

論文の内容の要旨

論文題目 心不全における CXCR7 の役割の解明

氏名 石塚 理人

(序文)

本邦では、心不全入院患者数が急激に増加しており、「心不全パンデミック」と呼ばれている。現在、心不全入院を減らすための新規治療薬の開発は、喫緊の課題である。これまで β 遮断薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) が、心不全患者の生存率を改善することが証明されてきたが、これらは G タンパク質共役受容体 (GPCR) に作用する薬剤であり、今後も GPCR が心不全治療の新たな創薬の標的になりうる。GPCR の下流シグナルは G タンパクによる伝達が主経路であり、その後 β -arrestin と共役することで不活化するというのが、古典的なモデルであった。しかし近年、 β -arrestin が GPCR の不活化だけでなく、多種のメディエーターにシグナルを伝えることが判明した。GPCR が刺激されると、通常は G タンパク経路と β -arrestin 経路が共に活性化されるが、一方が偏向性に活性化される場合を”biased agonism”と呼び、そのうち receptor による場合を”biased receptor”と呼ぶ。 β -arrestin 優位の biased agonism が心臓に保護的に働くことが多く報告されている。

ケモカイン受容体は GPCR のカテゴリーの 1 つで、近年心血管疾患におけるケモカイン受容体の重要性が指摘されているが、多くは血球系細胞や血管内皮細胞に発現するケモカイン受容体の機能であり、心筋細胞に発現するケモカイン受容体については今まであまり知られていない。ヒトやマウス心臓に発現する GPCR の内、CXC ケモカイン受容体 7 (CXCR7) の遺伝子発現が多いことが報告されている。CXCR7 は、 β -arrestin とのみ共役する biased receptor であると考えられ、下流シグナルとして細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) をリン酸化することが報告された。

CXC ケモカインリガンド 12 (CXCL12) は、CXCR4、CXCR7 の 2 つの受容体に共通のリガンドである。幹細胞の遊走を期待して CXCL12 プラスミドを虚血性心筋症患者の心筋内に注射した STOP-HF 試験は、プライマリーエンドポイントを満たさず、CXCL12 による心筋梗塞の治療法開発は現在暗礁に乗り上げている。その理由として、受容体である CXCR4 の心筋梗塞後の炎症増悪と血管新生の二面性が挙げられる。もう一方の受容体である CXCR7 の β -arrestin シグナルを解明することが、CXCL12 の臨床応用の課題を解決する。

(方法)

新生仔ラット心筋細胞の CXCR7 遺伝子発現量を定量 PCR で検討し、新生仔ラット心筋細胞を CXCR7 アゴニスト: TC14012 で薬剤刺激した。心臓内の CXCR7 発現細胞の同定のために、マウス心臓の心筋細胞もしくは非心筋細胞の一細胞解析と、一分子蛍光 *in situ*

hybridization を行った。また、心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞それぞれの CXCR7 の役割を検討するために、 α MHC-Cre マウス, VEcad-CreERT2 マウス, Col1a2-CreERT2 マウスと、CXCR7^{flox/flox} マウスをそれぞれかけあわせ、心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウスを作成した。マウス心不全モデルとして、胸部横行大動脈縮窄術による圧負荷心不全モデルと、左冠動脈前下行枝結紮術による心筋梗塞モデルの2つを作成した。術後、4 週もしくは 8 週観察し、生存率や心重量、また心臓超音波検査や組織学的検査により、心機能と組織変化を評価した。心臓より蛋白を抽出し、リン酸化 ERK を immunoblotting で評価した。炎症細胞浸潤は CD45、Ly6G、F4/80 に対する免疫染色で評価した。

(結果)

新生仔ラット心筋細胞の CXCR7 遺伝子発現が、新生仔ラット線維芽細胞と比較し多く、CXCR7 アゴニスト: TC14012 で新生仔ラット心筋細胞を刺激することで ERK リン酸化が上昇した。マウス心臓の一細胞解析により、心筋細胞に遺伝子発現するケモカイン受容体のほとんどが CXCR7 であり、また血管内皮細胞や線維芽細胞にも発現していた。マウス心臓切片を用いた一分子蛍光 *in situ* hybridization で心筋細胞と非心筋細胞での CXCR7 の遺伝子発現を確認できた。圧負荷心不全モデルで心筋細胞における CXCR7 の遺伝子発現が横行大動脈縮窄術 4 週後に増加した。心筋梗塞モデルにおいて、遠隔領域より周辺領域、梗塞領域で CXCR7 の遺伝子発現が多いことを示した。

心筋細胞特異的に CXCR7 をノックアウトすると、定量 PCR の結果、心臓全体の CXCR7 遺伝子発現量は大幅に減少した (0.22 ± 0.21 倍)。圧負荷心不全モデルを適用すると、コントロールに比べ生存率や左室内径短縮率は低下傾向であったが有意では無く、心重量は明らかな差を認めなかった。血管内皮細胞、線維芽細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウスでは、圧負荷心不全への影響は明らかでなかった。

圧負荷心不全モデルで心不全傾向を呈した心筋細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウス (cKO) に対して、心筋梗塞モデルを作成した。コントロール (Ctl) と比較し、心筋梗塞により有意な心重量の増加 (Ctl: 190.7 ± 18.4 , cKO: 220.3 ± 26.4 mg)、拡張期左室内腔面積の増加 (Ctl: 29.6 ± 5.0 , cKO: 36.0 ± 5.4 mm²)、左室内腔面積変化率の低下 (Ctl: $20.6 \pm 4.9\%$, cKO: $13.9 \pm 5.4\%$) を認めた。心筋細胞での CXCR7 欠損は、心筋梗塞において心拡大と収縮能低下をきたした。心筋梗塞 1 日後に、CXCR7 の主な下流とされるリン酸化 ERK を immunoblotting で評価したところ、Ctl では周辺領域でリン酸化 ERK/全 ERK 比 (pERK/tERK) が有意に増加していたが、cKO は Ctl に比べ周辺領域で pERK/tERK が有意に減少していた (Ctl 1.0 ± 0.3 , cKO 0.5 ± 0.2)。心筋梗塞 1 日後での、心臓内の CD45 陽性の炎症細胞浸潤は、cKO で有意に減少していた (面積比 Ctl: $43.8 \pm 18.6\%$, cKO: $14.3 \pm 7.1\%$)。

(考察)

本研究は、まず新生仔ラット心筋細胞を用いて、心筋細胞で線維芽細胞より CXCR7 が遺伝子発現しており、CXCR7 を刺激することで ERK リン酸化の下流シグナルがあることを示した。マウス心臓では、心筋細胞に発現するケモカイン受容体のほとんどが CXCR7 であり、血管内皮細胞や線維芽細胞にも発現していることを示した。圧負荷心不全モデルで心筋細胞における CXCR7 の遺伝子発現が増加すること、また、心筋梗塞モデルにおいて遠隔領域より周辺領域、梗塞領域で CXCR7 の発現が多く、心不全病態において CXCR7 が作用している可能性が示唆された。次に、心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞の各々に特異的に CXCR7 を欠損させたマウスに、圧負荷心不全モデルを作成した。心筋細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウスにおいて心不全増悪傾向を認めたものの、有意差は認めなかった。血管内皮細胞特異的、あるいは線維芽細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウスでは増悪傾向も認めなかった。心筋細胞特異的 CXCR7 ノックアウト心臓ではコントロール群と比較して約 80% の CXCR7 遺伝子発現の低下が認められることから、心筋細胞における CXCR7 発現が心不全の病態形成により重要な働きをしていることが示唆された。このため、心筋細胞特異的 CXCR7 ノックアウトマウスに、心筋梗塞モデルを作成した。結果、コントロール群と比較し有意な心拡大や収縮能低下をきたした。心筋梗塞において、心筋細胞に発現する CXCR7 は保護的に働いていると考えられた。機序として、心筋梗塞の周辺領域で本来増加する ERK リン酸化が、ノックアウトマウスで減少していることや、炎症細胞浸潤が低下していることとの関連が示唆された。

圧負荷心不全モデルより心筋梗塞モデルで、心筋細胞 CXCR7 ノックアウトの影響が大きかった原因の一つとして、本研究の定量 PCR では示せなかったが、心筋梗塞では虚血によりリガンドである CXCL12 の遺伝子発現や濃度が増えることが関係していると考えられる。他に、心筋梗塞ではアポトーシスや炎症の影響がより大きく、それらに CXCR7 が関与している可能性がある。心筋梗塞 1 日後、遠隔領域に比べて、周辺領域で ERK リン酸化が増加していた。ERK には、B-cell lymphoma 2 を介した抗アポトーシス作用が報告されている。周辺領域では、抗アポトーシス作用のある ERK リン酸化のシグナルが亢進し、心筋梗塞後の細胞生存に働いている可能性がある。周辺領域と梗塞領域では心筋梗塞 6 時間後に CXCR7 の遺伝子発現が増加しており、心筋梗塞 1 日後の周辺領域での ERK リン酸化増加の一部を CXCR7 が担っていることも考えられる。更に心筋細胞 CXCR7 欠損により、遠隔領域と周辺領域の両方で ERK リン酸化が減少していた。梗塞領域では、心筋細胞は死滅しており、心筋細胞が残る遠隔領域と周辺領域で CXCR7 下流の ERK リン酸化が減少したと考えられる。以上より仮説として、心筋梗塞後に増加する周辺領域の ERK リン酸化が、心筋細胞 CXCR7 欠損により減少し、アポトーシス増加をきたし、4 週後の心拡大や収縮能低下につながったと考えた。

また、心筋梗塞 1 日後の免疫染色の結果は、心筋細胞で CXCR7 が欠損したマウスで、CD45 陽性の炎症細胞浸潤が低下していた。このことは、今回の心拡大、収縮能低下が、炎症細胞浸潤の低下と関連している可能性がある。梗塞巣への炎症細胞浸潤には、壊死細

胞の除去や、線維化による修復など、正の側面もある。そうした炎症の過程が阻害されることで、心筋梗塞後の心拡大、収縮能低下を来した可能性がある。今後、蛍光活性化セルソーティングを用いて炎症細胞の種類や割合を詳細にみていきたい。

本研究の **limitation** として、**CXCR7** の遺伝子発現は示しているが、蛋白としての発現を示せてない点がある。また、**CXCR7** を刺激し下流シグナルとして **ERK** リン酸化を見ているが、**ERK** リン酸化が **CXCR7** と共役する β -arrestin の直接的なシグナル伝達であるかは示せていない点がある。今回の研究は、心筋細胞で **CXCR7** を欠損したマウスの解析に過ぎない。実際に **CXCR7** が保護的に働くのであれば、アデノ随伴ウイルスを用いた心筋細胞への **CXCR7** の導入等により、心筋梗塞の改善を確認する必要がある。

(結論)

本研究では、マウスの心筋細胞で最も発現しているケモカイン受容体が **CXCR7** であることを示した。心筋細胞での **CXCR7** 欠損は、心筋梗塞後の心拡大や収縮能低下をきたした。その機序として、心筋細胞に発現する **CXCR7** が、**ERK** リン酸化や、適切な炎症を促すことで、心保護的に働いていると考えられた。今後その機序の解明が **CXCR7** を標的とした新規心不全治療の開発に繋がる可能性がある。