HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7055
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71252
Type	doctoral thesis
File Information	Manami_KANEKO.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

金子まなみ

目次

序文 1

第1章　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

I　緒論 4

II　実験方法 9

A　動物 9

B　試薬 10

C　PLN 欠損/CSQ 過剰発現マウスの作製 10

1　Cas9 mRNA 及び gRNA の調整 10

2　受精卵インジェクション 11

3　遺伝子型判定 13

D　生存時間解析 13

E　麻酔下マウス心循環動態測定 14

F　ウエスタンブロット解析 14

G　Real-time PCR 測定 15

H　SR 小胞を用いた SERCA 活性測定 16

I　表面プラズモン共鳴アッセイ 17

J　HL-1 細胞を用いた Ca^{2+}動態測定 17

K　成熟ラット分離心筋細胞における収縮及び Ca^{2+}動態測定 18

L　ラット摘出灌流心標本における心機能測定 19

M　麻酔下ラット心循環動態測定 20

N　統計解析　21

III　実験成績　21

A　CSQ 過剰発現マウスの心不全病態に対する PLN 欠損の影響　21

1　PLN 欠損 CSQ 過剰発現マウスの産生　22

2　生存率に対する影響　25

3　心循環動態に対する影響　25

4　心臓重量と肺重量に対する影響　30

B　SERCA2a 活性化薬 compound A の心機能に対する効果　32

1　Compound A による SERCA2a 活性化　32

2　心筋細胞の Ca^{2+}動態に対する作用　35

3　ラット摘出灌流心標本の心機能に対する作用　38

4　麻酔下ラット心循環動態に対する作用　41

IV　考察　43

V　小括　51

第2章　心不全モデルマウスを用いた microRNA 発現解析による新規バイオマーカー探索

I　緒論　54

II　実験方法　55

A　動物　56

B　試薬　56

C　生存時間解析　56

D　覚醒下血圧測定　57

E　麻酔下マウス心循環動態測定　57

F　MicroRNA の網羅的発現解析 58

G　Real-time PCR 測定 59

H　統計解析 59

III　実験成績 60

A　CSQ 過剰発現マウスにおける AZL-M の抗心不全効果 60

B　CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA 発現解析 66

IV　考察 72

V　小括 76

総括 78

謝辞 82

参考文献 83

英文抄録 99

略語表

ANF	atrial natriuretic factor
ATP	adenosine triphosphate
AZL-M	azilsartan medoxomil
BNF/BNP	brain natriuretic factor/peptide
BSA	bovine serum albumin
BW	body weight
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Cas	CRISPR-associated
CF	coronary flow
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
CSQ	calsequestrin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DWORF	dwarf open reading frame
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HR	heart rate
IRAK1	interleukin-1-receptor-associated kinase 1
LV	left ventricle
LVDP	left ventricular developed pressure
LVEDP	left ventricular end diastolic pressure

LVP	left ventricular
MBP	mean blood pressure
MEM	minimum essential medium
β-MHC	myosin heavy chain beta isoform
Ngf	nerve growth factor
NIH	National Institutes of Health
NT-pro BNP	N terminal-proBNP
PAM	protospacer-adjacent motif
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE III	phosphodiesterase III
PKA	protein kinase A
PLN	phospholamban
RV	right ventricle
SBP	systolic blood pressure
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2a
SPR	surface plasmon resonance
SR	sarcoplasmic reticulum
TLR4	toll-like receptor 4
TRAF6	tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6
WT	wild type

序文

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。高齢者において最も共通の疾患であり、60歳以上の男性の約10%、女性の約8%が罹患していることが報告されている（Braunwald, 2013）。その罹患率は先進国における高齢者人口の増加に伴ってさらに上昇している。心不全の治療はこの数十年の間、植込み型除細動器などのデバイス治療（Cleland et al., 2005）、アンジオテンシンII受容体拮抗薬（Pfeffer et al., 2003）、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（CONSENSUS trial study group, 1987）、β受容体遮断薬（CIBIS Investigators and Committees, 1994）などの薬物治療が進歩し生存率は改善している。しかし、アメリカでは1年に300万人が心不全と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（Braunwald, 2015）、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、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド（NT-pro BNP）やガレクチン3を含む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（Buchanan, 2013）。米国の調査では、

イヌ及びネコの心血管疾患の罹患率はそれぞれ0.13%及び0.14%であった（Scansen et al., 2015）。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高血圧症、脂質異常症、糖尿病あるいは肥満症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、強心薬、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬等が用いられており、その診断にはバイオマーカーが利用されている（Borgeat et al., 2015; Boswood, 2009; Gordon and Côtè, 2015; Tidholm, 2006）。

心不全研究の進歩により、心不全は神経活性化因子の過剰な活性化、細胞外マトリックスの増殖、エネルギー代謝変化、細胞内Ca^{2+}動態の変化等を含む様々な病態メカニズムと関連した複雑な疾患であることが明らかとなっている（Chemaly et al., 2013; Kemp and Conte, 2012）。このうち細胞内Ca^{2+}動態の変化は心不全で最も特徴的な細胞レベルでの変化であり（del Monte et al., 1999）、心筋収縮不全、心筋細胞肥大、異常な電気伝導、ATP産生低下に関与することが報告されている（Cho et al., 2016; Gorski et al., 2015; Tham et al., 2015）。心筋細胞内のCa^{2+}動態には様々な分子が関与しているが、中でも筋小胞体（SR）に存在するsarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2a（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、この分子の発現や活性が心不全患者や心不全モデルで低下していることが報告されている（Kranias and Hajjar, 2012; Marks, 2013; Szymanska

et al., 2000）。

本研究では、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。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、SERCA2a活性化が抗心不全効果を示すことを明らかにした。さらに第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。心不全病態で血漿中の発現が顕著に低下し、病態改善に伴ってその低下が抑制される新規miRNAを見出だした知見を報告する。

第 1 章　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

I. 緒論

心筋細胞において、SR 上に発現している SERCA2a とその抑制蛋白である PLN は、細胞内 Ca^{2+}濃度を決定する主要な因子である。図 1 に心筋細胞での細胞内 Ca^{2+}動態の模式図を示す。SR に貯蔵された Ca^{2+}はライアノジン受容体を介して放出され、心筋線維上のトロポニンに結合して収縮を引き起こしたり、ミトコンドリアでの ATP 産生を調節している（Gorski et al., 2015）。そして放出された Ca^{2+}が SERCA2a によって SR 内に取り込まれることにより、細胞内 Ca^{2+}濃度が低下して心筋細胞の収縮が停止して弛緩が開始される。PLN は SERCA に結合することにより SERCA 活性を低下させる作用を有することが知られている（Fleischer and Inui, 1989）。この抑制作用は cyclic adenosine monophosphate（cAMP）依存性のプロテインキナーゼ A（PKA）や Ca^{2+}/カルモジュリン依存性キナーゼによる PLN のリン酸化によって解除される。

心不全患者や心不全モデルの心臓では、SERCA2a の発現や活性が低下していることが報告されている（Gupta et al., 1998; Kranias and Hajjar, 2012; Marks, 2013; Szymanska et al., 2000）。さらに、SERCA2a 活性の増加や PLN 作用を抑制することによって、心不全モデルや分離心

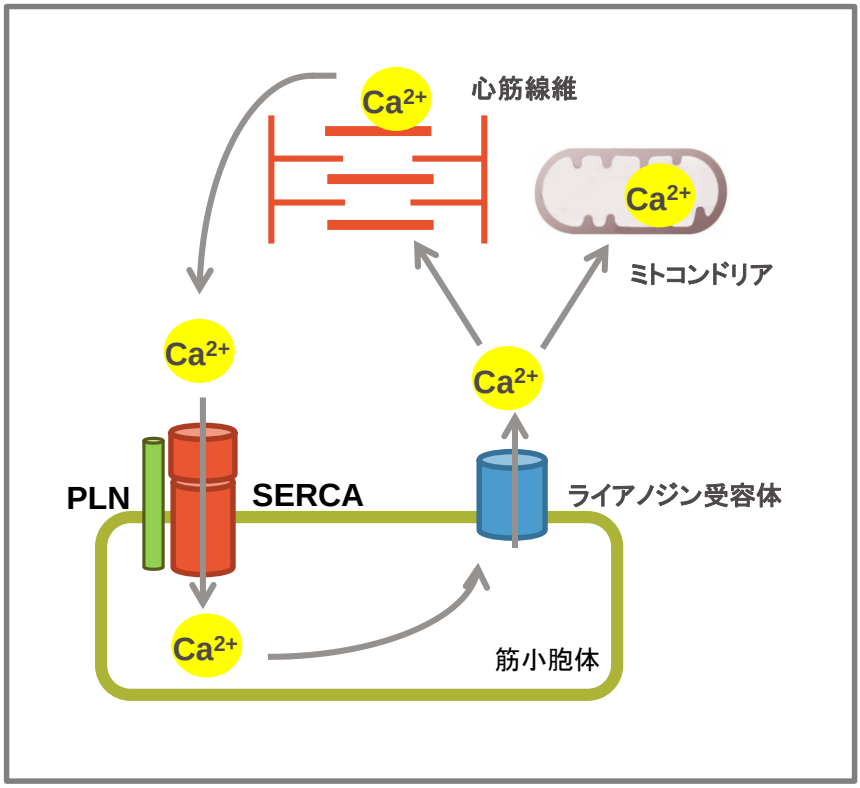

図 1　心筋細胞における細胞内 Ca^{2+}動態の模式図

筋小胞体は Ca^{2+}の細胞内の貯蔵庫であり、心筋細胞の収縮はライアノジン受容体から放出された Ca^{2+}が心筋線維上のトロポニンに結合して開始される。筋小胞体から放出された Ca^{2+}はミトコンドリアでの ATP 産生にも利用される。放出された Ca^{2+}は心筋細胞では SERCA2a によって SR 内に取り込まれ、細胞内 Ca^{2+}濃度が低下して弛緩が開始される。PLN は SERCA2a の近傍に存在して SERCA2a の作用を調節している。

SERCA2a ; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2a, PLN ;phospholamban

筋細胞で Ca^{2+}動態や収縮力が増加するという成績が報告されており （Byrne et al., 2008; Kaye et al., 2007; Sato et al., 2001）、SERCA2a や PLN は心不全治療のターゲットとして期待されている。しかし、β受容体作動薬や phosphodiesterase III（PDE III）阻害薬などの強心薬の cAMP 経路を介した細胞内 Ca^{2+}増加による収縮力増加は、エネルギー消費を増加したり異常な電気的活性を惹起して心不全患者の死亡率をむしろ増加させることが報告されている（Abraham et al., 2005; O'Connor et al., 1999）。同様の懸念が Ca^{2+}動態や収縮力を増加する SERCA2a 活性化や PLN 抑制治療にも伴うが、これまで生存率に対する効果まで調べた報告は大動脈狭窄ラット及びβ1 受容体過剰発現心不全マウスを用いた 2 報のみであり（del Monte et al., 2001; Engelhardt et al., 2004）、かつ、これらのモデル動物の臨床への外挿性も確立されていない。そこで、本研究では、早期の心不全死や異常な Ca^{2+}動態のほか、心不全患者で見られるのと同様な心肥大、線維化、ポンプ不全といった様々な特徴を示す重篤な心不全モデルである CSQ 過剰発現マウス（Harding et al., 2001; Jones et al., 1998）を用いて、生存率を含む心不全病態に対する PLN 欠損の効果を検討した。心不全患者の心臓では CSQ の発現量は変化しておらず発症メカニズムは異なるが、結果として生じる細胞内 Ca^{2+}動態異常や病態は心不全患者と非常に類似している。また、他の心不全モデルでは心不全死に対する薬効を評価するのに 10 ヶ月～1 年は必要であるが、CSQ 過剰発現マウスでは生後 10 週以内で評価できるという利点を持っている。実際にこのモデルを用いて著者の研究グループが行ったこれまでの検討において、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテン

シン変換酵素阻害薬、β受容体遮断薬のような抗心不全薬として臨床で用いられている薬剤が、生存率改善作用を示している（Kaneko et al., 2017）。

また、これまでにSERCA2a活性化作用を有する幾つかの低分子化合物が報告されており、現在新規作用薬の開発の初期段階にある（Cornea et al., 2013; Rocchetti et al., 2008; Tilgmann et al., 2013）。それらの中で最も有名なのはistaroximeであり、SERCA2a活性増加（Ferrandi et al., 2013）、心不全モデル動物（Sabbah et al., 2007）や少数例の心不全患者（Shah et al., 2009）での静脈内投与による収縮能/弛緩能増加作用が報告されている。しかし、istaroximeは元々Na^+/K^+-ATPase阻害薬として見出された薬剤であり、収縮能/弛緩能増加作用はNa^+/K^+-ATPase阻害作用を介している可能性もある。その他の非臨床の開発段階のSERCA2a活性化薬は、心筋細胞でのCa^{2+}動態や収縮力については報告されているが、*in vivo*で心臓の収縮/弛緩作用を増強するか否かは不明である。本研究では、武田薬品工業で創製された新規SERCA活性化薬であるcompound A [5'-benzyl-1'-butyl-N-(naphthalen-2-ylsulfonyl)-6'-oxo-1',6'-dihydro-2,3'-bipyridine-4-carboxamide]（図2）を用いて、PLNによるSERCA2a抑制の解除が、*in vitro*及び*in vivo*試験の心筋収縮能や弛緩能に与える影響を検討した。

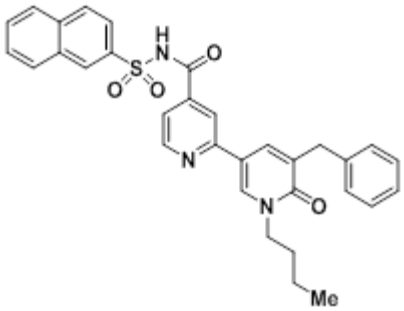

図 2　ピリドン誘導体 compound A の構造

イヌ心臓より単離した SR を用いた SERCA2a 活性測定系で選出した SERCA2a 活性化薬。

II.　実験方法

A. 動物

インディアナ大学（米国）で確立された系統で、心筋に特異的に発現するmyosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform（Myhcb）をプロモーターとしてイヌCSQを過剰発現させたマウス（CSQ過剰発現マウス）を用いた（Jones et al., 1998）。この系統はDBA/2マウスをバックグラウンドとして維持されている。実験にはDBA/2マウスをバックグラウンドとする雄性CSQ過剰発現マウスと正常な雌性C57BL/6Jマウス（CLEA Japan）を掛け合わせたDBA/2とC57BL/6Jマウスをバックグラウンドとするものを使用した。この際にCSQ過剰発現は1/2の確率で出現するため、過剰発現または非過剰発現をPCR法で判別した。407 bpの断片を増幅するイヌ特異的primerセット（F-primer :CTCTGACAGAGAAGCAGGCACTTTACATGG、R-primer :GATGAACAGGTGTGTTCTCTTCAT）とPrimeSTAR GXL DNA polymerase（Takara）を用いた10 μLの反応系で、98℃で10秒、60℃で15秒、68℃で 15秒を32サイクル行った。PCR終了後、LabChip GX（Caliper LifeSciences）により断片長を確認した。WistarラットはCLEA Japanより購入した。全ての動物実験は武田薬品工業株式会社、湘南研究所のInstitutional Animal Care and Use Committee（IACUC）（承認番号 :AU-00011269、AU-00011826、AU-00020793）または共同研究先の山口大学のAnimal Ethics Committee（承認番号 :07-40）

によって承認されている。

B. 試薬

Compound A は武田薬品工業株式会社で合成された。*In vitro* 試験で使用する際は dimethyl sulfoxide（DMSO）に溶解し、*in vivo* 試験で使用する際は DMSO: polyethylene glycol 400（1: 2, v/v）溶液（1.7% NaOH）に溶解した。薬物非適用の対照群には、それぞれの溶媒（vehicle）を適用または投与した（vehicle 群）。無水 caffeine 及び thapsigargin は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬については本文中にそれぞれの購入先を記載した。

C. PLN 欠損 CSQ 過剰発現マウスの作製

CSQ 過剰発現マウスの PLN を遺伝的に欠損させるために、clustered regularly interspaced short palindromic repeat（CRISPR）/CRISPR-associated（Cas）法を用いた。

1. Cas9 mRNA 及び gRNA の調製

Cas9 mRNA 調製のために、T7 プロモーターを PCR で Cas9 配列の上流に繋ぎ、得られた

PCR 断片を pMD20-T vector（Takara Bio）へ挿入した。その後、制限酵素処理で直線化した Cas9 プラスミドを鋳型にして、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit（Life Technologies）を用いて *in vitro* 転写後 polyA を付加した。また、gRNA の調製のために、*Pln* のコーディング領域を挟むように 2 箇所に設計した sgRNA 配列（図 3）へ PCR で T7 プロモーターを繋ぎ、得られた PCR 断片を鋳型にして、MEGAshortscript T7 Kit（Life Technologies）を用いて *in vitro* 転写した。得られた Cas9 mRNA と 2 種類の gRNA を RNeasy mini kit（QIAGEN）で精製した。

2. 受精卵インジェクション

インディアナ大学より導入し武田ラビックス（大阪）で繁殖した 11-12 週齢の雄性 CSQ 過剰発現マウス（DBA/2 背景）から精子を採取し、10 週齢の雌性 C57BL/6J マウス（CLEA Japan）から採取した未受精卵と体外受精させた。作製した Cas9 mRNA（100 ng/μL）、2 種類の gRNA（各 50 ng/μL）及び購入した donor oligo（50 ng/μL）（EurofinsGenomics）を 10 倍希釈した Tris/EDTA 水溶液中で混合して、得られた受精卵にマイクロインジェクションした。インジェクションした受精卵を用いて雌性レシピエントマウス（ICR マウス、CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN）の卵管膨大部へ胚移植を行い、F0 産仔を出産・離乳させた。4 回のインジェクションで、14 匹の雄性 PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウス（38 匹の

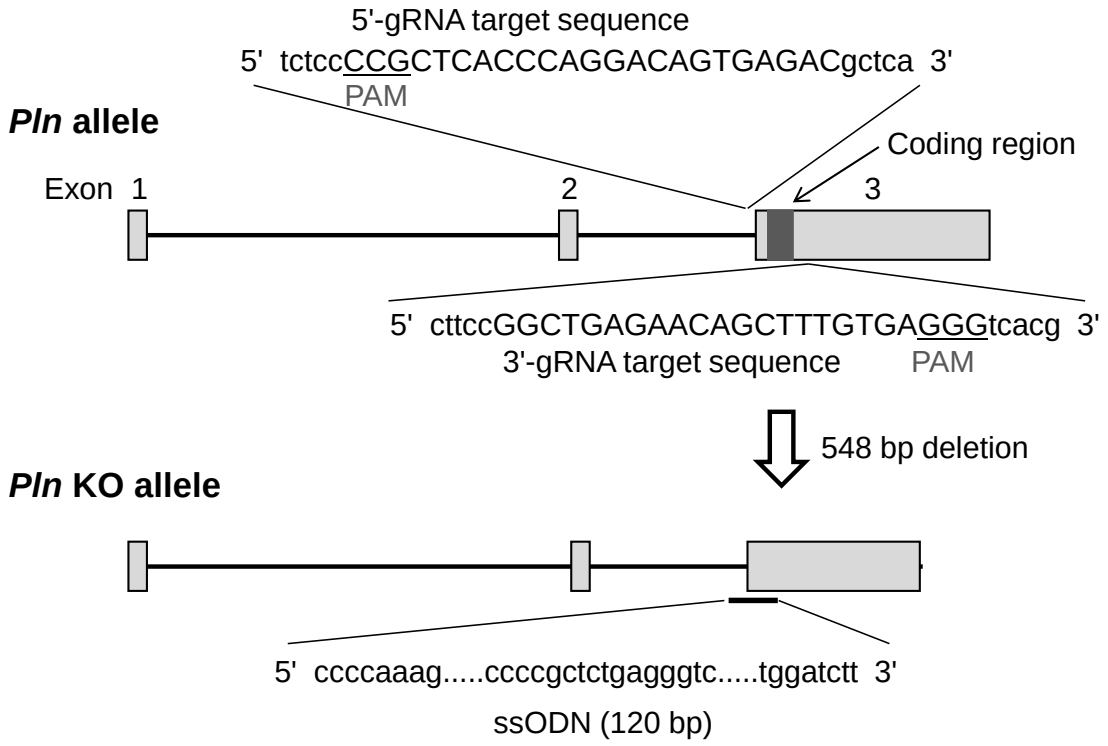

図 3　*Pln* コード領域をターゲットとする single gRNA（sgRNA）と single-stranded oligodeoxynucleotide（ssODN）の模式図

それぞれの sgRNA のターゲット配列を上段に挿入して示し、NGG PAM（protospacer-adjacent motif）配列は下線で示した。エクソンは四角で示した。sgRNA のターゲット部位は *Pln* をコードする部位を挟むようにデザインした（黒四角）。ssODN は sgRNA のターゲット配列の両サイドの 60 ベースに相同する。

PLN WT/CSQ 過剰発現マウス）を取得し、生存率試験に供した。心機能測定試験のために、5 回目のインジェクションで得られた全個体、6 匹の雄性 PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスを実験に使用した。

3. 遺伝子型判定

*Pln*遺伝子の欠失を確認するため、F0産仔の耳部よりDNeasy 96 Blood and Tissue Kit（QIAGEN）、またはLysis Buffer for PCR（Takara）にて抽出したゲノムDNAを用いて、7900HT Fast Real Time PCR system（Applied Biosystems）によりReal Time PCR（RT-PCR）解析を実施した。TaqMan primer-probeセットは、PLNのコード領域上に設計したものを用い、内部標準としてnerve growth factor遺伝子（Ngf）を使用した。反応は50℃で2分、95℃で20秒の後、95℃で1秒、60℃で20秒を40サイクル行った。

D. 生存時間解析

マウスの体重は週に 1 回測定し、死亡確認は毎日実施した。7 週齢以降は直腸温を毎日測定して 29℃以下になったら炭酸ガスで安楽死処置を行った。さらに、極端な活動低下や体重減少などの所見が見られたマウスには同様に安楽死処置を実施した。

E.　麻酔下マウス心循環動態測定

7 週齢の CSQ 過剰発現マウスの心機能を測定した。マウスを 1.5-2.5%のイソフルランで吸入麻酔し保定した。実体顕微鏡下で、右頸動脈を剥離して 1.4 F の圧センサー付きミラーカテーテル（SPR-671、Millar Instruments）を挿入し、大動脈平均血圧（MBP）及びその脈波から心拍数（HR）を記録した後、左心室内にカテーテルを導入し、左心室内圧（LVP）及びその微分値（LV dP/dt）を測定した。弛緩速度（tau）は左心室の弛緩曲線の一部から Weiss 法を使用して算出した。各パラメーターの値は、ポリグラフ（NEC San-ei Instruments Ltd. 及び Nihon Kohden Corporation）からアナログ/デジタル変換器（Power Lab、AD Instruments）を介してコンピューターに取り込み、データ解析ソフトウェア（Lab Chart v8 及び blood pressure module、AD Instruments）を用いて解析した（MB 及び HR は 10-20 秒間の平均値で示し、左室拡張末期圧（LVEDP）及び dP/dt は 10 拍の平均値で示した）。測定終了後に、イソフルラン麻酔下で放血による安楽死処置をし、心臓と肺を摘出して重量を計測した。心臓は左心室、右心室、心房に分けて測定を行った。各重量は体重で除した値で示した。これらの操作は全てブラインド条件下で行った。重量測定後、心臓サンプルは液体窒素にて凍結しウエスタンブロットや mRNA 測定に供するまで-80℃で保管した。

F.　ウエスタンブロット解析

マウスの凍結心臓を蛋白分解阻害剤及びリン酸化阻害剤（Roche）含有 RIPA バッファー（Thermo Fisher Scientific）中で破砕し、20,000 x g、4℃で 10 分間遠心した。蛋白質濃度を決定した後、SDS-PAGE を行った。PLN 蛋白測定のために Criterion™ Precast Gels（10±20% Tris-Tricine/Peptide、BIO-RAD）を、SERCA2a とβ-actin の発現測定のために Criterion™ TGXTM Precast Gels（4±20%、BIO-RAD）をそれぞれ使用した。Trans-Blot Turbo（BIO-RAD）を用いて PVDF membrane へ転写し、PVDF Blocking Reagent（TOYOBO）でブロッキングした。ブロッキングした PVDF membrane を、1: 1,000 に希釈した PLN 抗体（Millipore-Sigma）、SERCA2a 抗体（abcam）及びβ-actin 抗体（Millipore-Sigma）と 4℃で一晩インキュベーションした。1: 25,000 に希釈した抗マウス IgG 抗体もしくは抗ウサギ IgG 抗体（GE Healthcare）との抗原抗体反応は、ChemiDoc（BIO-RAD）を用いて luminescence 法（Amersham ECL Prime kit、GE Healthcare）にて検出した。バンドの強度は Image Lab 4.0（BIO-RAD）によって算出した。なお、蛋白質濃度は BCA タンパク質アッセイキット（Thermo Fisher Scientific）を用いてビシンコニン酸法で測定した。

G. Real-time PCR 測定

マウス左心室から total RNA を RNeasy mini kit（QIAGEN）を使って精製し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Life Technologies）を使って cDNA へ逆転写した。各 mRNA

発現量の測定は TaqMan Universal Master MixII（Life Technologies）と TaqMan Gene Expression Assay の primer-probe セット（Life Technologies）を使用し、7900HT Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）を用いて行った。各過程はそれぞれの添付文書に従って実施した。Primer-probe セットとして、myosin heavy chain beta isoform（β-MHC）（Mm01319006_g1）、atrial natriuretic factor（ANF）（Mm01255747_g1）及び brain（ventricular）natriuretic factor（BNF）（Mm01255770_g1）を用いた。β-Actin を内在性コントロールとして使用した。相対的 mRNA 発現は、ΔΔCT 法によって算出した。

H. SR 小胞を用いた SERCA2a 活性測定

SR 小胞は既報（Tanaka et al., 2009）に従ってイヌ心臓から調製した。心臓 SR 小胞の SERCA2a 活性測定は既報（Sasaki et al., 1992; Tada et al., 1983）を改良して実施した。SR 小胞（最終濃度 5-100 μg/mL）と compound A を反応溶液（20 mM imidazole-HCl（pH 6.9）、100 mM KCl、2 mM $MgCl_2$、5 mM NaN_3、0.1 mM ATP、0.567 μM free Ca^{2+}、5 μM ionomycin、ATP 再合成用試薬（2.5 mM phosphoenolpyruvate と 50 IU/ml pyruvate kinase））50 μL 中で、37℃で 4 分間インキュベーションした。この反応は ATP の添加によって開始し、170 μL のストップ液（0.3 mM 2-dinitrophenylhydrazine と 0.35 M HCl）の添加で停止した。Free Ca^{2+}濃度は WEBMAXC program（http://maxchelator.stanford.edu）を使って計算した。データは vehicle

群に対する変化値（%vehicle）として算出した。

I.　表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ

ストレプトアビジンでコートした sensor chip を備えた Biacore 3000（GE healthcare）を用いて実施した。ビオチンを結合したヒト型 PLN ペプチドの 1-36（PLN（1-36）; MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQQARQNLQNLFINFC-PEG2-Biotin）をストレプトアビジン-ビオチン結合を利用して、センサーチップに固定した。固定のためのバッファーとして 1 mM dithiothreitol（DTT）を含む phosphate buffered saline（PBS）を用いた。Compound A と PLN の結合解析実験は、1 mM DTT と 1% DMSO を含む PBS を用いて 22℃で実施した。Compound A は 75 mL/分の流速で 60 秒間注入し、その後 150 秒間分離の観察をした。データ解析には Scubber 2.0 software（BioLogic Software）を用いた。

J.　HL-1 細胞を用いた Ca^{2+}動態測定

マウスの心筋細胞株である HL-1 細胞は Dr. Claycomb ラボ（Louisiana State University Health Science Center）より入手し、既報（Claycomb et al., 1998; White et al., 2004）に従って Claycomb 培養液（Sigma–Aldrich）を用いて培養した。実験前に HL-1 細胞を PBS で 2 回洗

浄して、Ca^{2+}蛍光指示薬である fluo-4（1 mM、Molecular probe）含有の Claycomb 培養液（血清除去）でインキュベーションした。Fluo-4 の Ca^{2+}依存的な蛍光強度変化を FLIPRtetra® microplate reader（Molecular Devices）で測定した。SR 内の Ca^{2+}濃度は caffeine（10 mM）処置によって生じる SR からの Ca^{2+}放出のピーク値から算出した。Compound A は caffeine 処置の 60 分前に処置した。幾つかの実験では、thapsigargin を compound A 処置の 5 分前に処置した。

K. 成熟ラット分離心筋細胞における収縮及び Ca^{2+}動態測定

ラット心筋細胞は既報（Kajstura et al., 1997）に従って 6-8 週齢の雄性 Wistar ラット（CLEA Japan）の左心室から酵素処理によって分離した。分離した心筋細胞は 5%CO_2、37℃の条件で Joklik's modified minimum essential medium（MEM）/Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）(1:1) 培養液（pH 7.3。以下を含む; 7.5 mM taurine、4.3 mM creatine、1 mM L-carnitine、15 mM 2,3-butanedione monoxime 、1 mM $CaCl_2$ 、2.5% BSA 、1% insulin-transferrin-selenium-sodium pyruvate（Thermo Scientific）、1 × Glutamax™（Thermo Scientific）、1% penicillin-streptomycin）中で 3 時間インキュベーションした。細胞は Ca^{2+}蛍光指示薬である fura-2（1 μM、Thermo Scientific）と室温で 20 分間インキュベーションし、HEPES buffer 溶液（24 mM HEPES、126 mM NaCl、4.4 mM KCl、1.08 mM $CaCl_2$、1 mM $MgCl_2$、

10 mM NaH_2PO_4、11 mM glucose、0.5 mM probenecid、pH 7.4）で 2 回洗浄後に compound A と 37℃で 30 分間混和した。心筋細胞を播種したシャーレ内に設置した電極を介して電気刺激（40 V、5 msec、0.5 Hz）を行い、Ca^{2+}増加と筋節（サルコメア）の収縮を、同時に IonOptix 装置（Ion Optix LLC）で記録した。電気刺激により収縮するサルコメア長を経時的に測定し、最短になったサルコメア長を最大収縮とし、さらに弛緩時の速度（tau）を算出した。細胞内 Ca^{2+}濃度変化は 340 nm と 380 nm の励起光に対する fura-2 の 500 nm における蛍光強度の変化によって示した。データは IonOptix software で解析した。

L.　ラット摘出灌流心標本における心機能測定

9-11 週齢の雄性ウィスターラット（CLEA Japan）を実験に供した。ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i.p.、共立製薬）で麻酔後、大腿静脈よりヘパリン（1000 U/kg, i.v.、陽進堂）を投与した。開胸して心臓を摘出した後に、氷冷したクレブス液（113 mM NaCl、4.6 mM KCl、1.2 mM $CaCl_2$、3.5 mM NaH_2PO_4、1.2 mM $MgCl_2$、22 mM $NaHCO_3$、10 mM glucose、pH 7.4）中で心拍を停止させた。摘出した心臓の大動脈基始部にカテーテルを挿入して 37℃に保温したランゲンドルフ装置（IPH-W2、LABO SUPPORT）に取りつけ、混合ガス（95 % O_2-5 % CO_2）で酸素を添加したクレブス液を定圧灌流（70 mmHg）した。左心内圧は左心耳より挿入したバルーンカテーテルから圧トランスデューサーを介して測定した。左心内圧

と灌流圧は Bridge Amp system（AD Instruments）に接続された圧トランスデューサー（DTXPlus、Argon medical devices）を介して測定した。冠血流量（CF（mL/min））は灌流中に挿入された血流トランスデューサー（Nihon Kohden Corporation）を介し電磁流量計（MFV-2100、Nihon Kohden Corporation）によって測定した。全てのデータはアナログ/デジタル変換器（PowerLab）でコンピューターに取り込み、データ解析ソフトウェア（LabChart v.8 及び blood pressure module）を用いて HR（bpm）、左室内圧（LVDP（mmHg））、その上昇及び下降カーブの微分値（dP/dt_{max} 及び dP/dt_{min}（mmHg/s））を解析した。30 分程度の安定期間を置いた後に compound A を 15 分間処置した。薬物は最終濃度の 1,000 倍高濃度に調製し、クレブス液を灌流する流路の途中に挿入したチューブから CF の 1/1,000 の速度でインフュージョンポンプ（HARVARD Apparatus）を用いて投与した。データは薬物投与前値に対する百分率で示した。

M.　麻酔下ラット心循環動態測定

7-8 週齢の雄性 Wistar ラット（CLEA Japan）を 1-2%のイソフルランで吸入麻酔し仰臥位に保定した。右頚動脈を剥離して 2 F の圧センサー付きミラーカテーテルを挿入し、LVP 及びその微分値 LV dP/dt、LVP の脈波より HR を測定した。弛緩速度（tau）は左心室の弛緩曲線の一部から Weiss 法で算出した。各パラメーターは、ポリグラフからアナログ/デジタル

変換器（PowerLab）を介してコンピューターに取り込み、データ解析ソフトウェア（LabChart v.8 及び blood pressure module）を用いて解析した。左大腿静脈に薬物持続投与用のカニューレを挿入し、右大腿静脈に血液採取用のカニューレを挿入した。この実験には compound A の Na 塩を使用した。

N.　統計解析

数値は全て平均値±標準偏差で示した。

生存曲線の有意差検定は、Gehan-Breslow-Wilcoxon 法による Kaplan-Meier 生存率解析で行った。その他の CSQ 過剰発現マウスを用いた実験は全て Student's *t*-test を行い、$p < 0.05$ を有意とした。

Compound A を使用した試験では、コントロール群との間で両側 Williams' test を行い、$p < 0.05$ を有意とした。なお、*in vivo* 試験のみ持続投与 60 分後の時点の値を用いて、compound A 群とコントロール群との間で Student's *t*-test を行い、$p < 0.05$ を有意とした。

III.　実験成績

A.　CSQ 過剰発現マウスの心不全病態に対する PLN 欠損の影響

CSQ 過剰発現マウスは重篤な心不全患者と同様な心不全症状を示し、早期に心不全死に至るモデル動物である。PLN は SERCA2a の抑制蛋白であり、心筋細胞の収縮及び弛緩反応に抑制的に働くことが知られている。そこで CSQ 過剰発現マウスに PLN 欠損することにより生存率や心機能が改善するか否かを検討した。

1. PLN 欠損/CSQ 過剰発現マウスの産生

CSQ 過剰発現マウスの PLN を欠損させるため、*Pln* コード領域をターゲットとした CRISPR/Cas 混合液を 5 回の実験で 4,051 個の受精卵にインジェクションし、合計 668 匹を得た（表 1）。PCR で *Pln* 遺伝子のコピー数を測定したところ、70 匹が *Pln* 領域を欠損したマウス（*Pln* コピー数<0.05）で、261 匹は非欠損（ワイルドタイプ、WT）マウス（*Pln* コピー数>0.95）であった。残り 337 匹は *Pln* コピー数が 0.05-0.95 であり、PLN モザイクと分類した。なお、3, 4, 5 回目のインジェクションで CRISPR/Cas 混合液の注入量を多くしたところ、PLN のホモ欠損マウスの産生率が前 2 回と比較して高くなった。続いて、得られた産仔の DNA を PCR によって増幅後に電気泳動を実施して CSQ 過剰発現マウスであるか否かを同定した。668 匹中 328 匹が CSQ 過剰発現マウスであり、最終的に 40 匹の PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウス（12.2%、雄: 20 匹、雌: 20 匹）と 117 匹の PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（35.7%、雄: 62 匹、雌: 55 匹）を得た（表 2）。なお、PLN モザイクの CSQ 過剰発現マ

表 1.　CRISPR/Cas 法により作製した PLN 欠損/CSQ 過剰発現マウスにおける移植卵、産仔、PLN ホモ欠損、PLN WT の割合

ロット	インジェクションした受精卵	移植卵 (%)[a]	産仔 (%)[b]	PLN ホモ欠損 (%)[c]	PLN WT (%)[d]
1st lot	660	607 (92.0)	119 (19.6)	8 (6.7)	52 (43.7)
2nd lot	701	649 (92.6)	173 (26.7)	8 (4.6)	55 (31.8)
3rd lot	644	578 (89.8)	87 (15.1)	13 (14.9)	38 (43.7)
4th lot	695	623 (89.6)	109 (17.5)	18 (16.5)	34 (31.2)
5th lot	1,351	1,228 (90.9)	180 (14.7)	23 (12.8)	82 (45.6)

Pln コード領域をターゲットとした Cas9 mRNA、gRNA 及び donor oligo を含む混合液を、5 回の実験（1st～5th lot）で計 4,051 個の受精卵にインジェクションした。括弧内の値は産生割合を示す。[a] 移植卵数/インジェクションした受精卵数、[b] 産仔数/移植卵数、[c]PLN ホモ欠損数/産仔数, [d]PLN WT 数/産仔数。

表 2.　CSQ 過剰発現マウスと非過剰発現マウスにおける PLN ホモ欠損と PLN WT の割合

ロット	合計	CSQ 過剰発現		CSQ 非過剰発現	
		PLN ホモ欠損	PLN WT	PLN ホモ欠損	PLN WT
1st lot	60	4 (3, 1)	18 (11, 7)	4 (2, 2)	34 (22, 12)
2nd lot	63	3 (2, 1)	22 (9, 13)	5 (3, 2)	33 (18, 15)
3rd lot	51	7 (3, 4)	18 (10, 8)	6 (3, 3)	20 (12, 8)
4th lot	52	11 (6, 5)	18 (8, 10)	7 (1, 6)	16 (6, 10)
5th lot	105	15 (6, 9)	41 (24, 17)	8 (2, 6)	41 (20, 21)

各数値はマウスの数（匹)、括弧内の値は左側が雄、右側が雌の数を示す。

ウスが 171 匹得られたが実験には供しなかった。

2.　生存率に対する影響

PLN 欠損による SERCA2a 活性増加の心不全死に対する影響を検討した。ロット 1-4 で得られた全雄性マウスを生存率試験に用いた。PLN WT/CSQ 過剰発現マウスは生後 30 日から死亡し始め、以前の報告（Jones et al., 1998）と同様に生後 60 日以内にはほぼ全例が死亡した（図 4）。PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスも生後 60 日までに全例が死亡したが、死亡例が観察されたのは生後 40 日過ぎからであった。PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスと PLN WT/CSQ 過剰発現マウスの生存日数の中央値はそれぞれ 55 日と 50 日で、PLN ホモ欠損マウスの方が有意に長かった（p=0.04, Gehan-Breslow-Wilcoxon test）。なお、予備検討において CSQ 非過剰発現マウスでは生後すぐの死亡が認められないことを確認しており、今回の検討には含めなかった。

3.　心循環動態に対する影響

ロット 5 の雄性マウスを用いて、生存率の低下が観察される直前の 5 週齢の時点での心機能を解析した。PLN WT/CSQ 非過剰発現マウス（以下、CSQ 非過剰発現マウスと呼ぶ。

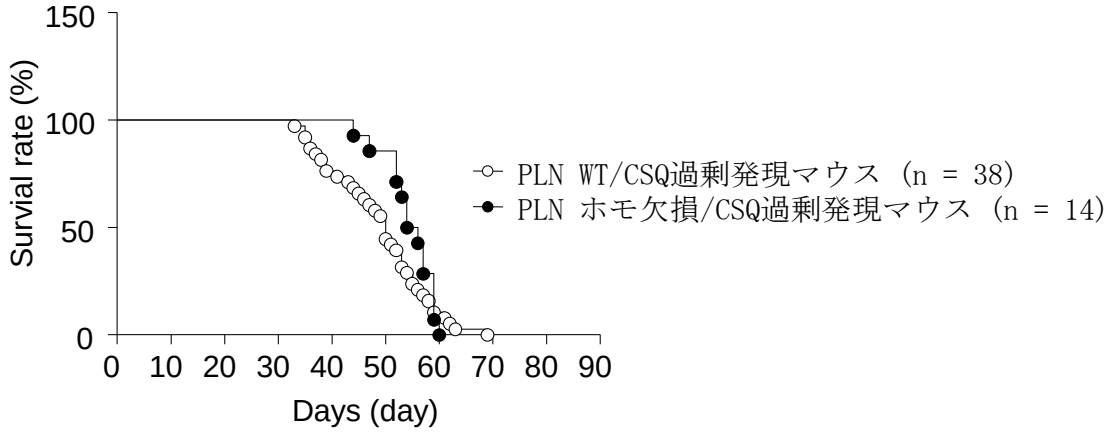

図 4　PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスと PLN WT/CSQ 過剰発現マウスの生存率曲線
PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（*Pln* コピー数> 0.95、n = 38）及び PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（*Pln* コピー数< 0.05、n = 14）の死亡の確認を生後 0 日目から 1 日 1 回行った。両群の生存率の有意差は p=0.04（Gehan-Breslow-Wilcoxon test）。

Pln コピー数; 1.17 ± 0.04、n=5）と比較して PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（*Pln* コピー数; 1.20 ± 0.04、n=8）は、心収縮能の指標である dP/dt_{max} 及び心弛緩能の指標である dP/dt_{min} の顕著な低下、別の弛緩能の指標である時定数 tau の延長、うっ血の指標である左室拡張末期圧（LVEDP）の増加傾向、血圧の低下が認められ、重篤な心機能不全に陥っていることが明らかとなった（図 5）。PLN ホモ欠損マウス（*Pln* コピー数; 0.001 ± 0.001、n=6）では 2 種類の弛緩能の指標（dP/dt_{min} と tau）が有意に改善して、収縮能が改善傾向を示した。一方、心拍数と血圧には PLN 欠損による変化は見られなかった。また、ロット 5 では PLN ホモ欠損/CSQ 非過剰発現マウスは 2 例のみしか得られず、そのうち測定した 1 例の心機能の値（dP/dt_{max}: 12,379 mmHg/s、dP/dt_{min}: -9,754 mmHg/s、tau: 0.007s、ΔLVEDP: 2.mmHg、心拍数: 411 bpm、平均血圧: 70 mmHg）は CSQ 過剰発現マウスにおける PLN 欠損と同様な傾向を示し、PLN WT/CSQ 非過剰発現マウスと比較して収縮/弛緩は増加したが、心拍数と血圧は変化が見られなかった。心機能測定時の不整脈の発生を観察したところ、CSQ 非過剰発現マウスと比較して CSQ 過剰発現マウスでは不整脈の発生頻度が増加していた。さらに、PLN WT/CSQ 過剰発現マウスと比較して PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスでは不整脈の発生頻度が低下していた（データ非公開）。

次に、心循環動態を測定したマウスから摘出した心臓の PLN と SERCA2a の蛋白質発現を測定した。PLN ホモ欠損/CSQ 非過剰発現マウス及び過剰発現マウスの両方において、PLN 蛋白質発現は全く検出されなかった（図 6）。一方、SERCA2a 蛋白質の発現量は PLN 欠損

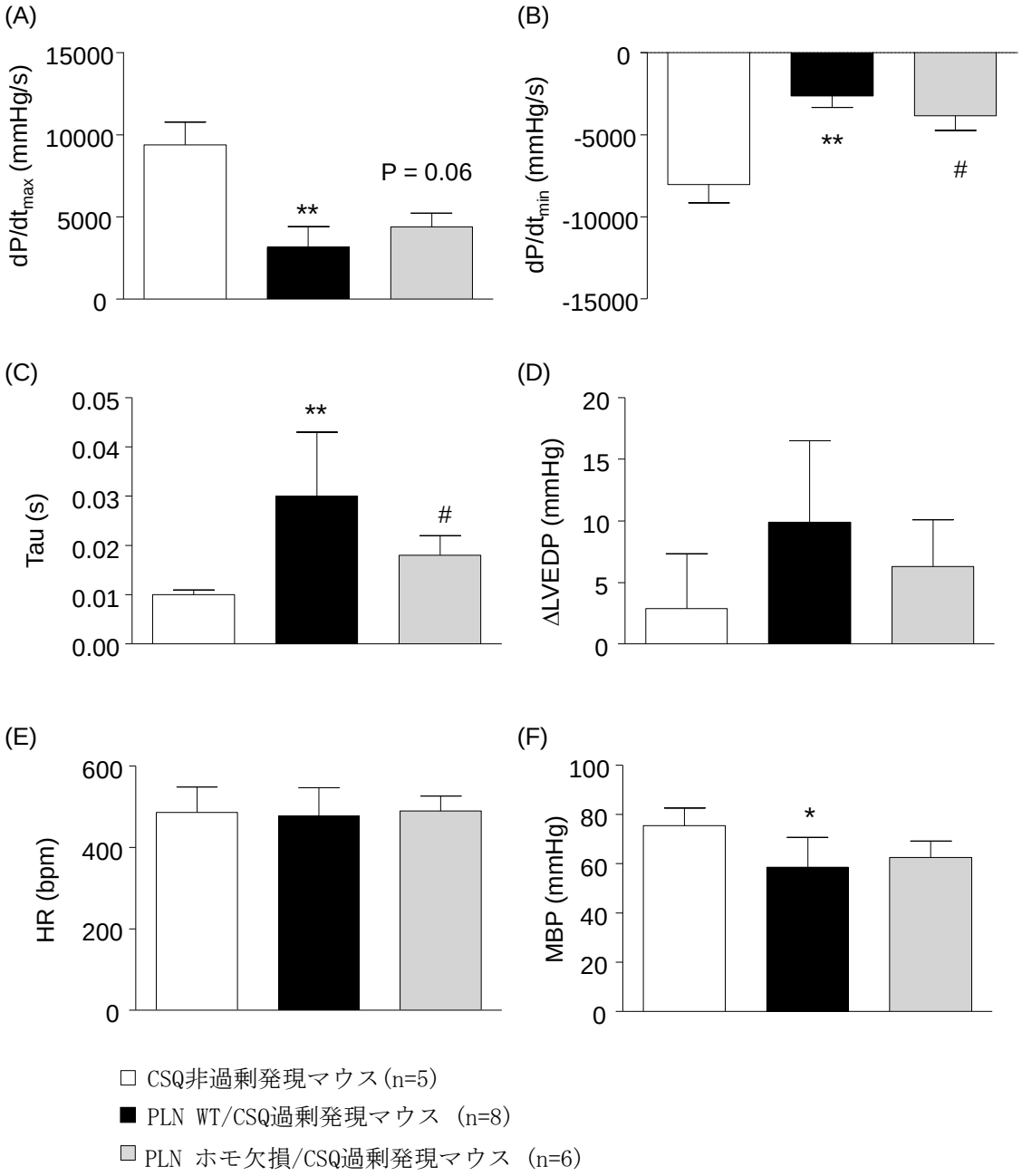

図 5　マウス心循環動態に対する CSQ 及び PLN 発現変化の影響

5 週齢の雄性 CSQ 非過剰発現マウス、PLN 野生型（WT）/CSQ 過剰発現マウス、PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスを用いて心カテーテル法にて測定した。(A) dP/dt_{max}、(B) dP/dt_{min}、(C) Tau、(D) LVEDP、(E) HR、(F) MBP。数値は全て平均値±標準偏差で示した。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$ vs. CSQ 非過剰発現マウス、 $^{\#}P < 0.05$ vs. PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（Student's *t*-test）。

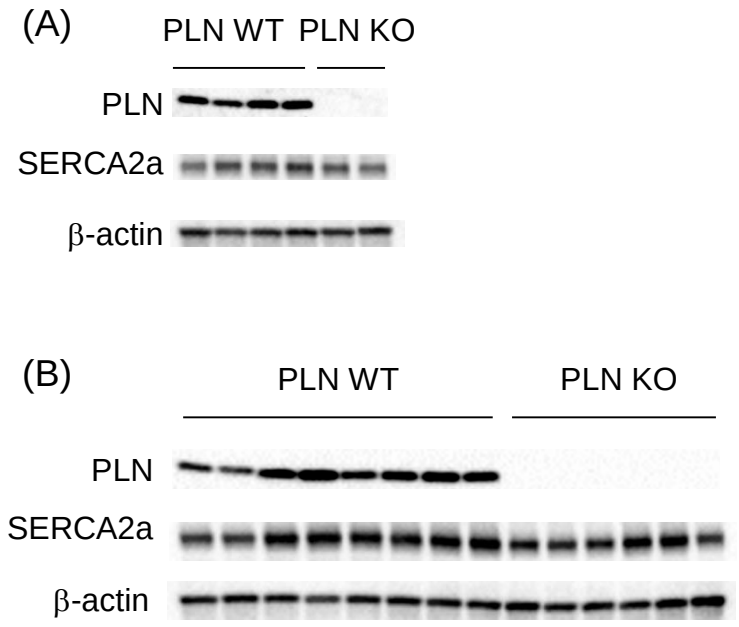

図 6　マウス心臓中の PLN と SERCA2a 蛋白質発現解析

CSQ 非過剰発現マウス（A）と CSQ 過剰発現マウス（B）の PLN 野生型（WT）と PLN ホモ欠損（KO）心臓における PLN、SERCA 及びβ-actin（内部標準）蛋白質発現のウエスタンブロット解析。心臓は心循環動態測定後の 5 週齢マウスから摘出した。

によって変化しなかった（SERCA/β-actin 比、PLN WT/CSQ 非過剰発現マウス: 2.00 ± 0.43、n=4 vs. PLN KO/CSQ 非過剰発現マウス: 1.74、n=2、PLN WT/CSQ 過剰発現マウス: 1.90 ± 0.30、n=8 vs. PLN KO/CSQ 過剰発現マウス: 1.59 ± 0.43、n=6）。

4. 心臓重量と肺重量に対する影響

CSQ 過剰発現マウスの心肥大に対する PLN 欠損の影響を検討するために、心循環動態測定に使用したマウスの左心室重量（LV）、右心室重量（RV）、心房重量（AW）及び肺重量（LW）を測定した。測定した全部位の重量が、CSQ 非過剰発現マウスと比較して PLN WT/CSQ 過剰発現マウスにおいて増加していた（図 7）。PLN 欠損は心房と肺重量の増加を有意に抑制した。興味深いことに、左室重量は PLN KO/CSQ 過剰発現マウスでむしろ増加した。PLN KO/CSQ 非過剰発現マウスから得られた 2 例の平均値は、PLN KO/CSQ 過剰発現マウスと同様の傾向、すなわち PLN WT マウスよりも左室重量が増大する傾向を示した（LV/BW: 3.95 mg/g、RV/BW: 1.06 mg/g、AW/BW: 0.42 mg/g、LW/BW: 6.15 mg/g、いずれも体重（BW）補正）。

CSQ 過剰発現マウスにおける PLN 欠損による左心室重量の増加が病的な心肥大であるか否かを検討するために、左心室の病的な心肥大マーカー遺伝子（β-MHC、ANF、BNF）の発現解析を行った。3 種類のマーカーの mRNA ともに CSQ 非過剰発現マウスと比較して PLN

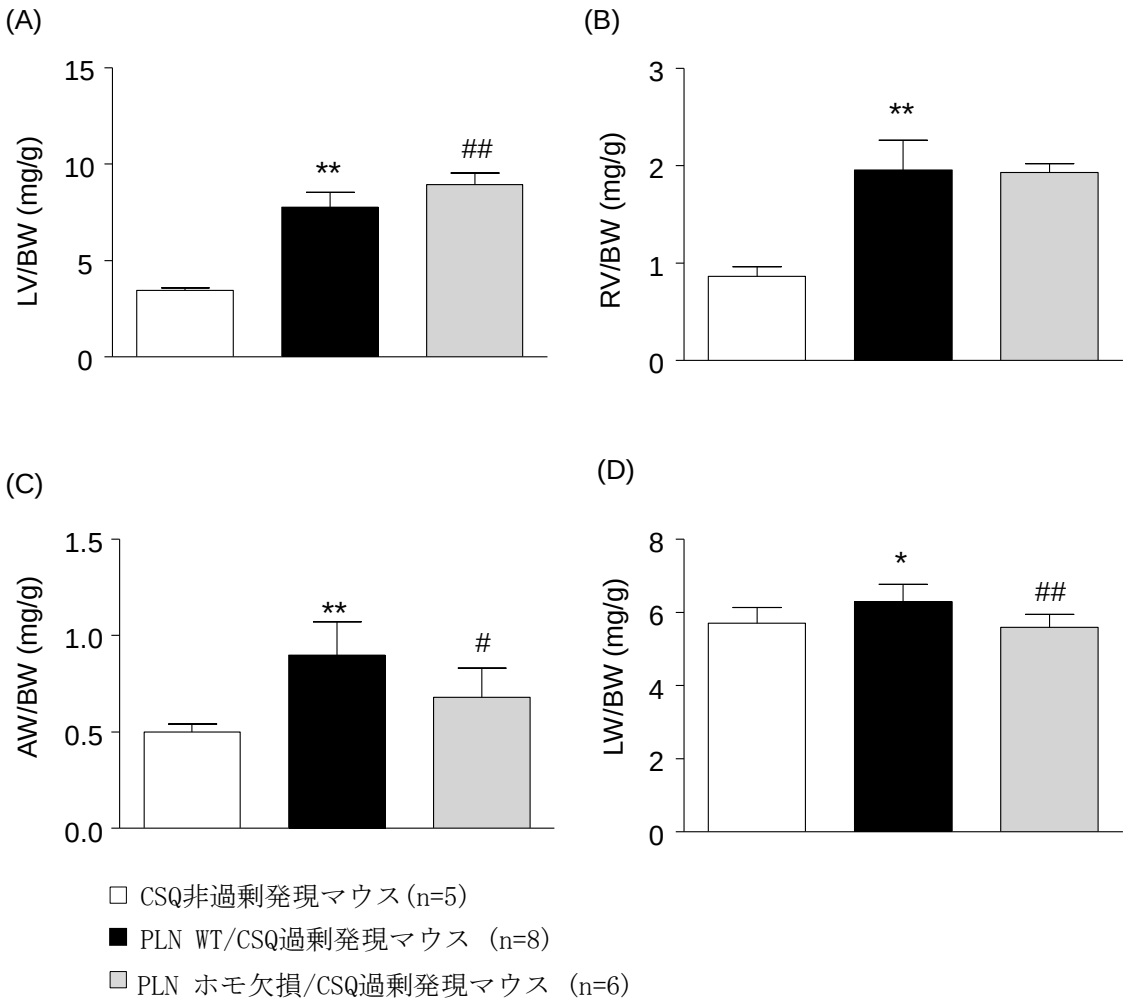

図 7　心臓及び肺重量に対する CSQ 及び PLN 発現変化の影響

PLN 野生型（WT）、PLN ホモ欠損 CSQ 過剰発現マウス及び CSQ 非過剰発現マウスにおける左室重量/体重（LV/BW）（A）、右室重量/体重（RV/BW）（B）、心房重量/体重（AW/BW）（C）及び肺重量/体重（LW/BW）（D）。心循環動態測定後の 5 週齢マウスの心臓及び肺を摘出して測定した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。*P <0.05、**P <0.01 vs. CSQ 非過剰発現マウス、 $^{\#}$P <0.05、$^{\#\#}$P <0.01 vs. PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（Student's *t*-test）。

WT/CSQ 過剰発現マウスにおいて左心室重量の増大に伴って増加していた（図 8）。しかし、PLN 欠損は、重量に対する作用とは異なり、β-MHC の発現上昇を有意に抑制した。また ANF と BNF では PLN 欠損による有意な変化は見られず、更なる増加は引き起こされなかった。

B. SERCA2a 活性化薬 compound A の心機能に対する効果

これまでの検討から PLN 欠損、すなわち SERCA2a 活性化は抗心不全効果を有することが明らかとなった。そこで次に、SERCA 活性を指標にした低分子化合物のスクリーニングから見出された compound A の心機能に対する効果を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。

1. Compound A による SERCA2a 活性化

最初に、compound A の SERCA 活性化作用を明らかにするために、イヌ心臓より単離した SR 小胞における Ca^{2+}依存的な ATPase 活性すなわち SERCA 活性に対する効果を検討した（図 9）。Ca^{2+}（0.567 μM）存在下で compound A（0.1–100 μM）は濃度依存的に ATPase 活性を増加した。なお、compound A は Ca^{2+}非存在下での ATPase 活性や、PLN を発現していない骨格筋（Periasamy and Kalyanasundaram, 2007）から単離した SR 小胞の ATPase 活性

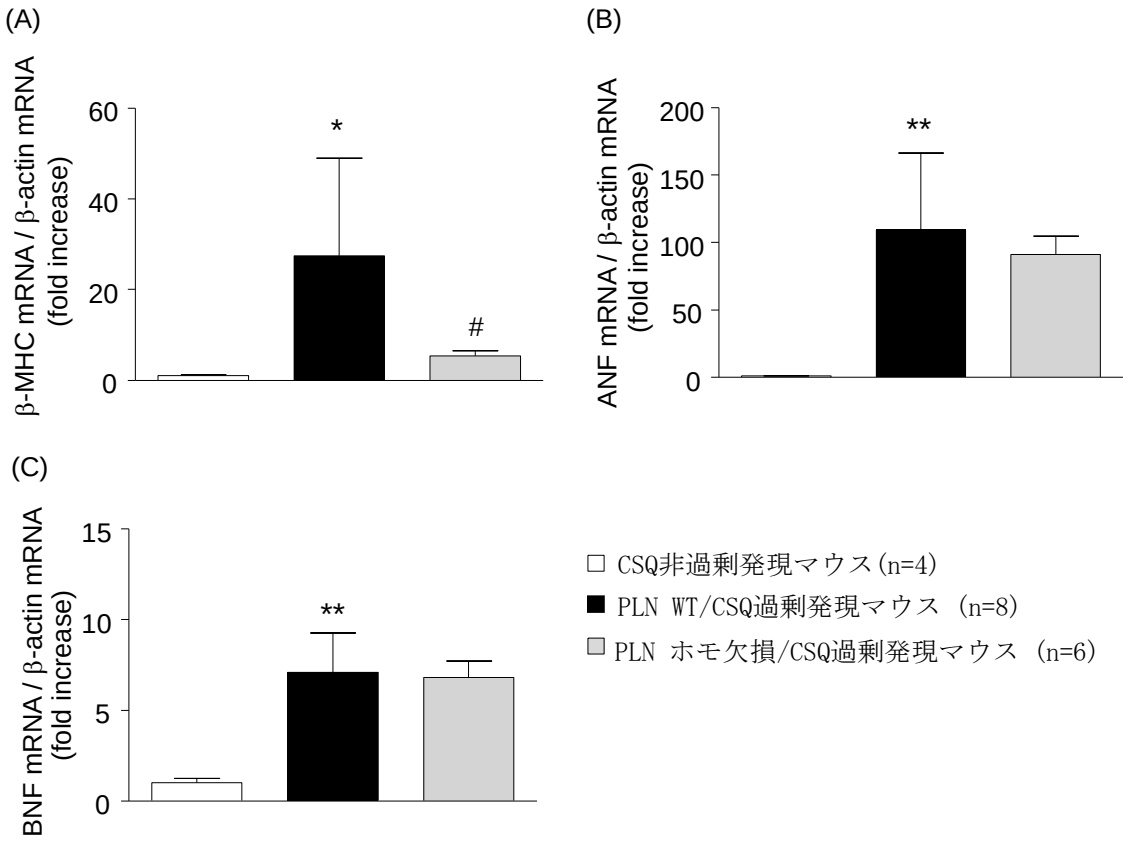

図 8　マウス左心室の心肥大マーカー遺伝子発現に対する CSQ 及び PLN 発現変化の影響

PLN 野生型（WT）、PLN ホモ欠損 CSQ 過剰発現マウス及び CSQ 非過剰発現マウス左心室におけるβ-MHC（A）、ANF（B）及び BNF（C）の mRNA 発現増加率。心臓は心循環動態測定後の 5 週齢マウスから摘出した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。*P <0.05、**P <0.01 vs. CSQ 非過剰発現マウス、$^{\#}$P <0.05 vs. PLN WT/CSQ 過剰発現マウス（Student's *t*-test）。

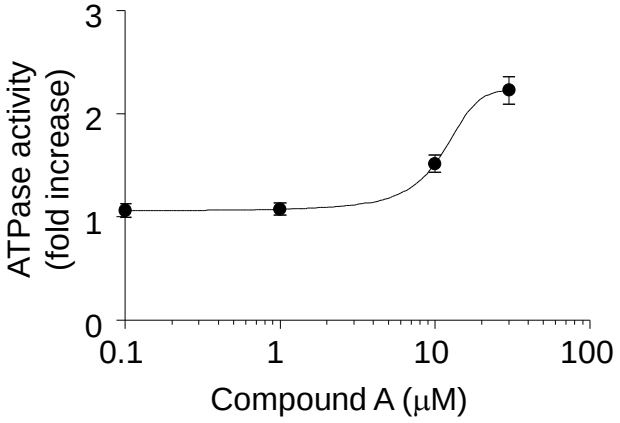

図 9　心臓から単離した SR 小胞における Ca^{2+}依存的な ATPase 活性に対する compound A の影響

イヌ心臓から調製した SR 小胞における 0.567 μM free Ca^{2+}存在下での ATPase 活性反応。Compound A（0.1–30 μM）は SR 小胞とともに 37℃で 4 分間インキュベーションした。数値は全て平均値±標準偏差で示した（n=3–5）。

に対して作用を示さないことを著者の研究グループが見出している。さらに、別の P 型 ATPase である Na^+/K^+-ATPase が発現しているシナプス膜（Erecinska and Silver, 1994）から単離した小胞の ATPase 活性に対しても、compound A は無作用であることも確認している（データ非公開）。これらのことから、compound A は PLN への結合とそれに伴う SERCA2a 活性の抑制解除によって選択的に SERCA2a を活性化していることと考えられる。続いて、compound A と PLN の結合を検討するために、PLN の部分ペプチド（PLN（1–36））を固定したセンサーチップを用いて SPR アッセイを実施した。結合応答は compound A の濃度依存的（1.6–100 μM）に増加し（図 10A）、compound A と PLN が直接結合することが示された。また compound A 適用終了後には直ちに SPR 応答が適用前の値まで回復したことから、この結合が可逆的だということが示唆された。Compound A と PLN の部分ペプチドとの計算上の解離定数は 75 μM であった（図 10B）。

2. 心筋細胞の Ca^{2+}動態に対する作用

心筋細胞での compound A による Ca^{2+}動態や収縮/弛緩に対する作用を検討した。マウス心筋由来 HL-1 細胞では caffeine 刺激による細胞内 Ca^{2+}増加量が SR 内の Ca^{2+}含量を現すと考えられる（Eisner et al., 2013）。Compound A（0.3–10 μM）は濃度依存的に caffeine（10 mM）による細胞内 Ca^{2+}上昇を増強した（図 11A と 11B）。さらに、この caffeine 刺激による細胞

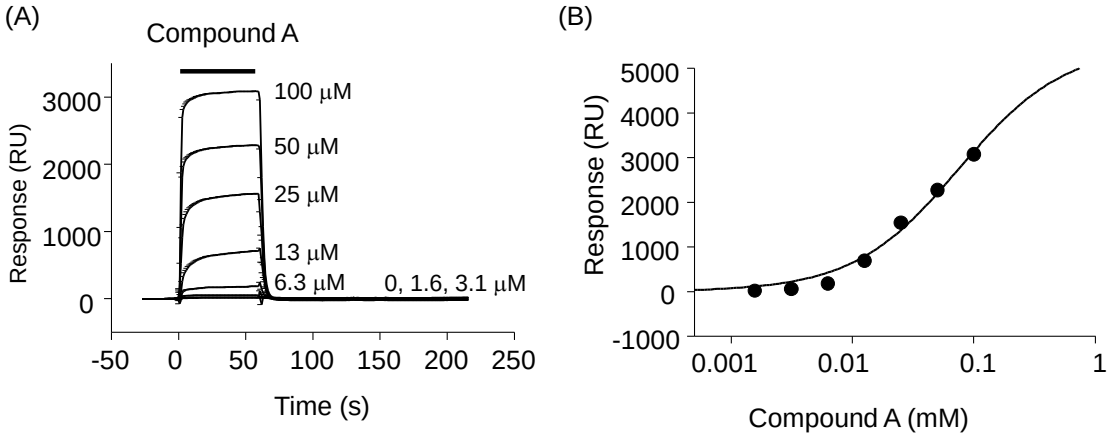

図 10　表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイを用いた compound A と PLN の部分ペプチド（PLN（1–36））の結合評価

Compound A と PLN (1-36) の結合を示す SPR 応答のトレース (A) 及び数値化した compound A の濃度依存的な SPR 応答反応（B)。ヒト型 PLN ペプチド（PLN（1–36））を固定したセンサーチップに compound A（1.6–100 μM）を 1 分間処置した。

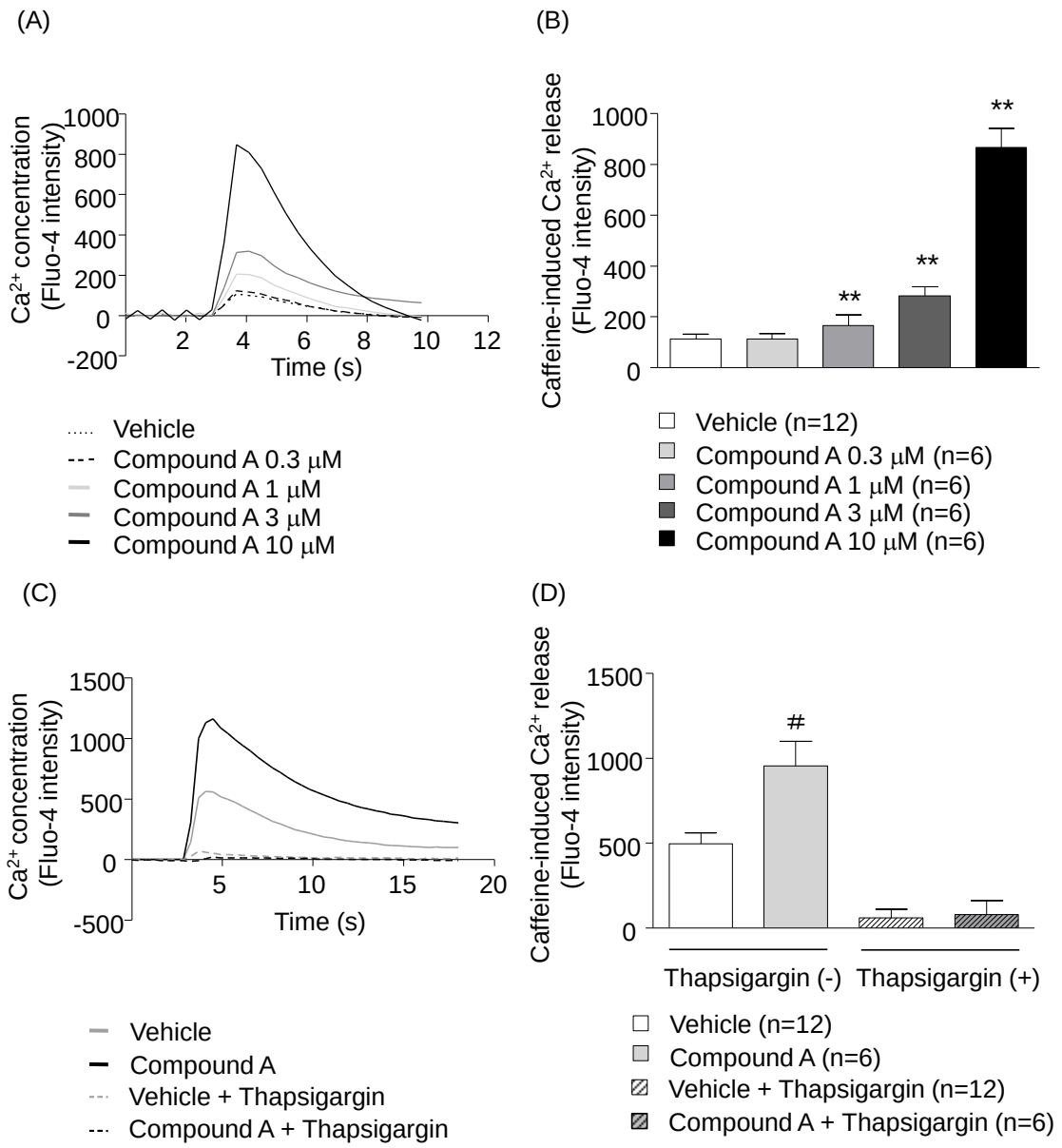

図 11　HL-1 細胞における caffeine 刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇に対する compound A の作用

HL-1 細胞における caffeine（10 mM）刺激による Ca^{2+} 上昇に対する compound A の増強作用（A 及び B）。Thapsigargin（0.3 μM）による抑制作用（C 及び D）。A 及び C は細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の代表的なトレースで、横軸は caffeine 処置開始（0 秒）からの時間を示している。数値は全て平均値±標準偏差で示した（B 及び D）。$^{**}P < 0.01$ vs. vehicle 群（両側 Williams test）。$^{\#}P < 0.05$ vs. vehicle 群（Student's *t*-test）。

内 Ca^{2+}上昇は SERCA 活性阻害薬の thapsigargin（0.3 μM）によって完全に抑制されたことから（図 11C と 11D）、compound A による筋小胞体内の Ca^{2+}含量増加は SERCA を介していることが支持された。

細胞株である HL-1 細胞より生体に近い細胞として成熟ラット分離心筋細胞を用いて、compound A の Ca^{2+}上昇とサルコメア収縮に対する作用を評価した。電気的フィールド刺激は心筋細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇とサルコメア収縮を引き起こした。Compound A（0.1–10 μM）は濃度依存的にこの電気刺激による Ca^{2+}上昇の振幅幅（図 12A と 12B）と減衰速度（図 12A と 12C）を増加させた。サルコメア収縮に対する作用も Ca^{2+}上昇に対する作用と一致しており、compound A は収縮ピーク（図 12D と 12E）と減衰速度（図 12D と 12F）を増加させた。

3. ラット摘出灌流心標本の心機能に対する作用

ラット摘出灌流心標本を用いて、compound A の心機能に対する効果を検討した。Compound A（0.3 及び 1 μM）を持続適用すると、急速に心収縮能と弛緩能が増加し、それに伴って CF も増加した。これらの効果は持続適用 10 分後に最大値に達した。適用 15 分後の値を図 13 に示した。収縮能、弛緩能及び CF は compound A（1 μM）によって有意に増加したが（図 13A、B、D）、HR は変化しなかった（図 13C）。

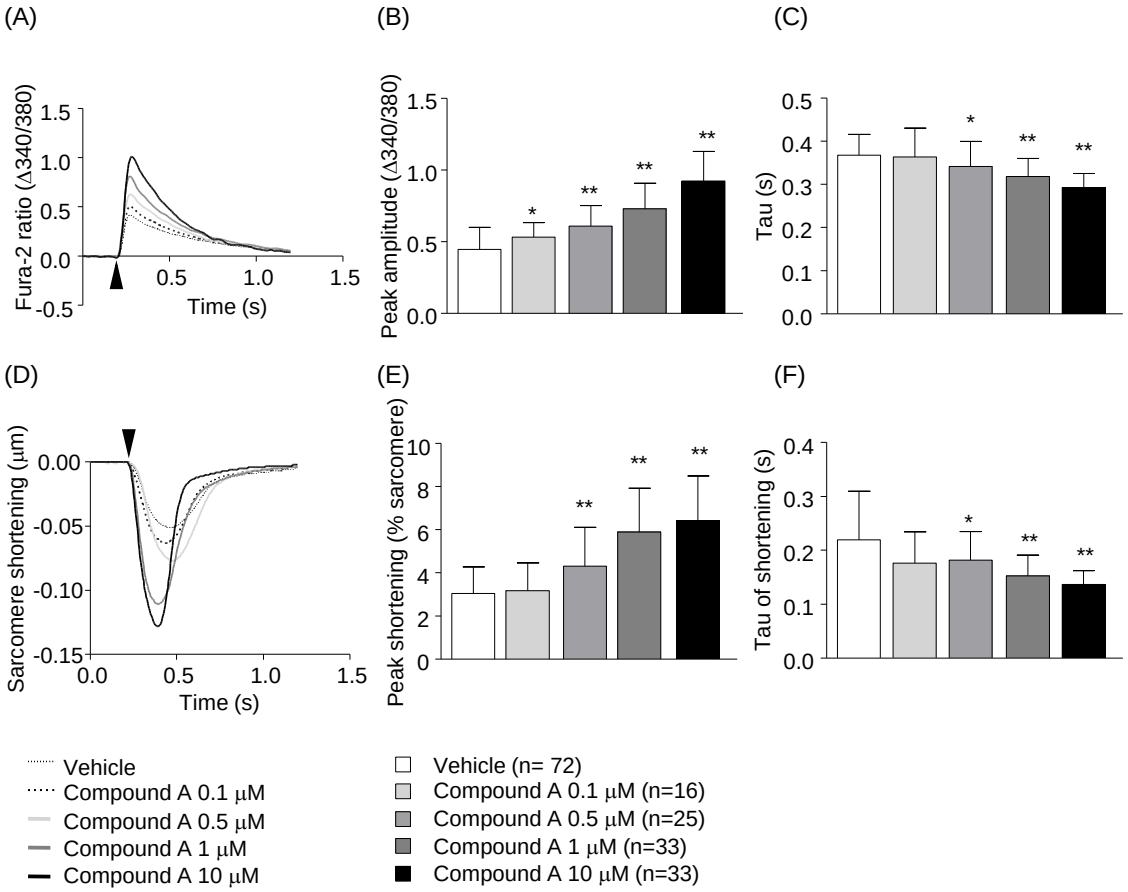

図 12　成熟ラット分離心筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 上昇とサルコメア収縮に対する compound A の作用

成熟ラット分離心筋細胞における電気刺激による細胞内 Ca^{2+} 上昇に対する compound A の増加作用（A 及び B）及び細胞内 Ca^{2+} 上昇の減衰速度（tau）の増加作用（A 及び C）。成熟ラット分離心筋細胞におけるサルコメア収縮に対する compound A の増加作用（D 及び E）及びサルコメア収縮の減衰速度（tau）の増加作用（D 及び F）。電気刺激（40 V、5 msec、0.5 Hz）の開始（▲）後の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化及びサルコメア収縮の代表的なトレース（A 及び D）。数値は全て平均値±標準偏差で示した（B、C、E 及び F）。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$ vs. vehicle 群（両側 Williams test）。

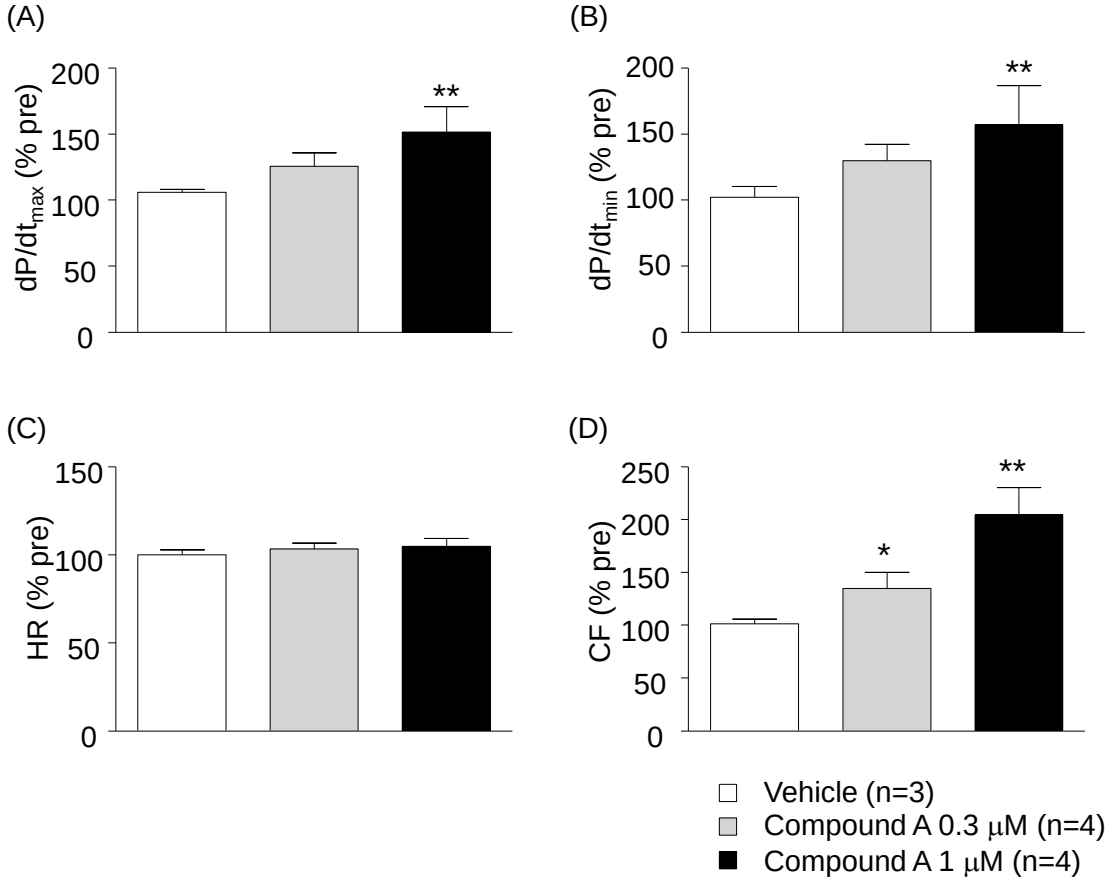

図 13　ラット摘出灌流心標本の心機能測定に対する compound A の作用

ラット摘出灌流心で測定した収縮能（dP/dt_{max}、A）、弛緩能（dP/dt_{min}、B）、心拍数（HR、C）及び冠血流量（CF、D）。Compound A 適用 15 分後の値を薬物適用前値に対する百分率で示した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$ vs. vehicle 群（両側 Williams test）。

4.　麻酔下ラット心循環動態に対する作用

Compound A の *in vivo* での心循環動態に対する作用を検討するために、麻酔下で正常ラットに心カテーテル法を実施した。Compound A は経口吸収性が不良なため、大腿静脈から 30 mg/kg を単回投与した後 2 mg/kg/min の速度で 60 分間持続投与した。投与 60 分後の時点で、compound A 投与群は vehicle 投与群と比較して 2 種類の弛緩パラメーター（dP/dt_{min} 及び tau）が有意に増加（図 14B と 14C）し、収縮能が増加傾向を示した（図 14A）。しかし、摘出灌流心標本での作用と同様に HR には無影響であった（図 14D）。

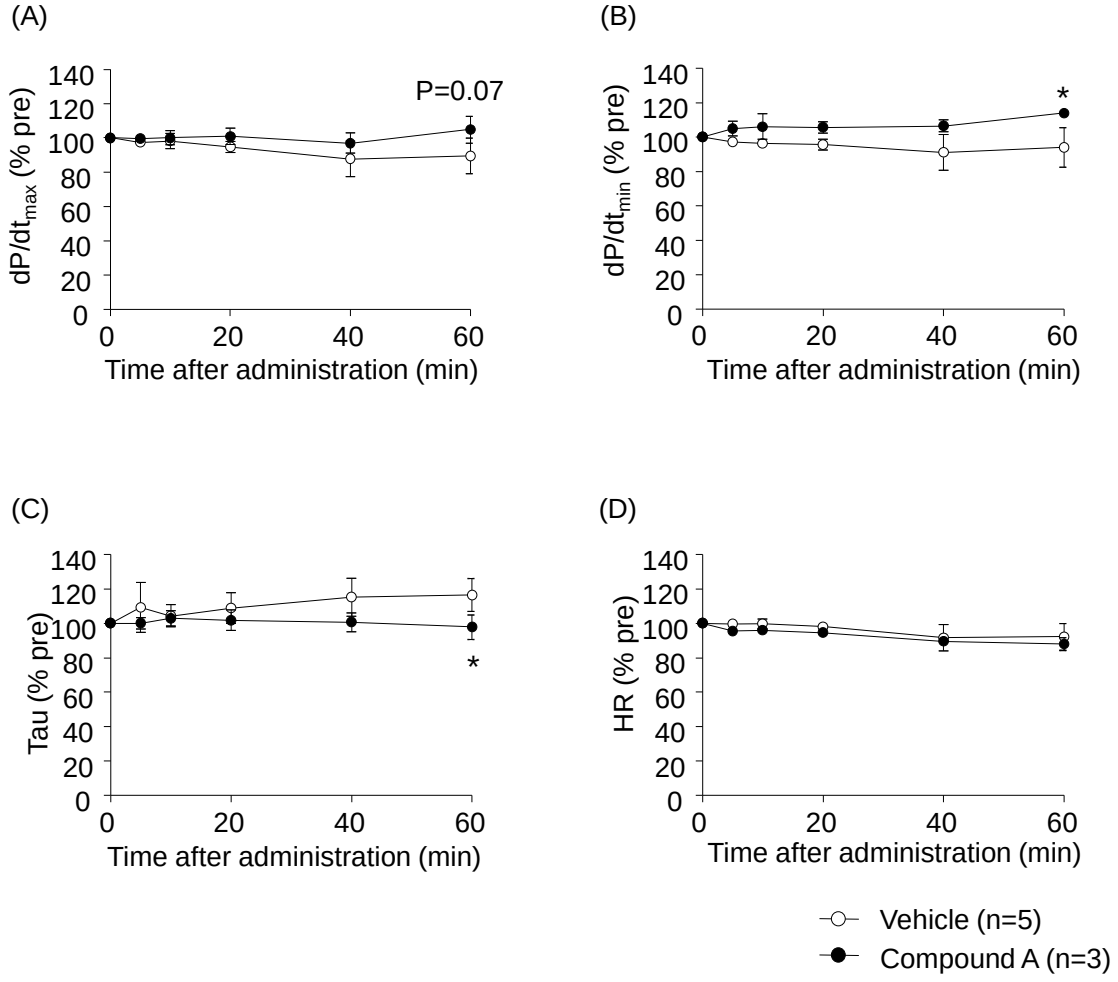

図 14　麻酔下ラット心循環動態に対する compound A の作用

麻酔下ラットに compound A を投与した時の心収縮能　(dP/dt_{max}、A)、弛緩能 (dP/dt_{min}(B)と tau(C))及び心拍数 (HR、D)。Compound A は大腿静脈から 30 mg/kg 急速単回投与の後に 2 mg/kg/min で 60 分間持続投与した。投与 60 分後の値を薬物投与前値に対する百分率で示した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。$^{*}P < 0.05$ vs. vehicle 群 (Student's *t*-test)。

IV. 考察

本研究において、SERCA2a を活性化させるために SERCA2a の抑制因子である PLN を CRISPR/Cas 法により欠損させた PLN 欠損/CSQ 過剰発現マウスが、心機能だけではなく生存率に対しても改善効果を示した。さらに、スクリーニングによって選出した低分子の新規 SERCA2a 活性化薬 compound A が、*in vitro* 心筋細胞や摘出心臓及び *in vivo* ラット心循環動態に対して、収縮能と弛緩能増加作用を示した。これらの結果から、SERCA2a 活性化はヒトや動物の心不全において、心機能のみならず生存率も改善する有効な治療法となる可能性が示された。

PLN 欠損 CSQ 過剰発現マウスにおける心不全改善作用

PLN 欠損や SERCA2a 活性化が心機能を改善するという報告は数多くあるが、心不全死を減少させるという報告は臨床への外挿性が不明な動物モデルを用いた 2 報のみであった（del Monte et al., 2001; Engelhardt et al., 2004）。そこで、心不全患者と同様な病態を示し、既存の抗心不全薬の薬効が確認されている重篤な心不全モデルである CSQ 過剰発現マウスを用いて、PLN 欠損が生存率を改善するか否かを調べた。これまでの報告と一致して（Jones et al., 1998）、CSQ 過剰発現マウスでは心臓のポンプ不全や心肥大を伴った死亡が生じ、生後 60 日以内にほぼ全例が死亡した。CRISPR/Cas 法による PLN 欠損は CSQ 過剰発現マウスの

生存率、特に早期の段階での死亡に対して改善効果を示した。CSQ 過剰発現マウスの死亡原因は、全身の器官への十分な血液供給ができなくなるポンプ不全だと考えられている。加えて、ポンプ不全は心房内血栓を産生し（しばしば CSQ 過剰発現マウスで見られる）、脳卒中による死亡をきたす。DBA/2 マウス系統バックグランドの CSQ 過剰発現マウスで報告されたように（Sato et al., 2001）、今回用いた C57BL/6J マウス系統バックグランドで心不全症状がより重篤な CSQ 過剰発現マウスにおいても PLN のホモ欠損は有意な心機能改善作用を示したことから、全身への血液供給が増加し心房血栓の形成が抑制され、結果として死亡率の低下に繋がったものと考えられる。また、CSQ 過剰発現マウスのもう一つの主な死亡原因は致死性不整脈である。不整脈は心不全において異常な Ca^{2+}動態によって惹起され（Pogwizd and Bers, 2002; Zhao et al., 2012）、実際に、CSQ 非過剰発現マウスと比較して CSQ 過剰発現マウスでは不整脈の発生が増加していた。著者の研究グループでは心機能測定時に PLN WT/CSQ 過剰発現マウスと比較して PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスでは不整脈の発生頻度が低下していることを観察しており、PLN 欠損による抗不整脈効果も生存率改善効果に寄与しているかもしれない。また、PLN 欠損は血圧や心拍数に影響を与えなかったことから、後負荷の減少やエネルギー消費の低下は生存率の改善に寄与していないことが示唆される。一方、β受容体作動薬や PDE III 阻害薬などの既存の強心薬は、心不全患者において異常な電気的活性の発生やエネルギー涸渇によってむしろ生存率を悪化させることが臨床試験の結果から明らかとなっている（Abraham et al., 2005; O'Connor et al., 1999）。

しかし、PLN 欠損や SERCA2a 活性化は、エネルギー消費に対して有害な影響を示さないことが報告されており（Lyon et al., 2011; Sakata et al., 2006）、本研究においても心不全死を増加させないことが明らかとなった。また、ジゴキシンなどの強心配糖体は Na^+/K^+-ATPase 阻害作用によって Na^+/Ca^{2+} exchanger の作用が亢進して細胞内 Ca^{2+}濃度が増加することによって収縮が増加する。しかし、細胞内 Ca^{2+}の増加は不整脈を誘引することから安全域が狭いことが問題である。それに対して、PLN 欠損や SERCA2a 活性化は細胞内の Ca^{2+}動態やバランスを改善するため、不整脈の心配が少ないと考えられる。従って、PLN 欠損は既存の強心薬とは異なり、生存率改善作用を伴う心機能改善作用を示す魅力的なアプローチである。

本研究において、PLN 欠損は初期の死亡を抑制したが、60 日齢以降で PLN WT/CSQ 過剰発現マウスの死亡率と差は認められなかった。この結果は、β1 受容体過剰発現心不全マウスで PLN 欠損が 1 年間の追跡期間の生存率を増加したという別の試験とは一致しない（Engelhardt et al., 2004）。この矛盾の 1 つの説明は、Ca^{2+}動態に関連する薬剤や遺伝子操作の影響を調べるモデルとしての CSQ 過剰発現マウスの限界である。CSQ は SR 内に存在する Ca^{2+}結合蛋白であり、過剰発現により Ca^{2+}の SR から細胞内への放出が減少して収縮が低下し、また SR 内 Ca^{2+}の濃度が高くなるために SR 内への Ca^{2+}取り込みが減少して弛緩低下、心筋細胞肥大や不整脈が惹起されて心不全となる。PLN 欠損や SERCA2a 活性化は SR 内への Ca^{2+}取り込みを促進するが、CSQ 過剰発現マウスでは高発現している CSQ に Ca^{2+}が結合する。そのため、SR 外へ放出され収縮に利用される Ca^{2+}の量が制限され、PLN 欠損や

SERCA2a 活性の効果を限定してしまうかもしれない。この点を考慮した上でも、CSQ 過剰発現マウスは上述したような心不全病態の特徴を持ち心不全死を評価できる有用な動物モデルであるため、本研究においてこのマウスを用いた。加えて、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、β受容体遮断薬のような抗心不全薬として臨床で用いられている薬剤が、このモデルで生存率改善作用を示している（Harding et al., 2001; Kaneko et al., 2017）ことも今回このマウスを用いた理由の一つである。

本研究で PLN ホモ欠損マウスでは PLN の蛋白レベルが完全に欠損していることが示された。以前の報告では（Luo et al., 1994; Minamisawa et al., 1999）、PLN 欠損は SERCA 活性の増加とその後の Ca^{2+}動態の改善をもたらすことから、PLN ホモ欠損マウスでも SERCA 活性や細胞内 Ca^{2+}動態に対して同様な作用を引き起こしていると考えられる。しかし、今回用いたマウスモデルでは SERCA 活性や細胞内 Ca^{2+}動態を測定しておらず、今後の課題である。

本研究で心肥大が CSQ 過剰発現マウスで見られ、PLN 欠損は心房の肥大を改善したが、心室の肥大に対しては改善作用を示さなかった。PLN 欠損によって肺重量が減少していたことから、心房肥大の軽減は PLN 欠損によるうっ血改善によるものと考えられる。対照的に、左心室重量は PLN 欠損でむしろ増加した。しかし病的心肥大で増加することが知られているマーカー遺伝子であるβ-MHC、ANF、BNF が、PLN ホモ欠損/CSQ 過剰発現マウスでは mRNA の発現上昇を示さなかった。そのため、この心室の肥大は心不全で見られる圧負荷や容量負荷によってもたらされる病的心肥大とは異なっていると考えられる。運動によ

って生じる生理的心肥大は心臓のポンプ機能を増加し、末梢組織への血液や酸素の供給を高める。この生理的心肥大は、病的心肥大とは構造も分子的プロファイルも異なる（Bernardo et al., 2010; McMullen et al., 2003）。CSQ 過剰発現マウスにおいて、PLN 欠損は増加した心機能に伴って生理的心肥大を呈し、それが病的心肥大の抑制と拮抗したのかもしれない。この仮説の検証には追加の検討が必要である。

SERCA2a 活性化薬の心機能増強効果

遺伝子改変による PLN 欠損や SERCA2a 活性化による *in vivo* 心機能測定試験の報告は多数あるが、低分子で選択的な SERCA2a 活性化薬による *in vivo* の心機能に対する影響を評価した試験の報告はない。著者の研究グループでスクリーニングから見出した SERCA2a 活性化薬 compound A は骨格筋の SR における ATPase 活性には影響しなかったが、心筋 SR の ATPase 活性を増加した。心臓と骨格筋の ATPase 活性は SERCA2a と SERCA1a がそれぞれ担うことが知られており、SERCA1a は SERCA2a と高い相同性を示すが PLN による制御を受けていないことが報告されている（Toyoshima et al., 2003）。また、SR アッセイで compound A と PLN の直接的な結合が示されたことから、compound A は PLN と結合することで SERCA2a の抑制を解除し、SERCA2a を活性化していると考えられる。Compound A の SERCA2a と PLN への作用は、シナプス膜の Na^+/K^+-ATPase 活性に対して無作用だったこと（データ非公開）からも支持される。

Compound A の PLN への結合や結果として生じる SERCA2a の活性化は、心臓 SR 内への Ca^{2+}取り込みの増加に伴う細胞内 Ca^{2+}の減衰の増加、心筋細胞の弛緩能の増加といった作用を引き起こすことが期待された。本実験において、compound A によるこれらの効果は、成熟ラット分離心筋において認められた。また、compound A を処置した HL-1 細胞において caffeine による Ca^{2+}放出が増加し、この増加反応は SERCA 阻害薬である thapsigargin によって完全に遮断された。このことから、compound A が SERCA2a による Ca^{2+}取り込みを増加させていることが示された。Caffeine は SR 上のライアノジン受容体を開放固定するため SR から Ca^{2+}が細胞内へ放出されて、一過性に細胞内 Ca^{2+}濃度を増加させる（Cheek et al., 1994）。そのため caffeine による Ca^{2+}上昇の大きさは SR 内の Ca^{2+}量に比例する（Eisner et al., 2013）。PLN 欠損マウスの心筋細胞においても caffeine による Ca^{2+}放出の増加が報告されている（Li et al., 1998）。Compound A を処置した細胞では、電気刺激による細胞内 Ca^{2+}上昇やサルコメア収縮の増加が生じた。Ca^{2+}上昇や収縮/弛緩の同様な増加は SERCA2a 過剰発現心筋細胞（Meyer and Dillmann, 1998）や PLN 欠損心筋細胞（Hüser et al., 1998）でも報告されており、SERCA2a を介した SR への Ca^{2+}取り込みは、心筋細胞の細胞内 Ca^{2+}上昇と収縮反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

分離心筋細胞の結果と同様に、compound A はラット摘出灌流心臓において、収縮と弛緩を増加させた。同様の効果は SERCA2a 過剰発現マウス（Baker et al., 1998）や PLN 欠損マウス（Sakata et al., 2006）から摘出した心臓でも報告されている。重要なことに、compound

A はこのラット摘出灌流心臓実験でも *in vivo* の麻酔下ラットの心機能測定実験でも HR には影響を与えなかった。HR を規定するペースメーカー細胞には PLN の発現がほとんどないことから（Sirenko et al., 2013）、compound A は HR を変化させなかったと考えられる。これは SERCA2a 過剰発現マウスや PLN 欠損マウスの HR が WT マウスと差がなかったという報告と一致する（Meyer and Dillmann, 1998; Slack et al., 2001）。Compound A が HR に影響を与えないというデータは、HR を増加させるメカニズムである PKA や PDE III には作用しないということを表している。加えて、compound A は Ca^{2+}/カルモジュリン依存性キナーゼ II α, β, δ, γ のいずれにも強い作用を示さないことを著者の研究グループでは確認している。

ラット摘出灌流心臓において、compound A（0.3 μM）の持続投与は収縮能と弛緩能をそれぞれ 30%及び 26%増加させた。麻酔下ラットの *in vivo* 心機能測定実験において、compound A は持続投与 60 分後に収縮能と弛緩能をそれぞれ 21%及び 17%増加した。この時の血漿中の蛋白非結合 compound A 濃度を著者のグループで測定したところ 0.46 μM であった。この濃度は摘出灌流心臓の作用濃度とよく一致しており、*in vivo* で認められた心機能の変化が、compound A の心臓直接的な作用であることが強く示唆される。なお、ATPase 活性や PLN の結合アッセイでは、compound A が明確な作用を示す濃度は 10 μM よりも高かった。結合アッセイでは PLN の 52 個のアミノ酸のうち C 末端から 16 個が欠けた部分ペプチドを用いていることが、compound A の効果に影響しているのかもしれない。さらに、SERCA2a 活性は PLN 以外の調節分子の dwarf open reading frame（DWORF）（Nelson et al., 2016）や S100A1

（Vangheluwe et al., 2005）によっても制御されていることが知られている。Compound A の有効濃度の相違は、このような生理的活性物質の有無が影響しているのかもしれない。別の可能性としては、compound A が心筋細胞では PLN 以外の標的にも作用しているということも考えられる。これらの可能性を検証するにはさらなる検討が必要である。

臨床において、アデノ随伴ウイルスをベクターとして SERCA2a を導入する遺伝子治療の臨床第 2 相試験（CUPID 2）が心不全患者を対象に実施されたが有益な効果を得ることが出来なかった。しかし、これは心臓における SERCA2a 発現が不十分だったことが失敗の原因だったと考えられている（Greenberg et al., 2016）。それ故、臨床での SERCA2a 活性の有効性についてはまだ結論が出ていない。今後、compound A の *in vitro* 活性や血中動態を改善することで、臨床応用の可能性が現実的なものになることと期待される。

V.　小括

第1章では、新規心不全治療薬の候補としてのSERCA2a活性化の有用性を、遺伝子改変動物や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用いて検証した。CSQ過剰発現マウスにSERCAの抑制蛋白であるPLNを欠損、すなわちSERCAを活性化させた遺伝子組み替えマウスを作製して、生存率改善効果や心機能改善効果を検証した。続いて、compound Aの選択性やメカニズム検証を実施し、細胞や生体での心機能に対する効果を検討した。

1. CRISPR/Cas法を用いて、PLNを欠損したCSQ過剰発現マウスを得ることができた。668匹中70匹が*Pln*領域を欠損したマウス（*Pln*コピー数<0.05）で、261匹は非欠損（WT）マウス（*Pln*コピー数>0.95）であった。残り337匹は*Pln* コピー数が0.05-0.95のPLNモザイクであった。

2. PLN WT/CSQ過剰発現マウスは心機能低下、心肥大、うっ血といった重篤な心不全症状を示し生後30日から死亡し始め、生後60日以内にはほぼ全例が死亡した。PLNホモ欠損/CSQ過剰発現マウスも生後60日までに全例が死亡したが、死亡例が観察されたのは生後40日過ぎからであった。死亡初期の段階における有意な生存率改善効果を示した（生存日数

の中央値、PLNホモ欠損/CSQ過剰発現マウス :55日、PLN WT/CSQ過剰発現マウス :50日、p=0.04）。

3. PLN WT/CSQ過剰発現マウスでは左室拡張末期圧の上昇、収縮能/弛緩能の低下が見られた。PLNホモ欠損/CSQ過剰発現マウスの心機能は弛緩能の有意な改善や収縮能の改善傾向を示した。さらにPLN欠損によって、CSQ過剰発現で観察される心房重量及び肺重量増加が有意に抑制され、うっ血が改善していることが示唆された。

4. SERCA2a活性化を指標に選出したcompound Aが、イヌ心臓から単離したSR小胞のSERCA2aを活性化することを明らかにした。この化合物はSERCA1aやNa^+/K^+-ATPaseに対しては無影響であった。さらにPLNの部分ペプチド（PLN（1–36））に対する結合実験の結果から、compound AがSERCA2aの抑制蛋白であるPLNに直接結合していることが示された。

5. Compound Aの細胞内Ca^{2+}動態に対する作用を検討したところ、HL-1細胞においてcompound AはSR内のCa^{2+}量を増加させた。この増加はSERCA阻害薬であるthapsigargin存在下では消失したことから、SERCA活性化を介した作用だということが示唆された。

6. 成熟ラット分離心筋細胞において、compound Aは電気刺激によるCa^{2+}上昇の振幅幅と減衰速度を増加させ、サルコメア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SERCA活性化及びPLN欠損と同様なプロファイルであった。

7. ラット摘出灌流心臓においてcompound Aは心拍数に影響を及ぼすことなく急速に収縮能や弛緩能を増加させた。

8. 麻酔下ラットにcompound A（30 mg/kg, i.v.+ 2 mg/kg/min, i.v.持続投与）を60分間持続投与した。投与60分後の時点で、compound A 投与群ではvehicle群と比較して有意な弛緩能増加作用を示し、心拍数には影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、SERCA2a 活性化作用は、心機能増加だけではなく生存率改善作用も併せ持つ有用な抗心不全薬となり得ることが示された。また、compound A は SERCA2a に選択的であり、その作用メカニズムが PLN に直接結合して PLN よる SERCA2a 抑制を解除することであることが示唆された。

第 2 章　心不全モデルマウスを用いた microRNA 発現解析による新規バイオマーカー探索

Ⅰ. 緒論

心不全治療において、正確な診断はその後の治療方針を決定するのに非常に重要であり、バイオマーカーの探索と確立が盛んに行われている。現在までに、BNP、ProBNP の不活化断片である NT-proBNP、ガレクチン 3 など幾つかの有用なバイオマーカーが同定された。しかし、心不全は、酸化ストレスや炎症、線維化、神経液性因子の活性化、虚血など様々な要因によって生じる複雑な疾患であり、既知のバイオマーカーだけでは不十分で新規のバイオマーカーが求められている（Maisel et al., 2008）。イヌやネコの心不全をはじめとする心疾患の診断にも NT-proBNP やトロポニンがバイオマーカーとして利用されているが、心不全患者同様に 1 種類のバイオマーカーだけではなく複数を組み合わせることの重要性が指摘されている（Boswood, 2009）。

MicroRNA（miRNA）は哺乳類で高く保存されているノンコーディング RNA で、臓器から血中へ分泌される。MicroRNA は蛋白への翻訳を抑制したり mRNA の分解を促進することによって、細胞分化、アポトーシス、ストレス応答、増殖など様々な生理的な反応を調節する（Bartel, 2004）。さらに、miRNA は心機能の調節や心肥大や心筋梗塞など心疾患に関与していることが報告されている（Boštjančič et al., 2009; Wang and Yang, 2012）。最近の研究

で、幾つかの miRNA が心不全患者や心不全動物モデルで変化していることや（Topkara and Mann, 2011）、マウスにおいて miRNA の欠損や過剰発現が心不全の進行に影響を与えることが報告された（Li et al., 2013; Ucar et al., 2012）。それ故、その正確な作用機序は不明なものの miRNA は魅力的な治療ターゲットとして考えられている。さらに、血中に存在する miRNA は RNA の分解酵素である RNase 活性に対して抵抗性であるため安定性が高いことから（Weber et al., 2010）、バイオマーカー候補としても注目が集まっている。心疾患において、バイオマーカーとしての血漿中 miRNA の探索は主に心筋梗塞で行われている。心臓に発現している幾つかの miRNA はトロポニンやクレアチンキナーゼ MB のような心筋細胞中の蛋白と同様に心筋梗塞になると血中へ放出されるので（Wang et al., 2010）、測定や研究が容易である。一方、より複雑な疾患である心不全患者の血漿中 miRNA を測定した報告は数報しかなく、抗心不全薬の治療効果を見た報告はない。さらに、心不全動物モデルにおける網羅的解析の報告は無く、心不全に対するバイオマーカーとして有用な miRNA は見出されていない。そこで、第 1 章の検討でも用いた重篤な心不全モデルである CSQ 過剰発現マウスを用いて血漿中 miRNA の網羅的測定を行い、さらに、強力なアンジオテンシン II 受容体拮抗薬である azilsartan medoxomil（AZL-M; TAK-491）（Ojima et al., 2011）の作用を検討した。

II.　実験方法

A. 動物

イヌの CSQ を過剰発現させたマウス（CSQ 過剰発現マウス）はインディアナ大学で確立された系統である（Jones et al., 1998）。この系統は DBA/2 マウスをバックグラウンドとして維持されている。詳細は第 1 章に示した。全ての動物実験は NIH（National Institutes of Health）の動物実験ガイドライン（National institutes of health guidelines for the care and use of laboratory animals）と武田薬品工業株式会社の動物実験ガイドラインに基づいて実施した。

B. 試薬

Azilsartan medoxomil（AZL-M; TAK-491）は武田薬品工業株式会社で合成されたものを（Ojima et al., 2011）、0.5%メチルセルロース（信越化学）液に懸濁して使用した。その他の試薬については本文中にそれぞれの購入先を記載した。

C. 生存時間解析

全ての試験に雄性 CSQ 過剰発現マウス（DBA/2 と C57BL/6J マウスバックグラウンド）を使用し、5 週齢より投薬を開始した。AZL-M は、投薬当日に調製して 10 mL/kg で 1 日 1

回強制経口投与した。Vehicle として 0.5%メチルセルロース液を用いた。マウスの体重は週に 1 回測定し、死亡確認は毎日実施した。7 週齢以降は直腸温を毎日測定して 29℃以下になったら炭酸ガスで安楽死処置を行った。さらに、極端な活動低下や体重減少などの所見が見られたら同様に安楽死処置を実施した。

D. 覚醒下血圧測定

生後 5 週齢のマウスを用いて、AZL-M を 3 日間反復投与後、最終投与の 2 時間後及び 24 時間後にテールカフ法（BP-98A:Softron）にて収縮期血圧（SBP）と心拍数（HR）を測定した。

E. 麻酔下マウス心循環動態測定

7 週齢の CSQ 過剰発現マウスの心機能を測定した。マウスをペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg,i.p.、共立製薬）で麻酔し保定した。実体顕微鏡下で、右頚動脈を剥離して 1.4 F の圧センサー付きミラーカテーテル（SPR-671、Millar Instruments）を挿入し、大動脈平均血圧（MBP）及びその脈波から HR を記録した後、左心室内圧（LVP）及びその微分値（LV dP/dt）を測定した。各パラメーターの値は、ポリグラフ（NEC San-ei Instruments Ltd.

及び Nihon Kohden Corporation）からアナログ/デジタル変換器（MacLab、AD Instruments）を介してコンピューターに取り込み、データ解析ソフトウェア（Lab Chart 5.3、AD Instruments）を用いて解析した。測定終了後に、麻酔下で放血によって安楽死し、心臓と肺を摘出した。心臓は左心室、右心室、心房に分けて重量を測定し、体重で除した値で示した。これらの操作は全てブラインド条件下で行った。重量測定後、心臓サンプルは液体窒素にて凍結し測定に供するまで-80℃で保管した。

F. MicroRNA の網羅的発現解析

ペントバルビタール麻酔下マウスの腹部大静脈から血液を採取した。MicroRNA は 200 μL の血漿から QIAzol Lysis Reagent と miRNeasy Micro kit（QIAGEN）を使って精製した。発現解析は 585 種類の miRNA を含む TaqMan Array MicroRNA Card（Rodent v2.0: Life Technologies）を使って添付文書に従って実施した。Ct 値が 35 以上の場合は正確に発現を反映していない可能性があるため、3 例以上の個体で 35 以上の Ct 値を示した miRNA は解析から除外した。標的 miRNA の Ct 値から検出可能だった全ての miRNA 量の Ct 値の中央値を差し引いた値を補正後 Ct 値としてデータ解析に用いた。相対的 miRNA 発現は、ΔΔCT 法によって算出した。クラスタリング解析とヒートマップの作成には MATLAB software（The Mathworks Inc.）を使用した。

G. Real-time PCR

特定の miRNA の発現をさらに詳細に解析するために、real-time PCR を行った。網羅的発現解析とは別のロットの CSQ 過剰発現マウスを用いて投薬とサンプリングを実施した。血液採取と miRNA の精製は上述の方法と同様に実施した。個々の miRNA に特異的な cDNA の合成は、得られた total RNA（5 ng/7.5 μL）を TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit（Life Technologies）及び各々のプライマーと共にキットの添付文書に従って反応を行った。PCR 反応は、TaqMan PreAmp Master Mix と特異的な TaqMan probe を用いて行った。発現解析は TaqManVR Fast Advanced Master Mix（Life Technologies）と primer-probe セットを用いて、7900HT Fast Real-Time PCR System（Life Technologies）にて行った。合成した 3 種類の線虫 miRNA（Cel-miR-239, Cel-miR-39, Cel-miR-54）（Hokkaido System Science）を各サンプルに添加し、それらの値を補正に使用した（Kroh et al., 2010; Mitchell et al., 2008）。相対的 mRNA 発現は、ΔΔCT 法によって算出した。

H. 統計解析

数値は全て平均値±標準偏差で示した。

生存曲線の有意差検定は、log rank 法による Kaplan-Meier 生存率解析 で行った。血圧測

定試験では、コントロール群（vehicle 投与群）との間で両側 Williams' test を行い、$p < 0.05$ を有意とした。その他の CSQ 過剰発現マウスを用いた実験は全て Student's *t*-test を行い、$p < 0.05$ を有意とした。

III. 実験成績

A. CSQ 過剰発現マウスにおける AZL-M の抗心不全効果

最初に、CSQ 過剰発現マウスの心不全病態に対する AZL-M の効果を検討した。CSQ 過剰発現マウスに生後 5 週齢から 3 用量の AZL-M（0.01、0.1 及び 1 mg/kg, p.o.）の投与を開始し、56 日間（8 週間）投薬を行って生存率に対する影響を検討した。図 15 に生存率曲線を示した。コントロールの vehicle 投与 CSQ 過剰発現マウスは、生後 50 日（投与 15 日目）前後から死亡し始め、9 週齢（投与 31 日目）で全例が死亡した。一方、AZL-M 投与マウスでは、用量依存的に生存率の改善が見られ、AZL-M（1 mg/kg）投与群では 9 週齢（投与 31 日目）で約 60%のマウスが生存しており、ほぼ全例が死亡したのは 12 週齢（投与 55 日目）であった。生存率曲線を統計解析した結果、この AZL-M による改善作用は 0.1 mg/kg から有意であり、最小有効量が 0.1 mg/kg であることが示された（0.01 mg/kg 投与群： $p=0.57$、0.1 mg/kg 投与群： $p < 0.01$、1 mg/kg 投与群： $p < 0.0001$）。AZL-M による生存率改善効果に

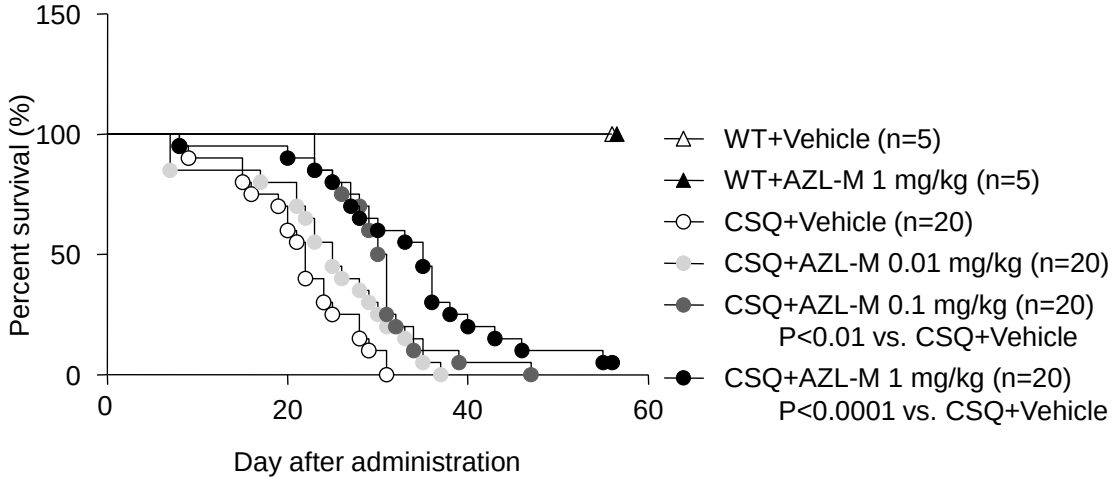

図 15　WT マウスと CSQ 過剰発現マウスの生存率曲線に対する AZL-M の作用

5 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）及び CSQ 過剰発現マウスに vehicle または AZL-M（0.01-1 mg/kg, p.o.）を投与し死亡を 1 日 1 回 8 週間観察した。CSQ 過剰発現マウスの AZL-M 投与群は vehicle 群に対して log rank 法による統計解析を行った。

対する後負荷軽減の関与を検討するため、生存率解析実験とは別のマウスを用いて AZL-M の 3 日間反復投与を行った 2 及び 24 時間後に覚醒下 SBP を測定した。AZL-M（0.01、0.1 及び 1 mg/kg, p.o.）投与群の SBP は、いずれの群でも最終投与 2 時間後で有意に SBP が低下したが、24 時間後には回復していた（表 3）。この結果から、AZL-M による抗心不全効果には降圧作用以外の機序も関与している可能性が示唆された。

次に、AZL-M の麻酔下心循環動態に対する効果を検討した。CSQ 過剰発現マウスに生後 5 週齢から vehicle（n=20）及び AZL-M（1 mg/kg, p.o., n=20）の投与を開始し、死亡例が観察され始める直前の 7 週齢にて心カテーテルによる心循環測定を実施した（図 16）。WT マウスと比較して CSQ 過剰発現マウスでは、収縮能や弛緩能の低下、うっ血の指標である左室拡張末期圧（LVEDP）の上昇が認められ、重篤な心機能不全を呈していることが示された。AZL-M（1 mg/kg）投与群では、収縮能や弛緩能の改善効果は認められなかったが、LVEDP の有意な減少が生じた。CSQ 過剰発現マウスの MBP や HR は vehicle と AZL-M 投与両群間で差は認められなかった。心機能測定の終了後に心臓と肺を摘出して重量の測定を行ったところ、CSQ 過剰発現マウスでは左室重量、右室重量、心房重量及び肺重量のいずれも有意に増大していた（図 17）。これはうっ血が進行したために心臓や肺に負荷かがかかり増大したものだと考えられる。AZL-M 群でうっ血の指標である LVEDP が改善したように、CSQ 過剰発現マウスの心臓や肺重量の増加も有意に抑制された。

表 3.　CSQ 過剰発現マウスにおける AZL-M による降圧作用

	WT マウス	CSQ 過剰発現マウス			
	vehicle (n=9)	vehicle (n=9)	AZL-M (0.01 mg/kg) (n=8)	AZL-M (0.1 mg/kg) (n=8)	AZL-M (1 mg/kg) (n=8)
投与 2 時間後 SBP (mmHg)	109 ± 8	100 ± 14	85 ± 11**	78 ± 8**	61 ± 8**
投与 24 時間後 SBP (mmHg)	112 ± 11	102 ± 13	100 ± 8	98 ± 13	94 ± 12

5 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）及び CSQ 過剰発現マウスに vehicle または AZL-M（0.01、0.1 及び 1 mg/kg, p.o.）の 3 日間反復投与を行い、最終投与の 2 及び 24 時間後に覚醒下 SBP を測定した。**P <0.01 vs. vehicle 群（両側 Williams test）。

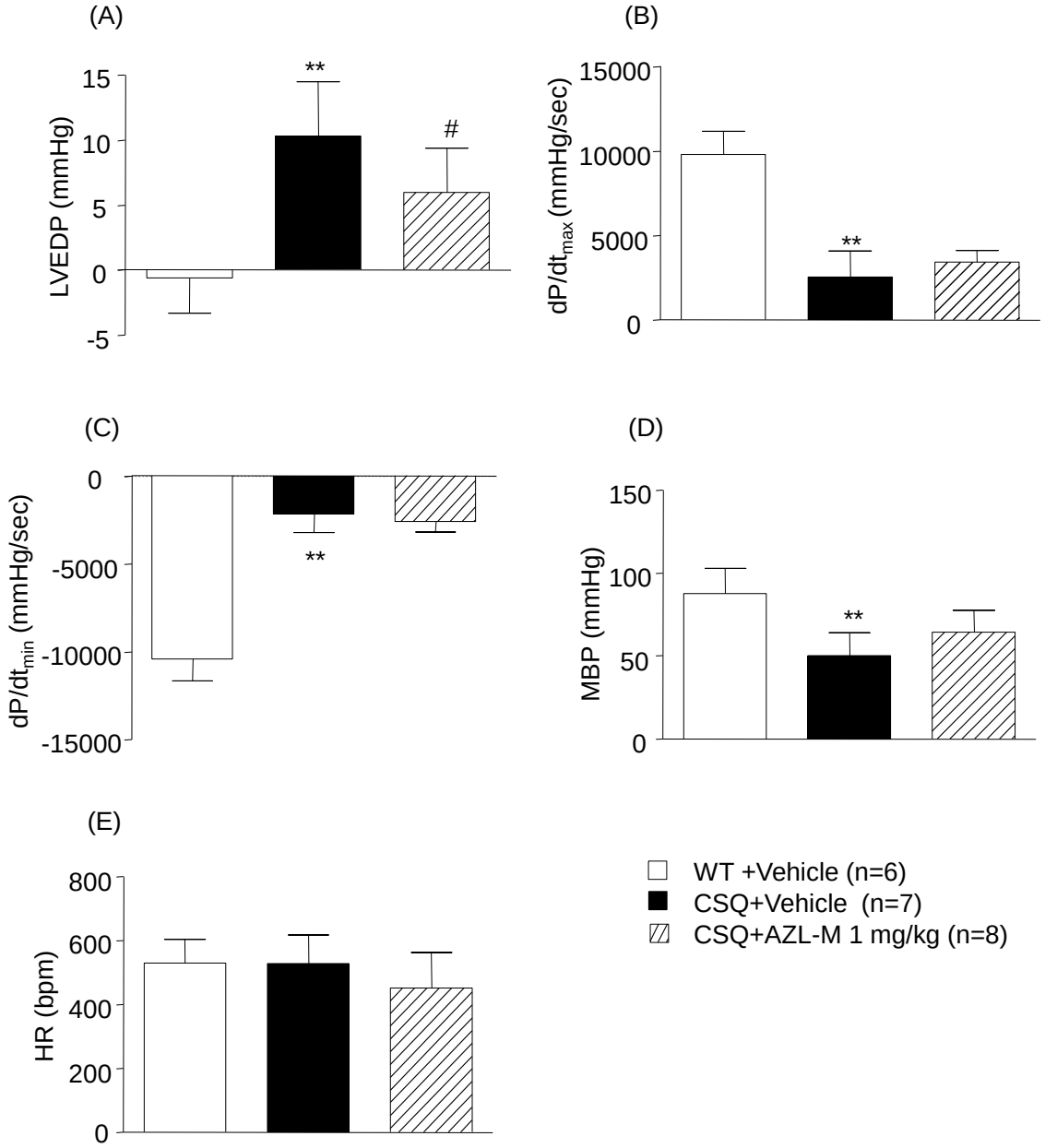

図 16　CSQ 過剰発現マウスの麻酔下心循環動態に対する AZL-M の作用

7 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）、vehicle または AZL-M（1 mg/kg, p.o.）を投与した CSQ 過剰発現マウスを用いて心カテーテル法にて測定した LVEDP（A）、dP/dt$_{max}$（B）、dP/dt$_{min}$（C）、MBP（D）及び HR（E）。薬剤は 5 週齢から 2 週間投与した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。**P <0.01 vs. WT マウス、 $^{\#}$P <0.05 vs. CSQ 過剰発現マウスの vehicle 投与群（Student's *t*-test）。

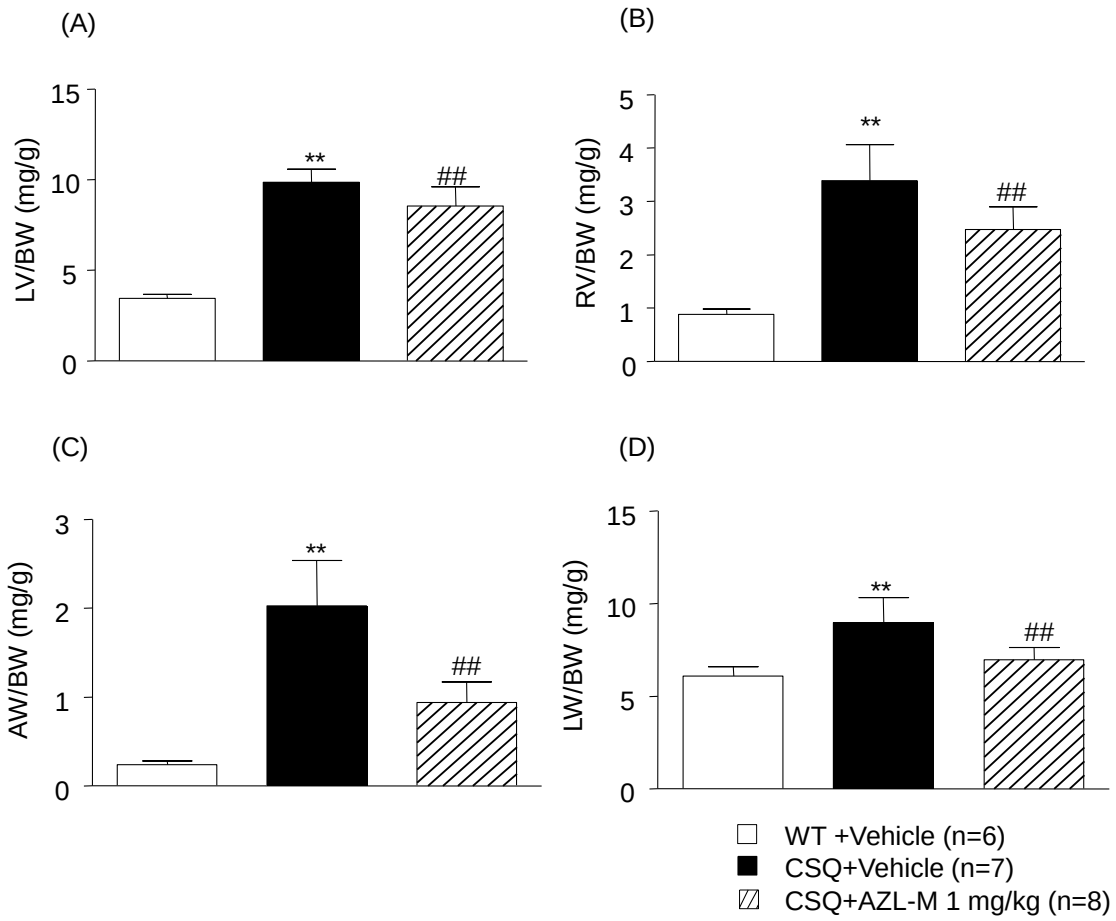

図 17　CSQ 過剰発現マウスの心臓及び肺重量に対する AZL-M の作用

7 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）、vehicle または AZL-M（1 mg/kg, p.o.）を投与した CSQ 過剰発現マウスにおける左室重量/体重（LV/BW）（A）、右室重量/体重（RV/BW）（B）、心房重量/体重（AW/BW）（C）及び肺重量/体重（LW/BW）（D）。心循環動態測定後にマウスの心臓及び肺を摘出して測定した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。**P <0.01 vs. WT マウス、 $^{\#\#}$P <0.01 vs. CSQ 過剰発現マウスの vehicle 投与群（Student's *t*-test）。

B.　CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA 発現解析

新規のバイオマーカー探索を目的として、血漿サンプルを用いて miRNA の網羅的発現解析を行った。発現量を基にクラスタリング解析を行ったところ、WT マウスと CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA の発現パターンは大きく異なっていた（図 18）。一方、AZL-M（1 mg/kg, p.o.）を投与した CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA は、vehicle 群のものよりも WT マウスに近い発現パターンを示した。発現パターンに相違が認められた複数の miRNA について、更なる解析を実施した。WT マウスと CSQ 過剰発現マウス間で、P <0.05 で fold change が 0.5 以下もしくは 2 倍以上の miRNA を表 4 にまとめた。CSQ 過剰発現マウスにおいて 9 種類の miRNA が 2 倍以上の発現増加を示し、27 種類の miRNA で半分以下のレベルまで発現量が減少した。このうち、AZL-M は幾つかの miRNA（miR-149、miR-150、let-7d*、miR-342-3p、miR-146a、miR-28*、miR-138*、miR-702）の発現レベルを正常方向へ回復した。なお、今回は基準外となったが、miR-137、 miR-197、miR-208、miR-544、miR-804 の 5 種類は、WT マウスではほとんど発現が見られないが CSQ 過剰発現マウスで発現が顕著に増加するというバイオマーカーとして期待される挙動を示した。

網羅的発現解析の結果をさらに検証するために、増加と減少の各トップ 5 と AZL-M で有意に回復した 8 種類の計 16 種類の miRNA について別試験で採取した血漿を用いて、リアルタイム PCR で個別に解析した。測定した 16 種類の miRNA の中で、vehicle 投与群の WT

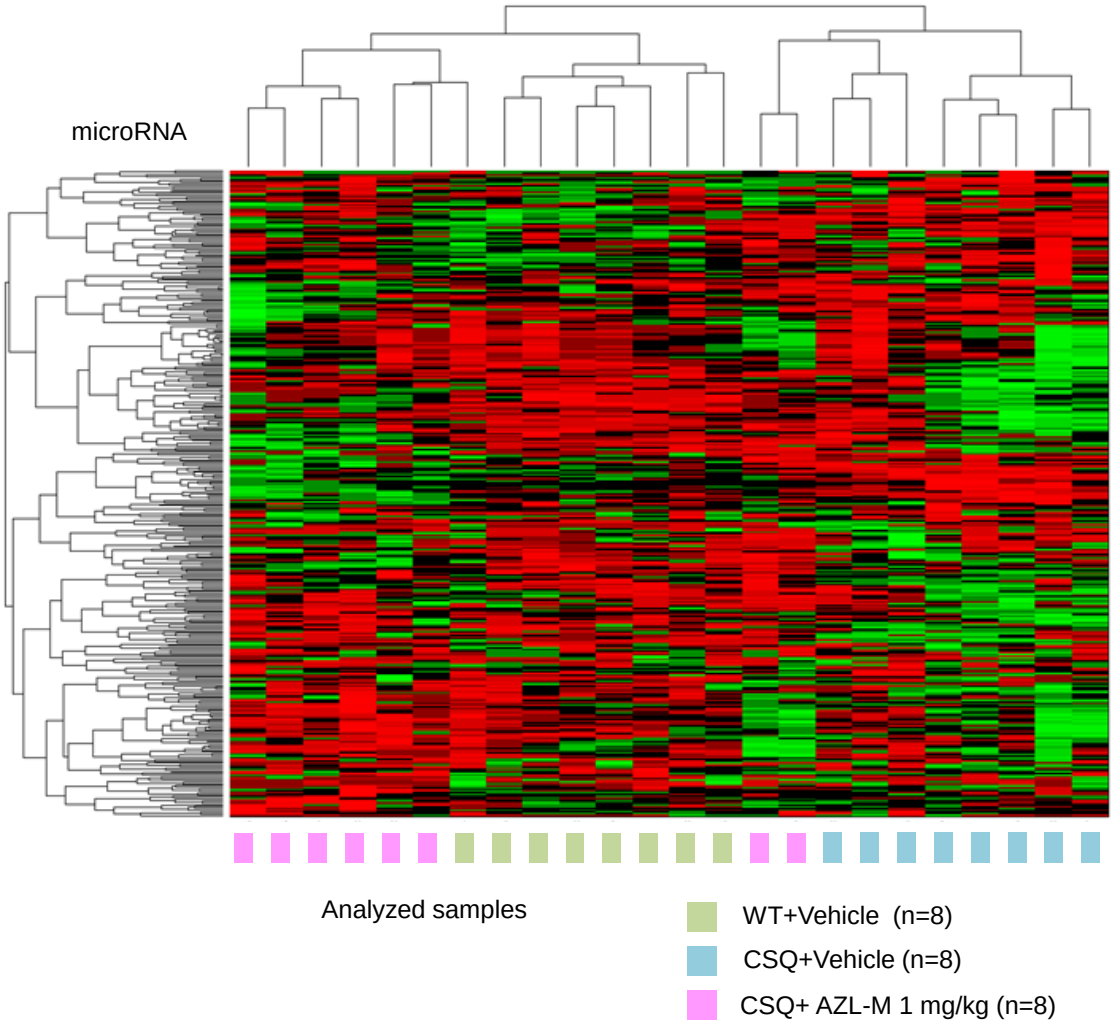

図 18　WT マウス、vehicle 及び AZL-M を投与した CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA のクラスタリング解析

7 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）、vehicle または AZL-M（1 mg/kg, p.o.）を投与した CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA の網羅的測定を実施した。薬剤は 5 週齢から 2 週間投与した。各 miRNA の発現量を基に MATLAB software を用いてクラスタリング解析とヒートマップの作成を行った。赤と緑は、それぞれ発現量の増加と減少を表している。

表4.　WTマウスと比較してCSQ過剰発現マウスのvehicle群で有意な発現増加（2倍以上）または有意な発現低下（半分以下）を示したmiRNA

miRNA	WT vs. CSQ (Vehicle)			CSQ (AZL-M) vs. CSQ (Vehicle)		
	fold	SD	t-test	fold	SD	t-test
WT マウスと比較して vehicle 群で増加していた miRNA						
mmu-miR-133a (#)	10.10	6.28	0.004	16.63	23.66	0.47
mmu-miR-133b (#)	10.79	6.77	0.004	17.55	28.06	0.53
mmu-miR-136 (#)	2.87	1.32	0.005	3.71	6.06	0.71
mmu-miR-411 (#)	3.87	2.55	0.02	2.28	1.53	0.15
mmu-miR-130a (#)	3.54	2.31	0.02	8.50	12.11	0.29
mmu-miR-1	5.95	4.67	0.02	6.06	7.82	0.97
mmu-miR-127	2.15	1.21	0.04	2.06	2.17	0.92
mmu-miR-29c	3.32	2.69	0.04	5.14	7.15	0.52
mmu-miR-376c	2.11	1.30	0.048	4.03	6.49	0.44
WT マウスと比較して vehicle 群で減少していた miRNA						
mmu-miR-297a* (#)	0.31	0.13	0.000005	2.80	3.14	0.06
mmu-miR-132 (#)	0.38	0.18	0.00001	4.72	5.22	0.051
mmu-miR-149 (#)	0.22	0.08	0.00005	0.56	0.37	0.03
mmu-miR-150 (#)	0.33	0.14	0.0001	1.82	1.55	0.03
mmu-miR-592 (#)	0.32	0.26	0.0001	0.83	0.69	0.08
mmu-miR-151-3p	0.37	0.14	0.0001	3.06	3.27	0.053
mmu-miR-674*	0.48	0.22	0.0001	1.38	1.28	0.09
mmu-let-7d* (#)	0.44	0.15	0.0002	1.65	1.33	0.04
mmu-miR-574-3p	0.30	0.18	0.0004	2.05	2.51	0.09
mmu-miR-455*	0.31	0.21	0.001	0.52	0.46	0.25
mmu-miR-455	0.12	0.08	0.001	0.25	0.18	0.10
mmu-miR-322	0.29	0.21	0.001	0.41	0.26	0.33
mmu-miR-200b*	0.35	0.35	0.002	1.27	1.69	0.20
mmu-miR-181a-1*	0.45	0.19	0.003	1.57	1.76	0.12
mmu-miR-134	0.33	0.28	0.004	1.23	1.29	0.09
mmu-miR-342-3p (#)	0.37	0.24	0.004	2.11	2.06	0.048
mmu-miR-218-1*	0.35	0.21	0.005	0.98	1.27	0.21
mmu-miR-146a (#)	0.48	0.23	0.005	2.76	2.68	0.047
mmu-miR-503*	0.40	0.23	0.007	1.57	1.94	0.13
mmu-miR-28* (#)	0.50	0.33	0.009	1.97	1.57	0.03

mmu-miR-138* (#)	0.28	0.13	0.010	1.70	1.51	0.03
mmu-miR-214	0.25	0.31	0.013	1.70	2.99	0.25
mmu-miR-667	0.40	0.45	0.02	1.92	2.67	0.15
mmu-miR-702 (#)	0.22	0.08	0.02	0.84	0.55	0.015
mmu-miR-877*	0.47	0.31	0.02	1.71	1.73	0.08
mmu-miR-129-3p	0.40	0.22	0.02	1.70	1.58	0.054
mmu-miR-801	0.43	0.37	0.046	0.96	0.84	0.13

（#）は別試験で個々に TaqMan PCR で発現解析を実施した miRNA を示す。統計は Student's *t*-test を行った。

マウスと CSQ 過剰発現マウス間において有意な変化が確認された miRNA の結果を図 19 に示した。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 の発現が有意減少し、このうち miR-146a と miR-342-3p の発現減少は AZL-M 投与で有意に回復した。本試験の vehicle と AZL-M 投与群の個体別のデータを用いて、この 2 種類の miRNA とうっ血の指標である心房重量との相関解析を実施したところ、相関傾向を示した（Vehicle 群と AZL-M 群の r 値はそれぞれ 0.75 と 0.59）。この結果は、AZL-M 投与による miR-146a と miR-342-3p の発現変化が、薬効に伴う変化であることを示唆している。

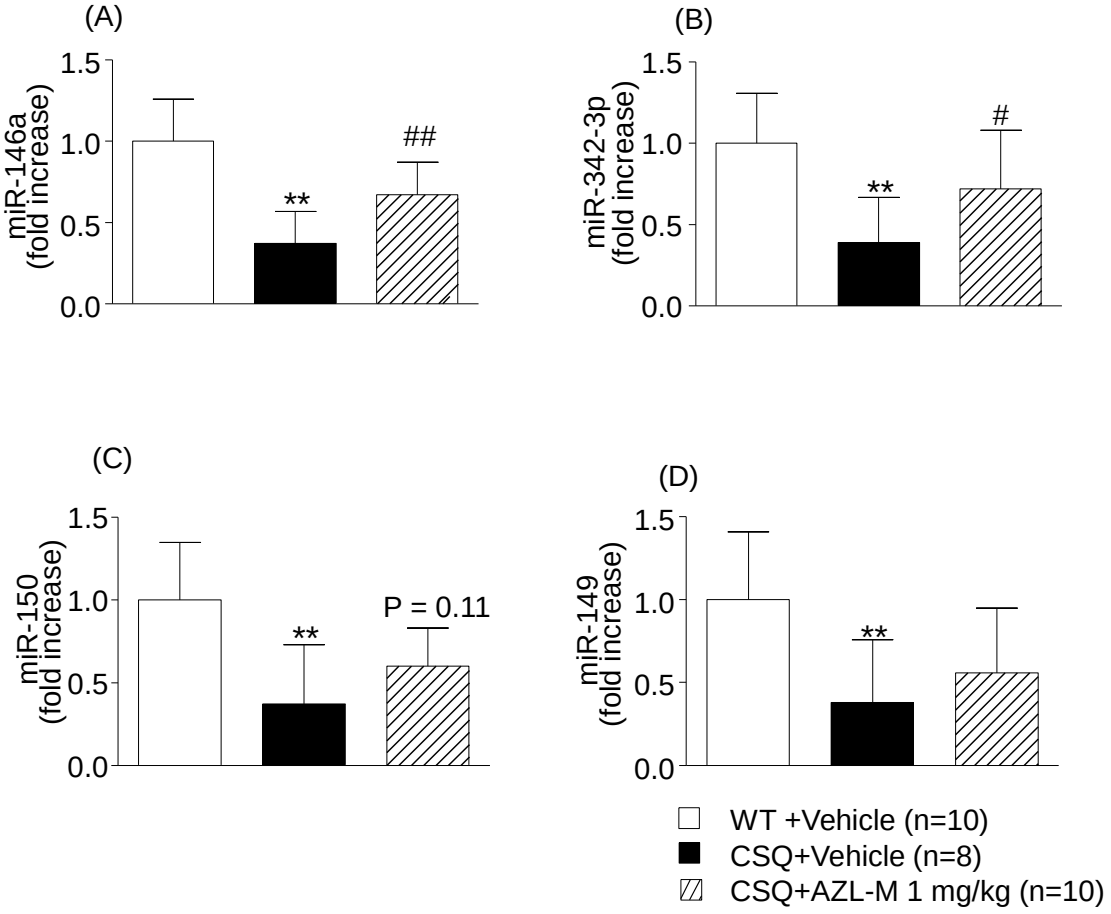

図 19　CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA 発現に対する AZL-M の作用

7 週齢の CSQ 非過剰発現マウス（WT マウス）、vehicle または AZL-M（1 mg/kg, p.o.）を投与した CSQ 過剰発現マウスにおける血漿中 miR-146a（A）、miR-342-3p（B）、miR-150（C）及び miR-149（D）の発現量変化。5 週齢から 2 週間薬剤を投与したマウスから採血を実施して、個々の miRNA の発現量を測定した。数値は全て平均値±標準偏差で示した。$^{**}P < 0.01$ vs. WT マウス、$^{\#}P < 0.05$、$^{\#\#}P < 0.01$ vs. CSQ 過剰発現マウスの vehicle 投与群（Student's *t*-test）。

IV. 考察

心不全は様々な原因、症状、重症度を示す複合的な疾患である。この複雑な疾患を治療するにあたり、病態の状態や適切な治療法を選択するのにバイオマーカーは極めて有用である。本検討では、心不全モデルである CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA の網羅的な解析を行い、血漿中 miRNA の発現プロファイルが正常マウスと比較して顕著に変動していることを見出した。さらに個々の miRNA の発現解析を実施したところ、これらの miRNA のうち、miR-146a、miR-149、miR-150、miR-342-3p の 4 種類の miRNA が、重度の心不全病態を呈する 7 週齢の CSQ 過剰発現マウスで有意に減少していることが明らかとなった。これらの miRNA の機能的な役割に関する情報はほとんどないが、幾つかの miRNA が心疾患と関係していることが判明している。MiR-146a は interleukin-1-receptor-associated kinase 1（IRAK1）や tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6（TRAF6）といった toll-like receptor 4（TLR4）シグナルの下流の蛋白の調節を介して免疫応答に関与していることが報告されている（Takahashi et al., 2010）。本研究の報告とは逆であるが、この報告の中では冠状動脈疾患患者の血漿中 miR-146a が上昇しており、また IRAK1、TRAF6、TLR4 の mRNA 発現が増加し、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 telmisartan やアンジオテンシン変換酵素阻害薬 enalapril の処置によってこれらの上昇が抑制されている。別の報告では、miR-146a がマウスの虚血再灌流障害に対して心保護的に作用することが示されている（Wang et al., 2013）。

MiR-342-3p の心血管系での役割に関する文献は無いが、健常人と比較して心不全患者で血漿中の miR-342-3p が減少しているという本研究と同様な結果が報告されている（Ellis et al., 2013）。また、心臓中 miR-149 の発現量が心筋梗塞後心不全モデルマウスで減少していたとの報告はあるが (van Rooij et al., 2008)、心臓での機能は不明である。一方、miR-150 は心肥大モデルマウスの心臓で発現が増加し、新生仔ラット分離心筋細胞に過剰発現させると細胞サイズが減少すると報告されており (van Rooij et al., 2006)、心肥大の抑制への寄与が期待される。加えて、血漿中 miR-150 の低下は心筋梗塞患者の左室リモデリングと関係しているという知見もある（Devaux et al., 2013)。しかし、これらの miRNA が直接的に心不全の進行に関係しているか否かについては現段階では不明である。これらの miRNA が心不全と関連する機序については更なる見当が必要である。

Tijsen らのグループは心不全患者の網羅的 miRNA 解析を実施して、心不全に選択的に上昇する血漿中 miRNA として miR-423-5p を同定した（Tijsen et al., 2010）。別のグループは収縮不全患者の血清を用いてその結果を追試し、さらに別の 3 種類の miRNA、miR-320a、miR-22、miR-92b を心不全で変動する miRNA として同定した（Goren et al., 2012）。Fukushima らのグループは血漿中 miR-126 が心不全患者で低下していることを（Fukushima et al., 2011）、Corsten らのグループは血漿中 miR-499 が急性心不全患者で上昇していることを報告した（Corsten et al., 2010）。しかし本研究では、これらいずれの miRNA も CSQ 過剰発現マウスで変動しなかった。この矛盾の原因として分析法が異なることが考えられるが、種差や心

不全のステージ等によって変動する miRNA が異なる可能性もある。

血漿中 miRNA と薬剤の治療効果との関係を明らかにすることは、バイオマーカーを探索する上で非常に重要である。本研究において抗心不全効果を示すアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 AZL-M は miR-146a 及び miR-342-3p の低下を回復させた。この結果は、血漿中 miRNA が抗心不全治療薬の薬効を反映するバイオマーカーとして利用できる可能性を示している。興味深いことに、予備的な検討で、血漿中で減少した 4 つの miRNA（miR-146a、miR-149、miR-150、miR-342-3p）の発現量は CSQ 過剰発現マウスの心臓中でも減少し、AZL-M はそれら全てを回復させた。心不全モデルでの心臓中の miR-146a 及び miR-342-3p 発現レベルが、血漿中のそれらの miRNA の発現レベルを反映している可能性がある。しかしその場合、miR-146a 及び miR-342-3p とは異なり、miR-149 及び miR-150 では AZL-M 処置により血漿中量が回復しなかった理由については現段階では明確には説明できない。上述したように、本研究での知見と対称的に、血漿中 miR-146a は冠状動脈疾患患者で増加し、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の他の阻害薬で減少したという報告がある（Wang et al., 2013）。心不全患者における血漿中バイオマーカーとしての miR-146a 及び miR-342-3p の価値や AZL-M による回復の機序については更なる検討が必要である。これらの miRNA のさらなる精査のために、それらの由来、標的、機能を評価する必要があり、また心筋梗塞後心不全モデルや大動脈狭窄圧負荷心不全モデル、あるいは心不全患者の血液を用いての検討も有効である。CSQ 過剰発現マウスを用いて、他のメカニズムの心不全治療薬であるβ

受容体遮断薬やミネラルコルチコイド受容体拮抗薬などのmiRNAに対する効果を検討するのも有益な情報を提供してくれる可能性があり、今後のさらなる検討が重要である。

V. 小括

第 2 章では、心不全の診断や治療に重要である新規バイオマーカー探索のために、CSQ 過剰発現マウスの血漿中 miRNA の測定を行った。治療効果に対する miRNA の変化を見るために、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬である azilsartan medoxomil（AZL-M）の作用を検討した。心不全動物モデルにおける血漿中 miRNA の網羅的発現解析の報告は無く著者らの検討が初めてとなる。

1. 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結果、CSQ過剰発現マウスの血漿中では正常群と比較して顕著なmiRNAの発現変動が見られた。

2. 網羅的発現解析で変動の見られたmiRNAのうち16種類のmiRNAについてリアルタイムPCRで個別に解析をした。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。

3. CSQ過剰発現マウスにアンジオテンシンII受容体拮抗薬であるAZL-M (1 mg/kg, p.o.) 投与したところ、生存率及び心機能低下や心肥大などの心不全病態の改善が認められた。

4. AZL-Mを投与したCSQ過剰発現マウスの血漿中miRNAは、vehicle群のものよりも正常マウスに近い発現パターンを示した。また、上記の4つのmiRNAのうちmiR-146aとmiR-342-3pの発現低下が有意に回復した。

今回の結果から、多くの miRNA が重篤な心不全モデルの血漿中で発現変動し、さらに重要なことに AZL-M の処置により miR-146a と miR-342-3p の発現変動が回復した。これらの結果は、心不全の診断に新しい知見を追加するとともに、血漿中 miRNA が抗心不全治療薬の薬効を予測するマーカーとなりうる可能性を示唆している。

総括

SERCA2a及びその抑制蛋白であるPLNは心筋細胞内のCa^{2+}動態の中心的な分子であり、心筋の収縮や弛緩において重要な役割を果たしている。本研究の第1章では、新規心不全治療薬の候補としてのSERCA2a活性化の有用性を遺伝子改変動物を用いて検証した。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PLN欠損) を実施した遺伝子組換えマウスを作製して、生存率改善効果や心機能改善効果を検証した。CRISPR/Cas法によって、PLNを欠損したCSQ過剰発現マウスを得ることができ、正常動物だけではなく病態モデルでもCRISPR/Cas法は有用なツールと成り得ることが明らかとなった。CSQ過剰発現マウスは心機能低下、心肥大、うっ血といった重篤な心不全症状を示し生後7週齢から死亡した。PLN欠損/CSQ過剰発現マウスはPLN WT/CSQ過剰発現マウスと比較して、死亡初期の段階における有意な生存率改善効果を示した。PLN欠損/CSQ過剰発現マウスの心機能では、PLN WT/CSQ過剰発現マウスと比べて弛緩能の有意な改善や収縮能の改善傾向を示した。さらにPLN欠損によって、CSQ過剰発現で観察される心房重量及び肺重量増加が有意に抑制され、うっ血が改善していることが示唆された。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。SERCA2a活性化を指標に選出したcompound Aが、イヌ心臓から単離したSR小胞のSERCA2aを活性化することを明らかにした。さらに

結合実験の結果から、compound AがSERCA2aの抑制蛋白であるPLNに直接結合していることが示され、その作用メカニズムがPLNによるSERCA2a抑制の解除であることが示唆された。Compound Aの細胞内Ca^{2+}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SR内のCa^{2+}量を増加させた。さらに、電気刺激によるCa^{2+}上昇の振幅幅と減衰速度を増加させ、サルコメア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SERCA活性化及びPLN欠損と同様なプロファイルであった。また、ラット摘出灌流心臓においてcompound Aは心拍数に影響を及ぼすことなく収縮能や弛緩能を増加させた。麻酔下ラットの心機能測定においてもcompound Aはvehicle群と比較して有意な弛緩能増加作用を示し、心拍数には影響を及ぼさなかった。このことから、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た。

さらに第2章では、心不全の診断や治療に重要である新規バイオマーカー探索のために、CSQ過剰発現マウスの血漿中miRNAの測定を行った。新規心不全バイオマーカー探索を目的として、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結果、CSQ過剰発現マウスの血漿中では正常群と比較して顕著なmiRNAの発現変動が見られた。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II受容体拮抗薬であ

るazilsartan medoxomil (1 mg/kg, p.o.) 投与すると心不全病態の改善とともに、上記の4つのmiRNAのうちmiR-146aとmiR-342-3pの発現低下が有意に回復した。

以上の結果から、SERCA2a活性化作用が既存の強心薬とは異なり、心機能増加だけではなく生存率改善作用も併せ持つ有用な抗心不全薬となり得ることが示された。また、これまで*in vivo*で心機能を増加した低分子化合物は無かったが、選択的な新規SERCA2a活性化薬compound Aは、心筋細胞、摘出心臓、そして*in vivo*でも心収縮及び弛緩を増加させることが示された。Compound Aは新規心不全治療創生のツールとなることが期待される。さらに、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（Ca^{2+}感受性増加作用とPDE III 阻害作用の両者を有する）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である NT-proBNP 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。

謝辞

稿の終わりに臨み、御指導と御高配を賜り、本論文を御校閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究院臨床獣医科学講座獣医内科学教室、滝口満喜教授に深く感謝申し上げます。

本論文を御校閲頂きます北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学講座解剖学教室、昆泰寛教授、同応用獣医科学講座実験動物学教室、森松正美准教授に厚く御礼申し上げます。

北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学講座薬理学教室、乙黒兼一教授には本論文執筆にあたり丁寧に御指導頂き、深く感謝しております。

最後に、長年に渡る研究活動を支えてくれた武田薬品工業株式会社及び Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社の上司、同僚に深く感謝いたします。

参考文献

1. Abraham, W.T., Adams, K.F., Fonarow, G.C., Costanzo, M.R., Berkowitz, R.L., LeJemtel, T.H., Cheng, M.L., Wynne, J., 2005. In-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure requiring intravenous vasoactive medications: an analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). J. Am. Coll. Cardiol. 46, 57-64.
2. Baker, D.L., Hashimoto, K., Grupp, I.L., Ji, Y., Reed, T., Loukianov, E., Grupp, G., Bhagwhat, A., Hoit, B., Walsh, R., Marban, E., Periasamy, M., 1998. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. Circ. Res. 83, 1205-1214.
3. Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-297.
4. Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., McMullen, J.R., 2010. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacol. Ther. 128, 191-227.
5. Borgeat, K., Connolly, D.J., Luis Fuentes, V., 2015. Cardiac biomarkers in cats. J. Vet. Cardiol. 17 Suppl 1, S74-86.
6. Boštjančič, E., Zidar, N., Glavač, D., 2009. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. Dis. Markers 27, 255-268.

7. Boswood, A., 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. J. Vet. Cardiol. 11 Suppl 1, S23-32.

8. Braunwald, E., 2013. Heart failure. JACC. Heart Fail. 1, 1-20.

9. Braunwald, E., 2015. The war against heart failure: the Lancet lecture. Lancet 385, 812-824.

10. Buchanan, J.W., 2013. The history of veterinary cardiology. J Vet. Cardiol 15, 65-85.

11. Byrne, M.J., Power, J.M., Preovolos, A., Mariani, J.A., Hajjar, R.J., Kaye, D.M., 2008. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. Gene. Ther. 15, 1550-1557.

12. Cheek, T.R., Berridge, M.J., Moreton, R.B., Stauderman, K.A., Murawsky, M.M., Bootman, M.D., 1994. Quantal Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores. Biochem. J. 301 (Pt 3), 879-883.

13. Chemaly, E.R., Hajjar, R.J., Lipskaia, L., 2013. Molecular targets of current and prospective heart failure therapies. Heart 99, 992-1003.

14. Cho, G.W., Altamirano, F., Hill, J.A., 2016. Chronic heart failure: Ca^{2+}, catabolism, and catastrophic cell death. Biochim. Biophys. Acta 1862, 763-777.

15. CIBIS Investigators and Committees, 1994. A randomized trial of β-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). Circulation 90, 1765-1773.

16. Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski,

A., Izzo, N.J., Jr., 1998. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 2979-2984.

17. Cleland, J.G.F., Daubert, J.C., Erdmann, E., Freemantle, N., Gras, D., Kappenberger, L., Tavazzi, L., 2005. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. N. Engl. J. Med. 352, 1539-1549.

18. CONSENSUS trial study group, 1987. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). N. Engl. J. Med. 316, 1429-1435.

19. Cornea, R.L., Lockamy, E.L., Gruber, S.J., Muretta, J.M., Jin, D., Chen, J., Dahl, R., Bartfai, T., Zsebo, K.M., Gillispie, G.D., Thomas, D.D., 2013. High-throughput FRET assay yields allosteric SERCA activators. J. Biomol. Screen. 18, 97-107.

20. Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J.A., Heymans, S., Schroen, B., 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. Circ. Cardiovasc. Genet. 3, 499-506.

21. del Monte, F., Harding, S.E., Schmidt, U., Matsui, T., Kang, Z.B., Dec, G.W., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., Hajjar, R.J., 1999. Restoration of contractile function in isolated

cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. Circulation 100, 2308-2311.

22. del Monte, F., Williams, E., Lebeche, D., Schmidt, U., Rosenzweig, A., Gwathmey, J.K., Lewandowski, E.D., Hajjar, R.J., 2001. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase in a rat model of heart failure. Circulation 104, 1424-1429.

23. Devaux, Y., Vausort, M., McCann, G.P., Zangrando, J., Kelly, D., Razvi, N., Zhang, L., Ng, L.L., Wagner, D.R., Squire, I.B., 2013. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. Circ. Cardiovasc. Genet. 6, 290-298.

24. Eisner, D., Bode, E., Venetucci, L., Trafford, A., 2013. Calcium flux balance in the heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 58, 110-117.

25. Ellis, K.L., Cameron, V.A., Troughton, R.W., Frampton, C.M., Ellmers, L.J., Richards, A.M., 2013. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. Eur. J. Heart Fail. 15, 1138-1147.

26. Engelhardt, S., Hein, L., Dyachenkow, V., Kranias, E.G., Isenberg, G., Lohse, M.J., 2004. Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic β-adrenergic stimulation. Circulation 109, 1154-1160.

27. Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. Prog. Neurobiol. 43,

37-71.

28. Ferrandi, M., Barassi, P., Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Molinari, I., Tripodi, M.G., Reina, C., Moncelli, M.R., Bianchi, G., Ferrari, P., 2013. Istaroxime stimulates SERCA2a and accelerates calcium cycling in heart failure by relieving phospholamban inhibition. Br. J. Pharmacol. 169, 1849-1861.

29. Fleischer, S., Inui, M., 1989. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18, 333-364.

30. Fukushima, Y., Nakanishi, M., Nonogi, H., Goto, Y., Iwai, N., 2011. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. Circ. J. 75, 336-340.

31. Gordon, S.G., Côtè, E., 2015. Pharmacotherapy of feline cardiomyopathy: Chronic management of heart failure. J. Vet. Cardiol. 17 Suppl 1, S159-172.

32. Goren, Y., Kushnir, M., Zafrir, B., Tabak, S., Lewis, B.S., Amir, O., 2012. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. Eur. J. Heart Fail. 14, 147-154.

33. Gorski, P.A., Ceholski, D.K., Hajjar, R.J., 2015. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure--a rational approach for disease treatment. Cell Metab. 21, 183-194.

34. Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Desai, A.S., Barnard, D., Bouchard, A., Jaski, B., Lyon, A.R., Pogoda, J.M., Rudy, J.J., Zsebo, K.M., 2016. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease

(CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. Lancet 387, 1178-1186.

35. Gupta, R.C., Shimoyama, H., Tanimura, M., Nair, R., Lesch, M., Sabbah, H.N., 1997. SR Ca^{2+}-ATPase activity and expression in ventricular myocardium of dogs with heart failure. Am. J. Physiol. 273, H12-18.

36. Harding, V.B., Jones, L.R., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., Rockman, H.A., 2001. Cardiac βARK1 inhibition prolongs survival and augments β blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 5809-5814.

37. Hüser, J., Bers, D.M., Blatter, L.A., 1998. Subcellular properties of $[Ca^{2+}]_i$ transients in phospholamban-deficient mouse ventricular cells. Am. J. Physiol. 274, H1800-1811.

38. Jones, L.R., Suzuki, Y.J., Wang, W., Kobayashi, Y.M., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., Cleemann, L., Morad, M., 1998. Regulation of Ca^{2+} signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. J. Clin. Invest. 101, 1385-1393.

39. Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L.G., Anversa, P., 1997. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. J. Mol. Cell. Cardiol. 29, 859-870.

40. Kaneko, M., Satomi, T., Fujiwara, S., Uchiyama, H., Kusumoto, K., Nishimoto, T., 2017. AT1 receptor blocker azilsartan medoxomil normalizes plasma miR-146a and miR-342-3p in a

murine heart failure model. Biomarkers 22, 253-260.

41. Kaye, D.M., Preovolos, A., Marshall, T., Byrne, M., Hoshijima, M., Hajjar, R., Mariani, J.A., Pepe, S., Chien, K.R., Power, J.M., 2007. Percutaneous cardiac recirculation-mediated gene transfer of an inhibitory phospholamban peptide reverses advanced heart failure in large animals. J. Am. Coll. Cardiol. 50, 253-260.

42. Kemp, C.D., Conte, J.V., 2012. The pathophysiology of heart failure. Cardiovasc. Pathol. 21, 365-371.

43. Kranias, E.G., Hajjar, R.J., 2012. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. Circ. Res. 110, 1646-1660.

44. Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., Tewari, M., 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Methods 50, 298-301.

45. Li, L., Chu, G., Kranias, E.G., Bers, D.M., 1998. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. Am. J. Physiol. 274, H1335-1347.

46. Li, R.C., Tao, J., Guo, Y.B., Wu, H.D., Liu, R.F., Bai, Y., Lv, Z.Z., Luo, G.Z., Li, L.L., Wang, M., Yang, H.Q., Gao, W., Han, Q.D., Zhang, Y.Y., Wang, X.J., Xu, M., Wang, S.Q., 2013. In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in

aortic-constricted mice. Circ. Res. 112, 601-605.

47. Luo, W., Grupp, I.L., Harrer, J., Ponniah, S., Grupp, G., Duffy, J.J., Doetschman, T., Kranias, E.G., 1994. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of β-agonist stimulation. Circ. Res.75, 401-409.

48. Lyon, A.R., Bannister, M.L., Collins, T., Pearce, E., Sepehripour, A.H., Dubb, S.S., Garcia, E., O'Gara, P., Liang, L., Kohlbrenner, E., Hajjar, R.J., Peters, N.S., Poole-Wilson, P.A., Macleod, K.T., Harding, S.E., 2011. SERCA2a gene transfer decreases SR calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. Circ. Arrhythm. Electrophysiol. 4, 362-372.

49. Maisel, A., Mueller, C., Adams, K., Jr., Anker, S.D., Aspromonte, N., Cleland, J.G.F., Cohen-Solal, A., Dahlstrom, U., DeMaria, A., Di Somma, S., Filippatos, G.S., Fonarow, G.C., Jourdain, P., Komajda, M., Liu, P.P., McDonagh, T., McDonald, K., Mebazaa, A., Nieminen, M.S., Peacock, W.F., Tubaro, M., Valle, R., Vanderhyden, M., Yancy, C.W., Zannad, F., Braunwald, E., 2008. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. Eur. J. Heart Fail. 10, 824-839.

50. Marks, A.R., 2013. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. J. Clin. Invest. 123, 46-52.

51. McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., Izumo, S.,

2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 12355-12360.

52. Meyer, M., Dillmann, W.H., 1998. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase overexpression by adenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. Cardiovasc. Res. 37, 360-366.

53. Minamisawa, S., Hoshijima, M., Chu, G., Ward, C.A., Frank, K., Gu, Y., Martone, M.E., Wang, Y., Ross, J., Jr., Kranias, E.G., Giles, W.R., Chien, K.R., 1999. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. Cell 99, 313-322.

54. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc. Natl .Acad. Sci. USA. 105, 10513-10518.

55. Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., Kavalali, E.T., Cannon, S.C., Houser, S.R., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2016. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. Science 351, 271-275.

56. O'Connor, C.M., Gattis, W.A., Uretsky, B.F., Adams, K.F., Jr., McNulty, S.E., Grossman, S.H.,

McKenna, W.J., Zannad, F., Swedberg, K., Gheorghiade, M., Califf, R.M., 1999. Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). Am. Heart J. 138, 78-86.

57. Ojima, M., Igata, H., Tanaka, M., Sakamoto, H., Kuroita, T., Kohara, Y., Kubo, K., Fuse, H., Imura, Y., Kusumoto, K., Nagaya, H., 2011. In vitro antagonistic properties of a new angiotensin type 1 receptor blocker, azilsartan, in receptor binding and function studies. J. Pharmacol. Exp. Ther. 336, 801-808.

58. Periasamy, M., Kalyanasundaram, A., 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle. Nerve 35, 430-442.

59. Pfeffer, M.A., Swedberg, K., Granger, C.B., Held, P., McMurray, J.J.V., Michelson, E.L., Olofsson, B., Őstergren, J., Yusuf, S., 2003. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. Lancet 362, 759-766.

60. Pogwizd, S.M., Bers, D.M., 2002. Calcium cycling in heart failure: the arrhythmia connection. J. Cardiovasc. Electrophysiol. 13, 88-91.

61. Rocchetti, M., Alemanni, M., Mostacciuolo, G., Barassi, P., Altomare, C., Chisci, R., Micheletti, R., Ferrari, P., Zaza, A., 2008. Modulation of sarcoplasmic reticulum function by PST2744 [istaroxime; (E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino) androstane-6,17-dione hydrochloride)] in a

pressure-overload heart failure model. J. Pharmacol. Exp. Ther. 326, 957-965.

62. Sabbah, H.N., Imai, M., Cowart, D., Amato, A., Carminati, P., Gheorghiade, M., 2007. Hemodynamic properties of a new-generation positive luso-inotropic agent for the acute treatment of advanced heart failure. Am. J. Cardiol. 99, 41A-46A.

63. Sakata, S., Lebeche, D., Sakata, Y., Sakata, N., Chemaly, E.R., Liang, L.F., Padmanabhan, P., Konishi, N., Takaki, M., del Monte, F., Hajjar, R.J., 2006. Mechanical and metabolic rescue in a type II diabetes model of cardiomyopathy by targeted gene transfer. Mol. Ther. 13, 987-996.

64. Sasaki, T., Inui, M., Kimura, Y., Kuzuya, T., Tada, M., 1992. Molecular mechanism of regulation of Ca^{2+} pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum. Effects of synthetic phospholamban peptides on Ca^{2+} pump ATPase. J. Biol. Chem. 267, 1674-1679.

65. Sato, Y., Kiriazis, H., Yatani, A., Schmidt, A.G., Hahn, H., Ferguson, D.G., Sako, H., Mitarai, S., Honda, R., Mesnard-Rouiller, L., Frank, K.F., Beyermann, B., Wu, G., Fujimori, K., Dorn, G.W., II, Kranias, E.G., 2001. Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation. J. Biol. Chem. 276, 9392-9399.

66. Scansen, B.A., Schneider, M., Bonagura, J.D., 2015. Sequential segmental classification of feline congenital heart disease. J. Vet. Cardiol. 17 Suppl 1, S10-52.

67. Shah, S.J., Blair, J.E.A., Filippatos, G.S., Macarie, C., Ruzyllo, W., Korewicki, J.,

Bubenek-Turconi, S.I., Ceracchi, M., Bianchetti, M., Carminati, P., Kremastinos, D., Grzybowski, J., Valentini, G., Sabbah, H.N., Gheorghiade, M., 2009. Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the hemodynamic, echocardiographic, and neurohormonal effects of Istaroxime, a novel intravenous inotropic and lusitropic agent: a Randomized Controlled Trial in Patients Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial. Am. Heart J. 157, 1035-1041.

68. Sirenko, S., Yang, D., Li, Y., Lyashkov, A.E., Lukyanenko, Y.O., Lakatta, E.G., Vinogradova, T.M., 2013. Ca^{2+}-dependent phosphorylation of Ca^{2+} cycling proteins generates robust rhythmic local Ca^{2+} releases in cardiac pacemaker cells. Sci. Signal. 6, ra6.

69. Slack, J.P., Grupp, I.L., Dash, R., Holder, D., Schmidt, A., Gerst, M.J., Tamura, T., Tilgmann, C., James, P.F., Johnson, R., Gerdes, A.M., Kranias, E.G., 2001. The enhanced contractility of the phospholamban-deficient mouse heart persists with aging. J. Mol. Cell. Cardiol. 33, 1031-1040.

70. Szymanska, G., Stromer, H., Kim, D.H., Lorell, B.H., Morgan, J.P., 2000. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. Pflugers. Arch. 439, 339-348.

71. Tada, M., Inui, M., Yamada, M., Kadoma, M., Kuzuya, T., Abe, H., Kakiuchi, S., 1983. Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3':5'-monophosphate- and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic

reticulum. J. Mol. Cell. Cardiol. 15, 335-346.

72. Takahashi, Y., Satoh, M., Minami, Y., Tabuchi, T., Itoh, T., Nakamura, M., 2010. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. Clin. Sci. 119, 395-405.

73. Tanaka, Y., Honda, T., Matsuura, K., Kimura, Y., Inui, M., 2009. In vitro selection and characterization of DNA aptamers specific for phospholamban. J. Pharmacol. Exp. Ther. 329, 57-63.

74. Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y.Y., Weeks, K.L., McMullen, J.R., 2015. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. Arch. Toxicol. 89, 1401-1438.

75. Tidholm, A., 2006. Survival in dogs with dilated cardiomyopathy and congestive heart failure treated with digoxin, furosemide and propranolol: A retrospective study of 62 dogs. J. Vet. Cardiol. 8, 41-47.

76. Tijsen, A.J., Creemers, E.E., Moerland, P.D., de Windt, L.J., van der Wal, A.C., Kok, W.E., Pinto, Y.M., 2010. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. Circ. Res. 106, 1035-1039.

77. Tilgmann, C., Pollesello, P., Ovaska, M., Kaivola, J., Pystynen, J., Tiainen, E., Yliperttula, M., Annila, A., Levijoki, J., 2013. Discovery and structural characterization of a

phospholamban-binding cyclic peptide and design of novel inhibitors of phospholamban. Chem. Biol. Drug Des. 81, 463-473.

78. Topkara, V.K., Mann, D.L., 2011. Role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. Cardiovasc. Drugs Ther. 25, 171-182.

79. Toyoshima, C., Asahi, M., Sugita, Y., Khanna, R., Tsuda, T., MacLennan, D.H., 2003. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca^{2+} ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 467-472

80. Ucar, A., Gupta, S.K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentzsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T.G., Nessling, M., Richter, K., Schiffer, M., Carrier, L., Napp, L.C., Bauersachs, J., Chowdhury, K., Thum, T., 2012. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. Nat. Commun. 3, 1078.

81. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Olson, E.N., 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 18255-18260.

82. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., Olson, E.N., 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 13027-13032.

83. Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Dode, L., Wuytack, F., 2005. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. Cell Calcium 38, 291-302.

84. Wang, G.K., Zhu, J.Q., Zhang, J.T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.W., Jing, Q., 2010. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. Eur. Heart J. 31, 659-666.

85. Wang, J., Yang, X., 2012. The function of miRNA in cardiac hypertrophy. Cell. Mol. Life Sci. 69, 3561-3570.

86. Wang, X., Ha, T., Liu, L., Zou, J., Zhang, X., Kalbfleisch, J., Gao, X., Williams, D., Li, C., 2013. Increased expression of microRNA-146a decreases myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc. Res. 97, 432-4

87. Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., Wang, K., 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin. Chem. 56, 1733-1741.

88. White, S.M., Constantin, P.E., Claycomb, W.C., 2004. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 286, H823-829.

89. Zhao, Z., Wen, H., Fefelova, N., Allen, C., Baba, A., Matsuda, T., Xie, L.H., 2012. Revisiting the ionic mechanisms of early afterdepolarizations in cardiomyocytes: predominant by Ca waves or

Ca currents? Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 302, H1636-1644.

英文抄録

Efficacy of SERCA2a activator on heart failure and development of novel biomarker for heart failure

Manami Kaneko

Therapeutic Area, Integrated Biology, Axcelead Drug Discovery Partners, Inc.

Fujisawa, 251-0012, Japan

Cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-dependent ATPase 2a (SERCA2a) and its inhibitory protein called phospholamban (PLN) play central roles in Ca^{2+} handling within cardiomyocytes. In this study, we performed PLN ablation in calsequestrin overexpressing (CSQ-Tg) mice, a severe heart failure model, to examine whether PLN inhibition can improve survival rate as well as cardiac function in heart failure. Then, the effects of a newly-developed SERCA2a activator, compound A on cardiac function in cardiomyocyte and *in vivo* were examined. Furthermore, circulating miRNA levels in the plasma of CSQ-Tg mice were analyzed and evaluated whether pharmacological treatment influenced their expression level to explore a novel biomarker for heart failure.

By using clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) system, PLN homozygous knockout (KO)/CSQ-Tg mice were generated, suggesting that this method is useful in both normal animals and animal disease models. CSQ-Tg mice started to die from 7 weeks after birth with typical symptoms of severe heart failure such as cardiac dysfunction, hypertrophy, and congestion. PLN homozygous KO/CSQ-Tg mice improved survival rate in an early stage as compared to PLN WT/CSQ-Tg mice. Measurement of cardiac function with cardiac catheterization at the age of 5 weeks revealed that PLN ablation improved cardiac function in CSQ-Tg mice. Furthermore, the increases in atrial and lung weight, an index of congestion, in CSQ-Tg mice were significantly inhibited by PLN ablation. It was revealed that compound A, a selective activator for SERCA2a, activated SERCA2a in sarcoplasmic reticulum isolated from canine heart. The binding assay showed a direct interaction between compound A and PLN, suggesting that the binding of compound A to PLN attenuates its inhibition of SERCA2a, resulting in SERCA2a activation. Compound A increased the caffeine-induced Ca^{2+} release in a dose-dependent manner. In field-stimulated cardiomyocytes, compound A increased the amplitude of Ca^{2+} transients and reduced the time constant of decay, followed by enhancement of the peak shortening and reduction of the time constant of decay. Similar effects to them have been reported in SERCA2a-overexpressing or PLN-deficient cardiomyocytes. In isolated perfused rat hearts, the compound A rapidly enhanced systolic and diastolic functions without affecting heart rate. Further,

intravenous administration of compound A significantly enhanced the diastolic function in anesthetized normal rats without affecting heart rate. These results suggest that compound A could be a positive inotropic agent without increasing in energy consumption and arrhythmia risk.

Circulating miRNA levels in the plasma were measured and compared between normal and CSQ-Tg mice. Circulating miRNA profiles between normal and CSQ-Tg mice were remarkably different. Among 16 miRNAs individually measured by real-time PCR, miR-146a, miR-149, miR-150, and miR-342-3p were reproducibly and significantly reduced in the plasma of CSQ-Tg mice. A potent angiotensin II type 1 receptor blocker, azilsartan medoxomil (AZL-M), improved the survival rate and reduced left ventricular end diastolic pressure, cardiac hypertrophy, and pulmonary congestion in CSQ-Tg mice. At the same time, the reduced expression levels of miR-146a and miR-342-3p were significantly restored by AZL-M treatment.

These results suggest that SERCA2a activation would be useful as an anti-heart failure drug which improves not only cardiac function but also survival rate. Although there were no any selective small-molecule SERCA2a activators with inotropic and lusitropic effects on the heart *in vivo* so far, compound A enhanced the systolic and diastolic functions of the heart *in vitro* and *in vivo*. Therefore, compound A might be a novel therapeutic lead for heart failure. Furthermore, changes of miR-146a and miR-342-3p were consistent with therapeutic effects of anti-heart failure drugs, suggesting that these miRNAs could be potential biomarkers for heart failure.

Cardiac glycoside with inhibiting Na^+/K^+-ATPase and pimobendan with enhancing sensitivity to Ca^{2+} and inhibiting phosphodiesterase III are used for pharmacotherapy of canine or feline heart failure, resulting in a deterioration of survival rate due to the increased heart rate and energy consumption, and abnormal electrical activity. SERCA2a activator is thus an attractive, novel therapeutic approach for heart failure, which has improved the survival in animals of heart failure. Although feline hypertrophic cardiomyopathy is characterized diastolic dysfunction, there are no any anti-heart failure drugs which focus on diastolic function. SERCA2a activator improves both systolic and diastolic function, and therefore is expected to be available for feline hypertrophic cardiomyopathy. No reports exhibit circulating miRNA profiling in dogs or cats with heart failure. It is meaningful to validate a utility of miR-146a and miR-342-3p as a biomarker for canine or feline heart failure. Evidences from studies of human and veterinary patients suggest that using multiple biomarkers is superior to using single marker alone for cardiovascular disease. It is considered that combination of NT-pro BNP and miRNAs identified in this study might improve diagnosis and management of heart failure in the future.