

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16086

研究課題名(和文) 心臓への圧負荷に対するジペプチジルペプチダーゼIIIの作用機序

研究課題名(英文) Role of dipeptidyl peptidase III on cardiac pressure overload

研究代表者

米野 雅大 (KOMENO, Masahiro)

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：40866307

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)：DPPIIIノックアウトマウス(DPPIII KO マウス)を用いて心圧負荷モデルマウス(Transverse aortic constriction: TAC)マウスを作成し、DPPIIIの有無による心機能や圧負荷に対する影響を検討した。DPPIII KO マウスにTACを行ない、12週間心臓超音波検査により循環動態を追跡した。TAC 6週以後において野生型よりEFやFSが有意に低下していた。さら後壁、中隔壁、前壁厚で野生型と比較して有意な肥厚が確認された。摘出心臓を用いたピクロシリウスレッド染色により心臓繊維化の評価を行ったところ、DPPIII KO マウスでは顕著な繊維化が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPPIIIは、ジペプチジルペプチダーゼファミリーに属するペプチダーゼであり、DPPIIIは生体内で様々な細胞の細胞質に発現している。本研究の目的は、主としてDPPIIIノックアウトマウスを用いて、心臓への圧負荷状態における心筋DPPIIIの作用機構を明らかにすることである。本研究で心臓機能低下の主因である心圧負荷状態における心筋細胞でのDPPIIIの作用機構を分子レベルで明らかにすることができれば、心不全に対する新規治療戦略開発へのアプローチとなるなどの創造性や波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed Transverse aortic constriction (TAC) on DPPIII knockout mice (DPPIII KO mice) and wild-type mice to create a mouse model of cardiac pressure overload. The effects of DPPIII on cardiac function and pressure loading were examined. DPPIII KO and wild-type TAC mice were followed for 12 weeks by echocardiography for circulatory dynamics. Ejection fraction and fractional shortening were significantly lower in DPPIII KO mice than in wild-type mice after 6 weeks of TAC. In addition, significant thickening was observed in the left ventricular posterior wall, ventricular septal wall, and left ventricular anterior wall thickness compared to the wild type. In histochemical staining, cardiac fibrosis was assessed by picrosirius red staining. DPPIII KO mice heart showed more pronounced heart fibrosis than wild-type mice one .

研究分野：病態生化学

キーワード：ジペプチジルペプチダーゼ 心臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DPPIII は、ジペプチジルペプチダーゼファミリー (DPPI~DPPX で構成される) に属するペプチダーゼであり、同ファミリーにおいては糖尿病治療薬のターゲットにされている DPPIV が有名である。DPPIII は 3~10 アミノ酸残基より構成される比較的小さなペプチドを加水分解できるが、DPPIV の基質である GLP-1 は分解できず、血糖調節作用はないなど DPPIV とは異なった特性を持つ酵素である。生体内で発現する DPPIII の作用機序についてはほとんど研究が行われておらず不明なままである。DPPIII は生体内で様々な細胞の細胞質に発現し、その中でも心筋細胞で高発現している。しかし現時点では、心筋における DPPIII の生理的・病理的な役割やその作用メカニズムは全く分かっていない。心臓、特に、左室心筋への圧負荷は、高血圧 (日本で約 3,000 万人と推定) や、加齢によって生じやすくなる大動脈弁狭窄症などで頻繁に見られる病態であり、継続的な心圧負荷は心筋ダメージ、心機能低下を経て心不全を引き起こす。心不全は今なお 5 年生存率が約 50% しかなく予後不良で、国内外で急速に増加している上、根本的な治療法に乏しい。様々な観点による心不全の病態研究と解明は循環器領域における世界的な重要課題である。この問題の解決を目指して、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を活用し DPPIII ノックアウトマウスを独自に作製した。本研究では心血管系に圧負荷をかけた場合の DPPIII ノックアウトマウスの表現型について心臓を中心に解析し、DPPIII が心筋で担っている役割とその分子機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では心血管系に圧負荷をかけた場合の DPPIII ノックアウトマウスの表現型について心臓を中心に解析し、DPPIII が心筋で担っている役割とその分子機構を明らかにすることが目的である。申請者の DPPIII に対するこれまでの知見から、心筋に内在する DPPIII は心臓への圧負荷に対する防御作用があるのではないかと考えている。DPPIII に関して構造解析などの基礎的研究はいくつか行われているが、生体で内在性に発現しているこの酵素の *in vivo* での検討は全く見当たらない。本研究で心圧負荷状態における心筋細胞での DPPIII の作用機構を分子レベルで明らかにすることができれば、心不全研究の新たな研究分野開拓に資するだけでなく、心不全に対する新規治療戦略開発へのアプローチとなるなどの創造性や波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

心臓への圧負荷に関しては、「大動脈縮窄 (Transverse aortic constriction: TAC) マウス」を利用することで検討する。

「TAC マウス」

大動脈弓部を外科的に縮窄することで TAC 手術より近位部 (心臓側) で、素早く心圧負荷 (通常血圧より約 40 mmHg 増) をかける。コントロールとしてシャム手術を行う。

上記マウスモデル作製前と作製後 12 週間の血行動態 (血圧、心拍数) モニタリング、心エコーによる心機能評価を 1 週間ごとに行い解析した。心エコーでは、心ディメンジョンと心収縮能以外に、心拡張能についても評価した。4 週間ごとに安楽死させ、心臓を摘出して、光顕レベルでの組織学的な心筋性状および心筋線維化を観察した。

4. 研究成果

1) 通常条件下での DPPIII 欠失の心筋への影響

DPPIII ノックアウトマウスは Crisper-Cas9 システムを利用して作成した。作成したノックアウトマウスは DPPIII exon4 のうち 5 塩基欠失した個体と 8 塩基欠失した個体が作出された。それぞれを DPPIII 5 ノックアウトマウスおよび DPPIII 8 ノックアウトマウスとして使用し

た。このノックアウトマウスはメンデルの法則の通りの割合で出生し、野生型と同様な成長・成熟が見られた。免疫組織学的解析では野生型では心筋に DPP111 が豊富に検出されたが、DPP111 ノックアウトマウスではその発現が欠失していることが確認された。血行動態解析ではコントロールマウスと比較して、脈拍数や血圧などに変化は見られなかった。心臓超音波検査を用いた左室収縮機能や拡張期の心室中隔厚や左室内径、左室下壁厚においても差は見られなかった。老化細胞は、老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA β -Gal ; senescence associated β -galactosidase) 活性のような共通の生化学的マーカーを呈する。加齢(80週令程度) DPP111 ノックアウトマウスの心臓を安楽死後、摘出して組織蛍光染色を行い確認したところ、野生型マウスよりもはるかに多くの SA β -Gal が検出された。

加齢による心筋細胞の老化が DPP111 の欠失により野生型よりも早く進行することが示された。

2) 圧負荷条件下での DPP111 欠失の心筋への影響

心圧負荷モデルマウス(大動脈縮窄(Transverse aortic constriction: TAC)マウス)を作成し、DPP111の有無による心機能や圧負荷に対する影響を検討した。DPP111ヘテロマウスを用いてTACを行ない、12週まで1週ごとに心臓超音波検査により心臓の状態を追跡した。左室駆出率(Ejection fraction; EF)や左室内径短縮率(fractional shortening ; FS)といった心機能において、DPP111 5ヘテロノックアウトマウスは野生型と比較して変化が認められなかった。また同様に DPP111 8ヘテロノックアウトマウスにおいても変化は認められなかった。さらに各壁厚についても計測を行った。拡張期心室中隔壁厚(interventricular septum ; IVS), 拡張期左室後壁厚(left ventricular posterior wall; LVPW), 拡張期左室内径(left ventricular internal dimension; LVID)について検討したが、これについても野生型マウスと DPP111 5ヘテロノックアウトマウス、DPP111 8ヘテロノックアウトマウスのいずれの群においても変化は認められなかった。12週終了後安楽死を行い心臓と肺を摘出しそれぞれの湿重量を測定したが、これにおいてもいずれの群においても変化は認められなかった。

そこで、DPP111 5ホモノックアウトマウスおよび DPP111 8ホモノックアウトマウスを用いて同様の検討を行った。TAC後6週以後において DPP111 5ヘテロノックアウトマウス、DPP111 8ヘテロノックアウトマウスともに野生型より EF や FS が有意に低下していた。さらに各壁厚については DPP111 5ヘテロノックアウトマウス、DPP111 8ヘテロノックアウトマウスともに LVPW が6週以後、IVS、LVID が8週以後に野生型と比較して有意な肥厚が確認された。12週終了後安楽死を行い心臓と肺を摘出しそれぞれの湿重量を測定すると、DPP111 5ヘテロノックアウトマウス、DPP111 8ヘテロノックアウトマウスともに野生型と比較して心臓重量が増加しており、肺重量においては顕著な増加が確認された。摘出した心臓を用いて組織染色を行った。HE染色で心筋形状について確認したところ、DPP111ヘテロノックアウトマウスでは心筋繊維の肥厚が確認された。またピクロシリウスレッド染色により心臓繊維化の評価を行ったところ、顕著な繊維化が確認された。

圧負荷による心臓肥大や心臓繊維化、それに伴う対償性心機能低下が DPP111 の欠失により野生型よりも早く進行することが示された。

本研究により DPP111 は心筋において、細胞老化や圧負荷による心筋ストレスや障害に対して保護的に作用している可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komeno Masahiro, Pang Xiaoling, Shimizu Akio, Molla Md Raseel, Yasuda-Yamahara Mako, Kume Shinji, Rahman Nor Idayu A., Soh Joanne Ern Chi, Nguyen Le Kim Chi, Ahmat Amin Mohammad Khusni B., Kokami Nao, Sato Akira, Asano Yoshihiro, Maegawa Hiroshi, Ogita Hisakazu	4. 巻 296
2. 論文標題 Cardio- and reno-protective effects of dipeptidyl peptidase III in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100761 ~ 100761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100761	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 Molla Md Raseel, Shimizu Akio, Komeno Masahiro, Rahman Nor Idayu A., Soh Joanne Ern Chi, Nguyen Le Kim Chi, Khan Mahbubur Rahman, Tesega Wondwossen Wale, Chen Si, Pang Xiaoling, Tanaka-Okamoto Miki, Takashima Noriyuki, Sato Akira, Suzuki Tomoaki, Ogita Hisakazu	4. 巻 5
2. 論文標題 Vascular smooth muscle RhoA counteracts abdominal aortic aneurysm formation by modulating MAP4K4 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1071~1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04042-z	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米野雅大
2. 発表標題 ジベプチジルペプチダーゼIIIが糖尿病性腎臓病を抑制する作用機序
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021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
---------	---------