

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08563

研究課題名(和文) TGF- の新規制御分子プロスタグランジン受容体EP4による心臓線維化抑制

研究課題名(英文) Prostaglandin E2 receptor EP4 regulates fibrotic changes via TGF-beta in cardiac fibroblast cells

研究代表者

梅村 将就 (UMEMURA, Masanari)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50595353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの心臓線維芽細胞に対して、EP4刺激を行うとトランスフォーミング増殖因子(Transfoming Growth Factor- $\beta$ ：TGF- $\beta$ )の分泌が減少することが判明した。TGF- $\beta$ は線維芽細胞の線維化を促進する強力な促進因子である。さらにEP4刺激により、結合組織の主要な増殖因子であるCTGF(Connective Tissue Growth Factor, IGFBP8)も強力に抑制することが分かった。これにより、EP4は心臓線維芽細胞において線維化を抑制する重要な調節因子であることが疑われた。今後は、EP4のノックアウトマウスなどを用いてさらに詳細にそのメカニズムを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓における線維芽細胞は線維化への関与だけでなく、様々なサイトカインや成長ホルモンを介して心筋細胞に直接作用し、細胞収縮や肥大、さらには細胞生存性を制御することが明らかになっている。プロスタグランジンE2(PGE2)受容体EP4欠損マウスではコントロールと比較し、アンジオテンシン(負荷)による心臓の線維化が亢進していることを見出した。我本研究の学術的意義はEP4受容体が、TGF- $\beta$ を介して心臓線維化の強力な新規調節分子として働いていることを証明し、心臓線維化への作用を解析することである。メカニズムが明らかになることで心臓の線維化を抑制する初めてのEP4作動薬の開発が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The EP4 prostanoid receptor is one of the four receptor subtypes for Prostaglandin E2 (PGE2). It is known that EP4 is highly expressed in the heart and has protective effects against adverse cardiac remodeling after ischemia-reperfusion. Regulation of EP4 signaling is a potential strategy for protective therapy against cardiac fibrosis. In this study, we show that EP4 signal regulates fibrotic changes and the regulation of signaling pathway in cardiac fibroblast. EP4 agonist decreased the expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and connective tissue growth factor (CTGF). These results indicated that PGE2-EP4 signaling downregulated the secretion of TGF- $\beta$  and CTGF in cardiac fibroblast of rat. These results demonstrated that EP4 regulates hormonal factors such as TGF- $\beta$  and CTGF, resulting in protection of fibrotic changes.

研究分野：分子生物学

キーワード：心臓線維芽細胞 EP4 TGF- $\beta$  線維化 CTGF

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心臓における線維芽細胞は線維化に関与しているだけでなく、様々なサイトカインや成長ホルモンを介して心筋細胞に直接作用し、細胞収縮や肥大、さらには細胞生存性を制御することが明らかになっている[1]。研究代表者は先行研究にて、プロスタグランジン E2(PGE2)受容体の1つである EP4 の欠損マウスでは Wild マウス(コントロール)と比較し、アンジオテンシン 負荷による心臓の線維化が著しく亢進していることを見出した。また、そのメカニズム検証の過程で、ラットから分離した培養心臓線維芽細胞に対して、EP4 作動薬(刺激薬)である ONO-AE1-329 により刺激することで、線維化を引き起こす強力な因子として知られる TGF- $\beta$ の分泌が顕著に抑制されることを発見した。これらの結果を基に、我々は EP4 が心臓において線維化を調整する有力な新規調節分子であるとの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、EP4 受容体が、TGF- $\beta$ を介して心臓線維化の強力な新規調節分子として働いていることを証明し、心臓線維化への作用を解析する。最終目標は、EP4 を制御することで、心臓の線維化の進行を抑制する初めての EP4 作動薬の開発への基盤となる知見を得ることである。

### 3. 研究の方法

EP4 遺伝子欠損マウスから分離した心臓線維芽細胞の初代培養や、ラットから分離した心臓線維芽細胞を用いて EP4 刺激によって誘導される線維化関連因子の解析を行った。

- (1) カルシウム感受性色素である Fura2 を用いて、ヒト心臓線維芽細胞、ヒト乳がん細胞(MCF-7)、ヒト神経膠芽腫細胞(LN229)、EP4 欠損マウス(ヘテロ)の心臓線維芽細胞、Wild マウスの心臓線維芽細胞を用いて、EP4 アゴニストである ONO-AE1-329(1  $\mu$ M)もしくは ONO-AE1-437(1  $\mu$ M)で刺激し、細胞内カルシウム濃度をそれぞれプレートリーダーにて測定した。EP4 アゴニストは小野薬品から提供されたものを用いた。
- (2) ラットの心臓線維芽細胞を EP4 アゴニストである ONO-AE1-329(1  $\mu$ M)で刺激し、刺激6時間後に定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction, PCR)を用いて線維化関連遺伝子の発現量を評価した。トランスフォーミング 殖因子(Transforming Growth Factor- :TGF- $\beta$ )、Connective tissue growth factor (CTGF)、ACTA2(別名: $\alpha$ -smooth muscle actin、 $\alpha$ -SMA)の評価を行った。
- (3) ラットの心臓線維芽細胞に対し、EP4 アゴニストである ONO-AE1-329(1  $\mu$ M)での刺激24時間後及び48時間後に培養上清を回収し、濃縮した後、ウエスタンブロットリング法を用いて蛋白の発現を評価した。TGF- $\beta$ 及びCTGFの発現を評価した。

### 4. 研究成果

EP4 アゴニストで、ヒト心臓線維芽細胞、ヒト乳がん細胞(MCF-7)、ヒト神経膠芽腫細胞(LN229)をそれぞれ刺激したところ、いずれの培養細胞でも速やかに細胞内カルシウム濃度が上昇することを確認した。次に、EP4 ノックアウトマウス(ヘテロ)と Wild マウスから心臓線維芽細胞を分離し、EP4 アゴニストでそれぞれ刺激した。その結果、比較対象である Wild マウスでは時間経過とともに細胞内カルシウム濃度の速やかな上昇を認めたのに対し、EP4 ノックアウトマウスでは、細胞内カルシウム濃度の上昇が有意に緩やかであった( $p < 0.05$ )。この結果から、EP4 は心臓線維芽細胞において、細胞内カルシウム濃度を上昇させる働きを担っていることが示唆された。この結果は、我々が口腔がん培養細胞において、EP4 アゴニストの刺激で細胞内カルシウム濃度が上昇したことを報告した論文と矛盾しなかった[2]。加えて、small hairpin RNA (shRNA) レンチウイルスを用いて EP4 をノックダウンし、EP4 アゴニスト刺激で細胞内カルシウム濃度を

評価した。その結果でも EP4 ノックダウン細胞では、コントロール shRNA 細胞と比較して、細胞内カルシウム濃度の上昇が有意に緩やかであった。このことにより、心臓線維芽細胞と口腔がんでは対象は違うものの、EP4 ノックアウトマウスと EP4 ノックダウン培養口腔がん細胞の両方において、EP4 を刺激することにより、細胞内カルシウム濃度が速やかに上昇することが確認できた。また、我々が行った口腔がんを用いた免疫沈降の実験では、EP4 は膜蛋白のカルシウムチャネルのひとつである Ora1 や Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) とカップリングしていることを確認した。このことにより、EP4 を介した心臓線維芽細胞における細胞内カルシウム上昇にもこれらの分子が関与していることが疑われた。加えて、我々の研究により、EP4 はカルシウムシグナルを介して口腔がんの遊走能を促進することがわかったため、心臓線維芽細胞でも遊走能への同様の評価が必要だと思われた。

また、ラット心臓線維芽細胞に対して、EP4 アゴニストで刺激を行うとトランスフォーミング増殖因子 (Transforming Growth Factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ )、Connective tissue growth factor (CTGF)、ACTA2 (別名:  $\alpha$ -smooth muscle actin、 $\alpha$ -SMA) の遺伝子発現が 6 時間後に低下することがわかった。TGF- $\beta$  は線維芽細胞の線維化を促進する強力な促進因子であり、CTGF は結合組織成長因子として知られる。また、 $\alpha$ -SMA は心臓線維芽細胞が心臓筋芽細胞 (活性型) に形質転換することを示すマーカーとしても知られている。この結果から、EP4 を刺激することで、遺伝子レベルで心臓線維芽細胞から心臓筋芽細胞への形質転換が抑制され、心臓の線維化が抑制される可能性が示唆された。

また、ラット心臓線維芽細胞を EP4 アゴニストで刺激し、培養上清を回収し、ウエスタンブロットティングで蛋白発現を評価したところ、TGF- $\beta$  のみならず CTGF の分泌も減少することが判明した。心臓線維芽細胞から抽出した蛋白の EP4 自体の発現に変化はなかった。これらの結果より、EP4 は細胞内カルシウム濃度を調節することで TGF- $\beta$  や CTGF の発現を調節し、線維化を抑制していることが示唆された。

従来、心筋梗塞の心臓でプロスタグランディンの産生が亢進することから、その心虚血・再灌流障害への関与が示唆されてきた。EP4 作動薬の心保護作用としては血管拡張、好中球機能の抑制、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 産生の抑制及びインターロイキン-10 (IL-10) の産生促進などが提唱されている。しかしながら、詳細については不明な点が多い。今回、我々が同定した EP4-TGF- $\beta$  や EP4-CTGF の経路は新たな心臓線維化の促進シグナルカスケードである可能性がある。なお、EP4-TGF- $\beta$  と EP4-CTGF のシグナルが独立して作用しているのか、クロストークしているのかについては、より詳細な検討が必要だと思われる。また、我々の検討により、抗がん剤のひとつであるドキソルピシンが心臓線維芽細胞において、活性型である心臓筋芽細胞への形質転換を促すことを見出し、論文報告した[3]。さらに心臓線維芽細胞において、ドキソルピシンは ACTA2 や CTGF の遺伝子発現を亢進し、心臓の血管周囲の線維化を促進することも見出し、論文報告した[4]。このことから、EP4 がドキソルピシンにより引き起こされる心臓線維化にも関与している可能性があり、今後の検討課題だと思われる。

一方、TGF- $\beta$  について言えば、拡張型心筋症や肥大型心筋症の患者では心臓組織及び血中の TGF- $\beta$  レベルが高いことが知られている[5]。すなわち、EP4 を介して TGF- $\beta$  が制御できれば拡張性心不全患者だけでなく、様々な病態の心筋症の患者に対しても治療効果が期待できると考えられるため、EP4 アゴニストは重要な心不全治療の候補薬になり得る可能性がある。

さらに、現在、がんの分野では EP4 拮抗薬「ONO-4578 (開発コード)」を用いた国内第 1 相臨床試験(P1)が 2018 年 1 月から開始されている。TGF- $\beta$  は、がんの進展においてがん抑制作用と浸潤・転移促進作用をもつという 2 面的な作用が広く知られている。胃がんや大腸癌などの癌細胞においても TGF- $\beta$  の過発現が確認されており、癌間質形成にも関与しているとされる。これらから、本研究は心臓線維化の作用の解析にとどまらず、がん領域における EP4-TGF- $\beta$  経路の解明にもつながると期待できる。引き続き、EP4 の心臓線維芽細胞特異的ノックアウトマウスなどを用いてさらに詳細にそのメカニズムを検討する。

#### <引用文献>

- [1] C.A. Souders, S.L.K. Bowers, T.A. Baudino, Cardiac fibroblast: the renaissance cell, *Circ Res* 105(12) (2009) 1164-1176.
- [2] K. Osawa, M. Umemura, R. Nakakaji, R. Tanaka, R.M. Islam, A. Nagasako, T. Fujita, U. Yokoyama, T. Koizumi, K. Mitsudo, Y. Ishikawa, Prostaglandin E(2) receptor EP4 regulates

cell migration through Orai1, *Cancer Sci* 111(1) (2020) 160-174.

[3] M. Umemura, M. Narikawa, R. Tanaka, H. Nemoto, R. Nakakaji, A. Nagasako, Y. Ishikawa, [Doxorubicin directly induced fibrotic change of cardiac fibroblasts], *Nihon Yakurigaku Zasshi* 156(3) (2021) 146-151.

[4] R. Tanaka, M. Umemura, M. Narikawa, M. Hikichi, K. Osaw, T. Fujita, U. Yokoyama, T. Ishigami, K. Tamura, Y. Ishikawa, Reactive fibrosis precedes doxorubicin-induced heart failure through sterile inflammation, *ESC Heart Failure* 7(2) (2020) 588-603.

[5] M. Pauschinger, D. Knopf, S. Petschauer, A. Doerner, W. Poller, P.L. Schwimmbeck, U. Köhl, H.P. Schultheiss, Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio, *Circulation* 99(21) (1999) 2750-6.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tanaka R, Umemura M, Narikawa M, Hikichi M, Fujita T, Yokoyama U, Ishigami T, Kimura K, Tamura K, Ishikawa Y	4. 巻 2
2. 論文標題 Reactive Fibrosis Precedes Doxorubicin-induced Heart Failure through Sterile Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 588-603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12616.	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 Hiromi T, Yokoyama U, Kurotaki D, Mamun A, Ishiwata R, Ichikawa Y, Nishihara H, Umemura M, Fujita T, Yasuda S, Minami T, Goda M, Uchida K, Suzuki S, Takeuchi I, Masuda M, Breyer M, Tamura T, and Ishikawa Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Excessive EP4 signaling in smooth muscle cells induces abdominal aortic aneurysm by amplifying inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1559-1573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.120.314297	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ishigami Tomoaki, Kino Tabito, Minegishi Shintaro, Araki Naomi, Umemura Masanari, Ushio Hisako, Saigoh Sae, Sugiyama Michiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulators of Epithelial Sodium Channels in Aldosterone-Sensitive Distal Nephrons (ASDN): Critical Roles of Nedd4L/Nedd4-2 and Salt-Sensitive Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3871 ~ 3871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21113871	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Umemura M, Islam R, Fukumura H, Sato I, Kawabata Y, Matsuo K, Nakakaji R, Nagasako A, Ohtake M, Fujita T, Yokoyama U, Nakayama T, Eguchi H, and Ishikawa Y.	4. 巻 110
2. 論文標題 Simultaneous hyperthermia-chemotherapy effect by arterial injection of Fe(Salen) for femur tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 356-365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13851	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 Prajapati R, Fujita T, Suita K, Nakamura T, Cai W, Hidaka Y, Umemura M, Yokoyama U, Knollmann B, Okumura S, and Ishikawa Y	4. 巻 83
2. 論文標題 The usefulness of exchanged protein directly activated by cAMP (Epac)1-inhibiting therapy for prevention of atrial and ventricular arrhythmias in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation journal	6. 最初と最後の頁 295-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0743	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 Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Suita K, Shigeta M, Kiyonari H, Umemura M, Yokoyama U, Sadoshima J, and Ishikawa Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Translationally controlled tumor protein (TCTP) plays a pivotal role in cardiomyocyte survival through a Bnip3-dependent mechanism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-019-1787-7	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 Narikawa M, Umemura M, Tanaka R, Fujita T, Yokoyama U, Ishigami T, Kimura K, Tamura K, Ishikawa Y	4. 巻 12;14(9)
2. 論文標題 Doxorubicin induces trans-differentiation and MMP1 expression in cardiac fibroblasts via cell death-independent pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221940	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 Osawa K, Umemura M, Nakakaji R, Tanaka R, Islam R, Nagasaki A, Fujita T, Yokoyama U, Koizumi T, Mitsudo K, Ishikawa Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Prostaglandin E2 receptor EP4 regulates cell migration via Orai1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 160-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14247	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 Tanaka R, Umemura M, Narikawa M, Hikichi M, Fujita T, Yokoyama U, Ishigami T, Kimura K, Tamura K, Ishikawa Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Reactive Fibrosis Precedes Doxorubicin-induced Heart Failure through Sterile Inflammation, and Pioglitazone Reduces Early Cardiac Remodelling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 588-603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.12616	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 Hiromi T, Yokoyama U, Kurotaki D, Mamun A, Ishiwata R, Ichikawa Y, Nishihara H, Umemura M, Fujita T, Yasuda S, Minami T, Goda M, Uchida K, Suzuki S, Takeuchi I, Masuda M, Breyer M, Tamura T, and Ishikawa Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Excessive EP4 signaling in smooth muscle cells induces abdominal aortic aneurysm by amplifying inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1559-1573
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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 梅村将就
2. 発表標題 静水圧や温熱などの外部刺激に対する心臓繊維芽細胞の生理応答
3. 学会等名 第126回日本解剖学会・第98回日本生理学会合同大会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Umemura M, Tanaka R, Narikawa M, Ishikawa Y
2. 発表標題 Hydrostatic pressurization suppressed fibrotic change via Akt/GSK-3 signaling in human cardiac fibroblasts
3. 学会等名 The American College of Cardiology (ACC) 2019: 68th Annual Scientific Session & Expo, March 16, New Orleans. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Narikawa M, Umemura M, Tanaka R, Ishigami T, Tamura K, Ishikawa Y
2. 発表標題 Doxorubicin directly induced fibrotic change of cardiac fibroblasts and matrix metalloproteinase-1
3. 学会等名 The American College of Cardiology (ACC) 2019: 68th Annual Scientific Session & Expo, March 16, New Orleans. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umemura M, Nakakaji R, Osawa K, Islam R, Eguchi H, Ishikawa Y
2. 発表標題 New technology of Synthesizing Commercial Available Drugs with Intrinsic Magnetism
3. 学会等名 BIT's 17th Annual Congress of International Drug Discovery Science & Technology, 2019, July, Kyoto, Japan, Invitation Speaker. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umemura M, Osawa K, Tanaka R, Hikichi M, Nakakaji R, Ishikawa Y
2. 発表標題 Prostaglandin E2 receptor EP4 regulates fibrotic changes via intracellular calcium in cardiac fibroblast cells
3. 学会等名 American Heart Association (AHA), Scientific Sessions 2019, Philadelphia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umemura M
2. 発表標題 Doxorubicin induces trans-differentiation in cardiac fibroblasts via cell death-independent pathways
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 公募シンポジウム
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学  
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/gyouseki.html>

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	横山 詩子  (YOKOYAMA Utako)  (70404994)	東京医科大学・医学部・主任教授    (32645)	

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