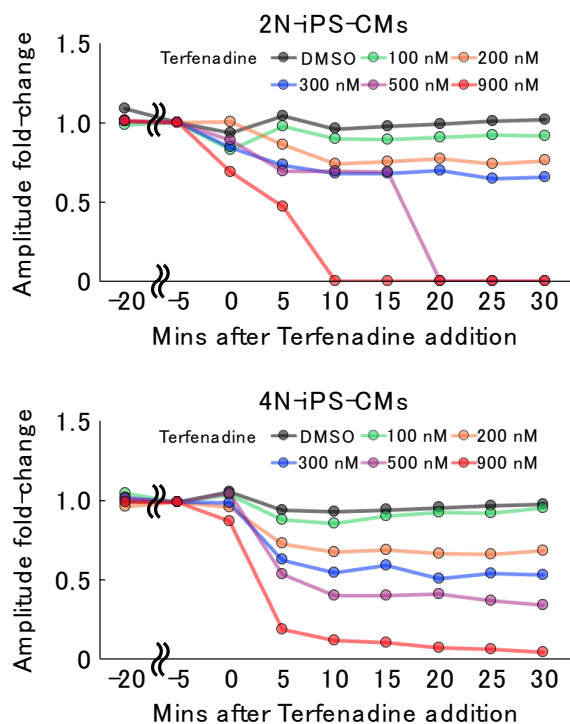


図3. iPS 細胞由来心筋細胞の心毒性に対する抵抗性評価
2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞 (2N-iPS-CMs) と4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞 (4N-iPS-CMs) の Terfenadine 添加に対する拍動の反応性評価。Terfenadine 添加前の電気抵抗値の振幅を 1 として、100~900 nM の Terfenadine を添加後 30 分までに振幅がどの程度減弱するかを fold-change で示す。2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞では、500, 900 nM Terfenadine 添加で拍動が完全に停止した。一方で4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、900 nM Terfenadine 存在下でも拍動を維持した。典型的な 1 例を 2倍体および4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞のそれぞれに示すが、独立して実施した他の 2例ずつについても同様の結果が得られた。

(4) RBM20 R636S ヘテロ変異を持つ4倍体 iPS 細胞の樹立と心筋細胞への分化誘導に成功した

上記の通り従来の2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも成熟した特徴を示す4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞を、ゲノム編集 iPS 細胞に活用して、遺伝性心筋症モデルとして活用するために、RBM20 R636S ヘテロ点変異を持つ2倍体 iPS 細胞⁵の融合を実施した。その結果、期待通りに R636S 変異をヘテロで有する4倍体 WTC11 iPS 細胞の樹立に成功した(図4)。さらに、樹立した4倍体 iPS 細胞を、Wnt シグナルを小分子で調整する一般的な分化誘導プロトコル⁷で心筋細胞に分化させたところ、拍動する心筋細胞を得ることができた。現在、分化誘導プロトコルの最適化を進めている。

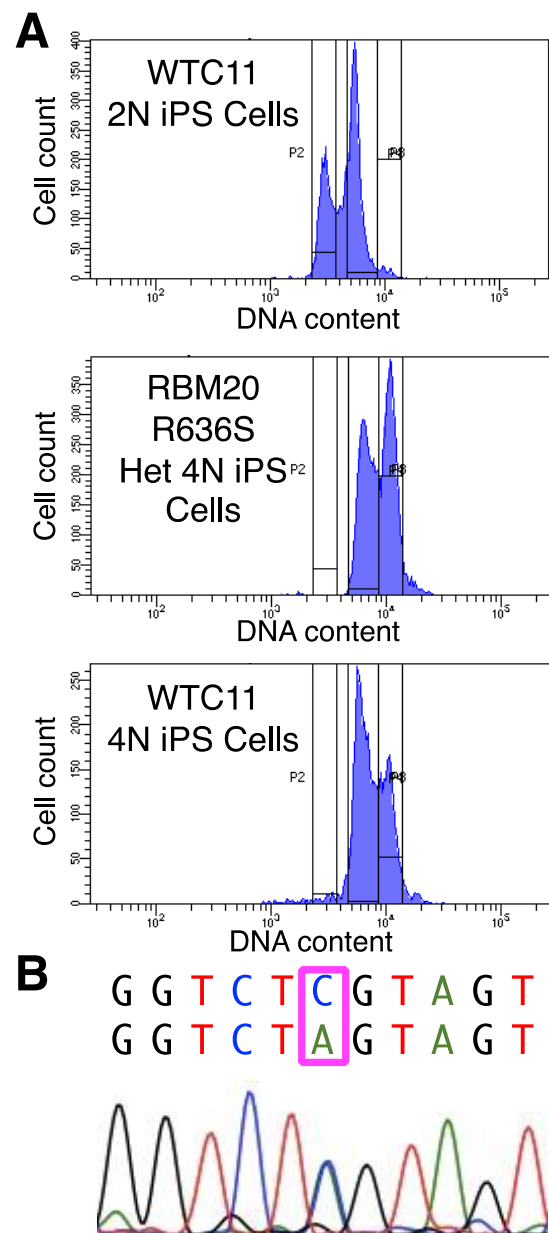


図4. RBM20 R636S ヘテロ変異4倍体 iPS 細胞の樹立
(A) フローサイトメトリーによる DNA 量の比較。通常の2倍体 iPS

細胞 (WTC11 2N iPS Cells) と、樹立済みの4倍体 iPS 細胞 (WTC11 4N iPS Cells) を比較対象として、RBM20 R636S 変異をヘテロで持つ4倍体 iPS 細胞 (RBM20 R636S Het 4N iPS Cells) の DNA 量を比較した。その結果、RBM20 R636S 変異をヘテロで持つ4倍体 WTC11 細胞が樹立できたことが確認できた。(B) 単離した4倍体 RBM20 R636S Het 4N iPS 細胞の標的領域の Sanger sequencing の結果。確かに、C から A の点変異がヘテロで導入されていた。

IV. 考 察

期待した通り、4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞は、2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも強く、速い収縮を示し、より成熟した特徴を持っていた。本研究開始前に実施済みであった RNAseq による網羅的な遺伝子発現解析から、サルコメア関連遺伝子やイオンチャネル遺伝子の発現を2倍体および4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の間で比較したが、明瞭な差は認めることができなかった。それにも拘らず、このように収縮様式に明確な差が生じたことは予想外であった。既に観察しているミトコンドリア量の増加によって、収縮に必要な ATP が4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞においてより多く供給されていることが原因の1つである可能性が考えられる。別の可能性として、mRNA レベルでは発現に有意な差が認められなくとも、タンパク質レベルでは、サルコメア関連遺伝子やイオンチャネル遺伝子の発現量が変化している可能性も考えられる。したがって、現在定量的かつ網羅的な質量分析により、2倍体および4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞において発現するタンパク質の解析を進めている。この解析によって、観察された倍数性に依存した収縮の様式の変化が生じる機構を明らかにしていきたい。

収縮様式の相違に加えて、Terfenadine に対する抵抗性に、2倍体および4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の間で差が認められた。生体心筋細胞の特性から期待された通り、4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の方が、成熟した心筋細胞の特徴であるより強い抵抗性を示した。現在のところ、この抵抗性の相違が生じる分子機構も明らかとはなっていない。上記の通り、RNAseq の結果からは、イオンチャネルなどの mRNA レベルの発現には倍数性による相違が認められない。今後実施する質量分析によるタンパク質レベルの発現解析により、4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の抵抗性を生み出す分子機構を明らかにしたい。

また、遺伝性拡張型心筋症の4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞モデルを作製するために、RBM20 R636S 点変異を持つ2倍体 iPS 細胞同士を融合し、4倍体 iPS

細胞の樹立に成功した。現在は、この4倍体 iPS 細胞の心筋細胞分化を進めている。RBM20 R636S ヘテロ変異4倍体 iPS 細胞由来心筋細胞が作製できた段階で、RBM20 R636S ヘテロ変異2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞の表現型との比較を行う。具体的には、RNAseq による遺伝子発現様式およびスプライシング様式の比較、本研究で実施したものと同様の電気抵抗値の測定による収縮様式の比較、さらに Terfenadine などの心毒性を持つ薬剤への抵抗性の比較などを実施する。これらの解析を通して、4倍体 iPS 細胞の樹立とその心筋細胞分化によって、従来の2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞に比較して、より忠実に生体心臓を再現する優れた疾患モデルが作製できることを示したい。

V. 結 論

細胞融合により樹立した4倍体 iPS 細胞から分化させた心筋細胞は、従来の2倍体 iPS 細胞由来心筋細胞よりも成熟した心筋細胞としての特徴を示した。ゲノム編集により心疾患の原因となる変異を導入した iPS 細胞から4倍体 iPS 細胞を樹立し、心筋細胞を作製することによって、これまでにない、生体をより忠実に反映する疾患モデルが確立できると期待される。

VI. 研究協力者

中島一徹・東京都医学総合研究所・教育研修生 (東京科学大学大学院生)

嶋根三好・Nanion Technologies・社員

Grace Holmstrom・Pitzer College・学部生

VII. 参考文献

- 1) Clancy CE, Santana LF. Advances in induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes: technological breakthroughs, key discoveries and new applications. J Physiol 2024;602:3871-3892.
- 2) Derks W, Bergmann O. Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration? Circ Res 2020;126:552-565.
- 3) Ahmed RE, Anzai T, Chanthra N, et al. A Brief Review of Current Maturation Methods for Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. Front Cell Dev Biol 2020;8:178.
- 4) Miyaoka Y, Chan AH, Judge LM, et al.

Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection. *Nat Methods* 2014;11: 291-293.

- 5) Fenix AM, Miyaoka Y, Bertero A, et al. Gain-of-function cardiomyopathic mutations in RBM20 rewire splicing regulation and re-distribute ribonucleoprotein granules within processing bodies. *Nat Commun* 2021;12:6324.
- 6) da Rocha AM, Campbell K, Mironov S, et al. hiPSC-CM Monolayer Maturation State Determines Drug Responsiveness in High Throughput Pro-Arrhythmia Screen. *Sci Rep* 2017;7:13834.
- 7) Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E1848-1857.

GPR68 に着目した新規心不全治療薬シーズの導出

—CryoEM を活用した電子レベルの分子機構解析を目指して—

九州大学大学院薬学研究院 薬物動態学分野 助教
吉田 優哉

I. 緒言

G protein-coupled receptor 68 (GPR68)は近年、酸性条件および圧力（せん断応力）で活性化することが解明した G タンパク質共役型受容体である (1,2)。生理機能への関与は長らく不明であったが、我々は単球に発現する GPR68 が慢性腎臓病 (CKD)性心不全の悪化に寄与すること、およびこの受容体の機能抑制が CKD 性心不全の予後を改善することを明らかにした (3)。特に心臓は常に拍動し圧力が大きく変化する臓器であるため、単球GPR68 が圧力を介して心不全全般に大きく寄与している可能性がある。しかしながら GPR68 には生理リガンドが存在しないことが示唆されており (1,2)、GPR68 の明確な分子活性化機構は解明されていない。一方、我々は以前の研究において、GPR68 依存的な炎症を阻害する化合物ホモハリントニン (HHT)を同定した (4)。しかしながら HHT の心不全全般への効果、およびその詳細な作用様式は殆ど未知である。そこで本研究では①HHT の心不全への効果、②HHT の作用様式の解析、③HHT の構造最適化、3 点について検討を行った。本報告書では各項目の進捗状況を述べる。

II. 対象・方法

実験動物

実験には自由摂食摂水、明暗周期条件下（明期 7:00-19:00）で飼育した ICR 雄性野生型 (WT) マウスを用いた。

CKD モデルマウスの作製

ICR 雄性マウスについて、7 週齢時に左腎 2/3 摘出、8 週齢時に右腎全摘出を行い、その後 8 週間飼育した 16 週齢マウスを CKD モデルマウス (5/6Nx マウス) として使用した。

肺高血圧症性心不全モデルマウスの作製

ICR 雄性マウスについて、7 週齢時より 5 週間、10%酸素条件下にて飼育したマウスを肺高血圧症モデルマウスとして使用した。

タンパク質の精製とクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) データ取得

HEK293 細胞で発現させた FLAG-GPR68 タンパク質は FLAG タグのアフィニティ精製および Ä KTA pure™ micro (Cytiva) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。データ取得には九州大学グリーンファルマ構造解析センターが所有する K3 検出器 (Gatan) と CRYO ARM 200 (JEOL) を用いた。

III. 結果

CKD モデルマウスに対する HHT の効果

5/6Nx マウスに対し、飲水中に溶解させた HHT を $0.4 \mu\text{mol/kg/day}$ にて 6 週間投与を行った。その結果、溶媒投与群では認められた心臓の線維化、左心駆出率の低下、および僧帽弁 E/A 比の低下が、HHT 投与群では有意に抑制された (図 1)。

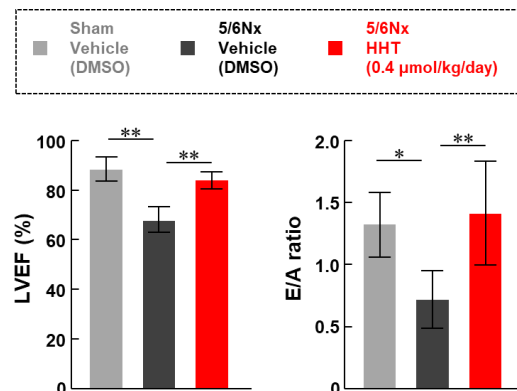


図1 CKD モデルマウス (5/6Nx)に HHT を投与した際の左心駆出率 (LVEF)および僧帽弁 E/A 比 (E/A ratio)。n=6, **;*P*<0.01.

肺高血圧症性心不全モデルマウスに対する HHT の効果

10%酸素飼育マウスに対し、飲水中に溶解させた HHT を 0.4 μ mol/kg/day にて 6 週間投与を行った。その結果、CKD モデルマウスと同様に、溶媒投与群では認められた心臓の線維化、左心駆出率の低下、および僧帽弁 E/A 比の上昇が、HHT 投与群では有意に抑制された (図2)。

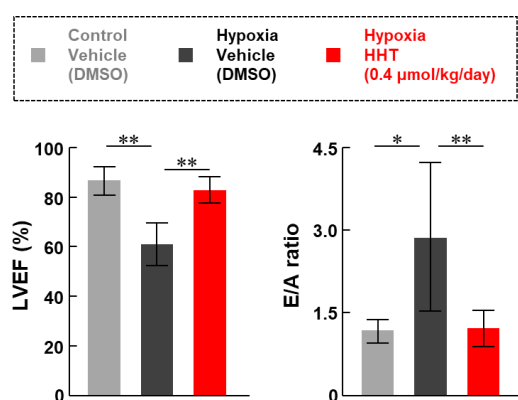


図2 肺高血圧症モデルマウス (Hypoxia)に HHT を投与した際の左心駆出率 (LVEF)および僧帽弁 E/A 比 (E/A ratio)。n=6, **;*P*<0.01, *;*P*<0.05.

HHT の構造最適化に関する検討

HHT の構造最適化にあたり、まず、HHT の代謝物が薬効を有するか否かを検討した。RAW264.7 への曝露実験を実施した結果、いずれの代謝物も GPR68 阻害活性を有していないことが示唆された (図3)。そこで現在、生体内でエステラーゼ等による代謝を受けない誘導体の開発を進行中である。

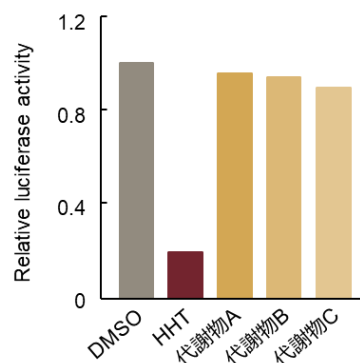


図3 HHT および代謝物を RAW264.7 に曝露した際の

GPR68 活性。化学発光による GPR68 活性の評価は以前の報告 (4) と同様に行った。n=3.

HHT の作用様式解析に関する検討

HHT の作用様式解析にあたり、GPR68 がどのようにして圧力 (せん断応力) を感知しているかを構造レベルで解析することを試みることとした。クライオ電子顕微鏡に用いるための高純度の GPR68 タンパク質を精製するため、HEK293 細胞に FLAG-GPR68 を発現する Tet-On システムを構築した。この細胞から FLAG によるアフィニティー精製とゲルろ過クロマトグラフィーにより、高純度の GPR68 タンパク質の生成に成功した。圧力感知時の電子密度解析を解析する手法および詳細な現在の状況については進行中のため割愛させて頂くが、解析に必要な試料の精製が鋭意進行中である。

IV. 考 察

GPR68 阻害剤である HHT が CKD のみでなく肺高血圧症に対しても効果を示したことから、GPR68 が肺高血圧症の病態にも深く関与していることが示唆された。そこで現在、GPR68 と肺高血圧症との関係についてより詳細な解析を進行中である。また、HHT の代謝物を用いた検討により、GPR68 阻害に必要なセファロタキサン骨格上の置換基のいくつか判明したと考えられる。加えて現在進行中の GPR68 の構造解析が進めば、HHT の構造最適化に必要なツールが揃う見込みである。

V. 結 論

本研究助成により、GPR68 阻害剤として開発した HHT の心不全に対する有効性を示すことが出来た。加えて、HHT の構造最適化のための Cryo-EM による GPR68 構造解析に必要な各種試料の調整が進行した。頂いた助成によって得られたこれらの成果を基に、画期的な心不全治療薬の導出を実現する予定である。

VI. 研究協力者

大戸茂弘・九州大学大学院薬学研究院・特命教授
松永直哉・九州大学大学院薬学研究院・教授
谷原智仁・九州大学大学院薬学研究院・大学院生
福岡航平・九州大学大学院薬学研究院・大学院生

VII. 参考文献

- 1) Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2003;425(6953):93-98.
- 2) Xu J, Mathur J, Vessi res E, et al. GPR68 Senses Flow and Is Essential for Vascular Physiology. *Cell*. 2018;173(3):762-775.
- 3) Yoshida Y, Matsunaga N, Nakao T, et al. Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):2783.
- 4) Yoshida Y, Fukuoka K, Sakugawa M, et al. Inhibition of G protein-coupled receptor 68 using homoharringtonine attenuates chronic kidney disease-associated cardiac impairment. *Transl Res*. 2024;269:31-46.