

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09492

研究課題名(和文) 新規Gタンパク質共役受容体CXCR7の心不全改善効果の検討

研究課題名(英文) The role of CXCR7 in failing heart

研究代表者

原田 睦生 (Harada, Mutsuo)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：90431642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCXCR7の心臓における生理的、病理的役割を解明するために研究を実施した。

心筋細胞特異的CXCR7遺伝子欠損マウスに圧負荷 心不全を誘導すると、野生型マウスと比較して心機能が増悪することが明らかになった。一方で血管内皮特異的、線維芽細胞特異的Cxcr7遺伝子欠損マウスの圧負荷心不全モデルでは、野生型マウスと比較して明らかな差異を認めなかった。このため、心臓におけるCxcr7は心筋細胞に発現するものが主体となっており、心保護的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アドレナリン受容体やアンジオテンシンII受容体は体表的なGタンパク質共役受容体(GPCR)であり、その遮断薬は多くの心不全患者の命を救ってきた。このため、新たな心不全薬の創薬もGPCRを標的としたものが盛んに行われている。

CXCR7は比較的新しいGPCRであり、その心不全での役割は不明であった。本研究によりCXCR7が心不全の新たな治療標的になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating a GPCR called CXCR7 function in the failing heart. Cardiomyocyte-specific deletion of Cxcr7 gene resulted in worsening of systolic function in pressure-overloaded heart in comparison with wild type control. This deterioration of heart function was not observed in endothelial cell-specific Cxcr7 knock out heart. We concluded that protective effects of CXCR7 in the heart were mainly derived from cardiomyocyte's CXCR7.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 CXCR7

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新規 G タンパク質共役受容体(GPCR)である CXCR7 は、免疫系細胞の遊走や増殖・生存に重要な働きをしているが、心臓における役割についてはこれまで全く報告がない。我々は RNA-seq 解析の結果、マウス心臓内に発現するすべての GPCR 遺伝子のなかで CXCR7 遺伝子発現が最も大きいことを見出した(未発表)。この新規心臓 GPCR である CXCR7 の解析は、すでに心不全治療薬として確立している アドレナリン受容体遮断薬などの GPCR 関連薬と同様、何らかの治療効果が期待できるかもしれない。

### 2. 研究の目的

培養細胞や組織特異的 CXCR7 遺伝子欠損マウスを用いて、その生理的・病理的役割を解明すること。

### 3. 研究の方法

#### 1. 成体心臓内での CXCR7 発現の局在と発現量の検討

##### ▶1-1. Cxcr7 遺伝子発現の局在の確認

8週齢の野生型マウスより心臓を摘出し、正常心臓組織内における mRNA 発現を RNA-seq および ISH により確認する。一細胞解析は心筋細胞のみならず CD31 陽性血管内皮細胞、PDGFR- 陽性線維芽細胞についても解析を行う。

##### ▶1-2. CXCR7 タンパクの局在の確認と定量

正常成体マウス心臓の凍結切片を用いて CXCR7 と各種細胞の特異的抗体を用いて共染色を行い、CXCR7 発現細胞を同定する。共染色に用いる抗体として、cardiac troponin-T, CD31, SM-MyHC, vimentin 抗体を用いる。

#### 2. 培養細胞系を用いた CXCR7 シグナル伝達の解明

##### ▶2-1. CXCR7 細胞内シグナルの解析

新生ラット培養心筋細胞、同線維芽細胞、血管内皮細胞 (HUVEC) から培養細胞を選択する。これに アゴニスト (CCX771) や中和抗体 (8F11-M16) あるいは siRNA により CXCR7 シグナルに介入を行い、下流の細胞内シグナルを解析する。副経路としての アレスチン伝達経路を評価するため、CXCR7 とその下流分子を eGFP でラベルした -アレスチン 2 cDNA を用いる (Rajagopal et al. 2010, 107;628.)

##### ▶2-2. 培養細胞系における CXCR7 生存シグナルの解析

血球系細胞において CXCR7 シグナルは Akt を介した生存シグナルを増強することが知られている (Chatterjee et al. Circ Res 2014, 115;939.)。このため CCX771 や中和抗体の存在下に過酸化水素の添加によりアポトーシスを誘導し、細胞死の抑制効果を検討する。同時に Bcl-2 や Bax 等のアポトーシス関連分子の発現や、細胞増殖能の評価 (Ki-67 陽性細胞) も経時的に追跡する。

#### 3. 成体マウス心臓における CXCR7 の生理的、病理的 (特に心不全での) 役割の検討

##### ▶3-1. 野生型マウス心臓を用いた CXCR7 の役割の検討

前述の CCX771 や中和抗体を成体マウス腹腔内に投与することにより、心臓における CXCR7 の役割を検討する (Zabel et al. J Immunol 2009, 183;3204-3211)。心臓超音波検査を施行し心収縮能を評価するとともに生存曲線を作成し野生型マウスと比較する。また安楽死後に採取した心臓組織は H&E 染色や Masson Trichrome 染色により心形態と線維化を組織学的に評価する。

##### ▶3-2. 組織特異的ノックアウト (KO) マウス心臓を用いた CXCR7 の役割の検討

CXCR7 KO マウスの 95% は生後 24 時間以内に死亡する (Sierra et al. PNAS 2007, 104;14759) ため、本研究には Cre/Lox システムを用いた臓器特異的な CXCR7 KO マウスを作成する必要がある。我々はすでに CXCR7 flox マウスのほか、心筋細胞 (aMHC-Cre, aMHC-CreERT2)、血管内皮 (Tie2-Cre)、線維芽細胞 (Col1-Cre) 特異的 Cre マウスを入手しており、網羅的に解析できる体制にある。

##### ▶3-3. 心不全進展への CXCR7 シグナルの関与の検討

組織特異的 CXCR7 KO マウスを用いて左前下行枝結紮モデル (心筋梗塞) あるいは大動脈縮搾モデル (圧負荷心肥大) を作成し、心収縮能を低下させることにより心不全を誘発させる。これにより心不全の進展に重要な役割を演じる CXCR7 発現細胞を同定することができる。

### 4. 研究成果

#### 1. 成体心臓内での CXCR7 発現の局在と発現量の検討

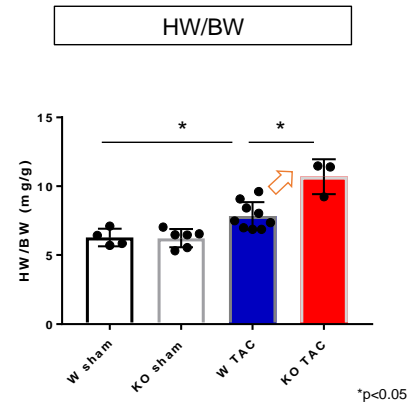
TAC 手術によりマウス圧負荷心不全モデルを作成し、術後 4 週目の心臓新鮮凍結標本を作製した。RNA-Scope in situ hybridization を用いて Cxcr7 遺伝子の発現を確認したところ、心筋細胞の細胞質と心臓間質は発現の局在を認めた。また、CXCR7 モノクローナル抗体を 2 種、ポリクローナル抗体を 2 種購入し、免疫染色を行った。すると RNA-Scope 結果と同様に心筋細胞の細胞質と間質に発現を認めた。

## 2. 培養細胞系を用いた CXCR7 シグナル伝達の解明

HEK293 を用いて CXCR7 阻害薬、中和抗体、siRNA で処理し、処理前後の細胞におけるカリン酸化タンパク質 43 種を網羅的に観察した。すると、これまで報告されていた ERK、Akt に加え、あらたに p53 や JNK の活性に変化を認めた。

## 3. 成体マウス心臓における CXCR7 の生理的、病的 (特に心不全での) 役割の検討

心筋細胞特異的 CXCR7 遺伝子欠損 (CXCR7 KO) マウスのほか、血管内皮特異的、線維芽細胞特異的 CXCR7 KO マウスを作成した。これらに圧負荷心不全を誘導したところ、心臓特異的 CXCR7 KO マウスのみで心機能の低下が優位に認められた。



## 5. 主な発表論文等

論文投稿準備中。その他、発表・書籍などなし。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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:

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: 池田 祐一

ローマ字氏名: Ikeda Yuich

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 特任准教授

研究者番号 (8 桁): 10744419

研究分担者氏名: 熊谷 英敏

ローマ字氏名： Kumagai Hidetoshi

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号(8桁): 20281008

研究分担者氏名：東口 治弘

ローマ字氏名： Toko Haruhiro

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任准教授

研究者番号(8桁): 40436358

## (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。