

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670412

研究課題名(和文)心筋線維芽細胞特異的発現を示す新たな増殖因子受容体の精製・同定

研究課題名(英文)Identification and purification of cardiac fibroblast-specific FGF23 receptor

研究代表者

北風 政史(KITAKAZE, Masafumi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・部長

研究者番号：20294069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、FGF23の血中濃度が心不全患者で高値であり、心臓線維化に関連し、予後を規定することを臨床研究から導き出した。FGF23と心臓線維化の関連を調べるため、我々はヒト心筋線維芽細胞を用いて、その受容体の同定と機能解析を行った。その結果、FGF23は我々が本研究により同定した受容体を介し、心筋線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させ、コラーゲン遺伝子の発現を増加させることがわかった。本研究の成果は、FGF23をターゲットにした新たな心不全治療薬の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that serum concentration of fibroblast growth factor 23 (FGF23) is significantly increased in patients with heart failure, and FGF23 level is associated with the extent of cardiac fibrosis. These findings led us to investigate the association between FGF23 and cardiac fibrosis. In this study, we found that FGF23 leads to transdifferentiate from fibroblast into myofibroblast, and then increases collagen gene expression using human cardiac fibroblast. We also identified FGF23 receptor in cardiac fibroblast. These results suggest that FGF23 may be a novel therapeutic target for heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患は、標準的な治療法が確立された現在でも、5年生存率は50%と極めて予後不良の疾患である。この状態を打破するため、我々は、10年以上前より心不全患者データコホート(*J Am Coll Cardiol.* 2006)、一般住民疫学コホート(*Hypertension Res.* 2008)を立ち上げ、すべての臨床データ、血液データ、心筋遺伝子発現データ、SNP データを集積して、新たな心不全治療のターゲットを探索してきた(*J Clin Invest.* 2007)。これまで、アデノシン、Nox、アディポネクチン、ヒスタミン、リンなどが心不全のターゲットとして俎上に上がり、それらの関与について基礎的・臨床的研究を行い成果を上げてきた。その中で、今回、リンと強い繋がりのある Fibroblast Growth factor (FGF)ファミリーに属する FGF-23 の血中濃度が心不全患者で高値であり、心臓線維化に関連し、予後を規定することを見出した。

FGF ファミリーは 20 種以上存在し非常に多様性に富み、いまだ同定されていない受容体の存在が示唆されている。FGF23 受容体を構成する共役受容体 Klotho は心臓になく、FGF23 は心臓へ直接作用しないと考えられてきた。しかし、我々は FGF23 が心筋線維芽細胞に直接作用し線維化シグナルを促進すること、また心筋細胞に作用しないことを明らかにした。以上より、FGF23 が心筋線維化に関与していることを示すとともに、心筋線維芽細胞特異的な共役受容体が存在することが考えられた。

2. 研究の目的

全ゲノム解読時代に創薬標的として重要な受容体はほとんどすでに同定されている。しかし、20 種以上存在して非常に多様性に富む FGF ファミリー分子に関しては唯一、いまだ同定されていない受容体の存在が示唆されている。我々の大規模臨床・疫学研究により、FGF23 が心臓線維化と心不全の予後に関与することが明らかになった。FGF23 は腎臓でのリン・カルシウム代謝制御に関与するが、心臓での働きは不明であった。我々は、心筋線維芽細胞において FGF23 刺激により線維化シグナルが活性化されることを確認した。これらの予備実験から、心筋線維芽細胞に特異的に発現する未同定 FGF23 受容体の存在が示唆された。そこで、本研究ではこの受容体を同定し、その心臓における機能解析をすすめることを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、心臓に Klotho 蛋白が発現しているか調べるため、マウスやラットの臓器を摘出し、RT-PCR や免疫染色による発現解析を行った。また、ラット心筋線維芽細胞とヒト心筋線維芽細胞を用いて、FGF23 刺激により線維化が促進されるかどうかを MTT アッセイと RT-PCR によるコラーゲン遺伝子の

発現解析を行い評価した。

次に、ヒト心臓線維芽細胞を用いて FGF23 の受容体の同定を行った。まず、心臓線維芽細胞に発現している様々な FGF 受容体の発現量を比較し、FGF23 刺激によりこれらの受容体がリン酸化をうけるかどうか評価した。また、ショットガン法により結合タンパク質の同定を行うことを予定した。

さらに、新規受容体を介する細胞内シグナル機構の解明ため、下流シグナルの解析とフェノタイプの解析を行った。最後に、新規受容体の遺伝子改変マウスを作成し、in vivo での解析解析を行うことを予定した。

4. 研究成果

(1)Klotho 受容体は心臓に発現しない。

我々は、まず Klotho 受容体が心臓で発現しているかどうかを検討した。マウスの全身臓器より RNA を抽出し、PCR を行ったところ、心房・心室ともに Klotho 受容体の発現はみられなかった。また、Western blot でも同様に心臓での Klotho 蛋白の発現はみられなかった。我々はマウス圧負荷心不全モデルを作製し、免疫染色にて Klotho の発現を確認したが、心筋・線維芽細胞ともに Klotho の発現はみられなかった。以上より、心臓において Klotho 蛋白は発現していないことがわかった。

(2)FGF23 は線維化を促進させる。

FGF23 が心筋線維芽細胞に直接作用するか調べるため、ラットの心筋線維芽細胞を単離し MTT アッセイを行ったところ、培養液中への FGF23 添加により心筋線維芽細胞の増殖効果を認めた。また、心室由来のヒト心臓線維芽細胞を用い、FGF23 を添加したところ、コラーゲン関連遺伝子の発現増加がみられた。これらの結果より、FGF23 は Klotho を介さず、心筋線維芽細胞に直接作用していると考えられた。

(3)心筋線維芽細胞における FGF23 受容体の同定。

我々は、ヒト心臓線維芽細胞を用いて FGF23 の受容体の同定を行った。まず、心臓に発現する FGF 受容体を調べたところ、ヒト心臓線維芽細胞では FGF1 受容体の発現が高いことがわかった。また、FGF23 をヒト心臓線維芽細胞に添加したところ、この受容体のリン酸がみられ、FGF23 の受容体として働いていることがわかった。

(4)FGF23 とその受容体を介した細胞内シグナル機構の解明。

ラット心臓線維芽細胞では FGF23 投与により ERK のリン酸化がみられたが、ヒト心臓線維芽細胞では ERK のリン酸化を認めなかった。そのため、ヒト心臓線維芽細胞特異的なこの受容体を介した下流シグナルの解析を行った。心筋線維芽細胞は、アンジオテ

ンシン II や TGF- 刺激により筋線維芽細胞に分化し、線維化を促進することが知られている。FGF23 をヒト心臓線維芽細胞に添加したところ、RT-PCR, ウエスタンブロットにて筋線維芽細胞のマーカー遺伝子・蛋白の発現増加を認め、免疫蛍光染色にて筋線維芽細胞への分化促進がみられた。また、FGF23 刺激により、コラーゲン遺伝子の発現増加もみられた。次に、siRNA を用いて FGF1 受容体をノックダウンしたところ、FGF23 による筋線維芽細胞への分化が抑制された。以上のことから、心臓線維芽細胞において、FGF23 は Klotho を介さず、この受容体を介したシグナルにより筋線維芽細胞に分化し、線維化を促進することがわかった。

近年、心筋細胞では FGF23 は FGF 受容体の 1 つ FGFR4 を介し、PLC をリン酸化させ、心肥大に関与することが報告された (*Molecular Cell* 2015;22:1020-1032)。この受容体は我々が同定したものと異なるものであったため、ヒト心臓線維芽細胞においても FGFR4 が FGF23 シグナルに関与しているか、さらに検討する必要性があると考えられた。ヒト心筋線維芽細胞での FGFR4 の発現を RT-PCR で確認したところ、発現はわずかであった。また、siRNA を用いて FGFR4 をノックダウンしたが、FGF23 による筋線維芽細胞への分化誘導は抑制されないことがわかった。

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 1 件)

Imazu M, Takahama H, Asanuma H, Funada A, Sugano Y, Ohara T, Hasegawa T, Asakura M, Kanzaki H, Anzai T, Kitakaze M

Pathophysiological impact of serum fibroblast growth factor 23 in patients with nonischemic cardiac disease and early chronic kidney disease.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014,15;307(10):H1504-11. 査読有

Imazu M, Takahama H, Amaki M, Sugano Y, Ohara T, Hasegawa T, Kanzaki H, Anzai T, Mochizuki N, Asanuma H, Asakura M, Kitakaze M.

Use of serum fibroblast growth factor 23 vs. plasma B-type natriuretic peptide levels in assessing the pathophysiology of patients with heart failure.

Hypertens Res. 2017 Feb;40(2):181-188. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Imazu M, Asakura M, Hasegawa T,

Asanuma H, Ito S, Nakano A, Funada A, Sugano Y, Ohara T, Kanzaki H, Takahama H, Morita T, Anzai T, Kitakaze M
Effects of the oral adsorbent of AST-120 in patients with both chronic heart failure and chronic kidney disease.
American Heart Association Scientific Sessions 2014 年 11 月 15 日 ~ 19 日 Chicago

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北風 政史 (KITAKAZE, Masafumi)

国立循環器病研究センター・

研究開発基盤センター・部長

研究者番号: 20294069

(2) 研究分担者

朝倉 正紀 (ASAKURA, Masanori)

国立循環器病研究センター・

研究開発基盤センター・室長

研究者番号: 80443505

瀬口 理 (SEGUCHI, Osamu)

国立循環器病研究センター・

病院・医師

研究者番号: 60570869

中野 敦 (NAKANO, Atsushi)

国立循環器病研究センター・

研究開発基盤センター・室長

研究者番号: 90648106

平成 27 年 10 月 16 日削除届

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者

伊藤 慎 (ITO, Shin)
今津 美樹 (IMAZU, Miki)
高島 成二 (TAKASHIMA, Seiji)
関 庚徳 (MIN, Kyung-Duk)
進藤 一紘 (SHINDO, Kazuhiro)
山崎 悟 (YAMAZAKI, Satoru)
福田 弘毅 (FUKUDA, Hiroki)