

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号： 11501
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011 ～ 2012
 課題番号： 23790830
 研究課題名（和文） 臓器組織間の相互作用とエピジェニック制御による早期心不全の治療戦略の開発
 研究課題名（英文） Investigation of the treatment of silent heart failure by controlling of multi-organ network and epigenic modulation
 研究代表者
 宍戸 哲郎（SHISHIDO TETSURO）
 山形大学・医学部・助教
 研究者番号： 60400545

研究成果の概要（和文）：

Midkine (MDK) は、細胞増殖、生存、炎症細胞浸潤などさまざまな作用を持つ成長因子であり、心不全患者の血中濃度が亢進していることが知られている。しかしながら、心臓そのものに与える MDK の効果は明らかでなかった。そこで、心臓特異的 MDK 過剰発現 (TG) マウスを作成し、大動脈縮窄術 (TAC) による心肥大へ与える効果を検討した。TAC 後、MDK 発現が亢進し、TG マウスでは、野生型マウスに比較して TAC 後の ERK1/2, AKT, 胎児型遺伝子発現が亢進していた。また、心重量の増加、左室拡張末期径増加、左室短縮率の低下が野生型マウスに比較して優位に悪化しており、心不全が増悪していることが、明らかとなった。また、TAC 後の生存率も優位に低値であった。これらの知見から、MDK は心肥大に悪影響を及ぼす重要な増悪因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Midkine is a heparin-binding growth factor having various functions such as cell growth, cell survival, and migration of inflammatory cells. We have previously reported that serum midkine levels are independently associated with adverse cardiac events in patients with heart failure. The aim of this study was to examine the role of midkine on the pathogenesis of the heart failure.

Midkine expression levels were mainly increased after transverse aortic constriction (TAC) surgery. We generated transgenic mice with cardiac specific overexpression of midkine (MK-Tg) using α -myosin heavy chain promoter. After TAC operation, phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and AKT, and the expression levels of fetal gene in the heart were significantly increased in MK-Tg mice than in WT mice. The ratio of left ventricular weight to body weight and left ventricular end-diastolic dimension were significantly increased, and fractional shortening and maximum and minimum of left ventricular developed pressure were significantly decreased in MK-Tg mice than in WT mice after TAC operation. The degree of interstitial fibrosis and profibrotic gene expressions were significantly higher in MK-Tg mice than in WT mice. Consistent with these results, Kaplan-Meier analysis revealed that the survival rate in MK-Tg mice was significantly lower compared with WT mice. We concluded that cardiac overexpression of MK plays a critical role in pressure overload induced cardiac hypertrophy and remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：慢性心不全、慢性腎臓病、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

日本での心血管病による死亡はその 30.8% を占め、心不全で死亡する症例数が増加している。加齢、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病、慢性呼吸不全は、自覚症状がない早期の心不全、いわゆる隠れ心不全の危険因子と考えられている。近年、高齢化、生活習慣の欧米化が進んでいること、心不全が顕在化すると治療が困難なため、自覚症状のない早期心不全の発症機序の解明が急務である。

Midkine (MDK) は胎生期に肺、心臓、腎臓、脳で強く発現し、神経細胞の分化、平滑筋細胞の遊走と増殖、心筋細胞分化に関与する細胞外分泌タンパクである (Cancer Lett. 2004)。成人期には、慢性腎臓病、低酸素状態によって、腎臓、肺、心臓で発現が亢進し、肺循環障害や臓器障害を引き起こすことから、循環血液中の MDK は腎肺連関に関与することが示唆されている (J Clin Invest. 2009)。腫瘍細胞では MDK が膜貫通チロシンホスファターゼ (PTP) や LDL 受容体様タンパク (LRP) に結合後、MAPK, p90RSK 活性が亢進することで、抗 apoptosis 作用や細胞増殖作用を示す (Neurosci Res. 2003)。

我々は、糖尿病では、早期に心機能障害が出現していることを報告した。加齢、糖尿病心で MAPK, p90RSK 活性が亢進し、RAS の亢進や心機能障害のメカニズムを報告した。また、心臓特異的 p90RSK 過剰発現マウスでは、加齢による心機能障害が早期に生じ、早期心不全の進行に p90RSK が関与することを確認した。これまでの報告と我々の研究により MAPK, p90RSK は、□ Serum response factor(SRF)活性亢進、レニンアンジオテンシン系 (RAS)亢進を促すほか、□ GSK3β活性を

抑制しβ-catenin /TCF, NFAT, GATA4 の転写活性の亢進を促す重要な役割を担い機序として、ヒストン H3S10 のリン酸化と引き続く H3K9 の脱メチル化により、クロマチンリモデリングに関与していることが示唆されている (Mol Cell. 2006;24.)。

我々は、心不全の進展における MDK の臨床的意義を検討し、血中濃度 MDK 濃度は心不全増悪の独立した危険因子であることを見出した。これまでの知見を踏まえ、MDK による臓器間ネットワークが、エピジェネティック制御により早期心不全の形成と重症化に関与すると想定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(シリーズ I) 心筋培養細胞を用いて、MDK による MAPK, p90RSK 活性亢進の分子機構と心血管病の進展に与えるエピジェネティック制御を解明する (シリーズ II) 疾患モデル動物を用いて、加齢、高血圧、糖尿病、慢性腎臓病、慢性呼吸不全によって亢進する MDK を介した心-腎-肺の臓器間の相互作用を明らかにすることである。

(シリーズ I)

培養心筋細胞や平滑筋での、MDK による MAPK, p90RSK 活性上昇機構を明らかにし、引き続いて起こる胎児型遺伝子の転写活性の亢進や MDK-MAPK- p90RSK シグナル抑制による、心筋細胞や肺動脈平滑筋細胞障害の抑制効果を検討する。

(シリーズ II)

心臓特異的 MDK 過剰発現(MDK-TG) マウスを作成する。MDK-TG マウスを用いて、糖尿病モデルや血行動態負荷、5/6 腎臓摘出術を行い、心臓、腎臓、肺での MDK の発現と

p90RSK の活性が心機能に与える影響を評価し、MDK を介した臓器間の相互作用を明らかにしていく。

ミッドカインシグナル抑制を治療目標として、早期心不全の発症と進行の予防効果を生体で検討する。ヒトにおいては、弁や不全心筋サンプルを用い、臨床像と対比させ MDK とその受容体の発現や活性の変化を検討する。

3. 研究の方法

α -MHC プロモーターを用いて、 α -MHC-MDK プラスミドを作成し、さらに心臓特異的 MDK 過剰発現マウスを作成する。MDK-TG マウス、と野生型マウスに横行大動脈縮窄術 (TAC) を行い、細胞内シグナルの変化、胎児型遺伝子発現、病理組織、心臓カテーテルや心エコー検査による心機能等の検討を行う。

4. 研究成果

野生型マウスの検討において、Sham 群に比較して大動脈縮窄術 (TAC) を行ったマウス心臓での MDK 発現が RNA レベルで亢進していた。さらに、肺、腎臓における MDK の発現を検討したところ、Sham 群に比較して TAC 手術群では、蛋白レベルで辞官依存性に MDK の発現が亢進していた。これまで、心不全患者で血中 MDK 発現が亢進していることを明らかにしているが、これらの知見を合わせると、心不全の出現により、腎臓や肺で MDK 発現が亢進し、その結果循環 MDK が亢進していることを意味している。循環している MDK による心臓への効果を明らかにするために、心臓特異的 MDK 過剰発現 (MDK-TG) マウスを作製した。野生型マウスに比べて、MDK-TG マウスでは、TAC 後の ERK1/2 活性が亢進しており、同様に、胎児型遺伝子発現の亢進と心臓肥大が亢進して

いた。このことは、ヒストン H3S10 のリン酸化と引き続く H3K9 の脱メチル化が生じており、クロマチンリモデリングが進行していることが示唆された。野生型マウスに比べて、MDK-TG マウスでは、TAC 後の左室拡張末期系、左室収縮末期径の優位な上昇を認め、さらに、左室短縮率が低下していた。心重量/体重比も同様に、MDK-TG マウスで増加していた。これらの知見から、循環 MDK が心不全によって亢進し、心臓に作用することで心不全がさらに増悪している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Ishino M, Kitahara T, Sasaki T, Katoh S, Otaki Y, Watanabe T, Shibata Y, Mantovani A, Takeishi Y, Kubota I. Long Pentraxin PTX3 Exacerbates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Dysfunction. PLoS One. 2013;8:e53133. 査読有
2. Funayama A, Shishido T, Miyashita T, Netsu S, Otaki Y, Arimoto T, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Konta T, Kubota I. Renal tubulointerstitial damage is associated with short-term cardiovascular events in patients with myocardial infarction. Circ J. 2013 Jan 25;77:484-9. 査読有
3. Narumi T, Shishido T, Kiribayashi N, Kadowaki S, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Shibata Y, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. Impact of insulin resistance on silent and ongoing myocardial damage in normal subjects: the

- Takahata study. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:815098. 査読有
4. Le NT, Takei Y, Shishido T*, Woo CH, Chang E, Heo KS, Lee H, Lu Y, Morrell C, Oikawa M, McClain C, Wang X, Tournier C, Molina CA, Taunton J, Yan C, Fujiwara K, Patterson C, Yang J, Abe J. p90RSK targets the ERK5-CHIP ubiquitin E3 ligase activity in diabetic hearts and promotes cardiac apoptosis and dysfunction. *Circ Res.* 2012;110:536-50. (*equally contributed author) 査読有
 5. Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Sasaki T, Katoh S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I. Serum pregnancy-associated plasma protein a in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2011;17:819-26. 査読有
 6. Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:759-66. 査読有

[学会発表] (計 87 件)

1. Suzuki S, Shishido T, Sasaki T, Ishino M, Kubota I, Mantovani A, Takeishi Y: The long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. European Society of Cardiology 2012 World Congress, Munich; August 25, 2012, Munich Messe, Germany
2. Narumi T, Shishido T, Kadowaki S, Funayama A, Otaki Y, Honda Y, Sasaki S, Hasegawa H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Cardiac-specific

- overexpression of high-mobility group box 1 protects cardiomyocyte from apoptosis during the pathogenesis of doxorubicin cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2012, Los Angeles, America; November 3, 2012, Los Angeles Convention Center
3. Netsu S, Shishido T, Ishino M, Funayama A, Kadowaki S, Narumi T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Overexpression of midkine aggravates cardiac dysfunction and adverse myocardial remodeling induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka; March 16, 2012, Fukuoka Convention Center
 4. Funayama A, Shishido T, Ishino M, Ohtaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) prevents cardiac dysfunction induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka; March 16, 2012, Fukuoka Convention Center
 5. Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Otaki Y, Honda S, Hasegawa H, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box

1 (HMGB1) attenuates cardiac dysfunction induced by pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 14, 2011, Orange County Convention Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宍戸 哲郎 (SHISHIDO TETSURO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60400545