

小胞体ストレス起因性カルシウム制御異常による HFpEF の病態機構解明と治療応用

橋本 亨

九州大学大学院医学研究院 循環器内科学分野

【研究の背景】

HFpEF の病態仮説としては、①炎症-内皮機能異常を介した NO-グアニル酸シクラーゼ (GC)-cGMP-PKG 系の障害、②誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を介した小胞体ストレスの障害、③titin (サルコメア構造タンパク) のリン酸化制御による心筋 stiffness の増大、④ミトコンドリアタンパクのアセチル化によるミトコンドリア機能障害、⑤カルシウムハンドリング異常による拡張機能障害、などが提唱されている。申請者は HFpEF における小胞体ストレス応答、ストア作動性カルシウム流入 (SOCE)、小胞体カルシウム枯渇を感知して細胞内カルシウム流入を誘導) 機構の異常を示唆するデータを得ており、具体的には心筋における PERK、CHOP 等の小胞体ストレスマーカーの発現亢進と、STIM1、TRPC3、TRPC6 など SOCE 関連因子の発現亢進を突き止めた。さらにはカルシウム・カルモジュリンによって活性化される phosphodiesterase 1A (PDE1A) も発現が亢進していた。心筋細胞内カルシウム濃度を測定すると、siRNA による phosphodiesterase 1A の遺伝子ノックダウンで SOCE 機構の抑制が確認された。以上の結果を踏まえると、小胞体ストレスにより SOCE 機構が作動して細胞内カルシウム濃度が増加することで拡張障害を惹起し、同時にカルシウム感受性ホスホジエステラーゼを活性化することで cGMP 依存性キナーゼ (PKG) が抑制されホスホランパンのリン酸化が低下することにより SOCE を増幅させ HFpEF の病態進展に至ると考えられる。

【目 的】

予後改善のエビデンスを伴う治療が多数存在する駆出率の低下した心不全 (HFrEF) と異なり、駆出率の保たれた心不全 (HFpEF) は治療法が確立していない。HFpEF の病態解明と新規治療法の開発は喫緊の課題である。申請者は予備実験で HFpEF 心筋におけるストア作動性カルシウム流入 (store-operated calcium entry, SOCE) 機構の異常を見出している。本研究の目的は、SOCE 機構を中心とする新たな HFpEF の病態仮説を立証し、SOCE を標的とする治療の有効性を証明することにある。

【方 法】

① HFpEF モデルにおける SOCE 機構の発現と Ca²⁺動態解析

高脂肪食と L-NAME を投与する HFpEF マウスモデルを用いる (5 週)。(i) a) 生存率・血圧・体重、b) 心機能 (心エコー、血行動態、臓器重量)、c) 組織病理学的評価、(ii) SOCE および Ca²⁺動態に関連する因子 (STIM1、Orai1、TRPCs、PDE1、PKA、PKG、RyR2、SERCA、PLB) の発現・リン酸化・活性を PCR、ウェスタンブロット、ELISA にて解析する。(iii) 免疫沈降法や免疫細胞化学による細胞内局在の解析を行い、分子間相互作用を解析する。プロテオーム解析により分子発現のパターン解析も合わせて行う。

② PDE1 による小胞体ストレス-SOCE 機構制御メカニズムの検討

培養心筋細胞実験にて病態変化を再現する。阻害薬および siRNA による遺伝子ノックダウンにて介在する機序を立証する。(i) ストレス応答シグナル (ANP、BNP、β MHC)、(ii) 小胞体ストレス応答 (PERK-CHOP、IRE1α-XBP1、ATF6 経路) の変化、(iii) PDE1 の下流経路 (cAMP/cGMP 濃度、PKA/PKG 活性) の変化を PCR、ウェスタンブロット、ELISA にて解析する。また、(iv) 蛍光色素 (Fluo4) による細胞内カルシウム濃度のリアルタイム測定により SOCE の変化を捉える。

③ PDE1 遺伝子改変動物を用いたメカニズム解析

AAV-shPDE1A をマウスに投与して PDE1A 遺伝子の *in vivo* ノックダウンを行う。コントロール shRNA 投与マウスと PDE1A ノックアウトマウスに高脂肪食・L-NAME 負荷による HFpEF モデルを作成する。HFpEF 病態が確立する 5 週後に組織を回収し、① (i)、(ii)、(iii)と同様の生理学的、組織学的、生化学的項目を評価する。これにより HFpEF における STIM1-TRPC3/6-PDE1-PKG 軸の役割を特異的に証明可能である。

【結 果】

C57BL/6J 野生型マウスに高脂肪食と L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester)を投与して HFpEF(駆出率の保たれた心不全)モデルを作成した。5 週間後に血圧上昇、体重増加、心臓超音波検査における E/A 比と E/E' 比の上昇、肺重量の増加(肺うっ血)、トレッドミルにおける運動距離の低下(運動耐容能の低下)、組織像における心筋細胞の肥大などの HFpEF の表現が完成していることを確認した。また HFpEF マウスでは対照群と比較して、iNOS や炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、TNF α 、MCP-1)の発現亢進、小胞体ストレスに関与する PERK、CHOP の発現亢進、BiP、XBP1s の発現減少が認められ、既報に一致する所見であった。ストア作動性カルシウム流入機構に関連する因子(STIM1、TRPC3、TRPC6)の発現増加が観察され、さらに HFpEF の心筋ではカルシウム結合蛋白であるカルモジュリンの発現増加も認められ、小胞体ストレスを契機としてストア作動性カルシウム流入機構が活性化することが HFpEF の病態促進に関わると考えられた。免疫沈降法では HFpEF 心筋、培養ラット新生仔心室筋細胞において TRPC6 と PDE1A の蛋白相互作用が確認され、免疫染色でも TRPC6 と PDE1A の共局在が観察された。さらに HFpEF 心筋では PKG 活性が低下し、phospholamban (PLB) のリン酸化が抑制されていた。以上から、PDE1A 活性化による PKG 抑制で PLB リン酸化が減少し、筋小胞体へ Ca²⁺取込み減少、細胞内 Ca²⁺上昇に至り拡張障害を呈すると考えられた。

cAMP、cGMP 両方の環状ヌクレオチドを制御する phosphodiesterase-1 (PDE1)のうち、PDE1A の発現が HFpEF マウスにおいて亢進していた。PDE1 はカルシウム・カルモジュリンによって活性化することが知られており、上述のカルモジュリンの発現増加が PDE1 の活性化につながっていると推察された。PDE1 阻害により血圧や体重は変化を受けないが、HFpEF の表現型(拡張障害、心重量増加・肺うっ血、運動耐容能低下、心筋細胞肥大)は改善した。HFpEF においては PKG の活性(VASP のリン酸化で評価)が低下し、PDE1A の *in vivo* ノックダウンおよび PDE1 阻害薬投与により回復した。一方で PKA の活性変化は明らかではなかった。PDE1 は cAMP、cGMP を標的とする dual PDE であるが、上述の結果を踏まえると HFpEF において PDE1A は主として cGMP を制御することで病態進展に寄与していることが示唆された。HFpEF マウスの心筋では phospholamban のリン酸化が減少し、PDE1 阻害で回復していたことから、PKG の活性化がこの過程に寄与し得るものと考えられる。

【考 察】

HFpEF においては、①炎症性刺激が小胞体ストレスを惹起し、②それによってストア作動性カルシウム流入機構が活性化し、③細胞内カルシウム濃度の上昇とカルモジュリンによって PDE1 が活性化し、④PKG 活性が抑制されることで phospholamban のリン酸化が減少し小胞体へのカルシウム取り込みが減少して細胞内カルシウム濃度上昇が遷延し、最終的に弛緩障害・拡張障害に至る病態が存在することが示された。今後の治療開発の基盤となることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

トランスレーショナル研究として HFpEF における小胞体ストレス-SOCE-PDE1 軸の関与を立証し、ついで阻害薬投与による薬理学的実験で病態が改善することを証明して HFpEF の新規治療開発の基盤とするものである。最終的にヒトへの投与が可能なら阻害薬の開発に繋げて、治療法が確立していない HFpEF 患者の予後改善に寄与することが期待される。HFpEF は心不全患者の半数を占め、予後は HFrEF と同等に不良であることから、その臨床的意義は極めて大きい。

【参考・引用文献】

Nature. 2015;519:472

Circ Heart Fail. 2020; 13:e006609

Circ Res. 2009;105:956

PNAS. 2016;113:E7116

Circulation. 2018; 138:1974

Nature. 2019;566:264

Circulation. 2013;127:938

Circ Res. 2021;128:232

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011.301:G385

Sci Rep. 2015;5:16580

J Biol Chem. 2015;290:20880

Circulation. 2018;138:1988

Sci Adv. 2019;5:eaaw5870