

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08444

研究課題名(和文)新規線維化抑制因子Semaphorin6Aは心臓リモデリングを抑制できるのか？

研究課題名(英文)The assessment of novel antifibrotic factor Semaphorin6A for cardiac remodeling after myocardial infarction.

研究代表者

大辻 浩(OOTSUJI, Hiroshi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70581651

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)：Semaphorin6A (Sema6A)が抑制するTGF-beta/Smad3経路は、心臓リモデリングを促進させるシグナルでもあり、我々はマウス心筋梗塞モデルを用い、Sema6Aの心筋梗塞後リモデリングへの影響を評価した。マウス心筋梗塞モデルにおいて浸透圧ポンプを用いSema6Aの細胞外ドメインを4週間持続皮下投与(2µg/4週)すると、生食投与群と比較し、生存率の改善を認めた。更に心筋梗塞8週間後の心臓超音波検査にて心拡大抑制、収縮力改善、心重量・肺重量低下、シリウスレッド染色では非梗塞領域の線維化抑制、リアルタイムPCRでは心筋での炎症・線維化・心肥大関連遺伝子発現抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心筋梗塞はかつて極めて致死率の高い疾患であったが、早期再灌流療法が一般的に施行される現在その致死率は激減した。しかし皮肉なことに多くの生存例の心臓はその後、長期的に心筋梗塞後リモデリングをきたし、心不全パンデミックの一因となっている。治療薬として、心臓リモデリングの背景にある炎症からの線維化を直接阻害するというコンセプトは極めて明快であるが、直接線維化抑制をターゲットとした治療薬は現在も存在しない。本研究は心筋線維化を抑制することにより心筋梗塞後リモデリングを抑制するメカニズム解明、更には治療薬開発へつながる基盤研究となるものである。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin6A (Sema6A) suppresses TGF-beta/Smad3 pathway, which exacerbate cardiac remodeling, so we use mouse model of myocardial infarction to assess the effect of Sema6A for cardiac remodeling. We administer Sema6A with osmotic pump (2µg/4 week), which implanted under mouse subcutaneous. Compared to mouse administered saline, Sema6A improved survival rate after myocardial infarction. Also, echocardiography showed that Sema6A suppressed cardiac dilatation, improve cardiac contractility. Plus, Sema6A reduced weight of lungs and heart after myocardial infarction. Silius-red stain showed that Sema6A reduced fibrosis at the area of non-infarction. Real-time PCR showed Sema6A reduce expressions of inflammatory, fibrosis and cardiomegaly-related genes.

研究分野：心筋虚血

キーワード：心筋梗塞 心臓リモデリング 慢性炎症 臓器線維化

1. 研究開始当初の背景

心臓において圧・容量負荷や炎症などの負荷が持続的に加わることによって心臓リモデリングと呼ばれる現象が起き、最終的には過剰な線維化が左室にびまん性に生じ、心肥大・心拡大、収縮不全をきたし心不全が進行する。また、心臓はリンパ管構造が発達した臓器であり、本来、リンパ管は組織における老廃物や蛋白質成分を回収、組織微小環境の恒常性維持において重要な役割を果たすが、その機能が破綻し、特に蛋白質が組織内に蓄積すると組織細胞の変性と線維化が起こる。実際、心筋梗塞では、リンパ管の回収機能が障害されることで心臓リモデリングが引き起こされることが明らかになっている。申請者らはこれまで臓器線維化に注目して研究を行ってきており、線維化抑制作用を示す因子として、肝線維化進行に伴って発現低下する Semaphorin 6A (Sema6A)を同定した。Sema6A は細胞の分化・形態の制御に関与し多くの疾患・病態にかかわる遺伝子ファミリーの一つである。Sema6A は分泌型及び膜型リガンドであり、受容体である PlexinA2 又は A4 に結合しシグナルが活性化される。申請者らは、線維芽細胞株にて Sema6A が臓器線維化の主要伝達経路の一つである TGF- β /Smad3 経路を抑制することを予備実験にて見出した。

また、申請者らは、Sema6A は肝組織において肝類洞内皮細胞での発現が高く、心臓では LYVE-1/Stabilin2 陽性リンパ管内皮細胞に発現することも明らかにしている。遺伝学的細胞系譜追跡からは心内膜を起源とする NFATc1(リンパ管前駆細胞マーカー)陽性細胞は肝類洞内皮細胞に分化することが報告され、同様に LYVE-1/Stabilin2 を発現することから、肝類洞内皮細胞はリンパ管内皮細胞と類似の形質を有していると考えられており、心臓において Sema6A はリンパ管内皮細胞を介して線維化抑制に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、リンパ管新生促進を介した Sema6A の心臓リモデリング抑制効果とその作用機序を明らかにする。具体的には、マウスを用いて Sema6A によるリンパ管新生が心臓リモデリングを抑制するメカニズムを明らかにする、リンパ管内皮細胞株を用いて Sema6A の線維化抑制機序を明らかにする、心臓微小環境における Sema6A の生理作用を一細胞遺伝子発現解析にて明らかにすることである。

本研究において申請者らは独自に明らかにした Sema6A の心臓リモデリング抑制作用に注目し、Sema6A によるリンパ管新生作用が心臓リモデリングを抑制するとの仮説のもと研究を遂行する。Sema6A は申請者らが独自に線維化抑制作用を明らかにした因子であり、精製蛋白は商品化されていないため、これまで十分な研究は行われていない。申請者は独自に Sema6A 蛋白を抽出するスキルを習得し、本研究では心臓リモデリングに対して Sema6A の新規治療薬としての可能性を探求することが可能である。

3. 研究の方法

工呼吸器下に左開胸、冠動脈を結紮し、心筋梗塞モデルマウスを作成、Sema6A の心臓リモデリング抑制作用を明らかにする。浸透圧ポンプによる Sema6A 精製蛋白投与を行う。モデル作成後、1、2、4、8 週後に体重・心重量・肺重量を測定、採血、心臓超音波検査、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析、病理評価を行う。

4. 研究成果

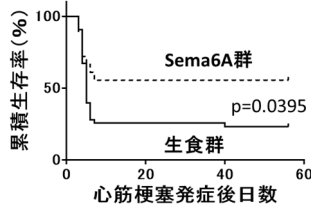


図1. 心筋梗塞後、浸透圧ポンプにて Sema6Aを4週間持続皮下投与 (2 μ g/4週) することにより生食投与群と比較し、生存率の改善を認めた。

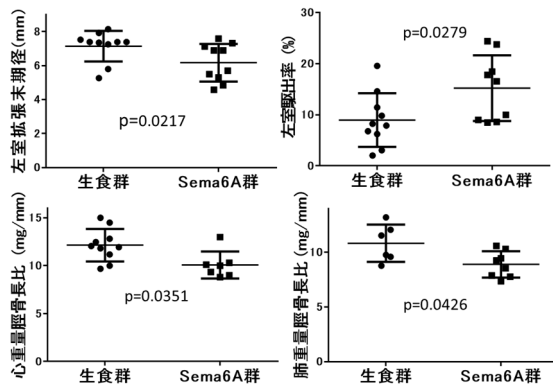


図2. Sema6A投与群では生食投与群と比較し、心筋梗塞8週間後の左室拡張末期径、左室駆出率が改善、Sema6Aが梗塞後リモデリングを抑制した。またSema6A投与により心重量、肺重量が軽減し、心筋梗塞後の心肥大、肺うっ血を抑制した。

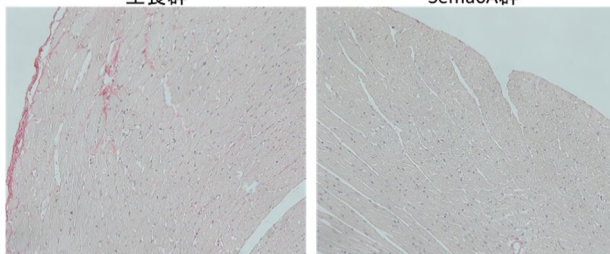


図3. Sema6A投与群では生食投与群と比較し、心筋梗塞8週間後の非虚血領域における線維化(シリウスレッド染色)が抑制されている。

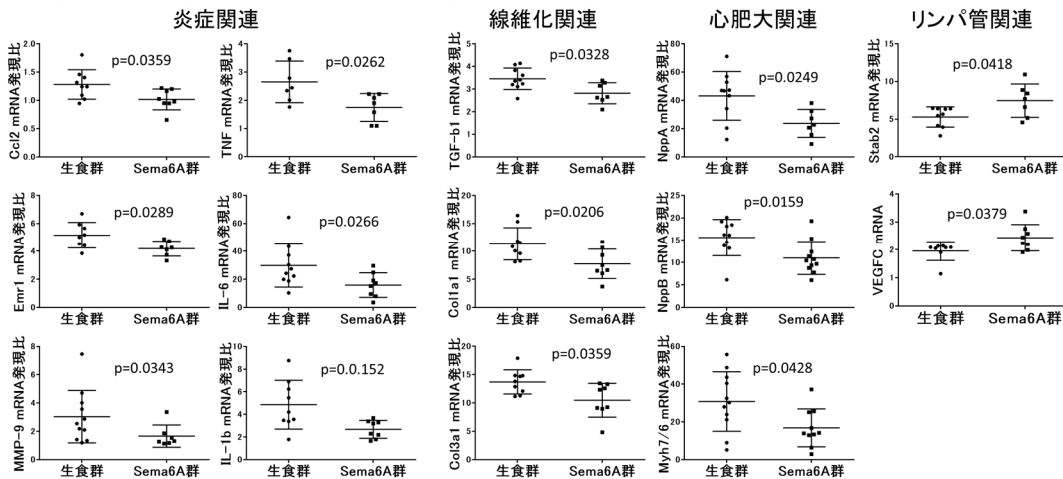


図4. 生食投与群と比較し、Sema6A投与群では心筋梗塞8週間後の心筋mRNAにて、炎症 (Ccl2、Emr1、MMP-9)・線維化 (TGF- β 、Col1a1、Col3a1)・心肥大 (NppA、NppB、Myh7/Myh6) 関連遺伝子の発現減弱、リンパ管 (Stab2、VEGFC) 関連遺伝子の発現亢進を認めた。

更に Sema6A の His-212 を Asn に置き換えた変異体 (H212N) は受容体 PlxnA2 に対するシグナル経路に通常よりも活性を持つことを明らかにしている。同様に浸透圧ポンプにて

マウス心筋梗塞モデルにおいて、浸透圧ポンプにて Sema6A を 4 週間持続皮下投与 (2 μ g/4 週) することにより生食投与群と比較し、生存率の改善を認めることを明らかにしている(図 1)。更に心筋梗塞 8 週間後、Sema6A 投与群では心臓超音波検査にて心拡大の抑制、収縮力の改善(図 2)、シリウスレッド染色では非梗塞領域での線維化の抑制(図 3)、リアルタイム PCR では心筋での炎症・線維化・心肥大関連遺伝子の発現抑制、リンパ管関連遺伝子の発現亢進を認めた(図 4)。これらのことから、Sema6A はリンパ管新生に作用し、心臓リモデリングの抑制に関与している可能性がある。

Sema6A H212N 変異体を心筋梗塞モデルに 4 週間持続皮下投与 (2 μ g/4 週) 生食投与群と比較し、H212N 変異体は心拡大抑制、収縮力改善、心重量・肺重量低下 (図 5) がみられた。以上より、Sema6A は PlxnA2 に作用し、心臓リモデリングの抑制に与している可能性があると考えた。

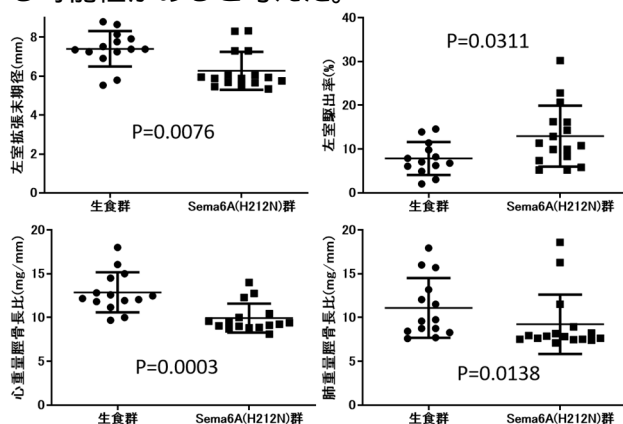


図5. 受容体PlxnA2に対するシグナル経路に通常よりも活性を持つSema6A変異体(H212N)では生食投与群と比較し、心筋梗塞8週間後の梗塞後リモデリング、肺うっ血を抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	岡田 光 (OKADA Hikari) (50788916)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授 (13301)	

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