

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08046

研究課題名（和文）転写とDNA損傷応答による血管老化と心不全の分子機構解明および治療応用

研究課題名（英文）Molecular mechanism of vascular aging and heart failure due to transcription and DNA damage response and therapeutic application

研究代表者

相澤 健一（Aizawa, Kenichi）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70436484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：駆出率低下型心不全（HFrEF）は、左心室駆出率（EF）の低下と呼吸困難、疲労、浮腫などの症状を伴う。新しい治療法が求められる中、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4（PDK4）の阻害が心保護作用を持つ可能性が示唆されている。ビタミンK3を基にした新しいPDK4阻害剤を合成し、マウス心不全モデルでその効果を試験した結果、PDK4阻害剤8が最もEFを改善した。この新規で強力なPDK4阻害剤は、クエン酸回路の活性化を介して心不全の心臓のEFを改善する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新規PDK4阻害剤の開発を通じて、駆出率低下型心不全（HFrEF）の治療に対する新たなアプローチを提供する学術的意義を有するものである。特に、ビタミンK3を基にしたPDK4阻害剤が既存の治療法よりも優れた効果を示し、心保護効果を持つことが証明された。社会的意義としては、HFrEF患者に新たな治療オプションを提供することで、症状の改善や生活の質の向上に寄与する可能性がある。従来の治療法では効果が限定的であった患者に対して、この新薬は新たな希望となり得る。また、心不全の治療費削減や医療資源の最適化にも貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) is marked by a reduced left ventricular ejection fraction (EF) and symptoms like dyspnea, fatigue, and edema. While several pharmacological interventions exist, new treatments targeting different pathophysiological mechanisms are needed. Evidence suggests that inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) may be cardioprotective. We focused on vitamin K3, using its structure to create new PDK4 inhibitors with higher activity than dichloroacetic acid, and tested their effects on a mouse heart failure model. Among these, PDK4 inhibitor 8 significantly improved EF without reversing cardiac fibrosis or wall thickness. This potent PDK4 inhibitor may enhance EF by regulating bioenergetics through the activation of the tricarboxylic acid cycle.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は、日本人では癌に次ぐ高い死亡率であり、基礎疾患が良性であっても最終的には心機能の悪化により死亡する。種々の治療法開発にも拘わらず心不全は急速に増加しており、その病態理解はいまだに十分ではない。心血管細胞は代謝的、虚血、物理的負荷などによる傷害を受けた際、適応・修復のための機転としてリモデリングを生じ、その破綻は心血管組織の機能不全を来す。すでに多くの心肥大誘導因子が知られているが、心不全に至る適応破綻の機構は十分に解明されていない。

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) は、チアミンニリン酸 (ThDP) を活性化する。活性化された ThDP はピルビン酸と結合し、アセチル-CoA を生成する。その結果、クエン酸回路 (TCA サイクル) が活性化され、ATP が合成される。PDH キナーゼ 4 (PDK4) は、PDH の Ser293 および Ser300 をリン酸化することで PDH を不活性化し、TCA サイクルを抑制する。心不全の心臓では電子伝達系が障害され、TCA サイクルの減衰によりエネルギー産生のために解糖系への依存が増す。PDK4 は心臓で高発現し、心不全の心臓で上方制御されていることから、PDK4 の阻害は心不全治療の可能性を示している。

### 2. 研究の目的

以前の研究では、PDK4 阻害剤として用いられるジクロロ酢酸のアミン塩 (DADA) が、重度のインフルエンザにおける代謝障害や多臓器不全を防ぐことが示されている。ラット心不全モデルでも、ジクロロ酢酸 (DCA) が心機能を改善することが報告されている。しかし、PDK4 阻害の高い IC<sub>50</sub> (57.8 μM) と DCA の神経毒性により、臨床応用には適さない。そこで、PDK4 活性を阻害する新しい安全な治療法を確立するため、DCA や他の既存薬とは構造的に異なる、より活性の高い PDK4 阻害剤を探索した。その結果、ビタミン K3 が高い PDK4 阻害活性を持つことを発見し、ビタミン K3 に由来する 5 つの新規 PDK4 阻害剤を作成した。これらの PDK4 阻害剤は強力な PDK4 阻害活性と低毒性を示し、その心保護効果を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) PDK4 阻害能力および毒性のアッセイ

##### PDK4 の記述

全長ヒト PDK4 (アクセッション番号 NP\_002603.1 のアミノ酸 1-411) を N 末端グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質 (73 kDa) として大腸菌発現系を用いて発現させ、グルタチオンアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

##### 誘導体溶液の調製

誘導体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、100 倍濃度に調製した後、アッセイバッファーで 25 倍に希釈して試験サンプル溶液を作成した。陽性対照物質も同様に調製した。

##### オフチップモビリティシフトアッセイ (MSA)

試験サンプル溶液、基質/ATP/金属溶液、キナーゼ溶液を混合し、室温で 5 時間反応させた。反応を終了バッファーで停止し、LabChip システムで基質ペプチドとリン酸化ペプチドを分離・定量した。基質ペプチドピーク高さ (S) とリン酸化ペプチドピーク高さ (P) から生成物比 (P/(P+S)) を計算した。

##### ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性アッセイ

RIKEN Cell Bank から取得した。

#### (2) 動物

C57BL/6J マウスを日本 SLC 株式会社および高杉実験動物供給株式会社から購入し、12 時間明暗スケジュールで飼育した。すべての動物取り扱い手順は自治医科大学のガイドラインおよび ARRIVE ガイドラインに準拠し、自治医科大学の動物実験委員会が承認した。

#### (3) 横行大動脈縮窄 (TAC)

マウスを挿管し、補助換気を行いながら手術を実施した。大動脈を可視化し、27-G の鈍針を横行大動脈に沿って配置し、縫合糸で結紮した。

#### (4) 心エコー検査

TAC 誘導後の 0 週、4 週、および 5 週に、マウスを 1.5% イソフルランで麻酔し、30 MHz プローブを用いて心エコー画像を撮影した。駆出率は Teichholz 法で計算した。

#### (5) 注射

TAC 手術後 4 週間で EF が 55% 未満のマウスに対し、化合物 8 または DCA を含む溶液を 7 日間毎日腹腔内注射した。

### 4. 研究成果

TAC 術後 4 週間目から 1 週間、8 を半量 (1.4 mg/kg/日) 投与しても、対照群と比較して EF は増加しなかった。8 を 2 倍量 (5.6 mg/kg) 投与したマウスの EF は、対照群よりも有意に高かったが、2.8 mg/kg を投与したマウスと同程度であった。このため、2.8 mg/kg が最小有効量であると判断した。心不全治療の有効性を評価するため、EF が 55% 未満に低下したマウスに 2.8 mg/kg

の 8 または対照溶液を腹腔内に 1 日 1 回注射した。7 日後、8 を投与されたマウスは対照群に比べて EF が 1.5 倍高かった (図 2a)。TAC 手術を受けたマウスのうち、8 を投与された 11 匹中 9 匹で EF が増加した。一方、対照群の TAC マウスでは EF は変化しないか減少した (図 2b)。エコー検査により、収縮期の左室内径が 8 を投与された TAC マウスで有意に短いことが示された (図 2c,d)。拡張期の左室内径、拡張末期および収縮末期の心室中隔厚 (IVS;d および IVS;s) および拡張末期および収縮末期の左室後壁厚 (LVPW;d および LVPW;s) には有意な差は見られなかった (図 2c,d)。これらの結果は、8 が心不全の心臓の収縮機能を改善するが、病的な心リモデリングを逆転させないことを示唆している。さらに、対照群と 8 投与群の TAC マウス間で心臓の線維化に有意な差はなかった。これらの結果を総合すると、8 は病的な心リモデリングを逆転させることなく、心不全の心臓の収縮力を改善することが示唆される。

図 1. ビタミン K3 誘導体 (5, 8, 11, 13a, 13b) は駆出率 (EF) を改善した。

(a) 研究デザイン。心エコー検査は TAC 誘導前、4 週目、および 5 週目に取得された。4 週目から、駆出率が 55% 未満のマウスに各誘導体を 1 日 1 回 (q.d.) 1 週間にわたり腹腔内 (i.p.) 注射した (赤い矢印で示す)。TAC 誘導後 5 週目にマウスを安楽死させた。(b) 散布図は、EF の変化の平均値 ± SD を示している (毎日の PDK4 阻害剤注射 1 週間後の EF 変化)。変化の大きさは、5 週目の EF (EF5) を 4 週目の EF (EF4) で割ることで計算された。Kruskal-Wallis 検定および Dunn の多重比較検定を使用した。\*\*\*  $p < 0.001$ 。

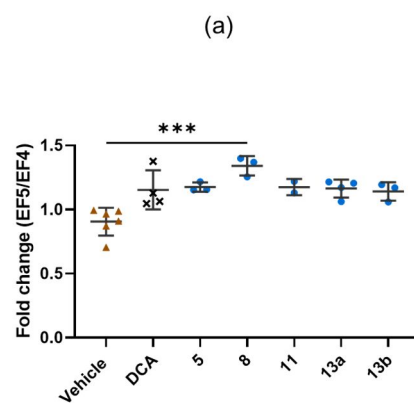
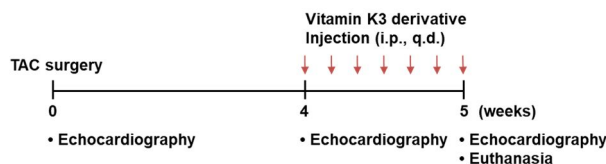
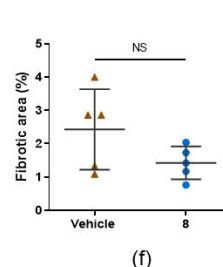
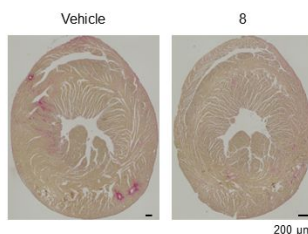
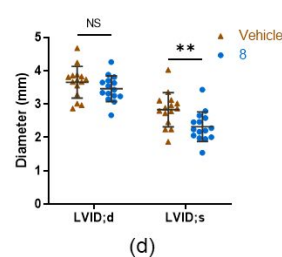
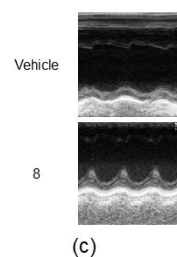
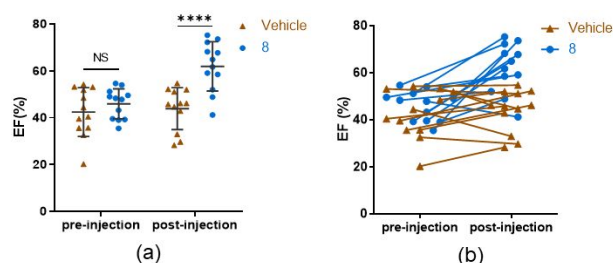


図 2. 駆出率低下型心不全 (HFrEF) の回復は、8 の 7 日間にわたる毎日の治療後に見られた。

(a) 横行大動脈狭窄手術 (TAC 手術) から 4 週間後の駆出率 (EF) および TAC 手術後の 4 週間のインキュベーション後の 7 日間の毎日のピークル (n=8) または 8 (n=9) 治療後の EF の平均値 ± SD を示す散布図。Bonferroni の多重比較検定を用いた二元配置分散分析 (ANOVA) \*\*\*\*  $p < 0.0001$ 。(b) 8 の注射前後の各マウスの EF。(c) ピークル注射および 8 注射を受けた TAC 手術マウスの左心室の M モードエコーの例。(d) ピークル注射および 8 注射を受けた TAC マウスの拡張終末期左室内径 (LVIDd) および収縮終末期左室内径 (LVIDs) Mann-Whitney U 検定。NS = 有意差なし。\*  $p < 0.01$ 。(e) シリウスレッド染色された TAC マウスの心臓切片。線維化領域はピンクに染まる。スケールバー: 200  $\mu$ m。(f) ピークル注射および 8 注射を受けた TAC マウスの心臓切片の線維化領域の統計結果。NS = 有意差なし。



## 結論

PDK4 の構造解析により、HFrEF を治療する化合物が開発された。新規で強力な PDK4 阻害剤を毎日注射することで、EF を増加させ、左室内径を減少させることで HFrEF を治療したが、他の心臓の物理的パラメータには影響を与えなかった。したがって、PDK4 阻害剤 8 は心リモデリングに関係なく心不全の治療に使用できる可能性がある。さらに、PDK4 阻害が新しい治療戦略であることから、PDK4 阻害剤 8 は、現行の治療法に反応が悪い患者の生存率を向上させることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aizawa Kenichi, Ikeda Akari, Tomida Shota, Hino Koki, Sugita Yuuki, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Kido Hiroshi, Yokoyama Shigeyuki, Nagai Ryozo	4. 巻 13
2. 論文標題 A Potent PDK4 Inhibitor for Treatment of Heart Failure with Reduced Ejection Fraction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 87~87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells13010087	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 相澤健一	4. 巻 1
2. 論文標題 循環器臨床におけるプロテオミクスの現状と将来展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 136-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	永井 良三 (Nagai Ryoza) (60207975)	自治医科大学・医学部・学長  (32202)	

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
---------	---------