

令和元年5月7日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07751

研究課題名(和文) 心臓における β_3 交感神経受容体の発現解析および心筋線維化に関わる機序の解明研究課題名(英文) Expression of the β_3 adrenergic receptor in the heart and investigation of the mechanism regarding cardiac fibrosis

研究代表者

堀 泰智 (Yasutomo, Hori)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：20406896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：交感神経受容体(AR)には β_1 と β_2 のサブタイプがあり、 β_3 -ARには3つのサブタイプが存在している。この内、心血管系における β_3 -ARの局在が明らかとなり心不全の病態との関連性が注目されている。本研究では、左心室における β_3 -ARの発現量は極めて少なかったが、心臓線維芽細胞では発現が確認された。また、 β_3 -AR 作動薬は心臓線維芽細胞のp44/42 MAPK (pERK1/2)およびpCREB発現量を増加させたが、 β_3 -AR阻害薬はこれらを有意に抑制した。この結果は、 β_3 -ARはERK1/2ならびにCREBを介して細胞内シグナルを伝達していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに心臓線維芽細胞における β_3 -ARの局在は知られておらず、 β_3 交感神経受容体(AR)を介した心筋線維化のメカニズムは未知のままである。

本研究では、これまで知られていなかった心臓における β_3 交感神経受容体(AR)の局在を明らかにし、心臓線維芽細胞における細胞シグナル経路の一端を解明することができた。これらのことは β_3 -ARが心不全患者における心臓線維化の進行に関わっていることを示唆しており、 β_3 -ARの抑制を介した心不全治療の可能性が期待される。今後は心臓線維芽細胞における β_3 -ARとリモデリングに関する機能解析を行い、 β_3 -ARと心臓線維化の関係を解明する必要がある。

研究成果の概要(英文)：There are β_1 and β_2 subtypes in adrenergic receptor (AR), and 3 subtypes in β_3 -AR. Of these, the localization of β_3 -AR in the cardiovascular system has been clarified, and its pathological effects to the heart failure has been noted. In our study, the expression level of β_3 -AR in the left ventricle was extremely low, but the expression was confirmed in cardiac fibroblasts. In addition, β_3 -AR agonists increased the expression of the p44 / 42 MAPK (pERK1 / 2) and pCREB in cardiac fibroblasts, but β_3 -AR inhibitors significantly suppressed them. These results suggests that β_3 -AR transmits intracellular signals via ERK1 / 2 and CREB.

研究分野：循環器

キーワード：心不全 心臓線維化 交感神経受容体 β_3 受容体 心臓線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

心不全動物では交感神経の賦活化によってカテコラミンの分泌が上昇しており、心血管系に多く分布している交感神経受容体(AR)が刺激される。交感神経受容体には α と β のサブタイプがあり、さらに β -ARには3つのサブタイプ(β_1 , β_2 , β_3)が存在している。 β_1 -ARならびに β_2 -ARの慢性的な刺激は心筋細胞や心臓線維芽細胞の増殖・肥大、コラーゲン産生を誘導し、結果として心肥大や心筋線維化を誘起する。一方、 β -ARの阻害は心不全動物の心筋線維化を抑制し、心機能を改善することから、 β -ARは心不全の進展に深く関わっていると考えられる。

β_3 -ARは1980年代後半にクローニングされた新しい β -ARであり、脂肪細胞や平滑筋に多く発現しているため、当初は肥満や糖尿病の治療薬として注目されていた。しかし、近年では心血管系における β_3 -ARの局在が明らかとなり、生理学的機能や心不全の病態との関連性が注目されている。他の β -ARとは対照的に、 β_3 -ARは心血管系において一酸化窒素合成系や Ca^{2+} 調節系を介して陰性変力作用を発揮することが特徴である。心筋の β_3 -AR発現量は心不全患者や心不全モデル動物において増加しており、 β_3 -AR作動薬は心機能改善効果や抗不整脈作用を持つことから心血管保護効果が期待されている。しかし、心臓線維芽細胞における β_3 -ARの局在は知られておらず、 β_3 -ARを介したコラーゲン産生の調節機序は未だ解明されていない。従って、心筋線維化のメカニズムは十分に解明されておらず、心不全における β_3 -ARの病態生理学的意義は未知のままである。

2. 研究の目的

心臓線維芽細胞は心臓を構成する細胞数の約70%を占め、コラーゲン産生を通して心筋線維化の中心的役割を担っている。しかし、心臓線維芽細胞での β_3 -ARの局在は精査されておらず、 β_3 -ARを介したコラーゲン産生の調節機序は解明されていない。このことから、本研究では心臓線維芽細胞における β_3 -ARの局在を探索し、本受容体を介したコラーゲン合成に関するシグナル伝達経路を解析することで、 β_3 -ARを中心とした心筋線維化のメカニズムを解明する。また、 β_3 -ARの薬理的制御を通じた心筋線維化抑制の効果を解析することで、心筋線維化治療の臨床応用に向けた基礎的情報を集積する。

3. 研究の方法

ラット

4週齢のWister Kyoto ラット(雄)を使用した。

試薬

β_3 -AR作動薬(BRL37344)ならびに β_3 -AR阻害薬(SR59230A)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入した。

細胞培養

心臓線維芽細胞の初代分離培養には雄のWister Kyoto ラット(4週齢)を用い、

左心室を細切した後にコラゲナーゼ処理(60分)を行った。細胞浮遊液を濾過した後に上清を遠心分離し、沈渣に含まれる線維芽細胞は10%FBS加DMEMで培養した(37°C; 5% CO₂)。細胞は15,000~30,000 cells/wellになるように6穴プレートに播種し、24時間インキュベートした。その後、無血清DMEMに置換し、48時間インキュベートした細胞を実験に使用した。

ウェスタンブロット

細胞または左心室はライシスバッファーを用いて蛋白抽出を行い、4 µg/laneになるよう10%SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし電気泳動した。泳動後、ゲルはPVDF膜(Immobilon RP, Millipore, Bedford, MA)に転写し、1次抗体でオーバーナイトした。1次抗体にはanti-collagen-I, 1:500 (Rockland Immunochemicals)、phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)、p44/42 MAPK (ERK1/2)、phospho-CREB、CREB antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-β-actin, 1:1,000 (Santa Cruz Biotechnology)を使用した。

PVDF膜は2次抗体(1:10,000-20,000; Santa Cruz Biotechnology)でインキュベートし発光試薬(ECL plus Western blotting detection reagents; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を用いて発光した。

RT-PCR

細胞および左心室のRNAはTRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて抽出した。First-strand cDNAの合成にはTranscript First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)を用いた。Real-Time PCRにはStepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems)とSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。β₃受容体ならびにGAPDHのプライマーを設計し、PCRに用いた(図1)。

オリゴ名	塩基配列	length	
β ₃ -AR	TATGCCAACTCTGCCTTCAACC	292 bp	
β ₃ -AR	TTGCATCCATGGACGTTGCT		
GAPDH	GCCATCACTGCCACTCAGAAG	486 bp	
GAPDH	GTGGTCCAGGGTTTCTTACTCC		
プライマーセット	アニーリング温度	プライマー濃度	cycle数
β ₃ -AR	65°C	10µM (10倍希釈)	35
GAPDH	69°C	2µM (50倍希釈)	30

図1. β₃受容体ならびにGAPDHのプライマーとPCR条件

4. 研究成果

ラットの左心室ならびに心臓線維芽細胞におけるβ₃-AR発現の有無を解明するために、RT-PCR法ならびにウェスタンブロット法を用いてmRNA・蛋白質発現を解析した。RT-PCR法ではラット左心室におけるβ₃-AR mRNAの発現量は少なかったが、心臓線維芽細胞ではmRNA発現が確認された(図2左図)。同様に、β₃-AR蛋白質発現は心臓線維芽細胞においてのみ確認された(図2右図)。

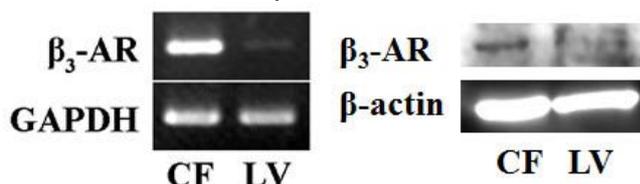


図2. 左心室(LV)ならびに心臓線維芽細胞(CF)におけるβ₃-ARの検出
左図はRT-PCR法、右図はウェスタンブロット法の結果を示している。

β₃-ARを介した細胞内へのシグナル伝達の有無を精査するために、異なる濃度

(10^{-6} ~ 10^{-4} M, 24h)の β_3 -AR 作動薬(BRL37344)を用いて心臓線維芽細胞を培養し、ウェスタンブロット法を用いて p44/42 MAPK 発現量の変化を精査した。BRL37344 に暴露した心臓線維芽細胞では濃度依存性に p44/42 MAPK (pERK1/2) の発現量が増加した。PL と比較して 10^{-5} M では pERK1/2 発現量に変化はみられなかったが、 10^{-5} M ならびに 10^{-4} M では有意に発現量が増加した(図 3)。しかし、コラーゲン I 発現量に有意な変化はみられなかった。

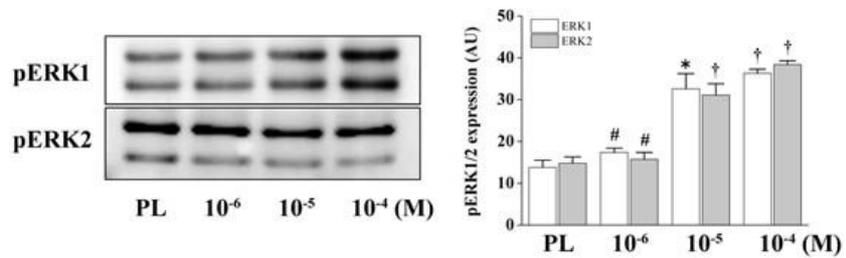


図3. β_3 -AR作動薬(BRL37344)で刺激した心臓線維芽細胞におけるp44/42 MAPK発現量の変化

*; $P < 0.05$ vs PL, †; $P < 0.01$ vs PL, #; $P < 0.01$ vs 10^{-5} M and 10^{-4} M.

次に、 10^{-4} M の BRL37344 を用いて β_3 -AR を刺激した時の指摘時間を検索するために、異なる培養時間 (0, 10, 30, 120 min)で心臓線維芽細胞を培養し、ウェスタンブロット法を用いて p44/42 MAPK 発現量を精査した。BRL37344 添加 10 分後には pERK1/2 の最も強いシグナルが認められ、0 分と比べて p44/42 MAPK 発現量は有意に上昇していた(図 4)。一方、30 分以降では p44/42 MAPK 発現量が 0 分と同等であり、10 分と比べて有意に低値を示した。

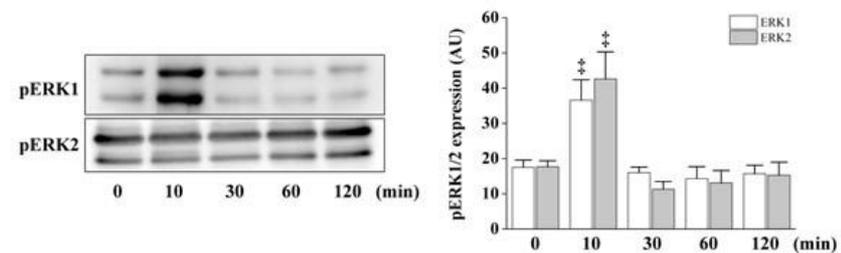


図4. β_3 -AR作動薬(BRL37344)で刺激した心臓線維芽細胞におけるp44/42 MAPK発現量の継続的变化

†; $P < 0.01$ vs PL.

最後に、 β_3 -AR を介した細胞内シグナルメントの調節経路を精査するために、BRL37344 ならびに β_3 -AR 阻害薬(SR59230A)を用いて心臓線維芽細胞を培養した。心臓線維芽細胞は無血清培地で 48 時間培養した後、SR 59230A($1 \mu\text{M}$, 2h)でプレインキュベートし、BRL37344(10^{-4} M, 24h)を添加した。PL と比較して、SR59230A 単独処理における pERK1/2 ならびに pCREB 発現量は変化しなかったが、SR59230A は BRL37344 による pERK1/2 ならびに pCREB 発現量の増加を有意に抑制した(図 5 & 6)。しかし、コラーゲン I 発現量に有意な変化はみられなかった。

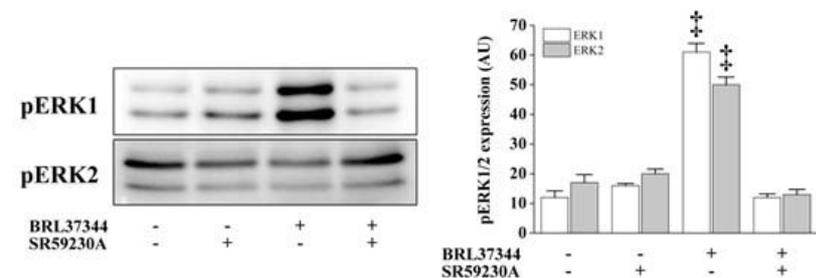
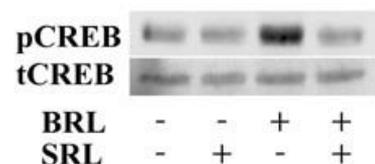


図5. β_3 -AR作動薬(BRL37344)ならびに阻害薬(SR59230A)を暴露した心臓線維芽細胞におけるp44/42 MAPK発現量の変化

‡; $P < 0.001$ vs PL.

図6. β_3 -AR作動薬(BRL37344)ならびに阻害薬(SR59230A)を用いた心臓線維芽細胞におけるpCREB発現量の変化



本研究課題の成果より、ラットの心臓線維芽細胞において β_3 交感神経受容体が存在すること、 β_3 交感神経受容体を介した細胞内シグナルメントの伝達には ERK が深く関わっている事が明らかとなった。また、ラット心臓線維芽細胞における β_3 交感神経受容体を介した ERK 発現ならびに CREB 発現は β_3 交感神経受容体の抑制によって制御されることが明らかとなった。しかし、 β_3 交感神経受容体の刺激はコラーゲン I 発現量に影響していなかったことから、今後は心臓線維芽細胞における β_3 交感神経受容体を介した細胞増殖、分化、アポトーシス、肥大などに関する機能解析を行い、 β_3 交感神経受容体の生物学的機能ならびに心臓線維化との関係を解明する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：岡田 卓、近藤 千種、堀 泰智、木村 祐哉、近澤 征史朗、金井 一享、星 史雄、伊藤 直之

演題：ラット心臓線維芽細胞における交感神経 β_3 受容体の局在および ERK1/2 調節機序の解析

会場・日時：第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年 9 月(青森)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。