

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15881

研究課題名(和文)心不全の病態生理においてドパミン受容体D1が果たす役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of dopamine receptor D1 in the pathophysiology of heart failure

研究代表者

山口 敏弘(Yamaguchi, Toshihiro)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50802394

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)：研究者は、圧負荷モデルマウス及び心不全患者の心臓組織の遺伝子発現を複合的かつ網羅的に解析することで、いずれの病態においても発現が著増する遺伝子としてドパミン受容体D1を同定した。また、心筋特異的ドパミン受容体欠損及び強制発現マウスの機能解析を行い、心臓の同受容体は致死的不整脈の発症に寄与していることを明らかとした。また、その作用機序として心筋細胞内のリアノジン受容体のリン酸化が関与していることが示唆された。さらに、D1受容体は重症心不全患者群の中でも致死的不整脈の既往のある群において増加していたことから、同受容体がヒトにおいても心不全時の致死的不整脈の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の基礎研究領域ではこれまでモデル動物を用いた研究が積み重ねられてきたが、従来の研究ではモデル動物とヒトの種差及び心不全の病態の差異が臨床応用における課題となってきた。研究者はこの課題を乗り越えるため、心不全モデル動物及びヒト心不全の両者において発現が著増する心臓ドパミン受容体に着目し、心筋細胞特異的遺伝子改変マウスの解析により同受容体が心不全時の致死的不整脈の発症に寄与していることを明らかとした。また、心不全患者のサンプル及び病歴の解析により、同受容体はヒトにおいても致死的不整脈の発症に寄与していることが示唆された。本研究は心不全患者の突然死を抑制する新規治療法の開発に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：The researchers identified the dopamine receptor D1 as a gene whose expression is markedly increased in both pressure-overload mouse models and heart failure patients through complex and comprehensive analysis of gene expression in cardiac tissue. We also performed functional analysis of mice lacking and forcibly expressing cardiac-specific dopamine receptors, and found that these receptors in the heart contribute to the development of fatal arrhythmias. In addition, phosphorylation of ryanodine receptors in cardiomyocytes was suggested to be involved in the mechanism of action. Furthermore, the expression of D1 receptors were increased in the patients with severe heart failure especially in those with a history of fatal arrhythmias, suggesting that D1 receptors are involved in the development of fatal arrhythmias during heart failure in humans.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 不整脈 ドパミン受容体

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢社会の進展に伴い本邦の慢性心不全患者数は年々増加している。心不全の年間死亡者数は 7 万人に及びその予後は未だ不良である。重症心不全に対する内科的治療の選択肢は限られており、新しい内科的治療法の開発が待たれている。新規内科的治療法の開発のためには「ヒト心不全」の病態形成に関与する新たなメカニズムを発見することが必要である。「ヒト心不全」の病態解明に繋がるヒト心臓組織や心筋細胞の採取には心筋生検が必要であるが、心筋生検は侵襲性が高く、全身状態が悪い心不全患者から心臓組織や心筋細胞を入手することは容易ではない。このため横行大動脈結紮術 (TAC) による圧負荷心不全モデルマウスなどの心不全モデル動物の解析を中心とした心不全研究が長年に渡り行われてきた。その結果、種々の標的遺伝子の改変や標的分子に作用する薬物によりモデル動物の心不全が改善する報告がされ、多数の心不全のメカニズムが提唱されてきた。これらの研究結果が今後「ヒト心不全」の臨床応用へと発展することが期待されているが、問題点として「モデル動物の心不全とヒト心不全の病態が異なる点及びモデル動物とヒトとの種差」が挙げられている。この課題を解決するために、申請者は従来とは異なるアプローチで「ヒト心不全」の病態形成メカニズムに迫ることを試みた。

(2) 申請者は心不全モデルマウスを用いて「ヒト心不全」に臨床応用可能となるシーズの探索をするために以下の検討を行った。まず圧負荷心不全モデルマウスを作成し、心臓組織の遺伝子発現の網羅的解析を行った。次にヒト健常人・虚血性心筋症患者・非虚血性心筋症患者の心臓組織の遺伝子発現を網羅的に解析し、ヒトの心不全時の遺伝子発現の変化にも着目した。その上で、圧負荷心不全モデルマウスで発現増加する上位遺伝子を抽出し、ヒト心筋症の両病態群においても発現増加が強く保たれている遺伝子を探索したところ、ドパミン受容体 D1(D1R) の遺伝子 *Drd1* が同定された。心臓 *Drd1* の解析を進めたところ、*Drd1* は正常心でこそ発現量が少ないものの、圧負荷モデルマウスの心臓では 40 倍以上に発現が増加しており、かつ病勢を反映した経時的な増加を認めた。また、ヒトの虚血性及び非虚血性心筋症でも *Drd1* は病勢に一致して発現量が変化していた。以上の結果より、心臓 *Drd1* は種や病態を超え、心不全の本質的病態に深く関与していることが示唆された。また、追加検討により 圧負荷心不全時に増加している D1R は心筋細胞の D1R であることが明らかとなった。

(3) D1R のリガンドであるドパミンは内因性カテコラミンの一種であり、Holemらにより心臓への直接的強心作用が初めて報告された。さらに Goldbergらにより急性心不全に対する治療効果が明らかにされると、ドパミンは急性心不全の治療薬として広く臨床で使用されるようになった。その後、ドパミンは同じ強心薬である アドレナリン受容体刺激薬と同様に慢性心不全での予後延長効果も期待されたものの、慢性心不全患者に対するドパミンアナログの長期投与はむしろ突然死を増やし、生命予後を悪化すると Lancet 誌で報告された。その後、受容体遮断薬は慢性心不全領域での予後改善効果が確立されるようになったものの、ドパミンシグナルの遮断に関する心不全研究は行われていない。ドパミンを静脈内投与、あるいは単離し

た心臓に灌流すると、強心作用・心拍上昇作用があることは複数報告されている。しかし、その作用機序については生理実験によって 1 アドレナリン受容体に直接作用して強心作用を生じると報告されているものの、詳細な作用機序を検討した文献は見られない。また、ドパミン受容体に関する研究はその発現量から中枢神経領域を主として行われてきており、末梢組織に存在する心臓ドパミン受容体に関しては、心筋細胞に D1R が存在するという報告こそあるものの、その生理的意義や分子生物学的メカニズムについての詳細な検討は報告されていない。

2．研究の目的

(1) 本研究の核心をなす学術的「問い」は「種や病態を超え、心不全の病勢に一致して発現変化している D1R が心不全の病態生理においてどのような役割を果たしているのか」である。また、D1R が心不全の病態形成に寄与しているならば「なぜ心不全で D1R は発現が増加し、「どのような機序で心不全の病態を形成」しているのか」という問いが生じてくる。本研究の目的はこれらの問いに対する答えを明らかにすることで、心不全における心臓 D1R の果たす役割を解明し、ドパミンシグナルを標的とした心不全の実現可能な新規治療法の開発に繋げることである。

3．研究の方法

- (1) FISH 法及び 1 細胞 RNA シーケンスを用いた心不全時に増加する D1R の解析
- (2) 心筋細胞特異的 *Drd1* ノックアウトマウス及び心筋細胞特異的 *Drd1* 強制発現マウスの表現型解析
- (3) アデノウイルスを用いた D1R 強制発現培養心筋細胞の生理的機能解析

4．研究成果

(1) 研究者は予備的検討の結果をもとに、免疫組織染色を用いて心不全時に増加する心臓 D1R の可視化を試みたが、うまく描出することができなかった。そこで、FISH 法を用いて心不全時に増加する心臓 D1R を解析したところ、D1R は心筋細胞において増加しており、かつその増加は heterogenic に生じていることが明らかとなった。同様の結果は 1 細胞 RNA シーケンスの結果においても確認された。

(2) 心不全時の D1R は心筋細胞において増加していることから、研究者は心筋細胞特異的 *Drd1* ノックアウトマウス及び心筋細胞特異的 *Drd1* 強制発現マウスを作製し、その機能解析を行った。その結果、心筋細胞特異的 *Drd1* ノックアウトマウスでは心不全時の心室性不整脈が抑制され、生存率も改善した。また、心筋細胞特異的 *Drd1* 強制発現マウスにおいては、非心不全の状態においても心室性不整脈が増加していることが明らかとなった。以上より、心不全時に増加する心筋細胞 D1R は致死的不整脈の発症に寄与していることが明らかとなった。

(3) D1R が不整脈を惹起している機序を明らかにするために、アデノウイルスを用いて培養心筋細胞に D1R を強制発現したところ、D1R は心筋細胞内のカルシウム濃度の変化に異常をきたしていることが明らかとなった。心筋細胞内のカルシウム濃度の変化には種々のメカニズムが関与

していることが知られているが、そのひとつとして心筋細胞内のリアノジン受容体が知られている。そこで、心筋細胞特異的 *Drd1* 強制発現マウスの心臓リアノジン受容体のリン酸化を解析したところ、D1R の強制発現によりリン酸化が亢進していることが明らかとなった。このことから、D1R を介した不整脈の発症にリアノジン受容体の活性化が関与していることが示唆された。

(4) その他、心不全時に心筋 D1R が増加する機序を解明するために *Drd1* プロモーター領域のモチーフ解析により *Drd1* の制御 pathway を絞りこみ、培養心筋細胞を用いた検証実験により転写因子 X が *Drd1* の発現制御を担っていることを示唆する結果を得ている。また、小室一成、野村征太郎ら本研究の協力者の研究事業の協力のもと、東京大学医学部附属病院及びコロラド大学附属病院の2病院において、重症心不全患者の病歴を解析し、致死的不整脈の治療歴あるいは埋め込み型除細動器による治療歴のある患者群（不整脈群）と対照群（非不整脈群）の比較を行ったところ、心臓ドパミン受容体は不整脈群の患者において、より発現増加が認められており、心臓ドパミン受容体がヒトにおいても心不全時の致死的不整脈の発症に関与していることが示唆される重要な結果が得られたため、本研究結果においてもこれを報告としたい。

<引用文献>

1 .Yamaguchi T et al. Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure. *Nat Commun.* 2020 Aug 31;11(1):4364. doi: 10.1038/s41467-020-18128-x.

2 . 慢性心不全患者で認められる突然死の原因を解明

https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/__icsFiles/afieldfile/2020/09/01/20200901_release.pdf

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshihiro Yamaguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18128-x.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース 慢性心不全患者で認められる突然死の原因を解明 https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/_icsFiles/afieldfile/2020/09/01/20200901_release.pdf https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20201007-02.html</p>

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
研究協力者	小室 一成 (Komuro Issei)	東京大学医学部附属病院・循環器内科・教授 (12601)	
研究協力者	野村 征太郎 (Nomura Seitaro)	東京大学医学部附属病院・重症心不全治療開発講座・特任助教 (12601)	

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