

## トランスクリプトーム解析による心不全制御機構の解明

高野博之

千葉大学大学院薬学研究院 分子心血管薬理学

### 【研究の背景】

わが国では心不全患者数が増加している。心不全患者は生活の質が低下するだけでなく生命予後が不良であることから、心不全に対する新たな治療法を開発することは喫緊の課題である。最近、dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬が次世代の糖尿病治療薬として使われるようになった。DPP-4 はインクレチニなどを分解するセリンプロテアーゼである。申請者らのグループが最近行った実験で、マウスの心筋梗塞モデルにおいて心筋梗塞後の急性期に血中や心臓の DPP-4 活性が増加した。また、DPP-4 阻害薬を投与することにより、血糖降下作用とは関係なく心不全が改善した<sup>1</sup>。DPP-4 により分解される基質は多数存在することから、①心不全に DPP-4 が関与している、②心臓保護的に作用する内在性の DPP-4 基質が DPP-4 により分解されることで心不全が発症・進展する、という可能性が示唆される。

### 【目的】

本研究の目的は、心不全マウスの心臓を用いてトランスクリプトーム解析を行い、発現変動遺伝子群から DPP-4 の基質を網羅的に探索し、その中から心臓保護作用を有するタンパク質を同定することである。

### 【方法】

#### 1) トランスクリプトーム解析による DPP-4 基質の探索

心不全モデルマウスとして、マウスの左冠動脈を結紮して作製した心筋梗塞モデルを用いる。シャムオペ群と心不全群の心臓から抽出した mRNA を、千葉大学の共通機器であり使用可能な Illumina 社の HiSeq1500 を用いて、2 群間での発現変動遺伝子のプロファイリングを行う。変動を認めた各遺伝子のアミノ酸配列より DPP-4 の基質となりうる候補を絞り込む。DPP-4 の基質は N 末から 2 番目のアミノ酸がアラニンかプロリンであることが知られているため、UniProt(アミノ酸配列データベース)により選出することが可能である。同定したタンパク質は、DPP-4 Inhibitor Screening Kit を用いて既存の基質との競合から DPP-4 酵素活性部位への結合能をスクリーニングし、Mass spectrometry を用いて DPP-4 による分解能を解析して DPP-4 の基質であることを確認する。

#### 2) DPP-4 基質の心臓保護作用と発現様式の検討

DPP-4 の基質として同定したタンパク質が心臓保護作用を有するか否か解析する。培養心筋細胞は酸化ストレスの H2O2 による刺激や低酸素培養下でアポトーシスを起こす。培養液中に DPP-4 基質を過剰添加することによりアポトーシスが抑制されるか検討することで心臓保護作用を調べる。また、心筋梗塞モデルマウスの血液中や心臓における DPP-4 基質のタンパク質発現様式を経時的に検討する。さらに、心臓を構成する細胞(心筋細胞、線維芽細胞、血管細胞)における DPP-4 基質の mRNA およびタンパク質発現様式についても検討する。

#### 3) 心不全に対する DPP-4 基質の効果に関する解析

同定した DPP-4 基質であるタンパク質を心不全モデルマウスに投与または遺伝子を過剰発現させた際に心不全が改善するか調べる。申請者らのグループがこれまでの研究で用いてきた心不全モデル(心筋梗塞モデル、圧負荷心肥大モデル)<sup>2,3</sup>を使って、マウス専用の心エコー機器(研究室で保有)により心機能を評価する。

## 【結 果】

マウスの急性心筋梗塞モデルを作製し遺伝子変動を調べるのに最適な時間を検討した。心筋梗塞後の経過時間をふつて心臓を摘出し心不全に関連する mRNA の変動を検討した。これまでに報告されている変動パターンとほぼ同じであることを確認した上で、さまざまな mRNA の発現レベルの変動が始まる初期の段階である 12 時間後、24 時間後に着目してトランスクリプトーム解析を開始した。現在、急性心筋梗塞マウスとシャムオペマウスの 2 群間における発現変動遺伝子のプロファイリングを行っている段階である。

## 【考 察】

本研究で使用する次世代シークエンサーは従来のシークエンサーと比較し、より短い時間で大量の遺伝子発現レベルを解析することが可能である。本研究はこれまでの申請者らの研究成果をさらに発展させるものであり、従来の研究手法では解明できなかった革新的な心不全制御機構の探索と新規治療法の開発につながると期待される。今後も本研究を継続して成果の発表を目指す。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

心不全の発症・進展における DPP-4 の関与を詳細に解明し、心臓保護作用をもつ DPP-4 の基質が同定できれば、これまでとは全く異なる革新的な心不全治療薬の開発が可能となる。また、心不全関連分子やシグナル経路もより詳細に解明でき、心不全の発症や治療効果の指標となる新規バイオマーカーの探索にもつながる。

## 【参考・引用文献】

1. Kubota A, Takano H, Wang H, Hasegawa H, Tadokoro H, Hirose M, Kobara Y, Yamada-Inagawa T, Komuro I, Kobayashi Y. DPP-4 inhibition has beneficial effects on the heart after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 91: 72-80, 2016.
2. Kameda Y, Hasegawa H, Kubota A, Tadokoro H, Kobayashi Y, Komuro I, Takano H. Effects of pitavastatin on pressure overload-induced heart failure in mice. *Circ J.* 76: 1159-1168, 2012.
3. Takano H, Ueda K, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, Komuro I. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest.* 120: 2016-2029, 2010.