The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	心筋組織リモデリングにおける新たな分子メカニズムの解析 ： 非心筋細胞を標的とした心不全治療の開発を目指して
Author(s)	熊谷, 渉平
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56186
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　熊谷　渉平　　）	
論文題名	心筋組織リモデリングにおける新たな分子メカニズムの解析 ―非心筋細胞を標的とした心不全治療の開発を目指して―

論文内容の要旨

［緒論］

近年、心血管病罹患患者数は世界的に増加している。心不全は心筋梗塞や心筋症などのあらゆる心疾患の終末像であり、心不全の発症、進展を予防することは臨床的に極めて重要である。心筋が虚血などのストレスにさらされ心機能が低下すると、代償的に神経体液性因子が活性化され、短期的には心機能は保持される。しかしながら、この代償性機構はいずれ破綻し、過度に心筋肥大や心筋線維化が進展することで、さらなる心機能の低下が引き起こされる。この一連の過程は心筋リモデリングと呼ばれ、心不全の病態形成に深く関与している。そのため、現在の心不全治療は神経体液性因子を抑制する薬剤、すなわちアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシンII受容体拮抗薬、またβアドレナリン受容体遮断薬が用いられている。しかし、それら薬剤を用いても、心不全患者の5年生存率は50%以下と未だ予後不良であり、新たなメカニズムによる心不全治療法の開発が求められている。

現在の治療法が、神経体液性因子の活性化阻害による心筋細胞傷害の抑制を標的としている一方、新規心不全治療法開発に向け、cytokineやgrowth factorによる心筋細胞保護を狙った研究がこれまで数多く行われている。また、iPS細胞由来心筋細胞や心筋幹細胞などを用いた心筋再生治療に関する研究も進んでいる。しかしながら、これら心筋細胞の保護や再生による心不全治療は、未だ臨床応用に至っていないのが現状である。

他方、近年、非心筋細胞による炎症反応や組織修復の制御が、心筋リモデリングの進展に深く関与していることが明らかにされつつあるが、その制御メカニズムは未だ不明な点が多い。よって、その詳細な分子機構の解明は新たな心不全治療法の開発につながるものと考えられる。

本論では、線維芽細胞及びミエロイド細胞による心筋リモデリング制御の分子メカニズムとして、それぞれ炎症関連分子であるP2X7受容体(P2X7R)及びleucine-rich α2 glycoprotein (LRG)シグナルを見出した。

［本論］

P2X7Rは、ATPや抗菌ペプチドであるcathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)により活性化される、リガンド開口型のイオンチャネルである。近年、ATP-P2X7Rシグナルがcryopyrin/apotosis speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)インフラマソームの活性化を誘導し、炎症反応を惹起することが報告されている。しかしながら、心筋リモデリングにおけるP2X7Rシグナルの役割は不明であり、その解明を試みた。

心疾患モデルとして、心筋梗塞(MI)モデルマウスを用いた。MIモデルマウスは、雄性C57BL6/Jマウスの左冠動脈前下行枝を結紮することにより作製した。まず初めに、MI後の心筋組織におけるP2X7Rの発現を、real time RT-PCR法により経時的に評価した結果、MI後4-7日目をピークに、その発現が上昇していた。MI後の心筋組織におけるP2X7Rの役割を検討すべく、P2X7R遺伝子欠損(KO)マウスを用いてMIを作製した。MI後14日目において、心エコーにより心機能を、マッソントリクローム染色により心筋線維化を評価した。その結果、野生型(WT)群に比べP2X7R KO群では、心機能が顕著に低下し、心筋線維化が有意に進行していることが明らかになった。従って、P2X7Rシグナルが心保護的に機能している可能性が示唆された。

MI後の心筋組織におけるP2X7Rシグナルによる心保護作用メカニズムを解明すべく、ASCインフラマソームの活性を評価した。MI後3日目の心筋組織からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法により検討した。その結果、WT群とP2X7R KO群の間でASCやIL-1βの発現に有意な差は認められなかった。このことから、MI後の心筋組織におけるASCインフラマソームの活性に、ATP-P2X7Rシグナルの関与は小さい可能性が示唆された。一方、P2X7Rの他のリガンドであるCAMPの発現がMI後の心筋組織において上昇することを見出した。このことから、MI後の心筋組織において、P2X7R及びそのリガンドCAMPの発現が上昇しており、CAMP-P2X7Rシグナルが誘導されている可能性が考えられた。そこで、

*in vitro*の系でCAMPの生理作用を検討した結果、CAMP刺激により心線維芽細胞の遊走が顕著に抑制されることを見出した。さらに、CAMPによる心線維芽細胞の遊走抑制作用は、P2X7R KOマウス由来の心線維芽細胞では消失することが明らかとなった。

以上の結果から、心筋梗塞後心筋組織において、CAMP-P2X7Rシグナルが心線維芽細胞の遊走を抑制し、心筋線維化を阻害することで、心不全病態の進行を抑止している可能性が示唆された。

他方、LRGは、ロイシンリッチリピート配列を有する糖タンパク質であり、1977年にヒト血清中から単離発見された。LRGは急性期タンパク質として知られており、IL-6やIL-1βなどの炎症性刺激により肝細胞から産生される。近年、関節リウマチやクローン病、潰瘍性大腸炎、悪性腫瘍など、多様な炎症性疾患における新規バイオマーカーとして同定された。また、心不全においても、現在用いられているB-type natriuretic peptide (BNP)同様、優れたバイオマーカーであることが報告された。しかしながら、バイオマーカーの領域における研究が盛んに行われている一方、LRGの分子機能や病態学的意義は十分には解明されていない。そこで、心筋組織リモデリングにおけるP2X7R及びLRGの病態学的意義を解明し、心不全治療ターゲットとしての可能性を検討することを目的とした。

まず初めに、MI後1-14日目の心筋組織におけるLRGの発現を、real time RT-PCR法及びウェスタンブロッティング法により経時的に評価した結果、その発現が持続的に上昇していることが明らかとなった。次に、LRGの産生細胞を同定することを目的に、蛍光免疫染色法を用いて各種細胞マーカーとLRGの共染色を行った。その結果、CD11b陽性ミエロイド細胞とLRG陽性細胞が高頻度で共局在を示し、LRGがミエロイド細胞から産生される可能性が示唆された。そこで、フローサイトメトリーを用いてさらに詳細な検討を行ったところ、CD11b陽性F4/80陰性の好中球及びCD11b陽性F4/80陽性のマクロファージ共に、LRGの発現が認められた。

そこで、MI後の心筋組織におけるLRGの役割を解明すべく、LRG KOマウスを用いてMIを作製した。MI後14日目において、心エコーにより心機能を、マッソントリクローム染色により心筋線維化を評価した結果、WT群に比べLRG KO群では、心機能が顕著に低下し、心筋線維化が有意に進行していることが明らかになった。よって、LRGがMI後の心筋組織において保護的に機能している可能性が示唆された。

LRG KO群におけるMI後のリモデリング悪化の要因を解明すべく、MI後のリモデリング悪化の要因を解明すべく、MI後の心筋組織における血管密度を免疫染色法により検討した。その結果、CD31陽性の血管内皮細胞密度がLRG KO群で有意に低下していることが明らかになった。このことから、LRGがMI後の心筋組織において血管新生作用を示す可能性が考えられた。そこで、血管新生機構をより詳細に解析すべく、apelin receptor (APJ)に着目した。APJは、発芽・伸長している血管内皮細胞特有のstalk cellに高発現しており、新生血管のマーカー分子である。その結果、WT群と比べLRG KO群において、APJ陽性血管が減少しており、またAPJ mRNA発現量も低下していることを見出した。さらに、血管新生シグナルの一つであるsmad1/5/8の発現をウェスタンブロッティング法により検討した。その結果、LRG KO群の心筋組織では、smad1/5/8シグナルが減弱していることが明らかとなった。以上のことから、LRGがMI後の心筋組織において、smad1/5/8シグナルを介して血管新生作用を示す可能性が示唆された。

本研究に用いたLRG KOマウスがConventional KOマウスであるため、ミエロイド細胞由来LRGの役割を検討するため、骨髄移植実験を実施した。γ線を照射し骨髄細胞を破壊したLRG KOマウスに、LRG KO又はWTマウス由来骨髄細胞を尾静脈より投与した。骨髄細胞の生着後、LRG KOマウス由来骨髄細胞移植マウス(KO→KO)及びWTマウス由来骨髄細胞移植マウス(WT→KO)にMIを施し、心筋リモデリングの評価を行った。その結果、WT→KO群において、MI後の心筋組織におけるLRGの発現が回復し、心機能や心筋線維化の増悪が改善した。さらに、KO→KO 群に比べWT→KO群において、血管密度が上昇していることが明らかになった。

以上の結果から、MI後の心筋組織において、LRGは浸潤ミエロイド細胞から産生され、周囲の血管内皮細胞に対しSmad1/5/8シグナルを誘導し、血管新生作用を示すことで、心保護的に働く可能性が示唆された。

[結論]

本研究では、炎症反応関連因子に着目し、心線維芽細胞及びミエロイド細胞といった非心筋細胞による心筋リモデリング制御の分子機構として、CAMP-P2X7Rシグナル及びLRGシグナルを見出した。これまで非心筋細胞を標的とした心不全治療は提案されていない。本研究は、心線維芽細胞、ミエロイド細胞を標的とする新たな治療を提案するものであり、新たなコンセプトに基づいた心不全治療の確立に貢献するものと期待する。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　熊谷渉平　）		
論文審査担当者		（職）　氏　名
	主 査	教授　藤尾　慈
	副 査	教授　八木清仁
	副 査	教授　辻川和丈

論文審査の結果の要旨

熊谷渉平君は、非心筋細胞による新規心筋リモデリング進展抑制機構として、

1. 線維芽細胞の遊走がP2X7受容体を介して抑制されること

2. 心筋組織に浸潤したミエロイド細胞がLRGを分泌し血管新生を促進すること

を見出した。これらの知見は、心不全治療における新規治療標的を提案するものであり、極めて独創性が高い。特に、非心筋細胞を標的とする心不全治療はこれまで提案されておらず、本研究は、心線維芽細胞、ミエロイド細胞を標的とする新規治療法を提案するという点で、新たなコンセプトに基づいた心不全治療の確立に貢献するものとして高く評価できる。

以上より、博士（薬科学）の学位論文に値するものと考える。