

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K16025

研究課題名(和文) 不全心筋に対するセマフォリン3Aによる心筋再生療法

研究課題名(英文) Cardiac regenerative therapy using semaphorin 3A for failing myocardium

研究代表者

黒川 早矢香 (KUROKAWA, Sayaka)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：60439130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はイソプロテレノール(ISP)負荷不全心筋モデルマウスに胎生蛋白質制御因子セマフォリン3A(Sema3A)を静脈内投与することで、不整脈や心不全の抑制を図るという方法論を検証し、Sema3Aを用いた新たな治療概念を確立することを目的に実施した。本研究によりSema3Aが不全心筋における過剰な交感神経の分布を抑制し、心筋組織障害の緩和や左室収縮能の維持、不整脈の抑制に寄与する可能性が示された。本研究の成果は学会発表および論文として公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSema3Aが不全心筋モデルにおける病的変化を改善させる逆リモデリング効果を持つことが示された。交感神経系の過負荷が病態形成に関与する心不全やカテコラミン心筋症などの治療にSema3Aが応用できる可能性を示唆する結果が得られたことには大いに意義がある。

一方、本研究はISP負荷不全心筋モデルマウスという特定の条件下でのSema3Aの効果を検討したものであり、ヒトの心不全や心筋症の治療に臨床応用するには今回得られたデータのみでは十分ではない。今後、ヒトの心疾患におけるSema3Aの役割や治療効果および安全性についてさらなる検討を要する。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to validate the methodology for suppressing arrhythmias and heart failure by intravenous administration of the embryonic protein regulator semaphorin 3A (Sema3A) in an isoproterenol (ISP)-induced failing myocardium model, and to establish a new therapeutic concept using Sema3A. Additionally, the study demonstrated that Sema3A may inhibit the excessive distribution of sympathetic nerves in failing myocardium, contributing to alleviating myocardial tissue damage, maintaining left ventricular contractility, and suppressing arrhythmias. The results of this study have been presented at scientific conferences and published as a research article.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セマフォリン3A イソプロテレノール 心筋リモデリング 電气的リモデリング 逆リモデリング

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

自律神経系は生体の循環制御において重要な役割を果たしている。心不全では交感神経系が活性化してノルエピネフリンの分泌を増加させる。交感神経系の活性化は、短期的には心拍数や心筋収縮力の増加をもたらす、心不全に対する代償機構としての役割を果たす。しかし、同時に心筋障害や心肥大の進行、不整脈の増悪をもたらす、長期的には心不全の予後を悪化させる。したがって、交感神経系の適切な制御により不整脈や心不全の発症・増悪を抑制し、心疾患の治療に広く貢献できると考えられる。

私はこれまでに酸化ストレスが不整脈基盤を形成する機序の解明を行ってきた(Kurokawa S, et al. Circ J 2011; 75: 1386-1393)。過去の研究では酸化ストレスモデルマウスにおいて、胎生期にカリウムチャンネルの発現と生理活性を制御する蛋白である KChIP2 の発現が低下することを明らかにした(Kurokawa S, et al. Circ J 2014; 78: 1950-1959)。これを踏まえ、KChIP2 をはじめとする心筋胎生蛋白を制御することで心筋の構造やイオンチャンネルを変化させ、不全心筋を正常心筋に再生し、心疾患における病的な変化を治療できる可能性があると考えた。

本研究では、酸化ストレスモデルマウスの枠を超え、不全心筋一般における胎生蛋白を用いた心筋再生療法への道を検討するため、不全心筋モデルマウスに胎生蛋白制御因子セマフォリン 3A(Sema3A)を静脈内投与して、不整脈や心不全の抑制を図るという方法論を検証した。

2. 研究の目的

本研究ではイソプロテレノール(ISP)負荷不全心筋モデルマウスに胎生蛋白制御因子 Sema3A を投与することで、不整脈や心不全の抑制を図るという方法論を検証し、心筋の構造的・機能的・電気的リモデリングに対する根本的で新たな治療概念を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では ISP を腹腔内投与して作製した ISP 負荷不全心筋モデルマウスに、マウス由来のリコンビナント Sema3A を静脈内投与して ISP+Sema3A マウスとした。control 群・ISP 群 (ISP 負荷不全心筋群)・ISP + Sema3A 群 (不全心筋治療群) の 3 群で下記の項目の評価を行い不全心筋における Sema3A の治療効果を検証した。

[評価項目]

構造的リモデリング: 心重量、組織学的評価[心筋のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソントリクローム染色]、心エコー図[左室拡張末期径(LVDd)、左室収縮末期径(LVDs)、左室中隔厚(IVSth)、左室後壁厚(PWth)]

機能的リモデリング: 心エコー図[左室内径短縮率(%FS)]、カルシウムハンドリング関連因子の評価(定量リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法)

電気的リモデリング: 電気生理学検査[単相性活動電位持続時間(MAPD)、有効不応期(ERP)]、心筋イオンチャンネルおよび心筋イオンチャンネル関連因子の評価(定量リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法)

交感神経系の評価: 組織学的評価(心筋のチロシンヒドロキシラーゼ免疫染色)

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

体重、心重量、心体重比

表に体重、心重量、心体重比を示す。第 0 日の体重には 3 群間で差を認めなかったが、第 7 日、第 14 日では ISP 群および ISP+Sema3A 群の体重は control 群よりも有意に低下していた。心重量は ISP 群では control 群よりも増加していたが、ISP+Sema3A 群と control 群には有意な差は認めなかった。心体重比は ISP 群および ISP+Sema3A 群で control 群よりも増加していた。

以上より、ISP の負荷により不全心筋群では心重量が増加し心肥大の存在が示唆されたが、Sema3A の投与によりこの変化は軽度にとどまる可能性が示された。

表 体重、心重量、心体重比

	体重 (g)			心重量 (g)	心体重比 (%)
	第0日	第7日	第14日		
control	24.0 ± 1.6	23.9 ± 1.6	24.3 ± 1.2	0.116 ± 0.016	0.478 ± 0.054
ISP	23.5 ± 1.2	22.6 ± 1.1*	22.4 ± 1.9*	0.126 ± 0.010*	0.564 ± 0.069*
ISP+Sema3A	23.7 ± 1.6	22.4 ± 1.4*	22.6 ± 1.7*	0.123 ± 0.016	0.545 ± 0.057*

*p<0.05 vs. control.

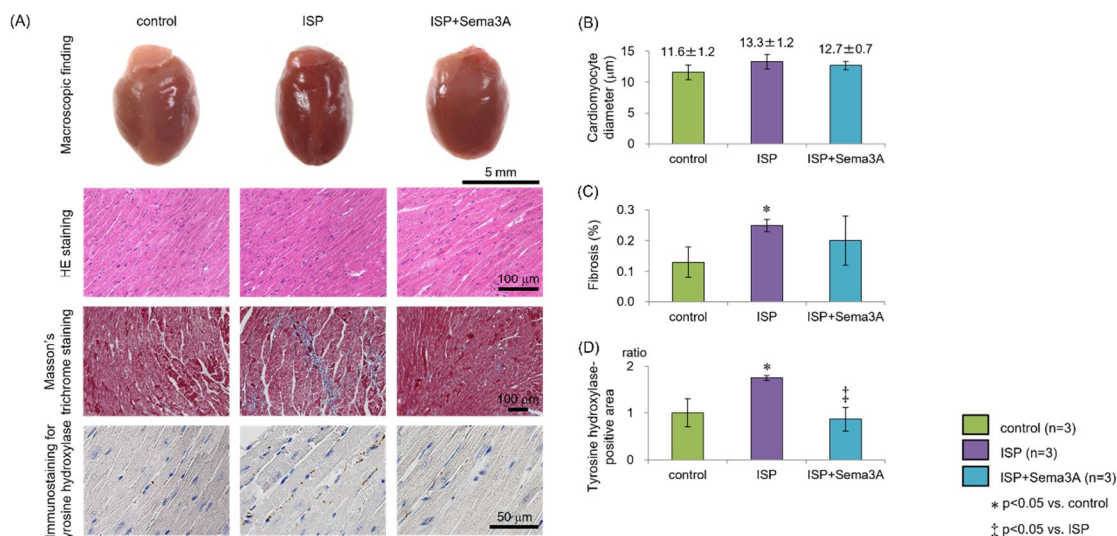
control: n=31, ISP: n=24, ISP+Sema3A: n=21.

組織学的評価

図 1 に心臓の肉眼的所見および心筋の組織学的所見を示す。肉眼的には 3 群に有意な差はみられなかった(図 1 A、1 行目)。HE 染色では 3 群の心筋細胞にはいずれも異常はなく、明らかな差異は認めなかった(図 1 A、2 行目)。マッソントリクローム染色では心筋細胞の横径に 3 群間の有意な差は認めず(図 1 A、3 行目および図 1 B)、心筋組織の線維化は ISP 群で control 群よりも亢進していたが、ISP+Sema3A 群では control 群および ISP 群との間に有意な差を認めなかった(図 1 A、3 行目および図 1 C)。チロシンヒドロキシラーゼの免疫染色による交感神経の分布は ISP 群で control 群よりも亢進し、ISP+Sema3A 群では ISP 群よりも低下していた(図 1 A、4 行目および図 1 D)。

以上より、ISP 負荷により心筋組織の線維化と交感神経の分布の亢進が認められ、この交感神経の過剰な分布は Sema3A の投与により抑制されることが確認できた。一方、Sema3A が心筋組織の線維化を抑制することを統計学的に示すことはできなかった。

図 1 肉眼的所見、心筋組織所見



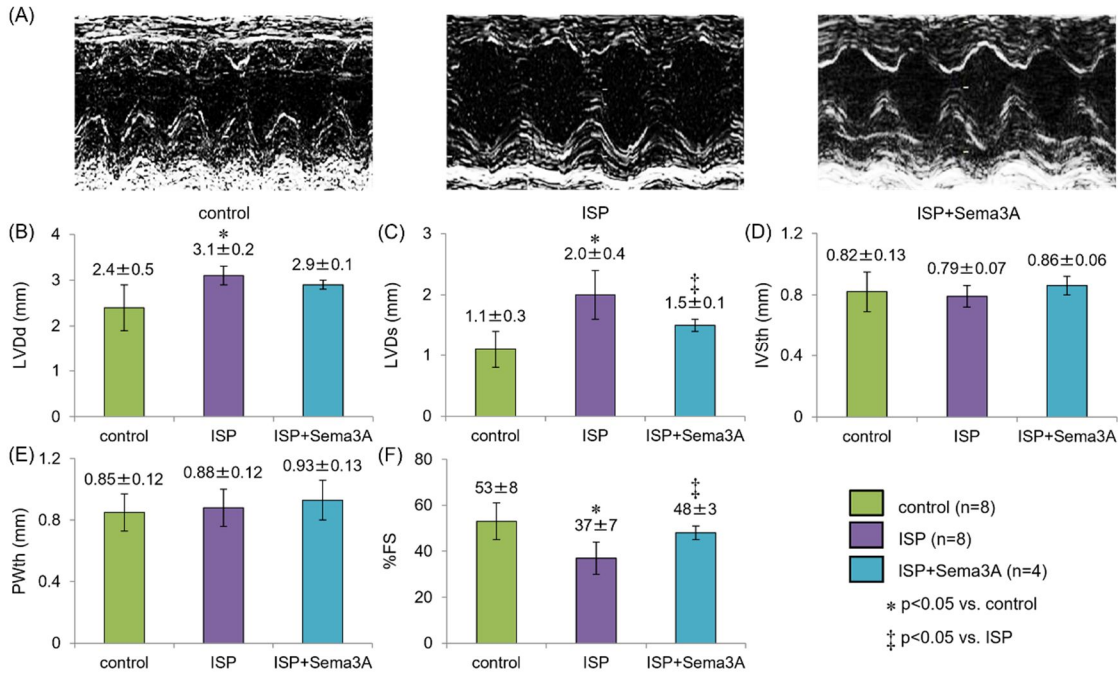
心エコー図

心エコー図の結果として、図 2A に左室短軸断面乳頭筋レベルでの M モードにおける代表的な画像を示す。また、図 2B~F に心エコー図における各計測値の結果を示す。

ISP 群では control 群よりも LVDd および LVDs が拡大しており、さらに LVDs は ISP+Sema3A 群で ISP 群よりも縮小していた。左室壁厚 (IVSth および PWth) には 3 群間に有意な差は認めなかった。ISP 群で control 群よりも低下した %FS は、ISP+Sema3A 群では ISP 群よりも上昇していた。

以上より、ISP 負荷は左室を拡大し左室収縮能を低下させるが、Sema3A の投与により左室収縮能は改善することが示された。

図 2 心エコー図



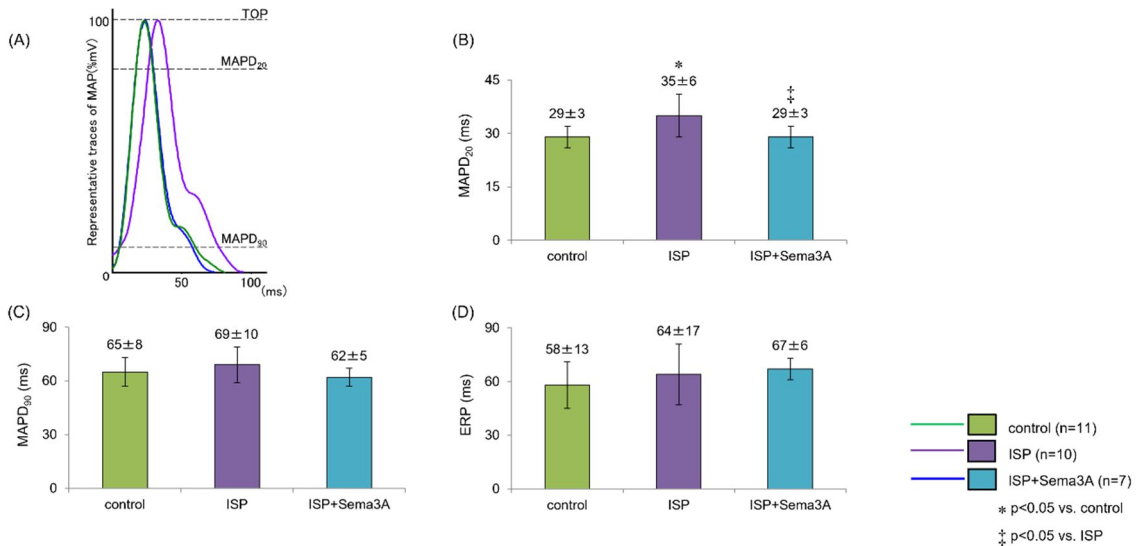
電気生理学検査

図 3 に各群における単相性活動電位の代表的な波形(MAP、図 3A)と単相性活動電位持続時間 20%回復時間(MAPD₂₀)、90%回復時間(MAPD₉₀)、ERP の計測結果(図 3B ~ D)を示す。

MAPD₂₀ は ISP 群で control 群より延長したが、ISP+Sema3A 群では ISP 群より短縮し、control 群と同程度に改善した。また、MAPD₉₀ と ERP には 3 群に差を認めなかった。

ISP 負荷により催不整脈性に与する MAPD₂₀ の延長がみられたが、この変化は Sema3A の投与により改善することが示された。

図 3. 電気生理学検査



心筋イオンチャネルおよびカルシウムハンドリング関連因子の mRNA および蛋白発現

心エコー図や電気生理学検査より得られた結果の裏付けとなる原因を明らかにするために、心筋イオンチャネルおよび関連因子、カルシウムハンドリング関連因子の mRNA 発現を定量リアルタイム PCR で評価し、有意な変化を示したものについてさらにウェスタンブロット法による蛋白発現を評価した。

図 4 に代表的な因子の mRNA 発現、図 5 に蛋白発現の結果を示す。心筋イオンチャネルおよび関連因子では Kv4.3 および KChIP2 が ISP 群で低下したが、ISP+Sema3A 群ではいずれも ISP 群より増加した(図 4A・B)。同様にカルシウムハンドリング関連因子では SERCA2 が ISP 群で control 群より低下したが、ISP+Sema3A 群では ISP 群より増加した(図 4C)。なお、いずれの因子においても control 群に比較すると ISP+Sema3A 群での mRNA 発現は低下していた。一方、Kv4.3 の蛋白発現は ISP 群では control 群よりも低下していたが、ISP+Sema3A 群では ISP 群よりも増加して

いた(図 5B)。しかし、KChIP2 および SERCA2 の蛋白発現には 3 群間で有意な差を認めなかった(図 5C・D)。

図 4 mRNA の発現 (control 群での発現量を 1 として各群での発現量を相対的に示す。)

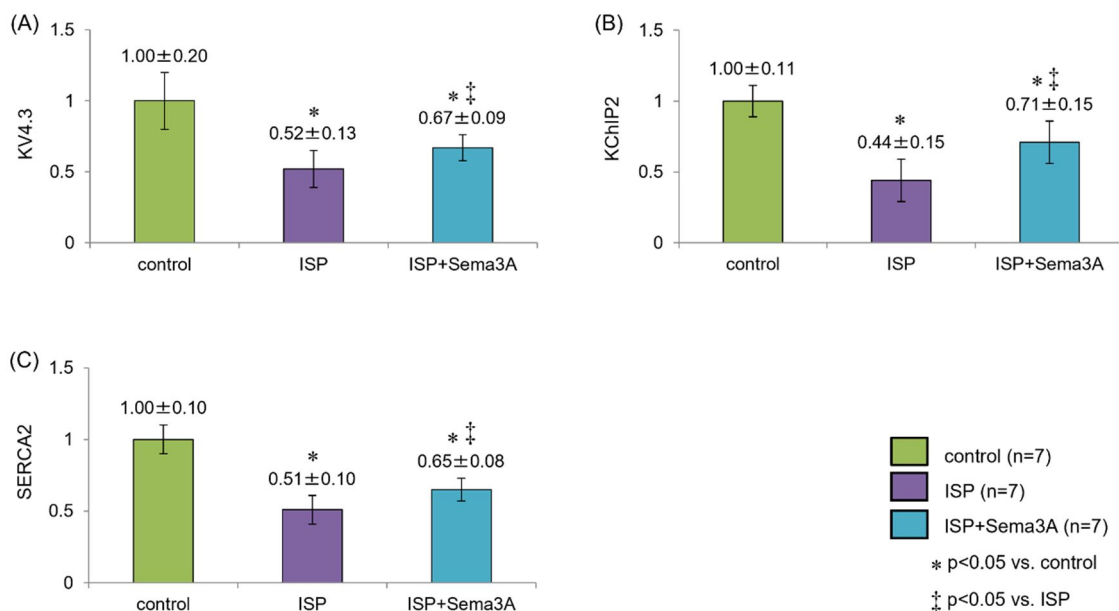
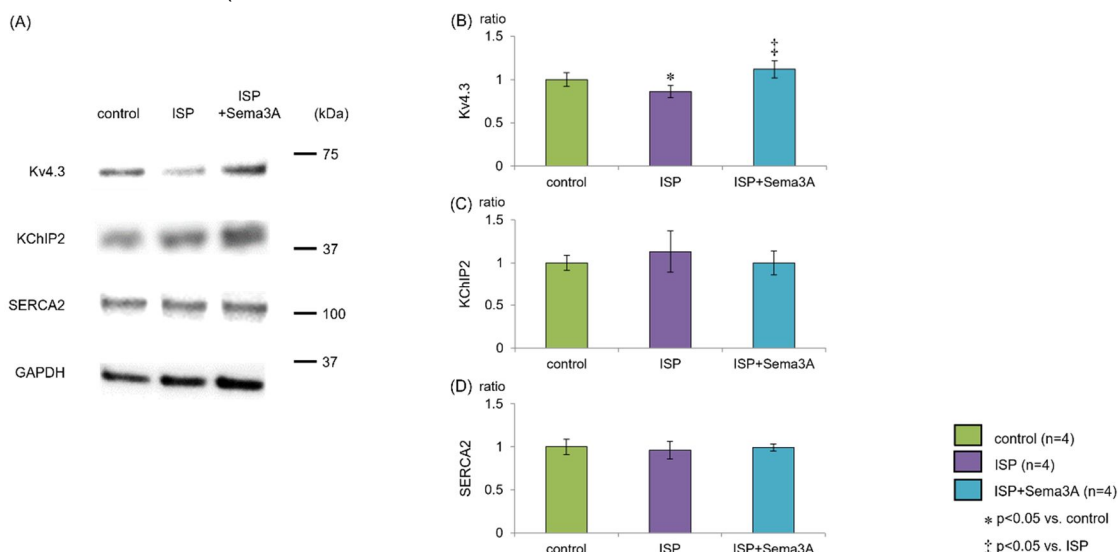


図 5 蛋白発現 (B-D では control 群での発現量を 1 として各群での発現量を相対的に示す。)



(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト・今後の展望

ISP 負荷不全心筋モデルマウスでは心筋に交感神経が過剰に分布してカテコラミンの過負荷を生じ、心筋組織の線維化が進行して%FS が低下し、Kv4.3 の発現低下により MAPD₂₀ が延長することが明らかになった。さらに、ISP 負荷マウスへの Sema3A の静脈内投与は、心筋での交感神経の過剰な分布を抑制してカテコラミン負荷を軽減し、心筋の線維化を緩和して%FS を維持し、Kv4.3 の発現を増加させて MAPD の適正化に寄与することが示唆された。本研究により静脈内投与した Sema3A が不全心筋において心筋組織障害の緩和や左室収縮能の維持、不整脈の抑制に寄与する可能性が示された。本研究の成果は学会発表および、論文[Kurokawa S, et al. *Intravenous semaphorin 3A administration maintains cardiac contractility and improves electrical remodeling in a mouse model of isoproterenol-induced heart failure*. *Int Heart J* (in press)]として公表した。今回 Sema3A が不全心筋モデルにおいて構造的・機能的・電気的リモデリングを改善させる逆リモデリング効果を持つことを示唆する結果が得られたことで、交感神経系の過負荷が病態形成に関与する心不全やカテコラミン心筋症などの治療に応用できる可能性が示されたことには大いに意義がある。

一方、本研究は ISP 負荷不全心筋モデルマウスという特定の条件下での Sema3A の効果を検討したものであり、ヒトの心不全や心筋症の治療に臨床応用するには今回得られたデータのみでは十分ではない。今後、ヒトの心疾患における Sema3A の役割や治療効果および安全性についてさらなる検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurokawa S, Kashimoto M, Hagikura K, Shimodai-Yamada S, Otsuka N, Wakamatsu Y, Nagashima K, Matsumoto T, Hao H, Okumura Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Intravenous semaphorin 3A administration maintains cardiac contractility and improves electrical remodeling in a mouse model of isoproterenol-induced heart failure.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kurokawa S, Kashimoto M, Otuska N, Wakamatsu Y, Nagashima K, Okumura Y.
2. 発表標題 Intravenous Administration of Semaphorin 3A Improves Electrical Remodeling and Heart Failure to Regulate Catecholamine Overload.
3. 学会等名 Heart Rhythm 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurokawa S, Kashimoto M, Otuska N, Wakamatsu Y, Nagashima K, Okumura Y.
2. 発表標題 Intravenous Semaphorin 3A Maintains Contractility and Improves Electrical Remodeling in Isoproterenol-Induced Myocardial Failure in Mice.
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会(JCS2022)（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------