

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08510

研究課題名(和文) 梗塞後リモデリング進展過程における β -アレスチン偏向性受容体CXCR7の機能解明

研究課題名(英文) Beta-arrestin-biased agonism of CXCR7 affects post-infarct cardiac remodeling.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカインレセプターであるCXCR7は、 β -アレスチン経路のみを活性化する偏向性受容体であるが、心臓におけるその役割は不明であった。

心臓を構成する細胞を網羅的に解析するためにscRNAseq解析を施行した。結果、CXCR7は血管内皮細胞に発現は低く、心筋細胞で高いことが分かった。次に細胞特異的遺伝子欠損マウスを作成したところ、やはり心筋細胞特異的CXCR7遺伝子欠損マウスで心不全が増悪した。CXCR7はERKの活性化が伴うことが細胞実験によって示唆され、マウス心臓やヒト不全心においても同様の結果であった。CXCR7は心筋細胞において心保護的に働くことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、以下のような新規の発見があった。

心臓においてCXCR7の発現量は高く、とくに心筋細胞がその首座になっていること、心筋細胞内に発現するCXCR7が心筋梗塞に対して保護的にはたらくこと、CXCR7がERKを介して心保護的に働くこと、ヒト心臓においても同様の心保護効果が期待されること、である。心不全治療の標的分子として応用可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：CXCR7 is a beta-arrestin-biased receptor highly expressed in the heart but its role remains elusive. Here we performed single cell-RNAseq analysis and revealed that Cxcr7 is predominantly expressed in cardiomyocytes, not in endothelial cells. Cardiomyocyte-specific Cxcr7 null mouse exhibited exacerbated heart morphology and function after myocardial infarction, suggesting the cardioprotective effects of CXCR7. *in vitro* study using CXCL12, a CXCR7 ligand, demonstrated that ERK activation is CXCL12 dose dependent. ERK activation was also observed in the border zone of infarcted murine heart and this ERK activation was abolished in cardiac-specific CXCR7 null heart. In human hearts, RNAseq analysis unveiled Cxcr7 expressions were significantly increased in failing heart compared to control heart and this increase was ameliorated by LVAD treatment, further suggesting the association of CXCR7 and heart failure.

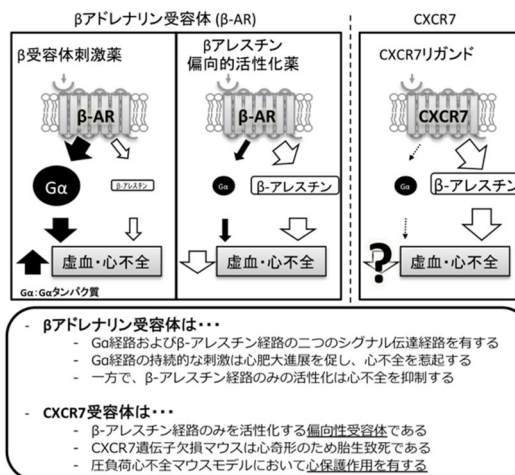
研究分野：心不全

キーワード：CXCR7 心不全 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

アドレナリン受容体遮断薬 (遮断薬) などの G タンパク質共役受容体 (GPCR) 標的薬は心不全治療の第一選択薬である。これまで、遮断薬の心保護作用は G タンパク質を介した有害なシグナル伝達の抑制によるものと考えられてきたが、近年、その効果は GPCR の副経路とも言われる β -アレスチン経路の活性化が担っていることが報告された (図 1)。GPCR のひとつである CXCR7 は、 β -アレスチンのみを活性化する β -アレスチン偏向性受容体であり、成体マウス心臓に発現する GPCR のなかで最も発現が高い (図 2)。全身で CXCR7 が欠損したマウスは心奇形により胎生致死となる一方で、成体マウス心臓における CXCR7 の役割は不明のままであった。申請者らは圧負荷心不全マウスモデルを用いた予備実験において CXCR7 が心保護作用を有することを発見した。

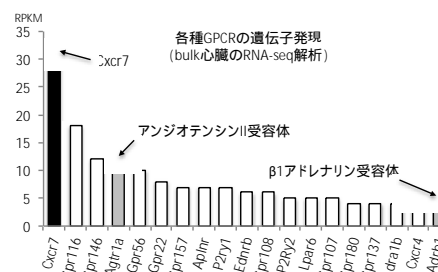
図1. β -アレスチン偏向的活性化による心不全抑制作用



2. 研究の目的

本研究では「心筋梗塞後リモデリングにおける β -アレスチン偏向性受容体 CXCR7 の機能解明」を目的として以下の 4 点を明らかにする。梗塞後リモデリングにおける CXCR7 機能の主座となる細胞種の同定、梗塞後リモデリングにおける SDF1-CXCR4 シグナルと CXCR7 シグナルの関連、梗塞後リモデリングにおける CXCR7/ β -アレスチン経路活性化の証明と機能評価、CXCR7 下流シグナルの網羅的解析と心不全治療標的シグナル分子の同定。

図2. 心臓内 Cxcr7 遺伝子発現は非常に高い



3. 研究の方法

Conventional な CXCR7 KO は胎生致死である。このため本研究では Cre/LoxP システムを用いた細胞特異的 cKO マウスを用いる。心臓を構成するほぼすべての細胞種を網羅的に解析するために、心筋細胞特異的 (MHC-Cre)、血管内皮細胞特異的 (Cdh5-CreERT2)、線維芽細胞特異的 (Col1a2-Cre) の 3 種の CXCR7 cKO マウスを作成する。これらに左前下行枝結紮手術を施行し、梗塞後心臓リモデリング・心不全を誘導する。

1. <CXCR7 の心保護効果における主座となる細胞種の同定>

心筋、血管内皮、線維芽細胞の 3 種の細胞特異的 CXCR7 cKO を作成し、心筋梗塞手術を施行する。心機能 (心エコー) 線維化 (PicroSirius Red 染色)、心体重比をもとに心不全重症度を評価し、いずれの細胞種における CXCR7 が最も重要かを判定する。また、細胞種が同定できた場合、その細胞種特異的なトランスジェニックマウス (MHC-CXCR7 Tg マウスなど) を作成し、cKO 解析結果の裏付けを取る。さらに in situ hybridization (RNAscope®) や免疫染色を用いて CXCR7 発現を RNA 1 分子レベルで明らかにする。

2. <SDF1-CXCR4 シグナル-免疫細胞系の関与>

CXCR7 のリガンドは SDF-1 であるため、リガンドを競合する CXCR4 を介した細胞 trafficking の関与、すなわち血球浸潤も検証する。CXCR7cKO 梗塞心臓を digest 後に Ly6c, CD11b などによりラベルし、フローサイトメトリーを用いて浸潤細胞の比較を行う。同様の抗体で免疫染色を施行し、浸潤細胞の時空間的局在を確認する。

3. <CXCR7/ β -アレスチン活性化>

in vivo においては CXCR7 と β -アレスチンの多重免疫蛍光染色と免疫沈降を、in vitro においてはラット培養心筋細胞などを用いて Proximity Ligation Assay を施行し、CXCR7/ β -アレスチンの相互作用を確認する。

4. <下流シグナルと治療標的の探索>

46 種類のカイネースを同時に解析できるカイネースアレイを用いて、siRNA (siCxcr7, SiArrb1/2) で処理前後の培養細胞におけるシグナル活性化を網羅的に比較検討する。CXCR7 あるいは下流分子を標的とする低分子化合物 (TC14012 など) を心不全マウスに投与し、心不全改善効果を認めるかどうかを検討する。

4. 研究成果

野生型マウス心臓を用いて 1 細胞 RNAseq 解析により心臓組織内における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、*Cxcr7* 発現はおもに心筋細胞と線維芽細胞に発現しており、血管内皮細胞や平滑筋細胞、心臓マクロファージなどの細胞には発現が低かった。一方で CXCR7 のリガンドである *Cxcl12* 発現を見てみると、*Cxcr7* とは対照的に血管内皮細胞における発現が顕著であった(図 3)。つぎに心筋細胞特異的 (MHC-Cre)、血管内皮細胞特異的 (Cdh5-CreERT2)、線維芽細胞特異的 (Col1a2-Cre) の 3 種の CXCR7 cKO マウスを作成のうえ、心筋梗塞手術を施行した。結果、心筋細胞特異的 CKO マウスにおいてのみ心筋梗塞後リモデリングの増悪が認められた(図 4)。これは、心筋細胞における CXCR7 が心保護的に働いていることを示す結果であった。

CXCR7 がどのように心保護効果を発揮するかを確認するために、CXCR7 遺伝子を導入した HEK293 細胞を作成し、リガンドである CXCL12 による titration 効果を確認した。すると、CXCR7 の下流シグナルとして知られる ERK が CXCL12 量依存的に活性化していること、そしてその活性化は CXCR7 遺伝子発現と相関することが見いだされた。また、CXCR7 アゴニストである TC4012 による刺激が ERK を活性化させることはラット胎仔心筋細胞においても確認されたことから、CXCR7 による心筋細胞の保護効果は ERK 活性化に由来することが示唆された。このような心筋細胞における CXCR7-ERK シグナル経路を生体内で確認するために、野生型マウス心筋梗塞を用いて、梗塞境界領域の CXCR7-ERK シグナル経路を確認した。結果、梗塞境界領域においては、遠隔領域と比較して *Cxcr7* 発現が高値であり、ERK 活性化も更新していることが分かった。また、このような ERK の活性化は心筋細胞特異的 CXCR7cKO マウスにおいては認められなかったため、ERK が CXCR7 の下流に位置し効果を発揮していることが生体心臓においても確認できた。さらに、マウス生体のみならずヒト心不全においても CXCR7 の関与がないかどうか確認するため、ヒト不全心の心内膜下生検標本を用いて RNAseq 解析を施行した。解析の結果、マウス心臓と同様にヒト不全心のサンプルにおいても *CXCR7* 発現は著明に増加しており、心不全形成に CXCR7 が関与していることをさらに示唆する結果となった。

図3. 1細胞RNAseqヒートマップ解析

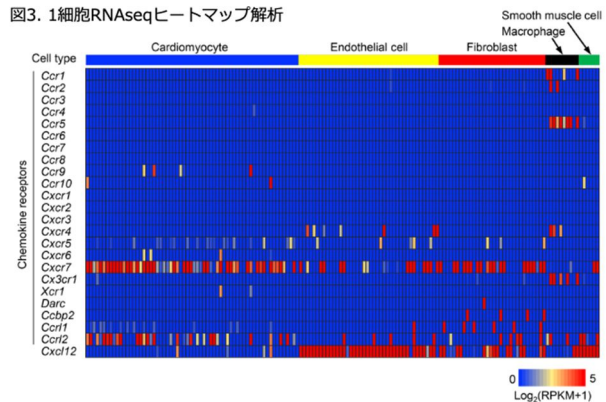
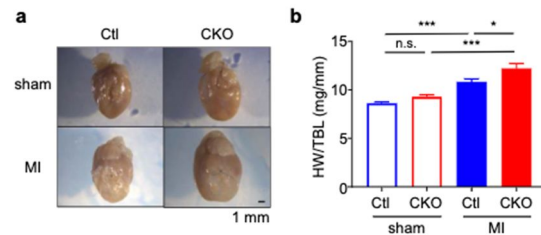


図4. 心筋細胞特異的CXCR7 KOマウスは梗塞後リモデリングが増悪する



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ishizuka et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a arrestin-biased receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83022-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	東口 治弘 (TOKO HARUHIRO) (40436358)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	

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