

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460480

研究課題名(和文) 心筋リモデリング(組織再構築)を抑制する非翻訳RNAの探索と機能制御

研究課題名(英文) Regulatory role of bFGF and microRNA for cardiac remodeling

研究代表者

赤坂 喜清 (AKASAKA, Yoshikiyo)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：60202511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋リモデリングによる慢性心不全の病態解明のため、bFGFによる間質線維化抑制による心筋リモデリング抑制効果を検討した。bFGF投与による高血圧性Dahlラット心では間質線維化と心肥大を抑制し、同処理の培養心筋間質線維芽細胞ではCollagen type $\alpha 1(I)$ とMMP-2,9の発現抑制、TIMP-1の発現増加やMMP-9の活性抑制を見出した。同処理培養心筋間質線維芽細胞を網羅的に解析し、bFGFで有意に増加し心筋間質に特異性の高いmiR-29c-3pを選定した。アンチセンス核酸分子の遺伝子導入実験により、mi29c-3pの標的分子の同定に努めている。

研究成果の概要(英文)：This study shows antifibrotic effects of bFGF injection in hypertensive DS rat hearts carried out using cardiac fibroblast lines harvested from the heart during the LV dilation phase. Specifically, we demonstrated that (1) bFGF inhibited interstitial fibrosis in hypertensive rat heart in vivo; (2) bFGF up-regulated TIMP-1 and down-regulated MMP-9 expression in cardiac fibroblasts (CFs) from hypertensive rat hearts; (3) bFGF also inhibited the expression of collagen I and III in the CFs; (4) real-time PCR array microRNA assays in bFGF treated CFs identified several microRNAs that were up-regulated in the CFs and specifically expressed in interstitial fibrosis of hypertensive DS rat hearts.

研究分野：創傷治癒学、組織工学

キーワード：miRNA bFGF 心筋間質 線維芽細胞 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

- (1) 慢性心不全で特異的に血中増加する非翻訳 RNA microRNA(miRNA)が注目されてきた。miRNA は標的 mRNA に結合して強力な蛋白発現を抑制する病態制御に極めて重要な内在性分子である。しかし慢性心不全の進行に重要な心筋リモデリングを直接制御する miRNA は解明されていない。特に心筋リモデリングの基本病態である間質線維化を強力に抑制する miRNA は不明であり、その同定は心筋リモデリングの進行抑制による新規の治療法開発に重要である。
- (2) 我々は Basic fibroblast growth factor (bFGF) が強力に線維化抑制を推進することを実証してきた。心臓では bFGF 投与が間質線維化を抑制し心筋リモデリングの抑制から慢性心不全予防や治療法開発に寄与する重要なサイトカインと推定している。しかし bFGF の間質線維化の抑制過程で誘導され標的分子の発現抑制から心筋リモデリングを抑制する慢性心不全予防に効果的な miRNA は同定されていない。
- (3) 我々のオリジナルの実験系である bFGF 誘導性間質線維化抑制系を網羅的解析し、線維化抑制を強力に推進する miRNA を探索する。この miRNA アンチセンス遺伝子導入実験から標的分子を同定し心筋間質線維化を強力に抑制することで、miRNA の内在性分子による新規性に富んだ慢性心不全治療法開発が期待できるユニークな研究課題である。

2. 研究の目的

- (1) bFGF による心筋間質線維化抑制能と microRNA 探索
《bFGF による心筋間質線維化抑制とリモデリング抑制を実証する》
高血圧性 Dahl rat 心に bFGF を投与し血管周囲と心筋細胞間の間質線維化を定量し bFGF 投与による間質線維化抑制能を実証する。
心肥大抑制効果を検証し、bFGF 投与高血圧性心筋リモデリング抑制能を実証する。
培養心筋線維芽細胞に bFGF を投与し組織修復蛋白の発現性を検討し bFGF による線維化抑制能を証明する。
《心筋間質線維化抑制性 miRNA を網羅的に探索する》
bFGF 投与した培養心筋間質線維芽細胞 miRNA を網羅的に解析する。

bFGF 投与で有意に発現上昇する miRNA を選定する。

この miRNA の発現性から心筋間質線維芽細胞の線維化抑制性 miRNA を選定する。

- (2) 選定 microRNA の標的遺伝子の同定
《標的遺伝子を探索する》
miRNA 標的遺伝子をコンピューター解析から推定する。
コンピューター解析による標的遺伝子の局在を検討し、心筋組織における miRNA と標的遺伝子の相互関係を検討する。
《アンチセンス遺伝子導入による標的遺伝子を確定する》
アンチセンス遺伝子を培養心筋間質線維芽細胞に導入し、線維化関連蛋白の発現性を指標にして間質線維化抑制に特異的な標的遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

- (1) bFGF による心筋間質線維化抑制と心筋リモデリング抑制効果 <In vivo>
 - 心肥大計測：高血圧性 Dahl rat 心不全発症前(15週)に bFGF (100 µg) を 1 回心筋内に注射する経時的 CT 検査による拡張性肥大心室の内腔径を定量した。
 - 間質線維化定量：血管周囲と心筋間質の線維化面積をデジタル画像解析で定量した。
- (2) bFGF による心筋間質線維芽細胞の線維化蛋白の発現抑制 <in vitro>
線維化蛋白発現抑制：心筋培養間質線維芽細胞に bFGF を投与し MMP-2, -3, -9, の発現性をウエスタン法で、MMP-2, -9 の活性化は Zymography で検定した。
- (3) bFGF 投与心筋間質線維芽細胞における miRNA の網羅的解析
bFGF 投与 48 時間目の培養心筋間質線維芽細胞において Microarray 法を用いて網羅的解析を実行した。bFGF 投与培養心筋間質線維芽細胞において bFGF 非投与培養心筋間質線維芽細胞と比較検討 Normalized Raw が 1.5 倍以上増加する miRNA を選定した。
- (4) 選定 miRNA の発現量解析
網羅的解析による miRNA の発現量を定量した。bFGF 投与 48 時間目の培養心筋間質線維芽細胞における選定 miRNA の発現量を Real-time PCR 法や Northern 法で定量した。これを網羅的解析結果と比較し、同じ発現挙動を示す miRNA を間質線維化抑制関連 miRNA として選別した。
- (5) 選定 miRNA の局在観察

In situ hybridization 法で心不全発症前後(15 と 18 週)の高血圧性心筋組織で選定 miRNA の局在性を観察した。心筋間質に特異的発現を示す miRNA を選別した。また心不全発症前後における発現細胞の局在変化や頻度を比較検討し、心不全発症前後で有意な発現変化を示す miRNA を選別した。

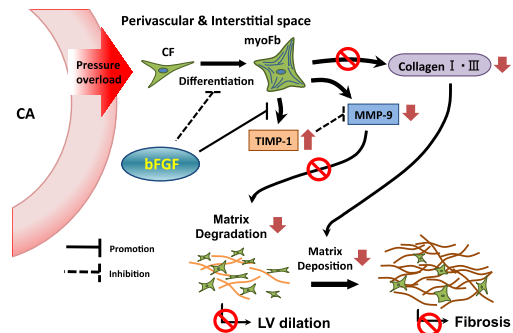
- (6) 標的遺伝子の探索
選定 miRNA の標的遺伝子を TargetScan 解析により選定した。
- (7) アンチセンス遺伝子導入実験による標的遺伝子の決定
高血圧性心筋間質線維芽細胞に miRNA の Mimic と Inhibitor を遺伝子導入し bFGF 投与 48 時間目の標的蛋白の発現性を検討した。ウエスタン法で標的蛋白の発現抑制効果と発現促進効果を確認して標的遺伝子を決定した。
- (8) 選定 miRNA の局在観察
miRNA の心筋組織における局在性を in situ hybridization 法で観察し、miRNA との相互関係を組織で検証し、標的遺伝子の機能から選定 miRNA の役割を考察した。

4. 研究成果

- (1) bFGF による心筋間質線維化抑制と心筋リモデリング抑制効果の判明 <In vivo>
 - bFGF 投与の高血圧性心不全心では左心室壁厚の減少、左心内腔径の増加と心拍出量減少が確認された。よって bFGF による拡張性心不全の抑制が臓器レベルで確認された。
 - 血管周囲線維化が bFGF 投与群で有意に減少していた。筋線維芽細胞は投与群で明らかに減少していた。
 - ウエスタン法では -SMA 発現が投与群で明らかに減少していた。MMP-9 活性化は bFGF 投与群で増加していた。したがって bFGF により MMP-9 が活性化し細胞外基質の沈着が抑制されていることが示唆された。
- (2) bFGF による心筋間質線維芽細胞の組織修復蛋白の発現特異性 <In vivo>
 - 高血圧性心不全心では心筋間質線維化が 15 週以降に急激に進行するのを認めた。
 - 高血圧心由来の間質線維芽細胞では 16 週目のもので MMP-9 の高度な発現増加を認めた。
 - 16 週目の高血圧心由来の間質線維芽細胞で TIMP-1, Collagen type I と III の高度発現増加を認めた。よって高血圧性心筋リモデリング期に相当する 16 週

目では細胞外基質の産生と溶解が亢進し、心筋組織の再構築が亢進していることが判明した。

- (3) bFGF による心筋間質線維芽細胞の組織修復蛋白の発現特異性 <In vitro>
 - bFGF 投与高血圧心由来心筋間質線維芽細胞では -SMA, MMP-2, -9 と Collagen type I と III の mRNA 発現が有意に減少していた。
 - TIMP-2 の mRNA 発現性に有意な変化はなかったが、TIMP-1 mRNA 発現は増加しているのが判明した。
 - FGFR1 siRNA のノックダウン実験では Control では MMP-2, -9, TIMP-2 と Collagen type I と III の発現減少と TIMP-1 の発現増加を認めたが、FGFR1 siRNA ではこれら反対の発現変化が認められなかった。よって bFGF の高血圧心由来の培養心筋間質線維芽細胞における -SMA, MMP-2, -9, TIMP-2 と Collagen I, III の発現性は FGFR1 を介していると考えられた。



- (4) 心筋間質線維芽細胞における miRNA の網羅的解析
bFGF 投与 48 時間目の培養心筋間質線維芽細胞で増加する miRNA を網羅的に解析した。EXIQON 社の Real-time PCR array 解析では Fold change 1.5 以上を示す microRNA が 752 個中 12 個選定された。うち文献的考察から間質線維化との関連性が高い rno-miR-29c-3p を選定した。
- (5) miR-29c-3p の発現量解析
FGF 投与 48 時間目の培養心筋間質線維芽細胞では非投与群に比べて miR-29c-3p の発現量増加が認められた。
- (6) miR-29c-3p の局在観察
高血圧性心筋組織における miR-29c-3p の発現性を in situ hybridization 法から観

察した。高血圧性心筋組織では間質に強い発現性がみられた。また bFGF 投与有無による発現変化は、bFGF 投与群で有意な発現増加を認め、miR-29c-3p が bFGF 誘導性間質線維化抑制と心筋リモデリング抑制に関与する可能性が示唆された。

- (7) アンチセンス遺伝子導入実験による標的遺伝子の選定
高血圧性心筋間質線維芽細胞に miR-29c-3p の Mimic と Inhibitor を遺伝子導入し bFGF 投与 48 時間目の標的蛋白の発現性を検討した。ウエスタン法で PDGFR や NF- κ B などの蛋白発現を検討し標的分子の特異的性を検討しているところである。

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 2 件)

赤坂喜清、藤澤千恵、浜之上誠、鈴木健也、木下利雄、慢性心不全の病理：拡張不全型心不全における心筋組織再構築の分子機序、心電図、査読無、37 巻、2017, S-1-50-53 DOI 無し

Kinoshita T, Ishikawa Y, Arita M, Akishima-Fukasawa Y, Fujita K, Inomata N, Suzuki T, Namiki A, Mikami T, Ikeda T, Yamazaki J, Ishii T, Akasaka Y. Antifibrotic response of cardiac fibroblasts in hypertensive hearts through enhanced TIMP-1 expression by basic fibroblast growth factor, Cardiovascular Pathology 23, 2014, 92-100 査読あり

DOI: 10.1016/j.carpath.2013.11.001

〔学会発表〕(計 3 件)

赤坂喜清、慢性心不全の病理：拡張不全型心不全における心筋組織再構築の分子機序、第 43 回比較心電図研究会、2016 年 9 月 3 日、東京大学弥生キャンパス(東京都文京区)

木下俊雄：bFGF による心筋組織修復の制御と機能分子の探索、第 45 回日本創傷治療学会、2015 年 12 月 1 日、JP タワーホール&カンファランス(東京都千代田区)
Y. Akasaka, T. Kinoshita, M. Nakamichi, Y. Akishima - Fukasawa, T. Suzuki, K. Ohnishi, T. Ikeda, T. Mikami. Basic fibroblast growth factor inhibits fibrotic response of cardiac fibroblasts in hypertensive hearts through enhanced TIMP-1 expression. 2015 WHS Annual Meeting, 2015 年 5 月 1 日, San Antonio, Texas

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 喜清 (AKASAKA, Yoshikiyo)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：60202511

(2) 研究分担者

石川 由紀雄 (ISHIKAWA, Yukio)
東邦大学・医学部・客員教授
研究者番号：30276894

鈴木 健也 (SUZUKI, Takeya)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：20516231

木下 利雄 (KINOSHITA, Toshio)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：00723719