

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06709

研究課題名(和文)キマーゼ特異的阻害効果を有する新規核酸製剤の応用

研究課題名(英文)Application of a novel nucleic acid agent for chymase-specific inhibition

研究代表者

高井 真司(TAKAI, Shinji)

大阪医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80288703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キマーゼを特異的に阻害する新規の核酸製剤の心筋梗塞後の心不全に対する効果を検討した。心筋梗塞後に心臓キマーゼ活性は有意に上昇したが、核酸製剤は有意に抑制した。心筋梗塞後に増加した心臓のキマーゼ、TGF- $\alpha$  およびコラーゲンのmRNAレベルは核酸製剤により有意に低下した。心筋梗塞後に低下した心機能も核酸製剤により有意に改善し、死亡率も有意に低下した。キマーゼ特異的阻害核酸製剤が心筋梗塞後の心不全予防に有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞を起こした患者は、心筋梗塞後に心不全に陥っていくが、特異的にキマーゼを阻害する核酸製剤が心筋梗塞直後からの投与でその進行を予防することを示した。この核酸製剤のキマーゼに対する特異性は既存の低分子キマーゼ阻害薬よりも極めて高く、低濃度でも有用であった。核酸製剤は、心筋梗塞後の心不全予防において新しい治療戦略になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of a novel nucleic acid compound that specifically inhibits chymase on heart failure after myocardial infarction. Cardiac chymase activity was significantly increased after myocardial infarction, but it was significantly suppressed by the nucleic acid compound. Cardiac mRNA levels of TGF- $\alpha$  and collagen increased after myocardial infarction were significantly reduced by the nucleic acid compound. Cardiac function reduced after myocardial infarction was also significantly improved by the nucleic acid preparation, and the mortality rate was significantly reduced. The nucleic acid compound with specific chymase inhibition was useful in the prevention of heart failure after myocardial infarction.

研究分野：薬理学

キーワード：キマーゼ 核酸製剤 阻害薬 心筋梗塞 心不全 ハムスター 心機能 線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) キマーゼはアンジオテンシン、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 、Matrix metalloproteinase (MMP)-9 を産生して心血管疾患の病態形成に深く関与することが知られており、心筋梗塞後に心臓のキマーゼが著明に増加してくることを我々は報告してきた。

(2) 本研究で用いた核酸製剤は、抗体と同様に蛋白に結合するが、抗体で見られるようなアナフィラキシー反応を起こす可能性が低いことが知られており、キマーゼを阻害するのに従来使用されてきたペプチド性阻害物質や低分子化合物に比べて極めてキマーゼに対する特異性が高く、他のキマーゼ類似酵素に対する阻害活性がほとんどないことが予想された。しかし、in vivo での効力については不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究で用いる新規核酸製剤のキマーゼに対する阻害活性を明らかにするため、in vitro および in vivo におけるキマーゼ阻害活性を測定する。

(2) 心筋梗塞モデルに使用する核酸製剤の濃度を決定するため、核酸製剤による心臓キマーゼに対する阻害活性およびその関連因子に対する影響を解析する。

(3) 核酸製剤による心筋梗塞後の心機能に対する影響と死亡率に対する影響を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 核酸製剤の阻害活性

我々が以前に報告した方法に従って精製したハムスターのキマーゼを用いて 62.5、125、250、500、1000、2000 pM の濃度の核酸製剤のキマーゼに対する阻害率を測定した。In vivo における核酸製剤投与後の血中濃度を測定するため、1、3、10 mg/kg の核酸製剤をハムスター皮下に投与したのち 24 時間の時点で採血を行い、血中の核酸製剤濃度を測定した。

#### (2) ハムスター心筋梗塞モデル

ハムスターの心筋梗塞モデルは、我々が以前に報告した方法に従って麻酔下において左冠動脈を結紮することにより作製した。

#### (3) 心筋梗塞モデルに対して使用する核酸製剤投与量の検討

心筋梗塞後の心不全に対する核酸製剤の濃度による影響を解析するため、心筋梗塞を起こす 1 日前より 1、3、10 mg/kg の核酸製剤またはプラセボ（生理食塩水）を皮下投与した。心筋梗塞後 1 日および 3 日の時点で心エコーによる左室駆出率（EF）と左室流入血流速波形（E 波）/ 拡張早期最大流速（A 波）（E/A）を測定した。心機能測定後、心臓を摘出して一部をキマーゼ活性測定と心臓線維化関連因子の遺伝子発現量測定に使い、残りの組織をカルノア固定し、その心臓組織切片を用いてキマーゼの発現細胞である肥満細胞の染色とキマーゼの免疫染色を行った。

#### (4) 心筋梗塞後の心機能および生存率に対する核酸製剤の影響

心筋梗塞後 1 日の時点で心エコーにて EF および E/A を測定したのち、核酸製剤群およびプラセボ群に差がないように均等に分けたのち、1 mg/kg の核酸製剤またはプラセボ（生理食塩水）の皮下投与を開始して心筋梗塞後 14 日まで 1 日 1 回投与した。心筋梗塞後、経時的（心筋梗塞後 1、3、7、14 日）に体重および心拍数を測定し、血圧は心筋梗塞後 1 日と 14 日に測定した。心筋梗塞後 14 日の血圧測定後、心エコーにて EF および E/A を測定したのち、心臓を摘出してキマーゼ活性と心臓線維化関連因子の遺伝子発現量を測定し、心臓組織切片を用いて梗塞面積率を測定した。また、心筋梗塞後 2 週までの生存率をプラセボと比較した。

#### (5) 心機能

麻酔下、心エコーによる EF と E/A を測定した。

#### (6) キマーゼ活性

組織からのキマーゼの抽出は既報に従い、リン酸緩衝液でホモジネートしたのち遠心し、その沈殿物を更に 0.1% ノニデット P-40 および 2 M 塩化カリウム含有のリン酸緩衝液にてホモジネートして一晩 4 度で放置した。翌日遠心してキマーゼを抽出した。その抽出液中のキマーゼ活性は、アンジオテンシン I を基質としてアンジオテンシンの定量を行った。

#### (7) 遺伝子発現量

TGF- $\beta$ 、コラーゲンの遺伝子発現量は、心臓組織からトリゾールを用いて mRNA を抽出したのち RT-PCR を行い、GAPDH にて補正して測定した。

#### (8) 組織解析

カルノア固定した組織より切片を作製し、肥満細胞はトルイジンブルーにて染色した。キマーゼは、抗ハムスターキマーゼ抗体を用いて免疫染色した。

### 4. 研究成果

#### (1) 核酸製剤の阻害活性

精製ハムスターキマーゼに対して核酸製剤は、62.5 pM より阻害活性を示し、濃度依存的に強くなり、IC50 値は 170 pM で 500 pM 以上の濃度でほぼ 100% の阻害活性を示した (図 1. 左図)。また、1、3、10 mg/kg の核酸製剤を皮下投与したのち 24 時間の時点の血中濃度は、1 mg/kg でも 10 ng/mL 以上の濃度であった。核酸製剤の分子量は約 55,000 なので 1 mg/kg の核酸製剤投与後 24 時間においても 180 pM の濃度を維持していた (図 1. 右図)。

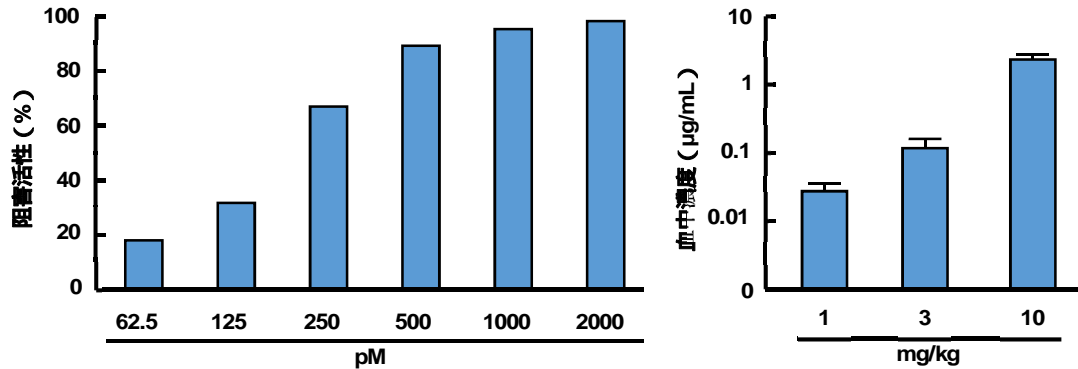


図 1. 精製ハムスターキマーゼに対する核酸製剤の阻害活性 (左図) と核酸製剤投与後 24 時間の血中濃度 (右図)

#### (2) 心筋梗塞モデルに対する核酸製剤投与量の検討

ハムスターに 1、3、10 mg/kg の核酸製剤を皮下投与したのち 1 日後に心筋梗塞を作製し、その後 1 日および 3 日の時点で EF および E/A を測定した。EF は、プラセボを投与したハムスターでは心筋梗塞後 1 日と 3 日の両時点で正常ハムスターに比して有意に低下していたが、1 mg/kg の核酸製剤投与でもプラセボ投与に比して有意に高くなっていった。そして、1 mg/kg と 3 mg/kg の間に有意差を認めず、ほぼ同程度の改善であった。E/A は、プラセボを投与したハムスターでは正常ハムスターに比して心筋梗塞後 1 日の時点で有意に上昇していたが、1 mg/kg の核酸製剤投与でもプラセボ投与に比して有意に低値であった。

心筋梗塞後 3 日に摘出した心臓のキマーゼ活性は、正常ハムスターに比してプラセボ投与したハムスターで有意に高値を示したが、1、3、10 mg/kg の核酸製剤を投与したハムスターではほぼ同程度にキマーゼ活性を有意に抑制した。

これらの結果より 1 mg/kg の核酸製剤を用いて心筋梗塞後 2 週までの心不全および生存率に対する影響を解析することにした。

#### (3) 心筋梗塞後の心機能および生存率に対する核酸製剤の影響

体重は、心筋梗塞後 1、3、7、14 日の時点のプラセボを投与したハムスターで 7 日目の時点でのみ正常ハムスターに比して有意な体重減少が見られたが、核酸製剤を投与したハムスターでは正常ハムスターとの間に差を認めなかった。心拍数は、正常ハムスターに比してプラセボおよび核酸製剤を投与したハムスターで心筋梗塞後 3 日より有意に少なく、14 日まで少ない状態でこれらの 2 群に差を認めなかった。また、血圧も心筋梗塞後 1 日と 14 日の両時点で正常ハムスターよりプラセボ投与ハムスターで有意に低下していた。そして、核酸製剤投与ハムスターも同様に低下しており、プラセボ投与ハムスターとの間に差を認めなかった。

心筋梗塞後 14 日の時点における心エコーの検査では、EF が心筋梗塞後 1 日の時点より 14 日まで正常ハムスターに比してプラセボ投与ハムスターで有意に低下していた。核酸製剤投与ハムスターの EF も 1 日後の時点で有意に低下し、プラセボ投与ハムスターとの差はなかった。尚、心筋梗塞後 1 日は、プラセボおよび核酸製剤の投与前である。そして、心筋梗塞後 3 日の時点では、プラセボ投与ハムスターに比して核酸製剤投与ハムスターで有意な高値を示し、心筋梗塞後 14 日まで有意差が認められた (図 2 左図)。E/A も心筋梗塞後 1 日の時点ではプラセボおよび核酸製剤が投与される前なので差を認めず、共に有意に高値を示した (図 2 右図)。しかし、心筋梗塞後 3 日以降はプラセボ投与ハムスターに比して核酸製剤投与ハムスターで有意に低下し、心筋梗塞後 7 日および 14 日では正常ハムスターとの間に有意差が消失した (図 2 右図)。

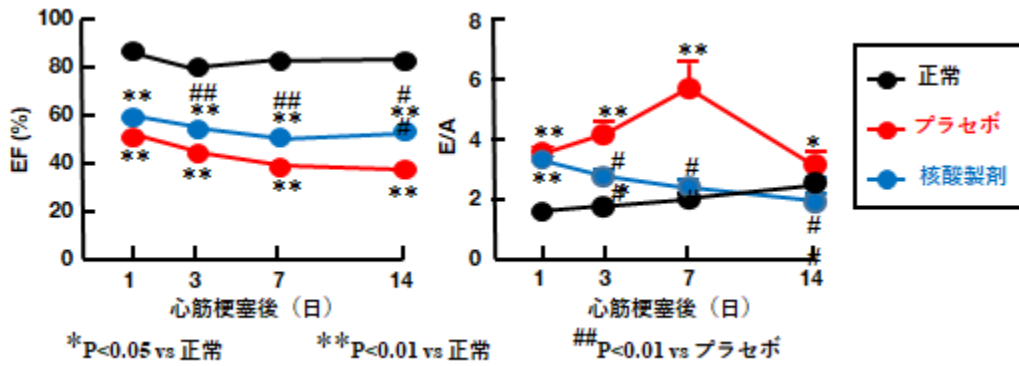


図 2. 心筋梗塞後 14 日の EF と E/A に対する核酸製剤の影響

心筋梗塞後 14 日の時点で血圧、心機能測定後に摘出した心臓の重量は、プラセボ投与および核酸製剤投与のハムスターで正常ハムスターに比べて有意に重かったが、プラセボ投与と核酸製剤投与の間には有意な差はなかった。そして、心重量/体重比も同様の結果であった。

一方、心臓のキマーゼ活性は、正常ハムスターに比してプラセボ投与のハムスターで有意に高値となったが、核酸製剤投与ハムスターで有意に低下した(図 3 左図)。また、心臓の TGF-β (中央図) とコラーゲン (右図) の遺伝子発現量もキマーゼ活性と同様に正常ハムスターに比してプラセボ投与のハムスターで有意に高値となったが、核酸製剤投与ハムスターで有意に低下した。

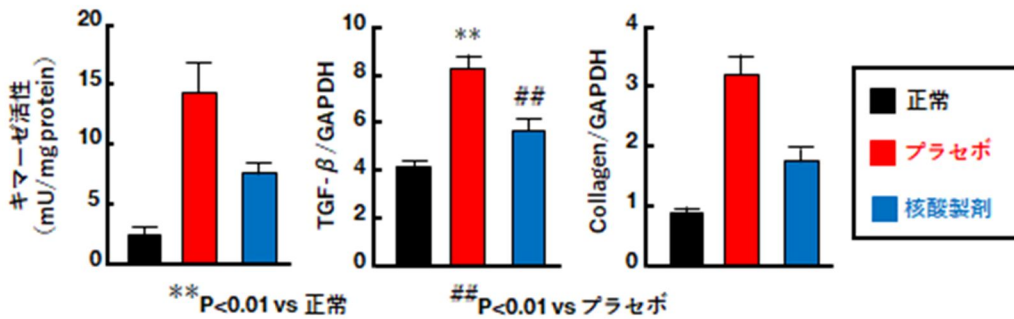


図 3. 心筋梗塞後 14 日のキマーゼ活性、TGF-β とコラーゲンの遺伝子発現量

心筋梗塞後 14 日までの生存率は、核酸製剤投与ハムスターがプラセボ投与ハムスターに比して有意に高かった (図 4)。

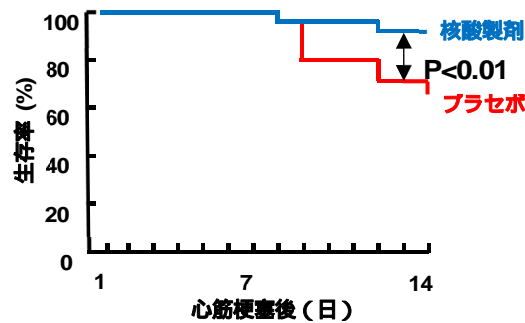


図 4. 心筋梗塞後の生存率

以上の結果より、新規キマーゼ阻害核酸製剤は心筋梗塞後に増加するキマーゼを抑制することを介して心筋梗塞後の心不全の進行抑制と生存率を改善することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Bivona Benjamin J., Takai Shinji, Seth Dale M., Satou Ryousuke, Harrison Bernard Lisa M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Chymase inhibition retards albuminuria in type 2 diabetes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jin Denan, Takai Shinji, Nonaka Yosuke, Yamazaki Satoko, Fujiwara Masatoshi, Nakamura Yoshikazu	4. 巻 14
2. 論文標題 A Chymase Inhibitory RNA Aptamer Improves Cardiac Function and Survival after Myocardial Infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 41 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozeki Maiko, Jin Denan, Miyaoka Yuta, Masubuchi Shinsuke, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of a chymase inhibitor and hyaluronic acid/carboxymethylcellulose (Septrafilm) in a novel peritoneal adhesion model in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Liu Shuangping, Liu Liping, Jin Denan, Zhang Qinggao, Takai Shinji	4. 巻 50
2. 論文標題 The novel mechanism of valproate to prevent peritoneal adhesion formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-01979-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Terai Kentaro, Jin Denan, Watase Kenji, Imagawa Akihisa, Takai Shinji	4. 巻 21
2. 論文標題 Mechanism of Albuminuria Reduction by Chymase Inhibition in Diabetic Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7495 ~ 7495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takai Shinji, Jin Denan	4. 巻 21
2. 論文標題 Chymase as a Possible Therapeutic Target for Amelioration of Non-Alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7543 ~ 7543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Vincent Laurence, Lapointe Catherine, Lo Modou, Gagnon Hugo, Pejler Gunnar, Takai Shinji, Day Robert, D'Orleans-Juste Pedro	4. 巻 376
2. 論文標題 Mast Cell Degranulation Increases Mouse Mast Cell Protease 4-Dependent Vasopressor Responses to Big Endothelin-1 But Not Angiotensin I	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 213 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.120.000325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Jin D, Takai S, Nonaka Y, Yamazaki S, Fujiwara M, Nakamura Y.
2. 発表標題 An antichymase RNA aptamer improved cardiac function in experimental heart failure.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金徳男、高井真司、野中洋介、山崎聡子、藤原将寿、中村義一
2. 発表標題 新規RNAアプタマーによるキマーゼ阻害と心筋梗塞後の心機能および生存率の改善効果
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野中洋介、金徳男、高井真司、藤原将寿、中村義一
2. 発表標題 抗キマーゼアプタマーにより心筋梗塞後の心機能および生存率の改善効果
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関