

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590800

研究課題名（和文）エリスロポエチン受容体およびHIFを標的とする新しい心不全治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment strategy that targets erythropoietin receptors and HIF

研究代表者

加賀谷 豊（KAGAYA YUTAKA）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90250779

研究成果の概要（和文）：

エリスロポエチン(EPO)受容体とその上流に位置する hypoxia-inducible factor (HIF)を治療標的とし、心不全治療薬としての遺伝子組み換えヒト EPO および HIF 安定化作用を持つプロリル水酸化酵素(PHD)阻害薬の有用性を明らかにすることを目的とした。マウスの左室圧負荷肥大心モデルにおいて、EPOにより左室収縮機能が維持され生存率が向上した。一方、PHD阻害薬は、今回実験に用いた投与量と投与期間では、このような保護効果を確認できなかったため、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Our objective was to determine whether novel strategies to treat heart failure with recombinant human erythropoietin (EPO) and a prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor that stabilizes hypoxia-inducible factor (HIF) are useful. EPO protected the pressure-overload induced hypertrophied left ventricle in mice by maintaining left ventricular systolic function and improved the survival. The PHD inhibitor failed to demonstrate such a protective effect at least with the doses and treatment period used in the present study. Further investigations are required to address the issue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、心肥大、エリスロポエチン、HIF

## 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全に対する種々の薬物・非薬物治療の開発にも関わらず、患者の予後は不良であり、新しい治療戦略の開発が急務である。

我々は、*EpoR*<sup>-/-</sup> rescued マウス（赤血球系細胞でのみエリスロポエチン（EPO）受容体を発現し、他の組織ではこれを欠損）を用い、内因性 EPO-EPO 受容体系は心筋の虚血再灌流傷害を抑制することを報告している。（Tada H, Kagaya Y, et al. *Cardiovasc Res* 2006）。一方、内因性 EPO-EPO 受容体系は、左室圧負荷肥大心モデルにおいて心筋の血管新生を促進し、心不全への移行を抑制することも報告している（Asaumi Y, Kagaya Y, et al. *Circulation* 2007）。さらに、我々は急性期に冠動脈インターベンションを受けた心筋梗塞患者の来院時の血清 EPO 濃度が高い群では、低い群に比べ有意に心筋梗塞サイズが小さく、血清 EPO 濃度が梗塞サイズを予測する独立した因子であることを示した（Namiuchi S, Kagaya Y, et al. *J Am Coll Cardiol* 2005）。

## 2. 研究の目的

本研究では、EPO 受容体系、さらにその上流に位置し低酸素生体反応に関わる hypoxia-inducible factor (HIF) を慢性心不全の新たな治療標的とし、心不全治療薬としての遺伝子組み換えヒト EPO (rhEPO)、および HIF 安定化作用を持つプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬の有用性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 左室圧負荷マウスにおける心不全への移行に対する rhEPO の保護効果

8 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いて、transverse aorta の狭窄 (TAC) による左室圧負荷肥大心モデルを作製した。はじめに至適濃度の EPO を決定するため 500 U/kg、2000U/kg、4000 U/kg の rhEPO またはその溶解液 (PBS) を週 2 回皮下投与した。2 週毎

に血圧測定と心エコー図を行い、8 週間後に血液を採取し、ヘマトクリット値を測定した。

3 種類の用量による心保護効果ならびにヘマトクリット値を考慮し、2000U/kg の EPO を週 2 回、8 週間投与するプロトコルを選択した。TAC による左室圧負荷肥大心モデルを作製し、2000 U/kg の rhEPO または PBS を週 2 回皮下投与した。2 週毎に血圧測定と心エコー図を行い、8 週間後に心臓カテーテルを行った。左室心筋をウェスタン・ブロッティングと組織検索に用いた。

### (2) 左室圧負荷マウスにおける心不全への移行に対するプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬 TM6008 の効果

8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに、用量の異なる TM6008 (5mg/kg/日~100mg/kg/日) または溶媒を連日経口投与した。ヘマトクリット値の上昇しない 5mg/kg/日と上昇の程度がほぼ飽和する 100mg/kg/日を選び実験を行った。

TAC による左室圧負荷肥大心モデルを作製し、PHD 阻害薬 TM6008 の高用量 (100mg/kg/日) および低容量 (5mg/kg/日) を連日経口投与した。3 週間後に心エコー図を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 左室圧負荷マウスにおける心不全発症に対する rhEPO の保護効果

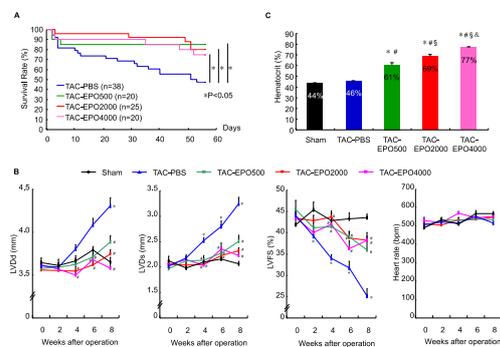


図1. 用量の異なる rhEPO の左室圧負荷肥大心マウスに対する効果

何れの用量の EPO も PBS と比較して同程度に生存率を改善した (図 1A)。500U/kg に比

較して、2000U/kg および 4000U/kg の EPO は、左室拡張末期径の拡大を抑制し、左室短縮率の低下を抑制する傾向があった (図 1B)。EPO は用量依存的にヘマトクリットを増加させた (図 1C)。心保護効果とヘマトクリット値を考慮し、2000U/kg の EPO を採用した。

2000U/kg の EPO の 8 週間の投与 (TAC-EPO) は、ヘマトクリット値を 69% に上昇させた。一方、シャム手術群、PBS 投与群 (TAC-PBS) では、それぞれ 44%、46% であった。心重量は両 TAC 群でいずれもシャム手術群に比べ同程度に増加 (1.7-1.8 倍) した。

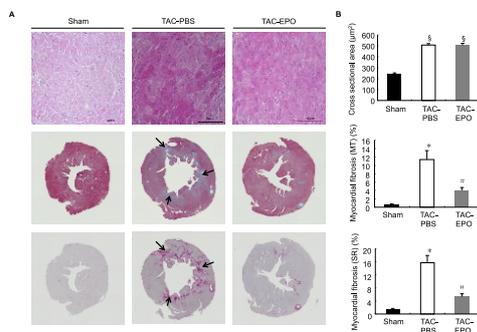


図 2. 左室心筋の組織学的検討

心筋細胞の肥大は、TAC-EPO 群と TAC-PBS 群においてシャム手術群と比べて有意にかつ同程度にみられた (図 2)。左室心筋組織の線維化の程度は、TAC-EPO 群では TAC-PBS 群に比べて、有意に改善していた (図 2)。

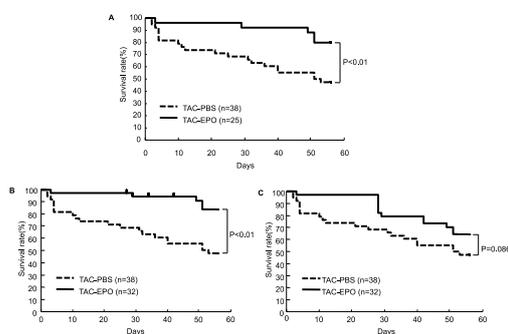


図 3. Kaplan-Meier 生存曲線

図 3 に TAC-EPO 群と TAC-PBS 群の生存曲線を示す。TAC-EPO 群では心エコーを実施中に

おそらく麻酔の影響で 7 匹のマウスが死亡した。これを除いて解析したものが A ( $P < 0.01$ )、これを脱落と解釈して解析したものが B ( $P < 0.01$ )、これを心不全による自然死と同様に扱い解析したものが C ( $P < 0.086$ ) である。

図 4 に心エコー図の結果を示す。TAC-EPO 群では、TAC-PBS 群に比べて有意に左室拡張末期径の増大が抑制され、左室短縮率の低下も有意に抑制された

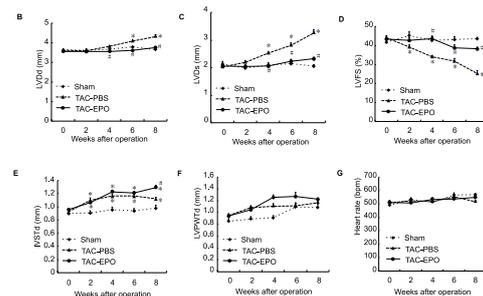


図 4. 心エコー図の結果

左室収縮期圧はシャム手術群  $86.4 \pm 3.2$  mmHg、TAC-PBS 群  $135.7 \pm 6.5$  mmHg、TAC-EPO 群  $161.5 \pm 4.2$  mmHg であり、TAC-EPO 群では TAC-PBS 群に比べて有意に上昇していた。LV dp/dt max と LV dp/dt min は、いずれも TAC-EPO 群で TAC-PBS 群に比べて有意に上昇していた。

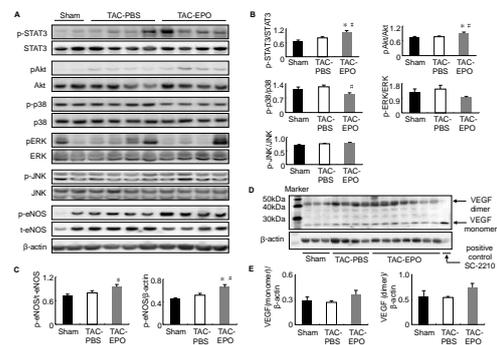


図 5. ウェスタン・ブロッティング解析の結果

8 週間の EPO による治療により、TAC-EPO 群の左室心筋の phospho-STAT3/STAT3 比およ

び phospho-Akt/Akt 比はシャム手術群および TAC-PBS に比較して有意に上昇した (図 5 A および図 5 B)。 TAC-EPO 群の左室心筋の phospho-p38/p38 比は TAC-PBS 群に比べて低下していたが、phospho-ERK1/2 / ERK1/2 比および phospho JNK/JNK 比は、TAC-EPO 群と TAC-PBS 群の間で有意差はなかった (図 5 A および図 5 B)。  $\beta$  アクチンの発現レベルで補正した左室心筋の eNOS の発現は、TAC-EPO 群において TAC-PBS 群に比較して有意に増加していた (図 5 A および図 5 C)。  $\beta$  アクチンの発現レベルで補正した左室心筋における血管内皮由来増殖因子 (VEGF) の発現はシャム手術群、TAC-PBS 群、TAC-EPO 群の間に有意差はなかった (図 5 D および図 5 E)。

TAC 術後 8 週間の左室心筋を用いた CD31 免疫染色では、CD31 陽性毛細血管数およびその密度に、シャム手術群、TAC-PBS 群、TAC-EPO 群間に有意差はなかった。

TAC 術後 8 週間の左室心筋における TUNEL 陽性細胞数はシャム手術群、TAC-PBS 群、TAC-EPO 群共に少なかったが、TAC-PBS 群ではシャム手術群に比べて有意に増加し、一方、TAC-EPO 群では TAC-PBS 群に比較して有意に減少していた。

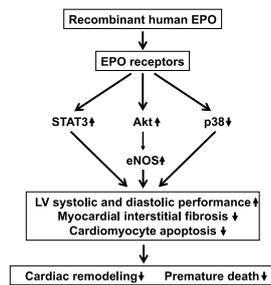


図 6. 遺伝子組み換えヒトEPOが圧負荷肥心を保護する予想される機序

以上から、rhEPOは、STAT3、AktおよびeNOS のリン酸化の促進と p38 のリン酸化の抑制を

介して心室リモデリングの進行を抑制し、生存率を改善することが示唆された (図 6)。

## (2) 左室圧負荷マウスにおける心不全の発症に対するプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬 TM6008 の効果

8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに 5mg/kg/日の TM6008 を 6 週間投与したところ、対照群とヘマトクリット値に差はなかった (図 7)。一方、10mg/kg/日、15mg/kg/日、20mg/kg/日および 50mg/kg/日の 6 週間の投与により、ヘマトクリットは用量依存性に増加し、100mg/kg/日では 53%に達した。また、ヘマトクリット値は各用量とも 4 週間ではほぼプラトーに達した。一方、いずれの用量においても左室重量/体重に変化はなかった (図 7)。

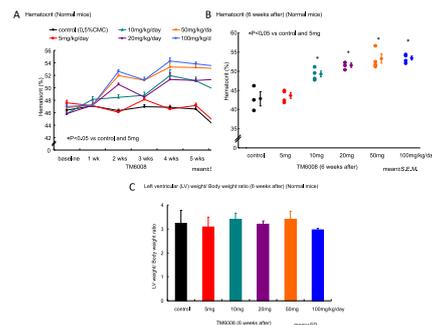


図 7. TA6008 が正常マウスのヘマトクリットおよび左室重量に与える影響

以上から、ヘマトクリット値に影響を与えない 5mg/kg/日と最大のヘマトクリット値の上昇が示された 100mg/kg/日を用い、以下の実験を行った。8 週齢の雄 C57BL/6 マウスにおいて transverse aorta の狭窄 (TAC) を行い、直後から 5mg/kg/日または 100mg/kg/日の TA6008 を連日経口投与した。3 週間後に心エコーにより左室内径と左室短縮率を評価したところ、何れの用量においてもこれらの指標は溶媒投与群と比較して有意差がなかった。すなわち、TAC マウスにおける左室収縮末期径の増大および左室短縮率の低下を

何れの用量の TA6008 も抑制できなかつた(図 8)。

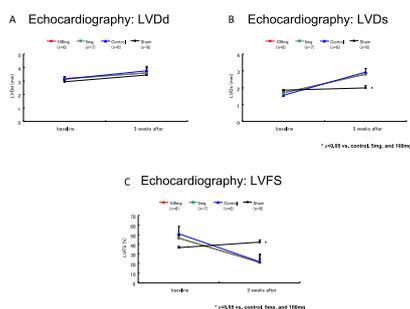


図 8. TA6008 が TAC マウスの左室内径および左室短縮率の変化に与える影響

### (3) 結語

EPO 受容体とその上流に位置する HIF を治療標的とし、心不全治療薬としての rhEPO および HIF 安定化作用を持つ PHD 阻害薬 TA6008 の有用性を明らかにすることを目的とした。マウスの左室圧負荷肥大心モデルにおいて、rhEPO により左室収縮機能が維持され生存率が向上した。一方、PHD 阻害薬 TA6008 では、今回実験に用いた投与量と投与期間では、このような保護効果を確認できなかったため、さらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kagaya Y, Asaumi Y, Wang W, Takeda M, Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Current perspectives on protective roles of erythropoietin in cardiovascular system: erythropoietin receptor as a novel therapeutic target. *Tohoku J Exp Med.* 2012;227:83-91. doi: 10.1620/tjem.227.83 (査読有り)
2. Wang W, Kagaya Y, Asaumi Y, Fukui S, Takeda M, Shimokawa H. Protective

effects of recombinant human erythropoietin against pressure overload-induced left ventricular remodeling and premature death in mice. *Tohoku J Exp Med.* 2011;225:131-143. doi:10.1620/tjem.225.131 (査読有り)

3. Satoh K, Fukumoto Y, Nakano M, Kagaya Y, Shimokawa H. Emergence of the erythropoietin/erythropoietin receptor system as a novel cardiovascular therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;58:570-574. doi: 10.1097/FJC.0b013e318235e7bb (査読有り)
4. Nakano M, Fukumoto Y, Satoh K, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. OX40 ligand plays an important role in the development of atherosclerosis through vasa vasorum neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010;88:539-546. doi: 10.1093/cvr/cvq211 (査読あり)
5. Ito K, Kagaya Y, Shimokawa H. Thyroid hormone and chronically unloaded hearts. *Vascul Pharmacol.* 2010;52:138-41. doi:10.1016/j.vph.2009.10.004 (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1. Tatebe S, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Nochioka K, Aoki T, Yamamoto S, Wakayama M, Kagaya Y, Shimokawa H. Prognostic impact of enhanced F<sup>18</sup>-fluorodeoxyglucose accumulation in the right ventricle in patients with pulmonary hypertension. 第 77 回日本循環器学会学術集会 (横浜) 2013 年 3 月 17 日.

2. Tatebe S, Fukumoto Y, Sugimura K, Satoh K, Miura Y, Nochioka K, Aoki T, Yamamoto S, Wakayama-Oikawa M, Kagaya Y, Shimokawa H. Prognostic significance of enhanced [<sup>18</sup>F] fluorodeoxyglucose accumulation in the right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension. Scientific Sessions of American Heart Association 2012 (Los Angeles, U.S.A.) Nov 5, 2012.
3. 加賀谷豊. 心不全と貧血. 第48回日本臨床生理学会学術集会(東京)2011年11月5日.
4. 加賀谷豊. 心筋血流シンチの基礎とエビデンス. 福島地区日本心臓核医学会地域別教育研修会(郡山)2011年11月4日.
5. 加賀谷豊. エリスロポエチン受容体と循環器疾患. 第29回内分泌代謝学サマーマナー(仙台)2011年7月8日.
6. 加賀谷豊. エリスロポエチンと心臓. 仙台白百合女子大学平成23年度健康栄養特別講義(仙台)2011年5月14日.

[図書] (計1件)

1. 加賀谷豊. エリスロポエチンの心保護作用. 循環器臨床サピア7:CKDと心血管病を理解する(筒井裕之編). 中山書店(東京)2010;p261-262.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加賀谷 豊 (KAGAYA YUTAKA)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 90250779

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

武田 守彦 (TAKEDA MORIHIKO)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号: 30375084