

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06898

研究課題名(和文)新規心線維化シグナリング分子の同定と拡張不全治療への応用

研究課題名(英文)Identification of novel therapeutic targets for 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞のNOX1/NADPHオキシダーゼは心線維芽細胞の抑制因子の産生もしくは活性を抑制していることを明らかにした。NOX1を欠損させた心筋芽細胞株(H9c2)では細胞外マトリックス分子(ECM)であるCollagen4a1(Col4a1)、Osteoglycin(Ogn)およびPodcan遺伝子の発現上昇がみとめられた。これらECM分子をゲノム編集法により欠損させると、NOX1欠損心筋芽細胞のモジネートで認められた心線維芽細胞の増殖抑制作用は有意に回復した。以上の結果からCol4a1、OgnおよびPodcanがNOX1により調節される心線維化抑制因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では左室駆出率の保持された心不全(Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: HFpEF)が心不全患者の50%以上を占めるものの、予後を改善する治療法がない現状である。HFpEFの主因は心筋細胞の肥大と線維化による拡張不全であることから、本研究ではHFpEFの新しい治療法の開発に向け、心臓の線維化を抑制する新しい分子の同定とその作用機構について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously presented that doxorubicin-induced cardiac fibrosis was suppressed in the mice which deficient of NOX1/NADPH oxidase. We studied the role of NOX1 in the cardiac fibrosis using H9c2 cells, a rat cardiomyoblast cell line, and primary cultures of cardiac fibroblasts isolated from adult male mice. Increased proliferation of cardiac fibroblasts induced by transforming growth factor- β (10 ng/ml) or fetal bovine serum (1%) was significantly suppressed when cardiac fibroblasts were exposed to homogenates from Nox1-disrupted H9c2, but not from wild-type cells. In Nox1-disrupted H9c2 cells, expression of Collagen4a1 (Col4a), Osteoglycin (Ogn), and Podocan (Podn) were up-regulated. When the homogenates from Col4a⁻, Ogn⁻, or Podn⁻ disrupted H9c2 were exposed to cardiac fibroblasts, suppressed proliferation was significantly restored. These findings suggest that NOX1 promotes cardiac fibrosis via down-regulation of fibrosis inhibitory factors in cardiomyocytes.

研究分野：薬理学

キーワード：心線維化 活性酸素種 NADPHオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

心不全には左室駆出率の低下した心不全 (Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: HFrEF) と左室駆出率の保持された心不全 (Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: HFpEF) がある。HFrEF はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系抑制薬で予後が改善するが、心不全の 50%以上を占める HFpEF は未だ有効な治療法が確立されておらず、高血圧、虚血性心疾患、糖尿病等の生活習慣病を背景に持つ患者が多い。

HFpEF の本質は左心室拡張不全であり主因は心筋の肥大と心臓の線維化である。なかでも線維性コラーゲンが拡張不全の原因となることから、HFpEF に対しては抗線維化作用を有する薬物が有効と考えられる。

2. 研究の目的

従来心疾患については心筋細胞死や機能障害を中心として研究が進められてきたが、心臓の線維化誘導機構に関しては未だ不明な点が多い。申請者は活性酸素種 (ROS) 産生酵素である NADPH オキシダーゼの誘導型分子種、NOX1 の遺伝子欠損マウス (Nox1-KO) で、アントラサイクリン系抗腫瘍薬であるドキソルビシン (DOX) 投与によって急激に惹起される心臓の線維化が抑制されるとの所見を得た。さらに心筋細胞において NOX1 が未知のシグナリング分子の産生・分泌を介し、心線維化を亢進させることを見出した。本研究の目的は心臓の線維化に関わる新規シグナリング分子の同定と、その作用機構の解明による HFpEF 治療への応用である。

3. 研究の方法

1) 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。

2) 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

申請者は Nox1-KO で、アントラサイクリン系抗腫瘍薬であるドキソルビシン (DOX) 投与によって急激に惹起される心臓の線維化が抑制されるとの所見を得た。心線維化の誘導機構には、傷害をうけた心筋細胞から漏出した HMGB1、Fibronectin および S100 protein 等の Damage-associated molecular patterns (DAMPs) が関与することが知られている。心筋細胞から漏出した DAMPs は心線維芽細胞の Toll-like receptors や終末糖化産物受容体、RAGE 等の Pattern recognition receptors (PRRs) に作用し心線維芽細胞の増殖および細胞外マトリックスの産生を促進し、心線維化を誘導すると報告されている。In vitro において心筋細胞傷害を再現する目的で、心筋芽細胞株 H9c2 の超音波粉砕によるホモジネートを調製し、マウスより単離した心線維芽細胞に処置したところ、有意な増殖の促進が認められたが、ゲノム編集により作製した NOX1-欠損 H9c2 のホモジネートでは、心線維芽細胞の増殖は有意に抑制されることを見いだした。また NOX1 により調節される線維化促進因子の一つが S100A1 であることを報告している。

本研究ではさらに心筋細胞の NOX1 が関わる心線維化調節因子の解析を行った。心筋細胞のどのような因子が心線維芽細胞の増殖に関与しているかを明らかにするため、H9c2 ホモジネートを DNase I、RNase A および加熱によるタンパクの変性処置を行った。野生型 H9c2 細胞ホモジネートの DNase I、および RNase A で処置では心線維芽細胞の細胞増殖に影響は認められなかったが、加熱により僅かに増殖の促進が認められた。一方、NOX1 欠損 H9c2 細胞では、ホモジネートの加熱により著明な心線維芽細胞の増殖亢進がみとめられ、野生型細胞と同程度まで回復が認められた。以上の結果から NOX1 欠損細胞では加熱により線維化抑制因子が失活した可能性が示唆された (図 1)。

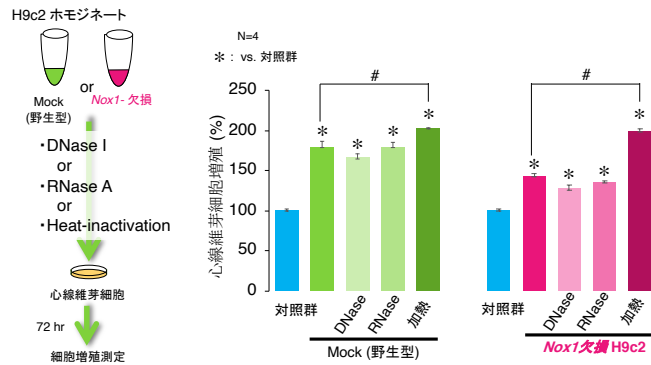


図1 心筋細胞ホモジネートの加熱により心線維芽細胞の増殖が促進

そこで、NOX 1 と線維化抑制因子との関与を明らかにするため、線維芽細胞増殖や細胞外マトリックス産生の促進因子である Transforming Growth Factor- β (TGF- β) および血清 (FBS) による心線維芽細胞の増殖刺激に対する H9c2 細胞ホモジネートの効果について検討した。心線維芽細胞に TGF- β もしくは FBS を処置すると増殖の促進が認められた。TGF- β および FBS と同時に野生型 H9c2 のホモジネートを処置した場合、心線維芽細胞の増殖は認められたが、NOX1 欠損細胞のホモジネートでは TGF- β および FBS による心線維芽細胞の増殖を有意に抑制した (図 2)。この結果から NOX1 欠損細胞では線維化抑制因子が増加もしくは活性化していると考えられた。

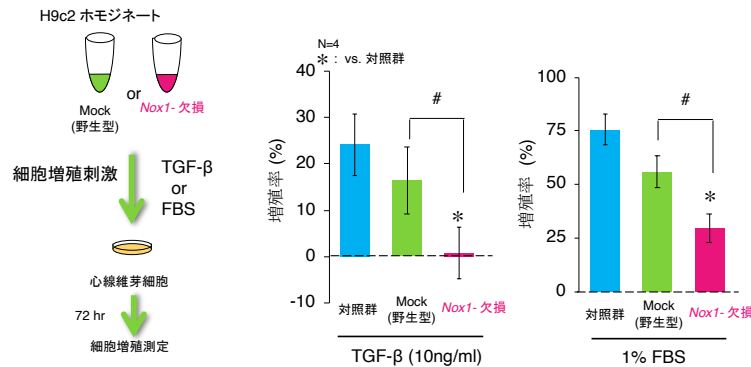


図2 NOX1 欠損細胞ホモジネートは TGF- β および血清刺激による心線維芽細胞の増殖を抑制

続いて、NOX1 により調節される線維化抑制因子を明らかにするために NOX1 欠損心筋芽細胞で網羅的に遺伝子発現を検討したところ、数種の細胞外マトリックス(ECM)分子の発現が上昇していることを見いだした。発現上昇がみとめられた ECM 分子のうち、Collagen4a1 (Col4a1)、Osteoglycin (Ogn)および Podcan (Podn)をゲノム編集法により欠損させると、NOX1 欠損心筋芽細胞のホモジネートによる心線維芽細胞の増殖抑制作用は有意に回復した (図 3)。

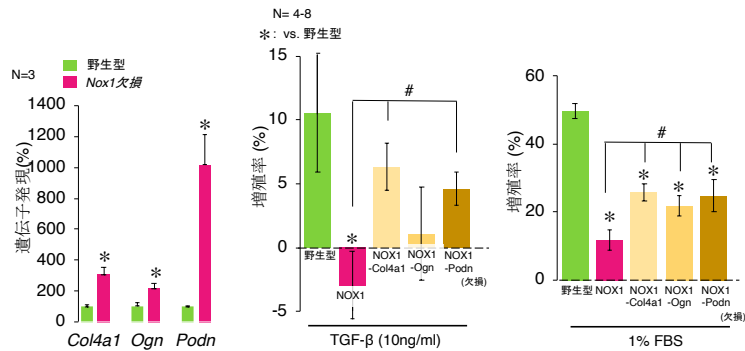


図3 Collagen4a1、Osteoglycin および Podcan 欠損により心線維芽細胞の増殖が回復

以上の結果から Collagen4a1、Osteoglycin および Podcan が NOX1 により調節される心線維化抑制因子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wen Xiaopeng, Iwata Kazumi, Ikuta Keiko, Zhang Xueqing, Zhu Kai, Ibi Masakazu, Matsumoto Misaki, Asaoka Nozomi, Liu Junjie, Katsuyama Masato, Yabe Nishimura Chihiro	4. 巻 286
2. 論文標題 NOX1/ NADPH oxidase regulates the expression of multidrug resistance associated protein 1 and maintains intracellular glutathione levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 678 ~ 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14753	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 Liu Junjie, Iwata Kazumi, Zhu Kai, Matsumoto Misaki, Matsumoto Kenjiro, Asaoka Nozomi, Zhang Xueqing, Ibi Masakazu, Katsuyama Masato, Tsutsui Masato, Kato Shinichi, Yabe-Nishimura Chihiro	4. 巻 147
2. 論文標題 NOX1/NADPH oxidase in bone marrow-derived cells modulates intestinal barrier function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 90 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.009	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazumi Iwata, Kuniharu Matsuno, Chihiro Yabe-Nishimura
2. 発表標題 Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following myocardial cell injury plays a critical role in the development of cardiac fibrosis
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazumi Iwata, Chihiro Yabe-Nishimura
2. 発表標題 Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following myocardial cell injury plays a critical role in the development of cardiac fibrosis
3. 学会等名 NOX Family NADPH Oxidases Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田和実, 矢部千尋
2. 発表標題 NOX1/NADPHオキシダーゼによる心線維化抑制因子の発現調節
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田和実, 劉俊傑, 矢部千尋
2. 発表標題 メタボリックシンドロームの形成に関わる菌血症と腸管バリア機能障害-活性酸素生成酵素NOX1/NADPHオキシダーゼの役割
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	松本 みさき (Matsumoto Misaki) (80533926)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

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
---------	---------