

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03674

研究課題名（和文）心臓の硬化を制御するG蛋白質共役受容体の機能解明と心不全治療薬シーズの探索

研究課題名（英文）The role of GPCR in cardiac diastolic dysfunction

研究代表者

竹藤 幹人（Takefuji, Mikito）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20709117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、加齢および心不全により発現が増加する機能未知のGタンパク質共役受容体（GPCR）を網羅的に解析し、心不全発症に関与するGPCRを同定する。GPCRは主な創薬ターゲットであるが、800種以上あるGPCRの中で循環器分野の治療標的となっているのは、遮断薬とアンギオテンシン受容体拮抗薬と限られており、これらの薬剤は高齢者心不全への治療効果は乏しい。数多くあるGPCRの中に新たな心不全標的分子があると考え、また、創薬法が蓄積されたGPCRは新たな治療法開発の実現性が高く、GPCRスクリーニングを行い、従来の心不全療法では治療困難な心不全の新たな治療薬の開発シーズを探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は、本邦における死因の1位である悪性腫瘍に続く2位であり、世界で3000万人以上の患者がいる。心疾患は予後不良であることに加え、後遺症により日常生活をおくる上で大きな障害になることから、特に高齢者の心不全に対する新たな治療法の必要性が高まっている。受容体を標的とする遮断薬やアンギオテンシン受容体阻害薬は心不全治療薬として広く使用されているが、高齢者心不全に対する有効性は乏しい。創薬の主な標的分子である受容体は数多くヒトに発現しており、心不全の新たな治療標的が埋もれている可能性が高く、本研究の成果は心不全の新たな治療標的を示し、新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we will comprehensively analyze G-protein-coupled receptors (GPCRs) with unknown functions that increase their expression due to aging and heart failure, and identify GPCRs involved in the development of heart failure. GPCRs are the main drug discovery targets, but among the more than 800 GPCRs, only blockers and angiotensin receptor antagonists are the therapeutic targets in the cardiovascular field, and these drugs have little therapeutic effect on heart failure in the elderly. We thought that there was a new heart failure target molecule among the many GPCRs, and GPCRs with accumulated drug discovery methods had a high feasibility for developing new treatment methods, so we performed GPCR screening to search for the seeds of development of new therapeutic drugs for heart failure that are difficult to treat with conventional heart failure therapy.

研究分野：循環器内科

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

慢性心不全の内服治療薬として β 遮断薬及びアンギオテンシン受容体阻害薬の有効性が1980年代に報告されたが、慢性心不全患者数・死亡者数は増え続けているのが現状であり、新たな治療法の開発が期待されている。

近年、収縮力低下に伴う心不全とは異なり、収縮機能が保たれた、拡張不全を主体とする心不全が注目されている。拡張不全を主体とする心不全は高齢者に多く発症し、加齢により組織の弾性率は低下し、肺や骨、血管、脳など全身で組織・臓器の硬化同様、加齢変化の可能性が指摘されている。心臓が硬くなり拮がりにくいために生じる病態は「収縮機能が保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection function: HFpEF)」と呼ばれ、新たな心不全として分類されている。健康寿命の延伸などを図るため、「脳卒中、心臓病対策基本法」が制定され、この分野への重点的な諸政策も開始されている。既存の循環器作動薬を中心に HFpEF 治療が試みられているが、その治療は難しく、標準となる治療法は確立されていない。HFpEF は「心臓が硬くなった心不全」とされているが、心臓が硬くなるという現象がどのような現象なのか不明な点が多く、HFpEF の治療標的となる新たな分子の同定が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、加齢および心不全により発現が増加する機能未知の G タンパク質共役受容体 (GPCR) を網羅的に解析し、心不全発症に関与する GPCR を同定する。GPCR は主な創薬ターゲットであるが、800 種以上ある GPCR の中で循環器分野の治療標的となっているのは、 β 遮断薬とアンギオテンシン受容体拮抗薬と限られており、これらの薬剤は HFpEF への治療効果は乏しい。数多くある GPCR の中に HFpEF の標的分子があると考え、また、創薬法が蓄積された GPCR は新たな治療法開発の実現性が高く、GPCR スクリーニングを行い、従来の心不全療法では治療困難な心不全の新たな治療薬の開発シーズを得ることを目指す。

3. 研究の方法

ヒト組織に発現する GPCR の mRNA の発現量を nCounter 法により解析し、心筋特異的に発現する GPCR を同定した。ヒト組織に加え、マウス心不全モデルにおける、心筋細胞の GPCR の発現量を測定し、心不全により心筋細胞の GPCR の発現量を測定する。心筋特異的に発現する GPCR については、心筋特異的遺伝子欠損マウスを作製し、マウス心不全モデルを用いて、受容体の機能解析を進める。

4. 研究成果

(1) GPCR スクリーニング

GPCR の網羅的解析により、GPCR X と CRHR2 が心臓の高発現をすることを明らかになった。CRISPR/CAS9 システムにより、Cre 発現依存的遺伝子欠損マウスを作製した。研究代表者が開発した薬物誘導性心筋特異的 Cre マウス (竹藤ら、Circulation 2012) と交配し、心筋特異的遺伝子欠損マウスを作製した。

(2) GPCR X

心筋特異的 GPCR X 欠損マウスに圧負荷心不全モデルを施行し、心臓重量測定による心肥大を検討した。GPCR X 欠損マウスは TAC に伴う心重量増加を抑制したが、既報されてきた分子より、その抑制効果は弱かった。心エコーを用いて拡張障害を評価したところ、遺伝子欠損マウスでは拡張障害の悪化傾向を認めた、病理学的手法などを用いて、評価を進めている。

(3) CRHR2

コルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin releasing hormone : CRH) ファミリーはコルチコトロピン放出因子とも呼ばれ、ヒツジの視床下部から発見されたペプチドである。CRH は 41 アミノ酸のポリペプチドで、196 アミノ酸の preCRH の C 末端が切断され、産生される。生体内ではストレスに反応し、CRH は視床下部で産生され、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌調節に重要な役割を果たしている。急性ストレスに反応される CRH は生体に不可欠であるが、慢性ストレスにさらされて放出される CRH は生体の恒常性に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。CRH にはサブファミリーが報告されており、魚類のウロテンシンと CRH の相同性を認めることから、ウロコルチン (Urocortin: UCN) と命名されている。CRH、UCN が結合する受容体として CRHR1 と CRHR2 が同定され、(1) にて施行したスクリーニングの結果、

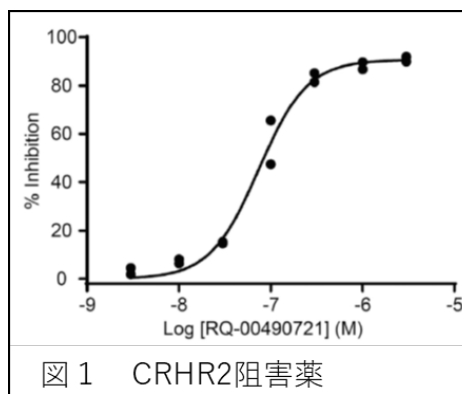


図1 CRHR2阻害薬

CRHR2 が心臓に強く発現することを明らかにした。UCN の短時間投与は強心作用を示すが、UCN2 をマウスに長期投与すると心機能は徐々に低下する。心筋特異的 CRHR2 欠損マウスでは圧負荷による慢性心不全の発症を抑制する CRHR2 阻害薬が心不全の新たな治療薬となる可能性が示唆されたため、CRHR2 阻害薬のリード化合物を開発し、用量依存的に CRHR2 を阻害することを確認した (図 1 : Y Mori, M Takefuji. *Biomed Pharmacother.* 2022 年)。CRHR2 刺激薬 (Ucn2) の刺激によりマウス心臓の CREB のリン酸化が生じ、CRHR2 阻害薬投与により、そのリン酸化は抑制された (図 2)。生体内でも阻害薬が薬効を発揮していることを確認した。さらに、マウス心不全モデルに CRHR2 阻害薬投与により、心臓の拡大が有意に抑制された (図 3)。CRHR2 が心臓の拡張障害を改善するかを現在、評価中である。

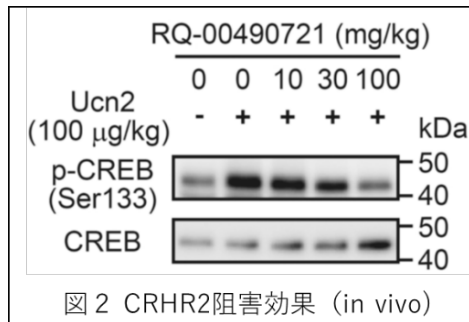


図 2 CRHR2阻害効果 (in vivo)

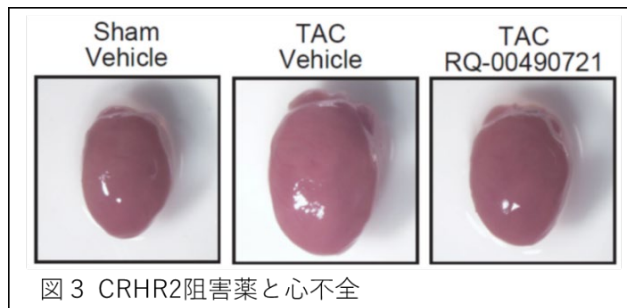


図 3 CRHR2阻害薬と心不全

CRHR2 の下流シグナルを評価するため、Ucn2 負荷有無の心臓サンプル検体を用いたメタボローム解析を施行した (未発表)。Ucn2 はミトコンドリア表面にある GPD2 酵素を調節している可能性が示唆された。そこで、GPD2 が心筋細胞のエネルギー代謝に関与しているかを調べるため、マウス心臓から単離した心筋細胞に GPD2 阻害薬を投与し、心筋細胞の ATP 産生量を測定した (図 4 : S Ishihama, M Takefuji. *FASEB J.* 2021 年。) GPD2 阻害薬投与により心筋における GPD2 が ATP 産生に関与していることが示された。

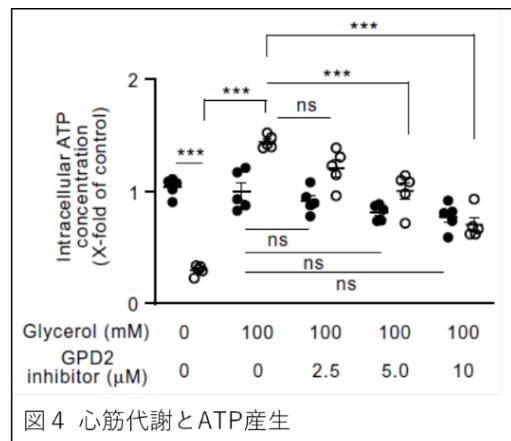


図 4 心筋代謝と ATP 産生

さらに GPD2 の代謝に関連する AQP7 遺伝子欠損マウスを心不全モデルにより評価した。AQP7 遺伝子欠損マウスでは、心不全時の心筋アポトーシスを悪化させることから、AQP7 と GPD2 の代謝経路は心不全時の抗アポトーシス作用を有すると考えられた。Ucn2 負荷ではこの GPD2 の代謝経路を阻害するため、心不全時のアポトーシスを悪化することが考えられた。一方、CRHR2 阻害薬では、心不全時の心筋細胞のアポトーシスを抑制することが期待できる。AQP7 遺伝子欠損マウス、GPD2 遺伝子欠損マウスを心不全モデルにより評価すると、いずれの遺伝子欠損マウスも心不全モデルによる心機能の低下をさらに悪化させた。研究代表者が提唱した心不全時の心筋代謝経路を示す (図 5)。今後、心臓の拡張には多くの ATP が必要とされているため心臓の拡張障害について評価を進めている。

今後の展望

心疾患は、本邦における死因の 1 位である悪性腫瘍に続く 2 位であり、世界で 3000 万人以上の患者がいる。心疾患は予後不良であることに加え、後遺症により日常生活をおくる上で大きな障害になることから、特に高齢者の心不全に対する新たな治療法の必要性が高まっている。

GPCR を標的とする β 遮断薬やアンギオテンシン受容体阻害薬は「心収縮力低下を伴った心不全」の治療薬として広く使用されているが、HFpEF に対する有効性は示されていない。創薬の主な標的分子である GPCR は 800 種以上あり、HFpEF の治療標的となる GPCR が埋もれている可能性があり、本研究の成果は心不全との関連が報告されていない受容体であり、心不全の新たな治療標的となることを示し、治療法の開発に繋がることを期待される。

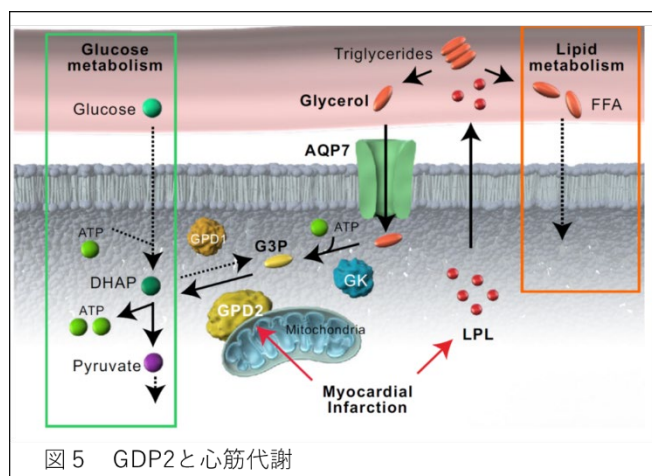


図 5 GDP2 と心筋代謝

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ishihama Sohta, Ouchi Noriyuki, Sakaguchi Teruhiro, Tsuda Takuma, Kato Katsuhiko, Yagyu Hiroaki, Wetttschureck Nina, Kubota Naoto, Offermanns Stefan, Kadowaki Takashi, Murohara Toyooki, Takefuji Mikito	4. 巻 35
2. 論文標題 LPL/AQP7/GPD2 promotes glycerol metabolism under hypoxia and prevents cardiac dysfunction during ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100882R	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 Mori Yu, Tsuchihira Ayako, Yoshida Tatsuya, Yoshida Satoya, Fujiuchi Akiyoshi, Ohmi Masashi, Isogai Yumi, Sakaguchi Teruhiro, Eguchi Shunsuke, Tsuda Takuma, Kato Katsuhiko, Ohashi Koji, Ouchi Noriyuki, Park Hyi-Man, Murohara Toyooki, Takefuji Mikito	4. 巻 146
2. 論文標題 Corticotropin releasing hormone receptor 2 antagonist, RQ-00490721, for the prevention of pressure overload-induced cardiac dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112566 ~ 112566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.112566	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹藤幹人
2. 発表標題 Protein kinase N promotes cardiac dysfunction by mediating the interaction of myocardin-related transcription factor A with actin.
3. 学会等名 日本循環器学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikito Takefuji
2. 発表標題 G-protein-mediated cellular signaling in heart failure
3. 学会等名 Advances in Cardiovascular Medicine and Research-2023 (ACMR-2023)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023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
研究分担者	榎本 篤 (Enomoto Atsushi) (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	室原 豊明 (Murohara Toyoaki) (90299503)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	天野 睦紀 (Amano Mutsuki) (90304170)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

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		
ドイツ	Max-Planck Institue		