

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16015

研究課題名（和文）HFpEF治療におけるキサンチン酸化還元酵素（XOR）の有効性の検討

研究課題名（英文）The role of xanthine oxidoreductase in the development of heart failure with preserved ejection fraction

研究代表者

渡部 賢（Watanabe, Ken）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40787248

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：医学の進歩にも関わらず、心不全は増加傾向にある公衆衛生上重要な問題である。HFpEFは有効な治療法が未だ確立していない。新たな治療薬の開発が期待される。我々は、HFpEF患者において、キサンチン酸化還元酵素（XOR）活性が予後と関連することを報告した。XORは、活性酸素種の産生に重要な役割を果たす。マウスHFpEFモデルを作成し、各臓器のXOR発現や活性を比較したが、対照群と有意な変動を認めなかった。心組織のRNAシーケンス解析を行ったが、XORと関連する遺伝子の変動を認めなかった。マウスHFpEFモデルは、人のHFpEFの病態とXOR活性に関しては異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HFpEFの治療法は確立しておらず、新たな治療薬の開発が期待される。HFpEFの病態解明が重要であり、我々はXORについて検討を行った。マウスと人では、尿酸代謝が異なることが知られている。マウスHFpEFモデルを用いて、XORが拡張障害に与える影響を検討した。残念ながら人と異なりマウスHFpEFモデルにおいて、XORは活性化していなかった。XOR活性の研究には、適切なHFpEFモデルの作成または動物種の変更が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Heart failure (HF) with preserved ejection fraction (HFpEF) is an unmet medical need due to its increasing prevalence, high morbidity and mortality, and lack of proven treatment. Xanthine oxidoreductase (XOR), the rate-limiting enzyme of purine metabolism, plays an important role in uric acid production and generates reactive oxygen species. We have reported that XOR activity was associated with clinical outcomes in patients with HFpEF. Thus, we examined the functional role of XOR in the development of HFpEF. We induced HFpEF in mice by feeding high-fat diet and L-NAME containing water. Unfortunately, mRNA and protein expression levels of XOR were not significantly altered in HFpEF mice compared to control mice. RNA sequence analysis of cardiac tissues from HFpEF mice identified several differentially expressed genes, however genes involved in XOR were not significantly altered. Further examinations are required to reveal the impact of XOR activity on cardiac diastolic dysfunction.

研究分野：Cardiology

キーワード：XOR HFpEF HFD+L-NAME

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩にも関わらず、心不全は増加傾向にある公衆衛生上重要な問題である。心不全は、左室収縮能(Left ventricular ejection fraction: LVEF)により、3つに分類される。LVEFの低下した心不全(Heart failure with reduced ejection fraction: HFrEF)、LVEFが軽度低下した心不全(Heart failure with mid-range ejection fraction)、そしてLVEFの保たれた心不全(Heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF)である。加齢に伴い、HFpEFが増加すること見込まれている。標準治療が確立したHFrEFとは異なり、HFpEFは有効な治療法が未だ確立していない。新たな治療薬の開発が期待される。そのため、新たな治療標的を検討するために、HFpEFの機序を解明することは重要である。

HFpEFの背景疾患とされる高血圧、糖尿病、肥満、メタボリックシンドロームなどの状態では、血中のインターロイキン-6 (IL-6) や腫瘍壊死因子 (TNF- α) が高値で全身性炎症が生じている (J Am Coll Cardiol. 2013; 62: 263-271)。同様に、これらは酸化ストレスによる血管内皮障害を惹起し、HFpEF発症に寄与すると考えられている。

生活習慣病をはじめとした種々の併存疾患から活性酸素種が誘導され心筋細胞にストレスをかけHFpEFの発症につながる。その機序として、心筋細胞に活性酸素種が誘導されると小胞体ストレスが増大し心機能障害を引き起こすことが知られている。キサンチン酸化還元酵素 (XOR) は尿酸産生のみならず、活性酸素種の産生にも重要な役割を果たす。我々は、以前HFpEF患者において、キサンチン酸化還元酵素 (XOR)活性が予後と関連することを報告した(ESC heart fail. 2020;7:1735-1743)。本研究では、HFpEFにおけるXORが果たす役割を検討し、XOR阻害薬やXORノックアウトマウスを用いて、その治療的意義について検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HFpEFモデルマウスを用いて、HFpEFの発症および進展におけるXORの役割を検討することである。HFpEFの病態にXORが関与することがわかれば、XOR阻害剤やノックアウトマウスを用いて、治療標的となるか追加の検討を行う。

3. 研究の方法

L-NAMEを混ぜた飲料水と高脂肪食を給餌することでHFpEFマウスを作成した。臓器毎にXORのmRNAと蛋白質発現の変化を検討し、ELISA法でXOR活性を測定した。血管内皮細胞におけるXORに注目し、ヒト臍帯静脈内皮細胞を培養し、XOR活性を測定した。

4. 研究成果

HFpEFマウス作成

マウスに、L-NAMEを混ぜた飲料水と高脂肪食を給餌することで、HFpEFを誘導した。5週間後に評価したところ、マウスの体重は有意に増加し、心筋重量/脛骨長比は有意に増加した。心臓超音波検査上、心収縮能は保たれていたが、E/e'やE/Aなどの指標は拡張障害を示した。HFpEFが5週間で誘導されることが確認された。その後、8週・16週に再度心臓超音波検査を施行したところ、左室収縮能は保たれていたが、拡張能は一貫して低下していた。このことから、HFpEFモデルは5週間のHFD+L-NAMEで持続的に誘導できることがわかった。一方、同モデルは心不全が誘導されているにもかかわらず、すべてのマウスが16週間の観察期間を生存した。そのため、XOR阻害剤による生存率の検討は困難と判断した。

人において血清尿酸値は、XOR活性と腎機能障害による排泄障害の影響を受ける。腎機能がXOR

活性与える影響は知られておらず、HFpEF マウスの腎機能を評価した。予想に反して、HFpEF マウスでは、血漿クレアチニン値と尿素窒素値が対照群に比較して、低値を示した。以上より、HFpEF マウスでは、腎機能障害は来していないことが示唆された。マウスは尿酸代謝系が、人と異なっており詳細な尿酸値への影響は検討しなかった。

腸間膜脂肪組織、精巣上体脂肪組織、皮下脂肪組織などの各脂肪組織や肝臓、小腸、肺、心臓などにおける XOR の発現をウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法で解析した。HFpEF マウスは野生型マウスに比較して、XOR 発現は mRNA および蛋白質レベルで明らかな変化を認めなかった。また ELISA キットを用いて心臓・肺・肝臓・腎臓・(精巣上体)脂肪の XO 活性測定を行った。しかし、対照群と HFpEF モデルマウスとの間に有意な差は認めなかった。以上を踏まえて、臓器の発現量の変化がないため、Cre/loxP システムや CRISPR-Cas9 システムを用いて XOR ノックアウトマウスを作成することは断念した。

HFpEF マウスに心臓組織において、PKR-like ER kinase (PERK)、inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6) の3種類の小胞体ストレスセンサーの発現量の変化をウェスタンブロット法で評価した。IRE1 は、非特異的バンドが多く、評価困難であった。他方、PERK や ATF6 に関しては、HFpEF マウスと野生型マウスにおいて、蛋白質発現に有意差を認めなかった。

上記を踏まえ、L-NAME を混ぜた飲料水と高脂肪食を給餌することで誘導した HFpEF の遺伝子を網羅的に解析するために、心臓組織の RNA シークエンス解析を追加した。多くの発現変動遺伝子を認めたが、尿酸代謝や XOR に関する遺伝子の変動を認めなかった。以上より、同モデルは XOR の検討を行う上で、不適切なモデルであった可能性が示唆された。

ヒト臍帯静脈内皮細胞細胞実験

ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて IL-6 や TNF- α 刺激を行い、内皮細胞における XOR の発現をウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法を用いてタンパク質や mRNA レベルで解析した。それぞれの刺激において、経時変化をまず解析した。0, 1, 3, 6, 12, 24 時間の段階でサンプルを回収した。しかしながら、ヒト臍帯静脈内皮細胞において、XOR の発現が少なく解析が困難であった。経時的な変化でみても、炎症性サイトカイン刺激を行っても、XOR の mRNA や蛋白質発現に明らかな変化を認めなかった。

XOR は臓器や細胞毎に活性が異なっている。しかし、HFpEF を誘導しても、腸間膜脂肪組織、精巣上体脂肪組織、皮下脂肪組織などの各脂肪組織や肝臓、小腸、肺、心臓での発現変化に統計学的有意差を認めなかった。心不全において XOR 活性が上昇していることは知られている。XOR の検討を行う上で、有用な HFpEF モデルマウスの必要性が示唆された。XOR が高発現する臓器を再検討し、多臓器連関の観点から HFpEF 発症における XOR の意義を検討していく必要があると考えられた。

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

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