

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19552

研究課題名（和文）新しい心不全治療薬としての新規PDK4阻害薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel PDK4 inhibitor as a new therapeutic agent for heart failure

研究代表者

永井 良三（Nagai, Ryoza）

自治医科大学・医学部・学長

研究者番号：60207975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：心不全に対する薬物治療は、アンギオテンシン受容体拮抗薬、遮断薬などの神経・体液性因子の抑制が中心である。これにより心不全の予後は改善したが、死亡率は依然として高い。また、高齢社会の進捗中、心不全患者の増加はとどまることがない。このため病態の本質に基づく新しい治療薬が求められている。本研究では、心不全を発症したマウスに新規PDK4阻害薬を投与し、心機能を改善することを示した。今回開発したPDK4阻害薬の投与では、リバース・リモデリングが起きないことから、エネルギー代謝の改善が新規PDK4阻害薬による心機能回復の作用機序だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は日本人ではがんに次ぐ高い死亡率であり、種々の治療法開発にもかかわらず急速に増加している。しかし、その病態理解はいまだに十分ではない。本研究では、ATP産生の高効率化のための新規PDK4阻害薬を開発した。新規PDK4阻害薬の投与によって、心不全マウスの心機能が回復することを見出した。ATP産生が低下し病態を悪化させる現象は、腎臓の線維化、感染やショックによる臓器不全やがんでも知られている。本研究で開発されたPDK4阻害薬はこれらの病態を改善できる可能性も秘めており、その影響は循環器領域に留まらず、他の臓器疾患に対し普遍的な理解をもたらす学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Medical therapies for heart failure focuses on the suppression of neuro-humoral factors, such as angiotensin receptor blockers and beta-blockers. Although these therapies have improved the prognosis of heart failure, the mortality rate remains high. In addition, the number of patients with heart failure continues to increase as aging of society progresses. Therefore, there is a need for new therapeutic agents based on the nature of the pathophysiology. In this study, we demonstrated that a novel PDK4 inhibitor improves cardiac function in mice with heart failure. Since administration of the novel PDK4 inhibitor does not induce reverse remodeling, we suggest that improvement of energy metabolism recovers cardiac function.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 PDK4 立体構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全に対する薬物治療は、アンギオテンシン受容体拮抗薬、 β 遮断薬などの神経・体液性因子の抑制が中心である¹。これにより心不全の予後は改善したが、高齢社会の進む中、心不全患者の増加はとどまることがない。このため、病態の本質に基づく新しい治療薬が求められている。

心臓は毎日 10 トン近い血液を送り出すため、大量の ATP を消費する。成人心臓が産生する ATP は一日に実に約 35 kgにも及ぶ。そのもとになっているのが、好氣的解糖による TCA サイクルと酸化的リン酸化である。しかし酸素不足状態では解糖系は嫌気性代謝となり、ATP 産生の低下と乳酸産生を促し、心機能は低下する^{2,3}。ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4 (PDK4)は心臓で発現が高く、ピルビン酸脱水素酵素(PDH)をリン酸化することにより抑制する^{4,5}。不全心筋では PDK4 の発現増強と活性化が起こり⁶、PDH が強く抑制され、解糖系を嫌気性代謝に転換する。このため、PDK4 阻害薬は新規の心不全治療薬として期待される。しかし、代表的な PDK4 阻害薬であるジクロロ酢酸(DCA)は PDK4 阻害活性が低く、神経毒性等の有害事象があり、医薬としての使用が不可能であるため、これらを改善した新規 PDK4 阻害薬の開発が必要である。これまで国内外で成功していない PDK4 阻害薬の開発と、心筋細胞内の ATP の産生効率を高める新規心不全治療薬の実用化が求められている。

2. 研究の目的

心臓は常に動き続け、変動する負荷に適応するために莫大なエネルギーを消費する。これは ATP の分解により供給される。心筋梗塞などにより ATP 産生が低下すれば、心臓の収縮弛緩機能は悪化し、心臓への酸素供給も低下、そのため心筋細胞の ATP 産生能力はさらに悪化するという悪循環に入る。かくも重要な ATP 産生は、糖や脂肪酸に内在するエネルギーを TCA サイクルと酸化的リン酸化により引き出すことによって行われる。しかし TCA サイクルにより効率的に ATP を産生する好氣的代謝か、あるいは非効率で乳酸を産生する嫌気性代謝に従うかは、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ PDK4 によって制御されている。当然ながら心臓では好気性解糖が必須であるが、心不全状態では嫌気性代謝に陥り、悪循環が始まる。そこで PDK4 阻害薬の開発は新しい心不全治療薬として期待されてきたが、いまだにどの企業も成功していない。

最近、我々は北里大学で開発された KIS 化合物が PDK4 を阻害し、心不全を著明に改善することを見出した。本研究では、リード化合物をさらに改善すべく、理化学研究所と共同で、蛋白・阻害薬複合体の構造から創薬を行うものである。

3. 研究の方法

(1) 新規 PDK4 阻害薬の合成

ジクロロ酢酸(DCA)と PDK4 との複合体の構造に *in silico* 解析を加え、シードの探索を行った。このシードより新規 PDK4 阻害薬の候補化合物 5 種類を設計し、合成した。

(2) 新規 PDK4 阻害薬の心不全治療効果のマウスモデルによる検証と治療効果の高い PDK4 阻害薬の選択

8 週齢 C57BL/6J 雄マウスを用いて、横行大動脈縮窄手術により心不全マウスモデルを作製し、4 週間後、心エコーで左室駆出率が 55%以下であることを確認した。左室駆出率が 55%以下のマウスに各新規 PDK4 阻害薬を 7 日間投与し、心機能の改善を指標に、新規 PDK4 阻害薬を選抜した。

(3) 新規 PDK4 阻害薬の心臓リモデリングへの影響

8 週齢 C57BL/6J 雄マウスを用いて、横行大動脈縮窄手術を施し、4 週間後、左室駆出率が 55%以下になったマウスに新規 PDK4 阻害薬を 7 日間投与し、心エコーで拡張期と収縮期の心室中隔、左室内径、左室後壁の厚さを計測した。投与 7 日目でマウスを安楽死させ、心臓を取り出し固定後、パラフィン包埋し、5 μ m の心臓切片を作製した。作製した切片は線維化を検証するため、ピクロシリウスレッドで染色し、染色された領域の面積の定量を行った⁷。

(4) 新規 PDK4 阻害薬による心機能改善の分子機構

8 週齢 C57BL/6J 雄マウスを用いて、横行大動脈縮窄手術を施し、4 週間後、左室駆出率が 55%以下になったマウスに新規 PDK4 阻害薬を 7 日間投与し、安楽死させた後、心臓を採取した。採取した心臓は溶解し、ピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性の定量や PDH のリン酸化レベルの定量に使用した。

4. 研究成果

(1) 新規 PDK4 阻害薬の合成

PDK4 阻害の心保護作用の検証のため、PDK4 阻害活性が高く細胞毒性の低い 5 種類の新規 PDK4 阻害薬を合成した (PDK4 阻害薬 1 - 5)。

(2) 新規 PDK4 阻害薬の心不全治療効果のマウスモデルによる検証と治療効果の高い PDK4 阻害薬の選択

横行大動脈縮窄手術後 4 週間で左室駆出率が 55% 以下になったマウスに各新規 PDK4 阻害薬を 1 週間投与した。溶媒コントロール群と比較して左室駆出率が有意に改善していた群があったため、以降、この PDK4 阻害薬を使用して実験を行った。

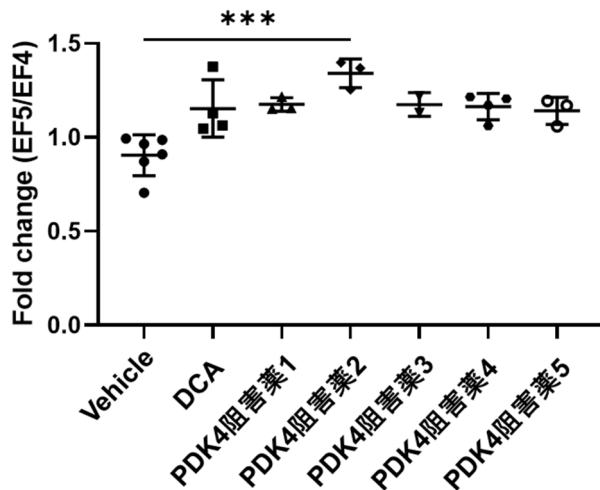


図 1 横行大動脈縮窄手術後 PDK4 阻害薬投与による左室駆出率の改善。各薬剤投与 7 日目の左室駆出率(EF5)を各薬剤投与開始時の左室駆出率 (EF4) で割った値を比較した。

(3) 新規 PDK4 阻害薬の心臓リモデリングへの影響

横行大動脈縮窄手術後を施されたマウスは左室駆出率の低下以外にも、心肥大や心臓の線維化といったリモデリングが起きる⁸。横行大動脈縮窄手術後 4 週目から 5 週目にかけて新規 PDK4 阻害薬を投与された群と溶媒を投与された群で線維化面積に有意な差はなく(図 2、3)、左室後壁や隔壁の厚さにも有意差は見られなかった。収縮期の左室内径 (LVID;s) が新規 PDK4 阻害薬投与群で有意に減少していたことから、PDK4 阻害薬投与によって、左室の収縮力が改善したと考えられる(図 4)。このことから、新規 PDK4 阻害薬は大動脈縮窄によって引き起こされる心臓リモデリングには影響を及ぼさないと考えられる。

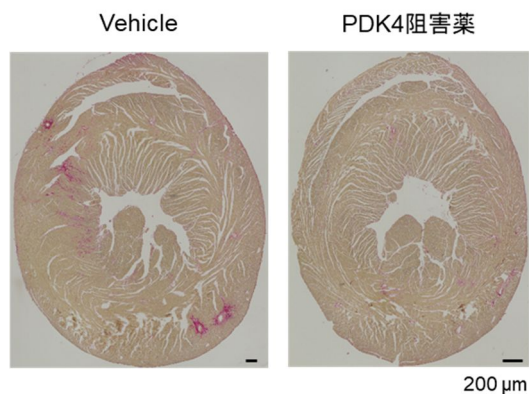


図 2 PDK4 阻害薬 7 日間投与後の心臓の線維化

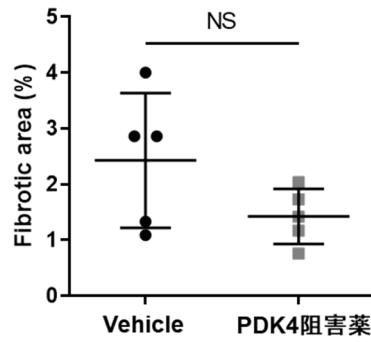


図3 PDK4 阻害薬 7 日間投与後の心臓の線維化面積の定量

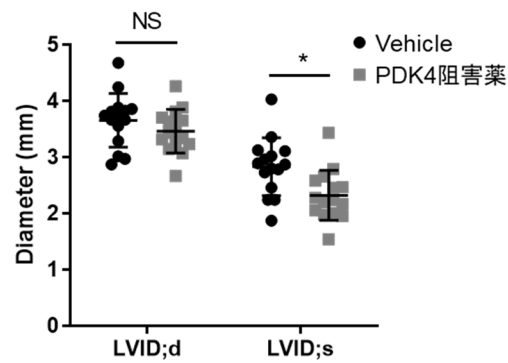


図4 PDK4 阻害薬 7 日間投与後の左室内径
LVID;d は拡張期の左室内径を表し、LVID;s は収縮期の左室内径を表す。

(4) 新規 PDK4 阻害薬による心機能改善の分子機構

PDH は PDK4 によるリン酸化を受けて活性が抑制される。そこで、新規 PDK4 阻害薬を 7 日間投与し、PDK4 の基質である PDH の活性を測定した。心臓溶解液中の PDH 活性は新規 PDK4 阻害薬投与群で溶媒コントロール群と比べて有意に高かった(図 5)。また、PDK4 によるリン酸化を受けるアミノ酸残基として知られる Ser300 と Ser233 のリン酸化は新規 PDK4 阻害薬投与群で有意に減少していた。また、PDK4 の転写は活性化していなかった。新規 PDK4 阻害薬は心臓リモデリングを逆行させるのではなく、PDH を活性化し、エネルギー産生を正常化することで心機能を改善すると考えられる。

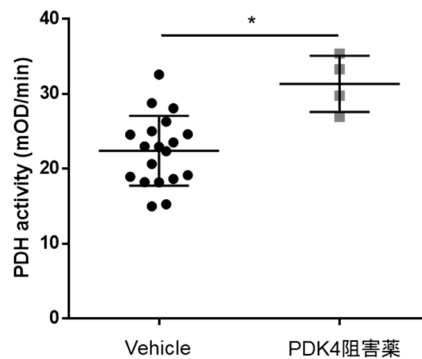


図5 PDK4 阻害薬 7 日間投与後の心臓内のピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性

まとめ

本研究では、心不全における PDK4 阻害の効果を検証するため、5 つの新規 PDK4 阻害薬を開発した。新規 PDK4 阻害薬は高い PDK4 阻害活性を示し、細胞毒性は低かった。それぞれの心保護作用を検証した結果、心不全マウスの左室駆出率を著明に改善することができる PDK4 阻害薬を見出した。

横行大動脈縮窄手術を施され、左室駆出率が 55%以下になったマウスに 7 日間新規 PDK4 阻

害薬を投与すると、左室駆出率の改善が見られた。今回の投与方法では心臓の壁の肥厚や線維化を解消するといったリバース・リモデリングは起きなかったが、収縮期の左室内径が PDK4 阻害薬投与群で有意に短くなっていたことから、PDK4 阻害薬の投与により、ピルビン酸脱水素酵素が活性化され、エネルギー代謝が改善した結果、心臓の収縮力が回復したと考えられる。また、本研究では、新規 PDK4 阻害薬を心不全発症後に投与し、治療効果を検証したが、予防的に投与することで心臓リモデリングの予防が可能か今後検証の余地がある。

本研究で着目した TCA サイクル以外にも、ペントースリン酸回路や分岐鎖アミノ酸代謝経路の心不全への関与が示唆されている。例えば、PDK4 阻害活性を持つジクロロ酢酸の投与により、ペントースリン酸回路が活性化され、心筋が受ける酸化ストレスを軽減することが知られている⁹。また、分岐鎖アミノ酸は肥大した心臓で蓄積するが¹⁰、これを解消することで、左室駆出率が改善することも知られている¹¹。今後、新規 PDK4 阻害薬のそれらの経路への効果を解明することで、PDK4 阻害薬の心保護作用のさらなる増強に繋がれると期待する。

また、心不全には、心臓の機能低下が慢性的に起こっている状態も含まれる（慢性心不全）。慢性心不全に対してジギタリスやカテコラミンなどの強心薬を使用すると、いわば「痩せ馬に鞭」という状態になり、長期の生命予後は悪化する。2000 年以後の薬物治療は、神経・体液性因子を標的とした心臓保護薬（アンギオテンシン受容体拮抗薬、β遮断薬など）が中心となったが、高齢者が増える中で慢性心不全患者や急性心不全の増加はとまらず、新しい治療法の開発が待望されている。ATP 産生効率を高める PDK4 阻害薬の開発は、医療上の必要性だけでなく、心不全と臓器障害の病態生理の理解を深め、新しい循環器学、病理学、病態生理学を発展させる可能性がある。

なお、本 PDK4 阻害薬は特許申請を控えているため、構造については開示できないことを申し添える。

< 引用文献 >

1. Ami Shah, Dimple Gandhi, Sneha Srivastava, Kunal Shah, Rupal Mansukhani, Heart Failure: A Class Review of Pharmacotherapy, *P and T*, 42 巻、2017、464-472
2. Renée Ventura-Clapier, Anne Garnier, Vladimir Veksler, Frédéric Joubert, Bioenergetics of the failing heart, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813 巻、2011、1360-1372
3. Gary D. Lopaschuk, Qutuba G. Karwi, Rong Tian, Adam R. Wende, E. Dale Abel, Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure, *Circulation Research*, 128 巻、2021、1487-1513
4. S. S. Moon, J. E. Lee, Y. S. Lee, S. W. Kim, N. H. Jeoung, I. K. Lee, J. G. Kim, Association of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene polymorphisms with type 2 diabetes and metabolic syndrome, *Diabetes Res Clin Pract*, 95 巻、2012、230-236
5. X. Wang, X. Shen, Y. Yan, H. Li, Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): an overview toward clinical applications, *Biosci Rep*, 41 巻、2021
6. Jun Mori, Ratnadeep Basu, Brent A. McLean, Subhash K. Das, Liyan Zhang, Vaibhav B. Patel, Cory S. Wagg, Zamaneh Kassiri, Gary D. Lopaschuk, Gavin Y. Oudit, Agonist-Induced Hypertrophy and Diastolic Dysfunction Are Associated With Selective Reduction in Glucose Oxidation, *Circulation: Heart Failure*, 5 巻、2012、493-503
7. Marcos A. Rossi, The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease, *International Journal of Cardiology*, 30 巻、1991、335-340
8. Thanachai Methatham, Ryoza Nagai, Kenichi Aizawa, A New Hypothetical Concept in Metabolic Understanding of Cardiac Fibrosis: Glycolysis Combined with TGF-β; and KLF5 Signaling, *Int J Mol Sci*, 23 巻、2022
9. Takao Kato, Shinichiro Niizuma, Yasutaka Inuzuka, Tsuneaki Kawashima, Junji Okuda, Yodo Tamaki, Yoshitaka Iwanaga, Michiko Narazaki, Tetsuya Matsuda, Tomoyoshi Soga, Toru Kita, Takeshi Kimura, Tetsuo Shioi, Analysis of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure, *Circulation: Heart Failure*, 3 巻、2010、420-430
10. Haipeng Sun, Yibin Wang, Branched chain amino acid metabolic reprogramming in heart failure, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862 巻、2016、2270-2275
11. Haipeng Sun, Kristine C. Olson, Chen Gao, Domenick A. Prosdocimo, Meiyi Zhou, Zhihua Wang, Darwin Jeyaraj, Ji-Youn Youn, Shuxun Ren, Yunxia Liu, Christoph D. Rau, Svati Shah, Olga Ilkayeva, Wen-Jun Gui, Noelle S. William, R. Max Wynn, Christopher B. Newgard, Hua Cai, Xinshu Xiao, David T. Chuang, Paul Christian Schulze, Christopher Lynch, Mukesh K. Jain, Yibin Wang, Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure, *Circulation*, 133 巻、2016、2038-2049

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	横山 茂之 (Shigeyuki Yokoyama) (00159229)	国立研究開発法人理化学研究所・科技八産連本部・特別招聘研究員 (82401)	
研究分担者	砂塚 敏明 (Toshiaki Sunazuka) (30226592)	北里大学・感染制御科学府・教授 (32607)	
研究分担者	相澤 健一 (Kenichi Aizawa) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (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