

拡張不全型心不全に対する次世代の治療法の開発

清水逸平

順天堂大学医学部 内科学教室・循環器内科学講座

【研究の背景】

これまで私は加齢性疾患(心不全や肥満、糖尿病など)における細胞レベルでの老化や全身の代謝不全の意義について報告してきた(*Nat Med* 2009, *Cell Metab* 2012, 2013, *J Clin Invest* 2010, 2014, *Cell Rep* 2018, *Sci Rep* 2019, *J Mol Cell Cardiol* 2015, 2019 (全て筆頭著者)、*Cell Metab* 2014(筆頭著者)などに総説を掲載)。これらの研究を通して、様々な特性を有した臓器がほぼ同じ時相で加齢に伴い機能低下をきたす「加齢同期」メカニズムを明らかにしたいと考えるに至った。血液中に存在するタンパク質や代謝物質が加齢同期の中心的役割を担い、老化に伴う病的側面を促進している可能性が想定される。分泌型タンパクに着目し検討を行なったところ、老化や肥満時に血液中で Age related fibrotic protein (AFP) という分泌型線維化促進分子が上昇することが明らかになった。予備的検討の結果、AFPは、1)ヒト老化個体、2)HFpEF症例、3)心房細動症例、4)CKD 症例、5)サルコペニア症例、6)NASH 症例、7)肥満モデルマウス、8)老化マウス、9)NASH モデルマウスの血漿で上昇することが明らかになっていた。遺伝子改変動物を用いたモデル等で AFP を抑制することで、1)肥満モデルマウスの左室拡張能や左心室の線維化、2)心房の線維化、3)NASH マウスモデルにおける肝臓の線維化、4)肥満モデルマウスの骨格筋および腎臓の線維化が改善することも明らかになっていた。加齢とともに血液中の AFP のレベルが有意に上昇するため、AFP を「老化促進タンパク」と定義し、加齢関連線維性疾患(A-FiD)における病的意義を本研究課題で解明したいと考えた。

【目 的】

本研究課題で、加齢関連線維性疾患(Age-related Fibrotic Disorders(A-FiD))の疾患概念の確立、2)A-FiD に対する臓器・疾患横断的治療法の開発、に挑んだ。A-FiD は拡張不全型心不全(HFpEF)、心房細動、慢性腎障害(CKD)など、加齢と共に罹患率が増加し組織の線維化が中心的病態を形成する疾患、と新しく定義した。

本研究の目的は、A-FiD に対する疾患横断的な治療法を開発することであり、AFP を標的とした治療法を開発を目指した。特に HFpEF の病態に着目し、AFP 抑制による新規治療法の開発に挑戦した。加齢とともに血液中の AFP のレベルが有意に増加するため、AFP を「老化促進タンパク(Senoprotein)」と定義し、加齢同期を担う分子の一つとしてその病的意義の解明に挑んだ。開始時点までに行っていた予備的検討の結果 AFP は循環血液中で老化及び肥満に伴い上昇し、全身臓器(心臓(左心室及び心房)、肝臓、腎臓、骨格筋)の線維化を促進することで老化に伴う病的形質の進展に中心的役割を担う可能性が高いと考えられた。HFpEF の分子機序は未だ未解明な点が多いが、心臓の線維化による拡張不全が主たる病態である。また、加齢及び肥満で罹患率が上昇する。HFpEF には有効な治療法がなく新規治療法の開発は急務である。そこで、本研究課題において HFpEF における AFP の病的意義を明らかにし、同分子を標的とした新規治療法を開発を目指した。

【方 法】

1. A-FiD としての HFpEF 疾患概念の確立とマウスモデルを用いた検討

研究開始時点までの予備的検討の結果、AFP は、1)ヒト老化個体、2)高度左室拡張不全症例、3)肥満モデルマウスの血漿で上昇することが明らかになっていた。AFP 全身ノックアウト(KO)マウス、褐色脂肪特異的 KO マウス(AFPは褐色脂肪で主に産生される)を用いて検討を行った。あらゆる分子生物学的手法を用いた検討により HFpEF における AFP の病的意義を明らかにし、治療標的となりうるか詳細な検討を行った。

2. AFPを標的とした HFpEF 治療法の開発

本研究課題に先行する形で行なった検討において、様々な遺伝子改変動物を用いた検討の結果、NASH における、AFP の病的意義が明らかになりつつあった。ペプチドワクチンを用いた系で、AFP を抑制できるか検討を行なった(中神らとの共同研究)。AFP に対するペプチドワクチンを用いた検討の結果、ワクチンを投与した NASH 肥満モデルマウスの肝臓で線維化が抑制されることがわかっていた。そこで、AFP ペプチドワクチンにより心臓の線維化が抑制され HFpEF の病態が改善するか検討を行なった。AFP ペプチドワクチンの系に加え、中和抗体を用いて本分泌分子を抑制する系の確立を目指した。AFP を抑制するスクリーニングの系の確立も目指した。AFP の中和抗体の開発は順天堂大学の福原らと共同研究を行った。また、ヒト化 AFP 過剰発現モデルマウスを作製し、AFP 中和抗体により心臓を含む全身臓器の線維化が抑制されるか検討することを目指した。

3. AFP 制御メカニズムの検討

バイオフィンフォマティクスの手法等を用いた検討の結果(奥田、沖ら)、AFP が主に褐色脂肪で産生されること、AFP のプロモーター領域に転写因子である cFOS が結合し、発現を制御する可能性が示唆されている。肥満マウスの褐色脂肪を用い cFOS のレベルを検討したところ、高脂肪食負荷時には褐色脂肪の cFOS の発現が上昇することがわかった。そこで cFOS を発現するアデノ随伴ウイルスを作成し、代謝ストレス→cFOS の核への移行→AFP 発現レベルの上昇、という経路を検討することとした。老化に伴い褐色脂肪で AFP が増加することも確認されているが、詳細な機序の解明に挑む。

4. HFpEF における AFP のバイオマーカーとしての検討(回顧的検討)

新潟大学循環器内科が保有するバイオバンクを用いた検討の結果、1) 老化個体、2) 高度左室拡張能低下症例($E/A > 1$ 、 $E/e' > 10$)の血液中で AFP のレベルが上昇することがわかっていた。バイオバンクを保有する国内外の研究機関(新潟大学、名古屋大学、順天堂大学、大阪大学)と連携し、より多くの症例数で検討を行うこととした。日本国内の施設が保管する検体とあわせ、血液中の AFP のレベルと HFpEF 患者の臨床データ(経胸壁心エコー、採血データ、予後など)が相関するか検討を行った。

【結 果】

分泌型タンパクに着目し検討を行なったところ、老化や肥満時に血液中で分泌型線維化促進分子 AFP が上昇することが明らかになった。検討の結果、AFP は、1)ヒト老化個体、2)拡張不全型心不全(HFpEF)症例、3)心房細動症例、4)慢性腎障害(CKD)症例、5)サルコペニア症例、6)NASH 症例、7)肥満モデルマウス、8)老化マウス、9)NASH モデルマウスの血漿で上昇することが明らかになった。遺伝子改変動物を用いたモデル等で AFP を抑制することで、1)肥満モデルマウスの左室拡張能や左心室の線維化、2)心房の線維化、3)NASH マウスモデルにおける肝臓の線維化、4)肥満モデルマウスの骨格筋および腎臓の線維化が改善することも明らかになった。加齢とともに血液中の AFP のレベルが有意に上昇するため、AFP を「老化促進タンパク」と定義した。加齢関連線維性疾患(A-FiD)を拡張不全型心不全(HFpEF)、心房細動、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、慢性腎障害(CKD)など、加齢と共に罹患率が増加し組織の線維化が中心的病態を形成する疾患と新しく定義した。様々な検討の結果、AFP は機能不全に陥った褐色脂肪から分泌されていることがわかった。全身 AFP ノックアウトマウスに加え、Floxed AFP マウスを開発し、Ucp1 Cre マウスと交配することで褐色脂肪特異的 AFP ノックアウトマウスを開発した。全身 AFP KO マウス、褐色脂肪特異的 AFP KO マウスに高脂肪食を負荷したところ、心臓の線維化が抑制され左室拡張能が改善した。また、中神らとの共同研究で AFP に対するペプチドワクチンを作成し肥満モデルマウスに投与したところ、心臓の線維化が AFP ペプチドワクチン投与により抑制され、拡張能が改善することもわかった。AFP を発現するアデノ随伴ウイルスを褐色脂肪に投与することで、肝臓及び心臓の線維化が促進することも明らかになった。肥満ストレスが加わると、褐色脂肪細胞で過剰な脂肪酸流入→cFOS→AFP という経路で AFP の発現が上昇することアデノ随伴ウイルスを用いた検討からわかった。また、肥満マウスの餌を通常食に戻し、運動をさせると AFP の発現が褐色脂肪で低下することもわかった。加齢に伴い AFP の発現が褐色脂肪で上昇するが、その詳細な機序を現在検討中である。これらの検討を

踏まえ、組織特異的に AFP の発現を強発現できるマウスを開発したいと考え、高橋ら(筑波大学)と共同研究を行いマウス AFP 過剰発現マウス、ヒト AFP 過剰発現マウスを開発し現在コロニーを増やしているところである。また、AFP に対する中和抗体の開発を福原ら(順天堂大学)と行うこととし、現在シーズ抗体の探索を行なっているところである。全身 AFP KO マウス、褐色脂肪特異的 AFP KO マウスに肥満ストレスを加えると、肝臓のみならず、心臓、心房、腎臓の線維化も抑制されることが強く示唆された。HFpEF、心房細動、CKD の病態には組織の線維化が深く関連する。HFpEF 患者は世界で約 1300 万人、心房細動患者は 3000 万人以上、NASH 患者は世界人口の 3-5%、CKD 患者は世界人口の 10-12%に達すると考えられている。HFpEF、NASH、CKD には未だに有効な治療法が存在しない点が医療上の問題であり、新たな治療法の開発は急務である。これらの疾患を A-FiD という概念で包括的に定義し、AFP を標的とした次世代の治療法を開発に引き続き挑んでいきたい。

【考 察】

本研究課題で、老化や肥満に伴い血液中で上昇し、線維化を促進する分泌型線維化促進分子 (AFP) を標的とした拡張不全型心不全 (HFpEF) 治療法の開発を目指した。肥満食を投与したところ左室拡張不全が生じたが、AFP 全身ノックアウトマウス、臓器特異的 AFP ノックアウトマウスでは左室の線維化及び拡張不全の改善を認めた。400 名以上のヒト検体で検討したところ、加齢に伴い血液中で AFP のレベルが上昇すること、100 名近い HFpEF 症例の検体で検討したところ加齢とともに AFP が上昇し、拡張不全マーカーと正の相関を示すことが明らかになった。肥満ストレスで AFP が上昇する機序を検討したところ、cFOS/cJUN 経路により AFP の発現が上昇することがわかった。臓器特異的 AFP 発現モデルマウスの開発は完了し、今後表現型の検討を行う予定である。また、HFpEF に対する次世代の治療法を開発するために AFP に対する中和抗体のスクリーニングを現在行っている。更に検討を行うことで、HFpEF に対する次世代の治療法開発を行いたいと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

HFpEF 患者は世界で約 1300 万人に達すると考えられている。HFpEF に有効な薬剤は SGLT2 阻害薬しか存在しないので、新たな治療法の開発は急務である。本研究課題において様々なマウスモデルを用いて AFP を抑制、過剰発現したところ、AFP により心臓の線維化が促進し HFpEF の病態が促進することがわかった。現在、1) 低分子化合物スクリーニング、2) 中和抗体開発、という二つのアプローチで新規薬剤の開発に挑んでいる。本研究を遂行することで HFpEF に対する次世代の治療法開発につながる可能性が高い。

【参考・引用文献】

Hsiao Y T*, Shimizu I*,**, Yoshida Y, Minamino T**. Role of circulating molecules in age-related cardiovascular and metabolic disorders. *Inflammation and regeneration*. (IF7.354) 42(1):2, Jan1, 2022. *Co-first author, **Co-corresponding author