

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08026

研究課題名(和文) DPP-4基質に着目した網羅的解析による新規心臓保護活性物質の探索

研究課題名(英文) Exploratory research on novel cardioprotective agents

研究代表者

高野 博之 (TAKANO, HIROYUKI)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60334190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全モデルマウスを安定して作製し、RNA-seq解析を行うにあたって必要な心臓サンプルを準備した。また、近年注目を集めている拡張不全マウスも作製できるようになったため、このマウスの心臓も実験に用いることとし同時に準備を進めた。また、心不全モデルマウスにおいて、DPP-4阻害薬が心臓線維化を抑制することも認めため、その機序をin vitroの実験系を用いて調べた。DPP-4阻害薬は、DPP-4の基質であるGLP-1の分解・不活化を抑制し血中濃度を増加させることで、cAMP、Epac1を介して心臓線維化を抑制してい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

わが国の心不全患者数は年々増加しているが、この30年間で治療ガイドラインに挙げられている治療薬や治療効果に大きな変化はみられていない。患者の自覚症状や生命予後をこれまで以上に改善する画期的な新規治療薬の開発が待たれる。また、心不全の早期診断・早期治療により重症化に至らぬよう早い段階から心不全の進行を抑えることも必要であるが、心不全の早期診断バイオマーカーはこの10年間で新たなものは出現していない。したがってこれまでとは別の角度から心不全の病態解明にアプローチし、新規治療薬や診断バイオマーカーとなりうる標的候補を探索する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We previously confirmed that DPP-4 inhibition has beneficial effects on the hearts after myocardial infarction (MI) and elucidated novel mechanisms underlying the DPP-4 inhibition-mediated cardioprotective effects. DPP-4 inhibitors are newly available drugs for diabetes mellitus. DPP-4 is a serine protease which cleaves a dipeptide from the N-terminus of incretin. It has been reported that DPP-4 degrades and inactivates many other substrates other than incretin. Interestingly, G-CSF and erythropoietin, which have cardioprotective effects on heart failure, are also reported to be substrates of DPP-4. Therefore, we planned to explore novel cardioprotective agents by using substrates of DPP-4 whose expressions change in case of heart failure. We prepared enough hearts and blood samples from mice models of heart failure. And we elucidated the mechanisms of anti-fibrotic effects by DPP-4 inhibition in heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 トランスクリプトーム解析 DPP-4 バイオマーカー

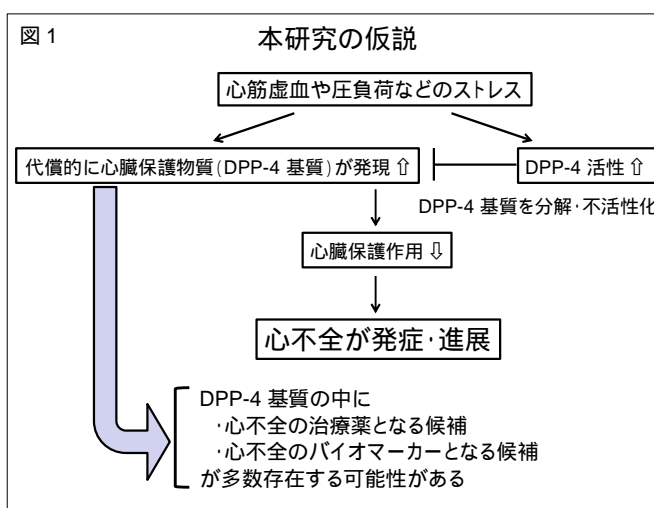
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に伴いわが国での心不全患者数は年々増加している。心不全患者は息切れ、呼吸困難、易疲労感、動悸などの症状のため生活制限が必要となる。また、治療を継続していても心不全の悪化による入退院を繰り返すことから生活の質 (QOL) は著しく低下する。心不全患者の QOL を改善し、入退院による医療費を抑制するためにも効果的な新規心不全治療薬を開発することは喫緊の重要課題である。1980 年代から心不全治療ではレニン - アンジオテンシン系阻害薬や β 遮断薬が使用されるようになり、以前よりも生命予後は改善傾向にあるが治療効果はまだ十分とは言えない (Yancy CW, et al. *Circulation*. 2013)。これまで神経液性因子や炎症関連因子を標的に心不全研究が進められてきたが、この 30 年間は強力な臨床効果をもつ新規心不全治療薬は登場していない (Owens AT, et al. *Circ Res*. 2016)。したがってこれまでとは別の角度から心不全の病態解明にアプローチし、新規治療薬や診断バイオマーカーとなりうる標的候補を探索する必要がある。

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬は次世代の糖尿病治療薬として開発され臨床現場で使われるようになった。DPP-4 は分解酵素のセリンプロテアーゼであり、細胞外領域に dipeptidyl peptidase-4 活性を有し、膜結合型と細胞外領域で切断された可溶性の 2 つのタイプが存在する。食事摂取に伴い小腸から分泌されるインクレチンは、DPP-4 の基質であるため DPP-4 により速やかに分解・不活化される。DPP-4 阻害薬によりインクレチンの分解が抑制される結果、膵臓でのインスリン分泌が促進し血糖が低下する。DPP-4 活性により分解される基質はインクレチン以外にも多数存在する。心不全モデル動物に対する DPP-4 阻害薬の効果を調べた研究結果が報告されているが、作用機序はまだ十分解明されていない。申請者らが行った実験で、マウスの急性心筋梗塞モデルにおいて心筋梗塞後の急性期に血中や心臓の DPP-4 活性が増加することを認めた。低酸素培養下の心筋細胞において DPP-4 の産生が増加することも確認した。また、マウスの心筋梗塞モデルに DPP-4 阻害薬を投与することで血糖降下作用とは関係なく心不全が改善した。同様の効果は DPP-4 遺伝子欠損マウスを用いた実験でも認められた (Kubota A, et al. *J Mol Cell Cardiol*. 2016)。DPP-4 阻害薬による心臓保護作用は圧負荷心不全モデルマウス (高血圧症が原因で発症する心不全モデル) でも認められた (欧州心臓病学会 2017 で発表)。

DPP-4 阻害による心不全改善効果の機序の 1 つに、DPP-4 基質であり細胞保護作用を有するケモカインのストロマ細胞由来因子-1 (SDF-1) が関与していることも明らかにした。DPP-4 により分解される基質は多数存在することから、心不全に DPP-4 が関与している、心臓保護作用を有する生理活性物質 (DPP-4 基質) が DPP-4 により分解されることで心不全が発症・進展する、という可能性が考えられる (図

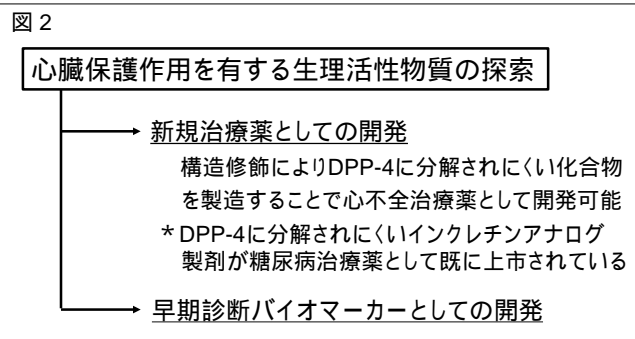


1)。本研究により、DPP-4 基質に新規の心臓保護活性物質が存在するのか解明したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心不全マウスの心臓を用いて次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、発現変動遺伝子群から DPP-4 の基質を網羅的に解析し、その中から心臓保護作用を有する生理活性物質を同定することである。分解酵素 DPP-4 の基質に着目した網羅的解析による心不全研究は国内外で

もまだ進んでいないことから学術的独自性の高い研究と考えられる。本研究ではこれまでとは異なるアプローチで解析することで、新規心不全治療薬の開発だけでなく、心不全の診断バイオマーカーの探索にもつながり、革新的なイノベーションの創出につながり学術的意義と重要性は大きい(図 2)。申請者らの基礎研究の結果、心不全発症前の時期から血中や心臓の DPP-4 活性が増加することから、DPP-4 基質の中に心不全発症早期の診断バイオマーカーとして利用できるものが含まれている可能性がある。本研究により得られる結果は、心不全の発症・進展に関わる新たな制御分子やシグナル伝達経路の解明にも役立つ。また、本研究で行う分解酵素基質に着目した創薬アプローチは、生活習慣病やがんなどの他疾患にも応用展開できる可能性があるため、普遍性に優れた波及効果が期待される。



3. 研究の方法

I. トランスクリプトーム解析によるアプローチ

心不全モデルマウスとして、急性心筋梗塞モデルを用いる。開胸のみのシャムオペ群、心不全無治療群、心不全治療群(DPP-4 阻害薬治療群)の 3 群のマウスから心臓を摘出し、次世代シーケンサー(Illumina 社の HiSeq1500)を使った RNA-seq 解析により、3 群間での発現変動遺伝子(Differentially Expressed Genes; DEGs)プロファイリングを行う。

II. DPP-4 基質であることの確認

I で検出された遺伝子のうち、分泌型タンパク質をコードする遺伝子に着目して以下の実験を続けて行う。DPP-4 は、N 末端から 2 番目のプロリンまたはアラニンを認識して切断する分解酵素である。分泌型タンパク質の構造についてデータベースによる解析を行い、タンパク質構造が DPP-4 の基質であるか検討する。DPP-4 の基質は N 末から 2 番目のアミノ酸がアラニンかプロリンであるため、UniProt(アミノ酸配列データベース)により選出することが可能である。DPP-4 の基質候補となる分泌型タンパク質に GST 標識をつけた GST-分泌型タンパク質を遺伝子導入によって培養細胞(HEK239 や COS-7)に発現させ、培養液中に分泌されたタンパク質を精製し DPP-4 基質であるか調べる。同定したタンパク質を DPP-4 Inhibitor Screening Kit を用いて既存の基質との競合から DPP-4 酵素活性部位への結合能をスクリーニングし、Mass spectrometry を用いて DPP-4 による分解能を解析し、DPP-4 の基質であることを確認する。

III. 標的とする分泌型タンパク質の心臓に対する作用の解析

これまでの実験を継続しながら、特に心臓保護作用に関わる分子を同定し創薬標的としての可能性について調べる。

a) DPP-4 基質の心臓保護作用の解析

申請者のグループは、これまで心臓保護作用を有するタンパク質のスクリーニングとして、新生児ラットの培養心筋細胞を用いてアポトーシスに対する効果を見る実験を行ってきた。培養心筋細胞は酸化ストレスの H₂O₂ による刺激や低酸素培養下でアポトーシスを起こす。培養液中に同定した DPP-4 基質を過剰添加することによりアポトーシスに対する影響を調べる。

b) 心不全モデルにおける発現変動の検証

心不全の早期診断マーカーとしての意義を確認するために、心不全モデルマウスの血液サンプルを用いて、同定した DPP-4 基質タンパク質の発現変動を心不全の発症前後から経時的に調べる。

4. 研究成果

マウスを用いて急性心筋梗塞モデルおよび圧負荷モデルを作製し、心不全モデルとしての再現性を確認した。申請者の研究グループでは、これまで心不全モデルマウスを使った実験を継続的に行い、多くの研究成果を発表してきたが、心不全モデルの作製者が交代したことにより、再現性のある心不全モデルの作製が可能となるまである程度の時間を要した。

作製した心不全モデルは、心エコー検査による心機能解析、病理学的解析、遺伝子発現解析などから実際に心不全が発症していることを確認した。心不全モデルマウスを安定して作製し、RNA-seq 解析を行うにあたって必要な心臓サンプルを準備することに十分な時間を当てた。また、近年注目を集めている拡張不全マウスも作製できるようになったため、このマウスの心臓も実験に用いることと同時に準備を進めた。以上のように、心不全モデルマウスの心臓サンプルと血液サンプルは十分に準備できた。新型コロナウイルス感染拡大による影響で研究が大幅に遅延したが、研究再開に向けた体制は整っている。今後は、次世代シーケンサーを使ったRNA-seq 解析に向けて、収縮不全および拡張不全の心不全モデルの心臓から抽出したサンプルを作製し随時プロテオーム解析を進める予定である。心不全により発現が変動する遺伝子プロファイリングを行い、DPP-4 基質の探索に取りかかる。さらに心不全に關与する DPP-4 基質として候補に挙げたものの中から、心臓保護作用を有する分子を同定し、心不全の創薬標的または診断バイオマーカーとしての可能性について研究を進める。

また、心不全モデルマウスにおいて、DPP-4 阻害薬が心臓線維化を抑制することを認めたため、その機序を *in vitro* の実験系を用いて調べた。新生仔ラットの心臓線維芽細胞を用いてアンジオテンシン II (Ang II) 添加後にコラーゲンの mRNA が増加することを確認した。次に、DPP-4 阻害薬添加後に Ang II を投与したが、コラーゲンの mRNA は変化しなかった。培養液中の GLP-1 濃度が低値であり、基質が存在しないことが原因と考えられた。そこで、GLP-1 添加後に Ang II を投与したところ、コラーゲンの mRNA は有意に抑制された。また、下流シグナルとして、Epac1 が活性化されることも明らかにした。既存の報告より、DPP-4 阻害薬の作用は GLP-1/cAMP/Epac1 の活性化を介していると考えられた。そこで、cAMP の阻害薬 (IBMX)を投与したところ、GLP-1 によるコラーゲン産生抑制効果は抑制された。DPP-4 阻害薬は、DPP-4 の基質である GLP-1 の分解・不活化を抑制し血中濃度を増加させることで、cAMP、Epac1 を介して心臓線維化を抑制している可能性が示唆された。これまでの研究成果は学会等で随時発表してきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kobara Yuka, Hasegawa Hiroshi, Hirose Masanori, Takano Hiroyuki, Kobayashi Yoshio	4. 巻 59
2. 論文標題 Analysis of the Correlation between the Myocardial Expression of DPP-4 and the Clinical Parameters of Patients with Heart Failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1303 ~ 1311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-547	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 Hirata Kensuke, Takakura Yuki, Shibazaki Misato, Morii Mariko, Honda Takuya, Oshima Motohiko, Aoyama Kazumasa, Iwama Atsushi, Nakayama Yuji, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Naoto, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 120
2. 論文標題 Forkhead box protein A1 confers resistance to transforming growth factor induced apoptosis in breast cancer cells through inhibition of Smad3 nuclear translocation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2259 ~ 2270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.27551	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 -

1. 著者名 Hori Naoto, Okada Kazuyuki, Takakura Yuki, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Naoto, Yamaguchi Noritaka	4. 巻 295
2. 論文標題 Vestigial-like family member 3 (VGLL3), a cofactor for TEAD transcription factors, promotes cancer cell proliferation by activating the Hippo pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8798 ~ 8807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012781	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirose Masanori, Hasegawa Hiroshi, Kobara Yuka, Yamaguchi Noritaka, Takano Hiroyuki, Kobayashi Y.oshio
2. 発表標題 Prognostic significance of myocardial DPP-4 expression level in patients with heart failure
3. 学会等名 European Society of Cardiology 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi Noritaka, Takakura Yuki, Sugino Ayumi, Yamaguchi Naoto, Takano Hiroyuki
2. 発表標題 Involvement of VGLL3 in TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirose Masanori, Hashimoto Naoko, Yamaguchi Noritaka, Kobayashi Yoshio, Takano Hiroyuki
2. 発表標題 Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors protect endothelial cells from hypoxia-induced apoptosis and vascular barrier impairment
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirose Masanori, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka, Kobayashi Yoshio
2. 発表標題 Mechanism of action of DPP-4 inhibition for cardiac fibrosis
3. 学会等名 第23回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 幸龍三郎、松本佐保姫、大沢沙弓、工藤藤美、高野博之、真鍋一郎
2. 発表標題 Biased adipocyte differentiation induce visceral adipose inflammation in obesity and aging
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose Masanori, Takano Hiroyuki, Yamaguchi Noritaka, Kobayashi Yoshio
2. 発表標題 Mechanism of action of DPP-4 inhibitor for cardiac fibrosis
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井貴浩、幸龍三郎、工藤藤美、柴田宗彦、山口憲孝、高野博之、真鍋一郎
2. 発表標題 常在性の心臓マクロファージは心筋細胞の代謝調節によって心保護に関与している
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大沢沙弓、幸龍三郎、工藤藤美、山口憲孝、高野博之、真鍋一郎
2. 発表標題 老化と肥満が誘導する脂肪前駆細胞の分化変調機序の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木拓郎、高倉勇氣、平田健介、町田萌香、杉野歩美、堀直人、寺田菜摘、川村友博、高野博之、山口直人、山口憲孝
2. 発表標題 転写共役因子VGLL3によるNF- κ B経路を介したオートファジーの細胞増殖における機能解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirose Masanori, Yamaguchi Noritaka, Kobayashi Yoshio, Takano Hiroyuki
2. 発表標題 Mechanisms of anti-fibrotic effects by DPP-4 inhibition in heart failure
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木孝行、平井直人、堀直人、高野博之、山口直人、山口憲孝
2. 発表標題 転写共役因子Vgl13による筋分化の抑制
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院 分子心血管薬理学研究室ホームページ
<https://www.p.chiba-u.jp/lab/mcp/index.html>

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	眞鍋 一郎 (MANABE ICHIRO) (70359628)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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