

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15888

研究課題名（和文）小胞体ストレス軽減作用を有した新規化合物による心筋梗塞治療法の開発

研究課題名（英文）Treatment of myocardial infarction by a novel drug to reduce endoplasmic reticulum stress

研究代表者

井手 裕也（Ide, Yuya）

独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・展開医療研究部・研究員

研究者番号：20804206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：KUS121（Kyoto University Substance 121）の心臓保護効果を検討した。ラット心筋芽細胞H9C2を用いた投与実験ではATPの維持、ERストレスの減少を介して細胞死が抑制された。続いて、マウス心筋梗塞モデルにKUS121を再灌流後に投与すると梗塞サイズが減少することが確認された。細胞実験と同様にATPは維持され、ERストレスのは減少することが判明した。さらにはヒトへの応用を考慮してブタ心筋梗塞モデルに対してKUS121を冠動脈内投与したところ、用量依存的に梗塞サイズは減少した。KUS121は急性心筋梗塞の新規治療法となる可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心筋梗塞に対する治療法は、カテーテル治療（経皮的冠動脈インターベンション）が第一選択の治療法である。しかし、それでも心筋梗塞を完全には改善させるには至らない。しかしながら、心筋梗塞サイズをさらに減らすための新たな手技や治療薬は未だ確立されたものはないというのが現状である。KUS121の投与によってマウス心筋梗塞モデルの梗塞サイズを減少させただけでなく、ブタの心筋梗塞モデルを用いた実際の治療を見据えた投与方法によっても梗塞サイズを減少させることを実証した。KUS121は急性心筋梗塞に対する新たな治療法となる可能性があり、心筋梗塞による死亡率を低下させ、心不全を減少させることも期待される。

研究成果の概要（英文）：We evaluated cardio-protective effects of KUS121 (Kyoto University Substance 121). KUS121 protected H9C2 rat cardiomyoblasts from cell death by reducing ER stress, and preserving ATP levels. In murine myocardial infarction models, KUS121 treatment was able to reduce the myocardial infarct size by administration after reperfusion. This improvement was also associated with reductions in ER stress and the maintenance of ATP levels. We examined whether KUS121 could produce therapeutic effects in porcine myocardial infarction models. Intracoronary administration of KUS121 attenuated the infarcted area in a dose-dependent manner. The efficacy of KUS121 as a promising novel therapeutic agent for myocardial infarction.

研究分野：虚血性心疾患

キーワード：心筋梗塞 新規化合物 心保護作用 ATP 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞に対する現在の治療法としては、経皮的冠動脈インターベンション (PCI) による責任冠動脈の再灌流を得る早期再灌流療法が第一選択の治療法である。しかし、早期再灌流療法によっても梗塞巣を完全には改善させることはできず、PCI 後の残存梗塞が大きくなるほど予後は悪化することが報告されている⁽¹⁾。現在まで様々な心筋梗塞治療法が研究されているが、未だ確立された新規治療法はないというのが現状である⁽²⁾。

VCP (valosin-containing protein) はコピキタスに発現している蛋白質で、異常蛋白質の処理や酸化ストレスへの応答などにおいて重要な役割を有する、細胞の恒常性維持のために重要な蛋白質である。また、IBMPFD (inclusion body myopathy associated with Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia) や家族性 ALS (amyotrophic lateral sclerosis) の一部が VCP の遺伝子異常によって引き起こされる疾患として報告されている⁽³⁾。

VCP は 2 つの ATPase 活性を持つドメインを有している。疾患を引き起こす変異によってその ATPase 活性が上昇することが報告されており⁽⁴⁾、VCP の ATPase 活性の上昇が病因の 1 つと考えられている。京都大学の垣塚氏は VCP の不可欠な機能を阻害することなく、ATPase 活性のみを選択的に低下させることも目的として化合物 KUS121 (Kyoto University Substance 121) を開発した。この KUS121 は細胞内の ATP 減少を抑制する作用、小胞体ストレスを軽減する作用を持つことが示された⁽⁵⁾。実際、マウス網膜色素変性症モデル⁽⁵⁾、緑内障モデル⁽⁶⁾、パーキンソン病モデル⁽⁷⁾、網膜虚血モデル⁽⁸⁾で神経保護的効果を有することがすでに報告されている。

VCP の変異によって引き起こされる疾患である IBMPFD の中に拡張型心筋症を示す心疾患の表現型があること⁽⁹⁾、生体において KUS121 の保護効果が報告されていることから、KUS121 の虚血性心疾患に対する保護効果が予測され、その効果を実証するため検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、KUS 剤の虚血性心疾患に対する保護効果を検討するため、細胞実験での保護効果、およびマウス虚血再灌流モデルを用いた生体での保護効果を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞保護効果の検討

心筋細胞に対する KUS121 の細胞保護効果を検討するために、ラット cardiomyoblast H9C2 に tunicamycin の投与を行った。Tunicamycin 投与によって細胞死が誘導されるが、KUS121 の投与によって細胞死が抑制されるかを検討した。加えて、細胞内 ATP レベル、ER ストレスについても評価を行った。

(2) マウス心筋梗塞モデルでの心臓保護作用の検討

生体でも心臓保護効果があるかを検討するために、マウス心筋梗塞モデルである虚血再灌流障害モデルを用いて KUS121 の投与実験を行った。マウス左冠動脈前下行枝を結紮して虚血を誘導し、45 分後に結紮を解除して再灌流を行った。再灌流直後に KUS 80mg/kg を静脈内に、80mg/kg を腹腔内投与した。術後 1 日目から 4 日目まで 24 時間毎に 160 mg/kg を腹腔内投与した。7 日目にマッソントリクローム染色によって組織学的に梗塞領域の評価を行った。

(3) ブタ心筋梗塞モデルでの臨床応用を視野に入れた検討

臨床応用を視野に入れた検討を行うため、ブタの心筋梗塞モデルである虚血再灌流障害モデルに KUS121 を投与した。左冠動脈前下行枝を経カテーテル的にバルーン閉塞を行い、虚血を誘導した。60 分後にバルーン閉塞を解除して再灌流を得た。再灌流直後に 0.64、2.5、5.0 mg/kg の KUS121 を経カテーテル的に左冠動脈前下行枝に冠動脈内投与した。7 日目に TTC/エバンスブルー二重線色による組織学的に梗塞領域の評価を行った。また、心臓 MRI のガドリニウム遅延造影でも同様に梗塞領域の評価を行った。

4. 研究成果

(1) KUS121 は細胞保護的に作用する

ラット cardiomyoblast である H9C2 に tunicamycin を投与して細胞死を誘導したところ、KUS121 は用量依存的に細胞死を抑制し、細胞内 ATP も同様に用量依存的に維持された。また、ER ストレスマーカーである C/EBP homologous protein (CHOP)、immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) も減少していた。

さらに、細胞外フラックスアナライザーを用いて KUS121 がミトコンドリア機能に与える作

用を検討した。H9C2 に tunicamycin を投与するとミトコンドリア機能は低下したが、KUS121 を加えているとミトコンドリア機能は保持されることが判明した (図 1)。

以上の結果から KUS121 は細胞内 ATP レベルの維持、ER ストレスの減少、ミトコンドリア機能の保持を介して細胞保護的に作用すると考えられた。

(2)KUS121 はマウス心筋梗塞モデルにおいて梗塞領域を縮小する

マウスの心筋梗塞モデルである虚血再灌流障害モデルを用いて KUS121 の投与実験を行った。虚血誘導前に KUS121 を投与すると、梗塞サイズは減少した。臨床応用を考慮すると再灌流後の投与が想定されるため、同じモデルで再灌流後に KUS121 を投与した。7 日目に組織学的に梗塞領域を評価したところ、KUS121 投与群では有意に梗塞サイズは減少していた (図 2: マッソトリクローム染色; 線維化領域は青色)。加えて、ER ストレスマーカーである CHOP の発現も KUS121 投与群で低下していた。また、心エコーを用いて心機能評価を行ったが、KUS121 投与群で有意に心機能が保たれていた。

生体でも KUS121 は細胞内 ATP に影響を与えるのか、京都大学の山本正道氏によって開発された ATP 可視化マウスである GO-ATeam2 マウスを用いた虚血再灌流モデルで検討を行った。KUS121 を再灌流後に投与すると、比較的速やかに ATP は改善した (図: オレンジ色は高 ATP、青色は低 ATP を表す)。この検討から、KUS121 は生体でも ATP を維持することが示された。

これらの結果から、KUS121 は生体においても細胞での検討と同様に ATP レベルの維持、ER ストレスの減少を介して心臓保護的に作用することが判明した。

図 1: KUS121 のミトコンドリア保護作用

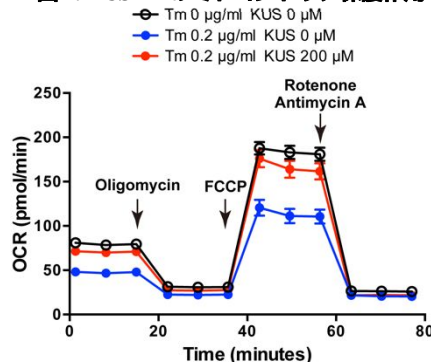


図 2: KUS121 は梗塞領域を減少させる

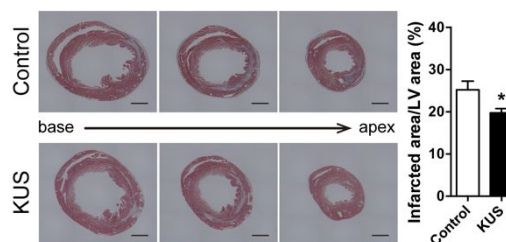
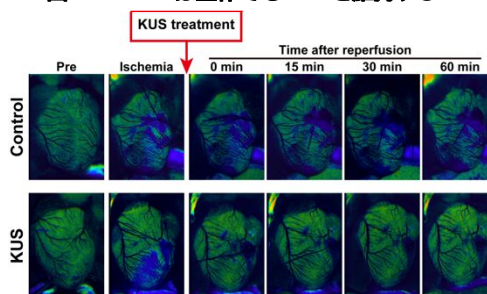


図 3: KUS121 は生体でも ATP を維持する



(3)臨床応用を視野に入れたブタ虚血再灌流モデルでの検討

実臨床での投与量、投与方法を検討するため、ブタの心筋梗塞モデルである虚血再灌流障害モデルを用いて KUS121 の投与実験を行った。投与 7 日目での TTC/エバンスブルー二重染色による組織学的な評価では、各投与群とも左室(LV)あたりの虚血領域(AAR; Area at risk)である

AAR/LV 比は同程度であったが、虚血領域あたりの梗塞領域 (infarcted area/AAR)は KUS121 投与によって用量依存的に減少していた (図 4: エバンスブルー染色で青色に染色されない部位が虚血領域、TTC 染色で赤色に染色されない部位が梗塞領域を表す)。また、心臓

図 4: 組織学的評価

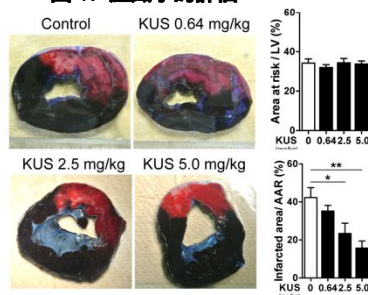
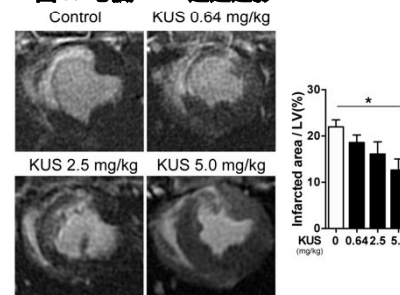


図 5: 心臓 MRI 遅延造影



MRI ガドリニウム遅延造影を用いた梗塞領域の評価でも KUS121 投与群では用量依存的に梗塞領域が減少していることが示された (図 5: 白色部位が梗塞領域を表す)。これらの結果から KUS121 の冠動脈内投与によっても心臓保護的に作用することが示唆された。

今回の検討から、KUS121 は急性心筋梗塞に対する新規治療法となる可能性が示唆された。今後臨床応用に向けたさらなる検討のため、KUS121 の薬物動態の評価を行っていく予定である。正常マウスおよび心筋梗塞モデルマウスでの KUS121 の心臓組織濃度、血中濃度の推移を評価し、今後の安全性試験・毒性試験の端緒としていく。

参考文献

1. Stone GW, et al. Relationship between Infarct Size and Outcomes Following Primary PCI Patient-Level Analysis from 10 Randomized Trials. J Am Coll Cardiol. 2016;67(14):1674–83.
2. Spath NB, et al. Novel cardioprotective and regenerative therapies in acute myocardial infarction: a

- review of recent and ongoing clinical trials. *Future Cardiol.* 2016;12(6):655–72.
3. Watts GDJ, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet.* 2004;36(4):377–81.
 4. Manno A, et al. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Genes to Cells.* 2010;15(8):911–22.
 5. Ikeda HO, et al. Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. *Sci Rep.* 2014;4.
 6. Nakano N, Ikeda HO, Hasegawa T, et al. Neuroprotective effects of VCP modulators in mouse models of glaucoma. *Heliyon.* 2016;2(4).
 7. Nakano M, Imamura H, Sasaoka N, et al. ATP Maintenance via Two Types of ATP Regulators Mitigates Pathological Phenotypes in Mouse Models of Parkinson's Disease. *EBioMedicine.* 2017;22:225–41.
 8. Hata M, Ikeda HO, Kikkawa C, et al. KUS121, a VCP modulator, attenuates ischemic retinal cell death via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep.* 2017;7:1–10.
 9. Hübbers CU, Clemen CS, Kesper K, et al. Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain.* 2007;130(2):381–93.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ide Yuya, et al.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardioprotective Effects of VCP Modulator KUS121 in Murine and Porcine Models of Myocardial Infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 701 ~ 714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2019.06.001	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuya Ide
2. 発表標題 Cardioprotective Effects of VCP Modulator KUS121 in Animal Models of Myocardial Infarction
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuya Ide
2. 発表標題 Myocardial Infarction-Our current study investigating a new treatment for MI
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 心筋細胞の保護用の医薬組成物	発明者 垣塚彰, 尾野巨, 堀江貴裕, 井手裕也, 齋藤成達, 木村剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-514365	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PROTECTING MYOCARDIAL CELLS	発明者 垣塚彰, 尾野巨, 堀江貴裕, 井手裕也, 齋藤成達, 木村剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、19789240.9	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 Composition for Protecting Cardiomyocyte	発明者 垣塚彰, 尾野巨, 堀江貴裕, 井手裕也, 齋藤成達, 木村剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17/047,475	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 心筋細胞の保護用の医薬組成物	発明者 垣塚彰, 尾野巨, 堀江貴裕, 井手裕也, 齋藤成達, 木村剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、10-2020-7032536	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------