

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07303

研究課題名（和文）GSK-3活性化作用に基づいた心臓線維化抑制薬開発に向けた基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of cardiac fibrosis inhibitors based on GSK-3 activation

研究代表者

高橋 富美（Takahashi, Fumi）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：50274436

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）：冷凍焼灼法によって作成した心臓の線維化に対するコキシブ系薬物の抗線維化作用の機序についてin vivoおよびin vitroで検討を行った。その結果、コキシブ系薬物によりTGF- β シグナル下流のSMAD2/3のリン酸化が抑制され、心臓の線維芽細胞の筋線維芽細胞への転換（fibroblast-to-myofibroblast transition）が抑制されていることが示された。これにより、コキシブ系は心臓の線維化を抑制し心機能の改善につながっていることが示唆された。これらの結果から、コキシブ系薬物には心臓線維化治療薬としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の心筋梗塞の発症率は、高齢化率の上昇に伴って増加傾向にある。心筋梗塞発症後は、早期再灌流療法の確立により死亡率は低下しているが、梗塞心筋の修復性線維化とこれに続く心臓リモデリングによる心機能の低下が問題となっている。心筋リモデリングに伴う線維化のコントロールは、心筋梗塞治療のターゲットとして有望視されているが、現段階では“線維化抑制薬”は開発されていない。本研究結果により、コキシブ系薬物が、心臓の線維化抑制薬として有望である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of the anti-fibrotic effect of coxibs on cardiac fibrosis created by cryoinjury was investigated in vivo and in vitro. The results showed that coxibs suppressed phosphorylation of SMAD2/3 which are downstream molecules of TGF- β signaling and inhibited fibroblast-to-myofibroblast transition (FMT) in cardiac fibroblasts. These results suggest that coxibs improve cardiac function via inhibition of cardiac fibrosis, and have a potential as an anti-fibrotic agent for treatment of cardiac fibrosis.

研究分野：薬理学

キーワード：心筋梗塞 線維化 GSK-3 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国の心筋梗塞の発症率は高齢化率の上昇に伴って増加傾向にある。急性冠症候群ガイドライン(2018年度版)によると、我が国での心筋梗塞の発症平均年齢は男性65歳、女性75歳となっており、心筋梗塞は高齢者に多くみられる疾患である。

心筋梗塞発症後は、早期の再灌流法の確立により死亡率は低下しているが、梗塞心筋の修復性線維化と、これに続く心臓リモデリングによる心機能の低下が問題となっており、高齢心筋梗塞罹患者のQOLを著しく低下させている。

心臓の修復性線維化に起因する心臓リモデリングは、さらなる心臓線維化と心肥大を引きおこし、心機能の低下へと結びつく。心臓の線維化は、その後の心臓リモデリングを加速させるため、心筋リモデリングに伴う線維化のコントロールは、心筋梗塞治療のターゲットとして有望視されている。しかし、現在のところ線維化抑制をターゲットとした薬物は開発されていない。

心臓の線維化では、活性化された線維芽細胞(筋線維芽細胞)の集積と筋線維芽細胞からの細胞外マトリックス分泌が起こり、組織の弾力性や強度が失われるとともに、電気信号伝達が阻害され、心臓収縮・拡張機能の低下を来す。

この線維芽細胞の活性化には、transforming growth factor (TGF) - β 1-SMAD2/3を介した経路が提唱されているが、近年この経路の構成分子の一つである、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3) が治療薬の標的として注目されている(Lal H. et al. Circ Res. 2015)。

GSK-3は、グリコーゲン合成酵素をリン酸化することでその活性を阻害するセリン・スレオニンキナーゼとして同定された。しかし、現在では胚発生、細胞周期制御、細胞分化、細胞運動性、アポトーシス、細胞接着といった様々な細胞機能に関与していることが知られている。

心筋細胞には様々なシグナル分子が存在するが、GSK-3は、心筋細胞の肥大を調節する重要な役割を果たしている(Antos CL et al. Proc Natl Acad Sci USA 2002, Lal H et al. Circ Res 2015)。GSK-3は β -catenin や nuclear factor of activated T-cell, cytoplasmic 3 (NFATc3) など、心肥大に関連するタンパク質を不活化する。GSK-3を恒常的に活性化した遺伝子改変マウスでは、圧負荷または アドレナリン受容体刺激による心肥大が抑制される(Webb JG et al. Cardiovasc Res 2010)。

GSK-3に関するこれらの報告から、GSK-3を活性化する薬物が、心臓リモデリングの抑制薬として、有用な治療ストラテジーになる可能性があると考えた。

心臓リモデリングは、心肥大および心臓の線維化を特徴とするが、特に心臓の線維化はその後の心臓リモデリングを加速させるため、心筋リモデリングに伴う線維化のコントロールは、心筋梗塞治療の重要な課題である。しかし、現在のところ“線維化抑制薬”は開発されておらず、その開発は切望されている。そこで、本研究は特に線維化抑制効果に主眼を置いて行った。

2. 研究の目的

現在までに我々は、GSK-3活性化作用を有するコキシブ系薬物が、複数の心肥大モデルマウス(遺伝性拡張型心筋症モデル、圧負荷モデル、アドレナリン刺激による心肥大モデル)の線維化を抑制し、心臓リモデリングの抑制と、それに伴う心機能改善効果を発揮することを報告しており、世界に先駆けた研究を展開している。

しかしながら、GSK-3活性化薬による心臓線維化抑制メカニズムの解明、特に線維化発症の引き金となる、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化および筋線維芽細胞の機能に及ぼすGSK-3活性化薬の効果については、検討すべき課題として残されたままである。

本研究では筋線維芽細胞に主眼をおいて、現在明らかとされていないGSK-3活性化薬(コキシブ系薬物、DIF)による線維化抑制メカニズムの解明を目指す。本研究を基盤研究として、臨床的にはまだ存在しない“線維化抑制薬”を開発し、心筋梗塞に対する新たな治療法の確立を最終目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、心臓由来線維芽細胞(in vitro)とマウス心筋梗塞モデル(in vivo)を用いて、GSK-3活性化薬(コキシブ系薬物およびDIF)の線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化並びに筋線維芽細胞の機能に及ぼす影響を検討する。

(1)マウス心臓線維芽細胞：筋線維芽細胞への分化および機能に対するGSK-3活性化薬の効果検

討

新生児マウスより心臓を摘出し、コラゲナーゼ処理により線維芽細胞を分離・培養する。筋線維芽細胞への分化は TGF- β を処置することで行う。得られた心臓線維芽細胞の、TGF- β 処理に惹起される筋線維芽細胞への分化に対する GSK-3 活性化薬の効果について、 α -smooth muscle actin (SMA: 筋線維芽細胞のマーカー) の発現を指標として検討する。

筋線維芽細胞のマトリックス分泌や増殖に及ぼす影響も併せて検討し、筋線維芽細胞の機能・増殖に対する GSK-3 活性化薬の効果을明らかにする。また、GSK-3 活性化薬の作用機序を解明するために、線維化に関連するシグナルへの GSK-3 活性化薬の効果を検討する。

(2) マウス心筋梗塞モデル: GSK-3 活性化薬の筋線維芽細胞分化抑制効果・心機能改善効果の検討

冠動脈結紮モデルに比較して手技が簡便、かつ均質な心筋梗塞モデルが得られる冷凍焼灼法を用いて、心筋梗塞後の線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に対する GSK-3 活性化薬の効果을 in vivo で検討するとともに、線維化抑制に伴う心機能改善効果について評価する。

心機能評価: マウスの心臓の左心前壁に液体窒素で -196℃ に冷却した直径 3mm のアルミニウムプローブを 10 秒間圧着させることで心筋梗塞を作製する。GSK-3 活性化薬は摂餌投与する。心筋梗塞作製 4 週間後に、超音波検査装置を用いて収縮期左室容積・拡張期左室容積、心室中隔厚および後壁厚、左室駆出率について評価する。

組織学的評価: 心機能評価後のマウスより心臓を摘出し、パラフィン包埋切片を作製する。線維化について、マッソン・トリクローム染色を用い、線維化面積の計測を行う。また、 α -SMA 蛍光染色により線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に対する GSK-3 活性化薬の効果을評価する。

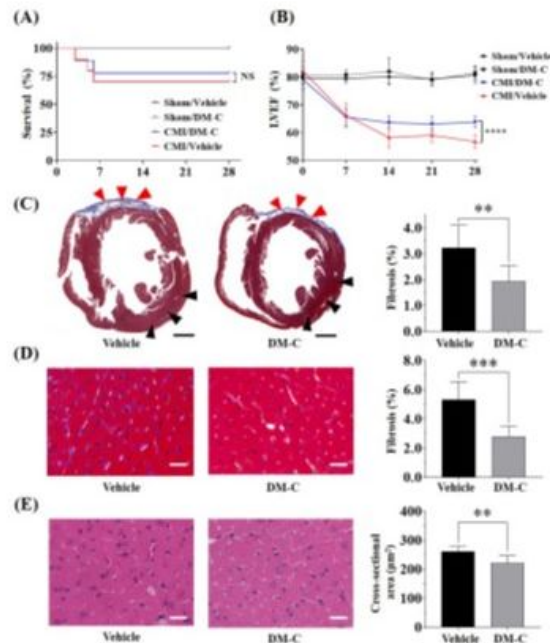
生化学的評価: 摘出した心臓からタンパク質・mRNA を抽出し、生体内における GSK-3 活性化薬の作用機序についての検討を行い、in vitro で解明した GSK-3 活性化薬の作用機序について検証する。

4. 研究成果

(1) ジメチルセラレコキシブ(DM-C)は冷凍焼灼により誘発される心臓リモデリングを減弱させる

まず、DM-C の生存率および心筋梗塞に対する効果을評価した。最大 30% のマウスが冷凍焼灼後 28 日までに死亡したが DM-C の生存率への影響は見られなかった(図 1A)。図 1B は心筋梗塞作成後の左室駆出率の変化を示す。Vehicle 群では左室駆出率が経時的に低下したのに対し、DM-C 投与群では左室駆出率の低下が抑制されていた。心筋梗塞作成 28 日後の心臓線維化をマッソントリクローム染色で評価した。図 1C 左の写真は乳頭筋レベルでの短軸像である。図 1C 右のグラフのように、DM-C 投与群では全体の線維化割合が有意に低値であり、DM-C は心筋梗塞後遠隔期の心臓線維化を抑制していることが示唆された。また全体像だけではなく、心筋梗塞遠隔部位でも DM-C 投与群では線維化割合が有意に低値であった(図 1D)。さらに、DM-C により、心筋梗塞後遠隔期の心筋細胞肥大が抑制されることが示唆された(図 1E)。

図 1



(2) DM-C は筋線維芽細胞の発現を減少させる

図 2A に示すように、冷凍焼灼による心筋の損害範囲には DM-C は影響を及ぼさなかった。しかし、冷凍焼灼 5 日後という早期には、すでに線維化の進行に対して DM-C は抑制作用を示した(図

2B)。また、線維化の進行に深く関与する筋線維芽細胞のマーカーである SMA による抗体を用いて免疫染色を行ったところ、DM-C による明らかな SMA 発現抑制が認められた(図 2C)。図 2D に示すように、冷凍焼灼によるダメージを受けた部分の心臓サンプルを用いたウエスタンブロット解析により、DM-C による SMA 発現抑制が認められ、DM-C が線維芽細胞から筋線維芽細胞への転換 (fibroblast-to-myofibroblast transition) を抑制していることが示唆された。

(3) DM-C は GSK-3 を介して TGF-シグナルを抑制する

TGF-シグナルに対する DM-C の効果を検討するために、ラット心臓より線維芽細胞を採取し、これに TGF- を負荷した。TGF- により、線維芽細胞の SMA 発現が上昇し、筋線維芽細胞への転換が促進されたことが示唆されたが、DM-C はこの効果を抑制した(図 3A)。TGF-シグナルの伝達分子である SMAD2/3 について検討したところ、DM-C により、この両者のリン酸化レベルが減少することが示され、TGF-シグナル抑制はこの作用に基づくことが示唆された(図 3B, C)。また、心臓由来線維芽細胞において、DM-C は GSK-3 を活性化し、これにより、SMAD2/3 のリン酸化レベルを低下させることが示唆された(図 3D-E)。

(4) DM-C は線維化関連遺伝子の発現を抑制する

筋線維芽細胞は α -SMA を発現し、細胞外マトリックスを構成するタンパク質である型コラーゲン、フィブロネクチン、線維化を促進することが報告されている CTGF connective tissue growth factor を産生する。そこで、DM-C の TGF- 刺激に対するこれら線維化関連因子の遺伝子は発現に対する効果を検討した。DM-C は TGF- 刺激で惹起される型コラーゲンの遺伝子発現増加を抑制したが、フィブロネクチンのそれは抑制しなかった。また、DM-C は TGF- 刺激で惹起される CTGF の遺伝子発現増加を抑制した。

以上の結果から、DM-C は心筋梗塞後に進行する心臓リモデリングを、SMAD2/3 のリン酸化抑制および GSK3 の活性化維持といった TGF-シグナルの抑制を介して、線維芽細胞から筋線維芽細胞への転換を抑制すること、またこれにより心筋梗塞後の線維化を抑制し、これが心臓リモデリングの抑制に結び付くことが示唆された。

図 2

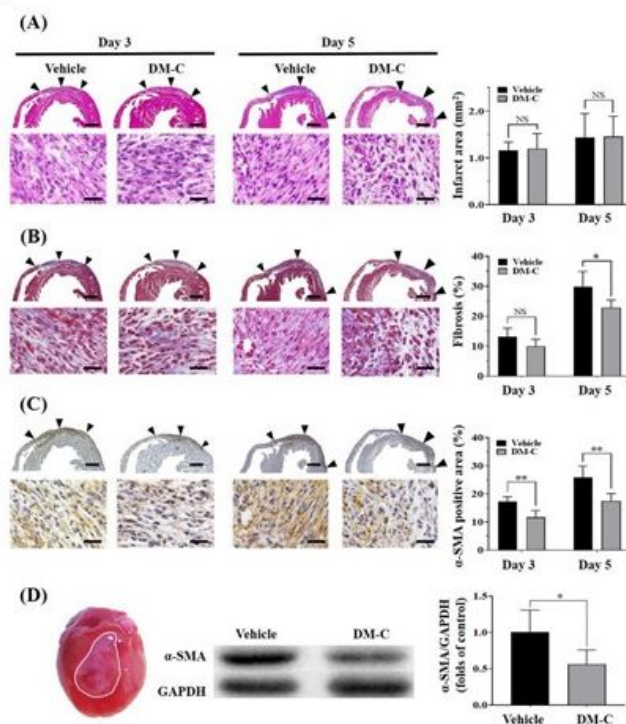


図 3

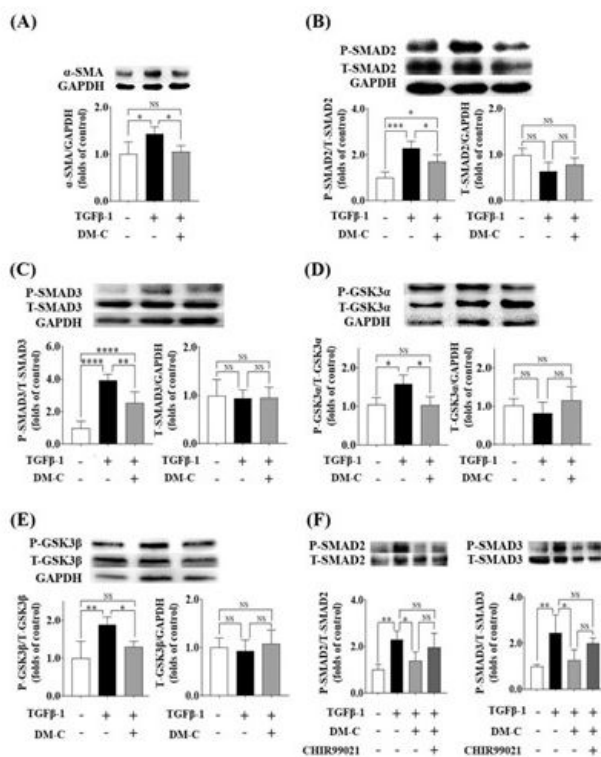
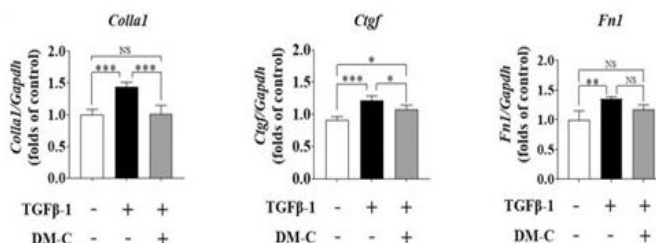


図 4



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 0件）

1. 著者名 Ikushima Eigo, Ishikane Shin, Kishigami Takehiro, Matsunaga Hiroaki, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Nishimura Yosuke, Takahashi-Yanaga Fumi	4. 巻 197
2. 論文標題 2,5-Dimethylcelecoxib attenuates cardiac fibrosis caused by cryoinjury-induced myocardial infarction by suppressing the fibroblast-to-myofibroblast transformation via inhibition of the TGF- signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114950 ~ 114950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.114950	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 Yamamoto Misaki, Takahashi-Yanaga Fumi, Arioka Masaki, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Yamaura Ken, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Cardiac and renal protective effects of 2,5-dimethylcelecoxib in angiotensin II and high-salt-induced hypertension model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 892-903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002728	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 幾島 栄悟、石兼 真、瀧口 知浩、岸上 赳大、松永 洋明、豊平 由美子、西村 陽介、高橋 富美
2. 発表標題 2,5-Dimethylcelecoxib attenuates cardiac fibrosis caused by cryoinjury-induced myocardial infarction by suppressing the fibroblast-to-myofibroblast transformation via inhibition of the TGF- signaling pathway
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 美佐紀、高橋 富美、笹栗 俊之
2. 発表標題 Cardiac and renal protective effects of 2,5-dimethylcelecoxib in angiotensin II-induced hypertension model mice
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 幾島栄悟, 石兼 真, 岸上 赳大, 松永 洋明, 瀧口 知浩, 豊平 由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 2,5-Dimethylcelecoxib attenuates cardiac remodeling after cryoinjury-induced myocardial infarction by suppressing the fibroblast-myofibroblast transformation
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 幾島栄悟, 石兼真, 岸上赳大, 松永洋明, 瀧口知浩, 豊平由美子, 高橋 富美
2. 発表標題 心筋梗塞後心臓リモデリングにおける筋線維芽細胞形質転換に対する ジメチルセレコキシブの作用の検討
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
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	石兼 真 (Ishikane Shin) (40470190)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	
研究 分担者	井川 和宣 (Igawa Kazunobu) (80401529)	九州大学・先導物質化学研究所・助教 (17102)	

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