



Title	心不全に対するSERCA2a活性化薬の作用と新規心不全バイオマーカー探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	金子, まなみ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7055号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71250
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Manami_KANEKO_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：金子まなみ

学位論文題名

心不全に対する SERCA2a 活性化薬の作用と

新規心不全バイオマーカー探索

心不全は心臓の機能不全やリモデリングによって特徴づけられる病態である。この数十年の間デバイス治療や薬物治療が進歩し、心不全患者の生存率は改善している。しかし、アメリカでは1年に300万人の人が心不全として診断されるなど依然として高い死亡率や入院率を示しており、新規心不全治療薬の登場が期待されている。また、心不全の診断や治療には適切なバイオマーカーの存在が大切である。実際に心不全に対しては、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチドなどの幾つかの有効なバイオマーカーが報告されている。しかし、心不全は様々な因子によって引き起こされる複雑な病態であるため、1つのバイオマーカーでは不十分であり、新規の有用なバイオマーカーの探索は非常に重要である。獣医学領域では、イヌでは大型犬は拡張型心筋症、小型犬は弁膜症から、ネコでは肥大型心筋症から最終的に心不全を発症することが多い。人間と比較してその割合は高くはないが、飼育環境や食事の変化によりペットの寿命が延びていることや心不全の危険因子である各種の生活習慣病を罹患しているペットの割合が増加していることから、今後ますます増加していくものと予想される。イヌやネコの心不全治療にも心不全患者と同様な薬物療法が行われており、その診断にはバイオマーカーが利用されている。

心不全の分子メカニズム研究の進歩により、細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が心不全で最も特徴的な細胞レベルでの変化であることが明らかとなっている。心筋細胞内の Ca^{2+} 動態には様々な蛋白が関与しているが、中でも筋小胞体に存在するSERCA2a（心筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase）は細胞内 Ca^{2+} 濃度を決定する主要な役割を担っており、この蛋白の発現や活性が心不全患者及び心不全モデルで低下していることが報告されている。本研究の第1章では、SERCA2a活性化による心不全改善作用ならびにSERCA2a活性化薬の心機能に対する効果を報告する。まず心不全病態におけるSERCA2aの役割を明らかにするために、心不全病態モデルであるcalsequestrin (CSQ) 過剰発現マウスにSERCAの活性化を促進する処置（SERCAの抑制蛋白であるphospholamban (PLN) 欠損）を実施した遺伝子組換えマウスを作製した。CSQ過剰発現マウスでは心機能の低下やうっ血（心房及び肺重量増加）などの重篤な心不全症状が見られたが、PLN欠損/CSQ過剰発現マウスではPLNワイルドタイプ/CSQ過剰発現マウスと比較して心機能やうっ血の改善効果が認められた。さらに、CSQ過剰

発現マウスは心不全により生後7週齢から死亡するが、PLN欠損により死亡率の改善も認められた。これらの結果より、SERCA2aの活性化によって心不全病態が改善されることが示された。続いて、スクリーニングで見出されたSERCA2a活性化効果を有する低分子ピリドン誘導体化合物compound Aの細胞や生体での心機能に対する効果を検討した。結合試験の結果から、compound AはPLNに結合していることが示され、PLNの抑制作用を解除することによってSERCA2aを活性化している可能性が示唆された。また、compound Aの細胞内Ca²⁺動態に対する作用を検討したところ、心筋細胞においてcompound Aは筋小胞体内のCa²⁺量を増加させた。さらに、電気刺激によるCa²⁺上昇の振幅幅と減衰速度を増加させ、心筋の筋節収縮や弛緩を増大させた。これらcompound Aの作用は、遺伝子操作によるSERCA2a活性化及びPLN欠損と同様なプロファイルであった。ラット摘出灌流心において、compound Aは心拍数に影響を及ぼすことなく収縮/弛緩能を増加させた。さらに、麻酔下で正常ラットにcompound Aを静脈内投与し心機能を測定すると、投与60分後にはコントロール群と比較して収縮能の増加傾向と有意な弛緩能の増加を示した。この時も心拍数には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、compound AはSERCA2aを活性化することで生存率と心機能を改善することが明らかとなり、SERCA2aが心不全治療の新規ターゲット分子となりうることを示された。Compound Aは既存の強心薬とは異なり、エネルギー消費の増加や不整脈の増加を引き起こさない強心薬と成り得る可能性が示唆され、新規心不全治療創生のツールとなることが期待される。

第2章では、microRNA (miRNA) に着目して新規の心不全バイオマーカーを探索した結果を報告する。CSQ過剰発現マウスと正常マウスから採取した血漿中のmiRNAを網羅的に測定したところ、CSQ過剰発現マウスの血漿中ではコントロールと比較して顕著にmiRNAの発現が変動した。計16種類のmiRNAについてリアルタイムPCRで個別に解析したところ、CSQ過剰発現マウスの血漿において、miR-146a、miR-149、miR-150、miR-342-3pの4種類のmiRNAの発現が有意に減少していた。CSQ過剰発現マウスにアンジオテンシン受容体II拮抗薬であるazilsartan medoxomil (1 mg/kg) 投与すると、生存率や心不全病態が改善した。このazilsartan medoxomil を投与したCSQ過剰発現マウスの血漿中miRNAは、ベヒクルを投与したCSQ過剰発現マウスのものよりも正常マウスに近い発現パターンを示した。さらに、azilsartan medoxomil を投与したCSQ過剰発現マウスではmiR-146aとmiR-342-3pの発現低下が有意に回復した。このことからmiR-146aとmiR-342-3pが心不全治療の有効性とよく一致した挙動を示すことが明らかとなり、これらのmiRNAが心不全のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

獣医学領域においても心不全治療には強心配糖体やpimobendanなどの生存率をむしろ悪化させる懸念のある強心薬が使われている。そのため、SERCA2a活性化薬は心不全患者のみならず心不全を発症した動物にとっても有用な抗心不全治療薬となることが期待される。さらに、ネコに多い肥大型心筋症では収縮能は保持されているが拡張能が低下することが知られている。既存の心不全治療薬で拡張能を積極的に改善するものは存在しないが、SERCA2a活性化薬は収縮能のみならず拡張能も改善する作用を有することからネコの肥大型心筋症に適用可能な薬剤となる可

能性もある。また、心不全を発症したイヌやネコでの血漿中miRNAの測定はまだ実施されておらず、miR-146a及びmiR-342-3pが心不全のバイオマーカーとして有用であるか否かについて検証することは非常に意義がある。動物の心不全治療においても単一のバイオマーカーのみの診断よりも複数のバイオマーカーとの組み合わせの重要さが認識されている。さらなる検証は必要であるが、今回の検討で見出されたmiRNAが既存の心不全バイオマーカーとともに利用することにより、心不全診断や薬剤による治療効果評価の精度が増すことが期待される。