

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09498

研究課題名(和文)特発性肺動脈性肺高血圧症由来心筋細胞の特性解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Characteristics of cardiomyocyte from idiopathic pulmonary arterial hypertension and newly developed treatment

研究代表者

赤木 達 (Akagi, Satoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60601127

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)：特発性肺動脈性肺高血圧症は著明な肺動脈の上昇から右室機能低下を来す疾患である。現在の治療薬は肺血管に作用するものだけで、右室に直接作用する薬剤はない。今回我々は特発性肺動脈性肺高血圧症の線維芽細胞からiPS細胞を作成し、心筋細胞への誘導に成功した。この心筋細胞には低酸素下のみならず常酸素下でも解糖系にエネルギー代謝を頼っている特性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺動脈性肺高血圧症の心筋細胞において、今回明らかになったエネルギー代謝の特性はこれまで知られていない。そのためこの特性に介入できる薬剤を開発できれば、新たな特発性肺動脈性肺高血圧症の治療薬として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) has characteristics with remarkable elevation of pulmonary artery pressure and dysfunction of right ventricular. Drugs for IPAH targets pulmonary arteries but did not directly target right ventricle. In this study we successfully created iPS cells from fibroblast obtained from patient with IPAH. Next, we successfully induced cardiomyocyte. Cardiomyocyte from IPAH patient had characteristic that energy metabolism depends on glycolysis under both normoxia and hypoxia.

研究分野：医学 循環器内科

キーワード：特発性肺動脈性肺高血圧症 iPS細胞 心筋細胞 エネルギー代謝 Warburg効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺動脈性肺高血圧症 (Idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH) は、肺血管攣縮、肺血管内皮細胞及び平滑筋細胞の過増殖やアポトーシス抵抗性による血管リモデリングにより、肺血管狭窄や閉塞を生じ著明な肺動脈圧の上昇をきたす疾患である<sup>1</sup>。この病態には血管拡張因子であるプロスタサイクリンや一酸化窒素の低下及び血管収縮物質であるエンドセリンの上昇が関与している。そのためこれら3因子に対する薬剤が開発され、プロスタグランジン<sub>2</sub>製剤 (PGI<sub>2</sub>)、エンドセリン受容体拮抗剤、一酸化窒素濃度を上昇させるホスホジエステラーゼ5阻害剤や可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激剤が新規肺血管拡張薬として登場した。これら治療薬により平均生存期間が約2.8年だったIPAHの予後は、5年生存率が70%を超えるまでに大きく改善した。

(2) このようにIPAHの肺血管に対する治療は大きく発展している。一方で新規肺血管拡張薬を用いても、その効果を楽しめず肺移植や死亡する症例も少なくない。著明な肺高血圧は右心不全をきたすが、IPAHの心機能低下については不明な点が多い。

肺移植を行うとその直後から肺動脈圧は正常化する一方で、右室肥大や拡大、右心機能低下は残存する。またIPAHでは左室や左心機能障害はないと考えられているが、拡大した右心室により左心室は圧排されており、実際の心筋障害については不明である。以上のような背景からIPAHでは右心室及び左心室の心筋が障害されている可能性がある。動物実験レベルで肺高血圧症の心筋の組織学的な特徴を調べた研究の報告はある。しかしながらヒトIPAH症例から心筋細胞を得ることは難しく、これまでヒトレベルでの研究はない。

(3) 2007年にヒトにおけるiPS細胞樹立の報告がなされ、様々な疾患モデルiPS細胞の作製が可能となった。そしてiPS細胞から疾患の原因となる細胞に分化誘導することで、細胞レベルでの疾患の病態などを調べることが可能となった。そこでIPAH症例の皮膚組織からiPS細胞を作成後心筋細胞に分化させることでその特性を明らかにすることができる。またその特性が解明できれば、心筋細胞に作用する新たなIPAH治療薬につながる可能性がある(図1)。

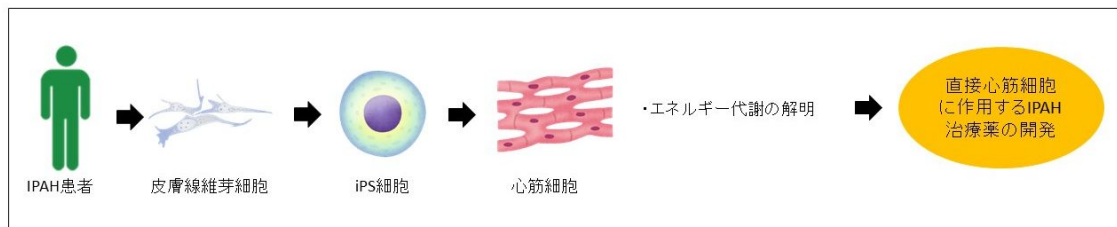


図1

## 2. 研究の目的

今回の研究はIPAH由来iPS細胞より誘導した心筋細胞を用いてその特性を明らかにし、新規肺高血圧治療薬の開発を目指すこと。

## 3. 研究の方法

### (1) IPAH由来iPS細胞の樹立

IPAH患者から皮膚線維芽細胞を培養し、iPS細胞を作成する研究に関して当院倫理委員会の承認を得ている。同意取得が得られたIPAH患者が肺移植など手術を受ける際に、切開創から3×10mm大の皮下組織を採取する。皮下組織を1-2mm大にした後、dishに移し10%FBSで培養すると約2週間で皮膚線維芽細胞が培養される。培養された皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いてOCT4、SOX2、KLF4、c-MYCの4遺伝子を導入し、IPAH由来iPS細胞を作成する。

### (2) IPAH由来iPS細胞から心筋細胞の誘導

作成されたiPS細胞をfeeder freeの状態ですべて単層培養し、CHIR99021、アスコルビン酸およびIWR-1を用いて心筋細胞を誘導する。非心筋細胞を無糖乳酸添加培地及び無グルタミン酸培地により除去し、心筋細胞を精製後、q-PCR、免疫染色で心筋細胞に特異的な遺伝子の発現を確認する。

### (3) エネルギー代謝に関する心筋細胞の特性解明

正常細胞において、常酸素下でグルコースは解糖系によりピルビン酸に代謝され、アセチルCoAに変換されTCAサイクルへ流入する(図2)。低酸素下ではピルビン酸脱水素酵素(PDH)がピ

ルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDK)により不活化されることにより、ピルビン酸は TCA サイクルに流入せず、乳酸脱水素酵素により乳酸へと代謝される。そこで IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞と非 IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞を常酸素及び低酸素チャンバー内で 72 時間培養し、PDK、PDH の発現などを PCR で測定し比較する。

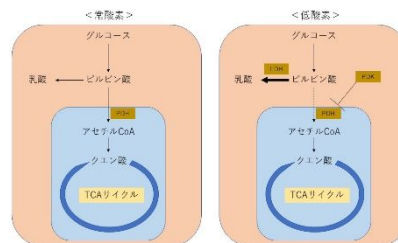


図 2

#### 4. 研究成果

##### (1) IPAH 由来 iPS 細胞の樹立成功

研究期間中に肺移植が行われた IPAH の 1 症例から、皮下組織を提供していただき皮膚繊維芽細胞を培養した(図 3)。その皮膚繊維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC の 4 因子を導入したところ、iPS 細胞の作製に成功した(図 4)。iPS 細胞であることは、OCT4、SSEA-4、SSEA-1、TRA-1-60 による免疫染色にて確認した(図 5)。



図 3



図 4

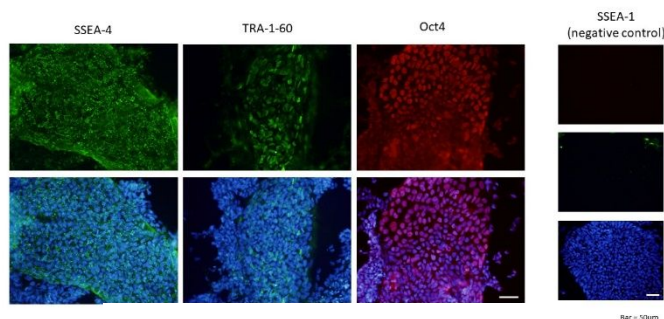


図 5

##### (2) IPAH 由来 iPS 細胞から心筋細胞の誘導成功

作成された iPS 細胞を継代、培養し十分細胞数が増えたところで、GSK3 阻害剤である CHIR99021、アスコルビン酸、Wnt シグナル阻害剤である IWR-1 を順次添加した結果、心筋細胞が誘導された(図 6)。無糖乳酸添加培地、無グルタミン酸培地を用いて精製した後、十分な拍動を有する心筋細胞を得ることができた。これらの細胞は アクチン、トロポニン I の免疫染色にて心筋細胞であることを確認した(図 6)。

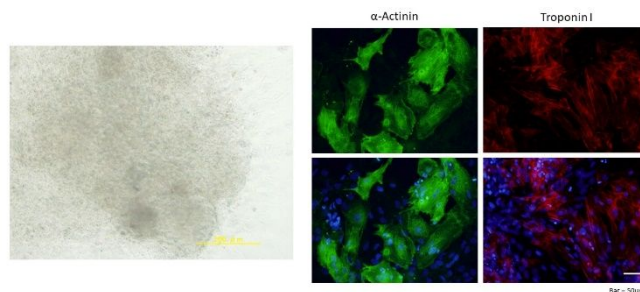


図 6

### (3) IPAH 由来心筋細胞は常酸素下において PDK1 及び PDH の発現が亢進

IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞と非 IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞を常酸素及び低酸素チャンバー内で 72 時間培養した後、RNA を抽出し PDK1 及び PDH の発現を調べた。PDK1 は常酸素、低酸素どちらの状況下でも非 IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞と比べ、IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞ではその発現が亢進する傾向にあった。同様に PDH においても、常酸素、低酸素どちらの状況下でも非 IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞と比べ、IPAH 由来 iPS 細胞から誘導された心筋細胞ではその発現が亢進する傾向にあった。

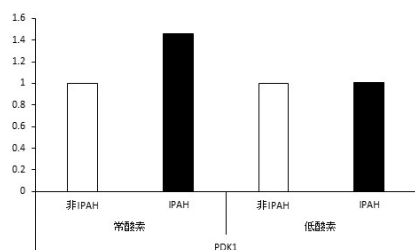


図7

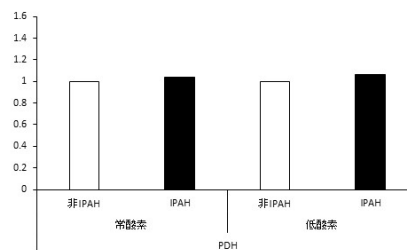


図8

PDK1 は PDH をリン酸化することで、ピルビン酸からアセチル CoA への変換を抑制する。今回 PDH の発現が亢進する傾向にあったが、リン酸化が亢進しているかまでは実験できていない。通常低酸素状況下では PDK1 の亢進、PDH のリン酸化により TCA サイクルを介したエネルギー代謝が起こらず、解糖系に頼ったエネルギー産生となる。低酸素状況下で IPAH 由来心筋細胞では PDK1 と PDH どちらも発現亢進がみられており、PDH の発現亢進はリン酸化した PDH の発現亢進かもしれない。また同様の PDK1、PDH の発現亢進が常酸素下の IPAH 由来心筋細胞でも見られており、IPAH 由来心筋細胞では常酸素下でもエネルギー産生を解糖系に頼っている可能性が考えられた。この現状は Warburg 効果と呼ばれ、腫瘍細胞などにみられる特徴である。腫瘍における Warburg 効果の意義については明らかになっていないが、以下の可能性が示唆されている。核酸やアミノ酸、脂肪酸などのバイオマスの合成量を増加させることにより、増殖が盛んな腫瘍細胞の代謝要求を満たす。ミトコンドリアは主要な活性酸素種の産生器官であるため、自発的にミトコンドリア機能を不活化させ、活性酸素種のレベルを低下させる。解糖系による ATP 合成速度は、TCA サイクルに比べ 100 倍ほど早い。そのため細胞外にグルコースが豊富にある環境では、ATP 産生量が増加し、細胞内活動を維持するために都合が良い。IPAH 由来心筋細胞での Warburg 効果の意義については今後の課題である。また研究期間中に IPAH で肺移植と受けた症例は 1 例のみであった。今後症例を増やして研究を継続していきたい。

#### < 引用文献 >

1. Akagi S et al. Modern treatment to reduce pulmonary arterial pressure in pulmonary arterial hypertension. J Cardiol. 2018 Dec;72(6):466-472.

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 1件）

1. 著者名 Nakamura K, Akagi S, Ejiri K, Yoshida M, Miyoshi T, Toh N, Nakagawa K, Takaya Y, Matsubara H, Ito H.	4. 巻 20(23)
2. 論文標題 Current Treatment Strategies and Nanoparticle-Mediated Drug Delivery Systems for Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E5885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms20235885.	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 Akagi S, Nakamura K, Yokoyama U, Kasahara S, Sarashina T, Ejiri K, Ito H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced EP4 Expression in a Pulmonary Artery Aneurysm With Dissection in a Patient With Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circ Cardiovasc Imaging.	6. 最初と最後の頁 e005839-e005839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCIMAGING.116.005839.	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤木 達、中村一文、廣畑 聡、伊藤 浩
2. 発表標題 Warburg Effect in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 第83階日本循環器学会総会
4. 発表年 2019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	中村 一文  (Nakamura kazufumi)  (10335630)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授    (15301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	斎藤 幸弘 (Sauto Yukihiro) (20724454)	岡山大学・大学病院・医員  (15301)	削除：平成30年3月22日
研究分担者	吉田 賢司 (Yoshida Masashi) (70532761)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師  (15301)	
研究分担者	伊藤 浩 (Ito Hiroshi) (90446047)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  (15301)	