

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293190

研究課題名(和文) 心臓リモデリングとその変容による心不全発症・進展の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying heart failure development and progression caused by alteration of cardiac remodeling

研究代表者

尾池 雄一(Oike, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：90312321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：心不全は健康長寿社会実現の大きな障害要因であり、高齢社会の到来に伴いその患者数も増加していることから、効果的な新規治療戦略の開発が望まれている。我々は、加齢や高血圧などの圧負荷によるストレスによって心筋細胞におけるANGPTL2の発現が増加し、心筋細胞におけるカルシウム濃度調節機能と心筋エネルギー代謝機能の低下を引き起こすことで心不全の発症・進展を促進することを明らかにした。さらに、心筋に対する感染指向性を持つアデノ随伴ウイルスを用い、shRNAにより心筋細胞におけるANGPTL2の発現誘導を抑制する遺伝子治療が、心不全病態に対する新規治療法となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Heart failure prohibits living people from living a healthy life. The number of patients with heart failure is increasing globally as we become an aging society. Thus, clarification of the mechanisms underlying heart failure development and progression is crucial to develop a useful strategy for treatment. In this study, we showed that angiotensin-like protein 2 (ANGPTL2) expression is increased in pathologically stressed heart and that elevated cardiac ANGPTL2 impairs Ca<sup>2+</sup> handling and energy metabolism in cardiomyocytes, thereby accelerating cardiac dysfunction. Moreover, we demonstrated that suppression of ANGPTL2 induction in cardiomyocytes using adeno-associated virus vector harboring Angptl2 shRNA could be a novel therapeutic strategy against cardiac dysfunction.

研究分野：循環器病態学 / 分子遺伝学

キーワード：心不全 ANGPTL2 心エネルギー代謝

### 1. 研究開始当初の背景

高血圧症や動脈硬化症などの心臓への圧負荷は心筋へのストレスとなり、これに対する生体の応答として生じる心肥大は生理的に重要な代償機構である。しかし、当該代償機構の変容・破綻により心機能が低下し心不全発症に繋がる。医学・医療技術の目覚ましい進捗にも関わらず、心不全の5年生存率は約50~60%と依然として非常に予後不良の疾患である。心不全の病態形成には、心筋細胞の肥大、アポトーシス、心筋組織の線維化に加えて、心筋細胞と線維芽細胞や心筋組織内に浸潤した免疫細胞などの間質細胞との相互作用による非感染性の持続的な炎症とこれに伴う心筋組織のリモデリングが重要であるが、その分子機構は十分に解明されていない。

我々は、これまでに Angiopoietin-like protein (ANGPTL) ファミリー分子の1つである ANGPTL2 が、種々のストレスに対して発現・分泌が増加し、血管新生や可逆的な組織リモデリングを誘導し、組織恒常性を維持するために重要な役割を果たしていること、ストレスが慢性的に過度になると、過剰応答し責任病変の組織において慢性炎症と不可逆的な組織リモデリングを介して、様々な疾患の発症・増悪に寄与していることを明らかにした。例えば、脂肪組織に発現する ANGPTL2 は、体重増加に伴いその発現・分泌が増加し血管新生や可逆的な脂肪組織リモデリングを誘導し、脂質を脂肪細胞に蓄えるための生理的応答に寄与する。しかし、肥満が過度になると脂肪組織における ANGPTL2 発現が過剰になり、病的血管新生やマクロファージの浸潤を促進し、脂肪組織における慢性炎症および不可逆的な組織リモデリングをもたらすなど応答破綻を引き起こし、全身のインスリン抵抗性など代謝異常症発症に繋がることを明らかにした。また、肥満や喫煙などで血管内皮細胞における ANGPTL2 発現が上昇し、血管組織の炎症が惹起され、血管内皮機能障害や動脈硬化性プラーク形成を促進することを明らかにした。さらに、血管周囲脂肪組織由来 ANGPTL2 と血管損傷後の血管リモデリングである血管内中膜肥厚や冠動脈硬化との関連より、血管/心臓周囲脂肪組織由来 ANGPTL2 が動脈硬化形成において重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、腹部大動脈瘤病変部位に集積するマクロファージ由来 ANGPTL2 が持続的な炎症に加え、マトリックスメタロプロテアーゼの活性化を誘導し、血管壁における不可逆的な組織リモデリングを促進することで、腹部大動脈瘤形成に関与していることも見出した。以上より、実質細胞や間質細胞に由来する過剰な ANGPTL2 分泌により持続的な炎症と不可逆的な組織リモデリングが生じ、肥満に随伴する代謝異常症や動脈硬化症等の様々な疾患の発症・増悪が生じていることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

近年、我々は、心筋にも ANGPTL2 が豊富に発現することを見出した。そこで、本研究の準備研究として、心筋における ANGPTL2 の病態生理的意義を解明するため、野生型マウスを用いて横行大動脈の banding による圧負荷心肥大・心不全マウスモデルを作製した。圧負荷後の心肥大・心不全により、心臓における *Angptl2* 発現が有意に上昇することを見出した。また、*Angptl2* ノックアウト (KO) マウスを用いたモデルでは、野生型に比べて心機能低下が抑制され、心不全病態の増悪が軽減されることを見出した。圧負荷に起因する心肥大・心不全の発症・進展に、心臓由来 ANGPTL2 の発現・分泌増加および過剰な ANGPTL2 シグナルによる不可逆的な心臓リモデリングの重要性が示唆された。そこで本研究では、圧負荷生理的応答としての心肥大と応答破綻としての心不全の発症・進展における ANGPTL2 の役割解明、心肥大・心不全の発症プロセスにおいて ANGPTL2 を発現する責任細胞同定と ANGPTL2 発現誘導機構の解明、ANGPTL2 シグナルを介した細胞間相互作用の観点から心肥大・心臓リモデリングの分子機構解明を行い、心不全に対する新規予防・治療法開発に向けた独創性の高い基盤研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

野生型マウスおよび各種 *Angptl2* 遺伝子改変マウスを圧負荷心不全マウスモデルは、transverse aortic constriction (TAC; 大動脈縮窄) を実施することで作製した。また、高血圧マウスモデルは浸透圧ポンプを用いたアンジオテンシン (Ang) 持続投与により作製した。作製した上記モデルマウスは経時的に心エコーおよび組織学的解析、遺伝子発現解析、ウエスタンブロットング解析を行い、その心機能を評価した。

microRNA による ANGPTL2 の発現制御機構については、マウス *Angptl2* の 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) をホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 側に結合したレポータープラスミドを作製し、*in silico* 解析により同 3' UTR に結合することが予想された microRNA の発現プラスミドと共にラット胎児初代心筋細胞に導入することで、そのルシフェラーゼ活性を指標に ANGPTL2 を標的とする microRNA の同定および発現に対する効果を検討した。

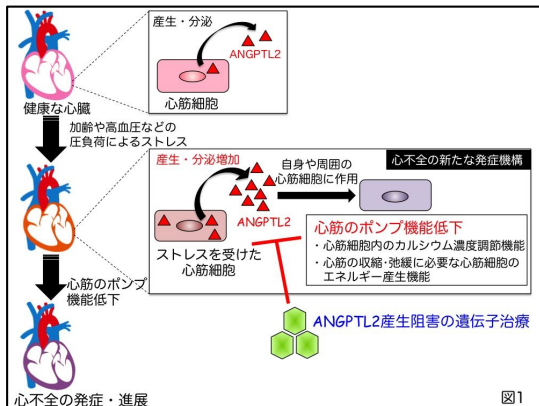
心筋細胞における ANGPTL2 の発現誘導を抑制する目的で、ANGPTL2 に対する shRNA (short hairpin RNA) を発現する免疫反応を起こしにくく心筋への感染指向性を持つ組換えアデノ随伴ウイルス (AAV6) を作製した。作製した組換え AAV6 を圧負荷による心不全発症誘導後 2 週間目に尾静脈より投与し、その後 7 週目まで経時的に心エコー解析を行いその心機能を評価した。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞に

ヒト ANGPTL2 に対する siRNA (small interfering RNA) を導入し、ミトコンドリアエネルギー代謝関連遺伝子や AKT-SARCA2A 経路についてリアルタイム PCR やウエスタンブロッティングによる解析を行い、ANGPTL2 ノックダウンによる効果を検討した。

#### 4. 研究成果

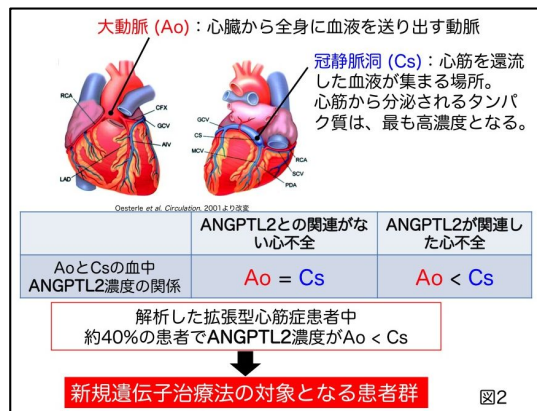
ヒト心筋組織を用いた免疫染色から、ANGPTL2 が主に心筋細胞で豊富に発現することを見出した。さらに、野生型マウスを用いた圧負荷心不全モデルマウスや高血圧モデルマウス、高齢マウスの心筋組織では、ANGPTL2 の発現が有意に上昇することが明らかとなった。心筋組織における ANGPTL2 発現誘導機構を検討したところ、加齢や高血圧などの圧負荷によるストレスにより calcineurin-NFAT 経路を介して心筋細胞における ANGPTL2 発現が誘導されることが明らかとなった。さらに、心筋細胞特異的に *Angpt12* を持続的に高発現するトランスジェニックマウスを用いた圧負荷心不全モデルおよび ANGPTL2 を高発現したラット胎児心筋初代培養細胞を用いた解析から、心筋細胞における ANGPTL2 発現増加により、心筋細胞における Akt-SERCA2a 経路を介した細胞内カルシウム濃度調節機能および心筋エネルギー代謝の減弱による心収縮力低下が引き起こされ、心不全病態の進展につながることを明らかにした(図1)。逆に、生理的心肥大を誘導する適度な運動負荷により ANGPTL2 を標的とする miR-221 や miR-222 などの microRNA 発現が誘導され、心筋細胞における ANGPTL2 発現が減少すること、その結果、Akt-SERCA2a 経路と心筋エネルギー代謝が活性化し、生理的心筋リモデリングによる心保護効果をもたらすことが明らかとなった。さらに、*Angpt12*KO マウスの心臓では、生理的心筋リモデリングを生じ、圧負荷による心不全病態の発症に対して抵抗性を示すことから、心筋細胞における ANGPTL2 発現誘導の抑制が心不全病態に対する新規治療法になると考えられた。



*Angpt12*KO マウスが圧負荷による心不全病態発症に対して抵抗性を示したことから、免疫反応を起こしにくく心筋への感染指向性

を持つアデノ随伴ウイルス (AAV6) を用い、心筋特異的に ANGPTL2 に対する shRNA を発現させ、ANGPTL2 発現を抑制する遺伝子治療法を開発した。圧負荷による心不全モデルマウスに経静脈的に組換え AAV6 ベクターを投与したところ、対照群に比べ心筋組織における ANGPTL2 発現減少、Akt-SERCA2a 経路およびエネルギー代謝経路の活性化を認め、有意に心機能低下を抑制することに成功した(図1)。また、ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞においても、ANGPTL2 ノックダウンによって Akt-SERCA2a 経路やエネルギー代謝経路が活性化することを見出した。以上より、心筋組織における ANGPTL2 発現抑制は、心不全病態の発症・進展に対する新規治療法として有用であると考えられた。

我々は、心筋細胞からの ANGPTL2 産生増大の有無が、冠静脈血(Cs)-大動脈血(Ao)における ANGPTL2 濃度ジャンプアップによりスクリーニング可能であることを明らかにしている(図2)。非家族性拡張型心筋症患者 53 例のうち 23 例(約 40%)で心臓からの産生・分泌増大が認められた。



#### 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 11 件)

Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K & Oike Y. ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. EMBO J 36: 409-424, 2017 査読有 DOI: 10.15252/embj.201695690  
Tian Z, Miyata K, Kadomatsu T, Horiguchi H, Fukushima H, Tohyama S, Ujihara Y, Okumura T, Yamaguchi S, Zhao J, Endo M, Morinaga J, Sato M, Sugizaki T, Zhu S, Terada K, Sakaguchi H, Komohara Y, Takeya M, Takeda N, Araki K, Manabe I, Fukuda K, Otsu K, Wada J, Murohara T, Mohri S, Yamashita JK, Sano M & Oike Y. ANGPTL2 activity in cardiac

pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. Nat Commun 7: 13016, 2016 査読有 DOI: 10.1038/ncomms13016

Motokawa I, Endo M, Terada K, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Morinaga J, Sugizaki T, Ito T, Araki K, Morioka MS, Manabe I, Samukawa T, Watanabe M, Inoue H & Oike Y. Interstitial pneumonia induced by bleomycin treatment is exacerbated in Angptl2-deficient mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 311: L704-L713, 2016 査読有 DOI: 10.1152/ajplung.00005.2016

Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H & Oike Y. Mice deficient in angiotensin-like protein 2 (Angptl2) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. J Biol Chem 291: 18843-18852, 2016 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M116.720870

Amadatsu T, Morinaga J, Kawano T, Terada K, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Kasano D, Kuratsu JI & Oike Y. Macrophage-derived angiotensin-like protein 2 exacerbates brain damage by accelerating acute inflammation after ischemia-reperfusion. PLoS One 11: e0166285, 2016 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0166285

Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, Shibata M, Hirakawa Y, Endo M, Ago T, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y & Ninomiya T. Serum angiotensin-like protein 2 is a novel risk factor for cardiovascular disease in the community: the Hisayama study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 36: 1686-1691, 2016 査読有 DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307291

Hirasawa M, Takubo K, Osada H, Miyake S, Toda E, Endo M, Umezawa K, Tsubota K, Oike Y & Ozawa Y. Angiotensin-like protein 2 is a multistep regulator of inflammatory neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. J Biol Chem 291: 7373-7385, 2016 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M115.710186

Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, Odagiri

H, Kadomatsu T, Nakamura T, Tanoue H, Ito H, Yugami M, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Iwase H, Mizuta H & Oike Y. ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. Sci Rep 5: 9170, 2015 査読有 DOI:10.1038/srep09170

Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H & Oike Y. Angiotensin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. Cancer Sci 105: 1550-1559, 2014 査読有 DOI: 10.1111/cas.12554

Kadomatsu T, Endo M, Miyata K & Oike Y. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. Trends Endocrinol Metab 25: 245-254, 2014 査読有 DOI: 10.1016/j.tem.2014

Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H & Oike Y. Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. Int J Biol Markers 29: e239-245, 2014 査読有 DOI: 10.5301/ijbm.5000080

〔学会発表〕(計 11件)

尾池雄一、アンジオポエチン様因子2と心血管疾患、脳心血管抗加齢研究会2016、2016年12月18日、秋葉原UDX(東京都)  
Yuichi Oike, Roles of Angiotensin-like protein 2 (ANGPTL2) in cardiovascular disease、第24回日本血管生物医学学会学術集会、2016年12月9日、長崎ブリックホール(長崎市)

尾池雄一、慢性炎症と臓器線維化におけるアンジオポエチン様因子2の役割、CVMW2016 心血管代謝週間、2016年12月16日、東京コンベンションホール(東京都)  
Yuichi Oike, Introduction for Cutting Edge in Advanced Genomic Medicine to Elucidate the Molecular Basis of the Cardiovascular System: From Development to Disease、第80回日本循環器学会学術集会、2016年3月20日 仙台国際センター(仙台市)

尾池雄一、がんと心血管疾患の共通分子基盤解明、脳心血管抗加齢研究会2015、2015年11月29日、梅田スカイビル（大阪市）

尾池雄一、アンジオポエチン様因子と生活習慣関連疾患、第35回日本肥満学会、2014年10月25日、シーガイアコンベンションセンター（宮崎市）

Yuichi Oike、Role of ANGPTL2 in obesity and insulin resistance、2014 International Conference on Diabetes and Metabolism (ICDM)、2014年10月17日、京畿道（韓国）

Yuichi Oike、Diverse roles of ANGPTL2 signaling in physiology and patho-physiology、Taishan Academic Forum on Cancer & Immune Signaling Pathways And First Session Stem Cell Immunology Qilu International Forum、2014年8月10日、烟台市（中国）

尾池雄一、アンジオポエチン様因子2による生体の恒常性維持と疾患、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月4日、万国津梁館（名護市）

尾池雄一、生体恒常性維持機構とアンチエイジング、第14回日本抗加齢医学会総会、2014年6月7日、大阪国際会議場（大阪市）

尾池雄一、アンジオポエチン様因子の観点からインスリン抵抗性の分子基盤を考える、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月23日、大阪国際会議場（大阪市）

〔図書〕（計 4 件）

尾池雄一、佐々木雄彦、村上 誠、矢作直也、株式会社エル・アイ・シー、発行にあたって series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患 上巻、2015、3-4

尾池雄一、株式会社エル・アイ・シー、序（第4章 慢性炎症関連因子）series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患 下巻、2015、25-26

宮田敬士、尾池雄一、株式会社エル・アイ・シー、Angptl2（第11節）第4章 慢性炎症関連因子 series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患 下巻、2015、118-125

門松 毅、尾池雄一、羊土社、ANGPTL（その他の増殖因子と受容体）第6章 細胞増殖因子 膨大なデータを徹底整理する サイトカイン・増殖因子キーワード事典、2015、287-289

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：心不全の予防又は治療のための医薬組成物

発明者：尾池雄一、田哲、門松毅、宮田敬士、堀口晴紀

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許

番号：特願 2016-123615

出願年月日：2016 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

名称：心不全の予防又は治療のための医薬組成物

発明者：尾池雄一、田哲、門松毅、宮田敬士、堀口晴紀

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/082673

出願年月日：2016 年 11 月 2 日

国内外の別：外国

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://molegene.kumamoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90312321

(2) 連携研究者

南野 徹 (MINAMINO, Tohru)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90328063