

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06805

研究課題名(和文)細胞外マトリックスを用いた拡張機能不全型心不全の新たな治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategies for diastolic heart failure using extracellular matrix

研究代表者

岩田 和実 (Iwata, Kazumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60305571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞のNOX1/NADPHオキシダーゼ(NOX1)は抗腫瘍薬による細胞傷害を増悪させることと心線維芽細胞の抑制因子の産生を抑制していることを明らかにした。NOX1を欠損させた心筋芽細胞株(H9c2)では細胞外マトリックス分子(ECM)であるPodocanのスプライスバリエントの一つであるPodn-Bの発現上昇がみとめられた。Podn-B分子をゲノム編集法により欠損させると、NOX1欠損心筋芽細胞のモジネートで認められた心線維芽細胞の増殖抑制作用は有意に回復した。また、HFpEFモデルにおいてNOX1欠損マウスでは、心拡張機能障害および心肥大が有意に改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では左室駆出率の保持された心不全(Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: HFpEF)が心不全患者の50%以上を占めるものの、予後を改善する治療法がない現状である。HFpEFの主因は心筋細胞の肥大と線維化による拡張不全であることから、本研究ではHFpEFの新しい治療法の開発に向け、心臓の線維化を抑制する新しい分子の同定とその作用機構について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In this experiment, we investigated the mechanism of cardiac fibrosis mediated by NOX1/NADPH oxidase (NOX1). NOX1 exacerbates cell injury induced by antitumor drugs and inhibits the production of cardiac fibroblast inhibitory factors in H9c2 cells, a rat cardiomyoblast cell line. The increased proliferation of cardiac fibroblasts induced by transforming growth factor- or fetal bovine serum was significantly suppressed when cardiac fibroblasts were exposed to homogenates from Nox1-disrupted H9c2 cells, but not from wild-type cells. In Nox1-disrupted H9c2 cells, the expression of Podn-B, one of the splice variants of Podocan, an extracellular matrix molecule, was up-regulated. The suppressed proliferation was significantly restored when the homogenates from Podn-B-disrupted H9c2 cells were exposed to cardiac fibroblasts. In addition, cardiac diastolic dysfunction and cardiac hypertrophy were significantly improved in NOX1-deficient mice in an HFpEF model.

研究分野：薬理学

キーワード：心線維化 細胞外マトリクス NADPH oxidase

1. 研究開始当初の背景

心不全には「収縮機能不全型」と「拡張機能不全型」の2つのタイプがあり、収縮機能不全型である heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF)では様々な治療法で有効性が認められることに対し、拡張機能不全型である heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF)の特異的な治療方法は未だ確立されていない。近年、心不全の約50%が「HFpEF」であることが明らかとなり、その治療法の開発が急務となっている。HFpEFは高血圧症や糖尿病等の生活習慣病により引き起こされ、その主因は心筋傷害後に誘導される筋線維芽細胞の過剰な増殖およびコラーゲンやフィブロネクチン等の細胞外マトリックス (ECM) の産生亢進による組織線維化である。線維化組織により心臓は硬化し拡張機能不全のみならず致死的不整脈を誘発することで生命予後を悪化させる。一方で線維化組織による傷害部位の置換は、心拡大および心破裂を防止する役割も担っているため、線維化の抑制のみを標的とした治療方法では、心筋障害を増悪させる可能性がある。このため、HFpEFの治療戦略では、筋線維芽細胞の過剰な活性化の抑制と、傷害部位の線維化組織による保護の相反する命題に答える必要がある。

これまでに心筋細胞で産生される数種の細胞外マトリックス (ECM)が「筋線維芽細胞の活性を抑制」することを見出している。本申請研究では「新たな線維化抑制因子としての ECM」による心傷害後の心臓保護と過剰な筋線維芽細胞の活性化抑制の両立を目指し、HFpEFの新たな予防および治療法の開発に繋げる。

2. 研究の目的

心不全の約50%を占める HFpEF は、有効な治療法がないため予後が不良である。拡張機能不全の主因は過剰な心線維化であり、筋線維芽細胞の活性を制御する新しい治療法の登場が待たれる。一方で心傷害部位の線維化組織による置換は心臓破裂を防ぎ、心臓保護に重要な役割を果たしている。

本研究では、「新たな線維化抑制因子としての ECM」分子の同定と、同定した ECM 分子の HFpEF 心不全に対する有効性を検討する。

申請者は活性酸素産生酵素の一つである NOX1/NADPH オキシダーゼ (NOX1) を欠損したマウスにおいてアントラサイクリン系抗腫瘍薬による心線維化が抑制されることを報告している。さらに研究を進めたところ、

1) ゲノム編集により NOX1 を欠損させた (NOX1-KO) 心筋芽細胞株 H9c2 のホモジネートは、Transforming growth factor- β (TGF- β) および血清刺激による筋線維芽細胞の増殖を抑制すること、
2) また、NOX1-KO H9c2 で発現上昇が認められた ECM 分子を欠損させることにより増殖作用が回復することから、これら ECM 分子が線維化抑制因子として作用することを見出した。そこで申請者は心筋由来の線維化抑制作用を有する ECM 分子を傷害後の心臓で増加させることが、傷害部位の保護と心硬化をもたらす筋線維芽細胞活性の抑制を両立させ、新たな HFpEF の治療に繋がるかどうかを問うこととした。

3. 研究の方法

ラット由来心筋芽細胞株 H9c2、マウス心線維芽細胞を用いた。CRISPR/Cas9 システムを用いゲノム編集により遺伝子欠損細胞を作製した。いずれの細胞もクローン化し遺伝子配列を確認した。細胞生存率および細胞傷害は、細胞内 ATP 量および細胞外に漏出した LDH 量を指標として評価した。7週齢の C57BL/6 マウスを用い、高脂肪食 (HFD) と飲水で 0.5 g/L の NG-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) を 15 週間与えることにより HFpEF モデルを作製した。心エコーを用い左室収縮機能として LVEF、拡張機能として E/e' の測定を行った。

4. 研究成果

野生型 (WT) の心筋芽細胞株 H9c2 に心筋細胞傷害を誘導する目的で、アントラサイクリン系抗腫瘍薬であるドキシソルピシン (DOX) を処置したところ、濃度依存的に細胞生存率の低下と細胞傷害の指標である LDH の漏出増加が認められた。WT と比較して NOX1 を欠損した H9c2 では DOX の処置により有意な細胞生存率の増加と LDH 漏出の減少が認められた。(図1)

ドキシソルピシンによる細胞死にはアポトーシスが関与することが報告されており、DOX を処置

した WT ではアポトーシスの指標である Cleaved caspase 3 の増加 (図 1) と Caspase 3/7 の活性上昇が認められた。WT と比較して NOX1 を欠損した H9c2 では DOX の処置により有意な Cleaved caspase 3 の減少と Caspase 3/7 の活性抑制が認められた。

また、NOX1 を欠損した細胞においてアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の増加が認められた。Bcl-2 はミトコンドリア膜に存在し、アポトーシスを誘導する因子である Bax と結合し、ミトコンドリアの膜電位の消失を抑制することが知られている。そこでミトコンドリア膜電子検出試薬である JC-1 を用い DOX 処置後のミトコンドリア膜電位を観察したところ、WT では膜電位低下の指標となる JC-1 monomer の増加 (緑) の増加が認められたが、NOX1 欠損細胞では、膜電位の消失は抑制された (図 2) 。

これらの結果から、NOX1 の欠損により DOX による心筋細胞のアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。

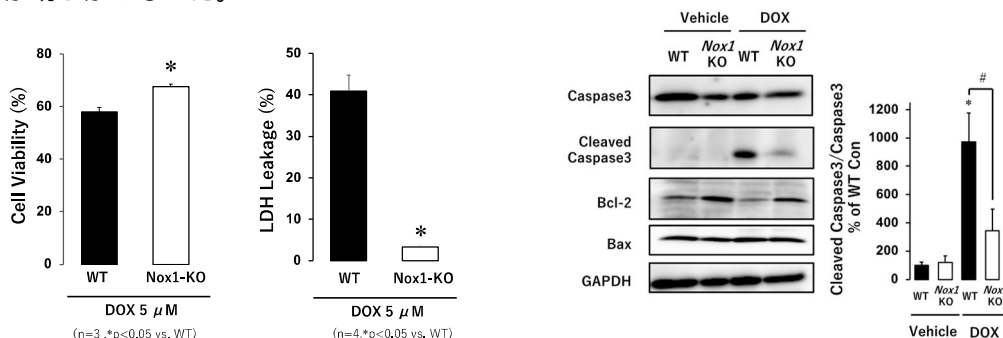


図 1 NOX1 欠損により DOX によるアポトーシスが抑制される

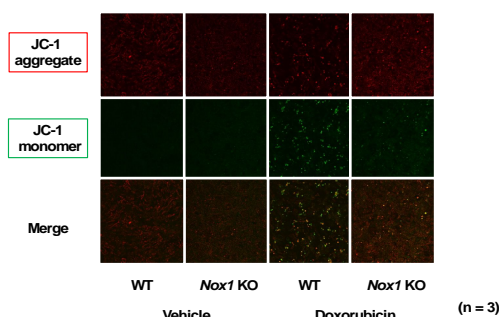


図 2 NOX1 欠損により DOX によるミトコンドリア膜電位の消失が抑制される

NOX 1 を欠損した H9c2 では線維化抑制因子の発現が上昇しており、その細胞ホモジネートでは線維芽細胞増殖や細胞外マトリックス産生の促進因子である Transforming Growth Factor- (TGF-) および血清 (FBS) による心線維芽細胞の増殖を有意に抑制した (図 3) 。

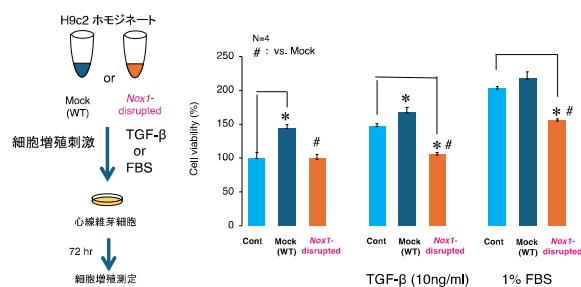


図 3 NOX1 欠損細胞ホモジネートは TGF- および血清刺激による心線維芽細胞の増殖を抑制

これまでに NOX1 の欠損により発現上昇する細胞外マトリックスの 1 つである Podocan (Podn) が筋線維芽細胞の活性を抑制する因子であることを見出している。

Podn には複数のスプライスバリエントが存在することが知られているが、何れのバリエントが NOX1 の欠損により増加するかを検討したところ、図 4 に示すタンパクコードするバリエントのうち 5'末端の短い Podn B の発現が上昇していることを見出した。そこで Podn B のエクソン 5 をターゲットとして Podn B のみを欠損する H9c2 細胞を作製した。NOX 1 を欠損した H9c2 で同時に Podn B を欠損させると、NOX1 のみを欠損させた細胞ホモジネートでみとめられた心線維芽細胞増殖の低下が有意に回復した (図 4) 。

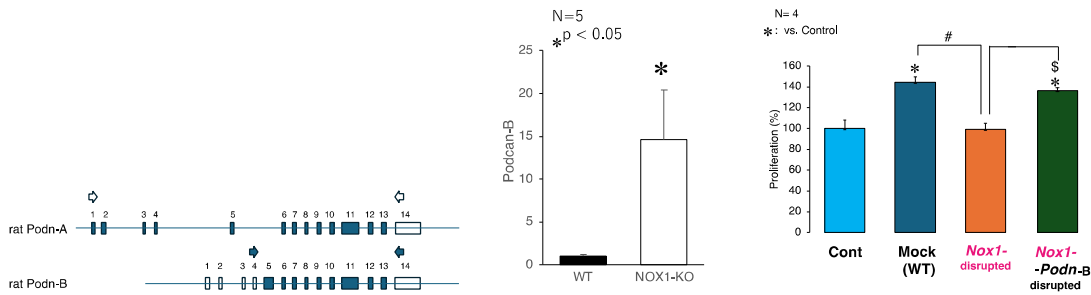


図4 Podocan B 欠損により心線維芽細胞の増殖が回復

NOX1 の HFpEF における役割を明らかにするため、NOX1 欠損マウスを用いて HFpEF モデルを作製した。

普通食 (Chow) の WT と NOX1-KO では左心収縮力の指標である LVEF、左心拡張機能の指標である E/e' および心肥大の指標である心重量/脛骨長比に差異を認めなかった。一方で WT において HFD + L-NAME 処置による HFpEF モデルでは、 E/e' の上昇 (拡張能の低下) と心肥大が認められたが NOX1-KO では有意に回復した。また WT の HFpEF モデルで心線維化の指標である Collagen1a1 (Col1a1) の発現が上昇したが、NOX1-KO では抑制傾向が認められた。以上の結果から、NOX1 が HFpEF において左心室拡張機能の障害に関与することが明らかとなった。今後、NOX1 により発現調節を受ける Podn を含めた細胞外マトリクスの HFpEF における役割を解明し、新たな HFpEF の治療開発に向けた検討を行う。

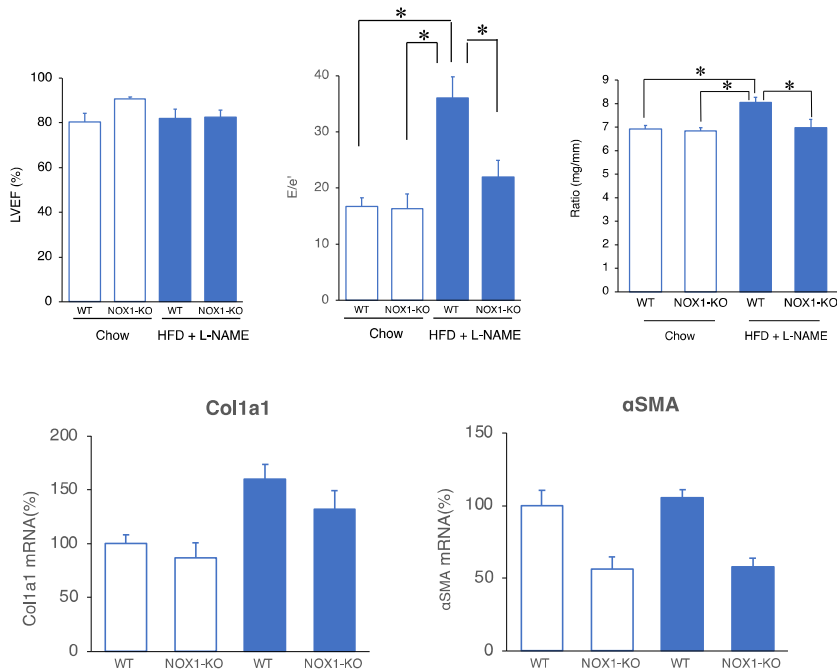


図5 NOX1 欠損マウスでは HFpEF モデルにおける左心拡張機能障害および心肥大が改善

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 深津 陽大, 岩田和実, 天ヶ瀬紀久子
2. 発表標題 活性酸素産生酵素NOX1/NADPHオキシダーゼのドキソルビシンによる心筋細胞傷害における役割
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深津陽大, 岩田和実, 松本みさき, 天ヶ瀬紀久子
2. 発表標題 ドキソルビシンによる心筋細胞傷害におけるNOX1/NADPHオキシダーゼの役割.
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 和実, 矢部 千尋, 榎村 敦詩
2. 発表標題 NOX1/NADPHオキシダーゼによって調節される小型ロイシンリッチプロテオグリカンの心線維化における役割.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深津陽大, 天ヶ瀬紀久子, 榎村敦詩, 岩田和実.
2. 発表標題 活性酸素種産生酵素 NADPHオキシダーゼ1が担うドキソルビシン誘発心毒性における役割.
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruto Fukatsu, Kazumi Itawa, Kikuko Amagase.
2. 発表標題 Role of NOX1/NADPH Oxidase in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity.
3. 学会等名 19th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深津陽大, 岩田和実, 榎村敦詩, 天ヶ瀬紀久子.
2. 発表標題 NOX1/NADPHオキシダーゼはアポトーシスを介しドキシソルピシン誘発細胞傷害を増悪させる.
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松本 みさき (Matsumoto Misaki) (80533926)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究 分担者	天ヶ瀬 紀久子 (Amagase Kikuko) (60278447)	立命館大学・薬学部・教授 (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------