

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860560

研究課題名(和文)心不全進行における低酸素環境と組織幹細胞システムの意義

研究課題名(英文)The role of resident stem cell in the progression of heart failure

研究代表者

眞田 文博 (SANADA, FUMIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30722227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食生活の欧米化、高齢化に伴い心不全患者数は急増しているが、病態メカニズムは未だ不明な点が多い。我々は心不全時に発現が変化する因子が心筋、心臓幹細胞システムにどのような影響を与えるのか検討をした。まずいくつかのラット心不全モデルを用いて、共通して発現が亢進する因子としてペリオスチンを見出し、そのC末端側に存在するアイソフォームの機能検討を行った。結果、心筋細胞のアポトーシスを誘導するアイソフォームが確認でき、選択的中和抗体を作成し、心筋梗塞モデルでの有効性を証明した。残念ながらいずれのアイソフォームも心臓再生には関与していなかったが、今後は独自に作成した中和抗体の臨床応用を目指す予定である。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is the major cause of death in the developed countries. However, the precise mechanism of this disease is still unclear. Using several rat heart failure models, we identified periostin that is upregulated by ischemia and causes myocyte apoptosis by inhibiting cell attachment. Moreover, neutralizing antibody against specific alternative splicing isoform of periostin has been generated and its effect on ischemic heart failure has been proofed in this experiment. We are currently conducting additional experiment for future clinical application of this antibody.

研究分野：循環器

キーワード：心不全

1. 研究開始当初の背景

心臓は収縮弛緩をつねに繰り返しているが、運動や心血管病などによる負荷の増大に対して心筋サイズや収縮力をダイナミックに変化させて適応する。心不全時に心筋は血液循環を維持するため肥大するとともに心血管数を制御し、仕事量に見合った血流を維持している。しかし、慢性的な心不全状態では、血管新生機構が破綻し冠血流量の減少から心機能低下がおこる。原因として慢性的な冠血流量の減少が心筋エネルギー産生の低下を引き起こし、低酸素環境下で生き残る為の休眠状態(冬眠心筋)を誘導すると考えられている。一方、これまでに研究代表者らは臨床におけるヒト心臓幹細胞の安全性および有効性を報告し(Lancet 2011)、続いて心筋間質に生じる低酸素状態に着目して、加齢マウスにおける心臓幹細胞ニッチの研究を行い加齢による低酸素心臓幹細胞の増加は機能的な正常酸素心臓幹細胞を枯渇させることを明らかにした(Circ Res. 2007, 2013)。この心臓老化のメカニズムは慢性的な冠血流量の減少を伴う各種心不全に共通するメカニズムである可能性がある。

2. 研究の目的

心不全は多様な心血管疾患の終末像であり、食生活の欧米化、高齢化に伴い患者数は急増している。しかしながら、心不全の進行に関する詳細なメカニズムはいまだ不明な点が多い。我々はこれまで心臓に内在する幹細胞が、内皮細胞、平滑筋細胞や心筋細胞にも分化することを確認し報告してきた(Lancet 2011, PNAS 2009)。一方でこの心臓幹細胞が心不全病態を誘導する“幹細胞病”としての負の側面の可能性を考え、研究を行ってきた(Circ Res. 2013)。この研究では心不全において認められる心臓虚血に着目し、低酸素環境、不全心特異的に発現が変化するたんぱく質が心筋、心臓幹細胞システム(幹細胞とその周辺組織)に与える機能的影響を検討し、心不全進行の新たなメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まずいくつかのラット心不全モデル(急性心筋梗塞モデル、大動脈縮窄モデル、食塩感受性ダールラットを用いた高血圧心不全モデル)を作成し、低酸素領域の広がりを確認の上、心機能の破綻する心不全の代償期から非代償期(冬眠心筋が増える期間)にかけて変化する因子を網羅的に検討した。特に発現が亢進する分泌たんぱく質としてペリオスチンを見出し、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 心不全で代償期から非代償期で上昇する因子の探索。

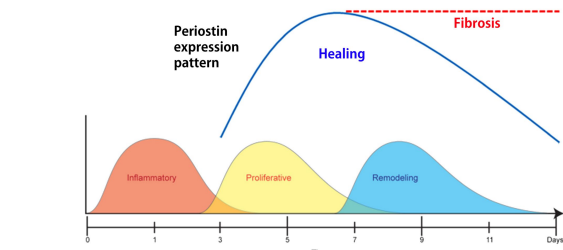


図1 慢性炎症性疾患におけるペリオスチンの発現パターン

まず各心不全モデルで共通して心不全代償期から非代償期にかけて上昇する因子を網羅的に解析し、治療ターゲットにしやすい分泌蛋白のうち発現が最も亢進していたペリオスチンに注目した。ペリオスチンは細胞外マトリックスの1つで、そのC末端側にスプライシングバリエーションを有し、主に線維芽細胞より分泌され、慢性炎症に関与する(図1、2)。またこれまでにペリオスチンが心臓再生を促すとの報告があることから(Nat. Med. 2007)、心臓再生のターゲットとしてペリオスチンスプライシングアイソフォームの機能解析を行った。

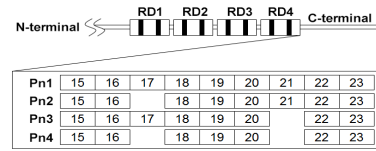
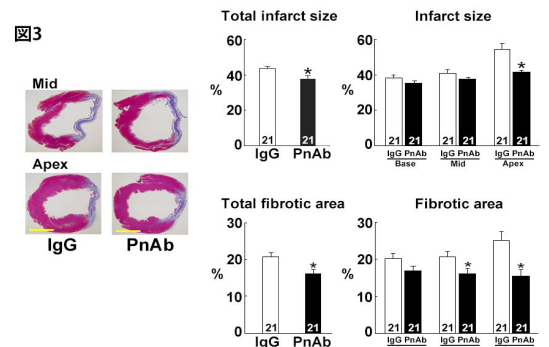


図2 ペリオスチンバリエーション(exon 15~23を表示)

(2) 急性心筋梗塞モデルにおけるペリオスチンの役割検討。

ラット急性心筋梗塞後の各ペリオスチンバリエーションの発現解析を行ったところ、全てのアイソフォームが術後7-14日目をピークに慢性期は減少していたが、ペリオスチンバリエーション1(Pn1、図2参照)のみが慢性期も高値であった。そこでペリオスチンエクソン17



に対する選択的中和抗体(PnAb)を作成し、急性心筋梗塞モデルに週1回腹腔内投与を行った。図3に示すように、PnAb投与は梗塞内残存心筋量を有意に増やし、線維化領域を減少させ、心機能悪化を抑制した。残念ながらKi67陽性再生心筋数、c-kit陽性心臓幹細胞数は中和抗体投与群とコントロール群で有意差はなかった。In vitroでの解析で、Pn1はTGF-β1刺激、PDGF刺激、低酸素刺激で上昇し、Pn1は線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質変換に関与していることが、中和抗体を用いた検討で明らかとなった。

(3)ペリオスチンスプライシングバリエントの役割検討。

各バリエントの役割をまず in vitro で解析した。Pn1-4 の各蛋白を用いて細胞接着実験を繊維芽細胞で行った。Pn1,3 (エクソン 17 含有) は細胞接着を抑制し、Pn2(エクソン 17 非含有) は接着促進作用が、Pn4 にはどちらの作用も認めなかった。また内皮細胞を用いた検討で Pn2 のみが血管新生作用を持つことが Tube formation assay で明らかとなった。梗塞部位で発現するペリオスチンバリエント 1 は心筋細胞接着を抑制し、足場に依存する心筋細胞のアポトーシスを誘導したが、PnAb はこれを抑制したものと考えられる。現在エクソン 17、エクソン 21 ノックアウトマウスを作成し、心機能を解析中である。

今回の検討では低酸素環境下、梗塞刺激下で主に線維芽細胞から分泌されるたんぱく質としてペリオスチンを見出し、C 末端側に存在するスプライシングバリエントの解析を行った。既報では心臓再生を誘導するとの報告があったが、残念ながら我々の作成した中和抗体、In vitro での蛋白実験で有意な再生心筋は認めなかった。

今後はバリエントノックアウトマウスを用いての検討と、心不全慢性期に持続上昇するペリオスチンバリエント 1(Pn1)がどのようなスプライシングメカニズムで上昇するのかを検討予定としている。

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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

・ Hypoxic and normoxic cardiac stem cell dictates myocardial aging. 眞田文博、第 14 回日本抗加齢医学会総会 2014 年、大阪国際会議場 (大阪)

・ Stem cell factor activates hypoxic cardiac stem cells reversing myocardial aging. 眞田文博、第 22 回日本血管生物医学会学術集会 2014 年、みやこメッセ (京都)

・ 液性因子による組織恒常性の破綻と維持炎症性疾患におけるペリオスチンバリエントの役割 眞田文博、脳心血管抗加齢研究会 (招待公演) 2015 年、梅田スカイビル (大阪)

・ Selective blockade of periostin Exon-17 ameliorates cardiac performance in acute myocardial infarction. 眞田文博、日本遺伝子治療学会学術集会、アジア・オセアニア遺伝子治療コンソーシアム 2015 年、大阪国

際会議場 (大阪)

・ ペリオスチンスプライシングバリエント制御による抗炎症効果の検討、眞田文博、脳心血管抗加齢研究会 2016 年、東京 秋葉原 UDX (東京)

・ マスト細胞の分化機能獲得におけるペリオスチンの影響、村津淳、眞田文博、脳心血管抗加齢研究会 2016 年、東京 秋葉原 UDX (東京)

・ Selective blockade of periostin exon-17 improves heart failure after myocardial infarction. 眞田文博、American Heart Association Scientific Session 2016 年、ニューオーリンズ (米国)

・ Selective blockade of periostin exon-17 ameliorates heart failure after myocardial infarction. 眞田文博、19th International Vascular Biology Meeting 2016 年、ボストン (米国)

・ 生活習慣病における最近の話題～スプライシングバリエントの役割を含めて～ 眞田文博、Molecular Jungle 2016 年、リーガロイヤルホテル (大阪)

・ Selective blockade of periostin exon-17 improves cardiac performance in rat myocardial ischemia model. 眞田文博、The 26th Scientific Meeting of International Society of Hypertension 2016 年、ソウル (韓国)

・ ペリオスチン・スプライシングバリエント制御による炎症性疾患治療法の確立、眞田文博、Molecular Cardiovascular Conference II 2016 年、東京ドームホテル (東京)

・

[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
大阪大学大学院 医学系研究科 臨床遺伝
子治療学ホームページ
<http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 文博 (SANADA FUMIHIRO)
大阪大学大学院医学系研究科
臨床遺伝子治療学 助教
研究者番号：30722227

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

森下 竜一 (MORISHITA RYUICHI)
谷山 義明 (TANIYAMA YOSHIAKI)