

平成 30 年度

がん・心臓病の基礎的・先駆的
研究事業報告書

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団

はじめに

我が国において、死因の上位を占める疾患の基礎的研究の促進を図り、学術の向上と国民の健康増進に寄与することを目的として、当財団では昭和62年から助成事業の枠に新たに「がん・心臓病の基礎的研究事業」を設定し、更に平成13年度からは「がん・心臓病の先駆的研究事業」も対象に加え、「医療の基礎的、先駆的研究助成事業」として平成30年までの477件のプロジェクトに対し、約3,838百万円の助成を行なってきました。

がんの早期発見、心臓病の予防等は現代人の国民生活にとって大変関心の高いものであります。

がん研究を見ると、がん本体の解明とその診断及び治療法の開発等がん制圧のための研究が鋭意進められており、その研究成果も上がり、がんは治る病気といった感を抱かせます。

また心臓病についても分子生物学的領域にまで研究が進んできており動脈硬化や心臓病の治療に遺伝子を用いる手法等も行なわれるようになりました。

これらの研究事業を実施された研究者の方々は、3年間以内という限られた期間のうちに少人数で研究を行い、これを取りまとめることは非常なご苦勞があったと思います。今回の研究成果は、今までにそれぞれの学会或いは論文により発表されて、それぞれに高い評価を受けておられます。

この研究成果について、より広く社会の各方面に公表することが必要との声もあり、この要請に応え、29年度をもって研究が終了し、私どもに提出していただいた研究報告書を抄録としてここに刊行する次第です。がん・心臓病の今後の研究に少しでも役立てば幸いです。

令和元年12月

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団
理事長 深澤 亘

目 次

臨床検体を用いた分子標的療法耐性機構の解明とその克服法の開発片山 量平.....	1
心不全の筋萎縮、サルコペニアとその対策としての新規リハビリ法に関する臨床的 ならびに基礎的研究中島 敏明.....	11
心筋筋小胞体カルシウムサイクリング制御機構の解明と心臓病への役割南 沢 享.....	25
催不整脈性に関わる心臓イオンチャネルの分子認識機構の解明大 澤 匡 範.....	33
高血糖及び圧受容器機能低下がもたらす心不全重症化機構の解明坂 本 昌 也.....	43

臨床検体を用いた分子標的療法耐性機構の解明とその克服法の開発

《 研究の概要 》

がんはわが国における死亡原因の1位であり、中でも、肺がんおよび大腸がんによる死亡者数はそれぞれ年間7万人以上、5万人以上にのぼり、合わせるとがんによる死亡者数の4割を超える。中でも4期の進行肺がんは最近まで5年生存率がわずか数%であった。4期の肺がんは他臓器等への転移があり切除不能であるため、化学療法などの薬物療法が中心となっている。約15年前までは細胞障害性の抗がん剤を基軸とした薬物療法が中心であったが、肺がんの中でも多数を占める非小細胞肺がんでは、がんの原因となる遺伝子変異（EGFR活性化変異やALK融合遺伝子などのドライバーがん遺伝子）の発見と、がん遺伝子産物を特異的に標的とする分子標的薬の進歩により、その治療は目覚ましい進歩を遂げ、ドライバーがん遺伝子陽性肺がん患者の予後を著しく改善してきた。更に、近年ではがん免疫チェックポイント阻害薬の開発に伴い、ドライバーがん遺伝子などが陰性の進行肺がん患者においても、その予後を著しく改善してきた。しかしながら、がん分子標的療法やがん免疫チェックポイント阻害薬がどれほどたかい治療効果を示した場合においても、やがて獲得耐性が生じ、がんが再発することが大きな問題となってきた。

本研究において我々は、臨床検体を用いてがんの分子標的薬耐性機構を中心に解析を進め、複数の治療抵抗性機構の発見と、耐性克服療法の発見、さらにはユニークなメカニズムによるがん免疫療法への耐性機構の発見に成功し、複数の論文として発表した。日本人の肺がんの約3割を占めるEGFR変異陽性肺がんでは、EGFR阻害薬の使用順序により出現してきうる耐性変異が異なってくることを実験的に示したり、第3世代EGFR阻害薬の奏功期間に第1, 2世代のEGFR阻害薬耐性変異のアリル頻度が関連性を示すこと、あらゆるEGFR阻害薬に耐性を示す重複耐性変異体：EGFR-C797S/T790M/活性化変異に対するあたらしい治療法を発見するなどした。ALKやROS1, NTRKなどの融合遺伝子が陽性のがんについては、耐性変異と克服法についてそれぞれのがん毎に発見し論文として報告した。そして、がん免疫チェックポイント阻害薬の中で抗PD-L1抗体に対する耐性機構として、スプライシング異常に伴う分泌型PD-L1の出現が抗PD-L1抗体のデコイとして働き、耐性を引き起こしていることを発見し報告した。まだ耐性機構が未解明のままであるケースも少なくはないが、本研究により世界に先駆けて複数の獲得耐性機構と耐性克服法の発見に成功し、今後の治療応用へとつながりうる成果を上げることができた。

片山 量平	公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター基礎研究部・部長	本研究課題全体の実施と総括
竹本 愛	公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター基礎研究部・研究員	治療抵抗性関連分子の解析と 新規治療法探索
北園 聡	公益財団法人がん研究会 有明病院 呼吸器内科・副医長	肺がん臨床検体の収集と 臨床情報解析

研究報告

I 研究目的

日本人の死亡原因の1位はがんであり、中でも肺がんによる死亡者数は最も多い。約15年前までは、進行非小細胞肺がん患者の平均生存期間は半年から1年程度しかなかったが、EGFRをはじめとする様々ながん遺伝子異常の発見とそれらに対する分子標的薬の登場により、進行肺がんの予後は著しく改善されてきた。しかし分子標的薬への耐性獲得によるがんの再発が問題になっており、その耐性の分子機構解明と耐性克服法の開発が重要な課題である。これまでに様々な分子標的薬耐性機構が明らかにされ、一部ではその分子基盤に応じたより効果的な薬剤や、薬剤の併用療法による克服が試みられているが、まだ十分に解明されたとは言い難い。本研究では肺がんを中心に、分子標的療法抵抗性の分子機構解明と、耐性の回避・克服に係る分子基盤を明らかにし、耐性克服のための新たな標的療法・併用療法の開発を目標とした。

EGFR 活性型変異を有する患者には EGFR-TKI (チロシンキナーゼ阻害薬) が、ALK 融合遺伝子を有する肺がんには、ALK 阻害薬 (Crizotinib や Alectinib, Ceritinib) が著明な腫瘍縮小効果を示すが、いずれにおいても約1年～数年以内に獲得耐性を生じることが臨床問題となってきた。これまでに、代表研究者らは培養細胞株のみならず、分子標的薬耐性となった患者検体から培養細胞株を直接樹立し、ALK 陽性肺がんにおける ALK 阻害薬耐性機構とその克服法を多数同定することに成功してきた (Katayama R et al PNAS 2011, Science Transl Med 2012, Cancer Discov 2013, Clin Can Res 2014, 他)。また、ROS1 融合遺伝子陽性肺がんに対しても新たな耐性機構と克服薬の同定に成功した (Awad MM and Katayama R et al, NEJM 2013, Katayama R et al Clin Can Res 2015)。しかし、未だに耐性メカニズム同定には至っていない症例も多い。そこで本研究では、平成28年度より各患者検体由来の培養細胞株と Xenograft モデルを樹立し、遺伝子変異解析、たんぱく質発現解析、細胞内シグナル伝達解析等とプロテオミクスのプロファイリング等を行い、得られた生物学的特性と臨床病理学的所見とを組み合わせ、耐性機構の解析を行っている。さらに、がんと間質細胞の相互作用の解析を通じ、肺がんにおける種々の分子標的薬に対する未同定の耐性メカニズムを明らかにし、分子標的薬に対して不応となった際の併用療法の開発につながる成果を得ることを目的とした。

また、近年になり、肺がんの薬物療法の1つとして、免疫チェックポイント阻害薬が重要な役割を果たすようになってきた。腫瘍細胞が免疫による排除から逃避するのに働いている分子の1つである PD-L1 とその免疫細胞側のレセプターである PD-1 を標的とする抗

体が臨床応用されており、その他の免疫チェックポイントを標的とした抗体医薬等が相次いで開発されている。一部の患者では高い有効性と長い奏功期間が認められているものの、著効した患者においても徐々に獲得耐性が認められるようになってきている。そこで、免疫チェックポイント阻害薬による治療が予定されている症例、一旦は奏功が見られたものの耐性となり増悪した症例より、生検検体や手術検体、体腔液検体等を用いて、がん細胞株の樹立と共に、腫瘍と共に存在する免疫細胞を分離・培養して解析等に用い、がん免疫チェックポイント阻害薬に対する獲得耐性機構の解明と、その克服法の発見を目指し研究を行った。

II 研究計画及び材料と方法

肺がんにおける分子標的薬耐性機構解明と新規併用療法の探索研究

肺がん治療においてドライバーがん遺伝子などと呼ばれるがんを引き起こす遺伝子異常に対応した分子標的薬（EGFR 活性化変異に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬など）は著明な腫瘍縮小効果を示すが、いずれにおいても約 1 年程度で不応となり耐性化することが临床上問題となっている。そこで以下に列記する肺がん症例を中心に分子標的薬治療前・耐性後の検体からがん細胞株を樹立し、薬剤耐性機構を調べるために、標的遺伝子の変異解析と主要ながん関連遺伝子の変異解析を行った。これまでに樹立してきた臨床検体由来細胞株および、研究室内で *in vitro* で樹立してきた分子標的薬耐性細胞株も活用し耐性機構の解析を行った。該当する症例の選択およびその臨床情報の解析については、共同研究者の北園聡医師（呼吸器内科医）が行った。

- EGFR 変異陽性肺がん（Erlotinib, Gefitinib, Afatinib または第 3 世代 EGFR 阻害薬 Osimertinib 治療前・後の検体）
- ALK 融合遺伝子陽性肺がん（Crizotinib, Alectinib, Ceritinib または Lorlatinib などの ALK 阻害薬治療前・後の検体）
- ROS1, RET, NTRK1 融合遺伝子陽性がん（Crizotinib や臨床試験中であった阻害薬治療前・後の検体）
- その他（ERBB2 活性化型変異, cMET 遺伝子増幅, BRAF 変異陽性肺がん検体他）
- 肺がん免疫チェックポイント阻害薬に抵抗性の検体（一旦は著効が見られた症例）

分子標的薬の標的分子の耐性変異やそのほかのがん関連遺伝子の遺伝子変異については、次世代シーケンサー等を用いて解析を行った。遺伝子変異による耐性機構が見つからない症例については、抗体アレイ、遺伝子発現解析、質量分析計を用いたプロテオミクス（特にリン酸化プロテオミクスと総タンパク質のプロテオミクスを組み合わせた革新的プロテオミクス）等の解析手法を駆使し、耐性検体において分子標的薬処理時に活性化しているシグナルパスウェイや、耐性細胞で著しく発現上昇または減少しているたんぱく質等の同定を試みた。また、分子標的薬によって誘導される細胞死は主にアポトーシスによることがこれまでに示されているが、このアポトーシスの経路の異常などによる細胞死誘導不全等についても着目し、解析を進めた。さらに、細胞の EMT などの形態変化に大きくかかわ

ることが予想される因子などについても同時に検討した。他にも耐性機構同定のために、薬剤併用スクリーニングを、主に臨床で使用されている薬剤および、臨床試験中の薬剤を中心に行った。併用療法による相乗的な細胞増殖抑制が見られた際には、ヒットしてきた阻害薬の標的分子群から予測されるメカニズムを手掛かりに耐性機構の解明を試みた。

同定した因子が非常にユニークであり、阻害薬等が手に入らない場合には、阻害薬候補のスクリーニングにも挑戦した。分泌タンパクであったものについて、ELISA やアセトン沈殿などの方法を駆使して定量解析等を行った。

これらの検討から見出した標的因子については、併用療法を見出すために併用薬のスクリーニングを行った。そして同定した薬剤を用いて *in vivo* での効果についても検討を行った。また、新たに見出した耐性機構が他にも見られるかどうかを調べるために、FFPE 保存検体等を用いたスクリーニングも実施した。速やかな臨床応用を目指すために、併用薬候補としては実臨床で利用されている薬剤を極力用いた。

がん免疫チェックポイント阻害薬に対する獲得耐性機構の解析と、その克服法の解析

近年になり、肺がんの薬物療法の1つとして、免疫チェックポイント阻害薬が重要な役割を果たすようになってきた。腫瘍細胞が免疫による排除から逃避するのに働いている分子の1つである PD-L1 とその免疫細胞側のレセプターである PD-1 を標的とする抗体が臨床応用されており、その他の免疫チェックポイントを標的とした抗体医薬等が相次いで開発されている。一部の患者では高い有効性と長い奏功期間が認められているものの、著効した患者においても徐々に獲得耐性が認められるようになってきている。そこで、免疫チェックポイント阻害薬による治療が予定されている症例、一旦は奏功が見られたものの耐性となり増悪した症例より、生検検体や手術検体、体腔液検体等を用いて、がん細胞株の樹立と共に、腫瘍と共に存在する免疫細胞を分離・培養して解析等に用いた。具体的には下記のようにして解析を進めた。

1) 免疫チェックポイント治療前・後の肺がん臨床検体からの腫瘍細胞と免疫細胞の分離・培養

2) NGS を用いた体細胞変異の解析と腫瘍抗原（ネオアンチゲン）の解析

3) 抵抗性関連因子の同定と、その因子の腫瘍-免疫間の相互作用等に対する影響の解析

4) Syngeneic マウスモデルを用いた同定した因子の解析と抵抗性克服療法の検討

上記の手法などにより、肺がんにおける免疫チェックポイント阻害薬抵抗性機構の解析と耐性克服方法、ひいては初期治療における感受性規定因子となりうるバイオマーカーの同定も目指した。

これら上記の研究実施は代表研究者の片山量平と、共同研究者の竹本、北園が協同して行った。

III 研究成果

肺がんにおける分子標的薬耐性機構解明と新規併用療法の探索研究

がん研究会有明病院の呼吸器内科の肺がん患者のうち、当会で承認された臨床研究「分子

プロファイリングによる薬剤抵抗性機構の研究」に残余検体を使用することを同意して下さった患者由来の検体（EGFR 変異陽性肺がん、ALK 融合遺伝子陽性肺がんなどの各分子標的治療薬前・後の胸水や生検検体など）を用いて培養細胞株の樹立を試み、平成 28 年 4 月からの約 1 年半で EGFR 変異陽性症例 20 例以上、ALK 陽性症例 8 例、RET 陽性症例 3 例、ROS1 陽性症例 3 例からの培養株樹立に成功した。その中で、一部の症例については、既知の耐性機構の同定に成功したが、耐性機構がすぐには判明しなかった症例については培養株化に成功した検体を中心に、耐性機構を調べた。これらをはじめとして、耐性機構が同定できたものについては、概ね耐性克服法の候補を見出すことにも成功している。また、

EGFR-T790M耐性変異/活性化変異の比がOsimertinib奏功と相関

EGFR 変異陽性肺がんの耐性変異（T790M）にも有効な薬剤として Osimertinib が 2017 年に本邦でも承認され使用されるようになったが、その治療効果は、腫瘍内における T790M の比率が高いほうが良く、T790M 変異体の存在頻度が低い方が Osimertinib の治療奏功期間が短いことを発見し発表した（図 1、発表論文 9）。Osimertinib への耐性として C797S/T790M の重複変異が報告されている。その変異にも有効な薬剤は現在のところ存在しなかったが、我々はこの重複変異にも有効な薬剤を発見し、平成 29 年 3 月に中旬に発表した（図 2、

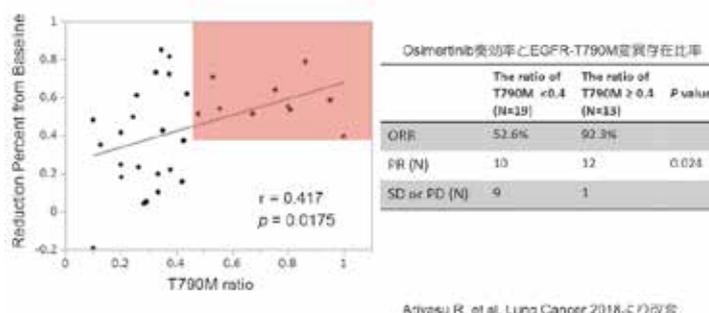


図 1. Osimertinib 治療前の患者における EGFR-T790M 変異と活性化変異の比が高いほど Osimertinib の奏功が良い傾向が認められた。

Brigatinibと抗EGFR抗体による多剤耐性EGFR-C797S/T790Mの克服

発表論文 1)。この成果は高い注目を浴びており、現在耐性克服療法の臨床応用に向けて、臨床試験のための準備を行っている。また、NTRK1 融合遺伝子陽性がんについては、新規獲得耐性変異を、ENU mutagenesis screening と、培養細胞株を用いた検討により同定し、更に異なる標的の阻害薬が耐性変異に対して有効であることを発見し、論文として発表した（発表論文 2）。ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいては、様々な第 1、第 2 世代 ALK 阻害薬耐性機構を発見するなどし、2 本の総説論文として発表した。さらに、共同研究により、上皮間葉転換（EMT）が治療抵抗性に関わることを見出し発表している。また、あらゆる第 1、2 世代耐性変異にも有効とされる第 3 世代 ALK 阻害薬 Lorlatinib にも弱点があり、2 つ以上の変異が重なるまたは、L1256F 変異が生じることにより耐性が生じること、それら Lorlatinib 耐性の一部は逆に第 1、2 世代 ALK 阻害薬に高感受性を示すようになること、

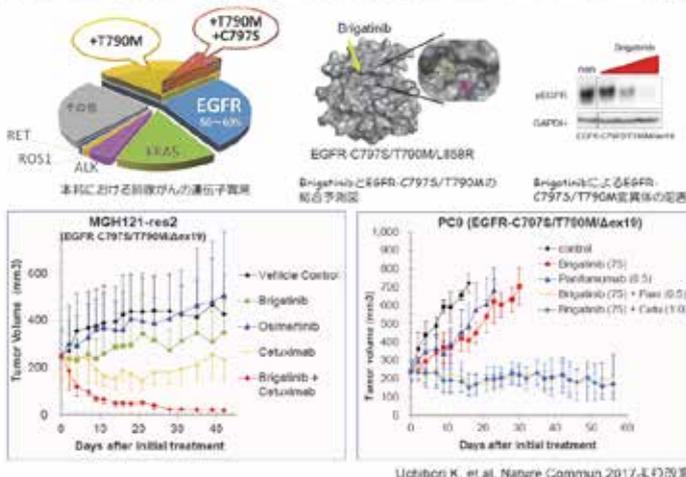


図 2. Osimertinib 耐性の EGFR-C797S/T790M 変異にも有効な治療薬として、Brigatinib と抗 EGFR 抗体の併用療法が有効であることを発見。

更に異なる標的の阻害薬が耐性変異に対して有効であることを発見し、論文として発表した（発表論文 2）。ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいては、様々な第 1、第 2 世代 ALK 阻害薬耐性機構を発見するなどし、2 本の総説論文として発表した。さらに、共同研究により、上皮間葉転換（EMT）が治療抵抗性に関わることを見出し発表している。また、あらゆる第 1、2 世代耐性変異にも有効とされる第 3 世代 ALK 阻害薬 Lorlatinib にも弱点があり、2 つ以上の変異が重なるまたは、L1256F 変異が生じることにより耐性が生じること、それら Lorlatinib 耐性の一部は逆に第 1、2 世代 ALK 阻害薬に高感受性を示すようになること、

などを発見し発表した(図3, 発表論文22)。

また、がんと間質細胞を介した耐性については、ALK陽性肺癌由来細胞株をマウスに移植したゼノグラフトモデルをALK阻害薬により治療実験を継続することで耐性腫瘍の樹立に成功した。樹立した腫瘍から培養細胞株の樹立を試みたところ、がんに入り込んでいた間質細胞があることで耐性を獲得していること、間質細胞は、直接接

していなくてもよく、培養上清に分泌する物質によりがん細胞に耐性を付与していることが明らかにできた。この耐性に関わる分子機構は思った以上に複雑であり、現在も引き続きその解析を引き続き実施し、論文化を目指している。これらの解析を通じ、肺癌における未同定の分子標的薬耐性メカニズムを明らかにするとともに、がんと間質などとの相互作用解析を介した治療抵抗性機構の解明が可能になると考えられる。なお、この間質との相互作用に関連して、肺扁平上皮癌において間質に存在する血小板が、腫瘍細胞との相互作用により様々な増殖因子やサイトカインなどを放出することで、腫瘍の増大や悪性形質に関わることも発見し報告している(発表論文13, 14)

がん免疫チェックポイント阻害薬に対する獲得耐性機構の解析と、その克服法の解析

肺癌の新たな治療の1つとして、免疫チェックポイント阻害薬が幅広く用いられるようになってきており、約2割から3割程度の患者においては顕著な治療効果が見られるが、やがて耐性が生じることが散見されるようになってきた。そこで、免疫チェックポイント阻害薬の中でも抗PD-L1抗体に耐性となった症例の治療後の検体と、治療前の検体からRNAseqにより遺伝子変異と発現を比較したところ、ALS(筋萎縮性側索硬化症)原因遺伝子の遺伝子の1つとして知られているRNA結合たんぱく質TARDBPに変異が見つかり、さらに、抗PD-L1抗体の標的であるPD-L1が異常スプライシングにより膜貫通領域が欠損するバリエントを発現していることを発見した。このバリエントは、培養細胞系においてもin vivo実験のいずれにおいても確かに抗PD-L1抗体への耐性に関与することが確認された。分泌型バリエントによる耐性の一般性についても、その他の耐性症例を用いた解析を進めており、少なくともこれまでに抗PD-L1抗体耐性の4症例(17症例中)に確認された。今後さらに使用が増えてくると考えられる免疫チェックポイント阻害薬への耐性機構の一端を解明し、この分泌型バリエントによる耐性の克服法発見にも成功した(発表論文24)。

IV 考察

本研究において、肺癌を中心に患者臨床検体より分子標的薬治療前、および治療耐性後の検体を、がん研究会有明病院を中心に新鮮な状態で頂戴し、数多くの貴重な培養細胞

ALK重複変異による耐性とその克服薬候補の発見

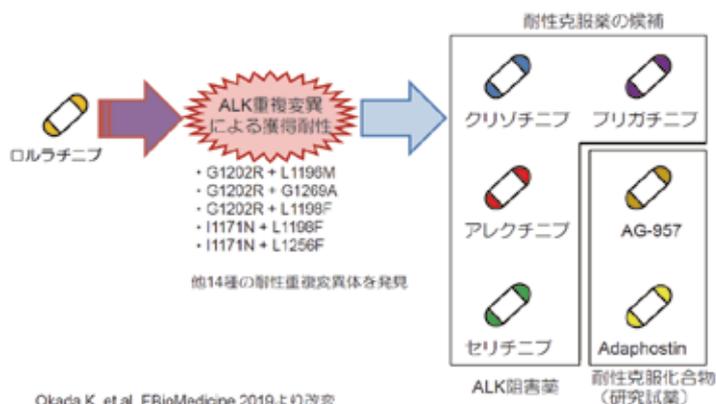


図3. 第3世代ALK阻害薬Lorlatinibへの耐性機構として、重複変異を14種同定し、その半数以上に対し、有効な薬剤候補を発見。

株樹立に成功した。倫理審査委員会にて承認済みのプロトコールに基づき同意を頂いた数多くの患者様より時には何度も検体を使用させていただくことができたおかげで、数々のがん分子標的療法耐性機構とその克服法候補の同定に成功した。しかしながら、いまだメカニズムが解明できていない症例は、約 1/4 から 1/3 程度は存在している。本研究において樹立した細胞株等を用いてマルチ Omics 解析や、モダリティの異なる解析を組み合わせることで、さらにはゲノムワイドなスクリーニング（遺伝子発現またはノックアウト）などを駆使することで、将来の研究において更なる耐性機構の発見と耐性克服法の発見につながることを期待される。また標準治療の 1 選択肢として急速に広がりつつあるがん免疫チェックポイント阻害療法についても、その耐性が徐々に明らかにされてきていることから、本研究を通じて新たに発見した分泌型 PD-L1 を介した耐性をはじめとして、さまざまな耐性機構と、その克服法の発見に向けた取り組みが重要である。

また、耐性が生じるためには、どれほど顕著な腫瘍縮小が認められた場合にも残存する腫瘍があり、それがやがて獲得耐性腫瘍へと「進化」として考えることができる。この治療残存腫瘍を培養細胞だけでなく、腫瘍内微小環境をも考慮に入れるための *in vivo* モデルでの検討、さらには手術前に薬物療法を受けた後の手術検体の解析から治療残存腫瘍の性状を明らかにできる可能性がある。

V 研究成果の発表(* corresponding author)

1. Uchibori K, Inase N, Araki M, Kamada M, Sato S, Okuno Y, Fujita N, *Katayama R, Overcoming osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Commun.*, 2017, 8:14768.
2. Fuse MJ, Okada K, Oh-hara T, Sato S, Ogura H, Fujita N, Katayama R Therapeutic strategies and resistant mechanisms to NTRK inhibitors in NTRK1 rearranged cancers. *Mol Cancer Ther.* 2017, October 1;16 (10):2130-2143.
3. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, Katayama R, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017, 16(4):752-762.
4. *Katayama R. Therapeutic strategies and Mechanisms of drug resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)-rearranged lung cancer. (review) *Pharmacology & Therapeutics*, 2017
5. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, Dagogo-Jack I, Mino-Kenudson M, Engelman JA, Shaw AT. et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016, 6(10):1118-1133.
6. Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, Takami M, Sato S, Nishio M, Okumura S, *Fujita N. A critical role of platelet TGF- β release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis. *Scientific Rep.* 2017, 7, 42186.

7. *Takemoto A, Kawashima SA, Li JJ, Jeffery L, Yamatsugu K, Elemento O, Nurse P., Nuclear envelope expansion is crucial for proper chromosomal segregation during a closed mitosis. *Journal of Cell Science*, 129, 1250-1259, 2016. (* corresponding author)
8. Yamamoto N, Fujiwara Y, Tamura K, Kondo S, Iwasa S, Tanabe Y, Horiike A, Yanagitani N, Kitazono S, Inatani M, Tanaka J, Nishio M. Phase Ia/Ib study of the pan-class I PI3K inhibitor pictilisib (GDC-0941) administered as a single agent in Japanese patients with solid tumors and in combination in Japanese patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2017, 35(1):37-46.
9. Ariyasu R, Nishikawa S, Uchibori K, Oh-Hara T, Yoshizawa T, Dotsu Y, Koyama J, Saiki M, Sonoda T, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Inase N, Kasahara K, Nishio M, *Katayama R. High ratio of T790M to EGFR activating mutations correlate with the osimertinib response in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2018 Mar;117:1-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.12.018.
10. Ogura, H., Nagatake-Kobayashi, Y., Adachi, J., Tomonaga, T., Fujita, N., and Katayama, R. TKI-addicted ROS1-rearranged cells are destined to survival or death by the intensity of ROS1 kinase activity. *Sci Rep* 2017, 7, 5519. doi: 10.1038/s41598-017-05736-9.
11. Katayama R. Drug resistance in anaplastic lymphoma kinase-rearranged lung cancer. *Cancer Sci*. 2018 Mar;109(3):572-580. doi: 10.1111/cas.13504.
12. Katayama R. Therapeutic strategies and mechanisms of drug resistance in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2017 Sep;177:1-8. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.015.
13. Miyata K, Takemoto A, Okumura S, Nishio M, and Fujita N. Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation. *Scientific Rep*. 2017, 7 (1): 4059.
14. Takemoto, A., Miyata, K., Fujita, N. Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev.*, 2017, 36 (2): 225-234.
15. Krishnan, H., Rayes, J., Miyashita, T., Ishii, G., Retzbach, E.P., Sheehan, S.A., Takemoto, A., Chang, Y.W., Yoneda, K., Asai, J., Jensen, L., Chalise, L., Natsume, A., Goldberg, G.S. Podoplanin - an emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci.*, 2018, 109:1292-1299.
16. Saiki M, Ohyanagi F, Ariyasu R, Koyama J, Sonoda T, Nishikawa S, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ninomiya H, Ishikawa Y, Nishio M. Dramatic response to alectinib in inflammatory myofibroblastic tumor with anaplastic lymphoma kinase fusion gene. *Jpn J Clin Oncol*. 2017 Dec 1;47(12):1189-1192.
17. Ariyasu R, Horiike A, Yoshizawa T, Dotsu Y, Koyama J, Saiki M, Sonoda T,

- Nishikawa S, Kitazono S, Yanagitani N, Nishio M. Adrenal Insufficiency Related to Anti-Programmed Death-1 Therapy. *Anticancer Res.* 2017 Aug;37(8):4229-4232.
18. Ariyasu R, Horiike A, Koyama J, Saiki M, Sonoda T, Kawashima Y, Takano N, Oguri T, Nishikawa S, Kitazono S, Yanagitani N, Ohyanagi F, Nishio M. Efficacy of bevacizumab and erlotinib combination for leptomeningeal carcinomatosis after failure of erlotinib. *Anticancer Drugs.* 2017 Jun;28(5):565-567.
 19. Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y, Ninomiya H, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ohyanagi F, Matsuura Y, Nakao M, Mun M, Okumura S, Inase N, Nishio M, Motoi N, Ishikawa Y. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2017 Sep;18(5):527-534. doi: 10.1016/j.clcc.2016.12.002.
 20. Uchibori K, Inase N, Nishio M, Fujita N, *Katayama R. Identification of Mutation Accumulation as Resistance Mechanism Emerging in First-Line Osimertinib Treatment. *J Thorac Oncol.* 2018;13(7):915-925. doi: 10.1016/j.jtho.2018.04.005.
 21. Gong B, Oh-Hara T, Fujita N, *Katayama R. 3D culture system containing gellan gum restores oncogene dependence in ROS1 rearrangements non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun 22;501(2):527-533. doi:10.1016/j.bbrc.2018.05.031.
 22. Okada K., Araki M., Sakashita T., Ma B., Kanada R., Yanagitani N., Horiike A., Koike S., Oh-Hara T., Watanabe K., Tamai K., Maemondo M., Nishio M., Ishikawa T., Okuno Y., Fujita N. and *Katayama R. Prediction of ALK mutations mediating ALK-TKIs resistance and drug re-purposing to overcome the resistance. *EBioMedicine*, 2019; 41:105-119, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.01.019
 23. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Nakagawa T, Taniguchi H, Suzuki T, Yamada T, Nishihara H, Ninomiya H, Ishikawa Y, Baba S, Takeuchi K, Horiike A, Yanagitani N, Nishio M, Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. *Cancer Res.* 2019;79:1658-1670. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2052
 24. Gong B., Kiyotani K., Sakata S., Nagano S., Kumehara S., Baba S., Besse B., Yanagitani N., Friboulet L., Nishio M., Takeuchi K., Kawamoto H., Fujita N., *Katayama, R. Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. *J Exp Med.* 2019;216(4):982-1000. doi:10.1084/jem.20180870.
 25. Ukaji T, Takemoto A, Katayama R, Takeuchi K, and *Fujita N. A safety study of newly generated anti-podoplanin-neutralizing antibody in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Oncotarget*, 2018: 9, 33322-33336. doi: 10.18632/oncotarget.26055

26. Kawashima Y, Nishikawa S, Ninomiya H, Yoshida R, Takano N, Oguri T, Kitazono S, Yanagitani N, Horiike A, Ohyanagi F, Ishikawa Y, Nishio M. Lung Adenocarcinoma with Lynch Syndrome and the Response to Nivolumab. *Intern Med.* 2019;58(10):1479-1484. doi: 10.2169/internalmedicine.1673-18.
27. Takano N, Ariyasu R, Koyama J, Sonoda T, Saiki M, Kawashima Y, Oguri T, Hisakane K, Uchibori K, Nishikawa S, Kitazono S, Yanagitani N, Ohyanagi F, Horiike A, Gemma A, Nishio M. Improvement in the survival of patients with stage IV non-small-cell lung cancer: Experience in a single institutional 1995-2017. *Lung Cancer.* 2019 May;131:69-77. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.03.008.
28. Shimomura A, Yamamoto N, Kondo S, Fujiwara Y, Suzuki S, Yanagitani N, Horiike A, Kitazono S, Ohyanagi F, Doi T, Kuboki Y, Kawazoe A, Shitara K, Ohno I, Banerji U, Sundar R, Ohkubo S, Calleja EM, Nishio M. First-in-Human Phase I Study of an Oral HSP90 Inhibitor, TAS-116, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Mol Cancer Ther.* 2019 Mar;18(3):531-540. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0831.
29. Saiki M, Kitazono S, Yoshizawa T, Dotsu Y, Ariyasu R, Koyama J, Sonoda T, Uchibori K, Nishikawa S, Yanagitani N, Horiike A, Ohyanagi F, Oikado K, Ninomiya H, Takeuchi K, Ishikawa Y, Nishio M. Characterization of Computed Tomography Imaging of Rearranged During Transfection-rearranged Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2018 Sep;19(5):435-440.e1. doi: 10.1016/j.clcc.2018.04.006.

心不全の筋萎縮、サルコペニアとその対策としての
新規リハビリ法に関する臨牀的ならびに基礎的研究

《研究の概要》

心不全では筋萎縮(サルコペニア)を合併し、QOL、生命予後の重大な脅威となる。その成因は、心不全や高齢者などでは、低栄養、不活動などによる筋蛋白質同化の抑制、さらに、TNF α 等の炎症性サイトカインによる筋蛋白質合成低下と筋蛋白質のユビキチン化を触媒する骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1、atrogen-1 などの筋タンパク異化の促進などにより、筋萎縮、サルコペニアが発症する。サルコペニアでは身体活動低下による内臓肥満も見られ、とくに心臓周囲の脂肪由来のアディポカインが直接、冠動脈、心筋に作用し、動脈硬化、心筋障害や心臓リモデリングをきたす可能性も報告されている。一方、身体活動は骨格筋から生理活性因子マイオカインを放出し、筋肥大、脂肪分解等をもたらすが、逆に、ミオスタチンなどの発現亢進では骨格筋の筋萎縮と脂肪蓄積をきたすといわれている。また、不全心筋ではミオスタチンの発現の亢進と筋萎縮との関連も報告されており、骨格筋、心筋と脂肪の 3 者の相互作用や干渉が発生する。このように、サルコペニアと心不全との関連は複雑で、詳細な機構はいまだ不明である。最近、さまざまな疾患に関するバイオマーカーに関する研究が報告され、exosome 中のマイクロ RNA (miR)も標的 mRNA の転写抑制作用から各種病態と関連することが報告されている。miR は血液中に分泌され、タンパクの転写・翻訳を制御するが、骨格筋や心筋可塑性のバイオマーカーとして臨床診断上も有望である。我々は、心不全を含む心大血管疾患患者、さらに、心大血管手術患者の手術時に血液ならびに脂肪組織(一部の例で心筋)を採取し、病態解析とサイトカイン類と分泌型 miR 類の解析で心不全の筋萎縮機序の解明と治療開発を目指す。一方、心不全患者の筋萎縮、サルコペニア改善において有酸素運動を基本とした心臓リハビリが実施されているが、今後、患者の高齢化により従来のリハビリが困難な症例が急増し、新たなリハビリ法の開発が急務である。我々はサルコペニア対策として新規リハビリ法の血流制限下トレーニング(いわゆる加圧トレーニング)と温熱刺激を利用した和温療法に注目した。筋肉は、筋タンパク質の同化と異化の平衡により維持され、筋力トレーニングによって同化の促進が異化の速度を上回らなければ、筋肥大を引き起こすことは難しい。高強度の筋力トレーニングは、筋タンパク質の出納バランスをプラスへ傾け筋肥大を引き起こすが、心不全や高齢者などでは、筋タンパク合成が減少、さらに、炎症による筋タンパク分解などにより出納バランスがマイナスに傾き筋萎縮を来たす。筋蛋白合成、筋肥大のメカニズムとして、もっとも重要なのが mTOR を含む細胞内シグナル伝達経路である。血流制限下トレーニングでは、低酸素負荷によるストレス応答遺伝子の転写と翻訳が亢進する。また、温熱刺激では、Heat shock protein (HSP)等の多くの遺伝子の転写と翻訳が増加し、HSP には新生ポリペプチドの分子シャペロン機能があり、タンパク合成とその編集機構が促進され、筋萎縮の予防効果が期待される。そこで、新たなリハビリ法として、低酸素刺激を応用した血流制限下トレーニングと温熱刺激を応用した和温療法の効果を検証するとともに、基礎実験を加えることにより、臨床データによって得られた知見を、さらに、科学的に実証することを目的とした新しい研究である。さらに、本研究開発目標は、心不全の筋萎縮、サルコペニア対策として、アディポカイン、サイトカイン、マイオカイン、分泌型マイクロ RNA に注目して、その病態解明と関連バイオマーカーを明らかにすることもある。こうした臨床ならびに基礎的研究により、血流制限下トレーニングおよび温熱刺激の有用性ならびに機序の解明がなされれば、サルコペニア予防、対策において、今後のリハビリ分野に大きく貢献すると思われる。本研究は、近未来の超高齢社会においても、新しいリハビリ法の今後の臨床展開につながる可能性もある。

共同研究者

小尾 正太郎	獨協医科大学 心臓・血管内科講師	温熱刺激の基礎的研究
柴崎 郁子	獨協医科大学 心臓・血管外科准教授	臨床的研究、検体採取
安田 智洋	聖隷クリストファー大学 看護学部教授	臨床的研究、骨格筋評価
狩野 豊	電機通信大学 大学院情報理工学研究科教授	基礎的研究
小栗 岳	東京大学医学部 循環器内科助教	基礎的研究

研究報告

I 研究目的

わが国では高齢化が進み、80歳以上の高齢者の増加ならびに心不全の増加が目立っている。今後、超高齢化社会を迎え、ますます、その傾向は強まることが予測される。慢性心不全患者は、2030年には130万人を超えると言われている。心不全では筋萎縮(サルコペニア)を合併し、QOL、生命予後の重大な脅威となる。その成因は、心不全や高齢者などでは、低栄養、不活動などによる筋タンパク質同化の抑制、さらに、TNF α 等の炎症性サイトカインによる筋蛋白合成低下と筋タンパク質のユビキチン化を触媒する骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1、atrogen-1などの筋タンパク質異化の促進などにより筋萎縮、サルコペニアが発症する。サルコペニアでは身体活動低下による内臓肥満も見られ、とくに、心臓周囲の脂肪由来のアディポカインが直接、冠動脈、心筋に作用し、動脈硬化、心筋障害や心臓リモデリングをきたす可能性も報告されている。一方、身体活動は骨格筋から生理活性因子マイオカインを放出し、筋肥大、脂肪分解等をもたらすが、逆に、ミオスタチンなどの発現亢進では骨格筋の筋萎縮と脂肪蓄積をきたすといわれている。さらに、不全心筋ではミオスタチンの発現の亢進と筋萎縮との関連も報告されており、骨格筋、心筋と脂肪組織の3者の相互作用や干渉が発生する。このように、サルコペニアと心不全の関連は複雑で、詳細な機構はいまだ不明である。最近、さまざまな疾患に関するバイオマーカーに関する研究が報告され、exosome中のマイクロRNA(miR)も標的mRNAの転写抑制作用から各種病態と関連することが報告されている。miRは血液中に分泌され、タンパクの転写・翻訳を制御するが、骨格筋や心筋可塑性のバイオマーカーとしても臨床診断上有望である。我々は、心不全を含む心大血管疾患患者ならびに心大血管手術患者の手術時に血液及び脂肪組織(一部の例で心筋)を採取し、病態解析とサイトカイン類と分泌型miR類の解析で心不全の筋萎縮機序の解明と治療開発を目指す。一方、心不全患者の筋萎縮、サルコペニア改善に心臓リハビリが実施されているが、今後、患者の高齢化により従来のリハビリが困難な症例が急増し、新たなリハビリ法の開発が急務である。我々はサルコペニア対策として新規リハビリ法の血流制限下トレーニング(いわゆる加圧トレーニング)と温熱刺激を利用した和温療法に注目した。筋肉は、筋タンパク質の同化と異化の平衡により維持され、筋力トレーニングによって同化の促進が異化の速度を上回らなければ、筋肥大を引き起こすことは難しい。高強度の筋力トレーニングは、筋タンパク質の出納バランスをプラスへ傾け筋肥大を引き起こすが、心不全や高齢者などでは、筋タンパク合成が減少、さらに、炎症による筋タンパク質分解などにより出納バランスがマイナスに傾き筋萎縮を来たす。筋蛋白合成、筋肥大のメカニズムとして、もっとも重要なのが、mammalian target of rapamycin (mTOR)を含む細胞内シグナル伝達経路である。血流制限下トレーニングでは、低酸素負荷によストレス応答遺伝子の転写と翻訳が亢進する。さらに、温熱刺激では、Heat shock protein (HSP)等の多くの遺伝子の転写と翻訳が増加し、HSPには新生ポリペプチドの分子シャペロン機能があり、タンパク合成とその編集機構が促進さ

れ、筋萎縮の予防効果が期待される。そこで、新たなリハビリ法として、低酸素刺激を応用した血流制限下トレーニングと温熱刺激を応用した和温療法の効果を検証するとともに、基礎実験を加えることにより、臨床データによって得られた知見を、さらに、科学的に実証する新しい研究である。さらに、本研究開発目標は、心不全の筋萎縮、サルコペニア対策として、アディポカイン、サイトカイン、マイオカイン、分泌型マイクロ RNA に注目して、その病態解明と関連バイオマーカーを明らかにすることもある。こうした臨床及び基礎的研究により、血流制限下トレーニングおよび温熱刺激の有用性ならびに機序の解明がなされれば、サルコペニア予防、対策において、今後のリハビリ分野に大きく貢献すると思われる。本研究は、近未来の超高齢社会においても、新しいリハビリ法の今後の臨床展開につながる可能性もある。

II 研究計画及び材料と方法

以下に示すように、(I) 臨床研究 (II) 基礎研究に分けて検討した。

(I) 臨床研究 ①心不全の筋萎縮、サルコペニアに関する臨床的検討 (中島、柴崎、安田)

当院ハートセンターに入院中の患者を対象に2015年10月より獨協医科大学倫理委員会の承認後に、心大血管疾患(CVD)入院患者490名、男性(n=318、68.4±13歳)及び女性(n=172、75.0±10.8歳)に対して、身体機能評価(握力、膝伸展筋力など)、筋形態学的評価(Inbodyを用いたBioelectrical impedance analysis (BIA)法による筋量測定ならびに筋エコーによる筋厚測定)などを実施し、筋萎縮、サルコペニアならびにサルコペニア肥満の頻度を詳細に検討した。サルコペニアの診断は、BIA法によるSkeletal muscle index (SMI)で判定した筋肉量と身体機能(握力、歩行速度)の評価により行った。さらに、身体機能の評価に、簡易身体能力バッテリー(short physical performance battery, SPPB)の総点数を規定する因子(握力、膝伸展筋力、栄養指標のCONUT scoreなど)について回帰分析を行った。心大血管疾患患者490例中、心大血管手術患者170例、心不全160例、虚血心疾患106例などであり、心不全が30%含まれていた。また、サルコペニアの有無と血液所見との関連を回帰分析により検討した。心大血管疾患手術患者においても、身体機能評価、筋形態学的評価などを実施するとともに、筋萎縮、サルコペニア、さらに、心機能評価を心エコーにより詳細に検討した。また、CT scanによる心外膜脂肪量、内臓脂肪量、皮下脂肪量も測定した。手術当日、血液と脂肪組織(心外膜脂肪及び皮下脂肪、一部の症例では左心耳、左心室)を手術時にサンプリングし、各種サイトカイン、マイオカイン、アディポカインなどをLuminexあるいはELISAで測定するとともに、脂肪組織、心筋組織からtotal RNA、蛋白を抽出し、サイトカイン、アディポカインなどの発現を検討した。さらに、この保存中の血液からexosome中のマイクロRNA(miR)を抽出してマイクロRNAの定量を行った。

臨床研究 ② 血流制限下トレーニングおよび温熱刺激の筋肥大効果の検討 (中島、安田、柴崎)

年齢により筋量ならびに身体活動の低下するものを狭義のサルコペニアと呼んでいる。まず、高齢女性において、大腿筋サイズと血管機能(CAVI、ABI)に対する血流制限(BFR)を用いた低強度トレーニングの効果を検討した。高齢者を3つのグループに分けた。低強度の弾性バンドBFRトレーニング(BFR-Tr、n=10)、中強度から高強度の弾性バンドトレーニング(MH-Tr、n=10)およびトレーニングなし(Ctrl、n=10)群である。BFR-TrとMH-Trグループは、弾性バンドを使用し、2回/週で12週間、スクワットと膝の伸展運動を行った。BFR-Tr運動中、被験者は両下腿の近位部に加圧ベルトを着用した。トレーニングの前およびトレーニング終了後3~5日後に、MRI測定、膝伸展筋力、CAVI、

ABIなどの検査を実施した。さらに、心大血管疾患手術患者 10 名に対して、術後早期から血流制限下での低強度筋力トレーニングを 2 回/週、3 か月間実施して、身体機能評価、BIA 法による筋量ならびに筋エコーによる筋厚に及ぼす効果につき検討した。さらに、サルコペニアを有する心不全患者に対しても、和温療法、血流制限下トレーニングの効果についても予備的に検討を開始した。

(II) 基礎研究

1. 温熱刺激の骨格筋細胞を用いた *in vitro* 研究 (小尾)

骨格筋からはさまざまなマイオカインが放出される。IL-6 は、骨格筋細胞からも放出され、運動、熱、カテコールアミン、活性酸素種および炎症によって誘発される。また、IL-6 は、オートクライン、パラクライン的に骨格筋に作用し、増殖や筋肥大を誘導することが報告されている。しかし、骨格筋細胞からの IL-6 の放出を誘導する分子的機構についてはいまだ不明である。TRPV1-4 などの熱感受性 Transient receptor potential channel (TRP) タンパク質は、細胞機能において重要な役割を果たしているが、この研究では、TRPV1 が熱を感知し、核にシグナルを伝達し、IL-6 を産生すると仮定して以下の検討を行った。C2C12 筋芽細胞を 37~42°C の温度に暴露し、温熱刺激の IL-6 分泌における活性化機構につき検討した。蛋白の発現は Western Blot で、遺伝子の発現はリアルタイム RT-PCR で検討した。さらに、温熱刺激の詳細な筋肥大効果の分子的機序ならびに、筋管形成、骨格筋芽細胞の分化に及ぼす効果、その機序に関しても検討した。

2. 温熱刺激に関するマウスを用いた *in vivo* の基礎的研究 (狩野、中島)

In vivo で温熱刺激を与えられる装置を作成して、Wistar 系雄性ラットを用いて温熱刺激の筋肥大効果の温度条件について、直腸体温、筋組織温度を測定し検討した。さらに、温熱刺激の筋肥大効果、筋線維のタイプ、遺伝子さらにタンパク発現に及ぼす効果も検討した。なお、5 検体に関しては、Microarray Data Analysis により検討した。

3. 熱ストレスおよび筋収縮が筋細胞質内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響 (狩野)

骨格筋における細胞内 Ca^{2+} は、筋肥大シグナル因子としての役割を担っている。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は細胞膜、ミトコンドリア、筋小胞体 (SR) によって調節されている。これらの 3 つのシステムのうち、 $[Ca^{2+}]_i$ 調節におけるミトコンドリアの重要性は骨格筋において不明な点が多い。そこで、ミトコンドリアによる Ca^{2+} 緩衝能力は安静時および収縮後の $[Ca^{2+}]_i$ を決定する主要な要因であるという仮説を検証した。実験にはペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子-1 α (PGC-1 α) の過剰発現 (ミトコンドリア増加モデル) および野生型 (WT) マウスを用いた。次に、温熱刺激と筋収縮を組み合わせた慢性的な複合ストレスが骨格筋へ与える影響は不明である。そこで、筋収縮は、熱刺激による筋肥大の効果を抑制するという仮説を立て実験を実施した。Wistar 系雄性ラットの脊柱僧帽筋を麻酔下で露出させ、 Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬である Fura2-AM を導入した。ガラスホットプレート上に筋を保持し、表面筋温 40°C の熱ストレス負荷中の $[Ca^{2+}]_i$ を 20 分間測定した (熱ストレス群)。また、熱ストレス 10 分後に、筋温を維持した状態で 30 秒間の等尺性強収縮を負荷し、その後、筋温を 40°C に維持した (熱ストレス + 筋収縮群)。同様のプロトコールによる筋サンプルを作成し、Western Blot により TRPV1 のリン酸化などを測定した。

4. 血流制限モデルラットにおける低強度電気刺激の筋肥大効果ならびに分子的機序の検討 (中島、狩野、安田、小栗)

機械的ストレスは、筋タンパク合成を促進する重要な要因である。一方、血流制限下での運動では、低強度の負荷にもかかわらず、高強度に似た筋肉内代謝環境をきたし筋肥大を誘発することが報告さ

れている。本実験では、血流制限下でのラットの運動モデルを作成し、筋肉内の低酸素が、発揮張力レベル、筋タンパク合成と筋肥大、さらにその根底にある機構を決定するという仮説を明らかにすることである。Wistar ラットを用いて、血流制限はラットの大腿部にカフを装着して、カフ圧(0、60 または 80mmHg)で実施した。前脛骨筋への電気刺激による等尺性収縮(30Hz の低強度(LIES):最大張力の 50%)及び 100Hz の高強度(HIES):最大張力の 100%)を 1 分間隔で 4 セット(20, 15, 15, 15 回)負荷した。このときの筋肉内の酸素分圧を測定した。さらに、同じプロトコールで前脛骨筋を刺激し、3 時間後に前脛骨筋を採取し、mTOR シグナル伝達経路のリン酸化反応(mTOR, S6K1, S6 など)を Western blot により検討した。また、この LIES を、カフ圧 80 mmHg で 3 週間(3 回/週)続け、前脛骨筋の筋肉量および等尺性強度を訓練の前後で測定するとともに、筋線維の大きさを組織学的に評価した。さらに、骨格筋における代謝産物輸送タンパク質およびミトコンドリア関連タンパク質を含む各種蛋白質発現を Western Blot により測定した。

III 研究成果

臨床研究

(I) 臨床研究 ①

心大血管疾患入院患者(CVD)のサルコペニアに関する実態が明らかとなった (Yasuda et al., 2017. Sci Rep)。握力、歩行速度、SMI、大腿前面筋厚、下肢伸展筋力は年齢とともに低下が見られ、大腿前面筋厚は、SMI と男性($r=0.685$, $p<0.0001$)、女性($r=0.608$, $p<0.0001$)、全体($r=0.691$, $P<0.0001$)と有意な正の相関があった。SPPB 全体のスコア(男性 9.7 ± 2.7 、女性 8.2 ± 3.0)、身体機能評価(握力、膝伸展)、形態学的評価では、除脂肪体重、骨格筋量、SMI、大腿周囲計、大腿前面及び後面筋厚において、女性より男性でより大きかった。SMI による筋量評価(男性 $<7.0 \text{ kg/m}^2$ 、女性 $<5.7 \text{ kg/m}^2$)及び握力(男性 $<26 \text{ kg}$ 、女性 $<18 \text{ kg}$)あるいは歩行速度($<0.8 \text{ m/sec}$)で判定したサルコペニアの頻度は、男性は 27.8%、女性は 41.8%であった。その中で、サルコペニア肥満は、男性 15.9%、女性 27.5%に認め、女性の方が男性より多かった。ロジスティック回帰分析により、SPPB 全体のスコアを従属変数とすると大腿前面筋厚などが独立変数として抽出された。これらの臨床研究から、総 SPPB スコアは、CVD 患者のサルコペニアに関する機能的評価として有効な評価法であることが示された。さらに、大腿前面筋厚は、男性、女性にかかわらず、CVD 患者において身体能力を維持するのにきわめて重要と思われ、とくに下肢筋力が低下した心大血管疾患患者では筋力強化が必要と思われた。

次に、CVD 患者のサルコペニアとして心不全、CKD との関連が明らかとなった。血中 BNP 値は、握力と下肢伸展筋力と逆相関を認め、BNP とサルコペニアの頻度を比較すると、サルコペニアのあるものでは血中 BNP は有意に高かった。また、男性 ($n=238$) および女性 ($n=110$)において、CKD stage (eGFR で分類)との関連につき検討した。CKD stage 1 (正常も含む) 51 名、CKD stage 2 141 名、CKD stage 3 109 名、CKD stage 4-5 47 名である。CKD の stage と年齢には、男女とも明らかな有意差はみとめなかったが、握力、SMI、大腿前面筋厚は、男性では、CKD の stage により低下が見られた。男性におけるサルコペニアの有無に対する eGFR の ROC 曲線のカットオフ値は $53 \text{ mL/分/}1.73 \text{ m}^2$ であり、面積、感度、特異度はそれぞれ 66%、78%、54%であった。心大血管疾患入院患者において、CKD は軽度であってもサルコペニアの罹患率と密接に関連することが判明した。したがって、サルコペニアのリスクを評価し、早期の CKD 患者においてもそれを予防する必要があると思われた。

さらに、心大血管疾患手術患者における筋萎縮、サルコペニア評価と生化学・分子生物学的検討

を行った。握力、歩行速度、下肢膝伸展筋力は、SMI、エコー上の大腿前面筋厚と有意な相関を認め、サルコペニアは35%に認められた。また、血中BNP値は、握力と下肢伸展筋力と逆相関を認め、サルコペニアのあるものでは血中BNPは有意に高かった。さらに、保存している血液サンプル(129サンプル)からサイトカイン、アディポカイン、マイオカイン20種類をELISAあるいはLuminex assayにより測定した。現時点までの解析で、いくつかの結果が得られている。炎症性サイトカインである成長分化因子-15 (Growth/differentiation factor 15, GDF-15) の心大血管疾患手術患者の筋萎縮への関与が明らかとなった。GDF-15は、年齢、BNP、eGFRと有意な相関を認めるとともに、SMI、握力、大腿前面筋厚ときわめて有意な負の相関を認めた。多変量解析では、年齢、性別、BMIで補正しても、握力および大腿前面筋厚を規定する因子として、GDF-15が独立因子として抽出された(握力 $\beta = -0.237$, $p = 0.041$; 大腿前面筋厚 $\beta = -0.390$, $p = 0.004$)。また、サルコペニア患者では、非サルコペニア患者に比し、有意にGDF-15濃度は高かった。血中GDF-15濃度を規定する因子としては、eGFRが独立因子として抽出された($\beta = -0.597$, $p = 0.000$)。eGFR<60の血中GDF-15濃度のROC曲線のカットオフ値は1154 pg/mlであり、面積、感度、特異度はそれぞれ92%, 88%, 83%であった。血中GDF-1濃度は、心大血管疾患患者、とくに、CKD患者の筋萎縮、サルコペニアに関するきわめて有用なマーカーであると思われた(論文作成中)。

一方、レプチン、アディポネクチンは、エネルギー代謝および体組成の重要な調節因子であり、心血管リスク、心大血管疾患の病態と密接に関連している。レプチンは肥満、メタボリック症候群などの病態において心機能抑制、左心室(LV)リモデリングをきたし、一方、アディポネクチンは心血管保護作用をきたすと報告されている。しかし、相反する結果も報告されている。我々の検討では、血中アディポネクチン濃度は、血中BNPレベル($r=0.628$, $p=0.000$)と強い相関を認め、年齢、左心房径(LAD)、左房容積係数(LAVI)、E/e'の間にも有意な正の相関を認めた。一方、BMI、eGFR、中性脂肪、Hb、アルブミン、握力、SMI、大腿前面筋厚、体脂肪量、さらに、心外膜脂肪量(Kaneda et al., 2018 PLoS one)との間には負の相関がみられた。一方、血清レプチン濃度は、BNP($r=-0.300$, $p=0.002$)および握力と負の相関がある一方で、BMI($p=0.000$)、コレステロール、中性脂肪、アルブミン、左室駆出率(EF)、および体脂肪率、心外膜脂肪量と有意な正の相関を示した(Kaneda et al., 2018 PLoS one)。レプチンは、また、LAD、LVMI、およびLAVIを含む心エコーパラメータの間にはアディポネクチンと異なり負の相関がみられた。アディポネクチンの血中濃度は、炎症性サイトカインであるTNF α ($r=0.301$, $p=0.001$)、GDF-15、さらに、酸化ストレスマーカーであるdROMsと正の相関がみられた($r=0.294$, $p=0.004$)が、レプチンとは有意な相関は認めなかった。サルコペニアを予測するための血清アディポネクチン濃度のROC曲線のカットオフ値は4.9 μ g/mlであった。これらの結果は、CVD患者において、レプチンは筋消耗を伴わずに心臓リモデリングを減少させる心臓保護ホルモンであり、一方、アディポネクチンは、心不全患者の炎症、酸化ストレス、筋消耗および栄養不良を含む代謝障害に関与していると思われ、アディポネクチンはサルコペニアに関するきわめて有用なマーカーであると思われた(論文作成中)。

分泌型マイクロRNAと組織中のmiRNAとの発現量との関連につき、miR-21に関して検討した。心房の線維化は、心房のリモデリングと心房細動の発生に重要な役割を演じている。2次元スペクトルトラッキング(2DS)法によって測定される左房ストレイン(LAS)は、左房(LA)の線維化の程度を予測するのに有用であることが報告されている。一方、miR-21は心臓の線維化を調節しているマイクロRNAとして知られている。そこで、LASと心房の線維化及びmiR-21の発現との関連につき検討した。

心臓弁置換術、冠動脈バイパス術などの手術前 117 人の患者（心房細動 36 例、洞調律 81 例、平均年齢 69.7 歳、男性 69 例）において、通常的心エコー検査および 2DS 法を実施した。また、手術中左心耳から心臓組織を摘出し得た 39 例において、コラーゲン 1 型 mRNA および miR-21 の発現を RT-PCR によって分析した。LAS は、左房径(LAD)、E/e', 左心房容積指数(LAVI) と有意な負の相関を認めた。また、洞調律群と比較して、LAS は心房細動群で有意に低値であり、LAD, LAVI は高値であった。LAS は、心房のコラーゲン 1 型 ($r = -0.418, p = 0.015$) および miR-21 ($r = 0.471, P = 0.004$) の発現量と有意な負の相関を認めたが、LAD、LAVI とは明らかな相関は認められなかった。さらに、洞調律患者(18 例)においても同様の所見が認められた。多変量解析において、LAS は、年齢、性別、BMI で補正しても、miR-21 ($\beta = -0.554, p=0.004$)、コラーゲン 1 型($\beta = -0.736, p = 0.005$)の発現量と独立した予測因子であった。一方、LAD、LAVI とは有意な関連は認めなかった。心大血管疾患患者において、左房ストレインは、心房のコラーゲン、miR-21 の発現と密接に関連し、心房リモデリング、心房の線維化、さらには心房細動の発症を予測するマーカーとしてきわめて有用であると思われた。なお、血液 exosome 中の miR-21 を測定したが、心房の線維化のマーカーとしての有用性については、今後の検討が必要と思われた。

さらに、心大血管疾患患者のサルコペニアと分泌型マイクロ RNA (miR) に関しては、検討を継続している。

臨床研究 ②

高齢者の血流制限下トレーニングは、大腿四頭筋 CSA (6.9%) および膝伸展 MVIC (13.7%) は、BFR-Tr 群で増加したが、MH-Tr および Ctrl 群では増加しなかった。c-SBP、c-Alx、CAVI、および ABI に関しては、トレーニング前後で変化は見られなかった。通常のエラスティックバンドを用いた血流制限下トレーニングは最大筋力と大腿筋 CSA を増加させるが、血管機能を低下させないことが立証され、有用性ならびに安全性が示された (Yasuda et al., 2016 Oncotarget)。また、心大血管疾患手術患者 10 名に対して、術後早期から血流制限下での低強度筋力トレーニングは、安全に筋量を増加することが明らかとなった。さらに、サルコペニアを有する心不全患者に対しても、温熱刺激 (和温療法)、血流制限下トレーニングの効果についても筋肥大に関する研究が継続している。なお、和温療法では 60°C 15 分では、深部体温が 0.5~1.0°C 上昇がみられた。

II) 基礎研究

1. 温熱刺激の骨格筋細胞を用いた in vitro 研究

マウス筋芽細胞を 37°C~42°C の温度に 2 時間暴露すると IL-6 の mRNA 発現は温度依存的に増加した。熱刺激は、筋芽細胞中の IL-6 分泌も増加させた。Fura-2 蛍光二波長励起法では、熱刺激は細胞内カルシウムを温度依存的に増加させ、TRPV1 アンタゴニスト及び TRPV1 の siRNA によるノックダウンはそれらを減少させたが、TRPV1 アゴニストのカプサイシンおよび NADA は、細胞内カルシウム流入および IL-6 mRNA 発現を増加させた (Obi et al., 2017 J Appl Physiol)。TRPV2,3 および 4 アゴニストは、細胞内カルシウムを変化させなかった。阻害剤を用いた Western blot により、熱により TRPV1 のリン酸化レベルが上昇し、続いて PKC および CREB が増加することが示された。

マウス筋芽細胞を 42°C に 30 分以上さらすと、プロテインキナーゼ C (PKC) と熱ショック因子 1 (HSF1) のリン酸化レベルおよび HSP70 の mRNA とタンパク発現レベルは増加した。TRPV1、カルモジュリン、PKC、および HSF1 の阻害剤ならびに TRPV1 の siRNA は、これらの熱応答を減少させた。さらに、HSF1 の下流のシグナルに関して検討した。細胞に 42°C の温熱刺激を 2 時間負荷して 37°C

に戻した直後、1, 2, 5 時間後の HSP90 (heat shock protein 90)、HSP70、HSP27 の蛋白発現を検討すると、いずれの HSP も温熱刺激により蛋白発現が増大した。また TRPV1 のノックダウンでは HSP70 の温熱刺激による応答が消失した。次に、蛋白の合成に関与する Akt/mTOR/4E-BP1 及び S6K1 のシグナルに関して検討した。細胞に 42°C の温熱刺激を 2 時間負荷して 37°C に戻した直後、1, 2, 5 時間後のリン酸化レベルを検討すると、いずれも温熱刺激により増大した。一方、筋蛋白分解に関与する FoxO3 のリン酸化は温熱刺激で変化しなかった。TRPV1 の発現をノックダウンすると、Akt/mTOR/4E-BP1 及び S6K1 の温度によるリン酸化増大が抑制された。最後に、温熱刺激が骨格筋の分化マーカーである MEF2D、MRF4、Myf5、MyoD1 の蛋白の発現に及ぼす効果について検討した。細胞に 42°C の温熱刺激を 2 時間負荷して 37°C に戻した直後、1, 2, 5 時間後の蛋白発現量を検討すると、いずれの骨格筋分化マーカーの蛋白発現量が増大した。TRPV1 の発現をノックダウンすると、いずれの蛋白発現も温度に応答しなくなった。さらに、熱刺激は筋管形成も増加させ、TRPV1 をノックダウンすると熱によるこれらのタンパク質の増加と筋管形成が減少した (Obi et al., 2019 FEBS Open Bio)。

2. 温熱刺激に関するラットを用いた *in vivo* の基礎的研究

43°C 1 時間の温熱刺激 3 週間では死亡するラットもみられたが、42°C 1 時間では有意な前脛骨筋の肥大が認められた。この温度条件で 60 分間温熱刺激を与えるとラットの直腸温及び骨格筋温度は約 40°C に上昇した。この温熱刺激を連日 1 週間、2 週間与えて、温熱刺激の効果につき検討すると、前脛骨筋 (TA) において、温熱刺激を 1 週間与えたラット (n=8) ではコントロールと比し、明らかな筋肥大効果はみられなかったが、2 週間与えたラットでは有意な筋重量の有意な増加が認められた (P=0.0008, n=8)。SDH 活性、MHC 組成は変化しなかった。なお、Microarray Data Analysis では、温熱刺激では、236 遺伝子が 2 倍以上に増加し、230 遺伝子が半分以下に減少しており、現在、詳細な解析をおこなっている。

3. 熱ストレスおよび筋収縮が筋細胞質内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響 (狩野)

前脛骨筋を *in vivo* で体外に部分的に露出し、蛍光プローブ fura 2 -AM および Rhod 2-AM によって細胞質とミトコンドリア Ca^{2+} 濃度変動を評価した。安静時および電気刺激 (120 秒、100Hz) によって誘発される筋収縮からの回復動態に加えて、SR (タプシガルギン) およびミトコンドリア (FCCP) 機能の薬理的阻害の効果を検証した。その結果、WT の $[Ca^{2+}]_i$ は、収縮後の回復期 (+6±1%) に上昇したままであったが、PGC-1 α 過剰マウスでは 150 秒以内に安静レベルまで回復した。タプシガルギンによる SR 機能抑制は、WT の安静時 $[Ca^{2+}]_i$ レベルを急激に増加させたが、PGC-1 α 過剰マウスではその変動が有意に低かった。FCCP によるミトコンドリア機能抑制は WT と PGC-1 α 過剰マウスにおいて観察されたタプシガルギン応答の違いを相殺した。また、ミトコンドリアの Ca^{2+} 蓄積は、収縮およびタプシガルギン処理後の PGC-1 α 過剰マウスにおいて観察された。以上より、ミトコンドリアの増加は細胞質中のカルシウム増加を抑制することが示された。これらの結果は、ミトコンドリアが多い遅筋線維 (Type I 線維) では、ミトコンドリアが少ない速筋線維 (Type II 線維) よりも筋肥大応答が減弱する可能性を示唆している (Eshima et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2017)。

次に、筋収縮が筋細胞質内カルシウムイオン濃度に及ぼす実験では、熱ストレス群の $[Ca^{2+}]_i$ は有意に増加した (10 分後: 10±4%, 20 分後: 20±7%)。ところが、熱ストレス+筋収縮群では 20 分後の $[Ca^{2+}]_i$ は初期値と同レベルまで抑制された。また、TRPV1 のリン酸化は、熱ストレス群では負荷前よりも 25±4% 増加したのに対して、熱ストレス+筋収縮群では有意なリン酸化反応は認められなかった。

以上より、筋収縮は、熱ストレスによる TRPV1 のリン酸化を抑制し、結果として細胞質への Ca^{2+} 流入を抑えるように作用することが示された。この機構は運動時の筋温上昇における Ca^{2+} 恒常性の維持に関与している可能性が考えられる (Ikegami et al., 2019 J Appl Physiol)。

4) 血流制限モデルラットにおける低強度電気刺激の筋肥大効果の分子的機序の検討

筋酸素分圧 (PmvO_2) は 30Hz の収縮とともに一過性に減少したが、血流制限下では、高度の低酸素環境を誘発し、最大 (100Hz) 収縮の場合よりも PmvO_2 をより減少させた。低強度電気刺激 (EXER) は筋肥大 (6.2%、 $P<0.01$) を誘発したが、対照群または血流制限単独では誘発しなかった。血流制限下での低強度電気刺激では、さらに著明な筋肥大を生じ (11.0%、 $P<0.01$)、表層の前脛骨筋 (TA) では筋断面積が有意に増加した ($P<0.05$)。また、血流制限下での電気刺激では、通常電気刺激のみに比較し、mTOR シグナル系である S6 の活性化応答が亢進することが示された。以上より、血流制限による酸素分圧の低下が大きい条件下での運動は、低強度刺激であっても mTOR シグナル系の活性を亢進させることが明らかとなった。さらに、血流制限下での低強度電気刺激では、通常電気刺激のみに比較し、monocarboxylate transporter-1 (MCT1)、PGC-1 α の発現が有意に亢進した。さらに、血流制限下での電気刺激群では、glucose transporter type 4 (GLUT4) の発現を亢進した。低強度運動に血流制限を組み合わせると、骨格筋での PGC-1 α 、GLUT4、MCT1 発現を亢進し、ミトコンドリアならびに筋機能、糖代謝の改善に関与すると考えられた (Nakajima et al., 2018 J Appl Physiol)。

IV 考察

心不全では筋萎縮 (サルコペニア) を合併し、QOL、生命予後の重大な脅威となる。その成因は、心不全や高齢者などでは、低栄養、不活動などによる筋タンパク同化の抑制、さらに、TNF α 等の炎症性サイトカインによる筋蛋白合成低下と筋タンパク質のユビキチン化を触媒する骨格筋特異的ユビキチンリガーゼである MuRF1、atrogin-1 などの筋タンパク異化の促進などにより、筋萎縮、サルコペニアが発症する。我々は、当ハートセンター入院患者において、生体電気インピーダンス法 (Bioelectrical Impedance Analysis; BIA) を用いた筋量評価と握力 (男性 < 26 kg, 女性 < 18 kg)、歩行速度 (0.8 m/sec 以下) からサルコペニアの頻度を検討すると、男性は 27.8%、女性は 41.8% と高率であった (Yasuda et al., 2017. Sci Rep)。特に、心不全患者、CKD 患者では、サルコペニアの有病率は高かった。サルコペニアは、転倒リスク、予後と密接に関係しており、サルコペニア予防、対策は、きわめて重要な問題である。我々の検討では、さらに、心大血管疾患入院中の患者において、大腿前面筋厚は、男性、女性、サルコペニア有無にかかわらず、CVD 患者において身体能力を維持するのに重要と思われた (Yasuda et al., 2017. Sci Rep)。このように、心不全および CKD 患者は、サルコペニアの発症と密接に関連し、サルコペニアの評価とともに、それを予防する必要があると思われた。とくに、下肢筋量を増強するようなトレーニングの重要性があらためて明らかとなった。

さらに、心大血管疾患患者における筋萎縮、サルコペニア評価と筋萎縮、サルコペニアに関連する血液バイオマーカーについて検討した。各種サイトカイン、マイオカイン、アディポカインなどを Luminex アッセイあるいは Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) で測定した。これまでの 20 種類の検討では、アディポネクチン、GDF-15、IGF-1、FGF-21、Galectin-3、TNF α 、さらに、カルニチンの中の acylcarnitine が、筋力低下、サルコペニアと密接に関連していることが判明した。とくに、炎症性サイトカインである GDF-15 が心大血管疾患、とくに、

CKD 患者の筋消耗、サルコペニアに密接に関与することが明らかとなった(論文作成中)。また、アディポネクチンは、心不全患者において、炎症、酸化ストレス、筋消耗、および栄養不良を含む代謝障害に関与していると思われ、アディポネクチンは心不全患者のサルコペニアに関してきわめて有用なマーカーであると思われた。一方、レプチンは、脂肪量の増加により上昇するが、筋肉消耗を伴わずに心臓リモデリングを減少させる心臓保護ホルモンであると思われた。ここ数年、欧米を中心に、BMI が大きい方が予後は良いという“obesity paradox”という、循環器領域などでの一般的な認識とは異なる現象が報告されている。この obesity paradox が日本人の心不全患者でも認められることを示唆する報告もみられるが、今回の我々のレプチンに関する研究成果は、この obesity paradox に関連していると思われる。一方、筋消耗との関連が報告されているミオスタチンは、驚くことに筋力および筋量と正の相関をみとめ(未発表)、今後の再検討を要すると思われた。現在、詳細にサイトカイン、マイオカイン、アディポカインとサルコペニアとの関連、HFrEF, HFpEF との関連についても検討している。

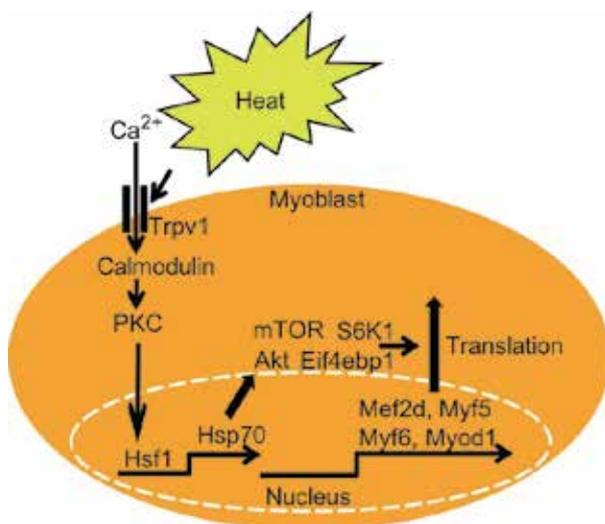
miR は血液中に分泌され、タンパクの転写・翻訳を制御する。我々は、はじめに、exosome 中の分泌型マイクロ RNA と組織中の miRNA との発現量との関連につき、miR-21 に関して検討した。心房組織での miR-21 を RT-PCR で定量すると線維化の指標であるコラーゲン I 型の発現量と有意な相関も見られ、心房細動、心房の線維化との関連も認められた。しかし、exosome 中の分泌型 miR-21 量を測定し分泌型 miR-21 は明らかに血液中に検出されたが、あきらかな組織中の線維化の指標とは有意な関連は認められず、分泌型 miR-21 を線維化の分子的マーカーとするには、さらなる検討が必要と思われた。本来の目的である筋萎縮関連 miRNA として、miR-1, miR29b などいくつか報告されているが、現在、心不全のサルコペニアの分子的マーカーとして保存中の血液から exosome 中のマイクロ RNA を抽出して定量を行っている。マイクロアレイ(Microarray)解析を含め、今後も研究を継続する予定である。

心不全患者の筋萎縮、サルコペニア改善に有酸素運動を中心とした心臓リハビリが実施されているが、今後、患者の高齢化により従来のリハビリが困難な症例が急増し、新たなリハビリ法の開発が急務である。我々はサルコペニア対策として血流制限下トレーニング(いわゆる加圧トレーニング)と温熱刺激を利用した和温療法に注目し、臨床ならびに基礎研究を実施した。臨床研究では、高齢者及び心大血管疾患手術患者の血流制限下トレーニングの効果ならびに安全性が実証された (Yasuda et al., 2016 Oncotarget)。現在、サルコペニアを認める心不全患者で、血流制限下トレーニングと温熱刺激研究が進行している。

臨床研究とともに、詳細な基礎研究も実施した。はじめに、骨格筋からはさまざまマイオカインが放出される。IL-6 は、骨格筋細胞からも放出され、オートクライン、パラクライン的に骨格筋に作用し、増殖や筋肥大を誘導することが報告されている。しかし、骨格筋細胞からの IL-6 の放出を誘導する分子的機構についてはいまだ不明である。そこで、温熱刺激の骨格筋細胞を用いた in vitro 研究により、マイオカインの一つである IL-6 産生に及ぼす温熱刺激による効果につき検討した。温熱刺激は TRPV1/PKC/CREB のシグナルを介して IL6 の発現を増大させることが明らかとなった (Obi et al., 2017 J Appl Physiol)。さらに、蛋白の翻訳に関与する Akt/mTOR/p70S6K1 のリン酸化を検討したところ、温熱刺激によりいずれもリン酸化が増大した。詳細な活性化機構を検討すると、温熱刺激を加えると TRPV1/カルモジュリン/PKC/HSF1 のシグナルが活性化することがわかった。また、温熱刺激は、骨格筋の分化マーカーである MyoD1, MEF2D, Myf5, MRF4 の蛋白の発現レベルがいずれも有意

に増大した。このように、温熱刺激は、TRPV1/カルモジュリン/PKC/HSF1 のシグナルを介して HSP70 が産生され、Akt/mTOR/4E-BP1 および S6K1 のシグナルを活性化して骨格筋分化マーカーである MEF2D、MRF4、Myf5、MyoD1 の蛋白の発現が増大することが明らかとなった（図 参照）。このように、*in vitro* の研究では、温熱刺激は、あきらかな筋肥大効果をきたすと考えられた。その機序として、(1) マイオカインである IL-6 の分泌により、IL-6 がオートクライン、パラクライン的に骨格筋に作用し、増殖や筋肥大を誘導すること (2) 筋タンパク合成系である Akt/mTOR/p70S6K1 系の活性化 (3) 骨格筋の分化の促進が明らかとなった (Obi et al., 2019 FEBS Open Bio)。実際、*in vivo* の実験で、温度条件 41°C、1 時間/日で温熱刺激を 2 週間与えたラットでは有意な筋重量の増加が認められた。さらに、機械的ストレスは、筋タンパク合成を促進する重要な要因である。一方、血流制限下での運動では、低強度の負荷にもかかわらず、高強度に似た代謝内環境をきたし筋肥大を誘発することが報告されている。血流制限下のトレーニングによる筋肥大効果ならびにその機序につき明らかにした。ラット血流制限モデルにより、筋酸素分圧は安静時(27.5mmHg)から 30 Hz の低強度電気刺激では 23.2 mmHg に減少し、血流制限を加えると著しく減少し、それは高強度運動(13.5mmHg) 状態より低かった。血流制限の有無にかかわらず低強度電気刺激の 3 時間後に、mTOR のリン酸化の増加が観察されたが、S6 のリン酸化は血流制限を加えることで著しく増強された。血流制限下での低強度筋収縮は、筋酸素分圧値を著しく低下させ、mTOR 系の S6 のリン酸化反応を誘発し筋肥大をもたらすと考えられた。さらに、血流制限下での電気刺激による慢性トレーニングは、骨格筋での PGC-1 α 、GLUT4、MCT1 発現を亢進し、ミトコンドリアならびに筋機能、糖代謝の改善に関与すると考えられた (Nakajima et al., 2018 J Appl Physiol)。

図 温熱刺激の骨格筋に対する作用 (Obi et al., 2019 FEBS Open Bio より)



これらをまとめると、加齢や病気によるサルコペニアに対する治療方法として、温熱刺激あるいは血流制限下トレーニングを加えることにより、骨格筋に対する効果が十分に得られることを科学的に証明することができた。これらの基礎研究は、今後の臨床研究の基礎となる重要な情報を提供できると思われる。しかし、*in vivo* の検討では、いくつかの問題点も考えられた。骨格筋における細胞内 Ca^{2+} は、筋肥大シグナル因子としての役割を担っている。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は細胞膜、ミトコンドリア、筋小胞体 (SR) によって調節されているが、ミトコンドリアも細胞質中のカルシウムイオン濃度の調節に関与していることが示された (Eshima et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2017)。この

結果は、ミトコンドリアが多い遅筋線維(Type I 線維)では、ミトコンドリアが少ない速筋線維(Type II 線維)よりも筋肥大応答が減弱する可能性があると思われた。さらに、筋収縮は、熱ストレスによる TRPV1 のリン酸化を抑制し、結果として細胞質への Ca^{2+} 流入を抑えるように作用することが示された (Ikegami et al., 2019 J Appl Physiol)。この機構は運動時の筋温上昇における Ca^{2+} 恒常性の維持に貢献していると考えられたが、温熱刺激に運動を併用すると温熱刺激の効果が減少する可能性があると思われ、今後のさらなる研究も必要と思われた。さらに、現在使用している温熱刺激装置（和温療法）では、60℃ 15分 で深部体温が 0.5～1.0℃ 上昇がみられたが、サルコペニアに対する治療方法として、どのような温熱刺激が有効か、温熱刺激の設定温度、時間などを含め、今後、さらなる臨床的検討が必要と思われた。

謝辞： 3年間の本研究の実施にあたり、ご協力していただいた、ハートセンター長、心臓・血管内科/循環器内科 井上教授、副センター長、心臓・血管外科 福田教授ならびにハートセンターのスタッフの皆様、さらに、特任教授 鄭忠和先生、研究助手の長谷川貴亮に深謝いたします。また、本研究事業の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人車両競技公益資金記念財団にこの場をお借りして深謝いたします。

V 研究成果の発表

Nakajima T, Yasuda T, Koide S, Yamasoba T, Obi S, Toyoda S, Sato Y, Inoue T, Kano Y. Repetitive restriction of muscle blood flow enhances mTOR signaling pathways in a rat model. 2016;31(10):1685-1695.

Yasuda T, Fukumura K, Tomaru T, Nakajima T. Thigh muscle size and vascular function after blood flow-restricted elastic band training in older women. *Oncotarget*. 2016;7(23):33595-33607.

Tanaka Y, Inagaki T, Poole DC, Kano Y. pH buffering of single rat skeletal muscle fibers in the in vivo environment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310(10):R926-933.

Fukushima Y, Kurose S, Shinno H, Thi Thu HC, Takao N, Tsutsumi H, Hasegawa T, Nakajima T, Kimura Y. Effects of Body Weight Reduction on Serum Irisin and Metabolic Parameters in Obese Subjects. *Diabetes Metab J*. 2016;40(5):386-395.

Fukushima Y, Kurose S, Shinno H, Cao Thi Thu H, Tamanoi A, Tsutsumi H, Hasegawa T, Nakajima T, Kimura Y. Relationships between serum irisin levels and metabolic parameters in Japanese patients with obesity. *Obes Sci Pract*. 2016;2(2):203-209.

Yasuda T, Fukumura K, Nakajima T. Short Physical Performance Battery for middle-aged and older adult cardiovascular disease patients: implication for strength tests and lower extremity morphological evaluation. *J Phys Ther Sci* 2017;29(4):748-753.

Sudo M, Ando S, Kano Y. Repeated blood flow restriction induces muscle fiber hypertrophy. *Muscle Nerve*. 2017;55(2):274-276.

Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Kikuchi H, Oguri G, Takahashi M, Nakamura F, Yamasoba T, Sakuma M, Toyoda S, Tei C, Inoue T. Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways. *J Appl Physiol* (1985). 2017;122(3):683-694.

Yasuda T, Nakajima T, Sawaguchi T, Nozawa N, Arakawa T, Takahashi R, Mizushima Y,

Katayanagi S, Matsumoto K, Toyoda S, Inoue T. Short Physical Performance Battery for cardiovascular disease inpatients: implications for critical factors and sarcopenia. *Sci Rep* 2017;7(1):17425.

Wakizaka M, Eshima H, Tanaka Y, Shirakawa H, Poole DC, Kano Y. In vivo Ca^{2+} dynamics induced by Ca^{2+} injection in individual rat skeletal muscle fibers. *Physiol Rep*. 2017;5(5). pii: e13180.

Eshima H, Miura S, Senoo N, Hatakeyama K, Poole DC, Kano Y. Improved skeletal muscle Ca^{2+} regulation in vivo following contractions in mice overexpressing PGC-1 α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(6):R1017-R1028.

Nakajima T, Koide S, Yasuda T, Hasegawa T, Yamasoba T, Obi S, Toyoda S, Nakamura F, Inoue T, Poole DC, Kano Y. Muscle hypertrophy following blood flow-restricted low force isometric electrical stimulation in rat tibialis anterior: Role for muscle hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2018;125(1):134-145.

Sawaguchi S, Nakajima T, Hasegawa T, Shibasaki I, Kaneda T, Obi S, Kuwata T, Sakuma M, Toyoda S, Ohni M, Abe S, Fukuda H, Inoue T. Serum adiponectin and TNF α concentrations are closely associated with epicardial adipose tissue fatty acid profiles in patients undergoing cardiovascular surgery, *IJC Heart & Vasculature* 2018;18:86-95.

Fukuda T, Matsumoto A, Kurano M, Nagahama H, Nakajima T. Stroke work progressively increased until maximal exercise in long distance runners, but plateaued at submaximal exercise in sprinters. *J Phys Fitness Sports Med* 2018;7(2):103-112.

Kaneda H, Nakajima T, Haruyama A, Shibasaki I, Hasegawa T, Sawaguchi T, Kuwata T, Obi S, Arikawa T, Sakuma M, Amano H, Toyoda S, Fukuda T, Inoue T. Association of serum concentrations of irisin and the adipokines adiponectin and leptin with epicardial fat in cardiovascular surgery patients. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201499.

Obi S, Nakajima T, Hasegawa T, Nakamura F, Sakuma M, Toyoda S, Tei C, Inoue T. Heat induces myogenic transcription factors of myoblast cells through Trpv1. *FEBS Open Bio*. 2018;9(1):101-113.

Ooshima A, Ishizaka Y, Katayanagi S, Arakawa C, Takahashi R, Nozawa N, Mizushima Y, Matsumoto K, Sawaguchi T, Haruyama A, Toyoda S, Ogawa H, Shibasaki I, Yagi H, Yamaguchi Uematsu A, S, Yasuda T, Sato Y, Fukuda H, Inoue T, Nakajima T. Combination of KAATSU training® and BCAA intake for a patient after aortic valve replacement surgery: A case study. *Int J KAATSU Training Res* 2018;12:1-4.

Ikegami R, Eshima H, Mashio T, Ishiguro T, Hoshino D, Poole DC, Kano Y. Accumulation of intramyocyte TRPV1-mediated calcium during heat stress is inhibited by concomitant muscle contractions. *J Appl Physiol* (1985). 2019;126(3):691-698.

心筋筋小胞体カルシウムサイクリング制御機構の解明と心臓病への役割

所属機関名 東京慈恵会医科大学

研究者名 南沢享

<<研究の概要>>

我が国では心臓病罹患人口は急増しており、国民の健康と社会経済にとっての緊迫した脅威となっている。心筋細胞における Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻、特に筋小胞体の機能・構造の異常は、心不全や致死性不整脈などの心臓病を増悪させる。心筋収縮時の Ca^{2+} 動態は筋小胞体の Ca^{2+} 放出と再吸収により主に規定されており、筋小胞体 Ca^{2+} 再吸収を人為的に賦活化することで、心不全の進行を抑制できることが報告されている。しかし、現在の心臓病治療薬には心筋筋小胞体での Ca^{2+} 調節を直接改善させる作用をもつ薬剤が未だに存在しない。従って、筋小胞体の機能調節を個体、細胞および分子レベルでより詳細に理解することが、心臓病の病因解明や治療法確立に先立ち必要不可欠である。

筋小胞体の Ca^{2+} 再吸収は2型小胞体 Ca^{2+} ATPase (SERCA2) が、 Ca^{2+} 放出には2型リアノジン受容体 (RyR2)が主要な役割を果たしていることが知られているが、筋小胞体 Ca^{2+} 放出と再吸収の連続工程よりなる Ca^{2+} サイクリングの生理的調節には不明な点が多く残されている。本研究では、心筋筋小胞体の機能制御に注目し、 Ca^{2+} サイクリング調節の解明に貢献する基礎研究、その調節不全と心臓病との関連を検討する動物レベルのトランスレーショナル研究を推進し、心筋筋小胞体の機能制御に基づく新規分子標的療法の開発を目指した。

我々は本研究において、フォスフォランバンの17番目のスレオニンを特異的に脱リン酸化することで、SERCA2活性を抑制する新規筋小胞体フォスファターゼ PP2Ce を発見した。PP2Ce は酸化ストレスや心不全患者で活性が増加し、ストレスによる心機能低下に重要な役割があることが判明した。一方、PP2Ce は小胞体ストレス誘導因子 IRE1 の活性制御にも重要であることが示されていたため、我々は IRE1 α の心臓での影響を調べたところ、活性型 IRE1 α は小胞体ストレスを誘導するが、心不全の進行には防御的に働くことが判明した。さらに筋ジストロフィー症モデルマウスにおいて、SERCA2活性改善によって筋小胞体機能を改善させたマウスでは、筋ジストロフィーの進行が抑えられることを明らかにした。

次いで Ca^{2+} 放出に関して、カテコラミン誘発性多型性心室頻拍 (CPVT) を生じる RyR2 遺伝子変異に関して解析した結果、疾患の臨床的重症度と Ca^{2+} 遊離活性の間に中程度の相関を認めた。さらに、CPVT 変異はすべてチャネル活性が増加する gain-of-function であることが判明した。特発性心室細動、QT 延長症候群、短連結性異型トルサード・ド・ポアント (short-coupled variant of torsade de pointes) を引き起こすアミノ酸変異体には、チャネル活性が増加する gain-of-function とチャネル活性が減弱する loss-of-function があることを見出した。さらに RyR2 チャネル作用する新規筋小胞体チャネル分子である TRIC チャネルの心疾患への寄与について検討を行ったところ、TRIC-A は RyR2 開口を強力に活性化したが、この作用は TRIC-B では観察されなかった。 β 交感神経作用薬による持続刺激ストレスを TRIC-A 欠損マウス心筋細胞に与えると、筋小胞体 Ca^{2+} 過剰負荷を起こして、ミトコンドリア活性酸素種の過剰産生を惹起して細胞死が亢進し、心機能低下や線維化亢進の要因となっていることが示唆された。さらに新規筋小胞体分子 MG23 チャネルには一過性の陽イオン透過性チャネル活性があり、心筋型リアノジン受容体チャネルとともに細胞質側の Zn^{2+} に依存してチャネルが開口することを明らかにした。

以上の結果は、筋小胞体の Ca^{2+} 再吸収及び Ca^{2+} 放出が、正常に制御されていることが心機能や骨格筋機能を正常に保つ上で極めて重要であり、その破綻が心不全や筋萎縮、不整脈を惹起することを端的に示していた。今回、これまでに知られていなかった筋小胞体 Ca^{2+} 放出と再吸収の制御機構のいくつかを新たに発見することが出来た。今後さらに、 Ca^{2+} サイクリング調節機構を解明し、その調節不全と心臓病との関連を検討する動物レベルのトランスレーショナル研究を推進し、心筋筋小胞体の機能制御に基づく新規分子標的療法を開発することが望まれる。

・共同研究者

呉林 なごみ 順天堂大学医学部
竹島 浩 京都大学大学院薬学研究科

・研究報告

I 研究目的

我が国では心臓病罹患人口は急増しており、国民の健康と社会経済にとっての緊迫した脅威となっている。その治療法には進歩がみられるものの、画期的な解決策は見出せていない。心筋細胞における Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻、特に筋小胞体の機能・構造の異常は、心不全や致死性不整脈などの心臓病を増悪させる。心筋収縮時の Ca^{2+} 動態は筋小胞体の Ca^{2+} 放出と再吸収により主に規定されており、我々を含む多くの研究者によって、筋小胞体 Ca^{2+} 再吸収を人為的に賦活化することで、心不全の進行を抑制できることが報告されている。しかし、現在の心臓病治療薬には心筋筋小胞体での Ca^{2+} 調節を直接改善させる作用をもつ薬剤が未だに存在しない。従って、筋小胞体の機能調節を個体、細胞および分子レベルでより詳細に理解することが、心臓病の病因解明や治療法確立に先立ち必要不可欠である。

筋小胞体の Ca^{2+} 放出には 2 型リアノジン受容体(RyR2)が、 Ca^{2+} 再吸収は 2 型小胞体 Ca^{2+} ATPase (SERCA2) が担当しており、両機能を制御するリン酸化やニトロシル化などの翻訳後修飾に加えて、それぞれに対して機能調節するアクセサリータンパク質の存在も報告されている。しかしながら、筋小胞体 Ca^{2+} 放出と再吸収の連続工程よりなる Ca^{2+} サイクリングの生理的調節には不明な点が多く残されており、その心臓病発症や進展への寄与についての詳細な分子機序に関して、さらなる研究が必要である。本研究では、心筋筋小胞体の機能制御に注目し、 Ca^{2+} サイクリング調節の解明に貢献する基礎研究、その調節不全と心臓病との関連を検討する動物レベルのトランスレーショナル研究を推進し、心筋筋小胞体の機能制御に基づく新規分子標的療法の開発を目指した。

II 研究計画及び材料と方法

本研究における動物実験、遺伝子組み換え実験は、東京慈恵会医科大学（南沢）、順天堂大学医学部（呉林）、京都大学大学（竹島）において認可を受けた上で実施した。本研究では心筋筋小胞体での Ca^{2+} 再取り込み、 Ca^{2+} 放出、小胞体内 Ca^{2+} 維持の調節機序を遺伝子改変マウス、病態モデル動物作成、細胞培養系、 Ca^{2+} イメージング、心筋生理力学特性などの手法を駆使して解析をした。

1. 細胞培養実験

細胞種は HEK293 細胞、H9C2 細胞、Sf9 細胞、マウス成獣心室筋、ラット成獣心室筋、マウス成獣骨格筋などを各施設において、これまでに報告した方法で培養し、各種実験に用いた。

2. 遺伝子組み換えによる変異 RyR2 の作成

マウス RyR2 (NM_023868.2) のコード配列を全長クローニングし、ヒトカテコラミン誘発性心室不整脈疾患に関わる遺伝子変異など特定部位に変異配列を導入した（研究成果 #4、5、23、24）。

3. 遺伝子組換え動物

PP2Ce 過剰発現マウス及び活性型 IRE1 α 過剰発現マウスは米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校 Wang 博士によって作成された（研究成果#1、15）。SLN 欠損マウスは東京慈恵会医科大学で保有しており、筋ジストロフィー症モデル mdx マウス（国立精神・神経医療研究センター武田伸一先生、谷端淳先生らとの共同研究）と交配をした。TRIC-A 欠損マウス(研究成果#9)、TRIC-B 遺伝子欠損マウス(研究成果#26) MG23 欠損マウス(研究成果#11) は竹島らが作成し、京都大学で飼育された。

4. 定量的 RT-PCR 検査

定量的 RT-PCR 検査においては、組織や培養細胞からの RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR 解析に関しては、各施設において、これまでに報告した方法で行った。

5. ウェスタンブロット及び免疫染色によるタンパク質検出

目的タンパク質検出においては、ウェスタンブロット法及び免疫染色法を用いた。組織や培養細胞からのタンパク質抽出、染色用標本作製と検出方法に関しては、各施設において、これまでに報告した方法で行った。

6. 脱リン酸化アッセイ

左心室からの組織を用いて、フォスファターゼ PP2Ce の PLN 脱リン酸化活性測定を行った（研究成果#1）。

7. 虚血再灌流心室筋傷害モデル

体外に取り出した心臓に対して、ランゲンドルフ灌流装置を使い、虚血再灌流の実験を行った（研究成果#1）。虚血再灌流後に、triphenyltetrazolium chloride (TTC, 1%)溶液を用いた心筋の虚血領域の計測や TUNEL 染色によってアポトーシスの程度を検討した。

8. 大動脈縮窄による圧負荷

活性型 IRE1 α 過剰発現マウスに対して大動脈縮窄による圧負荷を与え、心不全を生じさせ、IRE1 α の効果を観察した（研究成果#15）。

9. 骨格筋張力の測定

SLN 欠損マウスと筋ジストロフィー症モデル mdx マウスとの交配を行い、対照群と比べて SLN 欠損の影響を mdx マウスの長指伸筋の張力を測定することで判定した（研究成果#17）。

10. 細胞質内カルシウム濃度及び筋小胞体内カルシウム濃度測定

細胞質内カルシウム濃度は Fura2-AM や Fluo-4 などの蛍光カルシウム指示薬を用いて、各施設においてこれまでに報告した方法で行った。筋小胞体内カルシウム濃度の測定は東京大学飯野研究室から供与された pCMV R-CEPIA1er を用いて測定した。

11. [3H]リアノジン結合活性測定

リアノジンは開口している RyR チャンネルに結合するため、[3H]を用いて HEK293 細胞においてリアノジン結合活性を測定した。各測定値は最大結合能との比で標準化した（研究成果#4、5、23、24）。

12. 心機能検査—心超音波検査

遺伝子改変マウスやそれらに対するの各種ストレスが心臓機能に及ぼす影響を調べるため、心臓超音波検査を各施設においてこれまでに報告した方法で行った。

13. バキュロウイルス巨大蛋白発現システム

Invitrogen 社の Bac-to-Bac システムを使い、バキュロウイルスを Sf9 細胞で産生させた。このバキュロウイルスに、RyR2 遺伝子を導入し、RyR2 タンパク質を大量に産生する実験系を構築した（研究成果#4、5、23、24）。

III 研究成果

1. SERCA2 活性を抑制する新規筋小胞体フォスファターゼ PP2Ce の生体における役割

SERCA2 活性を抑制する働きのあるフォスホランバン phospholamban (PLN) はリン酸化されると SERCA2 活性抑制作用がとれる。すなわち、SERCA2 活性が上昇する。心不全時には PLN リン酸化が減少していることが知られている。先行研究によって同定された、筋小胞体に限局して存在するフォスファターゼ PP2Ce の生体における役割を検討した結果、PP2Ce は PLN の 17 番目のスレオニンを特異的に脱リン酸化することが判明した。また、PP2Ce は酸化ストレスや心不全患者で活性が増加した。さらに PP2Ce 過剰発現マウスを作成し、虚血再灌流の影響を調べたところ、PP2Ce 過剰発現マウスでは虚血心での障害が重症化することを見出した。以上の結果は、PP2Ce が SERCA2 活性を抑制し、心機能低下に直接的に関与することを示すものであった。

2. SERCA2 活性改善による筋疾患改善

大腿神経を切除して骨格筋萎縮を誘導したマウスの筋小胞体機能を検討したところ、筋萎縮によって筋小胞体機能が低下し、筋力低下を来すことが明らかになった。さらに筋ジストロフィー症モデルマウスでは、筋小胞体機能が低下すること、特に PLN と相同性の高い sarcolipin (SLN) の発現が増加していることが判明した。そこで、この筋ジストロフィー症モデルマウスと SLN 遺伝子欠損マウスを掛け合わせて、骨格筋を観察したところ、SLN 遺伝子欠損によって、SERCA2 活性が上昇し、筋小胞体機能を改善させたマウスでは、筋ジストロフィーの進行が抑えられた。

3. IRE1 α を介する小胞体ストレス誘導と心不全

脂肪細胞などの実験から、筋小胞体特異的フォスファターゼ PP2Ce は IRE1 の活性制御に重要であることが示されていたため、活性型 IRE1 α 過剰発現マウスを作成して、心臓への影響を調べた。活性型 IRE1 α 過剰発現マウスに大動脈縮窄による圧負荷を与え、心不全を生じさせる実験を行ったところ、活性型 IRE1 α 過剰発現マウスでは小胞体ストレスを誘導したものの、心不全の進行を防ぐことができた。

4. リアノジン受容体の疾患変異体による催不整脈機序の解明

様々なリアノジン受容体 (RyR2) の疾患特異的遺伝子変異体および人工的遺伝子変異体を HEK293 細胞に強発現して解析した結果、15 種類のカテコラミン誘発性多型性心室頻拍 (CPVT) 変異について、疾患の臨床的重症度と Ca²⁺遊離活性の間に中程度の相関を認めた。さらに、CPVT 変異はすべてチャネル活性が増加する gain-of-function であることが判明した。特発性心室細動、QT 延長症候群、短連結性異型トルサード・ド・ポアント (short-coupled variant of torsade de pointes) を引き起こすアミノ酸変異体には、チャネル活性が増加する gain-of-function とチャネル活性が減弱する loss-of-function があることを見出した。

さらに細胞質・小胞体の Ca²⁺解析および[3H]リアノジン結合実験を行った結果、SOICR (小胞体 Ca²⁺過負荷誘発性 Ca²⁺遊離) の閾値 Ca²⁺レベルは RyR2 の細胞質 Ca²⁺依存性の活性と RyR2 発現量によって決まるという結論が得られた。また、RyR2 は巨大な膜タンパクなため、これまで心筋細胞への発現が困難であったが、バキュロウイルス発現システムを用いることにより RyR2 を比較的容易に強発現させる事が可能となり、心筋細胞環境下の Ca²⁺動態や興奮収縮連関に対する RyR2 変異体の影響を検討できるようになった。

5. 大規模スクリーニングによるリアノジン受容体作用薬の探索と抗不整脈効果の評価

小胞体 Ca²⁺モニタリング法を改良して、約 10,000 種類のライブラリから 20 種類の RyR2 阻害薬を見出した。これらの化合物は、RyR2 発現 HEK 細胞における Ca²⁺オシレーションを抑制し、心筋細胞の Ca²⁺ wave も抑制し、不整脈の誘発頻度を減少させた。

6. TRIC チャネルの心疾患への寄与の解明

β 交感神経作用薬による持続刺激ストレスを TRIC-A 欠損マウス心筋細胞に与えると、筋小胞体 Ca²⁺過

剰負荷を起こして、単一細胞レベルで Ca^{2+} ウェーブの発生が生じやすくなった。さらに、筋小胞体 Ca^{2+} 過剰負荷はミトコンドリア活性酸素種の過剰産生を惹起して細胞死が亢進し、心機能低下や線維化亢進の要因となっていることが示唆された。

TRIC-A 欠損筋小胞体における TRIC-B チャンネルでは、常に数個のチャンネルが同調性に開口するという、coupled gating とよばれるチャンネル開口現象が認められたが、この現象は野生型では認めなかった。また、培養細胞 cDNA 共発現実験にて、TRIC-A は RyR2 開口を強力に活性化したが、この作用は TRIC-B では観察されなかった。キメラ TRIC タンパク質や分子内ドメイン欠損タンパク質を利用した実験にて、TRIC-A による RyR2 活性化作用は細胞質側に配向する C 末端ペプチドに起因すると推定された。一方、骨格筋小胞体試料を用いた脂質二重膜チャンネル再構成系において TRIC-A 欠損により骨格筋型リアノジン受容体チャンネルの活性低下が観察された。

TRIC-B 欠損マウスでは、骨密度低下が低下し、骨芽細胞の骨形成に TRIC-B チャンネルが必須の役割を有することを突き止めた。

7. 筋小胞体分子 MG23 が心機能に及ぼす影響の解明

人工脂質二重膜を使った実験で、MG23 チャンネルは一過性の陽イオン透過性チャンネル活性を示し、心筋型リアノジン受容体チャンネルとともに細胞質側の Zn^{2+} に依存してチャンネルが開口することが判明した。さらに H9C2 細胞を使った実験では、虚血条件で細胞質 Zn^{2+} が上昇するとともに、MG23 の発現が増加した。

IV 考察

本研究によって、これまでに知られていなかった筋小胞体 Ca^{2+} 放出と再吸収の制御機構のいくつかを新たに発見することが出来た。筋小胞体 Ca^{2+} 再吸収過程においては、筋小胞体膜に存在し、フォスフォランバンの 17 番目のスレオニンの特異的に脱リン酸化することで、SERCA2 活性を抑制する新規筋小胞体フォスファターゼ PP2Ce を発見した。これまでフォスフォランバンのリン酸化に関しては、16 番目のセリンのリン酸化を制御する PKA やフォスファターゼ及びその制御因子が精力的に調べられていた。17 番目のスレオニンはカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMKII) によってリン酸化されることは知られていたが、その脱リン酸化機序はよく知られていなかった。本研究によって、フォスフォランバンの機能修飾機序が一層、詳細になった。一方、骨格筋機能においては、フォスフォランバンと相同性の高いサルコリピンが筋小胞体機能を低下させ、さらには骨格筋機能を低下させるが、本研究によって、サルコリピンを働かせなくすることによって、筋ジストロフィー症の筋力低下を改善できた。フォスフォランバンと違って、サルコリピンではリン酸化などタンパク質修飾によって、機能を制御する機序がまだ、よく分かっていない。従って、サルコリピンを制御して筋機能を回復するためには、現時点では遺伝子の発現制御などを考えざるを得なく、一般的な治療方法としてはまだ道のりが長い。一方、心筋においては、フォスフォランバンが Ca^{2+} 再吸収の制御因子として極めて重要であることから、PP2Ce などを利用して、なんらかの方法でフォスフォランバンによる SERCA2a 抑制を解除することによって、筋小胞体機能を改善させ、さらには心機能を回復させる治療方法の開発へと繋げてゆくことは、可能であり、期待も出来ると考えられた。

次いで Ca^{2+} 放出に関して、呉林らの研究によれば、カテコラミン誘発性多型性心室頻拍 (CPVT) を生じる RyR2 遺伝子変異に関して解析した結果、疾患の臨床的重症度と Ca^{2+} 遊離活性の間に中程度の相関を認めたこと、CPVT 変異はすべてチャンネル活性が増加する gain-of-function であること、などから RyR2 チャンネルからの Ca^{2+} 遊離活性を何らかの方法で抑制することによって、CPVT による突然死を防ぐことが可能となることが本研究から示唆された。さらに竹島らの研究によって明らかとなった、TRIC-A は RyR2 開口を強力に活性化することや β 交感神経作用薬による TRIC-A 欠損心筋細胞での筋小胞体 Ca^{2+} 過剰負荷の結果、さらに MG23 チャンネルと RyR2 の関連性から考えると、TRIC-A や MG23 など実に多くの修飾タンパク質を介して、RyR2 のチャンネル活性が制御されていることがわかる。これまでに判明している RyR2 機能修飾タンパク質らとも今後比較検討して、RyR2 のチャンネル活性を精巧に制御するための薬物療法の開発に繋げ

てゆかねばならない。

以上、本研究で得られた成果から、筋小胞体の Ca^{2+} 再吸収及び Ca^{2+} 放出が、正常に制御されていることが心機能や骨格筋機能を正常に保つ上で極めて重要であり、その破綻が心不全や筋萎縮、不整脈を惹起することが明らかになった。その一方で、筋小胞体カルシウムサイクリングの仕組みにはまだまだ不明な点があることも明白である。心筋筋小胞体機能の調節機序を明らかにし、心臓病への新たな治療法の開発に繋げる研究は、医療・社会経済の両面から鑑みて、必要性が極めて高いため、今後さらに、 Ca^{2+} サイクリング調節機構を解明し、その調節不全と心臓病との関連を検討する動物レベルのトランスレーショナル研究を推進し、心筋筋小胞体の機能制御に基づく新規分子標的療法を開発することが望まれる。

V 研究成果の発表

1. Akaike T, Du N, Lu G, Minamisawa S, Wang Y, Ruan H. A sarcoplasmic reticulum localized protein phosphatase regulates phospholamban phosphorylation and promotes ischemia reperfusion injury in the heart. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science* 2(2):160–80, 2017.
2. Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, Fujimoto Y, Akaike T, Inoue T, Minamisawa S. Impairment of Excitation-Contraction coupling in right ventricular hypertrophied muscle with fibrosis induced by pulmonary artery banding. *PLoS One* 12(1): e0169564, 2017.
3. Minamisawa S. Regulation of calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum in the heart. In: Haruo Suji (ed). *Muscle Contraction and Cell Motility - Fundamentals and Developments*. Pan Stanford Publishing Pte.Ltd., pp. 303-332, 2016. ISBN 978-981-4745-17-8 (eBook), Print ISBN 978-981-4745-16-1.
4. Fujii Y, Itoh H, Ohno S, Murayama T, Kurebayashi N, Aoki H, Blancard M, Nakagawa Y, Yamamoto S, Matsui Y, Ichikawa M, Sonoda K, Ozawa T, Ohkubo K, Watanabe I, Guicheney P, Horie M. A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced Ca^{2+} release and short-coupled torsade de pointe ventricular arrhythmia. *Heart Rhythm* 14, 98-107, 2017.
5. Uehara A, Murayama T, Yasukochi M, Fill M, Horie M, Okamoto T, Matsuura Y, Uehara K, Fujimoto T, Sakurai T, Kurebayashi N. Extensive Ca^{2+} leak through K4750Q cardiac ryanodine receptors caused by cytosolic and luminal Ca^{2+} hypersensitivity. *J Gen Physiol*, 149, 199-218, 2017.
6. Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kurebayashi N, Murayama T, Nakamura K, Kakigi R, Okada T, Sakurai T, Kawamori R, Watada H. Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Rep*, 5, e13250, 2017.
7. Nonaka M, Kurebayashi N, Murayama T, Sugihara M, Terawaki K, Shiraishi S, Miyano K, Hosoda H, Kishida S, Kangawa K, Sakurai T, Uezono Y. Therapeutic potential of ghrelin and des-acyl ghrelin against chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Endocr J*, 64, S35-S39, 2017.
8. Matsuki, K., Takemoto, M., Suzuki, Y., Hisao Yamamura, H., Ohya, S., Takeshima, H. & Imaizumi, Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflugers Arch.* 469, 313-326, 2017.
9. El-Ajouz, S., Venturi, E., Witschas, K., Beech, M., Wilson, A. D., Lindsay, C., Eberhardt, D., O'Brien, F., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H. & Sitsapesan, R. Dampened activity of ryanodine receptor channels in mutant skeletal muscle lacking TRIC-A. *J. Physiol.* 595, 4769-4784, 2017.
10. Takei, D., Nishi, M., Fukada, S., Doi, M., Okamura, H., Uezumi, A., Yoshida, M., Miyazato, M., Ichimura, A. & Takeshima, H. *Gm7325* is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells. *Biomed. Res.* 38, 215-219, 2017.
11. Reilly-O'Donnell, B., Robertson, G. B., Karumbi, A., McIntyre, C., Bal, W., Nishi, M., Takeshima, H., Stewart, A. J. & Pitt, S. J. Dysregulated Zn^{2+} homeostasis impairs cardiac type-2 ryanodine receptor and mitsugumin 23 functions, leading to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leakage. *J. Biol. Chem.* 292, 13361-13373, 2017.

12. Zhong, X., Vallmitjana, A., Sun, B., Xiao, Z., Guo, W., Wei, J., Ni, M., Yongxiang Chen, Y., O'Brien, E. R., Gillis, A. M., Hoshijima, M., Takeshima, H., Hove-Madsen, L., Benitez, R., Belke, D. & Wayne Chen, S. R. Reduced expression of cardiac ryanodine receptor protects against stress-induced ventricular tachyarrhythmia, but increases the susceptibility to cardiac alternans. *Biochem. J.* 475, 169-183, 2018.
13. Miyazaki, Y., Ichimura, A., Shun Sato, S., Fujii, T., Oishi, S., Sakai, H. & Takeshima, H. The natural flavonoid myricetin inhibits gastric H⁺, K⁺-ATPase. *Eur. J. Pharmacol.* 820, 217-221, 2018.
14. Matsuki, K., Katoh, D., Takemoto, M., Suzuki, Y., Yamamura, H., Ohya, S., Takeshima, H. & Imaizumi, Y. Negative regulation of cellular Ca²⁺ mobilization by ryanodine receptor type 3 in mouse mesenteric artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* in press
15. Steiger D, Yokota T, Li J, Ren S, Minamisawa S, Wang Y. The serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1alpha protects the heart against pressure overload-induced heart failure. *J Biol Chem*, 293(25):9652-9661, 2018.
16. Iwai K, Nagasawa K, Akaike T, Oshima T, Kato T, Minamisawa S. CCN3 Secreted by prostaglandin E2 inhibits intimal cushion formation in the rat ductus arteriosus. *Biochem Biophys Res Commun.* 503(4):3242-3247, 2018.
17. Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Ruegg UT, Takeda S. Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 505(1): 51-59, 2018.
18. Sakuma T, Akaike T, Minamisawa S. Prostaglandin E₂ receptor EP4 inhibition contracts rat ductus arteriosus. *Circ J.* 83(1):209-216, 2018
19. Nakai G, Shimura D, Uesugi K, Kajimura I, Jiao Q, Kusakari Y, Soga T, Goda N, Minamisawa S. Pyruvate dehydrogenase activation precedes the down-regulation of fatty acid oxidation in monocrotaline-induced myocardial toxicity in mice. *Heart Vessels.* 34(3):545-555, 2018.
20. Xiong PY, Baba S, Nishioka N, Fujimoto Y, Archer SL, Minamisawa S. Left atrial stenosis induced pulmonary venous arterialization and group 2 pulmonary hypertension in rat. *J Vis Exp.* 141: e58787, 2018.
21. Akaike T, Shinjo S, Ohmori E, Kajimura I, Goda N, Minamisawa S. Transcriptional profiles in the chicken ductus arteriosus during hatching. *PLoS One.* 14(3):e0214139, 2019.
22. Tanihata J, Nishioka N, Inoue T, Bando K, Minamisawa S. Urinary titin is increased in patients after cardiac surgery. *Front Cardiovasc Med.* 6:7, 2019.
23. Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T. Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca²⁺-Release Channels. *Mol Pharmacol.* 94:722-730, 2018.
24. Murayama T, Ogawa H, Kurebayashi N, Ohno S, Horie M, Sakurai T. A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca²⁺ sensitivity. *Commun Biol.* 1:98, 2018.
25. Hatani T, Funakoshi S, Deerinck TJ, Bushong EA, Kimura T, Takeshima H, Ellisman MH, Hoshijima M, Yoshida Y. Nano-structural analysis of engrafted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in mouse hearts using a genetic-probe APEX2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 1251-1256, 2018.
26. Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Nakamura K, Kurebayashi N, Murayama T, Kakigi R, Sakurai T, Kawamori R, Watada H. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca²⁺ handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice. *J Appl Physiol.* 126:170-182, 2019.
27. O'Brien F, Eberhardt D, Witschas K, El-Ajouz S, Iida T, Nishi M, Takeshima H, Sitsapesan R, Venturi E.

Enhanced activity of multiple TRIC-B channels: an endoplasmic reticulum/sarcoplasmic reticulum mechanism to boost counterion currents. *J Physiol*. 597(10):2691-2705, 2019.

28. Qian N, Ichimura A, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi T, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Sci. Signal*. 12, eaaw4847, 2019.
29. Mori S, Inuma H, Manaka N, Ishigami-Yuasa M, Murayama T, Nishijima Y, Sakurai A, Kurebayashi N, Sakurai T, Kagechika H. Structural development of a type-1 ryanodine receptor (RyR1) Ca²⁺-release channel inhibitor guided by endoplasmic reticulum Ca²⁺ assay. *Euro J Med Chem*, 2019 (In press)

催不整脈性に関わる心臓イオンチャネルの分子認識機構の解明

《研究の概要》

正常な心機能には、複数の電位依存性イオンチャネルが適切なタイミングで機能することが必要である。電位依存性イオンチャネルの膜貫通領域は、膜電位変化を感受する電位感受ドメイン(VSD)と、イオン透過路を有するポアドメイン(PD)からなり、膜電位により異なる機能構造をとる。しかし、これまでに明らかにされた電位依存性イオンチャネルの立体構造は、いずれも電位のかかっていない脱分極状態のものであり、膜電位変化による機能構造間の遷移のメカニズムは未解明である。また、各電位下での機能構造を原子レベルで明らかにすることにより、新たな創薬標的構造を解明することができ、画期的新薬の創製に大きく貢献することができる。

そこで本研究では、電位依存性イオンチャネルの機能構造選択的な構造生物学的解析、および、リガンドが作用する機能構造やその上での結合部位を同定、結合様式の解明を通じて、不整脈の原因となる心臓の電位依存性イオンチャネルの機能および分子認識の構造メカニズムを解明することを目的とした。

本研究では、膜電位依存的な構造変化様式を解明するために、これまでに電気生理学的解析および脱分極状態での構造生物学的解析が進んでいる古細菌由来の電位依存性 K⁺チャネル(Kv)である KvAP を解析対象として選択し、KvAP の VSD 上の 2 残基に Cys 変異を導入した変異体をリポソームに再構成し、リポソーム内外の膜電位依存的に Cys 残基間に S-S 結合が形成されるか否かを、SS 結合形成により SH 基が修飾試薬から保護されているかにより判定する手法(膜電位依存的 SS-locking 法)を確立した(Nozaki T., Osawa M. et al. **Sci. Rep.** 2016)。この手法を用いて、KvAP の膜電位依存的な構造変化様式を解明した。

また、電位依存性 K⁺チャネル(Kv)である hERG は、ヒト心臓に多く発現する電位依存性 K⁺チャネルであり、心室筋活動電位の再分極に重要な役割を果たしている。近年、hERG の開口状態の立体構造が低温電子顕微鏡により解明された。しかし、膜電位存在下での静止状態の hERG の構造は未解明であり、膜電位依存的なチャネル開閉機構は不明である。

これまでに、イソギンチャク由来ペプチド性毒素である Gating Modifier Toxin (GMT) が、静止状態の hERG-VSD を特異的に認識して hERG を阻害することが報告されている。閉構造を安定化するこの GMT は、hERG が静止状態にある膜電位存在下における hERG-VSD の構造を安定化すると考えられている。そこで、GMT と hERG-VSD との複合体の立体構造解析ができれば、これまで未解明だった膜電位存在下の hERG-VSD の立体構造を解明することができ、hERG の動作機構および分子認識機構の解明が可能となる。そこで、本研究では大腸菌発現系を用いたリコンビナント GMT の大量発現・調製法を確立し、GMT による hERG 阻害のメカニズムを解明した。

大澤 匡範	慶應義塾大学薬学部 教授	研究の立案、実施、構造生物学的解析、研究の 統括
横川真梨子	慶應義塾大学薬学部 講師	試料調製、性状解析、X線結晶構造解析・ NMRによる相互作用解析
秋元まどか	慶應義塾大学薬学部 助教	試料調製、性状解析、電気生理学的解析、 NMRによる相互作用解析

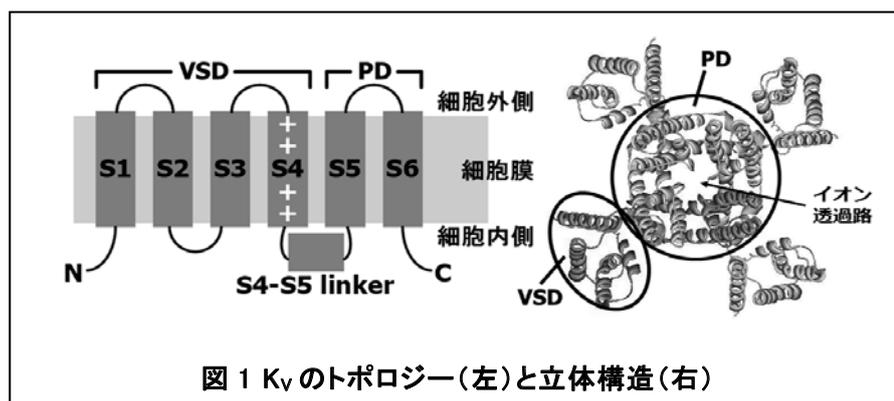
研究報告

I 研究目的

正常な心機能には、複数の電位依存性イオンチャンネルが適切なタイミングで機能することが必要である。特に、心臓における発現量・イオン透過量が大きく、正常な心機能に重要な役割を果たす電位依存性イオンチャンネルとして、電位依存性 Na^+ チャンネル(Nav)である Nav1.5、電位依存性 K^+ チャンネル(Kv)である hERG および KCNQ1、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(Cav)である Cav1.2 が知られている。これらのチャンネル機能が、遺伝的要因により低下している場合、または、投与薬物により阻害された場合、心電図における QT 間隔の延長を伴う不整脈が惹起される(Okada J. et al. *Sci. Adv.* 2015)。したがって、心臓のイオンチャンネルに特異的に作用し、その機能を賦活する薬物は、遺伝的チャンネル病の治療薬として有望である。また、阻害する化合物の分子認識機構を解明することができれば、催不整脈性という重篤な副作用を回避する戦略を立てる上でも非常に重要な知見を与える。

電位依存性イオンチャンネルは、イオン透過路を形成するポアドメイン(PD)と、膜電位変化を感受してイオン透過路をアロステリックに開閉する電位感受ドメイン(VSD)からなる

(図 1)。Kv は 6 本の膜貫通ヘリックスからなるサブユニットが 4 量体を形成して機能する。VSD には正電荷に富む S4 が膜電位依存的に膜中を移動し、“down state” と “up state”



との間で構造変化することで、アロステリックに PD のイオン透過路にあるゲートを開閉する。その結果、静止膜電位存在下では「閉構造」をとり、脱分極時には一過的な「透過性構造」を経て「透過性・不透過性構造の平衡状態」となり、不活性化と呼ばれる電流の減衰が観測される。すなわち、電位依存性イオンチャンネルは、これら 3 個の機能構造間を遷移することで機能する (Imai S. Osawa M. et al *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 2010)。

したがって、電位依存性イオンチャンネルの立体構造および分子認識様式は、機能構造ごとに解析する必要がある。しかしながら、これまでに結晶構造が報告されている電位依存

性イオンチャネルは膜電位のない状態で解析されるのみであり、膜電位存在下の機能構造を解明することは従来の構造生物学的手法では困難であった。

我々は、Kvのプロトタイプチャネルである KcsA において、透過性構造と不透性構造の平衡は、K⁺濃度や温度によりどちらかに偏らせることを見出した (Imai S. Osawa M. et al *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 2010)。まだ、古細菌由来の Kv である KvAP の VSD を用いて、膜電位依存的に近接する 2 残基それぞれに Cys を変異導入し、それらの間にジスルフィド(SS)結合を形成させることにより、各機能構造を安定化する手法を確立した。これらの知見より、電位依存性イオンチャネルの各機能構造を安定化できれば、機能構造毎の立体構造解析、および、各機能構造と阻害リガンドとの相互作用解析が可能であると考えた。

そこで本研究では、電位依存性イオンチャネルの機能構造選択的な構造生物学解析、および、リガンドが作用する機能構造やその上での結合部位を同定、結合様式の解明を通じて、不整脈の原因となる心臓の電位依存性イオンチャネルの機能および分子認識の構造メカニズムを解明することを目的とする。

解析対象として、古細菌由来の Kv であり、真核生物の Kv と構造・機能が良く類似している KvAP、および、催不整脈性に関わるヒト心臓の Kv である hERG を選んだ。

KvAP を用いた解析では、SS-locking 法により各機能構造を安定化することにより、電位依存性イオンチャネルに共通の膜電位依存的な構造変化様式の解明、および、阻害リガンドの機能構造選択的な相互作用様式の解明を目指した。

また、hERG を用いた解析では、未解明であるペプチド性リガンドの大量調製法の確立、hERG 阻害機構の解明、および、このリガンドと hERG との複合体の立体構造解析により、膜電位依存的な hERG の動作機構、および、機能構造選択的な阻害の構造基盤を得ることを目的とした。

II 研究計画及び材料と方法

(1) SS-locking 法による、KvAP の構造変化様式の解明

上述のように、電位依存性イオンチャネルの VSD 中の 4 番目のヘリックス S4 は、膜電位依存的に膜中を移動することが知られているが、その構造変化様式は未解明であった。そこで、KvAP-VSD の S1 の 4 残基のうちの一つと、S4 の 9 残基のうちの一つに Cys 変異を導入した 36 種類の変異体 (double Cys 変異体) をリボソームに再構成した試料を用いて、膜電位有り無しそれぞれの条件で、2 残基の Cys 残基間にジスルフィド(SS)結合が形成されるかどうかを調べた。両 Cys 残基の SH 基が近接したときのみ SS 結合が形成される。そこで、SS 結合が形成されずに残った SH 基をマレイミドポリエチレングリコール(Mal-PEG)で修飾し、分子量変化を SDS-PAGE のバンドシフトから検出した。これにより、膜中で近接する S1 と S4 の残基対を探索した。

さらに、KvAP 全長を用いて、S1 と S4 のそれぞれに 1 残基ずつ Cys 変異を導入した変

異体を 7 種類作成し、全長における近接残基対を探索した。

(2) SS-locking 法により機能構造を安定化した KvAP 変異体の大量調製と結晶化の試み

(1)で調製した KvAP 全長の double Cys 変異体の 1 つを、大腸菌により大量発現・精製する方法を確立した。SS-locking により機能構造を安定化するために、適切な酸化条件の検討を行った。

(3) hERG 阻害毒素の大量調製、阻害活性の電気生理解析

hERG の静止状態に結合することで阻害活性を発現するといわれているイソギンチャク由来の gating modifier toxin (GMT)の、大腸菌での大量発現系、変性巻き戻し・酸化によるジスルフィド結合形成を伴う精製法を確立した。また、GMT の hERG 阻害活性に重要な残基を同定するため、7 種類の残基を選び 1 残基ずつ Ala に置換した変異体を調製した。

得られた GMT およびその変異体の電気生理活性を、オートパッチクランプシステムにより解析した。

(4) hERG-VSD および hERG 全長の調製、NMR による構造解析

hERG 全長および hERG-VSD の GFP 融合体について、酵母を宿主とする大量発現・界面活性剤による可溶化を行った。可溶化した GFP 融合体について、GFP の蛍光を利用した蛍光サイズ排除クロマトグラフィー(FSEC)による性状解析を行った。

GMT を ^{15}N あるいは $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ で均一安定同位体標識を施し、各種 NMR 実験を行い、 ^1H , ^{13}C , ^{15}N シグナルの帰属を確立した。 $^2\text{H},^{15}\text{N}$ 標識 GMT を調製し、hERG-VSD との相互作用解析を行った。

III 研究成果

(1) SS-locking 法による、KvAP の構造変化様式の解明

調製した 36 種類の double-Cys 変異体を 1 種類ずつリポソームに再構成し、リポソーム内外の K^+ 濃度差を利用して膜電位を形成し、酸化剤の添加により分子内 SS 結合の形成を誘起した。その後、分子内 SS 結合の形成の有無を検出するために、変性させた VSD に maleimide polyethylene glycol (Mal-PEG) を添加することで、分子内 SS 結合を形成していない Cys の SH 基を修飾した。

その結果、図 2A に黒線で結んだ残基間に分子内 SS 結合が形成されたことが判明した。膜電位の有無に関わらず、S1 の V42 に対して S4 の N 末端側と C 末端側が SS 結合を形成すること、S4 中央部は SS 結合を形成しなかった。この結果は単一の構造からは説明できないことから、VSD は、V42 と S4 の C 末端側が近接した状態 (up state) と N 末端側が近接した状態 (down state) の間の平衡にあり中間的な状態はとらないこと、各 state において S4 に回転ゆらぎが存在していることが示唆された(図 2B)。また、膜電位非形成時にのみ V42-I130 が近接したことから、脱分極時には up state に平衡がシフトすること

が示唆された。(Nozaki T. et al. **Sci. Rep.** 2016)

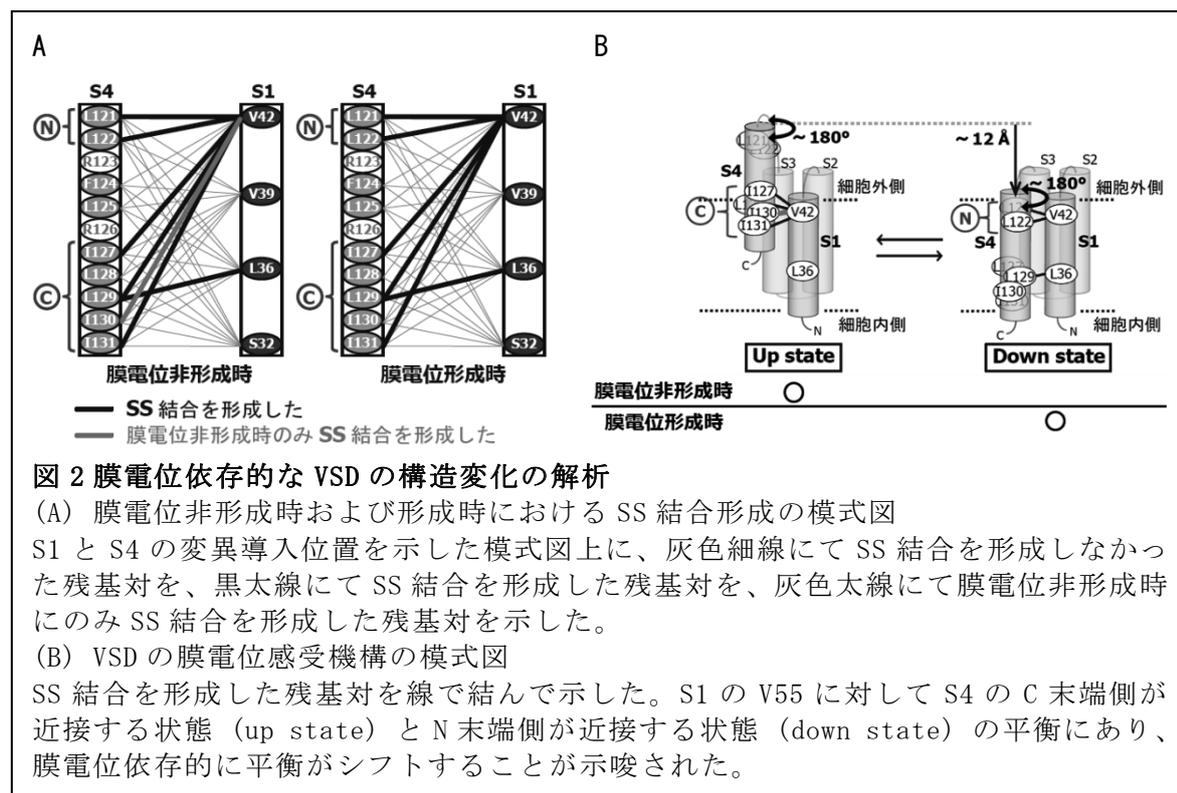


図 2 膜電位依存的な VSD の構造変化の解析

(A) 膜電位非形成時および形成時における SS 結合形成の模式図

S1 と S4 の変異導入位置を示した模式図上に、灰色細線にて SS 結合を形成しなかった残基対を、黒太線にて SS 結合を形成した残基対を、灰色太線にて膜電位非形成時にのみ SS 結合を形成した残基対を示した。

(B) VSD の膜電位感受機構の模式図

SS 結合を形成した残基対を線で結んで示した。S1 の V55 に対して S4 の C 末端側が近接する状態 (up state) と N 末端側が近接する状態 (down state) の平衡にあり、膜電位依存的に平衡がシフトすることが示唆された。

(2) SS-locking 法により機能構造を安定化した KvAP 変異体の大量調製と結晶化の試み

KvAP-VSD および全長の double Cys 変異体それぞれ 36 種類、7 種類を作成し、SS 結合により up-state もしくは down-state の立体構造の安定化を試みた。その結果、up-state を安定化する変異体は V42C/L127C および V42C/I130C、down-state を安定化する変異体は L36C/L129C および V42C/L121C であることが分かった。そこで、これらの変異体について大腸菌により大量発現・精製する方法、および、SS 結合形成のための最適な酸化条件の確立に成功した。

(3) hERG 阻害毒素の大量調製、阻害活性の電気生理解析

GMT については、イソギンチャクから精製した天然体の解析が報告されていたのみであったため、これまでは変異体を用いた活性残基の同定が困難であった。本研究において、我々はリコンビナント GMT の大量発現系を確立することにより、GMT の点変異体の調製法を確立することに成功した。

そこでまず、野生型 GMT について、哺乳類培養細胞 HEK293 を用いたパッチクランプ法により hERG 阻害活性を評価した。その結果、野生型 GMT の添加に伴って、hERG の活性化曲線は脱分極側 (右方) にシフトするとともに、hERG の最大電流が低下した。この電気生理活性の変化は、天然体 GMT と同等であり、我々が調製したリコンビナント GMT が天然体と同等の hERG 阻害活性を有することが分かった。GMT の「活性化曲線を

脱分極側にシフトさせる」性質は、GMT の結合が hERG の静止膜電位時の構造を安定化し活性化しにくくすることを示している。一方、「hERG の最大電流を低下させる」性質は、脱分極により活性化した hERG の電流透過活性を低下させており、GMT は活性化状態の hERG にも作用することが強く示唆される。

さらに、GMT の hERG 阻害活性に重要と推定されている 7 残基それぞれに変異を導入した変異体を調製し、野生型と同様に hERG 阻害活性を評価したところ、これらの 7 残基のうち、hERG の活性化曲線を脱分極側にシフトさせるのに重要な GMT 残基と、hERG の最大電流を低下させる GMT 残基は異なることが明らかとなった。このことは、hERG の静止状態の安定化に寄与する GMT 残基と、hERG の活性化状態への結合・hERG 電流阻害に寄与する残基が異なっていることを示しており、hERG の複数の機能構造を GMT 分子の異なる部位で認識し制御することが明らかとなった（投稿準備中）。

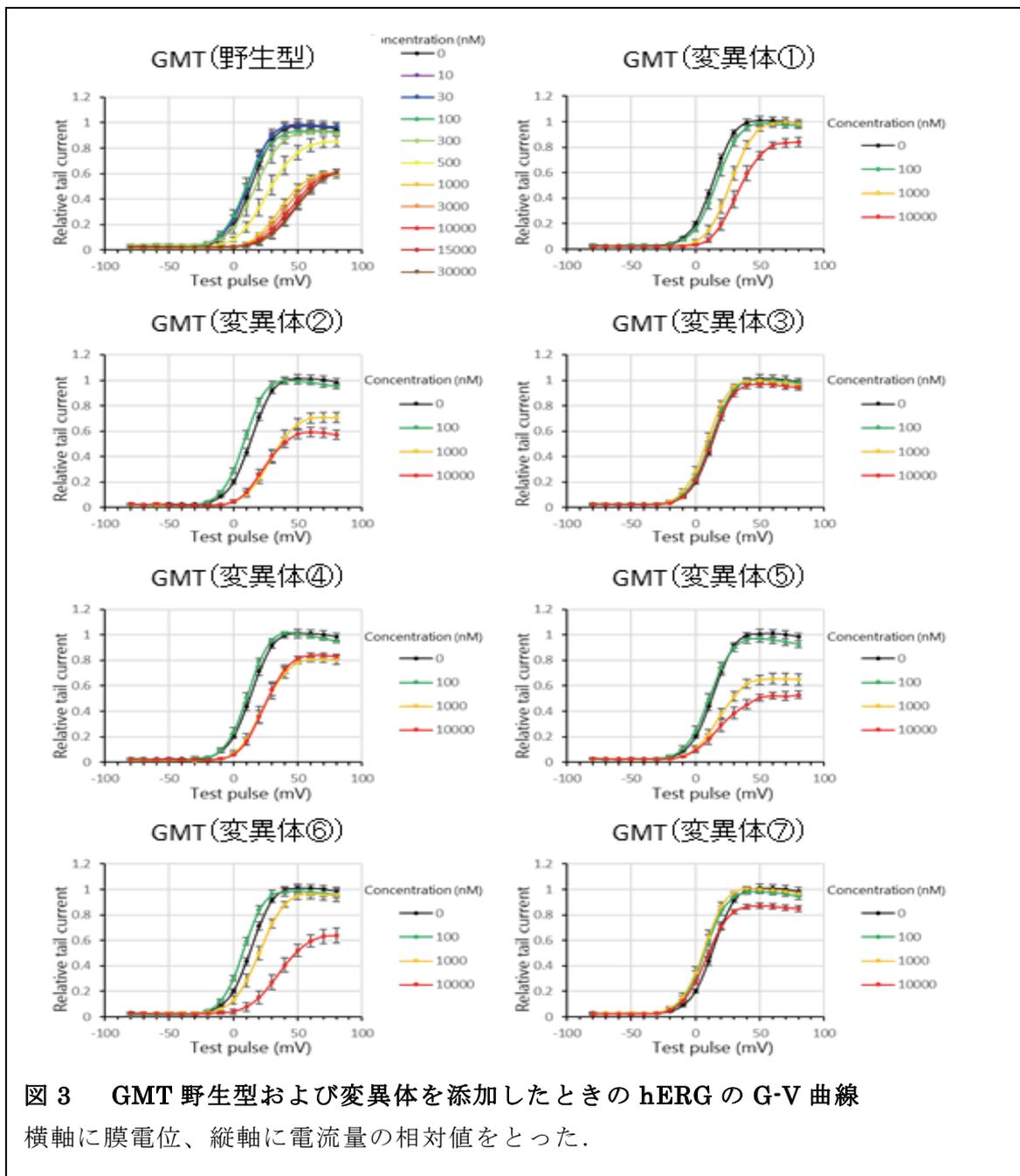


図3 GMT 野生型および変異体を添加したときの hERG の G-V 曲線
横軸に膜電位、縦軸に電流量の相対値をとった。

IV 考察

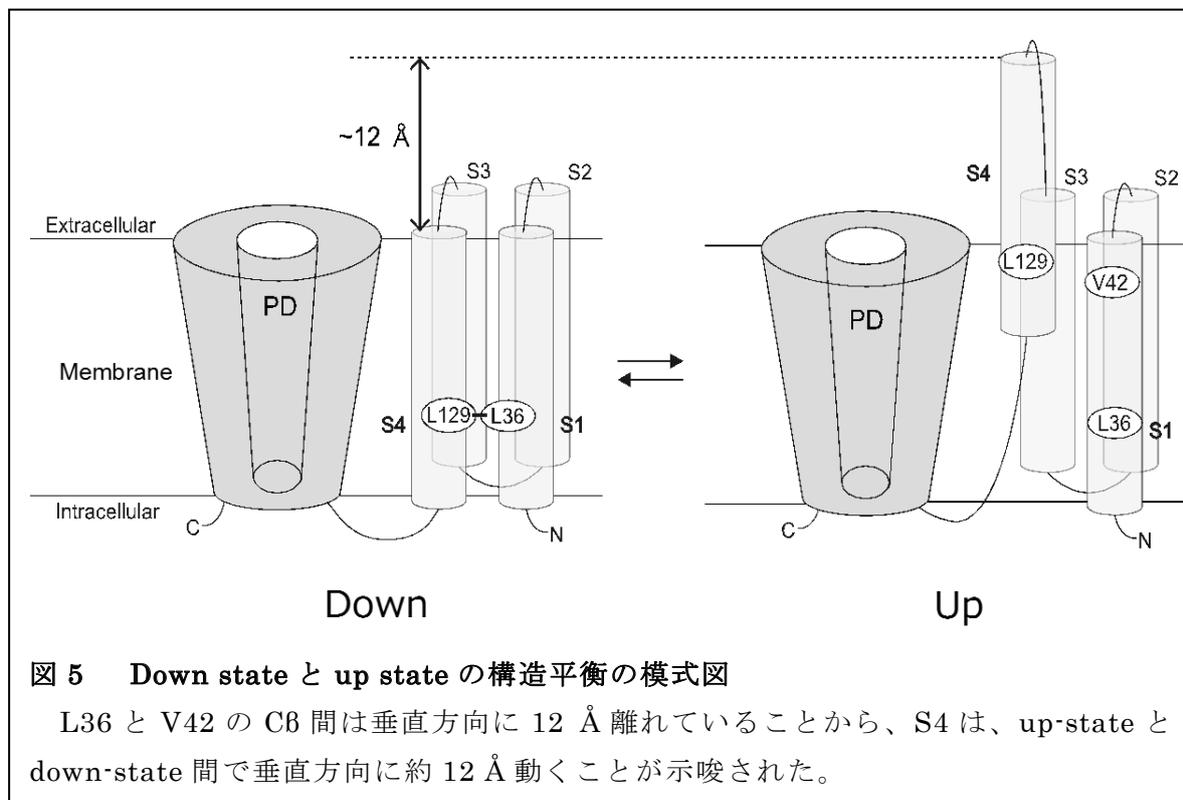
(1) SS-locking による KvAP の機能構造の安定化から示唆された機能発現メカニズム

Down-state の VSD の立体構造を安定化しうる Cys 変異 3 種 (L36C/L129C, V42C/L121C, V42C/L122C) をそれぞれ KvAP 全長に導入し、SS locking 法を適用したところ、L36C/L129C 変異体が最も分子内 SS 結合の形成効率が高いことが分かった。このことから、down-state においては、L36 と L129 が近づく構造がエネルギー的に安定であり、分子内 SS 結合を形成した KvAP (L36C/L129C) が閉状態の構造を最もよく模倣していることが示唆された。

Up-state においては、V42C/L129C 変異体において、SS 結合形成効率が最も高かったことから、この両残基が近接した構造が、up-state を最もよく模倣していることが示唆された。

これらの結果は、down-state と up-state の構造遷移が、S4 の L129 が S1 の L36 に近接した構造と、V42 に近接した構造との間に起こることを示唆している。L36 と V42 の C β 間は垂直方向に 12 Å 離れていることから、S4 は、up state と down state 間で垂直方向に約 12 Å 動くことが示唆された(図 5)。

S4 は S4-S5 リンカーを介してポアドメインの S5 に連続している。この S4-S5 リンカーは、ポアドメインにおいてゲート (ヘリックスバンドルクロッシング) を形成する S6 と接触している。S4 の動きにより、S4-S5 リンカーを介して S6 に構造変化を誘起し、ゲートの開閉をアロステリックに制御することが提唱されている。今回の解析により示唆された S4 の 12 Å の動きが、チャンネル開閉を制御していることが示唆された。



(2) hERG の膜電位依存的な動作機構、および、阻害メカニズム

今回用いた hERG を阻害する GMT は、静止状態の hERG に作用して安定化させると報告されているものであった。我々がリコンビナントとして大量調製法を確立した GMT 試料も同様に静止状態の hERG を安定化し、活性化しにくくするものであった。しかしながら、高電位（脱分極）側では電流が観測され、最大電流は GMT 非存在下の 1/2 程度に低下した。このことは、GMT は脱分極時に電流を通す「活性化状態」の hERG にも結合し、阻害することを示している。

また、リコンビナント GMT の調製に成功したことから、GMT の変異体により hERG 阻害に重要な残基の同定につながった。さらに、静止状態を安定化して活性化電位を高くするのに寄与する残基と、活性化電位には影響を与えないが活性化した状態での最大電流を下げるのに寄与する残基の同定に成功した。

今後、hERG とこの GMT との複合体の構造解析を行うことにより、GMT により安定化された静止状態の hERG の立体構造解析が可能となる。また、KvAP は構造平衡にあり、わずかな population は、hERG の活性化状態に GMT が結合している可能性もある。クライオ電子顕微鏡を用いて複合体の解析を行うことにより、複数の機能構造が同時に解明される可能性がある。

謝辞

本研究事業の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人車両競技公益資金記念財団に、心より感謝いたします。

V 研究成果の発表

1. Kano H, Yuki Toyama, Shunsuke Imai, Yuta Iwahashi, Yoko Mase, Mariko Yokogawa, Masanori Osawa, and Ichio Shimada. "Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel" **Nat Commun.** (2019)10, 1-13
2. Maruyama T, Imai S, Kusakizako T, Hattori M, Ishitani R, Nureki O, Ito K, Maturana AD, Shimada I, and Osawa M. "Functional roles of Mg²⁺ binding sites in ion-dependent gating of a Mg²⁺ channel, MgtE, revealed by solution NMR" **eLIFE** (2018)7, e31596.
3. Toyama Y, Kano H, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, and Shimada I. "Structural basis for the ethanol action on G-protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy." **Proc Natl Acad Sci USA** (2018)115(15), 3858-3863.
4. Sawazaki R, Imai S, Yokogawa M, Hosoda N, Hoshino S, Mio M, Mio K, Shimada I, and Osawa M. "Characterization of the multimeric structure of poly(A)-binding protein on a poly(A) tail." **Sci. Rep.**(2018) 8(1), 1455.
5. Toyama Y, Mase Y, Kano H, Yokogawa M, Osawa M, and Shimada I. "Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing protein-protein interactions", **Methods Mol Biol.** (2018) 1684, 115-128.
6. Toyama Y, Kano H, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, and Shimada I. "Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses." **Nat Commun.**(2017) 8, 14523.
7. Nozaki T, Ozawa SI, Harada H, Kimura T, Osawa M, and Shimada I. "Disulfide mapping the voltage-sensing mechanism of a voltage-dependent potassium channel." **Sci Rep.**(2016) 6, 37303.

高血糖及び圧受容器機能低下がもたらす心不全重症化機構の解明

研究課題名：高血糖及び圧受容器機能低下がもたらす心不全重症化機構の解明

所属機関 東京慈恵会医科大学附属病院 糖尿病・代謝・内分泌内科

研究者名 坂本 昌也

《研究の概要》

現在、様々な治療法が開発されているにも関わらず、依然として心不全死は増え続けている。特に糖尿病が合併した場合、心不全死亡率は一段と上昇する。糖尿病患者数の増加を鑑みても心不全のさらなる病態解明及び高血糖関与の詳細を明らかにする事は急務である。我々はアラキドン酸代謝酵素の一つである **12-lipoxygenase(以下 12LOX)** が既に糖尿病性心筋症の発症に重要な役割を果たすことを明らかにしている。しかし我々の過去の報告からも、心不全の発症、進展には血糖値や血圧値を低下のみでは、不十分であり、新たな残存リスク及び両者に共通の病態が存在し介入が望まれるが未だ不明である。

近年、血圧の絶対値である従来概念と異なった、「血圧変動の増大」が心血管イベント発症の新たなリスクである事が報告された。血圧変動増大には血圧調節のネガティブフィードバック系である圧受容器反射の障害が重要であることは判明しているが、心筋への増悪機序また高血糖関与は不明であった。

今回、我々は高血糖及び圧受容器機能低下がもたらす心不全重症化機構の解明を目的に In Vivo にて、圧受容器反射を低下させる手術 (Sino-aortic denervation 術；以下 SAD) を糖尿病モデル動物に施す事、また今回新規開発した装置により、In vitro にてラット心筋培養細胞に対して直接、間欠的負荷を与える事によって心筋細胞に対する影響が検討可能となった。結果、高血糖と圧負荷によるダブルストレスは長期的に心機能を低下させ、心不全へと至らしめる事が判明した。またそのメカニズムに関して、酸化ストレス (NOX4)、慢性炎症 (12-LOX) が関与している事も今回初めて明らかとなった。さらに、近年糖尿病患者において心不進展への予防効果があると報告されている、SGLT-2 阻害薬においても圧受容器機能が関与していることがわかった。圧受容器機能測定はヒトにおいても測定が可能となっているため、我々の本研究の結果を臨床にて確認した所、本研究のコンセプトは日常臨床への応用が可能となる事が示唆された。

坂本 昌也 東京慈恵会医科大学 研究統括・SAD/In vitro 装置開発

糖尿病・代謝・内分泌内科 准教授

鈴木 博史 東京慈恵会医科大学 12-LOX と圧受容器の役割解明

糖尿病・代謝・内分泌内科 助教

武田 憲彦 東京大学 心機能解析並びに酸化ストレスの機序解明

循環器内科 特任講師

研究報告

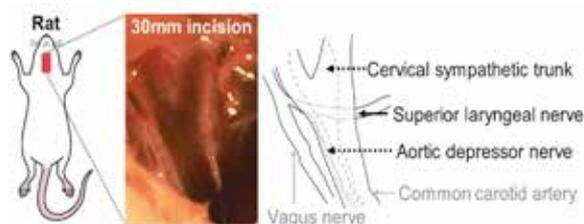
I. 研究目的

In Vivo 研究

糖尿病患者数並びに心不全の予後悪化に伴い、両者の研究は進んでいるが未だ決定的な治療法はなく、血糖低下などの対症療法が主流である。今回我々は両者に関わる、自律神経系に関わる、圧受容器機能をターゲットとして、その関連の有無並びに共通因子を検討する。

我々は既にアラキドン酸代謝酵素の一つである 12-lipoxygenase(以下 12LOX)が糖尿病性心筋症の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。さらに、12-LOX を心臓に特異的に発現させてマウスを開発している。

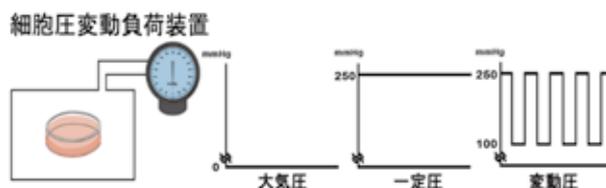
今回我々は、高血糖及び圧受容器機能低下がもたらす心不全重症化機構の解明を目的に In Vivo にて、圧受容器反射を低下させる手術（Sino-aortic denervation 術；



以下 SAD) を糖尿病モデル動物に施す事、さらには 12-LOX との関係性を 12-LOXKO マウス並びに 12-LOXTG マウスを用いる事によって解明する。これにはマウスに SAD 術を施す必要があるが、今までの所世界でもラットにしか成功しておらず、これを今回マウスにて実施する事が必要であるが、既に成功させており、マウス SAD モデルの確立を確固たるものにした上で研究を進める。

In vitro 研究

従来の方法では血圧変動を実現する in vitro モデルが存在せず、詳細を詰める手段を開発する必要があった。そこで申請者は、STREX 社との共同開発により



既に軟骨細胞などの圧負荷を測定する In vitro 装置を応用する事で、心筋細胞に加圧を加える in vitro モデルを新たに着手する事により、圧力そのものが心筋細胞において慢性炎症を引き起こすか否かの実験系を世界に先駆けて開発する事を目的としている。さらに装置に独自にプログラミングを開発する事により、今までなし得なかった、SAD 誘発心筋リモデリングに心筋細胞と心臓線維芽細胞のどちらが関与しているのかを解明する事も可能になると想定した。

本研究は上記知見を基に、圧受容器反応低下および血圧変動増大が血行動態に与える影響と心不全に至るまでの分子機構を解明し、さらに高血糖の関与を明らかにすることを目的としている。

さらに本研究の特徴として、実臨床において圧受容器機能はタスクフォースモニタ-装置によって測定が可能であり、基礎研究で得られた結果を臨床研究で、また臨床研究で実施されている結果の詳細を基礎研究へとフィードバックをかけながら進める事が出来る研究である事が特徴である。

II. 研究計画および材料と方法

In Vivo 研究

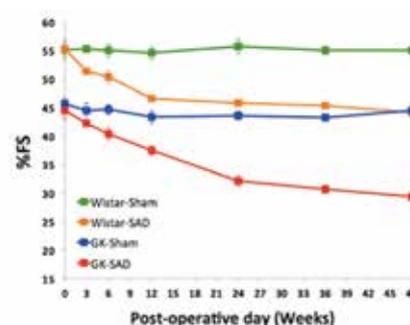
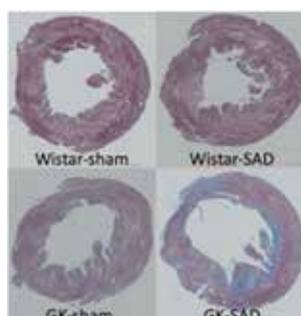
【ラットに対する SAD の心機能に及ぼす影響：長期観察（1年）による検討】

方法：血圧変動増大2型糖尿病ラット（SAD 施行 GK/Slc）に対し、心筋リモデリングの改善効果を検証する。心機能の確認は6週、12週、18週で心臓超音波検査を行い、摘出心から増悪分子を検証し、各種組織染色(4-HNE、12-LOX 免疫染色)も施行。

結果：SAD の施行で心機能が低下することは知られていたが、長期間経過を観察した報告はない。2型糖尿病モデル GK ラットでは SAD 施行時の心機能低下幅がより顕著で進行性であり、線維化の進行も著しいことが判明した。また、心筋組織内の 12LOX 発現は、GK-SAD 群で顕著に増加、その発現は SAD 後 12 週、1 年経過時も同等であり、慢性的な 12LOX の発現が認められた。さらにこ

れらは、直接的 12-LOX 阻害薬であるバイカレインで心筋線維化の予防が可能である可能性が示されている。

12-LOX が直接的に心臓に一定の役割を果たしているか否かについて In vivo で書

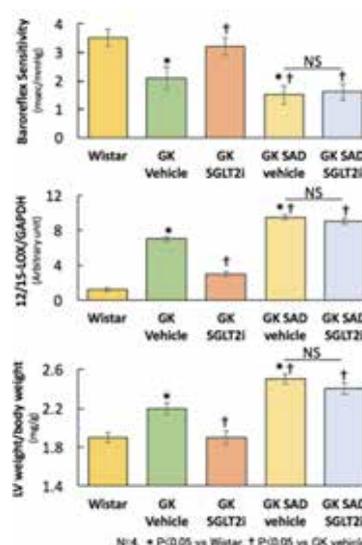


くするには心筋に特異的に 12-LOX を発現させたマウスあるいは特異的にノックアウトさせたマウスを使用する必要があるが、我々は心筋特異的に 12-LOX を発現させたマウスを開発しているため、これを用いることにした。また同時にマウスに SAD 術を作成することも世界に先駆けて成功した。SAD を 12-LOX TG マウスに施行し、心機能の低下程度を検討した。さらに、糖尿病性心筋症の Key factor である 12LOX を上昇させる、未だ不明な経路を特定する事を SGLT-2 阻害薬並びに酸化ストレス阻害薬を用いて検討をした。

【糖尿病モデルラット（GK ラット）における SGLT-2 阻害薬により心肥大改善が BRs,12-LOX を介しているか否かに関する検討】

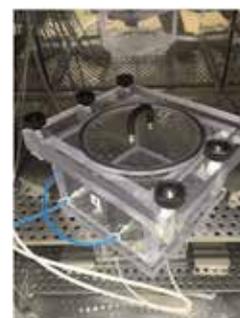
糖尿病患者において、SGLT2 阻害薬が CVD イベントリスクを改善させることが報告され

ているが、詳細な機序は不明である。そこで、SGLT2 阻害薬が BRS と心筋細胞での 12LOX 発現の低下を介して心筋肥大を改善するか否かの検討を行った。方法は、12 週齢の糖尿病モデルラット (GK/slc) に sham 手術と SAD を施し、18 週齢より 6 週間 SGLT-2 (Canagliflozin) を投与した。24 週齢で血圧テレメトリーを挿入し、2 日間 BRS を測定した後解剖を行い、心筋組織を解析した。結果は、sham 群に SGLT-2 を投与することで BRS, 12LOX, 心筋肥大を改善したが、SAD を施した群では、これらの効果は消失した。つまり、SGLT-2 が BRS 改善させ、12LOX 発現の低下を介して心筋肥大を改善させている可能性が示唆された。



【間欠的圧負荷における SGLT-2 阻害薬により心肥大改善が BRS, 12-LOX を介しているか否かに関する検討】

システム開発にあたり、大気圧を変更する方法を選択したが、様々な圧変化パターンにおいて、培養液中の溶存酸素濃度が一定とならない可能性があり、まず一定圧といくつかの変動圧パターンでの溶存酸素濃度が変化しないパターンを確立した。



次に心筋初代培養細胞に対して圧パターンを振り分けて NADPH oxidase の発現を確認したところ、一定圧に比べて半分の圧-時間曲線下面積であるはずの変動圧でも同程度に 12LOX と NOX4 の発現が亢進していることが明らかとなった。これは一定高圧状態よりも変動圧の方が細胞にとってストレスとなる可能性を示す知見であり臨床データ及び In Vivo data を裏付けするものである。

III. 研究成果

In vivo 研究

SAD の施行で心機能が低下することは知られていたが、長期間経過を観察した報告はない。2 型糖尿病モデル GK ラットでは SAD 施行時の心機能低下幅がより顕著で進行性であり、線維化の進行も著しいことが判明した。また、心筋組織内の 12LOX 発現は、GK-SAD 群で顕著に増加、その発現は SAD 後 12 週、1 年経過時も同等であり、慢性的な 12LOX の発現が認められた。さらにこれらは、直接的 12-LOX 阻害薬であるバイカレインで心筋線維化の予防が可能である可能性が示されている。

12-LOX が圧受容器機能と直接に心機能に関係しているか否かについて、心筋特異的 12-

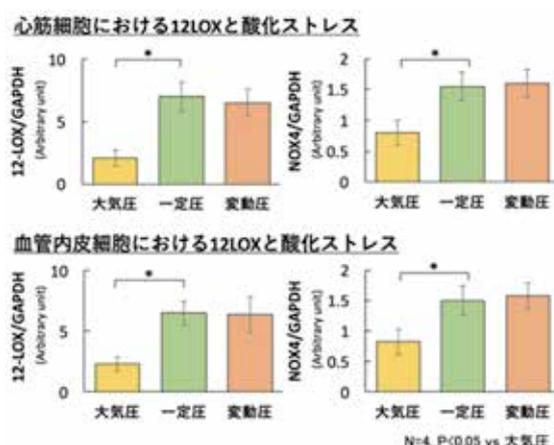
LOXTG マウスを用いて、SAD 術を施したところ、SAD 術後 12 週間後には野生型と比較して心機能が有意に低下している事が判明し、心臓における 12-LOX は圧受容器のターゲットである事が示唆された。

糖尿病患者において、SGLT2 阻害薬が CVD イベントリスクを改善させることが報告されているが、詳細な機序は不明である。そこで、SGLT2 阻害薬が BRS と心筋細胞での 12LOX 発現の低下を介して心筋肥大を改善するか否かの検討を行った。方法は、12 週齢の糖尿病モデルラット (GK/slc) に sham 手術と SAD を施し、18 週齢より 6 週間 SGLT-2 (Canagliflozin) を投与した。24 週齢で血圧テレメトリーを挿入し、2 日間 BRS を測定した後解剖を行い、心筋組織を解析した。結果は、sham 群に SGLT-2 を投与することで BRS, 12LOX, 心筋肥大を改善したが、SAD を施した群では、これらの効果は消失した。つまり、SGLT-2 が BRS 改善させ、12LOX 発現の低下を介して心筋肥大を改善させている可能性が示唆された。

In vitro 研究

In vitro 加圧変動モデルシステム開発にあたり、大気圧を変更する方法を選択したが、様々な圧変化パターンにおいて、培養液中の溶存酸素濃度が一定とならない可能性があり、まず一定圧といくつかの変動圧パターンでの溶存酸素濃度が変化しないパターン圧を確立した。

次に心筋初代培養細胞に対して圧パターンを振り分けて NADPH oxidase の発現を確認したところ、一定圧に比べて半分の圧-時間曲線下面積であるはずの変動圧でも同程度に 12LOX と NOX4 の発現が亢進していることが明らかとなった。これは一定高圧状態よりも変動圧の方が細胞にとってストレスとなる可能性を示す知見であり臨床データ及び In Vivo data を裏付けするものである。

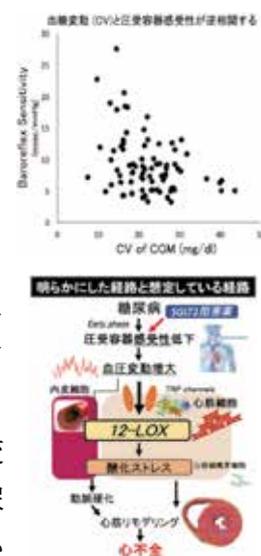


ヒトにおいては、2型糖尿病患者において、圧受容器の低下と24時間血糖変動並びに外来でのHbA1cのvisit-to-visitの変動と相関することもわかり、動物レベルでの分子機構の検証のさらなる発展を進める基盤となった(今後は血圧の変動との相関を進め、ヒト血液中の12-LOXの測定も検討する予定である)

IV. 考察

本研究により高血糖状態下における圧受容器の機能低下は血圧変動-アラキドン酸カスケードの 12-LOX といった炎症系を介して、機能を低下させる事が判明した。さらに In vitro 研究では、世界に先駆けて間欠的な圧が心筋細胞に直接的に関与している事を確認する事が出来た。本研究においては、圧受容器機能を直接破壊するため、2 型糖尿病患者において、そのような状態が起きるか否かについては検討出来ていなかったが、この研究を通して、その疑問に答えるべく、2 型糖尿病患者において、圧受容器の低下が低下しているかどうかについての検討も行ったところ、同患者においては、圧受容器機能が低下している事がわかり、さらに、24 時間血糖変動と負の相関することもわかった。この研究により、現在 2 型糖尿病患者において、心不全の進行を抑えるという報告がなされている、SGLT-2 阻害薬と圧受容器の関係性が関与していることに繋がった。現在の研究正解により、その可能性が明らかとなってきており、さらに研究を進める予定である。

本研究により、下記のような新たな経路が明らかとなり、これは高血糖の病態のみならず、高血圧患者や心不全患者においても応用出来る可能性がある。



V. 研究成果の発表

1. **Sakamoto M, Suzuki H et al.** Baroreflex failure aggravates diabetic cardiomyopathy in type 2 diabetic rats. (作中中：2019 年 9 月投稿予定) * (謝辞記載予定)
2. **Sakamoto M et al.** Clinical Implications of Baroreflex Sensitivity in Type 2 Diabetes. *Int Heart J.* 2019 Mar 20;60(2):241-246.
3. **Sakamoto M et al.** Possibility of a New Therapeutic Strategy for Left Ventricular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *J Clin Med Res.* 2018 Nov;10(11):799-805.
4. Matsutani D, **Sakamoto M**, Iuchi H, Minato S, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N, Horiuchi R, Utsunomiya K: Glycemic variability in continuous glucose monitoring is inversely associated with baroreflex sensitivity in type 2 diabetes: a preliminary report. *Cardiovascular diabetology* 2018, 17(1):36.
5. Matsutani D, **Sakamoto M**, Kayama Y, Takeda N, Horiuchi R, Utsunomiya K: Effect of canagliflozin on left ventricular diastolic function in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular diabetology* 2018, 17(1):73.
6. Matsutani D, **Sakamoto M**, Minato S, Kayama Y, Takeda N, Horiuchi R, Utsunomiya K: Visit-to-visit HbA1c variability is inversely related to baroreflex sensitivity independently of HbA1c value in type 2 diabetes. *Cardiovascular diabetology* 2018, 17(1):100.
7. Hayashi T, Shibata H, Kurihara I, Yokota K, Mitsuishi Y, Ohashi K, Murai-Takeda A, Jo R,

Ohyama T, **Sakamoto M**, Tojo K, Tajima N, Utsunomiya K, Itoh H. High Glucose Stimulates Mineralocorticoid Receptor Transcriptional Activity Through the Protein Kinase C β Signaling. *Int Heart J*. 2017. In press.

8. Iuchi H, **Sakamoto M**, Matsutani D, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N, Minamisawa S, Utsunomiya K. Time-dependent effects of ipragliflozin on behaviour and energy homeostasis in normal and type 2 diabetic rats: continuous glucose telemetry analysis. *Sci Rep*. 2017 ;7(1):11906.
9. Iuchi H, **Sakamoto M**, Matsutani D, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N, Utsunomiya K. Association between day-by-day and ambulatory blood pressure variability in type 2 diabetes patients. *Blood Press Monit*. 2017.

【禁無断転載】

令和元年 12 月発行

がん・心臓病の基礎的、先駆的研究事業報告書

発 行 公益財団法人 車両競技公益資金記念財団
東京都文京区本郷 3-22-5
住友不動産本郷ビル 8 階
電話 03-5844-3070(代表) <http://www.vecof.or.jp/>

発行者 深 澤 亘

印 刷 (株)サンワ

印刷 1.12.200

