



Title	アドレナリン β 2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 ―
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

論文内容の要旨

氏 名 (田 中 翔 大)

論文題名

アドレナリン β 2 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 (β AR) 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。 β AR 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 β 2AR を遺伝子的に欠損させた β 2AR KO マウスにおいて、非選択的 β AR 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 β 2AR 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 β 2AR 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 β AR 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-1 β 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 β AR のサブタイプを調べたところ、 β 2AR と β 3AR を高発現していた。そこで心線維芽細胞に β 2AR 選択的刺激薬 salbutamol (SAL)、あるいは β 3AR 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、 β 2AR 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- κ B (NF- κ B) 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- κ B 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 β 2AR 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。

β 2AR 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-1 β と TNF α 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 β 2AR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PKAc α 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 β 2AR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 β 2AR刺激によるArid5aとIL-6の発現増加にはCa²⁺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 β 2AR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 β 2AR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。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (田 中 翔 大)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	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、$\beta 2$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、$\beta 2$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、$\beta 2$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。			