

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591113

研究課題名(和文) 心臓線維化における、内皮間葉移行現象の分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation to clarify the role of endothelial mesenchymal transition in cardiac fibrosis

研究代表者

岡本 隆二 (Okamoto, Ryuji)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60378346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：pTie2-Creおよびlox-tdTomatoダブルTgマウスを用い、内皮細胞由来の細胞をマーキングした。さらにpFSP1-EGFPマウスと交配させ、心筋梗塞モデルを作成し、tdTomatoおよびEGFPのシグナルが重なる部位を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。心筋梗塞の周囲に一致して、tdTomatoとFSP1の一致する細胞は認められるも、線維芽細胞特異度の高い、periostinと一致する細胞は認めず、全て血球細胞と考えられた。このため、心筋梗塞の線維化部位では内皮間葉移行現象は生じておらず、線維芽細胞は、元々心臓に存在した線維芽細胞が増殖することによると結論した。

研究成果の概要(英文)：We assessed the hypothesis that endothelial mesenchymal transition played an important role in cardiac fibrosis. We generated pTie2-Cre and lox-tdTomato double transgenic mouse with a marker for endothelial cell-derived cells and performed the ligation of left coronary artery. Additionally we crossed those mice with pFSP1-EGFP mice. tdTomato expression was recognized specifically in endothelial cells. In cardiac fibrosis some cells expressed both the tdTomato and EGFP. However we could not observe the cells expressing tdTomato and periostin, a fibroblast-specific marker, simultaneously. Therefore we concluded endothelial mesenchymal transition did not play an important role in cardiac fibrosis.

研究分野：心肥大、高血圧症

キーワード：心臓線維化 心肥大 心筋梗塞 内皮間葉以降 レポーターマウス

1. 研究開始当初の背景

臓器の線維化において、上皮間葉移行(EMT)が重要であると考えられていた。心臓には上皮は存在しないが、内皮細胞が線維芽細胞に移行する、内皮間葉移行(EndoMT)という概念が、EMTの一形態として、当時提唱されていた。また線維芽細胞特異的のタンパク質1(FSP1)が線維芽細胞のレポータータンパク質として認知されていた。

2. 研究の目的

心筋梗塞などの心臓の線維化に EndoMT がどれほど、関与しているか、また Rho キナーゼシグナルと関係しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

線維芽細胞(FSP1)、内皮細胞(Tie2-Cre および lox-tdTomato)のそれぞれのレポーターマウスを交配し、心筋梗塞モデルを作成し、FSP1 および tdTomato を共に発現する細胞の有無を検討した。共に発現している細胞は内皮細胞由来の線維芽細胞と考えられ、EndoMT と判断した。また EndoMT を認めた場合、Rho キナーゼ1ノックアウト(KO)マウスおよび Rho キナーゼ2KO マウスと交配し、その違いを検討する予定であった。

4. 研究成果

(1)心筋梗塞の部位に FSP1 を発現する細胞は多数認められた。しかし、この細胞は Periostin という最近 FSP1 にとってかわった線維芽細胞特異的のマーカーを全く発現しておらず、血球細胞と結論した。Periostin と tdTomato を共発現する細胞は全く認めず、心臓の線維化において EndoMT は認められなかった。実際、他国の複数のグループから、FSP1 が線維芽細胞特異的ではないとする報告が相次ぎ、これまで FSP1 レポーターマウスを用いて報告されてきた、EMT および EndoMT 現象が否定され、現在では、EndoMT のみならず、EMT 自体が懐疑的と考えられるようになっていく。

(2) 内皮細胞 (Tie2-Cre および lox-tdTomato)レポーターマウスを用いて、大動脈結紮モデルを作成し、tdTomato と Periostin を共に発現する細胞を検討したが、認めなかった。このため、大動脈結紮モデルにおいても EndoMT 現象は否定的と結論した。

(3) 内皮細胞 (Tie2-Cre および lox-tdTomato)レポーターマウスを用いて、尿管結紮による、腎臓線維化モデルを作成し、tdTomato と Periostin を共に発現する細胞を検討したが、認めなかった。このため腎臓の線維化においても EndoMT 現象は否定的と結論した。一方で、Rho キナーゼ1KO マウス、Rho キナーゼ2KO マウスおよびファスジル投与群で腎臓の線維化レベルを検討したとこ

ろ、ファスジル投与>Rho キナーゼ2 KO マウス>Rho キナーゼ1 KO マウスの順に線維化が抑制されることを発見した。

(4) 内皮細胞 (Tie2-Cre および lox-tdTomato)を用いて、VEGF 受容体阻害薬 SU5416 および低酸素による肺高血圧症モデルを、レポーターマウスを用いて、作成した。tdTomato と Periostin を共に発現する細胞を検討したが、認めなかった。このため、肺高血圧症においても、EndoMT 現象は否定的と結論した。

以上より、複数の臓器線維化モデルにおいて、EndoMT 現象は確認できなかったため、Rho キナーゼ1&2 ノックアウトマウスと、レポーターマウスを交配する研究は断念した。

(5) 肥大型心筋症患者および拡張型心筋症患者の心筋生検および病理標本において、aSMA、FSP1、periostin、Tie2 の免疫染色を行いそれらが一致する部位があるかどうか検討を行った。FSP1 と Tie2 が一致する部位は散見されたが、periostin と Tie2 が一致する部位は認めなかった。

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 9 件)

Takeuchi T, Dohi K, Kumagai N, Nakamori S, Fujimoto N, Okamoto R, Fujii E, Kitamura T, Yamada N, Nakamura M, Hamada M, Ito M. Effects of cardiac resynchronization therapy on left ventricular mechanical dyssynchrony induced by right ventricular pacing in a patient with heart failure and preserved ejection fraction. *Int J Cardiol*. 査読有、177 巻、2014、1069-1072
DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.10.083.

Yamanaka K, Nakanishi T, Saito H, Maruyama J, Isoda K, Yokochi A, Imanaka-Yoshida K, Tsuda K, Kakeda M, Okamoto R, Fujita S, Iwakura Y, Suzuki N, Ito M, Maruyama K, Gabazza EC, Yoshida T, Shimaoka M, Mizutani H. Persistent release of IL-1s from skin is associated with systemic cardio-vascular diseases. *PLoS One*. 査読有、9 巻、2014、e104479
DOI: 10.1371/journal.pone.0104479.

Fulminant myocarditis in a patient with severe coronary artery disease. Fujita S, Okamoto R, Takamura T, Nakajima H, Tanabe M, Nakamori S, Dohi K, Tanigawa T, Nakamura M, Ito M. *J Cardiology Cases*. 査読有、9 巻、2014、15-17
DOI: 10.1016/j.jccase.2013.08.010

Collagen triple helix repeat containing 1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation and motility, Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Yamamoto N, Okamoto R, Usui M, Ito M, Takei Y, Nobori T, Kojima T, Suzuki H, Uchida M, Uchida K., Int J Oncol. 査読有、45 巻、2014、541-548
DOI: 10.3892/ijo.2014.2445

Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis, Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Yoneda M, Okamoto R, Yamamoto N, Takei Y, Ito M, Nobori T., Anticancer Drugs. 査読有、25 巻、2014、1028-1034
DOI: 10.1097/CAD.000000000000128.

Okamoto R, Li Y, Noma K, Hiroi Y, Liu PY, Taniguchi M, Ito M, Liao JK, FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2, FASEB J, 査読有、27 巻、2013、1439-1449
DOI: 10.1096/fj.12-217018.

Fujita S, Okamoto R, Taniguchi M, Ban-Tokuda T, Konishi K, Goto I, Yamamoto Y, Sugimoto K, Takamatsu N, Nakamura M, Shiraki K, Buechler C, Ito M, Identification of bovine hibernation-specific protein complex and evidence of its regulation in fasting and aging, J Biochem, 査読有、153 巻、2013、453-461
DOI: 10.1093/jb/mvt008.

A case of aortic thrombosis and embolism preceding the progression of early esophageal cancer, Goto I, Okamoto R, Sawai T, Takasaki A, Takeuchi T, Matsuo H, Miyahara M, Nakamura M, Ito M, J Cardiology Cases, 査読有、7 巻、2013、e123-e125
DOI: 10.1016/j.jccase.2012.12.008

Marked improvement of renal failure and severe hypertension after renal artery stenting in the solitary functioning kidney, Sawai T, Miyahara M, Okamoto R, Dohi K, Yamada N, Nakamura M, Ito M, J Cardiology Cases, 査読有、7 巻、2013、e82-e85
DOI: 10.1016/j.jccase.2012.12.001

〔学会発表〕(計 5 件)

岡本隆二, Endothelial mesenchymal transitions do not contribute to the development of pulmonary arterial hypertension caused by a VEGF receptor inhibitor in mice, 2015 年欧州心臓病学会 (ESC)、8 月 30 日、ロンドン市(英国)、エクスセル展覧会センター、moderated ポスター発

表

岡本隆二, A familial hypertrophic cardiomyopathy is caused by a mutation in ELP2, encoding one of subunits of elongator acetyltransferase complex, 2014 年度米国心臓学会(AHA)、11 月 17 日、シカゴ市(米国)、マコ - ミックプレイス、ポスター発表

岡本隆二, A mutation in Elongator Protein 2 can cause a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy, 2014 年度欧州心臓病学会(ESC)、8 月 31 日、バルセロナ市(スペイン)、フィラ・グランヴィア、招請講演

岡本隆二, Identification of Bovine Hibernation-Specific Protein Complex and Evidence of its Regulation in Fasting and Aging, 2012 年度米国糖尿病学会 (ADA)、6 月 11 日、米国フィラデルフィア市、ペンシルベニア会議場、ポスター発表

岡本隆二, 肺高血圧症および心筋症患者における、iPS 細胞を介した標的細胞の発現遺伝子変異の同定と安全性の検討, 2012 年度日本心臓病学会学術集会、9 月 16 日、金沢市、石川音楽堂、パネルディスカッション

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
岡本 隆二 (OKAMOTO, Ryuji)

三重大学・医学部附属病院・循環器内科・
講師
研究者番号：60378346

(2)研究分担者

伊藤 正明 (ITO, Masaaki)
三重大学・大学院医学研究科・循環器内科
学・教授
研究者番号：00223181

(3)連携研究者

()

研究者番号：