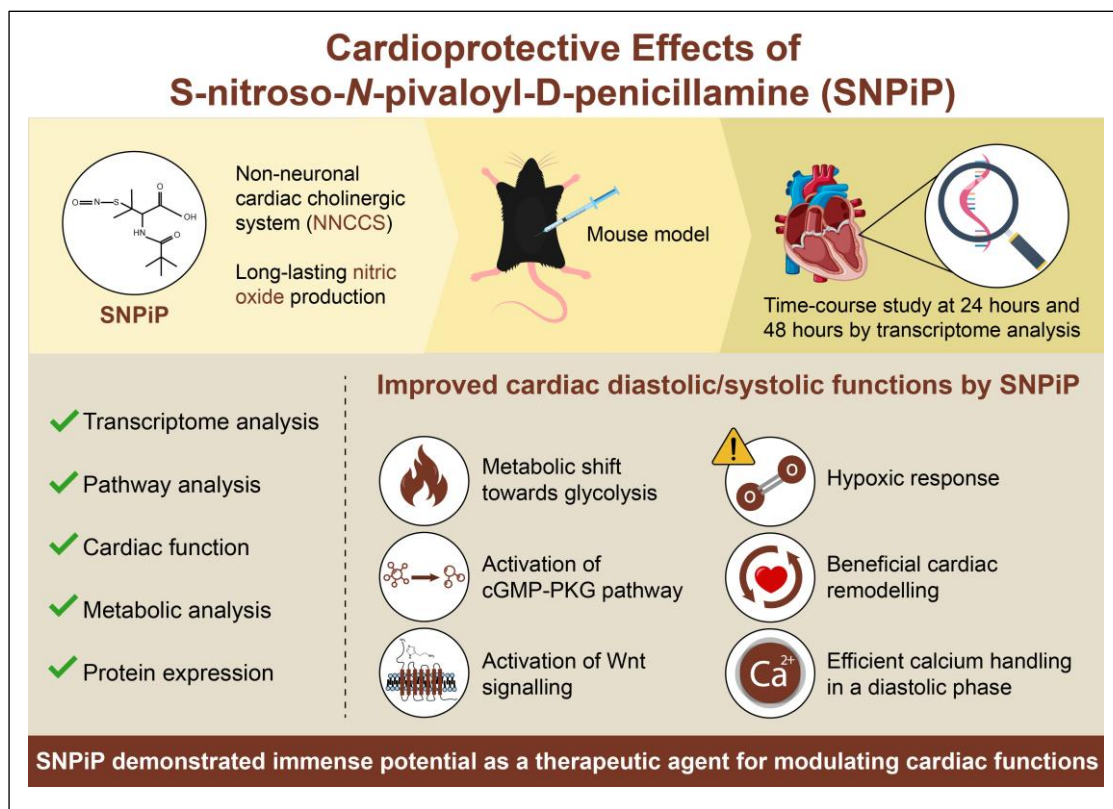


Transcriptome Analysis Reveals Enhancement of Cardiogenesis-Related Signaling Pathways by S-nitroso-N-pivaloyl-D-penicillamine (SNPiP): Implications for Improved Diastolic Function and Cardiac Performance.

SNPiP（非神経性心臓コリン作動系誘導薬）による、心臓保護作用増強効果に関するトランスクリプトーム解析の研究 心臓拡張能亢進による心機能改善のメカニズム

J Cardiovasc Pharmacol 2024 Feb 29. DOI: 10.1097/FJC.0000000000001552

Online ahead of print. PMID: 38422186



【研究の概要】

日本医科大学大学院生体統御科学分野研究グループ（筆頭著者：竹中康浩講師）は、日本医科大学化学教室（中村成夫教授）・埼玉医科大学国際医療センター臨床がんゲノム講座（平崎正孝講師）らとの共同研究により、心臓心筋細胞自身が備えている、アセチルコリン (ACh) 産生システム、すなわち the non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS)¹ を機能亢進させる新規化合物 (SNPiP) を見出し、その心臓における効果発現に関する網羅的解析を行いました。SNPiP の特徴的薬理効果として、心臓拡張能の亢進が既に同グループから発表

されましたが、それを裏付けるメカニズムは、以下に述べる複数の特徴的因子が時系列的に次々と起こり、最終的に心臓拡張能を正に制御する、と明らかとなりました。

- 1) 心臓カルシウムハンドリングに関わる因子の亢進
- 2) 心臓での ANP² 蛋白発現の亢進
- 3) 通常酸素下飼育マウスでの低酸素様応答の亢進

SNPiP は元来、細胞レベルでより緩徐な cGMP³ 値の上昇、細胞内産生 NO⁴ レベルのより緩徐な上昇、最終的に細胞内 ACh 産生レベルは 48-72 時間で亢進すること等は、同研究グループから報告されています。さらに、SNPiP 投与マウスの心臓では ACh 産生能も同様の時間経過で亢進し、正常・肥満マウス (db/db マウス) いずれでもその心臓拡張能を有意に亢進させ、結果、心拍数上昇を伴わずに心拍出量・収縮末期圧を増加させると報告されています。今回の結果により SNPiP 効果の分子メカニズムの一部が解明され、なぜ心臓拡張能が亢進するかについてより明確になりました。

NNCCS は本研究グループ柿沼大学院教授によって最初に報告されたシステムで、副交感神経終末由来の ACh とは独立した、心筋細胞自らが合成する ACh を意味します。そのシステムを亢進させた遺伝子改変マウスの心臓では、驚異的な虚血耐性能が獲得され、心筋梗塞時の新生血管形成促進も示されています。以上から NNCCS 機能賦活化・活性化薬の探索の結果、その一候補として SNPiP が見出されました。

ところで現在慢性心不全患者は世界的に見ても、今後その数はパンデミックによりさらに増加すると考えられています。この慢性心不全は、駆出率の保たれるものの拡張能が低下する HFpEF⁵ と、駆出率が低下する HFrEF⁶ の二種に分かれるとされています。このうちの前者 HFpEF において、拡張能障害を是正する薬物の報告は少ないことから、SNPiP の薬理作用である拡張能亢進効果は HFpEF にも応用可能であることが期待されます。

この SNPiP は 2023 年 8 月に特許登録され (JPB7338877)、2022 年 11 月から富士フィルム和光純薬から試薬として販売されています。本研究成果は、米国「Journal Cardiovascular Pharmacology」に、2024 年 2 月 29 日 Articles in press として発表されました。

本研究の一部は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金、喫煙科学研究財団、公益財団法人車両協議公益資金記念財団の支援を受け行われました。

【研究の背景】

心臓の機能は、自律神経系が調節しています。自律神経系には交感神経系と副交感神経系があり、そのバランスによって心臓は心拍数・収縮力・刺激伝導速度を変化させています。このうち、副交感神経終末から放出されるのがアセチルコリン(ACh)ですが、近年、ACh は必ずしも神経由来のみではなく、非神経細胞からも産生されることが明らかとなり、それを非神経性 ACh、つまり non-neuronal ACh と呼んでいます。その中で心筋細胞自らが ACh を産生することを、生体統御科学分野柿沼大学院教授らが 2009 年に報告し、その後 the non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS)と提唱しました。その後、本システムは心臓機能

維持に不可欠なものであり、その機能亢進マウスでは、その驚異的な虚血耐性能により、心筋梗塞後の生存率は、心筋梗塞後の野生型マウスの 2 倍であることが示されました。さらに、このマウスでは自己で迷走神経刺激を行っているのと同様の表現型を示し、加えて脳の高次機能を修飾し、抗うつ・抗ストレス効果、そして血液脳関門機能を強固にすることで、脳内炎症を抑制し、パーキンソン病や脳損傷モデルの病態を軽減させることも示されました³。したがって NNCCS 機能を高める薬物があれば、それは心臓のみならず神経疾患に対する治療戦略の一ツールになる可能性があると考えられました。そこで、本研究グループと本学化学教室 中村成夫教授との共同研究により、これまでに非常に弱いながらも NNCCS 機能を亢進させる薬物の基本骨格をもとに、中村教授のデザインのもと、多数の化合物の中から、新規候補物質の一つとして S-nitroso-N-pivaloyl-D-penicillamine (SNPiP) を見出しました。この化合物は緩徐に NNCCS 機能を活性化させ、心臓での ACh 産生を約 3 倍亢進させ、かつ心機能評価では心臓拡張能を主に亢進させることが明らかになりました。しかし、この薬物が、どのようにして拡張能を亢進させているのか、その詳細なメカニズムは不明でした。

【研究の内容】

野生型マウスに SNPiP を腹腔内投与後 24・48 時間後にマウス心臓心室を取り出し、コントロール群 (SNPiP の溶媒のみを投与し、同じ 24・48 時間後に心臓を取り出す) を対照として RNAseq を行い、網羅的遺伝子発現解析 (GO・KEGG パスウェイ・GSEA・IPA 解析) を行いました。その結果、SNPiP によって心臓心室では 187 の遺伝子群の発現が 24・48 時間後に共通して上昇し、逆に発現低下したものは 2 遺伝子のみであり、圧倒的な転写増加が示されました。その中でも心臓発生や低酸素応答関連遺伝子群の増加が認められました。この低酸素応答有意な遺伝子発現については、エンリッチメント解析によっても確認され、コントロール群と比べ SNPiP 群ではミトコンドリア電子伝達系遺伝子の有意な発現低下が認められました。すなわち SNPiP は、心臓のエネルギー代謝系を脂肪酸代謝から解糖系へよりシフトさせることが明らかとなりました。SNPiP 群では心臓内グルコース含量がより低下し、GLUT4⁷ 蛋白発現が亢進したことから、SNPiP は心臓での糖利用をより亢進させること、しかし SNPiP 投与群の心臓全体での ATP 含量はコントロール群と同レベルであることから、解糖系による代償が示唆されました。

さらに SNPiP により、ANP や sarcolipin⁸ 遺伝子・蛋白発現の有意な増加、SERCA⁹ や MCU¹⁰ など筋小胞体・ミトコンドリアに局在するカルシウムを取りこむ蛋白発現の有意な増加が明らかとなりました。これらは細胞質内カルシウム濃度をより効率よく調節することを示唆するものであり、SNPiP の薬理効果メカニズムの傍証になると考えられました。

【本研究の意義と今後の展望】

SNPiP は、たとえ通常酸素下であったとしても心筋細胞には低酸素応答を惹起させて、前もって低酸素環境に順化させるような一連の遺伝子群発現を上昇させました。さらに ANP と

いった急性心不全治療薬にも応用される遺伝子および蛋白発現を増加させていることから、SNP_iP は心臓保護的に働くことが示唆されました。また細胞質内カルシウムレベルをより効率よく制御する主要な因子(SERCA・sarcolipin・MCU)の蛋白発現も増加させることから、心臓拡張能亢進への関与が深く示唆されました。

現在慢性心不全患者は世界的に見ても、高齢化に伴いますます増加する傾向にあると考えられています。一般に慢性心不全は、心臓駆出率は正常でも拡張能が低下する HFpEF と、駆出率も低下する HFrEF に分かれますが、前者 HFpEF では、拡張能障害を是正する薬物の報告が少ないため、今回の研究結果から、SNP_iP の薬理作用である拡張能亢進効果は HFpEF にも応用可能である可能性が期待されます。

【用語解説】

1. NNCCS

非神経性 ACh の中で心筋細胞由来の ACh を産生するシステムを the non-neuronal cardiac cholinergic system と呼ばれる。一個の心筋細胞自らがもつ、副交感神経系とは独立したシステムである。

2. ANP

atrial natriuretic peptide 心房性ナトリウム利尿性ペプチド 主に心房、しかし心室でも一部発現しており、心臓内血液貯留によって心筋が伸展されることで分泌され、腎臓に働きナトリウム排泄を促進し、循環血液量を下げる働きがある。心不全の治療薬として使用されている。

3. cGMP

Cyclic guanosine monophosphate 環状グアノシン一リン酸 セカンドメッセンジャーとして働き、血管や平滑筋の弛緩作用に関与する。

4. NO

一酸化窒素であり、血管内皮細胞においてさまざまな刺激によりアルギニンと NO 合成酵素により産生される血管弛緩物質のうちの一つである。近年血管内皮細胞に限らず、心筋細胞でも産生されることが報告されている。

5. HFpEF

Heart failure with preserved ejection fraction 心臓の拡張機能は低下しているものの、ポンプ機能としての収縮能は保たれた心不全のこと。

6. HFrEF

Heart failure with reduced ejection fraction 心臓のポンプ機能としての収縮能の低下を伴う心不全のこと。

7. GLUT4

Glucose transporter type 4 横紋筋である心筋や骨格筋で発現している糖輸送体で、インスリンによって調節を受けている。

8. Sarcolipin

phospholamban という筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a)の機能を負に調節するタンパク質の似た機能をもつタンパク質で、通常は心房に発現する。

9. SERCA

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 心筋弛緩時に細胞質内からカルシウムを筋小胞体に組み入れるカルシウムポンプのこと。

10. MCU

Mitochondrial calcium uniporter ミトコンドリアのカルシウム取り込みに関与する輸送蛋白のこと。他の 6~7 種のサブユニットとともにカルシウムユニポーターを構成する。MCU がオリゴマーとしてチャネルを形成する。

【原論文情報】

論文名 : Transcriptome analysis reveals enhancement of cardiogenesis-related signaling pathways by S-nitroso-N-pivaloyl-D-penicillamine (SNPiP): implications for improved diastolic function and cardiac performance

著者名 : Takenaka Yasuhiro; Hirasaki Masataka; Bono Hidemasa; Nakamura Shigeo; Kakinuma Yoshihiko.

掲載誌名 : Journal of Cardiovascular Pharmacology

DOI: 10.1097/FJC.0000000000001552. PMID: 38422186

Website:

https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/abstract/9900/transcriptome_analysis_reveals_enhancement_of.292.aspx

or <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38422186/>

【発表者】 ※研究内容については発表者にお問合せください

日本医科大学大学院医学研究科 生体統御科学分野

講師（筆頭著者）竹中 康浩（たけなか やすひろ） E-mail: yasuhito-takenaka@nms.ac.jp

大学院教授 柿沼 由彦（かきぬま よしひこ） E-mail: k12417853@nms.ac.jp

TEL: 03-3822-2131 内線 5244 または 5278