

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17167

研究課題名（和文）右心不全特異的な分子標的療法の創出に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research for creating specific therapy against right heart failure

研究代表者

伊藤 章吾（Ito, Shogo）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60647808

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）：本研究は、右心不全に対する分子標的療法を創出することを目的とした研究である。なぜなら、右心不全に対する特効薬は存在しないためである。右心不全だけを改善する治療ターゲットを探すため、網羅的遺伝子発現解析を行うと、右心室で補体副経路が活性化していることが分かった。次に補体副経路を阻害する種々のマウスに対して肺動脈結紮モデルを作成したところ、右室機能が悪化せず、催不整脈性が抑制され、ここまでの研究業績は論文化された。この経路は何らかの免疫担当細胞が介在している可能性を考え、C3aが機能修飾するTh17細胞から分泌されるIL-17、IL-22に着目し、現在ノックアウトマウスを用いた解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、右心室の機能低下である“右室不全”の治療薬を創り出したいと思っています。なぜなら、左心機能に悪影響を与えない右室不全の特効薬は存在しないからです。我々はマウスの実験によって、補体副経路という免疫に関わるタンパク群を阻害することで、右室不全が改善することを発見しました。補体の阻害剤は既に他臓器の疾患に使用されており、それを右室不全へと応用できることを目標に、どのような機序を介して右室不全が改善したり悪くなったりするかについて更に研究を進めたいと考えています。

研究成果の概要（英文）：This study aims to create a molecular target therapy for right ventricular failure. This is because there is no specific therapy against right ventricular failure. To find a therapeutic target to improve only right heart failure, global gene expression analysis was performed and it was found that the alternative complement pathway is activated in the right ventricle. Next, when pulmonary artery constriction models were created in various knockout mice that inhibited the alternative complement pathway, accordingly right ventricular function was preserved, arrhythmogenicity was also suppressed. The research results have been published in Nature Communications 2023. In addition, we thought that the functional modification to immunocompetent cells would be underlying in this phenotype, therefore we focused on IL-17 and IL-22, which are secreted from Th17 cells whose functions are mainly modified by C3a, and are currently continuing analysis using knockout mice.

研究分野：分子生物学、循環器内科学

キーワード：右室不全

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は、我が国において癌とともに主要な死因である。発症者が若年～壮年期～高齢者にあまねく存在することも癌との共通点であり、画期的治療法の開発が求められる分野である。心不全には左心室の障害に起因する左室不全と、右心室の障害に起因する右室不全がある。しかし、古くから右心室から肺への駆出は左室収縮の力によってもたらされると報告されており(Rushmer RF, et al. Circ Res 1962;10: 17-26.)、左心不全の治療法によって右室収縮能は改善すると考えられていたため、右室不全の特異的な治療法は存在しない。しかし、心不全時の右室機能の低下によって既存の心不全治療薬は循環動態を悪化させ、他臓器障害も悪化する。このため、右室不全特異的な治療法の開発は急務であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、右心不全及び心不全に合併した右室機能低下に対して特異的な分子標的療法を創出することである。なぜならば、右心不全に特異的な薬物療法は存在しないからである。我々は、はじめに右室の心筋と左室の心筋を網羅的遺伝子発現解析を行い、いくつかの興味深い発現変動遺伝子の中から補体副経路に着目した。補体経路は自然免疫に重要な蛋白群として知られているが、心臓に対する役割は分かっていない。我々はその点に着目することとした。

まず、補体 C3 ノックアウトマウスを用い、肺動脈結紮術を行い右室不全モデルを作製したところ、野生型の右室不全モデルよりも右室の収縮能が良好に保たれた。更に、補体 C3a 受容体阻害剤を投与したところ、右室機能低下が抑制された。このことから、補体副経路の抑制によって右室不全が改善する可能性があると考え、メカニズムの解明を行うものである。

## 3. 研究の方法

### 1. ラット初代培養心室筋細胞を用いた in vitro 解析

この実験は C3a の心筋細胞に対する効果を検討する。C3a リコンビナントタンパクを培養心筋細胞へ投与すると、複数の MAP キナーゼの活性化を介し、心筋の機能低下をもたらした。このため、キナーゼ阻害剤の投与・ノックダウン実験を行った。

### 2. ノックアウトマウスを用いた in vivo 解析

マウス右室不全モデル (PAC モデル) を用いた解析

肺動脈結紮 (PAC) モデル作製後、心エコーを行うと 14 日目で右室収縮能が低下する。C3a 受容体阻害剤投与では右室収縮能が改善したため、C3 ノックアウトマウス、C3a 受容体ノックアウトマウスを用いて PAC モデル作製を行ない、心エコー検査を行う。既に C3 ノックアウトマウスを用いた解析を行っており、PAC 後の右室収縮能が低下しなかったことを確認した。

補体経路の各種ノックアウトマウスを用いた解析

右心不全に C3-C3a 経路が関与しているかは、C3-C3a 経路に関わるすべてのノックアウトマウスに対して右室不全モデルを作成することで解明を試みた。

C3a によって活性化されたマクロファージの影響の検討：骨髄移植モデル

C3a は産生部位近傍のマクロファージの機能修飾を行ない、更にオートクラインな C3a の分泌により、連鎖的な機能修飾が起こる (Liszeuski, et al. Immunity 2013.)。

これに対し、主に野生型 PAC マウスに放射線照射の後、野生型及びノックアウトマウスに対して骨髄移植モデルを作製し、表現型解析を行う。(令和 3 年度に終了予定)

右心不全時の補体 C3 発現の意義の検討

野生型マウスにおいて右心不全時に右室で補体 C3 の発現が増加しているが、この現象が心不全に影響するかを検討したい。このため心筋特異的 C3 ノックアウトマウスを作製し、心臓の発生異常の有無について検討し、さらに右室不全時にどのような表現系となるかを評価する。

## 4. 研究成果

主な結果を下に記す。

まず右室特異的な遺伝子発現パターンを解明するために、成獣オスマウスの心室を右室、左室、心室中隔に分けて網羅的遺伝子発現解析を行うと、右心室で補体副経路が活性化していることが分かった。補体副経路は自然免疫に重要なタンパクであるが、心臓での役割は分かっていない。

補体副経路を阻害することでマウスの右心不全モデルで右室機能が悪化しなかったことから、補体副経路を阻害すれば右心不全を治療できるようになると考え、メカニズムの解明を行った。主に、C3 ノックアウトマウスに対して肺動脈結紮モデルを作製す

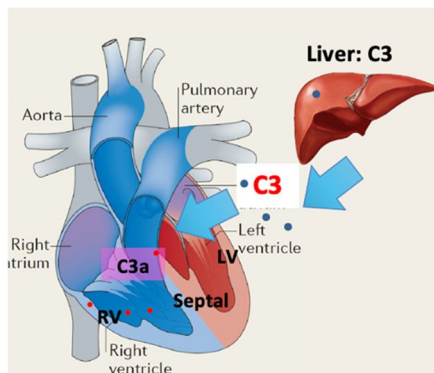
ると右室不全の進展が有意に抑制されること、心不全や線維化関連遺伝子発現も抑制された。さらに、C3KO マウスの肺動脈結紮マウスでは催不整脈性が抑制された。さらに、これらと同様の事象が C3a 受容体阻害剤によっても確認された。さらに、補体 C3-C3a 経路の中で重要な Cfd ノックアウトマウスを作製し右室不全モデルを作製したところ、右室機能の低下が有意に抑制された。

さらに、マウスに対する不整脈誘発実験を行った。主に右室不全モデルの野生型と C3 ノックアウトマウスを比較して、C3 ノックアウトマウスでは電気刺激による心室頻拍が優位に抑制された。さらに、単離心筋細胞を用いたカルシウムイメージング実験を行ったところ、C3 ノックアウトマウスは右室不全モデルであっても細胞単位でカルシウムスパークリングによる催不整脈性が抑制されていた。

培養細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析で、C3a の直接の下流にあたる転写制御因子 CEBP とケモカイン CCL5 が、C3a の直接下流として発現上昇していることがわかった。これら二つの因子は、in vivo 実験でも共通して右室不全モデルで発現上昇しており、C3-C3a 経路の阻害によって発現が有意に抑制されていた。

これらの実験結果は、2022 年に Nature Communications 誌に掲載された。現在も、C3a の下流として発現が大幅に変化する Th17 細胞から分泌される炎症性サイトカインが右室不全の病態の確立に寄与するかを実験的に検討している。

実験期間中に COVID-19 が流行し、動物の交配や動物モデル作製実験は閉鎖空間で行うため、実験の停止を余儀なくされ、動物は維持交配のみしか行うことができない期間が 2020 年 3 月から 2021 年 10 月まで続いた。このため、実験の進行に遅滞が生じ、申請者らの科研費の延長申請を複数回行った。この影響で、特に C3a 受容体ノックアウトマウスは基から産出仔体が少ない系統であり、維持交配の最中に系統が途絶してしまった。それによって、当初計画していた骨髄移植実験は全く行うことができず、実験規模を縮小せざるを得なかった。



図

肝臓で産生される補体 C3 は右室で Cfd の働きによって C3a へと変化し、右室不全時には C3a の産生量が増加する。

この経路を阻害することで、右室不全が改善することを発見した。

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 Ito Shogo, Hashimoto Hisayuki, Yamakawa Hiroyuki, Yuasa Shinsuke, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 The complement C3-complement factor D-C3a receptor signalling axis regulates cardiac remodelling in right ventricular failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33152-9	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 伊藤章吾、福本義弘	4. 巻 43
2. 論文標題 右心不全に対する補体系の役割の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 9-12
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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shogo Ito, Shinsuke Yuasa, Hiroyuki Yamakawa, Jin Komuro, Hisayuki Hashimoto, Mai Kimura, Eichi Nakao, Keiichi Fukuda, Yoshihiro Fukumoto
2. 発表標題 Development of molecular targeted therapy against right ventricular failure: involvement in complement C3- factor D- C3a pathway
3. 学会等名 Basic cardiovascular science 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤章吾
2. 発表標題 補体C3-D因子-C3a受容体のシグナル経路は右室不全における心臓リモデリングを制御する
3. 学会等名 第8回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤章吾
2. 発表標題 右心不全特異的な分子標的療法の創出に向けた基盤研究
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤章吾
2. 発表標題 マウスを用いた補体副経路の制御による心室細動抑制効果の検討
3. 学会等名 第266回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shogo Ito, Shinsuke Yuasa, Jin Komuro, Toshiomi Katsuki, Mai Kimura, Dai Kusumoto, Hisayuki Hashimoto, Ryohei Majima, Keiichi Fukuda, Hiroki Aoki, Yoshihiro Fukumoto.
2. 発表標題 Development of molecular targeted therapy against right ventricular failure: involvement in a network of immunocompetent cells
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Science 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shogo Ito, Shinsuke Yuasa, Takahiro Nakamura, Yohei Akiba, Jin Komuro, Toshiomi Katsuki, Mai Kimura, Dai Kusumoto, Hisayuki Hashimoto, Keiichi Fukuda, Yoshihiro Fukumoto.
2. 発表標題 Development of molecular targeted therapy against right ventricular failure: involvement in a network of immunocompetent cells
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------