The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	カルシウムシグナルを標的とした新規心不全治療の確立に向けた非臨床研究
Author(s)	森原, 啓文
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61680
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　森原　啓文　）	
論文題名	カルシウムシグナルを標的とした新規心不全治療の確立に向けた非臨床研究

論文内容の要旨

筋収縮、神経伝達、分泌、細胞肥大、細胞増殖、細胞死など多くの生体反応は、カルシウムイオン（Ca^{2+}）に依存した細胞内シグナリングを介して起こっている。心臓において、Ca^{2+} は心筋の収縮・弛緩を制御するが、心筋細胞内の Ca^{2+} が過度に上昇することやカルシウムオシレーションに異常を来たすことにより収縮不全となり、その後心不全に至る。現在、我が国において心疾患は死因の第二位となっており、新規心不全治療の確立が求められている。そこで本研究では、心臓におけるカルシウムシグナルを標的とした新規心不全治療の基盤構築を目指した。

近年、新規医薬品の開発に目を向けると、低分子医薬や抗体医薬に続く次世代の医薬品として、核酸医薬に大きな期待が寄せられている。核酸医薬は、塩基配列や構造が既知の核酸やタンパク質を標的とするため、作用機序が明確であり、従来の医薬品よりも副作用が少ないとされる。そこで本研究では、心臓における核酸医薬の効果を検討した。

心臓では、細胞内 Ca^{2+} が心筋細胞の収縮・弛緩の制御因子となっており、この細胞内 Ca^{2+} は、主として筋小胞体内の Ca^{2+} の量に依存する。筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みに関しては、sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA2a) が担っており、本検討では、この SERCA2a を抑制的に制御している phospholamban (PLN) と呼ばれる筋小胞体膜タンパク質に焦点を当てた。不全心筋において、PLN 発現の異常により SERCA2a の Ca^{2+} 取り込み能が低下するため、PLN を治療標的とすることは有効であると想起される。そこで、PLN の発現をアンチセンス法により mRNA レベルで抑制することによって、心不全病態時の心機能が改善されるのではないかと考えた。

PLN を標的とした antisense oligonucleotides (ASO) を作製する際、locked nucleic acid (LNA) による修飾を試みた。LNA は、糖鎖の2’位と4’位を架橋化することで、従来よりも標的とする RNA に対しての結合親和性が向上した人工核酸である。まず、PLN を標的とした LNA-ASO において、最も抑制効率の良いものを得るために、PLN を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、PLN-antisense LNA (PLN-AS) の in vitro におけるスクリーニングを行った。その結果、最も高い発現抑制効果を示した LNA-ASO (以下 PLN-AS-1) を以後の検討では用いた。さらに、この PLN-AS-1 の配列をスクランブルにしたものを、scrambled-antisense LNA (scr-LNA) とし、この scr-LNA が PLN のタンパク質発現に影響を及ぼさないことも同時に確認した。次に、in vitro におけるスクリーニングによって得られた PLN-AS-1 が、in vivo においても抑制効果を示すかどうかを確認するために、C57BL/6 マウス尾静脈より hydrodynamic 法を用いて PLN-AS-1 を単回投与し、投与7日後まで経時的に PLN のタンパク質発現量を確認した。その結果、PLN-AS-1 投与によって経時的な発現抑制が見られ、in vivo においても、PLN-AS-1 が有意に PLN タンパク質を抑制していることが確認された。

そこで次に、PLN を標的とした LNA-ASO が心不全病態に対して効果を及ぼすか検討した。マウス心不全モデルとして、C57BL/6 マウスに横行大動脈縮窄術 (TAC) を施した圧負荷モデルを使用した。TAC を施して3週間後に心エコーを行い、scr-LNA もしくは PLN-AS-1 を尾静脈より投与した。投与1週間後に再度心エコーを行い、心収縮力の指標となる fractional shortening (FS) を比較した。投与前後の FS 変化は、PLN-AS-1 投与群で有意な上昇を確認した。さらに、投与前後での FS の変化を2群間で比較した時に、PLN-AS-1 投与群では、FS が投与前後で6.5% 増加したのに対し、scr-LNA 投与群では、4.0% 減少していた。これらの結果から、PLN を標的とした LNA-ASO がマウス圧負荷モデルの心収縮機能障害を改善することが示された。

心臓において、心筋の収縮・弛緩以外にカルシウムシグナリングが関与した現象として、心筋細胞死が挙げられる。心臓組織が虚血や圧負荷等のストレスを受けると、ミトコンドリア電子伝達系の機能不全や好中球などの浸潤細胞集積により、心臓組織において活性酸素種 (ROS) が過剰に産生される。ストレス刺激や病態時において過剰に産生された ROS は、生体内の機能や恒常性維持に重要である酵素や細胞膜、DNA 等に障害を与える。さらに ROS はカルシウムシグナリングの制御にも大きく関与しており、両者の関係性は密接である。不全心筋において ROS 産生量が増加していること、さらに ROS によって心筋細胞死が惹起され、心不全症状を悪化させることからも、心不全の病態形成に

おいて ROS による心筋細胞死が大きく寄与していることがわかる。そこで、本研究では、ROS によって誘導される心筋細胞死に焦点を当て、細胞死が誘導される際に生じる細胞内外でのカルシウム動態の変化を検討し、その分子機構の解明を目的として研究を進めた。

新生仔ラット培養心筋細胞において、ROS の一種である H_2O_2 を用いて、ROS 誘導性心筋細胞死の系を構築した。100 μM の H_2O_2 で4時間刺激することによって、心筋細胞死が惹起され、さらに、刺激後10-15分で細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が見られた。また、細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM によって、H_2O_2 による心筋細胞死や細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が抑制されたことから、H_2O_2 誘導性心筋細胞死において、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与していることが示唆された。次に、細胞外 Ca^{2+} を除去した条件下で、H_2O_2 刺激後の細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られず、H_2O_2 は心筋細胞外からの過剰な Ca^{2+} 流入を誘導することが明らかとなった。

これらの結果を受け、H_2O_2 により誘導される心筋細胞死と細胞外からの Ca^{2+} 流入に寄与する分子を明らかにするため、心筋細胞における主要な Ca^{2+} 流入経路に対する阻害薬を用いて検討を行った。その結果、イノシトール三リン酸受容体（IP_3R）の阻害薬である 2-APB によって、H_2O_2 誘導性心筋細胞死と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が有意に抑制された。しかし、IP_3R 選択的阻害薬では、2-APB で見られた濃度依存的な心筋細胞死抑制効果は確認されず、さらに細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制も示されなかった。また、2-APB は、IP_3R 以外にも transient receptor potential（TRP）チャネルを阻害することが報告されているが、2-APB 感受性 TRP チャネルに対する特異的な阻害薬を用いた際も、H_2O_2 誘導性心筋細胞死は抑制されなかった。

H_2O_2 誘導性心筋細胞死において、2-APB が従来阻害するとされている Ca^{2+} チャネルの関与が確認できなかったため、H_2O_2 に対する 2-APB の作用に焦点を当て検討を行った。細胞浸透性蛍光プローブ DCFH-DA を用いて、心筋細胞内の ROS を測定した結果、H_2O_2 刺激による細胞内 ROS の上昇が 2-APB によって有意に抑制された。そこで、核磁気共鳴装置（NMR）を用いて、2-APB と H_2O_2 の反応性を検討した。その結果、2-APB と H_2O_2 を混合して5分後に得られた NMR チャートで変化が見られ、両者の間に化学的な反応が生じたと考えられた。さらに、薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いた検討により、2-APB が H_2O_2 と反応し、フェノールに酸化されたことが示唆された。これらの検討から、2-APB 自体が H_2O_2 と直接的な反応性を示し、それ自身が強力な抗酸化剤であることが示された。

最後に、マウス虚血再灌流モデルに 2-APB を投与して、虚血再灌流傷害が抑制されるかを検討した。C57BL/6 マウス心臓の左冠動脈前下行枝を30分間結紮し虚血状態に陥らせた後、結紮を解除し再灌流状態にした。2-APB は、再灌流直前に尾静脈より単回静脈内投与した。その結果、再灌流24時間後において、2-APB の投与により梗塞サイズが有意に減少していた。さらに、ROS の一種であるスーパーオキサイド（O_2^-）の産生を評価するために、DHE 染色を行った結果、2-APB は虚血再灌流によって産生される O_2^- を抑制していた。これらの結果から、2-APB は、虚血再灌流時に産生される ROS を抑制し、虚血再灌流傷害を抑制することが示唆された。

本検討において、PLN を標的とした LNA-ASO が、PLN タンパク質の発現を抑制し、マウス圧負荷モデルの心収縮機能障害を改善した。さらに、過剰な細胞内 Ca^{2+} 流入を誘導し、心筋細胞死を惹起する H_2O_2 と反応し、抗酸化作用を有する 2-APB が、マウス虚血再灌流モデルの心傷害を抑制した。今回、LNA を用いて細胞内カルシウムハンドリングに関わる分子と、さらに上流でカルシウム動態の異常を誘導する ROS を治療標的とすることが、有効な心不全治療戦略になる可能性を本研究が提示した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　森原　啓文　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	藤尾　慈
	副 査	教授	土井　健史
	副 査	教授	橋本　均

論文審査の結果の要旨

慢性心不全は心収縮・弛緩機能の低下を主たる特徴とする疾患であり、現在は神経体液性因子を標的とした薬物治療が主体であるが、依然として5年生存率が50%とその予後は不良である。カルシウムイオンは、心病態において収縮・弛緩を制御するとともに、細胞死や心肥大等の病態と関連する最も重要なセカンドメッセンジャーであるが、その生物学的多様性を司る機構の解明は、心臓分子生物学における残された大きな課題のひとつであり、未だにこれを標的とした治療が確立されるに至っていない。本研究において、カルシウムイオンの制御する心病態を標的とした新規の治療法の基盤の確立を試みた。心収縮を標的として筋小胞体のカルシウムポンプの調節分子であるホスホランバンに対する核酸医薬を用いた心不全の治療の確立を目指して、細胞実験系において至適配列を同定したlocked nucleic acid のアンチセンス核酸の心機能改善作用を明らかとした。一方、活性酸素が細胞外からのカルシウム流入を誘導し細胞死を惹起する事を明らかとし、かかるカルシウム流入を抑制する化合物の探索を行った。その中で、マルチチャネル阻害剤である2-APBが、活性酸素による心筋細胞死を抑制し、マウスにおいても心臓虚血再灌流傷害を抑制する事を見出し、さらにその詳細な機序を明らかとした。

以上、本研究は、心病態におけるカルシウムイオンの多様性を標的とするという斬新なアプローチに基づく治療法を提示しており、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。