

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09576

研究課題名(和文) 線維芽細胞 受容体シグナリングの心臓老化における病態的意義の解明

研究課題名(英文) The role of beta adrenergic signaling in fibroblasts during cardiac senescence

研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA, Hiroyuki)

大阪大学・キャンパスライフ健康支援センター・招へい准教授

研究者番号：40581062

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)：「心線維芽細胞における交感神経 炎症連関が慢性炎症持続の基盤となり、aging-related cardiomyopathy (ARC) を形成する」とする仮説を、 β 2アドレナリン受容体欠損マウス(2ARKO)を用いて検証した。2ARKOはコントロールと比較して、寿命の短縮、拡張能の低下、加齢に伴う心臓の線維化の増加傾向を認めた。一方、senescence-associated secreted phenotypeについては、老化マウスにおいて有意な差を認めなかった。以上の結果は、当初の仮説と異なり、 β 2ARがARCに対して線維化を伴う心拡張能を介して保護的に作用している可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、 β 2アドレナリン受容体欠失に伴い、マウスの寿命が短縮したことから、 β 2アドレナリン受容体を活性化させることにより、寿命を延長する可能性があることが示唆された。また、 β 2アドレナリン受容体は、心臓において拡張能の維持を介してaging-related cardiomyopathyを抑制することが明らかとなった。 β 2アドレナリン受容体アゴニストは気管支喘息に対する治療として貼付剤が一般的に使用されており、この既存の薬剤が健康寿命を延長させる治療へ展開できる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to verify a hypothesis that aging-related cardiomyopathy (ARC) would be developed due to chronic inflammation based on the relation between sympathetic nerve and inflammation in cardiac fibroblasts. We used beta 2 adrenergic receptor knockout (2ARKO) mice for this study and observed a shortness of life, a decrease in left ventricular diastolic function and an increase in cardiac fibrosis in accordance with age, compared to control mice. On the other hand, there was no significant difference between aged control and 2ARKO mice in senescence-associated secreted phenotypes. Those results were different from the hypothesis and suggested that β 2AR might have a protective role in the development of ARC due to cardiac diastolic dysfunction with fibrosis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心臓老化 線維芽細胞 アドレナリン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え老化の抑制による健康寿命の延長は喫緊の課題である。加齢に伴う心肺系の機能低下は健康寿命短縮の三大原因の一つであり、中でも心機能低下は非高齢者の場合と異なる aging-related cardiomyopathy (ARC) という特有の病態であると認識されつつある。ARC は、心機能的には心臓の収縮能が比較的維持されている中における拡張能の低下を特徴とする。また、心肥大や心臓の線維化を伴うことも明らかとなっている。我々はこれまでの研究で、 β 2 アドレナリン受容体の遺伝子欠失マウスを用いて、その心病態における役割を検討し、心臓の線維芽細胞の β 2 アドレナリン受容体がパラクライン作用を介して心肥大や心臓の線維化を制御している事を報告してきた。

一方、老化の促進要因として慢性的に炎症が持続する炎症老化(inflammaging)の概念が注目されている。特に老化細胞が炎症性サイトカインを分泌する Senescence-associated secreted phenotype (SASP) と呼ばれる現象が注目されている。これと関連して我々は、 β 2 アドレナリン受容体欠失マウスより採取した心線維芽細胞を用いた予備実験より、心線維芽細胞がカテコラミン刺激により炎症性サイトカインを産生する事を見出した。これまでの報告において、ARC の表現型と、マウスにおける持続カテコラミン刺激による心肥大モデルとの間には、共通点が多く存在する。

そこで、今回の研究において、「心線維芽細胞における交感神経 炎症連関が慢性炎症持続の基盤となり、aging-related cardiomyopathy を形成する」とする仮説を構築した。

2. 研究の目的

「心線維芽細胞における交感神経 炎症連関が慢性炎症持続の基盤となり、aging-related cardiomyopathy を形成する」とする仮説を、 β 2 アドレナリン受容体の遺伝子欠失マウスを用いて in vivo において検証し、その分子機構を同定し、線維芽細胞を標的とした心臓老化の抑制の基盤を確立する事を目的とし、交感神経 炎症連関を標的とする新規の抗老化薬の確立を目指すものである。すなわち、 β 2 アドレナリン受容体の遺伝子欠失マウスの寿命が延長する事を予想し、実際に寿命の延長を検討し、そのメカニズムと心線維芽細胞の炎症性サイトカインの産生の関連を明らかにする事を目的として研究を行う。

3. 研究の方法

β 2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウス(KO)とコントロールマウス(WT)を specific pathogen free (SPF) 環境下において飼育し、25 月齢までの生存を検討した。実験に用いた KO およびコントロールマウスは、野生型マウス(C57BL6/J)と KO(C57BL6/J background)を交配し、得られたヘテロノックアウトマウスを再交配する事により確立した系統を使用した。25 か月間にわたり生存曲線を検討した後に、心エコー検査により、心収縮能および拡張能を検討した。心拡張能は、ドップラー法を用いて僧帽弁血流の流速を計測し、急速流入波(E波)および心房収縮期流入波(A波)の比(E/A ratio)を用いて評価した。さらに、deceleration time(DcT)を算出した。心エコーによる解析において、最も拡張能を反映するとされるこの2項目により、心臓の拡張能を評価した。

さらに、重量解析により、心肥大に関する評価を行った。また、心臓における遺伝子発現を8週齢および25月齢のマウスより得られた心臓より調製した mRNA を用いて、real-time RT-PCR により解析した。心肥大に関する指標として代表的な atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP), alpha skeletal actin (α -SkA)を評価した。また、線維化の指標としては、マッソントリクローム染色により、組織学的に線維化を解析するとともに、心臓の線維化の分子マーカーである I 型及び III 型 collagen の遺伝子発現を評価した。Senescence-associated secreted phenotype (SASP) の指標として、炎症性サイトカインである TNF- α (TNF), interleukin-6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 β) の遺伝子発現を real-time RT-PCR により評価した。以上の4項目をもって心臓老化を総合的に評価した。

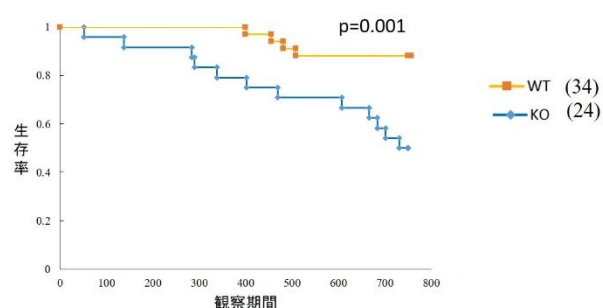
さらに、8週齢および25月齢における血清サンプルを用いて、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)を肝機能の指標として測定した。また、腎機能の指標として血清のクレアチンを測定した。

4. 研究成果

図1 β 2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウスの生存曲線

(1)生存曲線の解析

初めに、雄性的な β 2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウス(KO)とコントロールマウス(WT)において、生存率を検討した。その結果、予想に反して KO は、コントロールマウスと比較して25月齢までにおける生存率の低下を認められた(図1)。その機序を解析すべく、以下の解析を行った。



(2)心エコーによる心機能解析(収縮

能・拡張能)

まず初めに 25 月齢における心エコー解析を施行した。心収縮性の指標である fractional shortening や ejection fraction においては、両群に有意差を認めなかった。一方で、左室の拡張能の指標である僧帽弁血流の E/A ratio や DcT は、KO において有意に低下していた(図 2)。以上の結果より、KO は、収縮能の低下より拡張能の低下が有意な心機能の低下を呈する事が明らかとなった。

図 2 2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウスの左室拡張能

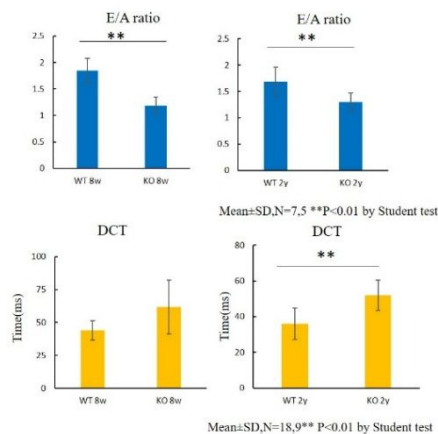
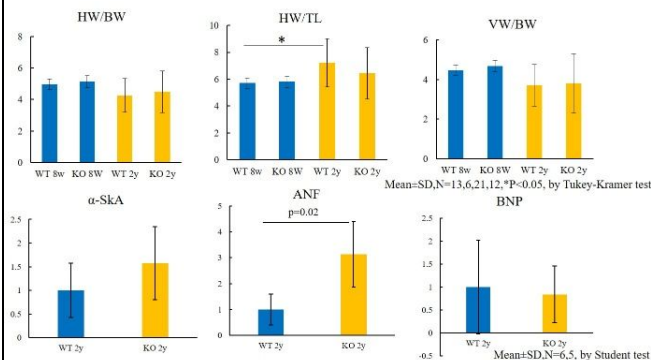


図 3 2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウスの心肥大



(3)心肥大解析

加齢に伴う心肥大について、25 月齢と 8 週齢のマウスにおいて検討した(図 3)。その結果、心肥大の指標である(HW/BW)に、25 月齢と 8 週齢のそれぞれの群間で有意な差を認めなかった。一方、体格の変化の影響を受けない HW/TL の結果から見ると、野生型のマウスにおいて、8 週齢のマウスより 25 月齢のマウスで、有意な上昇を認めた。また、心室肥大の指標である心室重量/体重比 (VW/BW) は、4 群間のマウスの間で差を認めなかった。心肥大の分子マーカーである -SKa、ANF、BNP の遺伝子発現を評価した real-time PCR の結果より、ノックアウトの老化マウスは野生型マウスより、ANF の有意な上昇を認めた。しかしながら、-SKa、BNP は老化マウスにおいて、両群間に有意な差を認めなかった。以上の結果、2 アドレナリン受容体は加齢に伴う心肥大に、直接的に関与しないと考えられた。

(4)心臓の線維化に関する検討:

加齢に伴う心臓の線維化について、2 アドレナリン受容体欠失の影響を検討した。マッソントリクローム染色の結果より、ノックアウトマウスの線維化が野生型マウスより、増加する傾向を認めた。real-time PCR により、2 種類のマウスにおいて、I 型 collagen の遺伝子発現に有意な差を認めなかった。しかしながら、III 型 collagen の遺伝子発現は、野生型よりノックアウトマウスにおいて、増加する傾向を認めた。以上の結果より、ノックアウトマウスにおいて、加齢に伴う心臓の線維化は増加する傾向があると考えられた。

(5)Senescence-associated secreted phenotype (SASP) :

最後に、加齢に伴う炎症を反映する SASP について、2 アドレナリン受容体との関連を検討した。SASP のマーカーである IL-6、IL-1、TNF の遺伝子発現は 25 月齢のマウスにおいて、有意な差を認めなかった。この結果は 2 アドレナリン受容体が、SASP と関連していない事を示唆している。

(6)重要臓器の機能評価 :

2 アドレナリン受容体遺伝子欠失マウスの寿命が短縮した原因として、心臓以外の重要臓器の機能低下の可能性も考えられる。この可能性を検討するため、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)を肝機能の指標として測定した。その結果、25 月齢において、2 群間に、いずれの指標においても、有意な差を認めなかった。さらに腎機能を血清クレアチニン値により評価したが、2 群間に有意な差を認めなかった。以上の結果は、寿命の短縮が、主として心臓に起因する可能性を示唆していると考えられる。

本研究において、2 アドレナリン受容体欠失に伴い寿命が短縮し、その表現型に心臓において拡張能の維持を介した aging-related cardiomyopathy の抑制が関与する事が明らかとなった。また、これらには SASP や他臓器は関与していない可能性が示唆された。この結果は 2 アドレナリン受容体を活性化させる事により、寿命を延長する可能性がある事が示唆される。2 アドレナリン受容体アゴニストは、気管支喘息に対する治療として貼付剤が一般的に使用され

ている。また、骨にも存在することが報告されており、骨粗鬆症との関連も示唆されている。今後、野生型老化マウスに、 β 2 アドレナリン受容体アゴニストを投与することにより、寿命が延長するかどうかを検討していく。将来的には、現在使用されている β 2 アドレナリン受容体アゴニストの貼付剤が、健康寿命を延長させる治療への展開を目指す。

本研究の結果により、抗老化薬の新規創薬が可能となれば、寿命の延長のみならず、高齢者の健康維持にもつながり、現代の高騰する社会福祉医療費の抑制をももたらす可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 1. Imaeda A, Tanaka S, Tonegawa K, Fuchigami S, Obana M, Maeda M, Kihara M, Kiyonari H, Conway SJ, Fujio Y, Nakayama H.	4. 巻 510
2. 論文標題 Myofibroblast 2 adrenergic signaling amplifies cardiac hypertrophy in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.01.070.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama H, Otsu K.	4. 巻 475
2. 論文標題 Mitochondrial DNA as an inflammatory mediator in cardiovascular diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 839-852.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20170714.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Enomoto D, Matsumoto K, Yamashita T, Kobayashi A, Maeda M, Nakayama H, Obana M, Fujio Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 ROR t-expressing cells attenuate cardiac remodeling after myocardial infarction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0183584.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0183584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyawaki A, Obana M, Mitsuhara Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, Fukada SI, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-01426-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama H, Yamamoto T, Oikawa H, Tonegawa K, Tsuchiyama D, Kawakatsu I, Obana M, Maeda M, Mohri T, Obika S, Fujio Y, Nakayama H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Phospholamban Inhibition by a Single Dose of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotide Improves Cardiac Contractility in Pressure Overload-Induced Systolic Dysfunction in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cardiovasc Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 273-282.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1074248416676392.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama H, Obana M, Tanaka S, Kawakatsu I, Tsuchiyama D, Mori S, Suizu H, Ishida A, Kimura R, Tsuchimochi I, Maeda M, Yoshimitsu T, Fujio Y, Nakayama H.	4. 巻 12
2. 論文標題 2-aminoethoxydiphenyl borate provides an anti-oxidative effect and mediates cardioprotection during ischemia reperfusion in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0189948.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0189948.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shota Tanaka, Daichi Enomoto, Emiko Yanase, Shohei Kumagai, Masanori Obana, Makiko Maeda, Yasushi Fujio, Hiroyuki Nakayama
2. 発表標題 Myofibroblast-specific deletion of Runx2 improves systolic function and survival in late phase of cardiac remodeling after myocardial infarction.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 守沖暁、尾花理徳、山本彩葉、金本聡自、前田真貴子、今泉和則、中山博之、藤尾慈
2. 発表標題 腎線維化病態における転写因子OASISの役割
3. 学会等名 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村瑠美、松本浩太郎、森原啓文、尾花理徳、前田真貴子、藤尾慈、中山博之
2. 発表標題 細胞死抑制因子Dad1の心筋細胞における意義
3. 学会等名 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 折本彩、中安佑介、松井理沙、宮脇昭光、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
2. 発表標題 心筋炎回復過程における心筋細胞の内因性増殖機構の解析
3. 学会等名 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関谷有紀子、尾花理徳、宮脇昭光、松本浩太郎、榎本大智、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
2. 発表標題 心筋細胞におけるR-spondin1の形態学的機能
3. 学会等名 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中山博之、藤尾慈	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床薬理学	

〔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	種池 学 (TANEIKE Manabu) (30609756)	大阪大学・キャンパスライフ健康支援センター・助教 (14401)	