
研究助成業績報告集

2025 年度 読売テレビチャリティ基金研究助成

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	心不全におけるD体アミノ酸代謝に関する基盤研究	池田 昌隆	1
2	構造生物学的アプローチによるK ⁺ 電流異常に起因するQT延長症候群の病態解明	糟谷 豪	3
3	がん化学療法による血管老化と駆出率保持型心不全の関連解明と治療法の探索	木谷 友哉	11

III. 結 果

DDO KO マウスの心臓において DDO タンパクの発現が消失していることを確認した。その上で、心不全モデルを作製した野生型マウスと DDO KO マウスについて、血圧、心機能（左室駆出率）、心重量・肺重量および心筋細胞死を比較・解析した。

なお、知的財産保護の観点から、具体的な結果の記載は割愛した。

IV. 考 察

本研究では、DDO KO マウスを用いて心不全モデルを作製・解析し、心不全における DDO の役割を検討した。得られた知見については、知的財産権の確保後に改めて論文等にて報告予定である。今後は、心不全における DDO および D 体アミノ酸代謝の役割とその分子機序について、さらに検討を進める予定である。

V. 結 論

DDO KO マウスを用いた心不全モデルの解析系を構築し、心不全における DDO の役割を検討した。詳細については、知的財産権の確保後に報告する予定である。

VI. 研究協力者

藤田理志・九州大学大学院医学研究院・大学院生

VII. 参考文献

- 1) Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K et al. D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\delta 2$ glutamate receptor. *Nat Neurosci* 2011;14:603-611.
- 2) The Human Protein Atlas. DDO tissue expression. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000203797-DDO/tissue>
- 3) Huang AS, Beigneux A, Weil ZM et al. D-aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. *J Neurosci* 2006;26:2814-2819.
- 4) Watanabe M, Ikeda M, Abe K et al. Excessive HIF-1 α driven by phospholipid metabolism causes septic cardiomyopathy through cytopathic hypoxia. *Nat Cardiovasc*

Res 2025;4:1077-1093.

- 5) Abe K, Ikeda M, Ide T et al. Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis. *Sci Signal* 2022;15:eabn8017.

構造生物学的アプローチによる K^+ 電流異常に起因する QT 延長症候群の病態解明

自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門・講師
糟谷 豪

I. 緒言

心臓の規則正しい収縮と弛緩は、心筋細胞における活動電位により精密に制御されており、その形成には多数のイオンチャネルや輸送体を介した電位依存性イオン電流が関与する。これらのイオン電流のうち、緩徐活性化遅延整流性 K^+ (I_{Ks}) 電流は心室筋の再分極過程を担う K^+ 電流であり、活動電位の持続期間を規定することで心電図上における QT 間隔の長さを決める重要な因子として知られている^{1,2}。

I_{Ks} 電流は電位依存性 K^+ チャネルの KCNQ1 (Kv7.1) と、機能調節タンパク質の KCNE1 の 2 種類の膜タンパク質が会合して形成する K^+ チャネルである KCNQ1-KCNE1 複合体により生じる。KCNQ1 チャネルは典型的な電位依存性 K^+ チャネルであり^{3,4}、そのサブユニットは細胞内外を横切る 6 本の膜貫通ヘリックスにより構成される。このうち、1 から 4 番目までの膜貫通ヘリックス (S1~S4) が細胞膜の電位変化を感知する電位センサードメイン (voltage-sensing domain : VSD) を、5 番目と 6 番目の膜貫通ヘリックス (S5~S6) が K^+ イオンを透過するポアドメイン (pore domain : PD) を担う (図 1A)。さらに、このサブユニットが 4 つ集まることで、中心にイオン透過孔を一つ持つチャネルを形成する⁵。特に、電位センサードメインを形成する 4 番目の膜貫通ヘリックス (S4) は正電荷のアミノ酸残基を複数含んでおり、主要な電位センサーとして機能する。一方で、KCNE1 は 1 回膜貫通型のタンパク質であり⁶、KCNQ1 チャネルに直接結合することで、その性質を大きく変化させ、 I_{Ks} 電流特有の性質をもたらす。具体的には、KCNE1 は KCNQ1 チャネルの電流量を増大させるとともに、活性化・脱活性化の速度を大きく遅延させる。また、電位依存性を正方向に大きくシフトさせる (図 1B)。これらの結果、 I_{Ks} 電流は心室筋における生理的再分極に適した“開閉の遅い電流”としての性質を獲得

する。

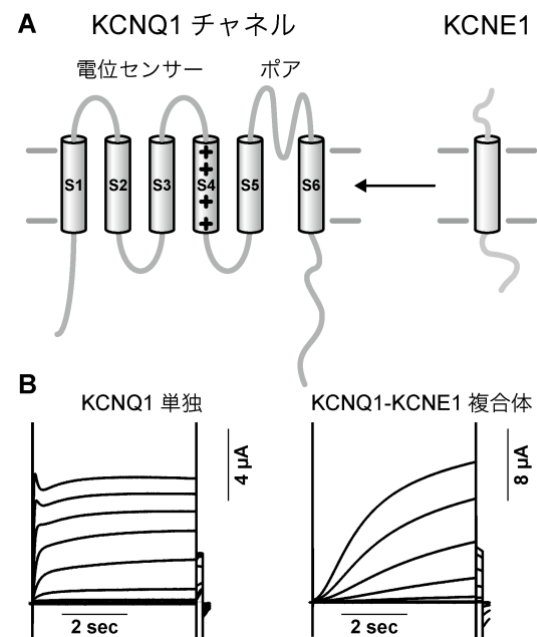


図 1 KCNQ1 チャネルおよびその機能調節タンパク質 KCNE1 のトポロジー (A) と、KCNQ1 単独と KCNQ1-KCNE1 複合体の電流 (B)

I_{Ks} 電流は正常な心臓リズム維持に必須であるため、KCNQ1 あるいは KCNE1 の機能異常は重篤な不整脈へ直結する。代表例として、KCNQ1 または KCNE1 遺伝子の機能喪失型変異は再分極を遅延させ、QT 間隔延長を特徴とする QT 延長症候群 (Long QT syndrome : LQTS) を引き起こす^{7,8}。このことから、KCNQ1 と KCNE1 遺伝子は LQT 関連遺伝子として分類されている (KCNQ1 : LQT1 ; KCNE1 : LQT5)。さらに、KCNQ1 では頻度は高くないものの機能獲得型変異も存在し、これらは I_{Ks} 電流を増強することで心房細動の素因となりうる事が報告されている^{9,10}。

したがって、 I_{Ks} 電流を構成する KCNQ1-KCNE1 複合体において KCNQ1 チャネルと機能調節タンパク質の KCNE1 がどのように会合するか、また

KCNQ1 や KCNE1 の疾患関連変異がどのようにして機能喪失や機能獲得をもたらすのかを分子レベルで理解することは、 I_{Ks} 電流を生物物理学的に理解することにとどまらず、LQTS や心房細動といった不整脈の病態理解と、将来的な治療戦略の基盤構築のために重要である。

そこで本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法 (single-particle cryo-electron microscopy : cryo-EM) による立体構造解析とアフリカツメガエル卵母細胞を用いた二本差し膜電位固定法 (two-electrode voltage clamp : TEVC) による電気生理学的機能解析を組み合わせることで、KCNQ1 と KCNE1 の QT 延長症候群や心房細動と関連する変異が KCNQ1-KCNE1 複合体の機能異常をもたらすとともに、それぞれの疾患を引き起こす分子機構を解明することを目的とした。

II. 対象・方法

本研究では、ヒト由来の KCNQ1 チャネルと機能調節タンパク質 KCNE1 が構成する KCNQ1-KCNE1 複合体を解析対象とした。野生型 KCNQ1-KCNE1 複合体に加え、LQTS との関連が報告されている KCNE1 変異体 (KCNE1 D76N)^{11,12} を含む機能喪失型の KCNQ1-KCNE1 複合体、および心房細動との関連が報告されている KCNQ1 変異体 (KCNQ1 S140G および KCNQ1 V141M) を含む機能獲得型の KCNQ1-KCNE1 複合体をそれぞれ作製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法 (single-particle cryo-electron microscopy : cryo-EM) による立体構造解析および二本差し膜電位固定法 (two-electrode voltage clamp : TEVC) による電気生理学的機能解析を行った。

cryo-EM 解析に用いる KCNQ1-KCNE1 複合体は、哺乳類細胞発現系を用いて発現させた¹³。構造解析の安定性および均一性を高めるため、KCNE1 の直後に KCNQ1 を融合し、更にその後ろにアフィニティ精製用の FLAG タグを挿入したコンストラクトを設計し、必須因子であるカルモジュリン (calmodulin : CaM) とともに共発現させた。発現後、界面活性剤を用いて膜タンパク質を可溶化し、FLAG タグを用いたアフィニティ精製およびゲルろ過クロマトグラフィーにより複合体を精製した。精製試料の品質は、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出プロファイルと SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。精製した試料をクライオ

電子顕微鏡用グリッドに急速凍結し、東京大学に設置された電子直接検出カメラ (K3 Bioquantum) を搭載した電子顕微鏡 (Titan Krios G4) を用いて、クライオ条件下で動画データ撮影を行った。取得したデータの処理は単粒子解析用解析ソフトウェア (cryoSPARC v4.6.0)¹⁴ を用いて行った。得られた最終密度マップに対してアミノ酸モデリングソフト (COOT v0.9.3)¹⁵ を用いてアミノ酸を当てはめ、精密化ソフト (PHENIX v1.19-4092)^{15,16} を用いて構造モデルの精密化を行った。

電気生理解析に用いる KCNQ1、KCNE1 (野生型および変異体)、KCNQ1-KCNE1 の融合コンストラクトは、これらの配列を鋳型として合成した相補 RNA (cRNA) をアフリカツメガエル卵母細胞に注入して発現させた¹⁷。電流の記録は TEVC 法を用いて室温下で行った。測定には増幅器 (OC-725C) を使用し、電圧固定プロトコルおよびデータ取得は、Digidata 1550 (Molecular Devices) および pCLAMP ソフトウェア (v10.7) を用いて行った。データは 10 kHz でサンプリングし、1 kHz のローパスフィルターを用いて解析した。膜電位は保持電位 -90 mV から、-100 mV から +60 mV まで 20 mV 刻みでステップさせて刺激した。パルス時間および測定間隔は、KCNQ1 単独では 2 秒 / 10 秒、KCNQ1-KCNE1 複合体では 5 秒 / 15 秒とした。保持電位 -90 mV における保持電流が -0.3 μ A を超える卵母細胞は解析から除外した。

III. 結果

まず、構造解析に用いる KCNQ1-KCNE1 の融合コンストラクトが、KCNQ1 チャネルと KCNE1 を別々に発現させた場合と同等の I_{Ks} 電流を発生する性質を保持しているかどうかを、電気生理解析により検証した。アフリカツメガエル卵母細胞において、KCNQ1 チャネルと KCNE1 の共発現および KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトをそれぞれ発現させ、電流を記録したところ、KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトは、KCNQ1 チャネルと KCNE1 を別々に共発現させた場合と同様に、“開閉の遅い” I_{Ks} 電流特有の電流波形および電位依存性を示した (図 2)。このことから、本融合コンストラクトは構造解析に適した機能を保持していると判断し、以降の立体構造解析に用いた。

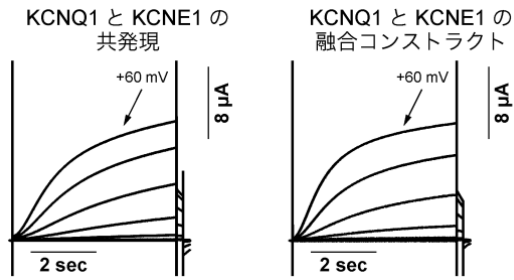


図2 KCNQ1 チャンネルと KCNE1 の共発現 (左) と KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクト (右) の電流

まず、この KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトを野生型として cryo-EM 解析により構造決定を行った。約 2800 枚の動画データを撮影し、約 3 Å の最終密度マップを得た (図 3)。

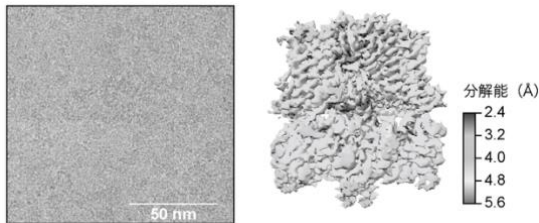


図3 KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトの撮影像 (左) と最終密度マップ (右)

その後、最終密度マップに対してアミノ酸を当てはめ、構造モデルの精密化を行った。得られた KCNQ1-KCNE1 複合体モデルにおいて、4 量体の KCNQ1 チャンネルの周囲に KCNE1 が 1 : 1 の割合で合計 4 分子結合した構造をとっていた。KCNE1 は各 KCNQ1 サブユニットの電位センサードメインのうち、1 番目の膜貫通ヘリックス (S1) に近接して配置されていた (図 4)。

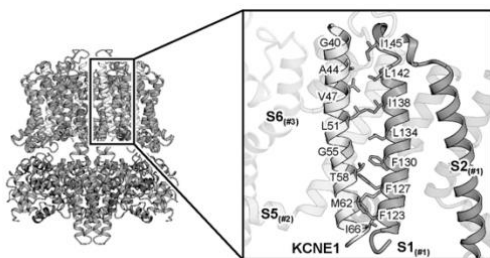


図4 得られた KCNQ1-KCNE1 複合体の構造 (左) と、膜貫通領域における KCNQ1 チャンネルと KCNE1 の相互作用部位 (右)

また、本構造においては KCNQ1 チャンネルがイオン透過孔を開くために必須の分子である膜脂質 (PIP₂) は観察されずイオン透過孔は閉じていた。また、KCNQ1 チャンネルの電位センサードメインは

活性化状態 (上側方向) へ移動した構造状態をとっていた。KCNQ1 チャンネルおよび KCNE1 の配置関係は、過去に決定された PIP₂ 非結合型のヒト由来 KCNQ1-KCNE3 複合体の構造と概ね一致していた¹⁸。

次に、QT 延長症候群 (LQTS) と関連する疾患関連変異を導入した KCNQ1-KCNE1 複合体について、野生型構造との比較解析を行った。今回解析対象とした KCNE1 D76N 変異は、KCNE1 の細胞内領域に位置する変異であり、KCNQ1-KCNE1 複合体の電位依存性を野生型と比べてさらに正方向へシフトさせ、生理条件下における I_{Ks} 電流量を低下させる機能喪失型変異として知られている^{11,12} (図 5 左)。まず、構造解析に用いた KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトに KCNE1 D76N 変異を導入し電気生理学的解析を行ったところ、野生型では顕著な外向き電流が確認される 0 mV の電位パルスにおいても、本変異体では電流は観察されなかった。さらに、+60 mV の電位パルスにおいても、野生型と比較して変異体の電流量は約半分に低下していた (図 2, 5 右)。すなわち、本融合コンストラクトにおいても、LQTS 関連変異による電位依存性の正方向シフトおよび I_{Ks} 電流の低下が再現された。以上の結果から、KCNE1 D76N 変異を導入した KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトは、LQTS における機能喪失型 I_{Ks} 電流異常の特性を保持していると判断し、以降の構造解析に用いた。

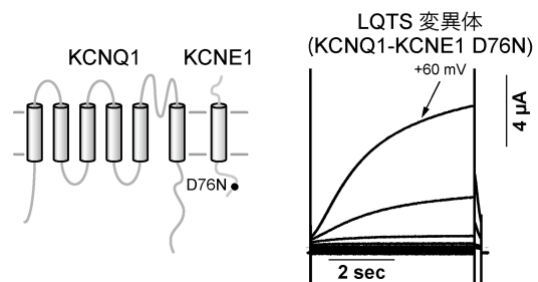


図5 LQTS 変異 (KCNE1 D76N) の位置 (左) と、本変異を導入した KCNQ1-KCNE1 D76N 融合コンストラクトの電流 (右)

そして、野生型と同一条件下で精製した KCNQ1-KCNE1 D76N 融合コンストラクトをクライオ電子顕微鏡用グリッドに急速凍結し、cryo-EM 単粒子解析により、KCNE1 D76N 変異が KCNQ1-KCNE1 複合体の立体構造に与える影響を解析した。野生型構造と同一の手法で動画データを取得し、最終的に約 2.9 Å 分解能の三次元密度マップを得た。

得られた密度マップに対してアミノ酸残基を当てはめ、構造モデルの構築および精密化を行った。

構築した KCNQ1-KCNE1 D76N 複合体モデルは、全体として野生型構造とよく一致しており、4量体の KCNQ1 チャネルの周囲に KCNE1 が 1:1 の割合で計 4 分子結合した構造をとっていた (図 6 左)。

一方で、KCNE1 D76N 変異を導入した細胞内領域周辺では電子密度が不明瞭であり、当該領域についてはアミノ酸残基をモデル化することができなかった。野生型および D76N 変異体の KCNQ1-KCNE1-CaM 単量体構造を重ね合わせたところ、アミノ酸主鎖原子の RMSD は約 0.8 Å であり、両者の全体構造に大きな差異は認められなかった (図 6 右)。

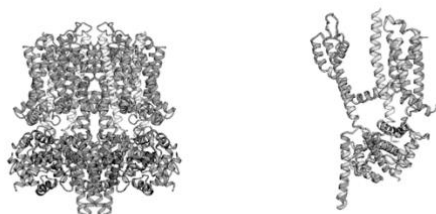


図 6 得られた LQTS 変異体 (KCNQ1-KCNE1 D76N) の全体構造 (左) と、野生型との単量体間の重ね合わせ (右)

次に、心房細動と関連する疾患関連変異を導入した KCNQ1-KCNE1 複合体について、野生型との比較解析を行った。今回解析対象とした KCNQ1 チャネルの S140G および V141M 変異は、いずれも KCNQ1 チャネルの 1 番目の膜貫通ヘリックス (S1) に位置する変異であり、KCNQ1-KCNE1 複合体の電位依存性を野生型と比べて負方向へシフトさせ、生理条件下における I_{Ks} 電流量を増加させる機能獲得型変異として知られている⁹⁻¹²。アミノ酸配列上において、S140G および V141M 変異は隣接しており (図 7 左)、いずれも KCNQ1-KCNE1 複合体の電位依存性を野生型と比べて負方向へシフトするという性質は変わらないものの、過去の電気生理学解析から、その仕組みは異なることが示唆されてきた。すなわち、KCNQ1 チャネルの S140G 変異は KCNE1 の有無に関わらず KCNQ1 チャネルの電位依存性を野生型と比べて負方向へシフトさせる一方で、KCNQ1 チャネルの V141M 変異は KCNQ1 チャネル単独では野生型に近い電位依存性を示すものの、KCNE1 存在下でのみ KCNQ1-KCNE1 複合体

の電位依存性を野生型と比べて負方向へシフトするということが知られている^{9,10,19} (図 7 右)。

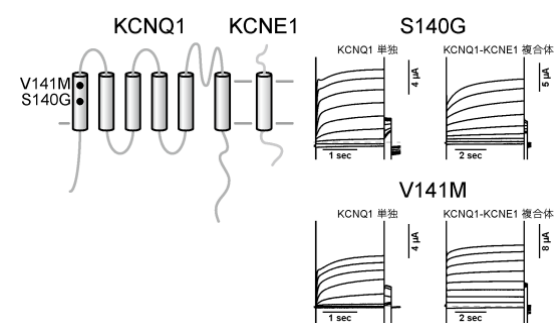


図 7 心房細動関連変異 (KCNQ1 S140G および V141M) の位置 (左) と、本変異をそれぞれ KCNQ1 チャネル単独もしくは KCNE1 と共発現した際の電流 (右)

そして、構造解析に用いた KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトに KCNQ1 S140G 変異および KCNQ1 V141M 変異を導入し電気生理学的解析を行ったところ、それぞれの KCNQ1 変異体を KCNE1 と共発現した場合と同様に (図 7)、野生型では顕著な外向き電流が確認されない負電位のパルスにおいても電流が観察された。すなわち、本融合コンストラクトにおいても、心房細動関連変異による電位依存性の負方向シフトおよび I_{Ks} 電流の増加が再現された (図 8)。以上の結果から、KCNQ1 S140G 変異、KCNQ1 V141M 変異をそれぞれ導入した KCNQ1-KCNE1 融合コンストラクトは、心房細動における機能獲得型 I_{Ks} 電流異常の特性を保持していると判断し、以降の構造解析に用いた。

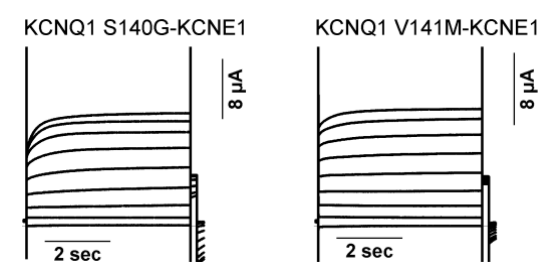


図 8 心房細動関連変異を導入した KCNQ1 S140G-KCNE1 融合コンストラクト (左) および KCNQ1 V141M-KCNE1 融合コンストラクト (右) の電流

まず、KCNQ1 S140G 変異が KCNQ1-KCNE1 複合体の立体構造に与える影響を解析した。野生型と同一条件下で精製した KCNQ1 S140G-KCNE1 融合コンストラクトをクライオ電子顕微鏡用グリッドに急速凍結し、cryo-EM 解析を行った。野生型構造と同一の手法で動画データを取得し、最終的に約

2.9 Å 分解能の三次元密度マップを得た。得られた KCNQ1 S140G-KCNE1 複合体の全体構造は、野生型と同様に 4 量体の KCNQ1 チャネルの周囲に KCNE1 が 1 : 1 の割合で結合した構造をとっており、電位センサードメインおよびポアドメインの全体的な配置に大きな破綻は認められなかった (図 9 左)。野生型および S140G 変異体の KCNQ1-KCNE1-CaM 単量体構造を重ね合わせたところ、アミノ酸主鎖原子の RMSD は約 0.8 Å であり、両者の全体構造に大きな差異は認められなかった (図 9 右)。

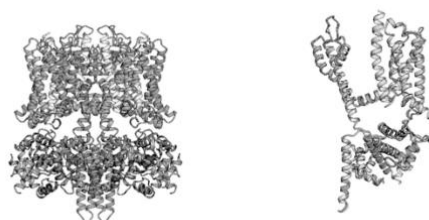


図 9 得られた心房細動関連変異体 (KCNQ1 S140G-KCNE1) の全体構造 (左) と、野生型との単量体間の重ね合わせ (右)

一方で、S140G 変異が導入された KCNQ1 チャネルの 1 番目の膜貫通ヘリックス (S1) 周辺に着目すると、野生型構造と比較して局所的な構造差が観察された。S140 残基がグリシンに置換されたことにより当該領域の側鎖体積が減少し、S1 周辺に空間的余裕が生じていた。その結果、S140 残基の持つ側鎖がなくなった結果により、スペースが生まれ、2 番目の膜貫通ヘリックス (S2) に存在する酸性アミノ酸 E160 と、主要な電位センサーとして機能する 4 番目の膜貫通ヘリックス (S4) に存在する塩基性アミノ酸 R237 との距離は、野生型構造では約 6.5 Å であったのに対し、S140G 変異体では約 3 Å まで近接していた。過去の電気生理学的解析により、これらの残基は電位センサードメインが活性化状態へ移行する際に近接し塩橋を形成することが知られている^{20,21}。本構造解析の結果は、S140G 変異体が電位センサードメインの活性化状態に対応する構造的特徴を示していることを示唆している (図 10)。

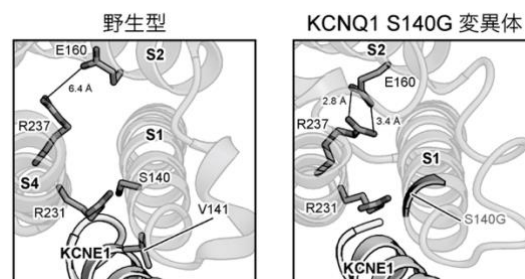


図 10 野生型 (KCNQ1-KCNE1) (左) および心房細動関連変異体 (KCNQ1 S140G-KCNE1) 変異体 (右) の電位センサードメインの拡大図。

次に、心房細動と関連するもう一つの KCNQ1 V141M 変異が KCNQ1-KCNE1 複合体の立体構造に与える影響を解析した。野生型と同一条件下で精製した KCNQ1 V141M-KCNE1 融合コンストラクトを用いて cryo-EM 解析を行った。野生型構造と同一の手法で動画データを取得し、最終的に約 2.8 Å 分解能の三次元密度マップを得た。得られた KCNQ1 V141M-KCNE1 複合体の全体構造は、野生型と同様に 4 量体の KCNQ1 チャネルの周囲に KCNE1 が 1 : 1 の割合で結合した構造をとっており、電位センサードメインおよびポアドメインの全体的な配置に大きな破綻は認められなかった (図 11 左)。野生型および V141M 変異体の KCNQ1-KCNE1-CaM 単量体構造を重ね合わせたところ、主鎖原子の RMSD は約 0.8 Å であり、両者の全体構造に大きな差異は認められなかった (図 11 右)。

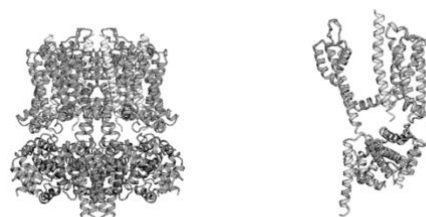


図 11 得られた心房細動関連変異体 (KCNQ1 V141M-KCNE1) の全体構造 (左) と、野生型との単量体間の重ね合わせ (右)

一方で、V141M 変異が導入された KCNQ1 チャネルの S1 膜貫通ヘリックス周辺に着目すると、野生型構造および先の S140G 変異体とは異なる局所的な構造変化が観察された。特に、V141M 変異残基は KCNE1 の膜貫通領域近傍に位置しており、その側鎖は KCNE1 の膜貫通領域側へ押し出される形で、2 番目および 4 番目の膜貫通ヘリックス (S2 および S4) 側を向いていた (図 12)。

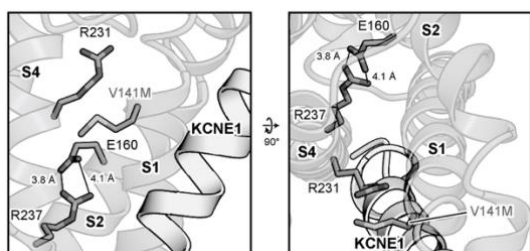


図 12 心房細動関連変異体 (KCNQ1 V141M-KCNE1) 変異体の電位センサードメインの拡大図。それぞれ膜貫通領域に並行な方向 (左) および細胞外側から見た方向 (右) からの表示。

その結果、電位センサードメインが活性化状態へ移行する際に近接し塩橋を形成する S2 に存在する酸性アミノ酸 E160 と、S4 に存在する塩基性アミノ酸 R237 との距離は、V141M 変異体では約 4 Å まで近接していた。さらに、野生型 KCNQ1-KCNE1 複合体および KCNQ1 単独構造との比較から、変異を導入した V141 残基は KCNE1 非存在下では外側を向いているのに対し、KCNE1 存在下では膜貫通領域側へ再配置されていることが明らかとなった (図 13)。以上の結果から、KCNQ1 V141M 変異は、KCNE1 存在下において電位センサードメイン近傍の局所的な構造配置に影響を与えていることが示された。

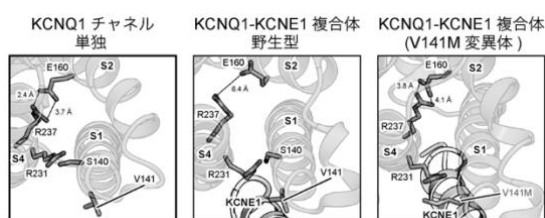


図 13 KCNQ1 チャンネル単独 (左)、KCNQ1-KCNE1 複合体 (野生型) (中)、および心房細動関連変異を有する KCNQ1-KCNE1 複合体 (KCNQ1 V141M) (右) における、V141 残基周辺構造の拡大比較図。

以上のように、心房細動関連変異である KCNQ1 S140G および V141M はいずれも I_{Ks} 電流の電位依存性を負方向へシフトさせるが、その構造基盤は異なっていることが示唆された。

IV. 考 察

本研究では、心室再分極を担う I_{Ks} 電流の分子実態を担う電位依存性 K^+ チャンネルの KCNQ1 と、機能調節タンパク質の KCNE1 の 2 種類の膜タンパク質が会合して形成する K^+ チャンネルである KCNQ1-KCNE1 複合体について、不整脈関連変異を対象に、

cryo-EM による立体構造解析と電気生理学的解析を組み合わせることで、機能異常の分子基盤を明らかにすることを試みた。

まず、LQTS 関連変異である KCNE1 D76N 変異について^{7,8}、電気生理学的解析により、 I_{Ks} 電流の電位依存性が正方向へシフトし、生理的膜電位範囲における電流量が低下する機能喪失型の性質が、構造解析に用いた融合コンストラクトにおいても再現されることを確認した。構造解析の結果、D76N 変異体は全体構造としては野生型 KCNQ1-KCNE1 複合体と良好に一致しており、電位センサードメインが活性化状態をとること自体は可能であることが示された。一方で、D76N 変異が導入された KCNE1 細胞内領域では電子密度が不明瞭であった。これらの結果は、D76N 変異による I_{Ks} 機能低下が、電位センサードメインの最終的な活性化そのものではなく、活性化過程やその安定化、さらにイオン透過孔が開く段階における調節異常に起因する可能性を示している。

次に、心房細動関連の機能獲得型変異である KCNQ1 S140G および V141M 変異について解析を行った^{9,10}。電気生理学的解析から、両変異はいずれも I_{Ks} 電流の電位依存性を負方向へシフトさせるという共通の表現型を示すが、その KCNE1 依存性は大きく異なることが知られていた。本研究の構造解析は、この機能的差異が明確に異なる構造基盤に基づくことを示した。S140G 変異では、KCNQ1 チャンネルの 1 番目の膜貫通ヘリックス (S1) における側鎖体積の減少により局所的な空間的余裕が生じ、電位センサードメイン内部において 2 番目の膜貫通ヘリックス (S2) に存在する酸性残基 E160 と 4 番目の膜貫通ヘリックス (S4) に存在する塩基性残基 R237 との距離が近接していた。これらの残基は、電位センサードメインが活性化状態へ移行する際に塩橋を形成することが知られており、S140G 変異体では、電位センサードメインが活性化状態に対応する構造配置をとりやすいことが示唆された。この結果は、S140G 変異が KCNE1 非依存的に電位依存性を負方向へシフトさせるという既報の機能的特徴と整合的である。

一方、V141M 変異では、全体構造や電位センサードメインの基本配置は野生型と大きく変わらないものの、V141M の側鎖が電位センサードメイン内側へ再配置され、電位センサードメイン近傍の局所的な構造配置に影響を与えていた。その結果、

S140G 変異体と同様に、E160 と R237 の距離が近接しており、電位センサードメインが活性化状態に対応する構造をとりやすい状態にあることが示された。これらの結果は、V141M 変異による機能獲得が KCNE1 との相互作用に依存して生じるという電気生理学的知見を、構造レベルで示唆するものである。

V. 結 論

以上のように、本研究は、同じ I_{Ks} 電流の電位依存性シフトという表現型であっても、QT 延長症候群 (LQTS) と心房細動関連変異において、その分子機構が異なることの構造生物学的基盤を提示した。LQTS 関連変異である KCNE1 D76N 変異では、電位センサードメインの最終的な活性化自体は可能であるものの、活性化過程やその安定化、あるいはイオン透過孔の開閉段階における調節異常が、 I_{Ks} 電流量低下の原因となる可能性が示された。一方、心房細動関連変異である KCNQ1 S140G および V141M 変異では、電位センサードメインが活性化状態に対応する構造配置をとりやすくなることが示され、機能獲得型の I_{Ks} 電流異常が構造的に裏づけられた。これらの結果は、KCNQ1-KCNE1 複合体における電位センサードメインの構造変化において、疾患関連変異が電位センサードメインの「どの段階の構造状態」に影響を与えるかによって、機能喪失あるいは機能獲得という異なる病態を引き起こすことを示唆している。

一方で、本研究で得られた構造は、いずれも電位センサードメインが活性化状態に近い構造を捉えたものであり、電位センサードメインが休止状態から活性化状態へと遷移する動的過程、さらに電位センサードメインが活性化状態に移動した後にイオン透過孔が開く段階の詳細については、未解明の点が多く残されている。特に、KCNQ1-KCNE1 複合体の機能発現には、膜リン脂質である PIP_2 の結合が不可欠であることが知られており、 PIP_2 は電位センサードメインとイオン透過孔の結合 (VSD-PD カップリング) を安定化する重要な因子と考えられている。LQTS 関連変異や心房細動関連変異が、 PIP_2 結合様式やその動態にどのような影響を与えるかについては、本研究では直接検証できておらず、今後の重要な課題である。

さらに、KCNE1 は電位センサードメインの運動やその状態間遷移を調節することが示唆されている

が、その調節機構が電位センサードメインのどの構造状態に作用しているのかについては、今回の構造解析からは明確な示唆を得ることができなかった。今後、 PIP_2 結合状態を制御した構造解析や、電位依存的な構造変化を捉える手法を組み合わせることで、 I_{Ks} チャネルの動的な制御機構がより包括的に理解されると期待される。これらの解析は、 I_{Ks} チャネル機能異常に基づく不整脈の病態理解を深めることが期待される。

VI. 研究協力者

中條 浩一	自治医科大学 教授
濡木 理	東京大学 教授
木瀬 孔明	東京大学 特任准教授
佐野 文哉	東京大学 特任助教
劉 嘉瑩	自治医科大学 大学院生
山之内 大地	東京大学 大学院生 (当時)
萩野 達也	東京大学 大学院生 (当時)
澤田 和宏	東京大学 大学院生
小林 敬光	東京大学 大学院生

VII. 参考文献

1. Grant, A. O. Cardiac ion channels. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **2**, 185–194 (2009).
2. Varró, A. *et al.* Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol. Rev.* **101**, 1083–1176 (2021).
3. Sanguinetti, M. C. *et al.* Coassembly of K (V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80–83 (1996).
4. Neyroud, N. *et al.* A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.* **15**, 186–189 (1997).
5. Long, S. B., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903 (2005).
6. Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current

- t. *Science* **242**, 1042–1045 (1988).
7. Kapplinger, J. D. *et al.* Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* **6**, 1297–1303 (2009).
8. Schwartz, P. J. *et al.* Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* **120**, 1761–1767 (2009).
9. Chan, P. J. *et al.* Characterization of KCNQ1 atrial fibrillation mutations reveals distinct dependence on KCNE1. *J. Gen. Physiol.* **139**, 135–144 (2012).
10. Peng, G., Barro-Soria, R., Sampson, K. J., Larsson, H. P. & Kass, R. S. Gating mechanisms underlying deactivation slowing by two KCNQ1 atrial fibrillation mutations. *Sci. Rep.* **7**, 45911 (2017).
11. Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehman, M. H., Sanguinetti, M. C. & Keating, M. T. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat. Genet.* **17**, 338–340 (1997).
12. Zou, X. *et al.* Pharmacological rescue of specific long QT variants of KCNQ1/KCNE1 channels. *Front. Physiol.* **13**, 902224 (2022).
13. Goehring, A. *et al.* Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nat. Protoc.* **9**, 2574–2585 (2014).
14. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. CryoSPARC: Algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **14**, 290–296 (2017).
15. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
16. Afonine, P. V. *et al.* Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 531–544 (2018).
17. Liman, E. R., Tytgat, J. & Hess, P. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861–871 (1992).
18. Sun, J. & MacKinnon, R. Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating. *Cell* **180**, 340–347 (2020).
19. Restier, L., Cheng, L. & Sanguinetti, M. C. Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels: KCNQ1 mutations in S1 domain. *J. Physiol.* **586**, 4179–4191 (2008).
20. Panaghi, G. & Abbott, G. W. The role of S4 charges in voltage-dependent and voltage-independent KCNQ1 potassium channel complexes. *J. Gen. Physiol.* **129**, 121–133 (2007).
21. Zaydman, M. A. *et al.* Domain–domain interactions determine the gating, permeation, pharmacology, and subunit modulation of the IKs ion channel. *Elife* **3**, e03606 (2014).

がん化学療法による血管老化と駆出率保持型心不全の関連解明と治療法の探索

—ドキシソルビシン誘導性血管内皮障害に着目した心不全発症機序と抗血管老化介入の検討—

京都府立医科大学循環器内科学・助教
木谷 友哉

I. 緒 言

がん罹患者の予後改善に伴い、ドキシソルビシンに代表される心毒性を有する薬剤による心血管障害が近年増加しており、循環器領域の診療において新たな問題となっている。申請者はこれまでに、がん化学療法による心筋障害と心不全について、特に心筋細胞に注目し、基礎的な研究を実施し新たな機序や治療標的を明らかにしてきた。(文献 1, 2) しかし、これまでの歴史的な経緯もあり、がん化学療法は心不全の中でも特に駆出率低下型心不全 (HFpEF) の発症を増加することは確立しているものの、HFpEF に対する影響は依然として不明である。

HFpEF は心不全患者の約半数を占めているが、現時点でも有効な治療方法は乏しく、さらなる治療介入標的の解明が必要とされている。HFpEF の発症危険因子は生活習慣病や加齢であり、HFpEF 患者では心筋の微小循環障害を認めることから、血管機能不全が HFpEF の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、この血管機能不全の進展には血管の老化が大きく寄与しているのではないかと想定されているものの、未だ確固たる証左は得られていない。(文献 3)

がん化学療法では、がん細胞の増殖停止が誘導される「がん治療誘導性細胞老化」が誘導されることが知られているが、同様にドキシソルビシンは培養細胞やマウスの正常な血管内皮細胞にも細胞老化様の変化を誘導することが既報や申請者らの事前検討によっても確認されている。共同研究者はこれまでも血管内皮細胞老化が血管老化および機能不全に重要であり、さらに様々な疾患を増悪させることを報告してきた。(文献 4, 5)

以上のことから申請者はがん化学療法、特に『ドキシソルビシンは血管内皮細胞の老化を促進し、HFpEF の発症リスクとなるのではないかと』と仮説を立て、共同研究者と協力しこれに取り組むこととした。

II. 対象・方法

【動物実験の承認および処置】

本研究における動物実験は、京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得て実施し、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に準拠して行った。心臓超音波検査は、フェイスマスクを用いた 2%イソフルラン麻酔下で実施した。実験終了時には、ペントバルビタールナトリウムの過量腹腔内投与、200 mg/kg、によりマウスを安楽死させ、その後、脱血により死亡を確認した。

【細胞培養】

ヒト血管内皮細胞モデルとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞、HUVEC を用いた。HUVEC は内皮細胞専用培地、HuMedia-EG2 (Kurabo) を用いて培養し、37°C、5% CO₂の加湿インキュベーター内で維持した。細胞は過度の継代による性質変化を避けるため、passage 5 から 10 の細胞を使用した。実験には、コンフルエントに近い状態まで増殖させた細胞を用い、各実験条件に応じて培地交換後に薬剤処理を行った。がん治療誘導性血管内皮細胞老化モデルを作製するため、HUVEC に低濃度ドキシソルビシンを短時間処理した。処理後、細胞を通常培地で培養し、ドキシソルビシン処理によって誘導される細胞老化様変化を評価した。

【細胞増殖実験】

HUVEC を 96 ウェルプレートに 1.0×10^3

cells/100 μ L/well の密度で播種し、各実験条件下で培養した。細胞増殖能および生存細胞数の評価には PrestoBlue Cell Viability Reagent を用いた。測定時に、PBS で10倍希釈した PrestoBlue 溶液 100 μ L を各ウェルに添加し、37°C、5% CO₂条件下で 30 分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー Infinite 200 PRO M Plex (TECAN) を用いて、製造元のプロトコールに従い蛍光強度を測定した。

【RNA 抽出および定量 PCR 解析】

マウス心臓組織および HUVEC から、Direct-zol RNA Kit (Zymo Research) を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA から、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて cDNA を合成した。定量リアルタイム PCR は、KAPA SYBR FAST qPCR kit を用い、CFX384 Real-Time PCR Detection System により実施した。各遺伝子の発現量は、ヒトサンプルでは ACTB、マウスサンプルでは Actb を内源性コントロールとして補正し、相対発現量として解析した。

使用したプライマーは以下の通りである。ヒト遺伝子については、ACTB は forward primer: CATGTACGTTGCTATCCAGGC、reverse primer: CTCCTTAATGTACGCACGAT、CDKN2A/p16 は forward primer: CACCAGAGGCAGTAACCATGCCCCG、reverse primer: GTAGGACCTTCGGTGACTGATGATC、CDKN1A/p21 は forward primer: GGAAGACCATGTGGACCTGTCACTG、reverse primer: AGATCAGCCGGCGTTTGGAGTGGTA、TP53 は forward primer: CAGCACATGACGGAGGTTGT、reverse primer: TCATCCAAATACTCCACACGC、ICAM1 は forward primer: ATGCCCAGACATCTGTGTCC、reverse primer: GGGGTCTCTATGCCCAACAA、IL1B は forward primer: AGCTGTACCCAGAGAGTCCTGTGCTGA、reverse primer: AGGAGAGCTGACTGTCTGGCTGATG、IL6 は forward primer: GAAGCTGCAGGCACAGAACCAGTGGC、reverse primer: CTGACCAGAAGAAGGAATGCCCAT、IL8 は forward primer: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC、reverse

primer: AACCCCTCTGCACCCAGTTTTTC を用いた。マウス遺伝子については、Actb は forward primer: GGCTGTATTTCCCTCCATCG、reverse primer: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT、Cdkn1a/p21 は forward primer: CCTGGTGATGTCCGACCTG、reverse primer: CCATGAGCGCATCGCAATC、Cdkn2a/p16 は forward primer: AACTCTTTTCGGTCGTACCCC、reverse primer: GCGTGCTTGAGCTGAAGCTA、Trp53 は forward primer: AGCCAGACGGATCTTGTGAG、reverse primer: TCCCGCACAGCAAACCTTTATC、Tgfb1 は forward primer: CTCCCGTGGCTTCTAGTGC、reverse primer: GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG、Tgfb2 は forward primer: CTTCGACGTGACAGACGCT、reverse primer: GCAGGGGCAGTGTAACCTTATT、Il6 は forward primer: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC、reverse primer: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC、Serpine1/PAI-1 は forward primer: GTCACCAACCGATTGACACAG、reverse primer: GGGACTCTTTACGCAACTGTT を用いた。

【マウスモデル作製および心機能評価】

C57BL/6J マウスは清水実験材料株式会社より購入した。6 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに対して、ドキシソルビシンを週 1 回腹腔内投与した。心機能評価は、18 から 38 MHz プローブを装着した VisualSonics Vevo 2100 system (VisualSonics, Toronto, Canada) を用いて経胸壁心臓超音波検査により行った。実験終了時にマウスを安楽死させ、心臓および各種組織を採取して解析に用いた。

HFpEF モデルは、高脂肪食および L-NAME 負荷により作製した。高脂肪食には 60 kcal% fat diet (D12492, SHIMIZU Laboratory Supplies Co., Ltd., Japan) を用いた。L-NAME 負荷には NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; Cat. No. 24540-74; Nacalai Tesque, Inc., Japan) を用い、0.5 g/L の濃度で飲水投与した。高脂肪食および L-NAME 含有飲水は原則として週 2 回交換し、実験期間中継続して負荷した。

【CRISPR スクリーニング】

血管内皮細胞における基礎的生存および増殖制御に関わる遺伝子を探索するため、HUVEC を用いた

CRISPR ノックアウトスクリーニングを行った。Epigenetic CRISPR knockout lentiviral library (Addgene #162256) を用い、 6.0×10^6 個の HUVEC を使用した。各レンチウイルスライブラリーは、 $4 \mu\text{g/mL}$ polybrene 存在下で、multiplicity of infection (MOI) 約 0.5 の条件で HUVEC に感染させた。感染 2 日後に、 $1 \mu\text{g/mL}$ puromycin で 2 日間薬剤選択を行った。薬剤選択後、一部の細胞をベースラインサンプルとして回収し、残りの細胞は puromycin 非存在下でさらに 10 日間培養した後に回収した。回収した細胞から、NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) を用いてゲノム DNA を抽出した。次世代シーケンス用ライブラリーは、既報に従い 3-step PCR 法により作製し、NovaSeq 6000 を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは、Cutadapt を用いてアダプター配列を除去した後、各ライブラリーの gRNA 配列情報に基づいてアライメントを行った。各 gRNA のリード数をもとに MAGeCK プログラムを用いて遺伝子ごとの RRA スコアを算出し、培養期間中に濃縮または減少した gRNA に対応する候補遺伝子を同定した。

Ⅲ. 結果

【ドキシソルビシン投与後のマウス心臓機能の変化】

既報およびこれまでの予備検討と一致して、野生型マウスにドキシソルビシン 5 mg/kg/週 を 5 週連続で腹腔内投与すると、著明な心機能低下および個体死を認めた。そこで本研究では、ドキシソルビシン投与による急性毒性ではなく、慢性期における左室拡張機能への影響を評価することを目的として、より低用量のドキシソルビシン 3 mg/kg を 1 回または 3 回腹腔内投与する条件を設定した。さらに、標準的な 2-hit HFpEF モデルである高脂肪食+L-NAME 負荷群を作製し、経時的な心臓超音波検査および体重測定を行った。

急性毒性モデルとは異なり、ドキシソルビシン 3 mg/kg の 1 回投与群および 3 回投与群では、明らかな体重減少は認められなかった。一方、2-hit HFpEF モデルでは、経過中に体重増加を認めた。(図 1)

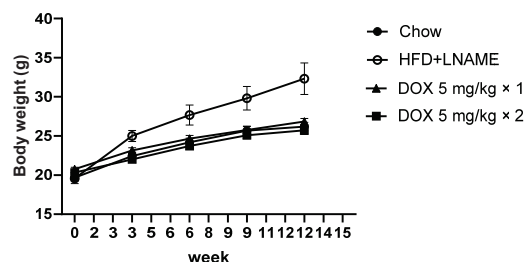


図 1 実験開始後のマウス体重の変化

心臓超音波検査では、ドキシソルビシン投与群において、ドキシソルビシン心毒性に特徴的な左室駆出率の一過性低下を認めた。しかし、左室駆出率は経時的に改善し、投与開始 12 週後にはほぼ正常範囲まで回復した。一方、2-hit HFpEF モデルでは、左室駆出率の明らかな低下は認められなかった。(図 2)

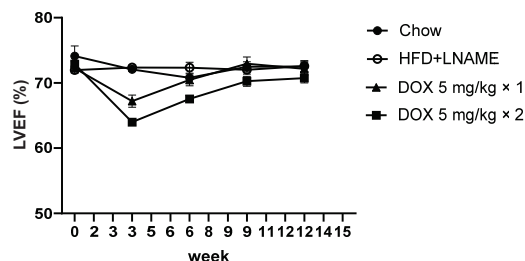


図 2 実験開始後のマウス左室駆出率の変化

左室拡張能の指標である E/e' は、2-hit HFpEF モデルにおいて持続的な上昇を認めた。ドキシソルビシン投与群においても、投与後に E/e' の上昇を認めたが、その後は徐々に低下し、投与開始 12 週後にはほぼ正常範囲まで回復した。(図 3)

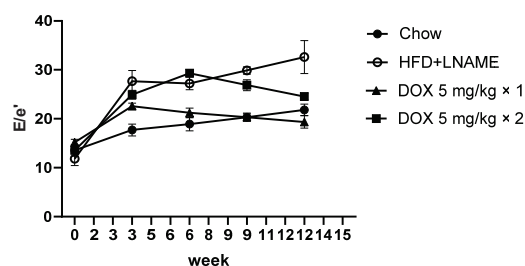


図 3 実験開始後のマウス左室拡張能の変化

さらに、ドキシソルビシン投与開始 12 週後にマウス心臓を回収し、qPCR により遺伝子発現解析を行った。その結果、ドキシソルビシン投与マウスでは、老化関連マーカーである Cdkn1a、Cdkn2a、Trp53、

Tgfb1、Tgfb2、Serpine1、Il6 などの発現上昇を認めた。(図 4)

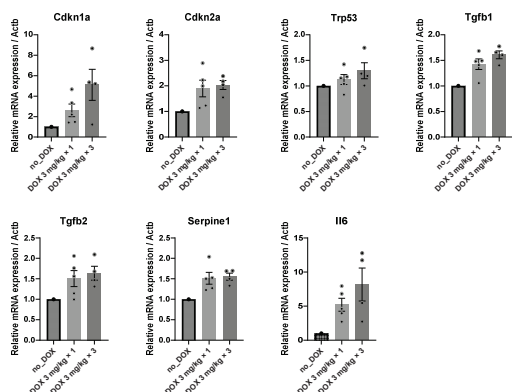


図 4 マウス心臓における遺伝子発現変化

【In vitro 血管内皮ドキソルビシン障害モデルと京丹後長寿研究より同定したアミノ酸 X の効果検証】

血管内皮細胞におけるドキソルビシンの慢性期影響を検討するため、HUVEC に対して 1 から 1000 nM のドキソルビシンで 1 時間処理し、その後 3 日間の細胞増殖を評価した。ドキソルビシン処理により、HUVEC の細胞増殖は濃度依存的に低下した。特に 1000 nM などの高濃度条件では、処理開始前と比較して明らかな細胞数の減少を認め、短時間処理であっても細胞死を誘導し得ることが示唆された。(図 5)

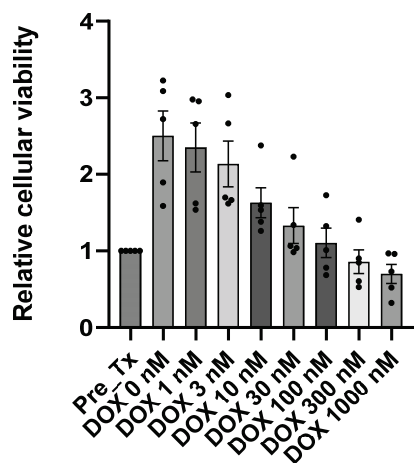


図 5 短時間ドキソルビシン刺激後の HUVEC 増殖能評価

次に、ドキソルビシン処理 3 日後に細胞を回収し、qPCR により mRNA 発現量を解析した。その結果、30 nM 以上のドキソルビシン処理条件において、

CDKN1A、CDKN2A、TP53 などの細胞老化関連マーカーの発現上昇を認めた。以上より、短時間かつ低濃度のドキソルビシン処理であっても、HUVEC に老化様変化を惹起し得ると考えられた。(図 6)

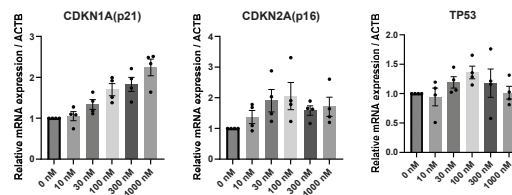


図 6 短時間ドキソルビシン刺激後の HUVEC における遺伝子発現変化

さらに、京都府立医科大学で実施している京丹後長寿コホート研究において新たに長寿関連物質として同定したアミノ酸 X が、ドキソルビシンによる血管内皮細胞障害に及ぼす影響を検討した。HUVEC をドキソルビシン 100 nM で 1 時間処理した後、アミノ酸 X を含む培地で 3 日間培養し、細胞を回収して qPCR により mRNA 発現量を解析した。

アミノ酸 X を含む培地で培養した HUVEC では、CDKN1A、CDKN2A、TP53 などの細胞障害および細胞老化関連マーカーの発現が低下する傾向を認めた。また、IL6 および IL1B などの炎症関連マーカーについても低下傾向を認めた。これらの結果から、アミノ酸 X はドキソルビシンによって誘導される血管内皮細胞障害および炎症性老化様変化を軽減する可能性が示唆された。(図 7)

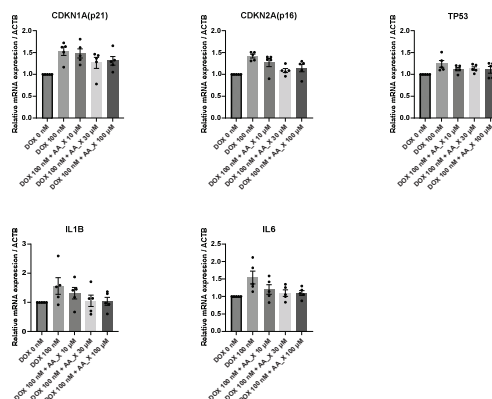


図 7 アミノ酸 X 存在下短時間ドキソルビシン刺激後の HUVEC における遺伝子発現変化

【CRISPR スクリーニング】

血管内皮細胞の基礎的な生存および増殖制御に関わる遺伝子を探索するため、HUVEC を用いて、エピゲノム制御因子を標的とした CRISPR ノックアウトスクリーニングを実施した。

Positive ranking、すなわちノックアウトにより細胞増殖が促進される遺伝子群では、代表的ながん抑制遺伝子であり「ゲノムの守護者」として知られる TP53 が最上位にランクされた。この結果は、細胞増殖抑制因子を同定する本スクリーニングの妥当性を支持するものと考えられた。FDR < 0.05 をカットオフとした場合、positive ranking では TP53 を含む 4 遺伝子が同定された。これらの遺伝子群には、これまで血管内皮細胞の増殖制御との関連が十分に報告されていない候補遺伝子も含まれており、現在、個別検証を進めている。なお、詳細な遺伝子名および解析結果については、今後の研究展開を考慮し、本報告書では非公表とする。(図 8)

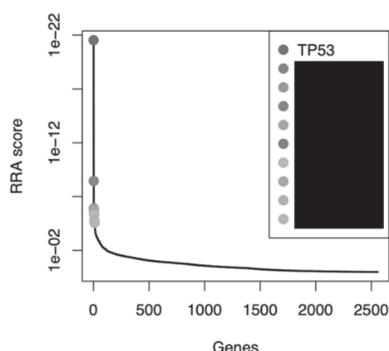


図 8 HUVEC を用いた CRISPR スクリーニング Positive ranking 結果

一方、negative ranking、すなわちノックアウトにより細胞数が減少する遺伝子群では、FDR < 0.05 をカットオフとした場合、186 遺伝子が同定された。これらの遺伝子群に対して GO 解析を行ったところ、転写制御を中心とするクロマチン依存的な遺伝子発現制御、および細胞周期制御に関連する項目が濃縮されていた。この結果は、HUVEC の基礎的な生存および増殖に必要な遺伝子群が negative ranking として抽出されたことを示しており、本スクリーニング結果は生物学的に妥当であると考えられた。(図 9)

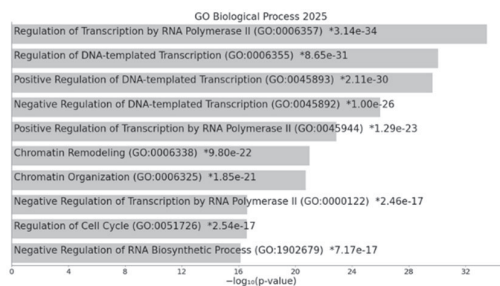


図 9 CRISPR スクリーニング Negative ranking より作成した GO 解析の結果

IV. 考 察

本研究では、がん化学療法による血管老化と駆出率保持型心不全、HFpEF、との関連を明らかにすることを目的として、ドキシソルビシン投与マウスモデル、HUVEC を用いた血管内皮細胞障害モデル、および CRISPR ノックアウトスクリーニングを用いた検討を行った。その結果、低用量ドキシソルビシン投与はマウスにおいて一過性の左室収縮能低下および左室拡張能指標の悪化を誘導したが、これらの変化は投与開始 12 週後にはおおむね正常範囲まで回復した。一方で、ドキシソルビシン投与後の心臓組織では、老化関連遺伝子および炎症、線維化関連遺伝子の発現上昇を認めた。また、HUVEC に対する短時間低濃度ドキシソルビシン処理は、細胞増殖低下と老化関連マーカーの上昇を誘導し、アミノ酸 X によりこれらの変化が軽減される傾向を認めた。さらに、HUVEC を用いた CRISPR スクリーニングでは、TP53 をはじめとする細胞増殖抑制因子および HUVEC の基礎的な生存、増殖に必要な候補遺伝子群が抽出された。

まず、マウスモデルの検討では、ドキシソルビシン 3 mg/kg の 1 回または 3 回投与により、急性毒性モデルでみられるような明らかな体重減少や高率の個体死は認められなかった。この条件では、ドキシソルビシン心毒性に特徴的な左室駆出率の一過性低下を認めたものの、慢性期には左室駆出率および E/e' はいずれもほぼ正常範囲まで回復した。したがって、本研究で用いた低用量ドキシソルビシン投与条件単独では、持続的な HFpEF 様病態を誘導するには不十分であった可能性がある。一方、高脂肪食と L-NAME 負荷を組み合わせたモデルは、代謝異常と NO 産生低下を介して HFpEF 様病態を誘導するモデルとして報告されている。(文献 6) 本研究においても、2-hit HFpEF モデルでは左室駆出率は保持

されたまま E/e'の持続的上昇を認めており、本実験系において HFpEF 様の拡張機能障害を評価できることが確認された。

しかし、ドキソルビシン投与マウスの心臓では、投与開始 12 週後においても Cdkn1a、Cdkn2a、Trp53、Tgfb1、Tgfb2、Serpine1、Il6 などの発現上昇を認めた。この結果は、心機能指標が見かけ上回復した慢性期においても、心臓組織内には細胞老化、炎症、線維化に関連する分子変化が残存している可能性を示している。HFpEF の病態では、生活習慣病や加齢などの併存因子に伴う全身性炎症および冠微小血管内皮障害が、心筋リモデリングや拡張機能障害に寄与するという概念が提唱されている。

(文献 7) したがって、低用量ドキソルビシン投与は単独では明らかな慢性期心機能障害を持続させないものの、心臓および血管組織に潜在的な老化様変化を残し、加齢、代謝異常、高血圧、内皮機能障害などの追加負荷が加わった際に HFpEF 発症を促進する素地を形成する可能性がある。

In vitro の検討では、HUVEC に対する 1 時間のドキソルビシン処理により、濃度依存的な細胞増殖低下を認めた。特に高濃度条件では処理開始前よりも細胞数が減少しており、短時間処理であっても細胞死を誘導し得ることが示唆された。一方、30 nM 以上の比較的低濃度条件でも CDKN1A、CDKN2A、TP53 などの老化関連マーカーの発現上昇を認めたことから、ドキソルビシンは急性細胞死のみならず、血管内皮細胞に遷延する老化様変化を誘導し得ると考えられた。この結果は、ドキソルビシンが心筋細胞だけでなく血管内皮細胞にも長期的な影響を与える可能性を支持するものであり、がん治療後の心血管障害を血管老化の観点から理解する上で重要である。

さらに、京丹後長寿コホート研究から同定されたアミノ酸 X は、ドキソルビシン処理後の HUVEC において、CDKN1A、CDKN2A、TP53 などの細胞障害および細胞老化関連マーカー、ならびに IL6、IL1B などの炎症関連マーカーを低下させる傾向を示した。この結果は、アミノ酸 X がドキソルビシン誘導性の血管内皮細胞障害および炎症性老化様変化を軽減する可能性を示唆している。ただし、現時点では主として遺伝子発現レベルでの変化であり、細胞増殖、遊走、管腔形成、SA- β -gal 染色、DNA 損傷応答、ミトコンドリア機能などの機能的評価を加えることで、アミノ酸 X の血管内皮保護作用をより

明確に示す必要がある。

CRISPR スクリーニングでは、HUVEC の基礎的な生存および増殖制御に関わる遺伝子群の探索を行った。Positive ranking では TP53 が最上位に同定され、ノックアウトにより細胞増殖が促進される因子として抽出された。TP53 は細胞周期停止、DNA 損傷応答、細胞老化に深く関与する代表的ながん抑制遺伝子であり、この結果は本スクリーニングが細胞増殖抑制因子を適切に検出できていることを示している。また、positive ranking で同定された他の候補遺伝子には、これまで血管内皮細胞の増殖制御との関連が十分に知られていないものも含まれており、血管内皮細胞の増殖、老化、障害応答を制御する新規因子である可能性がある。

一方、negative ranking では 186 遺伝子が同定され、GO 解析ではクロマチン依存的な遺伝子発現制御および細胞周期制御に関連する項目が濃縮されていた。これは、HUVEC の増殖および生存に必須の遺伝子群が適切に抽出されたことを示しており、本スクリーニングの生物学的妥当性を支持する結果である。今後は、これらの候補遺伝子について個別ノックアウトまたはノックダウン実験を行い、通常培養条件だけでなく、ドキソルビシン処理、酸化ストレス、炎症刺激などの血管障害条件下での役割を検証する必要がある。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、ドキソルビシン単独投与では慢性期に明らかな左室拡張機能障害の持続を認めなかったため、ドキソルビシンが単独で HFpEF を誘導することまでは示されていない。第二に、心臓組織全体を用いた遺伝子発現解析では、心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞などのどの細胞種に由来する変化かを明確に区別できない。第三に、HUVEC を用いた in vitro モデルはヒト血管内皮細胞の応答を評価する上で有用である一方、臓器特異的な微小血管内皮細胞や in vivo の複雑な血行動態、免疫応答、代謝環境を完全に反映するものではない。第四に、アミノ酸 X の効果は現時点では改善傾向にとどまっており、用量依存性、再現性、作用機序についてさらに検討が必要である。

以上より、本研究では、低用量ドキソルビシン投与が慢性期に持続的な HFpEF 様心機能障害を単独で誘導することは明確ではなかったものの、心臓組織および血管内皮細胞に老化、炎症、線維化に関連する分子変化を惹起する可能性が示された。また、

アミノ酸Xはドキソルビシン誘導性の血管内皮細胞障害を軽減する候補因子であり、CRISPR スクリーニングにより血管内皮細胞の生存、増殖を制御する新規候補遺伝子も同定された。今後、ドキソルビシン投与と 2-hit HFpEF 負荷を組み合わせたモデルや、血管内皮細胞特異的な解析を進めることで、がん化学療法による血管老化が HFpEF 発症に与える影響と、その治療標的としての意義をより明確にできると考えられる。

V. 結 論

本研究では、ドキソルビシンが血管内皮細胞および心臓組織に老化様変化を誘導し得ることを示した。また、アミノ酸 X はドキソルビシン誘導性の血管内皮細胞障害を軽減する候補因子である可能性が示唆された。CRISPR スクリーニングにより得られた候補遺伝子とあわせて、今後の抗血管老化治療標的の探索につながる成果と考えられる。

VI. 研究協力者

的場 聖明・京都府立医科大学循環器内科学・教授
池田 宏二・京都府立医科大学循環器内科学・特任教授

VII. 参考文献

- 1) Suga T, Kitani T, Kogure M, et al. Thosand and one amino acid protein kinase 1 suppression improves doxorubicin-induced cardiomyopathy by preventing cardiomyocyte death and dysfunction. *Cardiovasc Res* 2025 ; 121 : 601-613.
- 2) Kitani T, Ong SG, Lam CK, et al. Human-induced pluripotent stem cell model of trastuzumab-induced cardiac dysfunction in patients with breast cancer. *Circulation* 2019 ; 139 : 2451-2465.
- 3) Silva ED, Tomé I, Vasques-Nóvoa F, et al. Pharmacological clearance of senescent cells reduces inflammation, endothelial damage and cardiac fibrosis in HFpEF. *Cardiovasc Res* 2025 ; 121 : 2385-2403.
- 4) Ryanto GRT, Ikeda K, Miyagawa K, et al. An endothelial activin A-bone morphogenetic protein receptor type 2 link is overdriven in pulmonary hypertension. *Nat Commun* 2021 ; 12 : 1720.
- 5) Barinda AJ, Ikeda K, Nugroho DB, et al. Endothelial progeria induces adipose tissue senescence and impairs insulin sensitivity through senescence associated secretory phenotype. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 481.
- 6) Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 2019 ; 568 : 351-356.
- 7) Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction : comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013 ; 62 : 263-271.