

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08239

研究課題名(和文) 活性酸素産生酵素NOX1による新しい心臓の線維化誘導機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文) A novel role for Nox1/NADPH oxidase in cardiac fibrosis

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋細胞傷害後に誘導される心線維化にNOX1/NADPH oxidaseが関わることを遺伝子欠損マウスおよびゲノム編集により作製した遺伝子欠損細胞を用いて明らかにした。NOX1欠損マウスではドキシソルビシンによる心線維化が抑制された。傷害を受けた心筋細胞由来因子が心筋細胞のNOX1遺伝子の発現を上昇させた。心筋細胞のNOX1は心線維芽細胞の増殖作用を有するS100A1の遺伝子発現を調節することを見出した。NOX1が心傷害後の心線維化において新たな治療ターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated a novel role for NOX1, a non-phagocytic isoform of superoxide-producing NADPH oxidase, in cardiac fibrosis following drug-induced myocardial injury. A single-dose administration of doxorubicin (DOX) caused severe cardiac fibrosis in wild-type mice, but it was significantly attenuated in Nox1-deficient mice. When H9c2 cardiomyocytes were exposed to their homogenate, a dose-dependent increase in NOX1 mRNA was observed. When isolated cardiac fibroblasts were exposed to H9c2 homogenates, increased proliferation and up-regulation of collagen 3a1 mRNA were demonstrated. These changes were significantly attenuated in cardiac fibroblasts exposed to homogenates from H9c2 harboring disrupted Nox1. These findings suggest that up-regulation of NOX1 following cellular damage promotes cardiac fibrosis by aggravating the pro-fibrotic response of cardiac fibroblasts.

研究分野：病態分子薬理学

キーワード：心線維化 活性酸素種 心線維芽細胞 心筋細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

我が国において心疾患による死亡は悪性新生物に次いで多く、その有効な治療法の開発が求められている。なかでも心線維化は心筋梗塞、高血圧症、糖尿病等の疾患やアントラサイクリン系の抗腫瘍薬の副作用として発症することが知られる。心線維化は心機能の低下を引き起こすことから予後を決定づける重要な要因の一つと考えられている。

NADPH オキシダーゼは生体内における活性酸素種 (ROS) の主要産生源であり、古くから好中球に局在し生体防御に関わることが知られる。近年その触媒サブユニット NOX のホモログが見出され、非食細胞型の新規分子種 NOX1 が発見された。申請者はこれまで NOX1 の遺伝子欠損マウス (NOX1-KO) を作製し、循環器系疾患における NOX1 由来 ROS の役割について、アンジオテンシン II による血圧上昇やエンドトキシンによる敗血症モデルの心筋障害において NOX1 が疾患の増悪に関わることを明らかにしてきた。糖尿病モデル動物の血管では NOX1 が ROS の主要産生源であることも報告されており、NOX1 が循環器系疾患において薬物治療の新規ターゲットとなる可能性が示されている。

2. 研究の目的

最近、申請者はアントラサイクリン系抗腫瘍薬のドキソルピシン (DOX) 投与による心線維化が NOX1-KO で抑制されることを見出した。すなわち NOX1-KO では DOX による ROS 産生が抑制され、生存率および心機能の低下が改善されるとともに、心臓の細胞外マトリックス (ECM) であるコラーゲンの産生増加が抑制されていた。これらの結果は心臓において NOX1 により産生される ROS が心線維化の亢進に寄与していることを示唆している。しかしながら心臓組織における NOX1 の局在や線維化に関わる機序は明らかでない。本研究では *Nox1* 遺伝子欠損マウスおよび CRISPR/Cas を用いたゲノム編集法により作製した *Nox1* 遺伝子欠損細胞を用い、NOX1 が産生する ROS の心線維化における作用機序を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) DOX による心障害モデルマウスの作製

8~12 週齢の野生型マウス (WT) または NOX1-KO を実験に使用した。DOX は 20 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した。

(2) ゲノム編集による遺伝子欠損細胞の作製

ラット心筋芽細胞株 H9c2 に gRNA、Cas9 およびピューロマイシン耐性遺伝子発現ベクターを Xfect (Takara) を用い導入した後、ピューロマイシンで遺伝子が導入された細胞を選別した。クローニングした細胞の遺伝子

配列をダイレクトシーケンス法により確認した。

(3) 心線維芽細胞の単離

マウス心臓をコラゲナーゼで分散しメッシュを通して細胞塊を除いた後、培養ディッシュへ播種し、接着した細胞を線維芽細胞として実験に用いた。これらの細胞は DMEM/10% 血清/ペニシリン・ストレプトマイシン含有培地にて 37 °C 5% CO₂ 条件のもと培養した。

4. 研究成果

(1) DOX による心線維化と NOX1

DOX の投与 4 日後、心臓において NOX1 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。NOX1-KO では DOX による ROS 産生が抑制され、生存率および心機能の低下が改善されるとともに、心臓のコラーゲン産生量の指標であるハイドロキシプロリン量の増加が抑制されていた (図 1A)。一方で、心筋細胞死の指標である血清中クレアチンキナーゼ量は WT および NOX1-KO で DOX 投与により同様に上昇していたこと (図 1B)、またアポトーシスの指標である cleaved-caspase 3 のレベルは両遺伝子群間で差違を認めないことから、DOX による心線維化において NOX1 は心筋細胞死誘導後の心線維化の亢進に関与することが示唆された。

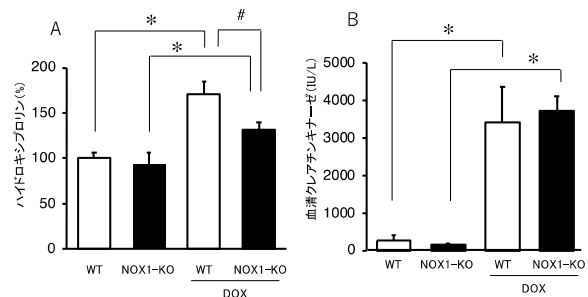


図 1. DOX 投与したマウスでの心臓ハイドロキシプロリン量 (A) と血清クレアチンキナーゼ量 (B)

(2) 心筋細胞における NOX1 遺伝子発現

心筋芽細胞株 H9c2 を用い DOX による NOX1 遺伝子の発現を検討したが、予想に反し用量依存的な発現の低下が認められた。細胞死により放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) が Toll-like receptor 4 (TLR4) を介し組織の炎症および線維化を引き起こすことが報告されている。そこで H9c2 細胞のホモジネートを心筋細胞の死細胞成分として、別途培養した H9c2 に処置したところ濃度依存的な NOX1 遺伝子の発現上昇が認められ、この上昇は TLR4 阻害薬である TAK-242 により完全に抑制された (図 2AB)。このことから、DOX を投与したマウスの心臓では DOX により傷害を受けた心筋細胞から放出される DAMPs が周囲の心筋細胞の NOX1 遺伝子の発現を上昇させたと考えら

れた。

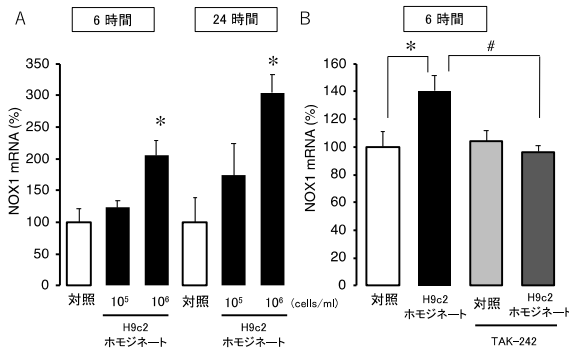


図 2 . H9c2 細胞ホモジネート処置による H9c2 細胞での NOX1 遺伝子発現

(3) 死細胞由来因子による心線維芽細胞の増殖および ECM 発現

死細胞から放出された DAMPs は心線維芽細胞の pattern recognition receptors (PRR) を介し、心線維芽細胞の増殖促進することが報告されている。そこで WT および NOX1-KO から心線維芽細胞を単離培養し、H9c2 細胞のホモジネートを処置したが、両遺伝子群間で同様に心線維芽細胞の増殖亢進が認められた。このことから心線維芽細胞における NOX1 は死細胞由来因子により誘導される細胞増殖亢進に関与しないと考えられた。

心筋細胞における NOX1 の役割を明らかにするため、ゲノム編集により *Nox1* 遺伝子を欠損させた H9c2 細胞を作製した。クローニングした細胞の遺伝子配列を確認したところ、フレームシフトした 3 クローン (#1~#3) を得た。Mock をトランスフェクトした野生型およびゲノム編集により *Nox1* 遺伝子を欠損させた H9c2 細胞のホモジネートを心線維芽細胞に処置したところ、*Nox1* 欠損 H9c2 細胞のホモジネートでは野生型と比較して有意な心線維芽細胞の増殖抑制が認められた (図 3A)。また野生型 H9c2 のホモジネートの処置により、心線維芽細胞ではコラーゲン IIIa 遺伝子の発現上昇が認められたが、*Nox1* 欠損 H9c2 細胞のホモジネート処置では有意に抑制された (図 3B)。

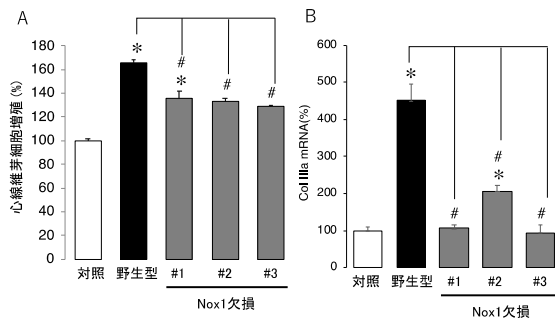


図 3 . H9c2 細胞ホモジネート処置による心線維芽細胞の増殖 (A) およびコラーゲン IIIa 遺伝子の発現 (B)

(4) 心筋細胞における NOX1 により調節される心線維芽細胞増殖因子の同定

傷害を受けた細胞から放出される DAMPs は PRR である TLR4 および receptor for advanced glycation end product (RAGE) を介し心線維化を誘導することが報告されている。TLR4 阻害薬および RAGE 拮抗薬を用い検討を行ったところ、H9c2 細胞のホモジネートによる心線維芽細胞の増殖は、TLR4 阻害薬により有意に抑制された。

DAMPs の中で high mobility group box protein1 (HMGB1)、Fibronectin-EDA、S100A1 は TLR4 を介し心線維芽細胞の増殖を誘導することが知られている。そこでゲノム編集により HMGB1、Fibronectin-EDA および S100A1 を欠損した H9c2 細胞を作製し、そのホモジネートを心線維芽細胞に処置したところ、S100A1 欠損細胞のホモジネートにおいて心線維芽細胞の増殖が抑制された (図 4A)。さらに、*Nox1* を欠損させた H9c2 細胞では S100A1 遺伝子の有意な発現低下が認められた (図 4B)。

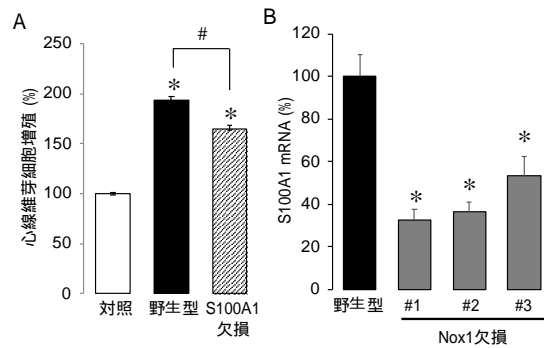


図 4 . S100A1 欠損 H9c2 細胞のホモジネート処置による心線維芽細胞の増殖 (A) および NOX1 欠損 H9c2 細胞における S100A1 mRNA の発現 (B)

以上の結果から、心筋傷害時には、心筋細胞死により放出される DAMPs が引き金となり周囲の心筋細胞で TLR4 を介し NOX1 が誘導されることが示唆された。心筋において誘導される NOX1 は S100A1 の発現を調節することにより、心線維芽細胞の増殖と ECM の発現上昇を誘導し心リモデリングを促進すると考えられる。本研究の成果から、現在有効な治療薬がない心線維化において、NOX1 が薬物治療の新規ターゲットとなる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Iwata K, Matsuno K, Murata A, Zhu K, Fukui H, Ikuta K, Katsuyama M, Ibi M,

Matsumoto M, Ohigashi M, Wen X, Zhang J, Cui W, Yabe-Nishimura C、
Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following drug-induced myocardial injury promotes cardiac dysfunction and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 120:277-288(2018). 査読有、
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.053.

〔学会発表〕(計 3件)

岩田和実、松野邦晴、矢部千尋：心筋細胞の傷害による活性酸素産生酵素 NOX1/NADPH オキシダーゼの発現誘導が心リモデリングを促進する、第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月(長崎)

Iwata K, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Reactive oxygen species derived from the NOX1 isoform of NADPH oxidase exacerbate doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting cardiac remodeling. SfrBM's 23rd Annual Meeting (SfrBM/SFRR1 2016), Hyatt Regency San Francisco (USA), Nov 2016

岩田和実、松野邦晴、矢部千尋：ドキソルビシンの心毒性と活性酸素産生酵素 NOX1/NADPH オキシダーゼ、第 37 回日本臨床薬理学会学術総会 2016 年 12 月(米子)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田和実 (IWATA, Kazumi)
京都府立医科大学・大学院医学研究科病態分子薬理学・講師
研究者番号：60305571

(2) 研究分担者

松本みさき (MATSUMOTO, Misaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科病態分子薬理学・助教
研究者番号：80533926

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()