

<研究課題>炎症を標的とした新規心不全治療の開発

代表研究者 東京大学医学部附属病院 循環器内科 助教 東邦 康智
共同研究者 徳島大学医歯薬学研究部（医学域） 循環器内科学分野 教授 佐田 政隆
北里大学医学部 小児科学 准教授 平田 陽一郎

【抄録】

心不全は癌と並んで死亡率が高く、高齢者の認知機能や活動度の低下に寄与する。心不全の新規治療の開発は喫緊の課題である。

心不全の発症には心筋細胞における炎症シグナルが重要な役割を果たす。我々はその治療標的として、転写調節因子 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ を同定した。 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ を標的とする臨床応用可能な新規心不全治療を開発するため、本研究では shRNA による核酸治療と機能を抑制する薬物療法を戦略とする研究開発に取り組んだ。前者については、クラス II 型プロモーター下で発現する shRNA を設計し、心筋細胞向性のアデノ随伴ウィルスベクターを用いてマウスに導入した。圧負荷心不全マウスにウィルスベクターを投与すると、心臓の機能及び構造が改善した。後者については、発光シグナルによる $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の蛋白質結合検出系の構築に成功した。

本研究成果により、炎症シグナルを標的とする新規心不全治療の実現に向けた概念実証と基盤技術を確立できた。

1. 研究の目的

心不全は癌と並んで死亡率が高く、高齢者の認知機能や活動度の低下に寄与する。超高齢化社会である我が国の心不全罹患率は増加している。現在の心不全薬物治療は心不全の進行を抑制するが、治癒させることはできない。我が国の社会的活力の維持には心不全の新規治療法の開発が重要である。

心不全の発症には慢性炎症が重要な役割を果たす。我々は、心筋細胞における内因性物質や心脳連関によるパターン認識受容体の活性化とその下流にある炎症関連転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化が心臓の構造的・機能的変化を惹起することを解明した。しかし、炎症誘導シグナルは心筋細胞の代償反応及び非代償反応の両者に寄与していることから、炎症を標的とした心不全治療の開発は困難であった。

我々はその両者を切り分ける因子として、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の活性化により誘導される転写調節因子 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ を同定した。 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ シグナルにより誘導され、核酸・蛋白質間及び蛋白質間相互作用により、炎症シグナルや心筋細胞機能の変容を引き起こす。

本研究の目的は、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ を標的とした臨床応用可能な新規心不全治療を開発することである。そのために、 shRNA による核酸治療と小中分子化合物による薬物療法の開発を目指す。

1-1 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ に対する shRNA を用いた心不全治療の開発

$\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ は特に免疫細胞の機能制御に重要な役割を果たすことが報告されている。実際、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$

の完全欠損マウスは重篤な皮膚炎を発症する。よって、心筋細胞特異的に $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ を抑制する必要がある。

shRNA 等の核酸治療はウィルスベクターを用いた遺伝子治療と親和性が高い。 shRNA は標的とする遺伝子の mRNA に結合し分解を促進する。心筋細胞向性のアデノ随伴ウィルス 9(AAV9)と心筋細胞特異的遺伝子プロモーターを組み合わせることにより、心筋細胞特異的に shRNA を発現させることが可能である。

本研究開発項目では、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ に対する $\text{shRNA}(\text{I}\kappa\text{B}\zeta \text{ shRNA})$ を設計し、その治療効果をマウス心不全モデルで検証する。

1-2 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ 阻害薬の開発

これまでの検討で、我々は $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ がセリン・スレオニンキナーゼ $\text{Dcl}k1$ と結合することを明らかにしている。心臓での $\text{Dcl}k1$ の抑制はミトコンドリア機能障害を介して心不全発症につながる。よって、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ と $\text{Dcl}k1$ の結合を阻害する分子を同定できれば、心不全治療に応用することができる。 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ の完全欠損マウスは重篤な皮膚炎を発症する。よって、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ と $\text{Dcl}k1$ との結合を特異的に抑制する治療戦略は副作用の少ない新規心不全治療として期待できる。

本研究項目では、 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ と $\text{Dcl}k1$ の結合を阻害する治療薬の開発を目指す。そのために、小中分子化合物のスクリーニング系を構築する。

2. 研究方法と経過

2-1 $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ に対する shRNA を用いた心不全

治療の開発

米国 Broad Institute が提供する Genetic Perturbation Platform を用いて(IkB ζ shRNA を設計した。AAV9 作成用プラスミドの心筋細胞特異的遺伝子プロモーター下流に IkB ζ shRNA を導入した。遺伝子導入確認のためのマーカーとしてルシフェラーゼを発現させる設計とした。

IkB ζ shRNA による心不全治療効果をマウス心不全モデルを用いて検証した。具体的には、大動脈縮窄術により心臓に圧負荷を加えてマウスに心不全を引き起こした。圧負荷 6 週間後に心不全状態となった野生型マウスに、後眼窩静脈叢注射により心筋細胞特異的に IkB ζ shRNA を発現する AAV9 ベクターを導入した。AAV9 ベクター導入 4 週間後に、心臓の機能と構造の経過を心エコー及び組織学解析で評価した。

2-2 IkB ζ 阻害薬の開発

IkB ζ と Dcl1 の結合を阻害する小中分子化合物のスクリーニング系を構築するため、IkB ζ と Dcl1 の結合を発光シグナルに変換する系の確立を目指した。具体的には、各蛋白質に分割ルシフェラーゼタグ(それぞれ LgBit 及び SmBit)を付与した融合蛋白質を作製した。IkB ζ と Dcl1 が結合すると、分割ルシフェラーゼも結合する。分割ルシフェラーゼ単体ではルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを付与しても発光反応は起こらないが、分割ルシフェラーゼが結合すると、ルシフェラーゼとしての機能を回復し、ルシフェリン付与時に発光シグナルを発する。この発光シグナルの強度を測定することで、小中分子化合物の結合阻害活性を評価することが可能となる。

分割ルシフェラーゼはリンカーを介して IkB ζ 及び Dcl1 と融合させているが、蛋白質の結合時の位置関係により、分割ルシフェラーゼの結合効率が変化しうることから、二つの分割ルシフェラーゼ断片をそれぞれの蛋白質の N 末端及び C 末端側に融合させた蛋白質群を作成し、様々な組み合わせによる発光シグナル強度を検討した。

スクリーニング系の構築においては、蛋白質結合の細胞種による違いも考慮する必要がある。本研究の目標は、心筋細胞において IkB ζ と Dcl1 の結合が阻害されることであるが、心筋細胞は増殖しないため、スクリーニング系構築には不向きな面がある。そこで、容易に培養可能な HEK293T 細胞を用いて、心筋細胞と同様の結果が得られるかを検証した。なお、

心筋細胞としてラット新生仔より単離した初代培養心筋細胞(NRVM)を使用した。

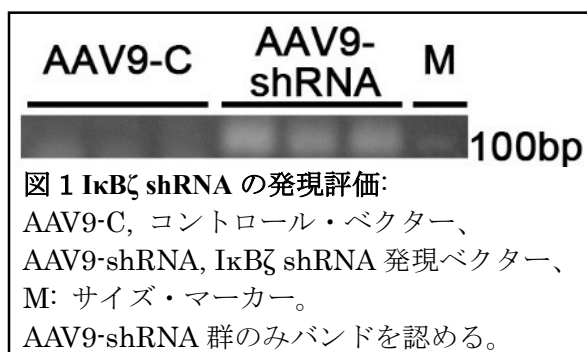
3. 研究の成果

3-1 IkB ζ に対する shRNA を用いた心不全治療の開発

まず、IkB ζ の mRNA に特異的に結合する RNA 配列を算出した。次に、miR-30 を基盤構造として改変し、IkB ζ に対する shRNA-miR を設計した。shRNA-miR は miR-30 の precursor 配列を元に、miR-30-5p 及び miR-30-3p 部分を改変することで、miR-30 が precursor から切り出される時と同じメカニズムで IkB ζ shRNA が切り出されるように設計した。それにより、shRNA がクラス II 型プロモーター下に発現させることを可能にした。細胞特異的プロモーターやストレス感受性プロモーターなどの多くのプロモーターはクラス II 型プロモーターであるため、shRNA-miR デザインは shRNA の単純な過剰発現ではなく、細胞特異的またはストレス依存性の発現を可能にする。

本研究では、心筋細胞特異的遺伝子プロモーターの下流に発現マーカーとしてルシフェラーゼを配置し、その 3'UTR に shRNA-miR 構造の形で IkB ζ shRNA を配置した。以上の転写ユニットを AAV9 ベクターに導入し、ウイルスを作製した。

まず、IkB ζ shRNA の発現を確認した。その検出のため、polyA ポリメラーゼによる polyA 付加後、oligo(dT)プライマーと MMLV reverse transcriptase を用いて cDNA を作成した。その後、IkB ζ shRNA 由来の cDNA を PCR 法で増幅したのち、電気泳動法で評価した(図 1)。



その結果、shRNA を搭載した AAV9 を導入したマウスの心臓組織にのみ標的とするバンドを認め、我々の設計した shRNA がマウスで発現していることを確認した。

次に、IkB ζ shRNA の治療効果を検証するため、まず大動脈縮窄術による圧負荷を加え

たマウス及び偽手術をしたマウスを用意した。6週間経過し、圧負荷マウスで心不全が誘導されたことを確認したのち、I κ B ζ shRNA を発現する AAV9 ベクターまたはコントロールの AAV9 ベクターを後眼窩静脈叢から投与した。AAV9 ベクター投与後4週後に各マウスの心臓の表現型を評価した。

心エコーでは、I κ B ζ shRNA を発現する AAV9 を投与した群で左室収縮能と左室拡大の改善を認めた(図2)。

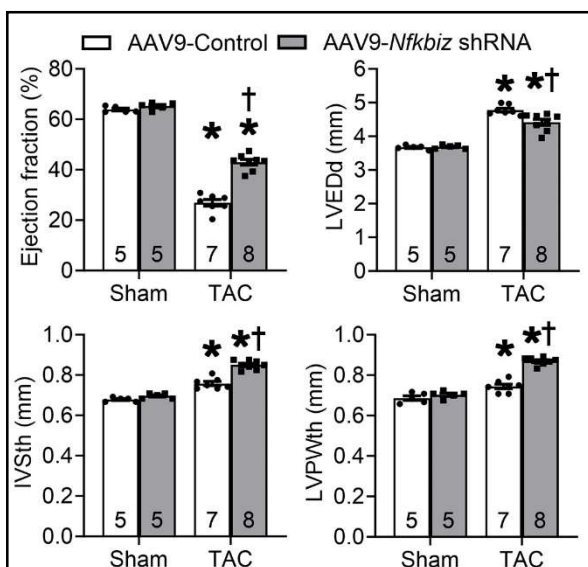


図2 心エコーによる shRNA の治療効果の評価:

LVEDd:左室拡張末期径、IVSth:心室中隔壁厚、LVPWth:左室後壁壁厚。*P<0.05 versus sham; †P<0.05 versus AAV9-Control。

組織学的評価では、I κ B ζ shRNA を発現する AAV9 を投与した群で心筋細胞肥大及び心線維化が改善し(図3)、マクロファージ浸潤の抑制と血管新生の促進を認めた(図4)。

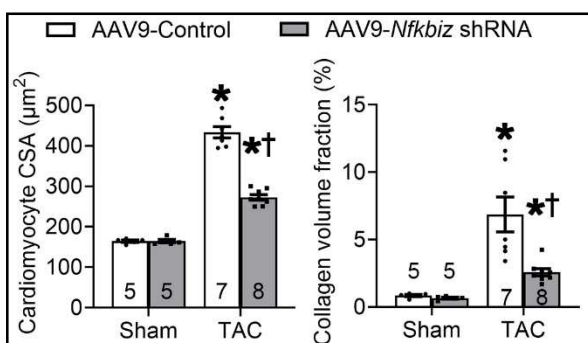


図3 組織学による shRNA の治療効果評価(心筋細胞肥大と心線維化):

CSA, cross-sectional area (心筋細胞の短軸切断面積を測定)。*P<0.05 versus sham; †P<0.05 versus AAV9-Control。

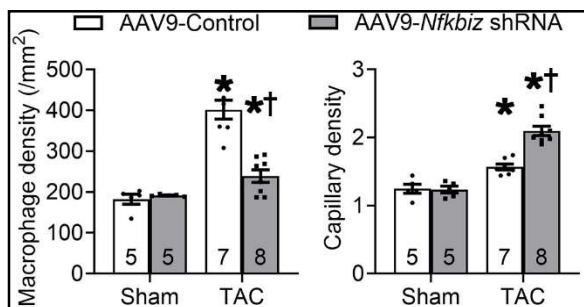


図4 組織学による shRNA の治療効果評価(マクロファージ浸潤と血管新生):

Macrophage density は mm² 当たりの Mac3 陽性細胞数を、Capillary density は1心筋細胞当たりの CD31 陽性の血管数を評価。*P<0.05 versus sham; †P<0.05 versus AAV9-Control。

以上より、I κ B ζ shRNA による核酸治療の有効性を動物実験で確認することに成功した。なお、I κ B ζ 完全欠損マウスで認める重篤な皮膚炎などの合併症は認めなかった。

3-2 I κ B ζ 阻害薬の開発

まず、I κ B ζ 及び Dcl1 と分割ルシフェラーゼ・タグとの融合蛋白質を作成した(図5)。



図5 融合蛋白質の設計

次に、NRVM において、各融合蛋白質の組み合わせ及び単独融合蛋白質の発光シグナルを測定した(図6)。なお、Positive Control として、SmBitPRKACA と LgBitPPKAR2A を使用した。

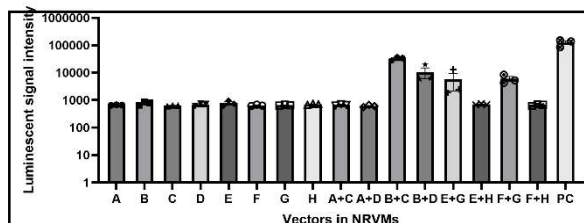
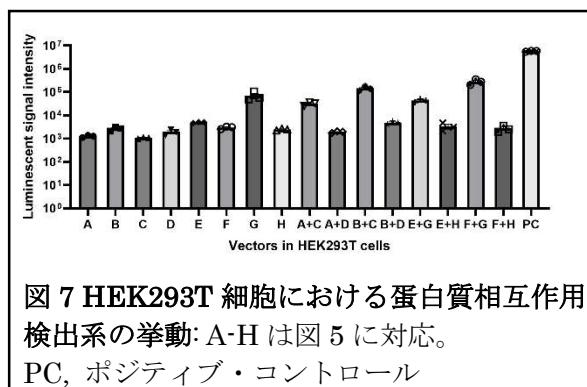


図6 心筋細胞における蛋白質相互作用検出系の挙動: A-H は図5に対応。PC, ポジティブ・コントロール

以上より、B と C の組み合わせが高い感度と特異度を示すことが分かった。

さらに、HEK293T 細胞において同様の検討を行った。図7の結果を得た。



以上から、B と C の組み合わせは心筋細胞だけでなく HEK293T 細胞でも高い特異性で機能する。この結果は、これらの融合蛋白質を用いた HEK293T 細胞等の増殖細胞における実験系の構築の有用性を示唆する。

4. 今後の課題

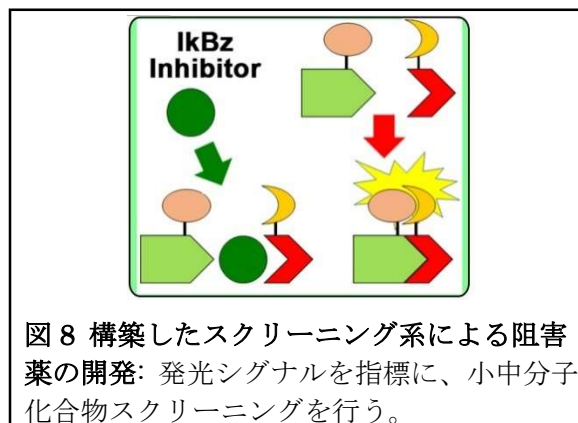
4-1 IκBζ に対する shRNA を用いた心不全治療の開発

本研究により、AAV9 を用いた IκBζ shRNA の心筋細胞への導入による圧負荷心不全治療効果を確認した。

今後の課題は、①他の心不全モデルにおける有効性の検討、②ブタなどの大型動物における IκBζ shRNA 治療の有効性の検討、③ヒトへの臨床応用に向けた基盤技術開発、である。心不全は様々な心疾患の終末像であり、複合的な要因で引き起こされる。よって、心筋梗塞モデルや薬剤誘発性心筋症モデル等での検証により、IκBζ shRNA 治療の対象疾患をどこまで広げることができるかを検討する必要がある。また、マウスとヒトとでは免疫システムも含めて様々な生命システムの相違が存在する。よって、解剖学的及び生理学的性質がヒトに近いブタなどの大型動物を用いた治療効果の検討が必要である。さらに、ヒトへの臨床応用にあたり、ヒトに有効な shRNA 配列の検討及び shRNA の発現法の開発が必要である。iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた検討を行う。

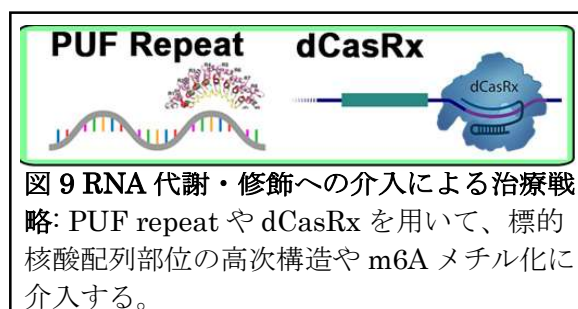
4-2 IκBζ 阻害薬の開発

本研究により、IκBζ 阻害薬開発のための小分子化合物スクリーニング系構築に必要な要素技術の開発に成功した。今後、実際の化合物ライブラリーを取得し、スクリーニングによる化合物の同定を行う。シーズ化合物の候補を同定後、治療有効性や毒性の観点から iPS 由来心筋細胞を用いた実験系で化合物の絞り込みと最適化を行い、臨床応用可能な最終化合物を開発する(図 8)。



4-3 IκBζ の mRNA に対する RNA 編集による心不全治療の開発

心不全治療を目的とした IκBζ の蛋白質発現への介入法として、mRNA の翻訳効率への介入がある。mRNA の翻訳効率は mRNA の構造変化や m6A メチル化によりコントロールされている。病的ストレスはこれらの変化を引き起こすことが報告されている。よって、これらのプロセスへの介入により、IκBζ の蛋白質発現を完全に抑制することなく、機能を制御できる可能性がある。今後、心不全発症に関連した IκBζ の mRNA の構造変化や m6A メチル化の解析結果を元に、dCasRx または PUF リピートをベースに、IκBζ に対する RNA 編集分子を用いた治療戦略の開発を推進する(図 9)。



5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部は、アメリカ心臓協会(BCVS2024)、ヨーロッパ心臓病学会(ESC2023)及び日本循環器学会(JCS2024)で発表した。

IκBζ shRNA の治療効果に関する成果はそのメカニズム研究のデータを合わせて、現在論文作成中である。IκBζ 阻害薬の開発に関する成果については、スクリーニング系の一部を上記作成中の論文の中で発表する。その後の薬物スクリーニングによる研究成果は、特許取得後に論文として発表する。それぞれ、英文の一般科学雑誌を中心に、循環器領域専門誌やバイオテクノロジー系雑誌に投稿する予定である。

Developing Novel Heart Failure Therapies Targeting Inflammation

Primary Researcher: **Yasutomi Higashikuni**

Assistant Professor, Department of Cardiovascular Medicine,
The University of Tokyo

Co-researchers: **Masataka Sata**

Professor, Department of Cardiovascular Medicine,
Tokushima University Graduate School

Yoichiro Hirata

Associate Professor, Department of Pediatrics,
Kitasato University

Heart failure contributes to cognitive dysfunction and reduced physical activity with high mortality in the elderly. There is a pressing need for novel heart failure therapies.

Proinflammatory signaling in cardiomyocytes has been shown to cause heart failure. We have previously identified a transcriptional modulator, I κ B ζ , as a promising therapeutic target for controlling proinflammatory signaling in cardiomyocytes for the treatment of heart failure. To develop clinically feasible therapeutic strategies targeting I κ B ζ , we designed oligonucleotide therapy using short hairpin RNA (shRNA). In addition, we sought to identify small- and medium-sized molecular compounds that inhibit I κ B ζ function by interfering with protein-protein interaction. For oligonucleotide therapy, we designed and synthesized shRNA targeting I κ B ζ that can be transcribed by RNA polymerase II promoters in adeno-associated virus (AAV) vector. Administration of AAV vector harboring shRNA improved cardiac structure and function in pressure-overloaded mice with heart failure. For drug therapy, we developed I κ B ζ protein-interaction detection system using fusion proteins with split luciferase tags that detects I κ B ζ binding to other proteins as a luminescent signal.

This work provided a proof of concept and established technical basis for the development of novel heart failure therapies targeting inflammation.