

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16048

研究課題名（和文）梗塞後心リモデリング形成におけるCXCR7関連炎症性細胞の統合的機能解析

研究課題名（英文）Integrative functional analysis of CXCR7-associated inflammatory cells in the post-myocardial infarction remodeling

研究代表者

石塚 理人（Ishizuka, Masato）

東京大学・医学部附属病院・病院診療医（出向）

研究者番号：60897677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：ラット新生仔単離心筋細胞に対し、CXCR7の特異的アゴニストTC14012で刺激した。遺伝子発現の変化を、RNAseqを用いて解析した。細胞骨格やミトコンドリア代謝に関わる遺伝子発現の変化を認めたが、有意な変化があった遺伝子群が少なく、GO解析で具体的なpathwayを見出すことはできなかった。虚血下と異なり、正常状態での心筋細胞に対しての作用が少ないことが示唆された。ゆえに、心筋梗塞のような虚血状態を再現するために低酸素チャンバーを用いた実験を進めている。また、マウス心筋梗塞モデルにおいても、心筋梗塞後に経時的にアポトーシスと関連する遺伝子発現の変化があることを見出し、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CXCR7は、心筋梗塞後リモデリング形成過程において心保護的に働くことが示されたものの、CXCR7と共役するβアラステチンとERK以下の、細胞死に関わる経路は全くもって不明であった。今回、CXCR7が正常状態に比べて、より虚血下で作動することが示唆され、特にアポトーシス抑制に関わるシグナルとの関連が疑われた。更に条件検討を行い、より網羅的な解析を行うことで、CXCR7と細胞死を結びつけるより詳細なpathwayが解明され、心筋梗塞や心不全を治療するための創薬に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：I stimulated rat neonatal isolated cardiomyocytes with the specific agonist of CXCR7, TC14012, and analyzed the changes in gene expression using RNAseq. Although I observed changes in gene expression related to cellular cytoskeleton and mitochondrial metabolism, the number of genes showing significant changes was small, and I could not identify specific pathways through GO analysis. Unlike under ischemic conditions, this suggests that the effect on cardiomyocytes in a normal state is limited. Therefore, I am proceeding with experiments using a low-oxygen chamber to reproduce ischemic conditions such as myocardial infarction. Furthermore, in a mouse myocardial infarction model, I have identified temporal changes in gene expression related to apoptosis after myocardial infarction and am continuing the analysis.

研究分野：循環器学

キーワード：CXCR7 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

心不全の 5 年生存率は 50%と予後不良の症候群であり、社会全体の高齢化とともに患者数は急増している。このため心不全の新たな治療標的の開発が強く待ち望まれている。心不全治療の第一選択薬として現在使用される G 蛋白共役受容体(GPCR)標的薬の多くは、GPCR の副経路とも言われる β -アレスチン経路の活性化を介して心保護効果を担っている。

CXCL12(SDF-1) をリガンドとするケモカイン受容体 CXCR7 は、GPCR でありながら G 蛋白と共役せず、 β -アレスチンのみを活性化する β -アレスチン偏向性受容体であるが、これまで心臓内における役割は不明であった。我々はこれまでに、成体マウス心臓に発現する GPCR のなかで CXCR7 が最も発現が高いことを示した(図 1)。また、心筋細胞に発現する CXCR7 が、 β アレスチンや ERK 経路を介して心筋梗塞後リモデリング形成過程において心保護的に働くことを明らかにしてきた(図 2、引用文献)。

図1. 心臓内Cxcr7遺伝子発現は非常に高い

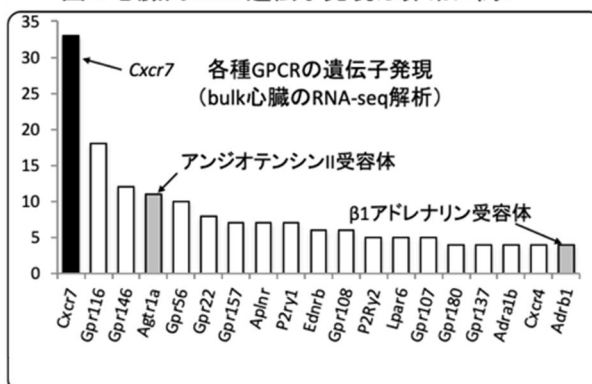
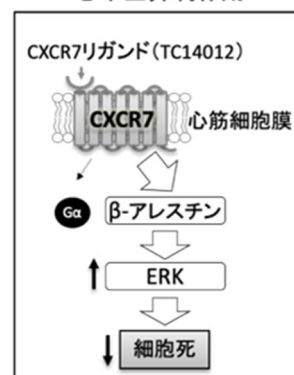


図2. CXCR7シグナルの心不全抑制作用



2. 研究の目的

CXCR7 は、心筋梗塞後リモデリング形成過程において心保護的に働くことが示されたものの、CXCR7 と共役する β アレスチンと ERK 以下の、細胞死に関わる経路は全くもって不明である。我々は、RNAseq を用いて網羅的に、かつ組織解析を用いて空間的に、CXCR7 下流の pathway を見つけることを目的とした。それを見つかることで、心筋梗塞や心不全を改善する創薬に繋がると考えた。

3. 研究の方法

(1) これまでに確立した、ラット新生仔心臓から心筋細胞を単離し培養する方法を用いた。細胞刺激として、既に既報で CXCR7 の特異的アゴニストとされる TC14012 を用いた(引用文献)。対照薬として、vehicle 以外に、CXCR7 の下流の β アレスチンとは対照的に β 1 アドレナリン受容体 $G_{\alpha s}$ 経路を活性化させるリガンドであるノルエピネフリンを用いた。これらの裏を取るために、アデノウイルスで *Cxcr7* の発現量を増やしたり、siRNA で *Cxcr7* の発現量を減らしたりすることも試している。

(2) また、in vivo での心筋梗塞を再現するために、細胞実験では低酸素チャンバーを用いた。活性炭に酸素を吸着させ、閉鎖チャンバー内を低酸素にするモデルである。SYTOX を用いて死細胞染色を行った。

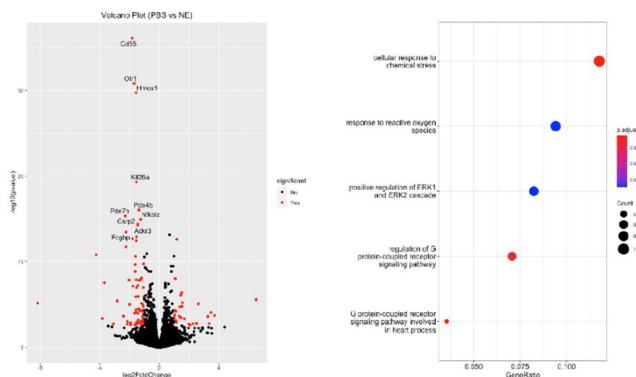
(3) マウス心筋梗塞モデルは、既に確立した、マウスの左冠動脈前下行枝を結紮して、心筋梗塞を作成するモデルである。実際に心筋梗塞が作成されていることは、心臓超音波を用いて形態的に確認している。心筋梗塞 6 時間後、1 日後、3 日後にマウス心臓を取り出し、解析に用いている。TUNEL 染色を用いて、アポトーシスを検出した。

4. 研究成果

(1) 単離したラット新生仔心筋細胞に対し、 β アレスチン偏向性受容体である CXCR7 の特異的アゴニスト TC14012 と、 β 1 アドレナリン受容体 $G_{\alpha s}$ 経路を活性化させる代表的なリガンドであるノルエピネフリンとで刺激した。遺伝子発現の変化を、RNAseq を用いて解析し、vehicle と合わせて 3 群で比較した。

ノルエピネフリン刺激での遺伝子発現の変化を volcano plot し、有意に発現が変化した遺伝子群で Gene Ontology (GO) 解析を行った(図 3)。結果、 $G_{\alpha s}$ 経路や ERK と関

図 3. ノルエピネフリンによる心筋細胞の遺伝子発現変化



連した遺伝子発現の変化が認められた。

一方で、TC14012 刺激では、細胞骨格に関わる *Ccdc63*、ミトコンドリア代謝に関わる *Slc25a22* 等の遺伝子発現の変化を認めた(図 4)。しかし、発現に有意な変化があった遺伝子群自体が少なく、GO 解析で有意な遺伝子発現変化のある pathway を見出すことはできなかった。原因として、今までの研究で CXCR7 は虚血下で保護的に働くことが見出されており、正常状態での心筋細胞に対しての作用がそもそも少ないことが示唆された。

(2) 上記結果を元に、心筋梗塞のような虚血状態を細胞実験で再現するために、低酸素チャンパーを用いた。低酸素時間とグルコース濃度を調整する事により、心筋細胞の生存率に変化があった。CXCR7 の特異的アゴニスト TC14012 で CXCR7 を刺激することで、生存率が改善することを見出した(図 5)。CXCR7 と共役する β アレスチンの主な下流シグナルである ERK には、アポトーシス抑制の作用があることが知られている。今回のモデルで、アポトーシス関連のシグナルの変化を追っている。また、アデノウイルスベクターを用いて心筋細胞における *Cxcr7* の発現量を増やすことにも成功している。改めてこの虚血の条件で、(1)で示したような RNAseq による網羅的解析を、再度施行することを検討している。

(3) 細胞実験と並行して、マウス心筋梗塞モデルにおいても、アポトーシス関連のシグナルを追っている。マウス心筋梗塞モデルで、心筋梗塞 6 時間後、1 日後、3 日後で、*Bim* といったアポトーシスと関連する遺伝子発現の経時的変化があることを見出した。また、マウス心筋梗塞モデルの心臓組織で、TUNEL 染色を用いて、アポトーシスが起きていることを確認した(図 6)。これらを用いて、CXCR7-ERK の下流シグナルとして疑われるアポトーシス関連のシグナルを、遺伝子発現もしくは組織染色の両面から、さらに解析していく予定である。

< 引用文献 >

- Ishizuka M, et al. CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β -arrestin-biased receptor. *Sci Rep.* 2021;9;11:3426.
Gravel S, et al. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: Roles of receptor domains. *J. Biol. Chem.* 2010;285:37939-37943.

図 4. TC14012 による心筋細胞の遺伝子発現変化

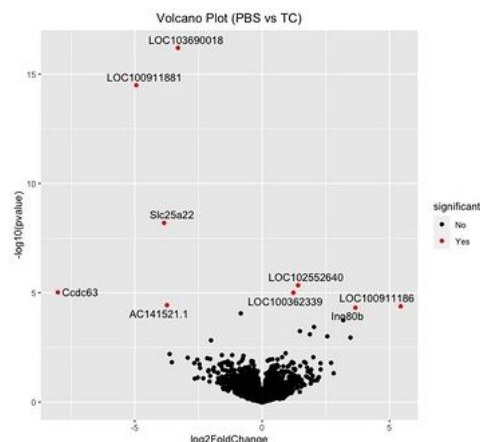


図 5. 低酸素チャンパーによる心筋細胞虚血モデル

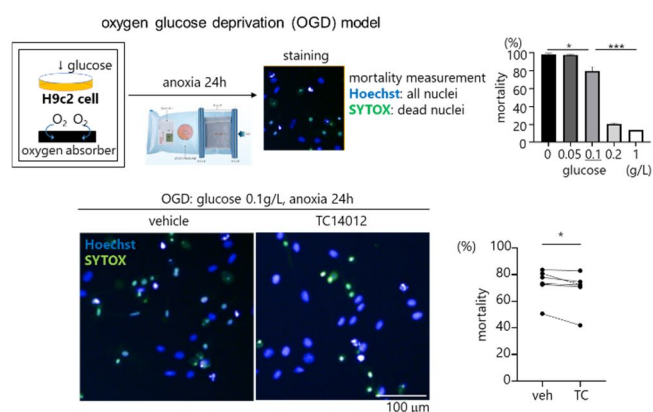
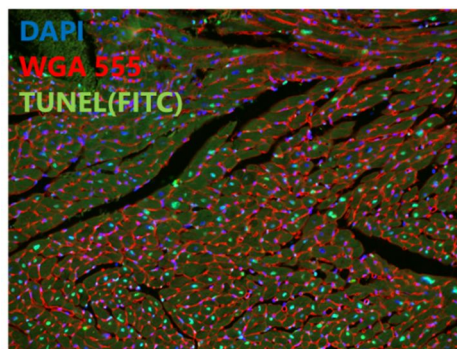


図 6. マウス心筋梗塞での TUNEL 陽性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石塚 理人、原田 睦生、野村 征太郎、候 聡志、池田 祐一、熊谷 英敏、武城 怜史、郭 嘉熙、テキ 博文、東口 治弘、小室 一成
2. 発表標題 β アレスチン偏向性受容体CXCR7は心筋梗塞後リモデリングを抑制する
3. 学会等名 第50回心脈管作動物質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ishizuka, Mutsuo Harada, Seitaro Nomura, Toshiyuki Ko, Satoshi Bujo, Jiaxi Guo, Bowen Zhai, Risa Kishikawa, Haruhiro Toko, Issei Komuro
2. 発表標題 β-arrestin-biased Receptor CXCR7 in Cardiomyocytes Acts on Cell Survival and Inhibits Post-Infarction Remodeling
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石塚 理人、原田 睦生、野村 征太郎、候 聡志、武城 怜史、郭 嘉熙、テキ 博文、岸川 理紗、東口 治弘、小室 一成
2. 発表標題 心筋細胞のβ アレスチン偏向性受容体CXCR7は心筋梗塞後リモデリングを抑制する
3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------