

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16076

研究課題名(和文) 病的肥大におけるセマフォリン受容体プレキシンB1の機能解明

研究課題名(英文) Plexin B1 Exacerbates Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

研究代表者

大瀧 陽一郎 (Yoichiro, Otaki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80732693

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)：心不全発症におけるセマフォリン-プレキシン経路の役割は、未検討である。我々は、Sema4D-Plexin B1経路に注目し、心臓特異的Plexin B1過剰発現マウスを作成した。同マウスに大動脈縮窄術を施行したところ、心肥大や心機能が悪化し、生存率が有意に低下した。PlexinB1とSema4Dは相互作用を認めた。RNAシーケンス解析では、Bmal1の発現が低下していた。心筋細胞にPlexin B1を過剰発現するとAktのリン酸化が亢進した。Plexin B1は、Bmal1/Akt 経路を調節していた。Sema4D- Plexin B1経路は、新たな治療標的となりうる可能生が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学の進歩にも関わらず、心肥大と心不全は日本人の重要な死因である。そのため、新たな機序解明や治療薬の開発が期待される。我々は、Sema4D-Plexin B1 pathwayが、病的肥大と心不全発症において重要な役割を担っていることをin vivoとin vitroの実験型で示した。分子生物学的には、Sema4D-Plexin B1 pathwayが時計遺伝子と関連する知見を得た。近年、抗Sema4D抗体が認知症での治療薬として注目されている。我々の結果は、心不全領域において、Sema4D-Plexin B1 pathwayが新たな治療標的となりうる可能生を示した。

研究成果の概要(英文)：It remains undetermined whether Semaphorin-Plexin pathway play the key role in the development of HF. We focused on Plexin B1, a major receptor for Sema4D, and examined the functional role of Sema4D-Plexin B1 pathway in the development of HF. We established cardiac-specific Plexin B1 transgenic mice (Plexin B1-Tg). We performed thoracic transverse aortic constriction (TAC) in Plexin B1-Tg mice and their littermates. Immunoprecipitation confirmed the interaction between plexin B1 and Sema 4D in cardiac tissues. Plexin B1-Tg mice exhibited cardiac hypertrophy, exacerbated cardiac function, and lower survival rate compared with the WT mice after TAC. RNA sequencing of the cardiac tissues identified Bmal1 as the downregulated differentially expressed gene in Plexin B1-Tg compared to WT mice hearts. Overexpression of Plexin B1 augmented phosphorylation of Akt in cardiomyocytes. Plexin B1 mediates Bmal1/Akt signaling. Sema4D-Plexin B1 pathway can serve as a novel therapeutic target for HF.

研究分野：Cardiology

キーワード：Plexin B1 Sema4D Cardiac hypertrophy Heart Failure BMAL1

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は世界的に増加しており、本邦においても約 120 万人の心不全患者がおり、今後も増加傾向にある重要な疾患である (Nat Rev Cardiol. 2011; 8: 30-41)。心疾患は我が国の死因の第二位と予後不良であり、新規の心不全治療法の開発が待たれている。病的な心肥大は心不全の大きな原因である。病的な心肥大の発生機序は、これまでも数多く報告されているが、セマフォリン・プレキシシンシグナル伝達経路に関する報告はない (Pharmacology & Therapeutics. 2010; 128:191-227)。

プレキシシンは、神経軸索誘導に係るセマフォリンの受容体として同定された。近年、血中セマフォリン 4D が心不全や心房細動などで増加することが報告された (ESC heart fail. 2018; 5: 603-609)。一方、プレキシシンと心疾患の関係は全く検討されていない。

プレキシシンは、セマフォリンと結合することで活性化する 1 回膜貫通型受容体である。また、現在知られている膜貫通型受容体の中で、低分子量 G タンパク質 (Rho family) と直接結合できる唯一の受容体である (Prog Biophys Mol Biol. 2015; 118: 161-168.)。プレキシシンファミリーの中で、プレキシシン B1 は、C 末端に PDZ ドメイン結合配列を持ち、Rho GEF/Leukemia-associated Rho GEF (LARG) と結合し、Rho GEF/Rho シグナルを直接活性化する (Nature reviews Drug Discovery. 20014; 13: 603-621.)。また、Wnt/ カテニンシグナルの主要な調節因子である Dishvelled protein (Dvl) は、PDZ ドメインを持ち、プレキシシン B1 と結合する可能性がある (Cellular signaling. 2018; 47: 52-64)。そこで、我々はプレキシシン B1 に注目した。Rho GEF/Rho シグナルや Wnt/ カテニンシグナルは、病的な心肥大において重要な役割を担う (J Exp Med 2013; 210: 665-673, Circ Res. 2010; 107: 1198-1208)。病的な心肥大は、心組織が圧負荷による機械的刺激やアンジオテンシン II などによる G タンパク質共役受容体を介する刺激など様々な機序が複雑に絡み合って生じる。アンジオテンシン II 受容体阻害薬のみでは、十分に心不全発症および増悪を抑制できていない。そこで、病的な心肥大には既知のシグナル伝達系に加えて、「セマフォリン 4D-プレキシシン B1 経路を介した心肥大の機序が存在するのではないか」と仮説を立てた。心肥大に係る新たな受容体経路を明らかにすれば新しい心不全治療薬の開発につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

これまで心疾患発症とプレキシシンの関係は検討されていない。プレキシシン B1 は、B2 や B3 に比較して、セマフォリン 4D と強く結合する (EMBO Rep. 2004; 5: 710-4)。セマフォリン 4D が心不全患者で高値を示すことを踏まえ、「心筋細胞のプレキシシン B1 はセマフォリン 4D と結合することで、病的な心肥大の発生に関与する」と考えた。本研究の目的は、病的な心肥大におけるプレキシシン B1 の役割を検討することである。

## 3. 研究の方法

野生型マウスに大動脈縮窄術を施行し、圧負荷を誘導し、プレキシシン B1 の mRNA 発現を検討した。心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスを作成した。同マウスに大動脈縮窄術を施行した。その後、心臓超音波検査で心肥大や心機能を評価した。RNA sequence 解析を行い、発現変動遺伝子を網羅的に解析した。心筋細胞を培養し、心肥大刺激 (AngII 刺激、Wnt3a 刺激) を行いプレキシシンの mRNA や蛋白質発現を検討した。プレキシシン B1 を過剰発現またはノックダウンし、心筋細胞肥大に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

### プレキシシン B1 は、圧負荷に対して発現が亢進した

野生型マウスに大動脈縮窄術を施行し、左室に圧負荷を加えた。既報通り、28 日後には、心筋

重量/脛骨長比が、有意に高値を示した。心臓超音波検査では、全周性左室肥大と左室収縮能低下を認めた。病的な心肥大が誘導された。マウスの心組織において、プレキシシン B1 とセマフォリン 4D の mRNA 発現を比較したところ、大動脈縮窄術群ではいずれも有意に増加していた。蛍光免疫染色を行ったところ、大動脈縮窄術群は、偽手術群に比較して心筋細胞のプレキシシン B1 の発現が亢進していた。以上より、病的な心肥大においてプレキシシン B1 の発現が亢進することが示された。

### 心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスの作成

プレキシシン B1 の病的な心肥大における機能を検討するために、MHC プロモーターを用いて心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスを作成した。また、RNA-seq では 5 倍に発現が増加し、Western blotting で蛋白質発現を確認したところ、3 倍程度の発現増加を認めた。脳、肺、腎臓、肝臓、消化管、骨格筋、脂肪組織では、プレキシシン B1 の発現に変化を認めず、心筋特異的にプレキシシン B1 が過剰発現していることを確認した。野生型マウスと心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスのベースラインでの表現型を比較したところ、体重、心重量、各臓器重量に有意差はなかった。また、心臓超音波検査上、心機能に変化は認めなかった。

### 心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスにおける大動脈縮窄術後の生存率

病的な心肥大における心筋細胞のプレキシシン B1 の役割を検討するために、心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスと野生型マウスに対して 27G 針を用いた大動脈縮窄術と偽手術を施行した。偽手術群のすべての心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスと野生型マウスは、56 日間の追跡期間を生き延びた。大動脈縮窄術の生存率は、野生型マウスよりも心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスで有意に低かった。

心臓超音波検査では、心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスは、野生型マウスに比較して、左室壁厚が厚くなり、左心室内腔が拡大し、左室短縮率が有意に減少した。これら結果から、心筋におけるプレキシシン B1 は、病的な心臓肥大を誘導し、大動脈縮窄術の生存率を悪化させる事が示された。

プレキシシン B1 は受容体であり、リガンドが結合するとエンドソームに取り込まれる。そこで、大動脈縮窄術を施行した心組織からエンドソーム蛋白質を抽出し、免疫沈降法を施行した。プレキシシン B1 はセマフォリン 4D と結合していた。このことから、心筋細胞のプレキシシン B1 は大動脈縮窄術後、セマフォリン 4D と結合することが示された。

TAC 後 28 日の心組織において RNA sequence 解析を行った。40 の発現変動遺伝子を認めた。興味深いことに時計遺伝子の変動が大きく、Bmal1 は発現が低下し、Per2 や Per3 は発現が亢進していた。また、KEGG pathway 解析では、Circadian rhythm に関連する遺伝子の変動を認めた。Bmal1 ノックアウトマウスは圧負荷に対して Akt のリン酸化を介して心リモデリングを増悪すると報告された (JAHA. 2022;11:e025021.)。心筋特異的プレキシシン B1 過剰発現マウスにおいて、Bmal1 の蛋白質発現を検討したところ野生型と比較して有意に低下していた。以上より、プレキシシン B1 は Bmal1 を介して心肥大を増悪した可能生が示唆された。

また、STRING Protein interaction 解析では、プレキシシン B1 はセマフォリン 6C と相互作用を認めた。プレキシシン B1 がセマフォリンファミリーと密接に関連している知見が得られた。

### 心筋細胞におけるプレキシシン B1 の発現解析

新生仔ラット心筋細胞培養を行った。心筋細胞に対して、Wnt3a 刺激を行ったところ、3 時間以

降プレキシシン B1 の蛋白質発現が有意に亢進した。また Ang II 刺激でも同様に、プレキシシン B1 の発現が亢進した。

### **プレキシシン B1 は、Akt、Erk1/2、GSK3 のリン酸化を制御する**

心肥大において、Akt、ERK1/2、GSK3 のリン酸化は心肥大を誘導することはよく知られている。そこで、H2C2 細胞や新生仔ラット培養心筋において、siRNA を用いてプレキシシン B1 をノックダウンした。すると、Akt、ERK1/2 および GSK3 のリン酸化が有意に抑制された。逆に、プレキシシン B1 を過剰発現すると、Akt のリン酸化が亢進した。プレキシシン B1 が心肥大シグナルを調節する可能性が示唆された。

以上より、心筋細胞のプレキシシン B1 は圧負荷に対して発現が亢進し、病的な心肥大を増悪することが示された。病的な心肥大において、プレキシシン B1 は、セマフォリン 4D と直接結合しており、セマフォリン 4D-プレキシシン B1 経路を介した心肥大の機序が存在することが示された。プレキシシン B1 は、病的な心肥大の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------