

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08491

研究課題名（和文）脂質メディエーターによる心筋細胞死制御機構の解明と心不全創薬への応用

研究課題名（英文）The role of a lipid mediator on cardiac cell death in the pathogenesis of heart failure

研究代表者

種池 学（TANEIKE, Manabu）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30609756

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）：心筋細胞特異的*iPLA2* ノックアウトマウスでは、圧負荷誘導性心不全モデルにおける表現型が改善し、心筋細胞ネクロシスが抑制されていた。リポミクス解析や細胞実験により、18:0 lysophosphatidylserine (LPS)およびその受容体であるGPR34がそのメカニズムに関与していることを見出した。GPR34ノックアウトマウスでは圧負荷誘導性心不全モデルの表現型が抑制された。以上より、*iPLA2* により産生されたLPSが、GPR34を介して心筋細胞のネクロシスを誘導することにより、圧負荷誘導性心不全の発症進展メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は我が国を含めた先進国において主要な死因の一つであり、新規治療法の開発が臨まれている。本研究では、複数のマウス心不全モデルおよび細胞を用いた実験により、*iPLA2* - LPS - GPR34 - 心筋細胞ネクロシスという心不全発症進展メカニズムを初めて報告した。この結果から、*iPLA2* のみならず、GPR34は心不全患者に対する治療の新規分子標的となりうることを示唆されており、これまでにない新規心不全治療薬の開発への応用が期待される。また、心不全だけではなく、他の動脈硬化性疾患や炎症性疾患など、心臓以外の広い領域についても治療などに臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In cardiomyocyte-specific *iPLA2* knockout mice, the phenotype observed in the pressure overload-induced heart failure model was improved, and necrotic cardiomyocyte death was inhibited. Lipidomics analysis and in vitro experiments using isolated neonatal rat cardiomyocytes revealed that 18:0 lysophosphatidylserine and its receptor, GPR34, were involved in the induction of the cardiomyocyte death. In global GPR34 knockout mice, the phenotype of the heart failure model was suppressed. These findings indicate that 18:0 lysophosphatidylserine produced by *iPLA2* plays a detrimental role in the pathogenesis of the development and progression of pressure overload-induced heart failure by inducing cardiomyocyte necrosis through GPR34.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 細胞死 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

我が国を含めた先進国において死因の主要な一つとなっている心不全は、あらゆる心疾患がたどり着く終末像である。2016年時点で日本における総心不全患者数は30万人を超えており、年間心不全死亡者数は約7万人であり、全死亡者数の約5%を占めている。現在の心不全患者に対する最新治療は多数のエビデンスに基づいて行われているにも関わらず、未だに予後を劇的に改善する治療法は得られていない。その結果、心不全患者の5年生存率は癌患者のそれとほぼ同等で、約50%以下と依然として低い水準のままである。近年、生活習慣や食生活の欧米化による脂質異常症やメタボリックシンドロームを有する患者数の増加を受け、それらを原因とする狭心症や心筋梗塞といった虚血性冠動脈疾患の患者数も増加している。カテーテルなどによる急性期治療成績の向上により急性冠動脈疾患の救命率は改善している反面、その後の経過として慢性期に到達する虚血性心筋症に伴う心不全患者数が増加する結果となっている。また、この増加は現代の日本が抱える高齢化社会という問題も背景要因の一つとなっている。前述のように心不全は非常に予後不良の疾患であるが、その発症や進展に関わる分子機構は未だに不明な点が多く、現状を解決するためには、新たな治療標的となる分子機構の解明や新規治療薬の開発が急務である。また、新しい治療法により心不全の発症進展を抑制・遅延させることができれば、心不全患者の利益になるだけでなく、医療費の抑制・社会保障費の削減にもつながることが期待される。

これまでも、心不全の発症進展と細胞死との関連が報告されている。これまで私が所属したグループは遺伝子改変マウスを用いた研究により、ASK1によるアポトーシスの制御、FKBP8によるアポトーシスの制御、ミトコンドリアタンパク質であるcyclophilin Dによるネクローシスの制御、またオートファジーによるミトコンドリアの品質管理やアポトーシスの制御などが心臓の構造や機能の維持に重要であることを見いだしてきた。また、心不全の発症に関する分子機構と炎症の関連性についても広く認識されてきており、我々は無菌性炎症が心不全の発症・進展のメカニズムに大きく関わってきていることを世界に先駆けて報告してきた。これらの研究および実臨床における不全心では心筋細胞の脱落による心筋組織傷害とともに、同部位に強い線維化を認めることがあり、ネクローシス後の線維化組織による置換の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では脂質代謝と炎症が細胞死、特にネクローシスを介して心不全に関連しているのではないかと、という問いに対し、脂質代謝、炎症惹起および細胞死の分子機構に含まれる物質が心不全を発症進展させるメカニズムについて検討することで、その解答が得られると考えた。この観点から今回注目した分子は、アラキドン酸の代謝に関わり、脂質メディエーターの生成を介してTNFやIL-1といったサイトカインの産生を促進し、炎症および細胞死に関与することが報告されているcalcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂)である。

本研究により脂肪代謝と炎症に関わる分子機構が細胞死を介して心不全を発症進展させるメカニズムを明らかにし、その結果を基に新規心不全治療薬の開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

A. 心臓特異的 iPLA₂ 遺伝子改変マウスを用いた検討

iPLA₂ の心筋細胞特異的ノックアウトマウスを用いて、横行大動脈縮窄手術による圧負荷誘導性心不全の病態モデルを作製してその表現型を検討する。炎症や細胞死について組織学的、生化学的、免疫学的手法を用いて解析する。この心臓サンプルにおけるリポドームの変動をリポドミクスの手法を用いて網羅的に解析することにより、責任分子およびメカニズムについて探索する。

B. 細胞を用いた in vitro での iPLA₂ による細胞死についての検討

初代単離ラット新生児心筋細胞を用い、責任分子による刺激下で、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死について、フローサイトメトリーなどを用いて評価する。さらに責任分子の受容体の細胞死に対する影響を siRNA を用いた発現抑制条件下で検討する。

C. iPLA₂ 関連細胞死に関連する責任分子の受容体についての検討

責任分子の受容体のノックアウトマウスを用いて、表現型の確認および治療応用の可能性について検討する。

D. ヒト不全心サンプルを用いた検討

大阪大学医学部附属病院の心不全患者から採取された心筋組織サンプルを用い、ヒト不全心における iPLA₂ の発現量を評価する。また、重症度や病態との関連性、遺伝子変異の有無などについてバイオインフォマティクスを駆使して解析する。

4. 研究成果

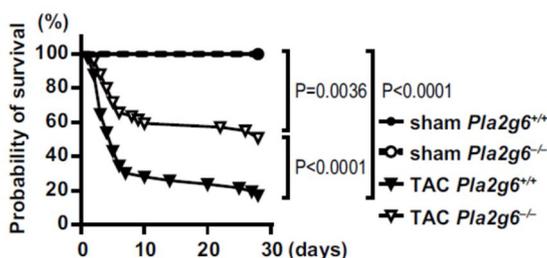
(1) iPLA₂ の心筋細胞内での役割を検討するため、iPLA₂ をコードする遺伝子である Pl2g6 の

flox マウスを作製し、MyHC プロモーター下に Cre recombinase を発現する transgenic マウスと交配させることにより、心筋細胞特異的 iPLA₂ ノックアウトマウスを取得した。当該ノックアウトマウスはメンデルの法則に従って生まれ、明らかな表現型を示さなかった。そこで、横行大動脈縮窄術 (TAC) を施行し、心臓を圧負荷条件においたところ、手術 4 週間後に対照群では約 80% の死亡率を示したのに対して、ノックアウトマウス群では約 50% と著明な改善を認めた (図 1)。原因を探索するため術後 5 日の時点で解析を行ったところ、対照群では心機能の指標である左室短縮率の著明な低下を認めたが、ノックアウトマウス群では有意な改善を認めた (図 2)。また、組織学的および生化学的評価法により、対照群で著明に誘導されていた炎症反応がノックアウトマウス群では抑制されていることを確認した。一方、心筋細胞肥大、心臓線維化などに両群で有意な差を認めなかった。

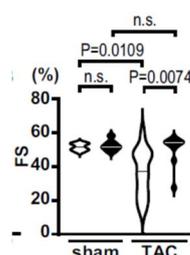
(2) ノックアウトマウスで見られた表現型改善のメカニズムを検討するため、TAC 後心臓組織における細胞死について組織学的、生化学的、免疫学的手法を用いて評価を行った。アポトーシスの指標である TUNEL 陽性心筋細胞数は両群において TAC 後に増加していたものの、両群に有意差はなかった (図 3)。一方で、ネクローシスの指標である血清トロポニン T、エバンスブルーの左心室組織への取り込み、HMGB1 の核外漏出 (図 4) は TAC 後の対照群のみにおいて有意に増加していた。これらの結果より、野生型で見られた TAC 後のネクローシスを原因とした心機能低下に iPLA₂ が関与していることが示唆された。

(3) TAC 後の心筋細胞死に関わる責任分子を、TAC 後の心筋組織サンプルを用いて、リポドミクス手法により網羅的に解析したところ、候補として 18:0 lysophosphatidylserine (LPS) のみを同定した (図 5)。初代単離ラット新生児心筋細胞を LPS で刺激したところ、時間依存的、濃度依存的に細胞死が誘導され、免疫染色によりネクローシスが増加していることが明らかとなった。LPS の受容体の一つである GPR34 に注目し、siRNA を用いてその発現を抑制したところ、LPS により誘導される心筋細胞死が抑制され (図 6)、ネクローシスが減少した。

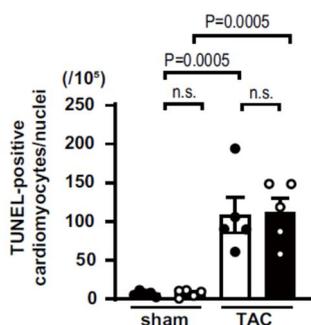
(4) GPR34 を介した LPS 依存性心筋細胞ネクローシスが圧負荷誘導性心不全に与える影響を評価するため、GPR34 ノックアウトマウスに TAC を施行し、評価を行った。TAC 術後 5 日目に野生型で見られた心機能低下はノックアウトマウスでは改善しており (図 7)、ネクローシスの指標である HMGB1 の核外漏出も有意に抑制されていた (図 8)。



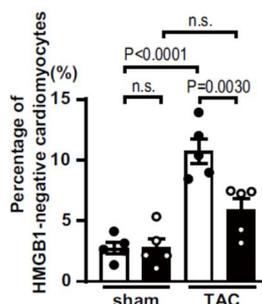
(図 1) TAC 後の生存率
対照 TAC 群 ノックアウト TAC 群



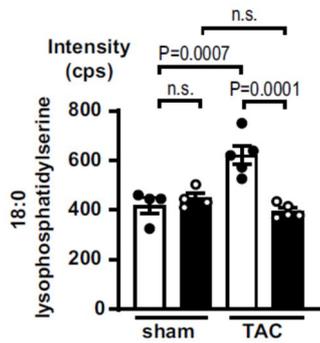
(図 2) TAC 後の左室短縮率
白: 対照群 黒: ノックアウト群



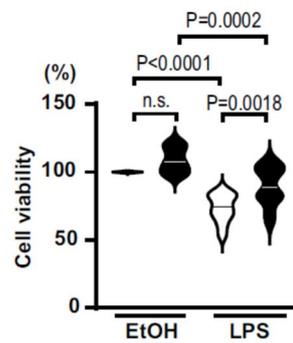
(図 3) TAC 後の左心室組織におけるアポトーシス心筋細胞数
白棒: 対照群 黒棒: ノックアウト群



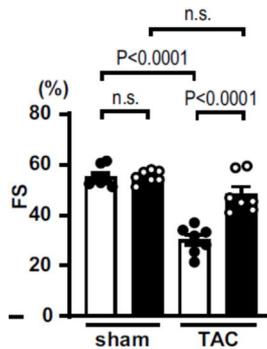
(図 4) TAC 後の左心室組織における HMGB1 陰性心筋細胞数
白棒: 対照群 黒棒: ノックアウト群



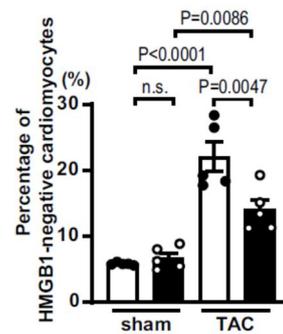
(図5) TAC後の左心室心筋組織における18:0 LPS量
白棒：対照群 黒棒：ノックアウト群



(図6) GPR34発現抑制およびLPS刺激後の心筋細胞生存率
白：対照群 黒：GPR34発現抑制群



(図7) GPR34ノックアウトマウスのTAC後の左室短縮率
白棒：対照群 黒棒：ノックアウト群



(図8) GPR34ノックアウトマウスのTAC後の左心室組織におけるHMGB1陰性心筋細胞数
白棒：対照群 黒棒：ノックアウト群

(5) 大阪大学医学部附属病院の心不全患者から採取された心筋組織サンプルを用い、ヒト不全心における $iPLA_2$ の発現量を評価したところ、その発現量が低下している症例が存在することが明らかとなった（未発表データ）。しかしながら、その数が少なく、さらに研究を進めることが難しい状況であった。今後、サンプル数が増加した時点で、再度解析することを検討する予定である。

本研究の結果から、 $iPLA_2$ は LPS を産生し、GPR34 を介して心筋細胞のネクロシスを誘導することにより、圧負荷誘導性心不全の発症進展メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この成果は LPS が受容体を介してネクロシスを誘導することを初めて報告することとなり、ハイインパクトジャーナルである Nature Communication（引用文献）に掲載された。 $iPLA_2$ ノックアウトマウスおよび GPR34 ノックアウトマウスにて心筋細胞死が抑制されたことから、 $iPLA_2$ のみならず、GPR34 は心不全患者に対する治療の新規分子標的となりうることを示唆されており、これまでにない新規心不全治療薬の開発への応用が期待される。また、心不全のみならず、他の動脈硬化性疾患や炎症性疾患など、心臓以外の広い領域についても治療などに臨床応用できる可能性がある。

<引用文献>

Sugihara R, Taneike M, et al. Lysophosphatidylserine induces necrosis in pressure overloaded male mouse hearts via G protein coupled receptor 34. *Nat Commun.* 2023;14(1):4494. doi: 10.1038/s41467-023-40201-4.

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugihara Ryuta, Taneike Manabu, Murakawa Tomokazu, Tamai Takahito, Ueda Hiromichi, Kitazume-Taneike Rika, Oka Takafumi, Akazawa Yasuhiro, Nishida Hiroki, Mine Kentaro, Hioki Ayana, Omi Jumpei, Omiya Shigemiki, Aoki Junken, Ikeda Kazutaka, Nishida Kazuhiko, Arita Makoto, Yamaguchi Osamu, Sakata Yasushi, Otsu Kinya	4. 巻 14
2. 論文標題 Lysophosphatidylserine induces necrosis in pressure overloaded male mouse hearts via G protein coupled receptor 34	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-40201-4	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 種池 学
2. 発表標題 Non-apoptotic Cell Death Induced by a Lipid Mediator in the Development of Heart Failure
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2023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	上田 宏達 (Ueda Hiromichi) (30865746)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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

英国	King's College London			
----	-----------------------	--	--	--