

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23800

研究課題名(和文) 梗塞後心不全発症の分子メカニズムの解明と新規心不全治療標的の提唱

研究課題名(英文) The elucidation of the molecular mechanisms of heart failure after myocardial infarction and the proposal of novel therapeutic targets for heart failure

研究代表者

松本 浩太郎 (Matsumoto, Kotaro)

大阪大学・薬学研究科・招へい研究員

研究者番号：90849879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後心不全発症機構の解明を目的に、新たな炎症関連免疫細胞の探索、及びその機能解析を行った。マウス心筋梗塞モデルにおいて、傷害を受けた心臓ではTGF- β 3やGARPを発現する、新規ミエロイド系細胞サブセットが浸潤していることが明らかとなった。また抗TGF- β 3抗体が、心筋梗塞後心不全発症を予防することが見出された。今後は、ミエロイド細胞におけるTGF- β 3やGARP欠損マウスを用いて、心不全発症機構における役割を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は我が国の死因別死亡率の第2位を占める。また、超高齢社会を迎えた我が国では、心不全パンデミックと称されるように、心不全患者が急増している。現在の治療を以てしても、心不全は予後不良の病態であるため、新たな心不全発症予防法の確立が重要である。本研究では、心筋梗塞後の心不全発症過程に、これまで知られていなかった炎症関連免疫細胞が関与する可能性を見出した。本研究結果は、新たな心不全治療標的の提唱に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiac remodeling is positively and negatively regulated by inflammatory immune cells; however, the molecular mechanisms are not fully understood. In the present study, novel myeloid cells expressing TGF- β 3 and Glycoprotein A Repetitions Predominant (GARP) were found by single cell RNA-sequencing. The expression of TGF- β 3 and GARP was increased in murine hearts after myocardial infarction (MI). Moreover, anti-TGF- β 3 antibody treatment suppressed cardiac dysfunction and adverse cardiac remodeling 14 days after MI. Therefore, the myeloid cells expressing TGF- β 3 and GARP may play a crucial role in cardiac remodeling. Future studies will assess the role of TGF- β 3 and GARP in myeloid cells in cardiac remodeling using cell specific knockout mice.

研究分野：分子心臓病学

キーワード：心不全 心筋梗塞 炎症関連免疫細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、心不全パンデミックと称されるように、心不全患者が急増している。現在の治療を以てしても、心不全は予後不良の病態であり、新規心不全発症予防法の確立が喫緊の課題である。心筋梗塞後の心不全発症過程（心筋リモデリング）には、ミエロイド細胞をはじめとした多くの免疫炎症細胞が関与することが報告されている。炎症関連免疫細胞には多様なサブタイプが存在することが知られているが、分子レベルでのキャラクター化は未だ不十分である。そこで、心不全病態機構の解明を目的に、新たな炎症関連免疫細胞（特にミエロイド細胞）を探索し、その機能を追究することとした。

2. 研究の目的

新規心筋梗塞後心不全発症予防法の確立を目指し、心筋リモデリングの制御に関与する新たな炎症関連免疫細胞を探索するとともに、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

動物実験は、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。

(1) マウス心筋梗塞 (MI) モデルの作製

マウス MI モデルは、イソフルラン麻酔下、マウス心臓の左冠動脈前下行枝を結紮することで作製した。

(2) シングルセル RNA-sequence

MI7 日目の心臓より、CD11b 陽性ミエロイド細胞を単離し、シングルセル RNA-sequence 解析 (BD Rhapsody Single-Cell Analysis System) を行った。

(3) 抗 TGF- β 3 抗体の投与

抗 TGF- β 3 抗体は、マウス MI モデルを作製後 1 日目と 8 日目にそれぞれ 100 μ g/body の用量で静脈内投与した。心機能は、心エコーにより測定した。MI14 日目に心臓を採材し、各種解析に供した。

(4) 遺伝子発現またはタンパク発現解析

心臓中遺伝子発現解析は定量的 PCR 法により、タンパク発現はウェスタンブロッティングやフローサイトメトリー、免疫組織学的検討により評価した。

4. 研究成果

下記の成果については発表準備中のため、データは割愛する。

(1) 心筋リモデリング制御に関与する新規炎症関連免疫細胞の探索

MI7 日目のマウス心臓より、CD11b 陽性ミエロイド細胞を単離し、シングルセル RNA-sequence 解析を行った。その結果、ミエロイド系細胞はその発現分子の特徴から 3 つのクラスターに分離できた。それら 3 つのクラスターは、一つがマクロファージ様、もう一つは好中球様の特徴を有していたが、残る一つは既報から特徴づけられる細胞群ではないことが明らかとなった。さらに、当該クラスターの細胞群は、TGF- β 3 や Glycoprotein A Repetitions Predominant (GARP) を強発現していた。なお、これら分子の心筋リモデリングにおける役割は不明である。そこで、当該炎症関連免疫細胞の役割を明らかにするべく、まずは TGF- β 3 及び GARP の機能を追究した。

(2) リモデリング心における TGF- β 3 の発現解析

MI 後、経時的に TGF- β 3 mRNA 発現を検討したところ、TGF- β 3 mRNA は MI 後 7-14 日目をピークに発現上昇し、28 日目では非病態心における発現レベルまで減少していることが明らかとなった。また、ウェスタンブロッティングより、MI7 日目の心臓から単離したミエロイド系細胞において、TGF- β 3 はタンパクレベルでも発現し、また免疫組織学的検討より、その発現は主に虚血傷害及びその近傍領域で認められることが明らかとなった。

(3) 心筋リモデリングにおける TGF- β 3 の役割

MI 後心筋リモデリングにおける TGF- β 3 の役割を検討するため、MI モデルマウスに抗 TGF- β 3 抗体を投与し、心機能や心筋線維化に与える影響を評価した。その結果、MI14 日目において、抗 TGF- β 3 抗体投与群ではコントロール群と比べて左室内径短縮率や左室収縮末期径などの心

機能の悪化の抑制が認められた。さらに、マッソントリクローム染色による組織学的評価から、抗 TGF- β 3 抗体投与群では有意な線維化抑制作用が認められた。

(4) リモデリング心における GARP の発現解析

MI 後、経時的に GARP mRNA 発現を検討したところ、GARP mRNA は MI 後 3-4 日目をピークに約 10 倍に発現上昇し、その後減少するものの、7-14 日目においても非病態心と比して約 5 倍と高値を示した。さらに、フローサイトメトリーの結果、タンパクレベルにおいても、MI2 日後に末梢血中で、MI4 日後に心臓組織中で GARP 発現の上昇が確認された。

(5) ミエロイド系細胞特異的 TGF- β 3 欠損マウス及びミエロイド系細胞特異的 GARP 欠損マウスの作製

ミエロイド系細胞特異的プロモーター-LysM の下流に Cre を有するマウス (LysM-Cre マウス) と TGF- β 3 の exon6 または GARP の exon1 が loxP 配列で挟まれたマウス (TGF- β 3 flox または GARP flox) を交配させ、ミエロイド系細胞特異的 TGF- β 3 欠損マウス及びミエロイド系細胞特異的 GARP 欠損マウスを作製した。今後、当該マウスを用いて心筋梗塞後心筋リモデリングにおけるミエロイド細胞の TGF- β 3 や GARP の役割を検討していく。

(6) ミエロイド系細胞の機能欠失/可視化マウスの作製

Cre-loxP システムにより、CD11b プロモーター下でジフテリアトキシン受容体及び GFP を発現するマウスを作製した。本マウスを駆使することで、ミエロイド細胞を可視化し生体内動態を追跡できるとともに、ジフテリアトキシンを投与することでミエロイド細胞を欠失させ、病態形成への寄与を検討することができる。

以上、本研究から、心筋梗塞後心筋リモデリング制御に、新規ミエロイド細胞サブセットの関与が示唆され、その分子メカニズムとして TGF- β 3 や GARP の重要性が示された。今後は、これら分子の欠損マウスを用いて、その機能をより詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Arisa Kobayashi, Wahyuni Tri, Ryuta Igarashi, Masashi Tomimatsu, Kotaro Matsumoto, Makiko Maeda, Masanori Obana, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 Maresin 1, an anti-inflammatory lipid mediator, induces physiological hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayaha Yamamoto, Masanori Obana, Takafumi Nakae, Yoshiaki Miyake, Sayuri Mitsuoka, Makiko Maeda, Kazunori Imaizumi, Kotaro Matsumoto, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 Inhibition of transcription factor OASIS attenuated kidney fibrosis.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Risa Matsui, Shoki Fukuyama, Yusuke Kametani, Yuriko Wada, Kotaro Matsumoto, Makiko Maeda, Masanori Obana, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 Development of a screening system for the compounds that induce the cell cycle activity in mammalian cardiomyocytes.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shota Tanaka, Atsuki Imaeda, Kotaro Matsumoto, Makiko Maeda, Masanori Obana, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 2-adrenergic stimulation induces Arid5a through cAMP/PKA/CREB axis to promote IL-6 upregulation.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsuki Imaeda, Shota Tanaka, Kotaro Matsumoto, Makiko Maeda, Masanori Obana, Yasushi Fujio.
2. 発表標題 2 adrenergic signaling of cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy through paracrine system.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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