The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アドレナリンβ2受容体を介したIL-6発現誘導シグナルと心臓拡大メカニズムの解明 ー 治療標的としての心線維芽細胞 ー
Author(s)	田中, 翔大
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76496
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　（　田中　翔大　）	
論文題名	アドレナリンβ2受容体を介したIL-6発現誘導シグナルと心臓拡大メカニズムの解明 ― 治療標的としての心線維芽細胞 ―

論文内容の要旨

心疾患は、国内外問わず死亡者数の多くの割合を占めており、全ての心疾患の終末像である慢性心不全は、病態の進行に従って患者のQOL、および予後が著しく悪化することから特に問題視されている。そのため心不全の形成、および進行を阻止する新たな治療薬の開発が求められる。傷害を受けた心臓では炎症反応が惹起されるとともに、この炎症がさらに心病態を増悪させることが知られている。そのため心臓における炎症の抑制は新たな心疾患治療薬の開発につながる可能性があるが、その発生機序は完全には解明されていない。

心臓を構成する細胞は収縮能を持つ心筋細胞と構造を支持する非心筋細胞に大別され、非心筋細胞の中でも線維芽細胞は特に多くの割合を占めている。かつては心線維芽細胞の働きは、細胞そのもの、あるいは細胞から分泌された細胞外マトリクスが心臓の構造を支えることであると考えられていた。しかし昨今では様々なサイトカインや成長因子を分泌することで直接心機能を制御していると考えられている。一方、アドレナリンβ受容体(βAR)は心病態の形成、および心臓での炎症を引き起こすことが知られている。βAR阻害薬は慢性心不全の治療薬として広く用いられてきたが、近年、心筋細胞だけではなく心線維芽細胞に対する作用もその治療効果に貢献しているとして注目を集めている。当研究室ではこれまでに、心線維芽細胞に高発現しているβ2ARを遺伝子的に欠損させたβ2AR KOマウスにおいて、非選択的βAR刺激薬isoproterenol (ISO)の持続投与に伴う心病態の形成が抑制されること、ならびにβ2ARが欠損した心線維芽細胞ではISO刺激による心筋細胞拡大誘導因子の産生が抑制されることを明らかにしている。その機序の一端として、心線維芽細胞のβ2AR阻害による炎症の抑制が関与していることを着想した。

そこで、本検討では心線維芽細胞のβARシグナリングに伴う炎症性サイトカインの発現誘導メカニズム、および心線維芽細胞から産生された炎症性サイトカインが心病態に与える影響の解明を目指した。

成体マウスから単離・培養した心線維芽細胞にISOを処置し、時間経過に伴う炎症性サイトカインのmRNA量変化を調べた。その結果、Interleukin (IL)-6のmRNA量はISO刺激1時間後をピークに大きく増加した。一方でIL-1βとTumor necrosis factor (TNF)αのmRNA量はISOによる大きな増加が認められなかった。成体マウスの心線維芽細胞に発現しているβARのサブタイプを調べたところ、β2ARとβ3ARを高発現していた。そこで心線維芽細胞にβ2AR選択的刺激薬salbutamol (SAL)、あるいはβ3AR選択的刺激薬CL-316243を1時間処置し、各炎症性サイトカインのmRNA量を調べた。その結果、ISOと同様にSALは主にIL-6 mRNAを増加させたが、CL-316243はいずれのmRNA量もほとんど増加させなかった。また野生型の心線維芽細胞と比較して、β2ARが欠損した心線維芽細胞はISOによるIL-6 mRNAの増加が抑制された。さらに心線維芽細胞から産生された培養上清中のIL-6量は、SALの濃度依存的に増加した。

タンパク質の発現量はmRNAの合成と分解により調節されている。IL-6の発現を誘導する代表的な転写因子にNuclear factor-κB (NF-κB)が知られている。しかしISO、およびSALを処置した心線維芽細胞ではNF-κBの活性化が認められなかった。一方、AT-rich interactive domain-containing protein 5A (Arid5a)はIL-6 mRNAを安定化させることでIL-6の発現を増加させる因子である。そこでβ2AR刺激を受けた心線維芽細胞におけるIL-6 mRNAの増加にArid5aが関与しているのかを調べたところ、IL-6と同様にArid5a mRNAもISO刺激1時間後に発現量が最大になった。またArid5a mRNAはSALにより増加したが、CL-316243では増加しなかった。さらに野生型の心線維芽細胞と比較して、Arid5aが欠損した心線維芽細胞では定常条件、およびSAL刺激後のIL-6の発現が抑制された。

β2ARは主にアデニル酸シクラーゼの活性化を介してcAMPを増加させることでシグナルを伝達することが知られている。そこで心線維芽細胞にアデニル酸シクラーゼ活性化剤forskolin、およびcAMP前駆体bucladesine (dBcAMP)を処置したところ、どちらも濃度依存的にIL-6とArid5aのmRNA量を増加させたが、IL-1βとTNFαのmRNA量には影響しなかった。cAMPの下流シグナルとしてProtein kinase A (PKA)、ならびにcAMP response element binding protein (CREB)が関与しているかを検討した。PKA阻害剤H89の前処置により、SALによるArid5aとIL-6のmRNA量の増加が抑制された。またISO、SAL、およびdBcAMPによりCREBがリン酸化するとともに、CREB阻害剤666-15はSALによるArid5aとIL-6のmRNA量増加を抑制した。さらにSAL誘導性のCREBのリン酸化はH89により抑制された。なおCa^{2+}キレート剤であるBAPTA-AM

もSAL、およびdBcAMPによるArid5aとIL-6のmRNA量の増加を抑制したが、SAL誘導性のCREBのリン酸化は抑制しなかった。

続いて心線維芽細胞のβ2AR刺激が心筋細胞を拡大させる機序を調べた。PKA活性体サブユニットPKAcαを過剰発現させた心線維芽細胞から得られた培養上清は、対照群の心線維芽細胞由来の培養上清と比べて新生児ラット培養心筋細胞を拡大させた。ISO持続刺激を加えたマウスの心臓ではIL-6、Arid5a、ならびにIL-6受容体のmRNA量が増加した。また野生型マウスと比較して、IL-6 KOマウスではISOの持続刺激による左心室内径、ならびに心筋細胞の拡大が抑制された。さらにIL-6欠損心線維芽細胞はISOで刺激された後に得られた培養上清でも心筋細胞を拡大させなかった。

最後にSAL刺激を1時間加えたArid5a欠損心線維芽細胞についてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、Arid5aの欠損によりChemokine (C-C motif) ligand (CCL)7、およびCCL19の発現が抑制されることを明らかにした。

心線維芽細胞はβ2ARに刺激を受けることでcAMP/PKA/CREB経路を介したArid5aの発現を誘導し、IL-6の産生を亢進させることを明らかにした。またβ2AR刺激によるArid5aとIL-6の発現増加にはCa^{2+}シグナリングの活性化も関与していることを明らかにした。さらにβ2AR刺激を受けた心線維芽細胞から産生されるIL-6はパラクライン作用により心臓の拡大に寄与することを示した。本検討は、心線維芽細胞のβ2ARの阻害、ならびにArid5aの機能抑制によるIL-6の産生の抑制が新たな心疾患の治療標的になり得ることを示すものである。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　田中　翔大　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	藤尾　慈
	副 査	教授	辻川　和丈
	副 査	教授	橋本　均

論文審査の結果の要旨

本論文は、心線維芽細胞において、β2アドレナリン受容体刺激が、炎症性サイトカインIL-6を発現誘導する分子機序を解明し、その意義を明らかにしたものである。具体的には、本論文は、β2アドレナリン受容体刺激が、心線維芽細胞において、Arid5aを誘導しIL-6 mRNAを安定化させることによりIL-6の発現を亢進すること、心線維芽細胞が産生するIL-6は生体において心肥大を惹起することを述べている。本論文の新規性は、

1. これまでArid5aの機能解析は炎症細胞にほぼ限定されており、本論文は、非炎症細胞においてその重要性を最初に示したものであること。

2. 炎症細胞、非炎症細胞を問わず、β2アドレナリン受容体の下流でArid5aが発現制御されていることを初めて報告するものであること。

という点にあり、循環薬理学/薬物治療学において新たな概念を提唱するものと評価できる。

以上、本論文は心臓における新たなシグナル伝達経路を解明したものであり、得られた知見は、今後、心不全の新たな治療法の開発に寄与すると期待されることより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。