

新規線維化関連因子に着目した HFpEF の新規機序解明とその臨床応用

花谷信介

熊本大学病院 循環器内科

【研究の背景】

心不全の半数以上を占める左室駆出率の保たれた心不全(HFpEF)は左室駆出率の低下した心不全(HFrEF)と異なり予後改善につながる有効な内科的治療が未だ確立されていない。HFpEF の病態の主体は、進行性線維化に伴う左室拡張障害であることが知られているが¹⁾、その詳細な分子機序は十分には明らかになっていない。

近年、精巣上体で発現するタンパクとして同定された human epididymis protein 4 (HE4)が活性化型の線維芽細胞である myofibroblast に特異的に発現し、かつ細胞外へ分泌され線維化促進作用を発揮する、ということがマウスを用いた基礎研究にて報告された²⁾。この研究では慢性腎臓病患者の血中で HE4 の濃度が上昇することも示されており、ongoing な組織線維化を反映しうる新たなバイオマーカーとしても期待されている。

我々は以前、拡張型心筋症患者において血中 HE4 濃度が将来の左室病的リモデリングの程度や将来の心血管イベント発生と関連すること、およびその機序として HE4 が液性因子として心臓線維芽細胞へ作用し線維化促進的に働くことを明らかにしているが³⁾、HE4 と HFpEF の関連についてはこれまで明らかにされていない。

【目 的】

HFpEF の病態における HE4 の関与およびその分子機序を解明し、HFpEF の新たな治療ターゲットの同定に寄与することが本研究の目的である。

【方 法】

初めに、HFpEF モデルマウスとして、近年他グループから報告された NOS 阻害剤(L-NAME)+高脂肪食(HFD)負荷モデル⁴⁾を作成し、圧容曲線などにて HFpEF に矛盾しないことを確認した。同モデルマウスの心臓組織を用い、定量的リアルタイム PCR 法にて HE4 の mRNA 発現の程度を評価した。

続いて HFpEF の病態と HE4 の関連を評価するため、HE4 のノックアウト(KO)マウスの作製を行った。熊本大学動物資源開発研究部門と共同で CRISPR/Cas9 を用いた HE4 の flox マウスを作製し、これと以前から使用していた CAG-CreERT2 マウスなど複数の Cre マウスとの交配を行った。

さらに、in vitro の実験として新生児ラット由来の心筋細胞(Neonatal rat cardiomyocyte; NRCM)と線維芽細胞(Neonatal rat cardiac fibroblast; NRCF)を採取し、それぞれの細胞における HE4 の遺伝子発現の程度を比較した。続いて NRCF に線維化刺激である TGF β やアンジオテンシン II などの刺激を行い、リアルタイム PCR にて各種遺伝子発現の変動を評価した。さらに、予備検討として行っていた HE4 ノックダウン NRCF とコントロール NRCF での RNA シークエンスにて発現の変動が顕著であった遺伝子群について、リアルタイム PCR にて validation を行った。

【結 果】

1. HFpEF の病態における HE4 の発現プロファイルや発現変動についての検討

野生型マウス(C57/B6J)に 9 週齢時点から L-NAME+HFD の投与を行い、15 週間継続したのち各種評価を行った。L-NAME+HFD モデルマウスは対照マウスと比較して有意に体重増加が大きく、血圧が高値であり、腹腔ブドウ糖負荷試験で評価した耐糖能が悪化していた。心エコーにて左室収縮能は保たれる一方で左室壁は著明に肥厚しており、解剖時 HFpEF モデルマウスにおいて有意に左室重量は増加していたものの、心不全の所見である肺重量の増加については負荷の有無で有意差を認めず、リアルタイム PCR で評価した HE4 の遺伝子発現の増加も確認出来なかった。

2. HE4 ノックアウトマウスの確立

前述の通り CRISPR/Cas9 を用いて HE4 の flox マウスを作製し、これと CAG-CreERT2 マウスの交配を行った。CAG-CreERT2×HE4 flox マウスにタモキシフェンを 5 日間腹腔内投与し Cre タンパクの発現を誘導した後、リアルタイム PCR にて HE4 の遺伝子発現を確認したところ、少なくとも肺や腎臓において HE4 の発現が著明に低下することが確認できた。なお、病的刺激等を行わない状態での表現型としては、精巣上体の萎縮を認める他に明らかなものはなかった。

3. HE4 の発現調節による治療応用の可能性についての検討

HE4 の遺伝子発現の程度を in vitro で比較したところ、NRCM と比べ NRCF での発現が有意に多かった。NRCF へ TGF β 刺激を加えたところ、活性化型線維芽細胞への分化を示唆する α SMA の mRNA 発現増加と共に HE4 の mRNA 発現も増加することが確認された。また、HE4 ノックダウンにより発現が変動していた線維化関連遺伝子のいくつかは、リアルタイム PCR での validation でもやはり有意に発現が増減していた。

【考 察】

今回の結果では、HE4 の発現が HFpEF 心で増加しているという本研究の仮説は実証されなかったが、これは HE4 発現が変わらないというより、HFpEF の病態が正しく誘導できていないことが原因だと考えている。現在新たな HFpEF モデルの確立にも取り組んでおり、これまでに報告のない新たな負荷モデルが HFpEF 様の病態を来すことを確認しつつある。解剖時の心重量や肺重量が有意に増加し、心エコーでも左室肥大を認める一方で左室収縮は維持されており、左室圧容量曲線でも拡張障害を示唆する所見を認めている(未発表データ)。今後さらに詳細な検証にて、このモデルマウスが HFpEF モデルとして矛盾しないかを検討し、改めて HFpEF と HE4 との関連について評価を進めていく予定である。

また、HE4 の KO マウスについてはマウスラインが work しているものと考えられ、今後は複数の Cre マウスと交配を進め HFpEF 誘導をした際の表現型について検討を進める予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現時点では HE4 と HFpEF の関連を明らかにするという目的は達成できていないが、上記の通り HE4 の KO マウスが無事に確立されつつある。HE4 は悪性腫瘍や呼吸器疾患など複数の疾患との関連が示唆されているタンパクであるが、KO マウスは致死的事からこれまで KO マウスの成体を用いた研究はほとんどなかった。今回の研究が今後 HE4 の各種疾患における病的意義を解明することの基盤となるものと期待される。

【参考・引用文献】

1. Paulus WJ, Tschoepe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:263-71.
2. LeBleu VS, Teng Y, O'Connell JT, et al. Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis. *Nat Med.* 2013;19:227-31.
3. Yamamoto M, Hanatani S, Araki S, et al. HE4 Predicts Progressive Fibrosis and Cardiovascular Events in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 2021;10:e021069.
4. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature.* 2019;568:351-356.