

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461064

研究課題名(和文)可溶性LOX-1血中濃度測定による特発性拡張型心筋症の重症度評価及び予後の検討

研究課題名(英文)Severity assessment and prognostic evaluation of idiopathic dilated cardiomyopathy by measurement of soluble LOX-1

研究代表者

青山 琢磨(AOYAMA, Takuma)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60422713

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)：特発性拡張型心筋症の重症度をsLOX-1測定し、検討した。DCM群と非DCM群を比較検討し、sLOX-1濃度とBNP濃度、心エコーパラメーターとは相関はなかった。次にドキソルビシン(DOX)心筋症とLOX-1との関連を検討した。LOX-1ノックアウトマウス(KO)は、野生型に比して、心機能が保たれた。KOでは、ROS産生、NF- κ B活性化、TNF- α 産生、VCAM-1発現、白血球浸潤が押さえられた。一方、DOXによる心筋細胞の退縮が抑制された。また、LOX-1の発現は主に心筋細胞に由来した。DOX心筋症の重症度は、心筋細胞のLOX-1の発現に相関する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Severity assessment of dilated cardiomyopathy (DCM) was examined by measurement of sLOX-1. Concentration of soluble LOX-1 were not correlated with BNP and parameters of echocardiography. Next, we focused a question whether LOX-1 contributes to the pathogenesis of DOX-induced cardiomyopathy. Preserved left ventricular function of LOX-1 knockout (KO) mice compared with those of wild (WT) mice was found after DOX administration. Production of ROS, activation of NF- κ B, production of TNF- α , expression of VCAM-1, and leukocyte infiltration were observed less in LOX-1 KO mice than WT mice. On the other hand, decreased expression of sarcometric proteins resulted in smaller diameters of CMs in WT mice than in LOX-1 KO mice. Interestingly, expression of LOX-1 in CMs was much more abundant than that in other cells. LOX-1 in CMs plays the most important roles in the pathology of DOX-induced cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科

キーワード：拡張型心筋症 LOX-1 心不全

1. 研究開始当初の背景

- LOX-1は、酸化LDL受容体として、申請者らが、1998年に同定し(Nature 386;p73-7)、心血管病における機能研究を続けている。申請者はLOX-1の遺伝子構造、転写制御機構(Biochem J 339,p177-84, J Mol Cell Cardiol 342,p101-14, FEBS Lett 467,p217-20)を解明し報告した。
- LOX-1は一回膜貫通型受容体で、細胞外ドメイン近傍でプロテアーゼにて切断され、sLOX-1として細胞から放出される(Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20,p715-20)。
- sLOX-1は、心不全で上昇する(Circ J. 74(4),p723-9)。心臓は心筋細胞と線維芽細胞からなるが、心臓の繊維化進展の原因となる線維芽細胞の増殖にLOX-1が重要である。
- 特発性拡張型心筋症とLOX-1の関連に関して検討した研究は未着手である。

2. 研究の目的

- 研究の全体の構想は、最小限の侵襲的検査である採血にて特発性拡張型心筋症の心筋繊維化の重症度(DCM)を評価することである。

3. 研究の方法

当院に受診中の対象患者(DCM 患者及び、非 DCM 患者)を対象とする。

(1) 血液検体の採取と解析

血中sLOX-1 濃度測定、BNP、TnI 等の生化学的検査を行う。

(2) 心筋生検検体の採取と解析

心臓カテーテル検査にて左心室、右心室から検体を採取し、HE 染色及びシリウス染色を施行する。抗LOX-1 抗体を用いて、心筋生検組織を免疫酵素抗体法にて染色し、LOX-1 の発現量を定量する。

(3) 心臓超音波検査と解析

2 群の患者群に対して、以下の項目を心機能のパラメーターとして記録、解析する。

・ 左室収縮能(心拍出量、左室駆出率、左室壁厚、左室心筋重量、左室拡張末期径、

左室収縮末期径、左室拡張期容積、左室収縮期容積)

以上の、研究の進展が良くないため、以下の実験を行った

12週齢、雄のLOX-1欠失マウス(KO)と野生型マウス(WT)を使用した。20mg/kgのDOXを腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を投与した。DOX投与前後に、左室拡張末期径(LVDd)、左室収縮末期径(LVDs)、左室内径短縮率(FS)を測定した。またDOX投与後、マイクロチップカテーテルを挿入し左室収縮期圧(LVSP)、左室拡張末期圧(LVEDP)を測定後、心臓を摘出した。心筋における病理学的検査として、HE染色、Sirius-Red染色等を行い、繊維化面積および心筋細胞径を比較した。CD45抗体および抗LOX-1抗体による免疫染色を行った。TNF- α 、IL-1 β 、ROSの定量を行った。Western BlottingにてLOX-1、VCAM-1、MHC、GATA-4、Troponin-Iと、(p)NF-kB、(p-)p38、(p-)Akt、(p-)ERKの発現を比較した。マウスの心筋細胞、線維芽細胞及び、冠動脈内皮細胞を培養し、各DOX 1 μ Mを投与後、各細胞でのLOX-1の発現量に関して検討した。

4. 研究成果

本研究は、当院で加療している DCM 群(10名)と非 DCM 群(15名)に対して以下の検討結果を得た。

・ 血中 sLOX-1 濃度と心不全マーカーBNP濃度、心エコーから得られたパラメーター(LV Dd Ds EF IVStH PWth)とは相関は認められなかった。

・ 心筋生検の組織切片において LOX-1 発現量は心筋細胞にヒトの検体でも確認できた。しかしながら、心不全重症度とsLOX-1濃度に相関は認められなかった。

上記の患者検体を用いた検討が、データの集積・解析途中となったため、マウスを用いた

ドキシソルピシン(DOX)投与による心筋症モデルにて、LOX-1の生理的役割を明らかにし、論文に投稿発表した。(PLoS One. 2016 May 19;11(5):e0154994.)

DOX 投与後の野生型マウス(WT)では左室拡大、左心機能低下が認められ、LOX-1 ノックアウトマウス(KO)ではこの変化が抑制された。

DOX 投与により心筋組織で ROS の増加、KO ではこの変化が抑制され、ROS 産生に LOX-1 の活性化が必要である事を証明した。DOX 投与後の WT では p38 MAPK と NF-κB のリン酸化が増強し、KO では抑制されていた。心筋組織における NF-κB 活性化が、TNF-α や IL-1 の発現を増加させ、炎症反応を引き起こしたと考えられた。DOX 投与後の WT で白血球接着因子 LOX-1 や VCAM-1 の発現が増強しており、心筋組織への炎症細胞浸潤が促進し、ROS による心筋組織の線維化、心筋細胞の退縮も生じた。一方 KO では抑制されていた。DOX 投与後の LOX-1 活性化により ERK MAPK が不活性化し、心筋細胞の縮小やサルコメア蛋白の退行性変化を導いたことが原因と考えられた。心臓では LOX-1 の発現は心筋細胞で最も多く、心筋細胞の LOX-1 発現が DOX による心筋傷害に重要な役割を果たす事を示した。以上より、LOX-1 の欠失により、DOX 投与後の心筋線維化、心筋細胞の退行性変化による心機能低下が抑えられるメカニズムを明らかにした。

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 1 件)

PLoS One. 2016 May 19;11(5):e0154994.

Deletion of LOX-1 Protects against Heart

Failure Induced by Doxorubicin

Chiharu Yokoyama, Takuma Aoyama, Takahiro

Ido, Akemi Kakino,

Takeru Shiraki, Toshiki Tanaka, Kazuhiko Nishigaki, Aiko Hasegawa, Yoshiko Fujita, Tatsuya Sawamura, Shinya Minatoguchi

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等:該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者
青山 琢磨 (AOYAMA Takuma)
岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：60422713

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
湊口 信也 (MINATOBUCHI Shinya)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20190697

沢村 達也 (SAWAMURA Tatsuya)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：30243033

西垣 和彦 (NISHIGAKI Kazuhiko)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60198447

竹村 元三 (TAKEMURA Genzou)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40283311

(4)研究協力者

()