

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21201

研究課題名(和文)新規ペプチドホルモンINSL6の心臓リモデリングにおける意義

研究課題名(英文)Role of cardiac remodeling of novel peptide hormone INSL6

研究代表者

吉田 守美子(YOSHIDA, Sumiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：40510904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：INSL6の心臓における作用を検討した。INSL6欠損(INSL6 KO)マウスを用いた検討で、通常状態ではINSL6 KOマウスと野生型マウスの心臓形態に差はなく、アンジオテンシンII刺激後のINSL6 KOマウスは、野生型マウスと比較して有意に心機能が低下し、心筋線維化が著明となった。INSL6は心筋線維化や心臓リモデリングに関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of INSL6 in the heart using INSL6 deficient mice (INSL6 KO). There was no difference in cardiac morphology between INSL6 KO mice and wild type mice under normal condition. INSL6 KO mice after angiotensin II stimulation showed significantly increased myocardial fibrosis and decreased cardiac function compared with wild type mice. It was suggested that INSL6 is involved in myocardial fibrosis and cardiac remodeling.

研究分野：生活習慣病

キーワード：心臓リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全はいまだ難治性疾患であり、その発症・進展には様々な機序に起因する心臓リモデリングが関与している。心臓リモデリングとは、心臓が血行力学的負荷に対応して循環動態を一定に保つために構造と形態を変化させることであり、心筋梗塞後や慢性圧・容量負荷後などに認められる。心筋梗塞後には、梗塞部の壁運動が低下し、非梗塞部のみの壁運動では必要な心拍出量が得られなくなる。このため代償機転として、Frank-Starling 機序により左室容積が増大し、この容量負荷に基づく左室壁応力 (wall stress) 上昇に対する代償として残存心筋の肥大が生じる。また高血圧による圧負荷が心臓に加わると、心筋は代償性に肥大し、心機能を保持しようとする。過剰な圧負荷がさらに持続すると、心筋細胞は伸展し、心室腔は拡大する。このような心室リモデリングは生体の代償機転であるが、その促進は長期的にみると予後不良因子となることが大規模試験で明らかとなっている。心室リモデリングは組織学的には心筋細胞の肥大と間質の線維化を伴う。また心室リモデリングには、アンジオテンシン II やエンドセリン、カテコラミンなどの神経体液性因子が関与すると考えられている。

(2) インスリン、Insulin-like growth factors (IGF)、リラキシン、Insulin-like peptide (INSL) は INSULIN/IGF/RELAXIN スーパーファミリー と称されるペプチドホルモン群である。これらのペプチドホルモンは、様々な臓器での発生と機能に関して重要な役割を担っていることが知られている。INSULIN/IGF/RELAXIN スーパーファミリーの中で、Insulin-like peptide 6 (INSL6) は 1999 年に新しく同定されたペプチドホルモンであり、その機能は未だほとんど解明されていない。現在までに、INSL6 は精巣で多く発現し、精子形成に関与し、不妊との関連が報告されている (Endocrinology, 2009)。また、INSL6 は通常状態のマウスにおいて、精巣以外に胸腺、小腸、脾臓等で比較的高い発現を認め、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、脂肪組織にも発現が認められている。しかしながら、その他の臓器における役割は未だ不明であり、受容体の同定にも至っていない。一方で、INSULIN/IGF/RELAXIN スーパーファミリーは心臓と深い関連があり、スーパーファミリーの一つである、リラキシン 2 (Serelaxin; recombinant human relaxin-2) の急性心不全患者への投与が、心血管死および全死亡軽減したとする臨床試験が発表されている (Lancet, 2013)。また動物モデルにおいて、リラキシンは心筋線維化の改善効果を有すると報告されている (Mol Cell Endocrinol, 2008)。そこで、リラキシンと同じファミリーに属する INSL6 も、心臓への作用を有する可能性が考えられ、本研究を着想するに至っ

た。なお、マウスとヒトの INSL6 の相同性は約 70% と報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) マウスモデルを用いて、INSL6 が、心不全の発症・進展に重要な心臓リモデリングに関与するかどうかを明らかにする。さらに、心臓リモデリングにおける INSL6 作用機序を明らかにする。

(2) INSL6 の、心臓リモデリングや心不全への治療薬の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) INSL6 遺伝子改変マウスを用いた心臓リモデリングモデルの作成

INSL6 の心臓での機能解析のために、INSL6 欠損 (INSL6 KO) マウスおよび INSL6 過剰発現 (INSL6 TG) マウスを用いる。INSL6 KO マウス、INSL6 TG マウスは、研究協力者のボストン大学の Kenneth Walsh 教授の研究室ですでに飼育されている。それぞれのマウスは 10~12 週齢の雄マウスを用い、申請者が過去に報告した浸透圧ポンプによるアンジオテンシン II 持続皮下投与 (2mg/kg/day) にて、約 2 週間で心臓リモデリングを生じるモデルを作成する (Ikeda et al. J Biol Chem, 2005)。この動物モデルを用い、INSL6 の有無による心臓の表現型の差異を検討し、INSL6 が心臓リモデリングに関与しているかどうかを明らかにする。さらに INSL6 KO マウスにアデノウイルスを用いて INSL6 を発現させ、同様にアンジオテンシン II 刺激心臓リモデリングモデルを作成し、心臓の表現型を観察する。それにより、INSL6 の直接の作用を確認する。また、INSL6 TG マウスは恒常的に INSL6 が過剰であるが、野生型マウスにアデノウイルスを用いて一時的に INSL6 を過剰発現させたマウスを作成し、同様にアンジオテンシン II 刺激後の変化を検討する。アデノウイルスはアンジオテンシン II 刺激の 3 日前に単回投与する。

(2) マウス心臓リモデリングモデルの解析方法

循環動態の把握のため、経時的に体重、血圧、心拍数を測定する。心機能は小動物専用の心エコー装置にて、左室肥大や左室収縮能 (Fractional Shortening, Ejection Fraction, LV Dimension, LV wall thickness) を評価項目として心臓リモデリング変化を検討する。我々の予備検討では、アンジオテンシン II 刺激モデルでは、約 1 週間ですでにエコー上心機能に変化が認められることから、1 週間毎に経時的に解析を行い、2 週間でマウスを犠牲死させ、臓器の解析を行う。心肥大、心不全の指標として、2 週間後の臓器摘出の際、心臓重量、肺重量を測定する。心臓の組織学的変化は、心筋線維化、心筋細胞の肥大、および冠動脈・大動脈における血管周囲の線

維化や内中膜肥厚を中心に評価する。

(3) INSL6 のアンジオテンシン II 刺激心臓リモデリングにおける作用機序の解析

作用機序の解析は、アンジオテンシン II 下流シグナルであり、心筋肥大や心筋線維化に関与する、TGF- $\beta$ /Smad 経路、ERK 活性化経路を中心に、遺伝子レベル、蛋白レベルでの変化を確認する。アンジオテンシン II 刺激約 1 週間ですでにエコー上心機能に変化が認められることから、遺伝子・蛋白の解析は、心臓リモデリングの早期と考えられる、アンジオテンシン II 刺激後 5 日目と、心臓リモデリングがほぼ完成したと考えられる 14 日目とで解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) INSL6 KO マウスおよび INSL6 TG マウスは、通常状態では、コントロールの野生型マウスと比較して、体重、血圧、心拍数に有意差を認めず、エコーによる心機能および組織学的な心臓形態に有意差を認めなかった。また、INSL6 KO マウスにアデノウイルスを用いて INSL6 を発現させた場合や、野生型マウスにアデノウイルスを用いて一時的に INSL6 を過剰発現させた場合でも、コントロールと比較し、体重、血圧、心拍数、心機能、心臓組織に差を認めなかった。

(2) 野生型マウスにおいて、アンジオテンシン II 刺激後に心臓での INSL6 の発現は軽度亢進し、アンジオテンシン II 刺激による心臓リモデリングに INSL6 が関与している可能性が考えられた。

(3) 10 週齢の雄の INSL6 KO マウスと野生型マウスに 2 週間のアンジオテンシン II 刺激 (2.0mg/kg/day) を行ったところ、INSL6 KO マウスは、野生型マウスと比較して、血圧や心拍数に差を認めないものの、心エコー上有意に心収縮能が低下した。また INSL6 KO マウスでは、アンジオテンシン II 刺激による左室壁肥厚を認めず、これは代償性心肥大反応の欠如や心機能低下を反映していると考えられた。アンジオテンシン II 刺激 2 週間後の心臓・肺重量は、INSL6 KO マウスで有意に増加し、心筋での BNP の発現も INSL6 KO マウスで増加しており、心臓リモデリングと心不全増悪に一致する所見であった。心臓組織では、アンジオテンシン II 刺激後の INSL6 KO マウスにおいて、野生型と比較して著明な心筋線維化と冠動脈周囲の線維化、さらに冠動脈の中膜肥厚を認めた。さらに INSL6 KO マウスで心筋でのコラーゲン発現が有意に亢進していた。INSL6 KO マウスにアデノウイルスを用いて INSL6 遺伝子レスキューを行い、同様にアンジオテンシン II 刺激を行うと、コントロールの INSL6 KO マウスと比較して、エコーでの心収縮能の改善と心筋線維化の減弱を認めた。

(4) 10 週齢の雄の INSL6 TG マウスと野生型マウスに 2 週間のアンジオテンシン II 刺激

を行ったところ、INSL6 TG マウスと野生型マウスで、血圧や心拍数、心エコーでの心収縮力、左室壁肥厚に有意な差を認めなかった。また、心臓・肺重量、心臓組織での心筋線維化や冠動脈の中膜肥厚、心筋の BNP 発現やコラーゲン発現にも差を認めなかった。しかしながら、野生型マウスにアデノウイルスを用いて INSL6 を一時的に過剰発現させたモデルでは、INSL6 過剰発現マウスの方が野生型マウスと比較して、アンジオテンシン II 刺激後の心機能低下が抑制され、心筋線維化も抑制された。

(5) 以上の結果より、マウスモデルにおいて、INSL6 はアンジオテンシン II 刺激による心臓リモデリングに関与し、心筋線維化と心機能低下を抑制する可能性が考えられた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

吉田守美子、Kenneth Walsh. Insulin-like peptide 6 はアンジオテンシン II 刺激による心筋線維化を抑制する。第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー。2016 年 7 月 15 日。久山温泉ホテル夢家 (福岡県・久山町)

吉田守美子、粟飯原賢一、Kenneth Walsh. Insulin-like peptide 6 はアンジオテンシン II 負荷による心筋線維化に関与する。第 38 回日本高血圧学会総会。2015 年 10 月 9 日～10 月 11 日。愛媛県県民文化会館 (愛媛県・松山市)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田 守美子 (YOSHIDA, Sumiko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号：40510904

(4)研究協力

粟飯原 賢一 (AIHARA, Ken-ichi)  
Kenneth Walsh (Kenneth, WALSH)