

学 位 論 文 要 旨

氏 名 北里 梨紗



論 文 題 目

「病的心臓リモデリングの分子学的機序解明」

指 導 教 授 承 認 印

阿古 耀哉

印



病的な心臓リモデリングの分子学的機序解明

北里 梨紗

背景： 近年、心臓カテーテル治療の進歩により、急性心筋梗塞発症早期に再灌流が得られるようになり、急性期の死亡率は低下している。しかしながら、急性期の治療発展に伴い、我が国では慢性期の心不全のリスク増加が問題となっている。心不全増悪には病的な心臓リモデリング (CR) が深く関与する。病的 CR の原因は、様々なサイトカインやその他の因子により引き起こされる心筋細胞肥大、心臓線維芽細胞増殖、心臓細胞外マトリックスの増生などである。新たな治療戦略獲得のためには、これらの機序を直ちに解明する必要がある。筆者は、CR に関わり得る二つの因子に注目し、さらにこれらのシグナル経路に関わる核内転写因子の一つについてさらに詳しく解析するため、フランス政府給費の援助も受け具体的に下記の内容でそれぞれ研究を行った。

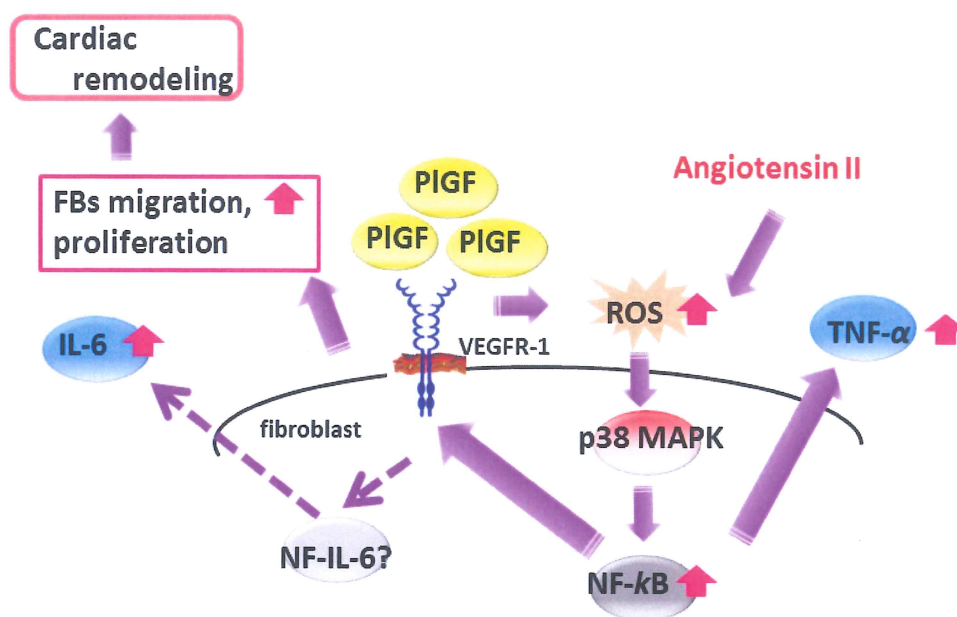
【研究 I】 胎盤増殖因子の病的な心臓リモデリングにおける役割の解明

【背景】 Placental Growth Factor (PlGF) は、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) ファミリーに属するサイトカインであり、VEGF 受容体 1 (VEGFR1) に結合する。PlGF は動脈硬化性病変局所への骨髄由来血管前駆細胞を動員し、粥腫内血管新生に寄与し、また、炎症や活性酸素種 (ROS) 産生を持続亢進させ動脈硬化を促進する。さらに、近年、PlGF は、容量負荷心不全モデルにおいて分子シグナルを制御することが証明されている (Carnevale D, *et al.* Circulation 2011; 124(12):1337-50)。PlGF が CR のシグナル伝達制御に重要な働きをしている可能性が高いが、そのメカニズムについてはほとんど解明されていない。

【目的】 レトロウイルスベクターを用いて PlGF を導入したマウス胎仔線維芽細胞 (C57/PlGF) を使用し、PlGF の CR に対する役割について、その分子メカニズムを解析する。

【方法】 C57/PlGF を心肥大の重要な刺激因子であるアンジオテンシン II (AngII) で刺激し、細胞機能解析を行った。なお、比較対象はレトロウイルスベクターのみを導入した C57/EV とした。AngII 刺激下の細胞遊走は wound scratch assay、細胞増殖は MTT assay, ROS 産生は DCFDA, NF- κ B 活性及び IL-6, TNF- α 産生は ELISA 法を用いて行った。細胞増殖は p38 MAPK 阻害剤である SB205580 存在下においても測定した。

【結果及び考察】 AngII 刺激下において、PlGF は NF- κ B 経路を介し、ROS 産生を促進した。またこれらの VEGFR1 関連シグナルは線維芽細胞 (FBs) の遊走及び増殖を促進し、炎症性サイトカインである TNF- α , IL-6 の産生増加も認められた。また SB205580 存在下において、FBs の増殖は有意に抑制され、これらの経路には p38 MAPK が関与していることが示唆された (図 1)。心臓間質の線維化は CR 増悪の重要な因子である。よって、これらは CR の重要なプロセスとなり得る。



(図 1) CR における PIGF 関連シグナルのモデル図。AngII 刺激下において、PIGF 関連シグナルは ROS 産生、及び CR 増悪に大きく関連する FBs の遊走及び増殖を促進し、TNF- α 、IL-6 産生も伴った。また、これらのシグナルカスケードには p38 MAPK, NF- κ B 経路が関与していた。

【研究Ⅱ】 第 X 因子及びトロンビンが心臓線維化に及ぼす影響

【背景】 心臓線維化は CR の大きな増悪因子の一つである。

血液凝固因子は FBs を刺激することにより創傷治癒を促進し、組織線維化に関わり得るが、詳細な分子学的機序は明らかではない。一方で、近年、トロンビン及び第 X 因子 (FXa) 双方が活性化するプロテアーゼ活性化受容体 1 (PAR1)、及び FXa のみが活性化する PAR2 は、凝固系のみでなく、心臓線維化にも関わることを報告されている (Mercer PF *et al.* Biochim Biophys Acta 2013; 1832:1018-27)。さらに、FX 欠損マウスでは心臓線維化の進展が促進するとの報告もある (Tai SJ *et al.* J Thromb Haemost 2008; 6:339-45)。

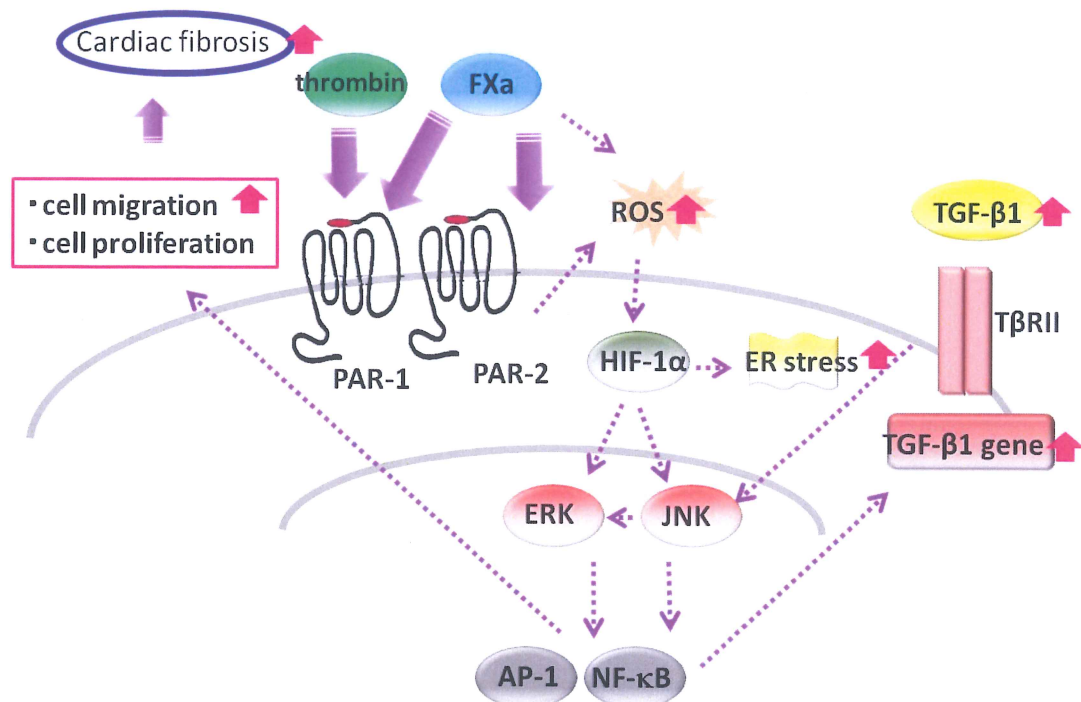
【目的】 FXa 及びトロンビンが心臓線維化に及ぼし得る影響につき、細胞分子シグナル解析を行い、また両者を比較する。

【方法】 マウスの胎仔 FBs (NIH3T3) を、FXa (1U/mL) またはトロンビン (1U/mL) で刺激し、細胞シグナル解析を行った。なお、比較対象は FXa 及びトロンビン刺激をしていない細胞とした (control)。細胞遊走は wound scratch assay、細胞増殖は MTT assay、ROS 産生は DCFDA、TGF- β 1 産生は ELISA 法を用いて行った。また、転写因子活性の測定に関してはシグナルレポーターアッセイを用いた。

【結果及び考察】 FXa 刺激 FBs、及びトロンビン刺激 FBs 双方において細胞増殖、細胞遊走は control に比し増加していた。ROS 産生に関しては、FXa 刺激 FBs がトロンビン刺激 FBs に比し優位に亢進し、TGF- β 1 の蛋白産生についても、FXa 刺激 18 時間後にトロンビン刺激 FBs, control よりも優位に増加していた。また、FXa 刺激 FBs において、AP-1, NF- κ B, Elk-1 SRF, HIF-1 α , CBF/NF-Y/YYY1 活性の亢進が認められ、HIF-1 α , JNK, ERK, NF- κ B, AP-1 経路の関与が示唆された

(図 2)。

FXa 及びトロンビンが心臓線維化において重要な役割を担っている可能性が極めて高いことが考えられ、さらにこの内一部のシグナルカスケードについてはトロンビン刺激と比し、FXa 刺激において、より亢進していることが証明された。(Kitasato L *et al.* Int Heart J.2014; 55(4):357-61)



(図 2) 心臓線維化における FXa 関連シグナルのモデル図。FXa 関連シグナルは ROS 産生、及び FBs の遊走及び増殖を促進し、臓器線維化大きく関係する TGF-β1 産生も伴った。また、これらのシグナルカスケードには HIF-1α, JNK, ERK, NF-κB, AP-1 経路の関与が示唆された。

以上の実験を通し、CR に関する細胞シグナルに、NF-κB 経路の関与が明らかになった。NF-κB は急性期の低酸素や再灌流障害に対しては心臓保護的に働くが、それを過ぎると、心不全を増悪させることがわかっている。しかし、NF-κB の活性機序等には未だ不明な部分が多い。よって、この経路に関する詳しい分子シグナル解析法を習得することは、心不全増悪の機序解明の糸口になるのではと考え、フランス政府給費を獲得し、World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (IARC), Infections and cancer biology group (Lyon, France)に留学し、以下の研究を行った。

【研究Ⅲ】HPV16 E7 における NF- κ B 活性

【背景】感染が原因となり得るヒトの癌において Human papillomaviruses (HPVs)は その 20%までに関与しているとされる。HPV16 oncoproteins E6 及び E7 は HPV が関与する発癌過程において NF- κ B 等様々な細胞シグナル経路を介し重要な働きをする (Hussain I *et al.* J. of Virol.2011; 85(17): 9013-22) が、NF- κ B 経路を介する分子学的機序は未だ明らかになっていない。

【目的】HPV16 oncoproteins E6 または E7 どちらが NF- κ B 経路活性に大きく寄与し得るかを検証し、またその機序を明らかにする。

【方法】NIH3T3 またはマウス表皮角化細胞系 (HFK293)に HPV16E6 または HPV16E7 をトランスフェクションさせ NF- κ B reporter luciferase assay を測定した。

【結果及び考察】NIH3T3 に関して、HPV16E7 (DNA 1 μ g)において E6 非存在下で NF- κ B reporter activity は優位に増加していた。次いで、これらの働きを担う部位を特定するため、NIH3T3 を用いた HPV16 E7 mutants の NF- κ B 活性につき検討したが、抑制はいずれも認められなかった。よって、細胞を HFK293 に変更し解析を行ったが、HPV16 E6E7 は 表皮角化細胞である HFK293 において、NF- κ B 経路の活性は認められず、恐らく HPV に対する親和性のためだと考えられた。今後は Near Diploid Immortalized Keratinocytes (NIKS)等での再検討が望ましいと考える。

今後の展望:

PIGF 及び FXa 関連シグナルが心臓線維化促進など病的 CR 制御において重要な役割を果たしていることが予想された。これらは、CR の分子学的機序解明の大きな一歩となり、新たな治療戦略の標的となり得る。FXa 阻害薬は、トロンビン阻害薬と並び、慢性心房細動患者に対する脳梗塞予防の為の新規抗凝固薬としてその使用頻度が増えている。これが心不全の治療にも関与することが証明されれば、患者にとってのメリットとなり、大きなインパクトとなる為、現在、当研究室で研究を続けている (Hasikata T *et al.* submitted)。

我々のデータを心臓特異的な細胞である心筋細胞や心臓線維芽細胞において追加検討することは、より心臓における働きを明らかにすることを可能にする。このため、筆者は、パスツール研究所 (Paris, France)の Department of Developmental Stem Cell Biology group と、PIGF 関連シグナルに関して、今後の研究計画を立案し、大学院卒業後に同研究所において研究継続を予定している。同研究室では、初代マウス心筋細胞及び心筋線維芽細胞の培養系は確立しており、これを用いた PIGF と心臓リモデリングの関係についての細胞シグナル解析を行う予定である。

以上の研究成果及び、今後の研究計画の遂行は、病的 CR 制御のメカニズム、これに続く心不全発症・進展の新たな分子機序解明は新たな治療戦略の発見に繋がり得るため、今後の慢性心不全患者の予後改善、治療成績改善への多大なる貢献となり得る。