

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461076

研究課題名(和文)心不全・動脈瘤の発症/進展におけるオステオプロテゲリンの関与

研究課題名(英文)Roles of osteoprotegerin in the development of heart failure/aortic aneurysm

研究代表者

鶴田 敏博 (Tsuruda, Toshihiro)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10389570

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)：本研究では、破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテゲリン(OPG)が心不全の病態にも関連するか、OPG遺伝子欠損マウス(OPG^{-/-}マウス)を用いて検討した。52週齢のOPG^{-/-}マウスの収縮期血圧は野生型マウスのそれより高値で、心臓が肥大し、左心室の収縮力が低下した。また、組織学的評価で左室内の線維化は乏しく、心筋細胞のアポトーシス陽性数が増加した。8週齢OPG^{-/-}マウスにアンジオテンシンIIを28日間皮下投与すると、同様に、OPG^{-/-}マウスの左室内腔は拡大し、収縮力が低下した。これらから、OPGが加齢や高血圧と関連し、心臓の形態や機能の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Main purpose of this study was to elucidate the possible roles for osteoprotegerin (OPG) in the development of heart failure. In 52-week-old OPG^{-/-} mice, we found that the OPG^{-/-} mice displayed higher blood pressure than wild-types. In addition, OPG^{-/-} mice revealed left ventricular dilation concomitant with reduction in left ventricular contractility. In histological analysis, OPG^{-/-} mice showed infrequent fibrosis for its heart size. Furthermore, we administered angiotensin II to 8-week-old OPG^{-/-} mice and wild-type mice, and we found the exaggerated left ventricular hypertrophy with the impaired left ventricular contractility. Recombinant OPG to these mice partially improved the phenomena. Taken together, our results suggest that OPG may have additive effects on cardiac structure and function associated with aging and hypertension.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 骨粗鬆症 加齢 線維化 アポトーシス 高血圧

1. 研究開始当初の背景

(1)急速な高齢化に伴い、介護を要する高齢者数は増加したため、社会福祉・医療経済面で大きな社会問題に直面している。「心不全」による死亡は「がん」に続き多い。心不全の予後に慢性腎臓病、貧血、糖尿病などの併存疾患が影響するため(*Eur J Heart Failure* 2014)、日常診療では包括的・集学的な医療が求められる。骨粗鬆症も心不全の重要な併存疾患のひとつである。我が国の保険統計(平成 25 年度)によれば、75歳以上高齢者の外来受診理由のうち、循環器系疾患(24%)と筋骨格系及び結合組織の疾患(22%)で全体の約半数を占める。骨粗鬆症による骨折は身体機能や運動機能を低下させ、高齢者の日常生活の質を落とし(フレイル)、そして心肺機能の低下といった負のスパイラルに陥る。近年、これら2疾病間の関連性が示唆する報告が散見されるようになった(*Circ Heart Fail* 2011; *Circulation* 2008; *Vasc Health Risk Manag* 2007)。

(2) Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)は、破骨前駆細胞上の受容体; RANKと結合し、破骨細胞への分化と機能発現を誘導する。オステオプロテゲリン(OPG)は、RANKと競合して RANKL の生物活性を阻害する(*Cell* 1997; *Biochem Biophys Res Commun* 1997)。このように RANKL/RANK/OPG システムは骨代謝の中心的な役割を担っていると考えられている。興味深いことに、OPG は生体内に広く分布し、骨代謝に関連する組織(甲状腺、腸、腎臓)のみならず心臓や大動脈にも強く発現する。これは OPG が骨代謝の制御に限らず心血管の構造や機能制御にも関与する可能性を示唆する。これまでの報告によれば、血中の OPG 濃度は心肥大や心不全の重症度に応じて増加し、生命予後を反映するという(*Hypertension* 2007; *Circ Heart Fail* 2011; *Am Heart J* 2010)。

(3)我々は有意な冠動脈狭窄を有さない56名を対象に、心臓カテーテル検査中に、左冠動脈入口部と冠静脈洞で同時に採血した。冠静脈洞部位の OPG 濃度は左冠動脈入口部のそれよりも有意に上昇することを見出した(7.7 ± 4.1 vs. 6.7 ± 3.6 pmol/l, $p < 0.0001$)。その変化率は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬/アンジオテンシン II 受容体拮抗薬を内服していない対象者で顕著で(7.8 ± 4.3 vs. 6.3 ± 3.1 pmol/l, $p < 0.0001$)、レニン・アンジオテンシン系と OPG 間の関連性が示唆された。さらに、アンジオテンシン変換酵素阻害薬/アンジオテンシン II 受容体拮抗薬を服用していない対象者($n=27$)では、OPG 濃度の変化率は求心性肥大リモデリングを呈する群に大きい傾向がみられた。これらより、OPG が心臓リモデリングに関与する可能性が考えられた(Koyama S, Tsuruda T, et al. *Horm Metab Res* 2014; 46: 581)。

しかしながら OPG の病態生理学的役割については未解明のままであった。

2. 研究の目的

われわれは、OPG は心臓の構造や機能を保

つ上で重要な分子であると仮説を立てて、実験を行った。本研究の主目的は、破骨細胞形成抑制因子 OPG が骨粗鬆症だけでなく心不全の病態とも関連する点に着目し、OPG 遺伝子欠損マウス(OPG^{-/-}マウス)を用いて「骨-心-血管クロストーク」の解明を目指した研究を展開することであった。

3. 研究の方法

自由飼育した OPG^{-/-}マウスと野生型マウスを、10週齢ならびに52週齢時に tail-cuff プレチスモグラフィを用いて血圧測定し、心臓超音波(フィリップス社 SONOS5500)で左心室腔の大きさ、壁厚と収縮力を計測した。深麻酔をかけた後、血液、心臓、脛骨を採取して計量した。心臓の組織切片を用いて、シリウス・レッドによるコラーゲン線維、TUNEL 染色(アポトーシスマーカー)を解析した。左心室組織を用いて、ウエスタンブロットによる extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK)のリン酸化、定量 PCR による遺伝子発現(atrial natriuretic peptide (ANP), OPG, RANKL, RANK, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), angiotensin converting enzyme (ACE), matrix metalloproteinase (MMP)-2、ELISA による soluble RANKL を測定した。マイクロCTスキャン(ScanXmate-L090H)を用いて骨容積、骨梁数、骨梁の厚さ、骨梁間隙等の骨形態を測定した。新生児ラットより単離した心筋細胞内の OPG 遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンし、アポトーシスシグナルと関連する分子(TRAIL やカスパーゼ-3)の蛋白発現変動をウエスタンブロット法で観察した。さらに8週齢 OPG^{-/-}マウスおよび野生型マウスにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min)をミニポンプ植え込み下で 28 日間皮下投与した。

4. 研究成果

(1)自由飼育した雄 OPG^{-/-}マウスは、10週齢時に野生型マウスに比し収縮期血圧は高値で、52週齢 OPG^{-/-}マウスの収縮期血圧も野生型マウスのそれより高かった(116 ± 2 vs. 101 ± 1 mmHg, mean \pm SEM, $p=0.001$)。また、心臓重量は加齢と共に増加し、52週齢で顕著であった(8.1 ± 0.64 vs. 4.7 ± 0.11 mg/g, $p < 0.001$)。

(2)心臓超音波で52週齢 OPG^{-/-}マウスは左室拡張期径が拡大(3.4 ± 0.3 vs. 2.1 ± 0.1 mm, $p=0.003$)、左室壁は菲薄化(0.8 ± 0.03 vs. 1.0 ± 0.05 mm, $p=0.0019$)、収縮率が低下した(44 ± 3 vs. $67 \pm 2\%$, $p < 0.0001$)。

(3)組織学評価では心筋間質の線維化に乏しく(0.08 ± 0.02 vs. $0.15 \pm 0.03\%$, $p=0.0435$)、心筋細胞のアポトーシスが亢進した(3.1 ± 1.0 vs. $0.1 \pm 0.1/40,000$ nuclei, $p=0.0256$)。

(4)OPG^{-/-}マウスの左室内 MMP-2 や TRAIL、ACE 遺伝子発現、ERK や JNK のリン酸化が亢進した。リコンビナント OPG 製剤を OPG^{-/-}マウスに 28 日間投与すると、骨密度の改善と共に左室収縮能は改善傾向を示した($32 \pm 4\%$ $41 \pm 1\%$, $p=0.0374$)。

上述の実験結果で、OPG^{-/-}マウスの左室内ACE 遺伝子発現が亢進することから、OPG/RANKL/RANK 系とレニン・アンジオテンシン系のクロストークが示唆された。

(5) 8週齢の雄 OPG^{-/-} および同週齢の野生型マウスにアンジオテンシン II を 28 日間持続皮下投与した。収縮期血圧は同程度だったが (153 ± 5 vs. 154 ± 6 mmHg, p=0.9074)、OPG^{-/-}マウスの心臓重量が有意に増加した (8.3 ± 0.6 vs. 6.4 ± 0.2 mg/g, p=0.0097)。

(6) 心臓超音波では OPG^{-/-}マウスの左室拡張期径は拡大し (2.93 ± 0.24 vs. 1.72 ± 0.08 mm, p=0.002)、左室後壁は薄く (0.85 ± 0.04 vs. 0.97 ± 0.03 mm, p=0.0431)、収縮率は低下した (43 ± 3 vs. 70 ± 2%, p<0.0001)。

(7) シリウスレッド染色では OPG^{-/-}マウスは心筋間質の線維化に乏しく (0.2 ± 0.1 vs. 2.9 ± 0.8%, p=0.0034)、心筋細胞の TUNEL 陽性アポトーシス数が増加した (7.2 ± 1.8 vs. 0.8 ± 0.4/40,000 nuclei, p=0.0091)。

(8) リコンビナント OPG 製剤 (10 mg/kg) をアンジオテンシン II 投与下の OPG^{-/-}マウスへ 28 日間腹腔内投与すると脛骨の骨密度の改善とともに左室収縮率が改善することを見出した (47 ± 3% vs. 54 ± 2%, p=0.0252)。

考察

これらの実験結果から、OPG が加齢や高血圧と関連し、心臓構築や機能の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかしながら、未解明な点も多く存在する。OPG は RANKL が RANK へ結合することを阻止することにより破骨細胞の成熟を調節する。われわれは当初、心臓においても同様なメカニズムが存在すると考えていた。しかしながら、OPG^{-/-}マウス、野生型マウスとも心臓内の RANKL 発現は OPG や RANK に比べると極めて低かった。一方で OPG^{-/-}マウスの血中には高濃度の RANKL が存在することから、これが心臓に対する攻撃因子であるのではないかと考えた。しかし、抗 RANKL 抗体を OPG^{-/-}マウスに投与して血中 RANKL を中和すると骨密度は増加するものの心不全は全く改善しなかった。また、新生児ラットから単離した培養心筋細胞中および培養液中に RANKL は検出されないが、同細胞中の OPG 遺伝子をノックダウンするとアポトーシスシグナルが亢進した。これらの結果からは、OPG には、RANKL に依存しない生物活性を有する可能性が示唆された。われわれの観察結果を支持するかもしれない報告がある (Baud'huin M, et al. *Cytokine Growth Factor Rev.*2013; 24(5):401-9)。同論文で、OPG は RANKL のみならず TRAIL やヘパリン結合蛋白を有するコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸なども結合し、生物学的機能を調整している可能性があるという。OPG は多岐に渡る生物学作用を有する可能性が示唆され、OPG 遺伝子が生体内に広く分布することからもうなずける。今後の研究展開が期待される。

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)

1. Hao Y, Tsuruda T, Sekita-Hatakeyama Y, Kurogi S, Kubo K, Sakamoto S, Nakamura M, Udagawa N, Sekimoto T, Hatakeyama K, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Cardiac hypertrophy is exacerbated in aged mice lacking the osteoprotegerin gene. *Cardiovasc Res.* 110:62-72, 2016. doi: 10.1093/cvr/cvw025. (査読有)
2. Tsuruda T, Sekita-Hatakeyama Y, Hao Y, Sakamoto S, Kurogi S, Nakamura M, Udagawa N, Funamoto T, Sekimoto T, Hatakeyama K, Chosa E, Kato J, Asada Y, Kitamura K. Angiotensin II stimulation of cardiac hypertrophy and functional decompensation in osteoprotegerin-deficient mice. *Hypertension.* 67:848-856, 2016. Doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.066 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Tsuruda T, Kitamura K. Osteoprotegerin, but not Receptor Activator of Nuclear Factor kappaB Ligand, is Associated with the Development of Systolic Heart Failure. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017 年 3 月 17 日 ~ 19 日 (金沢フォーラス, 石川県金沢市)
2. 鶴田敏博, 北村和雄. 骨粗鬆症と心不全の接点 - オステオプロテゲリンの関与. 第 20 回日本心血管代謝内分泌学会学術総会. 2016 年 12 月 16 日 ~ 17 日 (東京コンベンションホール, 東京) (シンポジウム)
3. 鶴田敏博, 北村和雄. アンジオテンシン II はオステオプロテゲリン遺伝子欠損マウスの遠心性肥大を促進させる. 第 39 回日本高血圧学会総会. 2016 年 9 月 30 日 ~ 10 月 2 日 (仙台国際センター, 宮城県仙台市)
4. Tsuruda T, Sekita-Hatakeyama Y, Kurogi S, Hao Y, Sakamoto S, Nakamura M, Udagawa N, Sekimoto T, Hatakeyama K, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Angiotensin II stimulation enhances cardiac hypertrophy and functional decompensation in osteoprotegerin-knockout mice. European Society of Cardiology Congress 2016. August 27-31, 2016 (Fiera di Roma, Rome, Italy)
5. 鶴田敏博, 畠山陽子, 萩異琳, 黒木修司, 中村美どり, 宇田川信之, 畠山金太, 帖佐悦男, 浅田祐士郎, 北村和雄. 心不全の発症に関わる骨代謝分子オステオプロテゲリンの役割. 第 58 回日本老年医学会学術集会 2016 年 6 月 8 日 ~ 10 日 (石川県立

- 音楽堂, 石川県金沢市)
- 6 . Tsuruda T, Hao Y, Kurogi S, Nakamura M, Udagawa N, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Cardiac hypertrophy is exacerbated in aged mice lacking the osteoprotegerin gene. American College of Cardiology. Geriatric Cardiology Section Meeting April 3, 2016 (McCormick Place, Chicago, IL, USA)
 - 7 . Tsuruda T, Hao Y, Kurogi S, Nakamura M, Udagawa N, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Cardiac hypertrophy is exacerbated in aged mice lacking the osteoprotegerin gene. American College of Cardiology. 65th Annual Scientific Session. April 2-4, 2016 (McCormick Place, Chicago, IL, USA)
 - 8 . Tsuruda T, Hao Y, Sakamoto S, Kurogi S, Udagawa N, Nakamura M, Hatakeyama K, Chosa E, Asada Y, Kitamura K. Deletion of osteoprotegerin gene exacerbates cardiac hypertrophy and systolic dysfunction in aged-mice. European Society of Cardiology Congress 2015. August 29-September 2, 2015 (ExCeL, London, UK).
 - 9 . Koyama S, Tsuruda T, Onitsuka H, Ishikawa T, Kitamura K. Osteoprotegerin is secreted into coronary circulation: a possible link to renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. American College of Cardiology. 63rd Annual Scientific Session. March 28-31, 2014 (Washington Convention Center, Washington DC, USA)

〔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 :

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鶴田 敏博 (TSURUDA, Toshihiro)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 10389570

(2)研究分担者

北村 和雄 (KITAMURA, Kazuo)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号: 50204912

畠山 金太 (HATAKEYAMA, Kinta)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 60325735
(平成 27 年 3 月 13 日まで)

(3)連携研究者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

関本 朝久 (SEKIMOTO, Tomohisa)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 60305000