

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02806

研究課題名（和文）特異的プライシングバリエントを標的とした心不全治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the new therapy for heart failure by the specific splicing variant inhibition

研究代表者

谷山 義明（TANIYAMA, YOSHIAKI）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授（常勤）

研究者番号：60372611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：心筋幹細胞がエクソソームを分泌する際にエクソソーム表明に心臓に保護的に作用するペリオスチンプライシングバリエントが存在し、それを集めて刺激すると心筋細胞増殖効果を認め、急性心筋梗塞モデルにおいて静脈内投与することによって心臓での心筋細胞の増殖効果を認め結果として心機能低下を抑制することを確認した。

また、50%グリセロールを筋注する横紋筋融解腎不全モデルにおいて、特定のペリオスチンバリエントを抑制することによって腎保護効果が作用することを確認した。

さらに、臨床の心筋症のプライシング異常の遺伝子を挿入して作成した心筋症マウスモデルへのペリオスチンの抑制が心保護効果を持つ事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓に存在する心筋幹細胞から分泌されるペリオスチンが心筋細胞増殖効果を持っており心不全も治療できることから治療薬の候補となることを見出した。臨床の心不全症例に心臓にウイルスベクターを用いて遺伝子発現させることで心機能を改善する可能性が考えられた。一方で、腎不全モデルにおいてはペリオスチンを抑制することが急性腎不全の腎機能低下を抑制することを見出した。急性腎不全症例の急性期に抗体を用いてペリオスチンを抑制することによって腎保護効果を期待することができる。また、心筋症マウスへのペリオスチン抑制が心保護効果につながることをしめされたので、抗体などによる治療が将来的に応用される可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：There is a periostin splicing variant that exerts a cardioprotective effect on exosome expression in the heart when myocardial stem cells secrete exosomes. As a result, it was confirmed that the cardiomyocyte proliferation effect was observed, and as a result, the deterioration of cardiac function with AMI was suppressed.

In a rhabdomyolytic renal failure model with intramuscular injection of 50% glycerol, we confirmed that inhibition of a specific periostin variant exerts a reno-protective effect.

Injecting the abnormal splicing gene of clinical cardiomyopathy, we confirmed that inhibition of periostin has a cardio-protective effect on a mouse model of cardiomyopathy.

研究分野：難治性疾患の治療薬の開発

キーワード：ペリオスチン 心不全 腎不全

1. 研究開始当初の背景

究代表者は5種類の心不全モデルを作成し、心肥大期から心不全期にかけて共通して変化する遺伝子を網羅的に解析し、ペリオスチン遺伝子(PN)の特異的スプライシングバリエーション(SV)(PN1)をクローニングした。PN1は心筋梗塞の梗塞巣周辺の筋線維芽細胞で主に分泌されていること、TGF- β やメカニカルストレスによって発現されることを報告した。(Hypertens.2007)、心線維芽細胞への特異的PN1ノックインモデルでは心不全が誘導され、一方、ノックアウトモデルでは食塩感受性ダールラットの心不全が著明に抑制されることを報告している。(Circulation.2004)また、急性心筋梗塞モデルではPNに4つのSV(PN1-4)が出現するが、PN1-4の蛋白質は各々機能が異なっており、PN2抑制では血管新生が抑制されて心不全が悪化し、PN4抑制では過度な線維化抑制が誘導されて心破裂が生じるのに対して、PN1/3のみを抑制すると心筋細胞間の接着が強くなり心筋壊死を抑制することができ、心破裂を伴わずに心不全を治療できることを報告した。(Hypertens.2016)。これは、「特異的SV抑制が新たな心不全標的に成り得る」ことを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①PNのSVが制御されるメカニズムを解析すること、②心臓における肥満細胞を起点としたPNを介した慢性炎症ネットワークを解析すること、③心不全誘導因子である腎不全の慢性・急性モデルでの特異的PNSV抑制による病態改善効果のメカニズムを解析することである。

3. 研究の方法

心筋幹細胞が分泌するエクソソームによって運搬されるペリオスチンの機能解析

我々は心筋幹細胞から分泌されるエクソソームがペリオスチンを含んでおり、かつ外部に付着する形で存在することを電子顕微鏡を用いて確認した。このペリオスチンのスプライシングバリエーションのパターンを解析するとともに、その機能を細胞レベル、成体レベルにおいて解析を行った。

臨床検体心筋細胞のスプライシング異常をミミックした心筋症マウスでのペリオスチンの作用解析

我々は東京医科歯科大学医学部にて集めた拡張型心筋症の遺伝子解析の結果から異常なスプライシングパターンを持つ遺伝子をクローニングし、異常なスプライシングのまま心筋特異的に発現するマウス心筋症モデル作成し、ペリオスチンノックアウトマウスと掛け合わせその後の変化を解析した。

心不全症例の心筋検体を網羅的に解析し、スプライシングパターンを確認した。

埼玉循環器病センター循環器内科および東宝塚さとう病院心臓外科で内科的あるいは外科的に入手して府前進の心筋生検サンプルを用いて様々な遺伝子のスプライシングバリエーションの発生するパターンの情報を解析した。

心腎連関の観点から腎不全でのペリオスチンの関与を腎不全モデルを用いた解析した。

慢性腎不全モデルとしては片側結紮腎不全モデル(UUOモデル)、急性腎不全としては50%グリセロール骨格筋投与による横紋筋融解症誘導腎不全モデルを作成し、ペリオスチンノックアウトマウスを掛け合わせることによって腎保護効果を検討した。

このマウスは6か月以内に心房細動から心室細動が誘導されるためすべての個体が早期に

4. 研究成果

心筋幹細胞が分泌するエクソソームによって運搬されるペリオスチンの機能解析

まず心筋幹細胞から分泌するエクソソームに付着するペリオスチンをウェスタンブロッティング法によって解析したところ、エクソン 17 は含みエクソン 21 を含むスプライシングバリエーションであることが判明した。我々は、以前にエクソン 17 を含むペリオスチンバリエーションが心臓において付着細胞である心筋細胞の足場形成を抑制するため、エクソン 17 を含むペリオスチンバリエーションを抑制することが心不全治療に結び付くことを報告してきたが、心筋幹細胞の分泌するペリオスチンはそれではなく、特定のエクソソームの含有するペリオスチンであることが判明した。次にこのエクソソームとペリオスチンをノックアウトした心筋幹細胞由来のエクソソーム FACS を用いて回収し、それぞれ心筋細胞に刺激したところ心筋細胞の心筋幹細胞由来のエクソソームは、コントロールのエクソソームと比して著明な心筋細胞増殖作用を示した。また、同様に内皮細胞に刺激したところ、血管新生作用を確認した。

次に、同様にこのペリオスチンの含有あるいは非含有するエクソソームを用いて急性心筋梗塞モデルに静脈内投与したところ、心筋幹細胞由来のペリオスチンを含むエクソソームはコントロールのエクソソームと比してマウス虚血心に心筋細胞の増殖、血管新生作用の増加をみとめ結果的に心不全の心機能を著明に改善することを確認した。(論文報告済)

臨床検体心筋細胞のスプライシング異常をミミックした心筋症マウスでのペリオスチンの作用解析

まず、この心筋症マウスをそのまま育てると1年以内に心房細動になり、最終的には心室細動から100%死亡することを確認した。さらに、ペリオスチンノックアウトマウスを掛け合わせることによって心機能低下は抑制されて、マウス予後が著明に改善されていた。この事は、異常なペリオスチンが不整脈にも影響を与えており、心房細動や心室細動を抑制することが明らかとなった。現在、ペリオスチンのどのスプライシングバリエーションに関与しているかを検討している。(論文準備中)

心不全症例の心筋検体を網羅的に解析し、スプライシングパターンを確認した。

心不全検体を用いて、理化学研究所でスプライシングのパターンを解析した。エクソソームの残存するリテンションが多くの変異子で見られるとともに、エクソソームの脱落しない変異子パターンなど特徴的な変化を確認し、現在標的変異子を求めるために解析を進めている。(論文準備中)

心腎連関の観点から腎不全でのペリオスチンの関与を腎不全モデルを用いた解析した。

慢性腎不全モデルの UUO モデルをペリオスチンノックアウトマウスにて行うことによって、腎障害が著明に抑制されることを確認した。また、特定のスプライシングバリエーションを抑制することによって腎不全が抑制されることを確認した。

また、急性腎不全モデルとしての横紋筋融解症誘導の腎不全モデルをペリオスチンノックアウトモデルで施行したところ、慢性腎不全モデルと同様にペリオスチン遺伝子の消去によって腎保護効果が認められること、特定のペリオスチンスプライシングバリエーションを抑制することにより腎保護効果が期待できることを確認した。(一文論文報告済、一部は論文準備中)

上記に示したように、循環器疾患にペリオスチンは大きく関与しており、特定のスプライシングバリエーションを抑制することによる臓器保護効果や、特定のスプライシングバリエーションを増強することによる臓器保護効果があることが明らかとなった。

今後、病態においてどのように介入すべきかを解析し、難治性疾患の治療薬開発を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fujikawa T, Sanada F, Taniyama Y, Shibata K, Katsuragi N, Koibuchi N, Akazawa K, Kanemoto Y, Kuroyanagi H, Shimazu K, Rakugi H, Morishita R	4. 巻 11
2. 論文標題 Periostin exon-21 antibody neutralization of triple-negative breast cancer cell-derived periostin regulates tumor-associated macrophage polarization and angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3(20):5072.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13205072.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Muratsu J, Kamide K, Fujimoto T, Takeya Y, Sugimoto K, Taniyama Y, Morishima A, Sakaguchi K, Matsuzawa Y and Rakugi H	4. 巻 7
2. 論文標題 The combination of high levels of adiponectin and insulin resistance are affected by aging in non-obese old peoples. Frontiers in Endocrinology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne).	6. 最初と最後の頁 12:805244.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.805244.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda-Iwabu Y., Taniyama Y., Katsuragi N., Sanada F., Koibuchi N., Shibata K., Shimazu K., Rakugi H., Morishita R	4. 巻 14
2. 論文標題 Periostin short fragment including exon 17 via aberrant alternative splicing is required for breast cancer growth and metastasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 10(4):892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10040892.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Balbi C., Milano G., Fertig T. E., Lazzarini E., Bolis S., Taniyama Y., Sanada F., Gherghiceanu M., Barile L., Vassalli G.	4. 巻 23;11(12)
2. 論文標題 An exosomal-carried short periostin isoform induces cardiomyocyte proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 5634-5649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/thno.57243.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sanada F., Fujikawa T., Shibata K., Taniyama Y., Rakugi H., Morishita R.	4. 巻 Volume 13 Issue 2
2. 論文標題 Therapeutic Angiogenesis Using HGF Plasmid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 109-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.ra.20-00035.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 5件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Jun Muratsu, Yoshiaki Taniyama, Fumihito Sanada, Nobutaka Koibuchi, Naruto Katsuragi, Kana Shibata, Tatsuya Fujikawa, Ryoko Nakagawa, Atsuyuki Morishima, Katsuhiko Sakaguchi, Hiromi Rakugi and Ryuichi Morishita
2. 発表標題 Inhibition of Periostin Protected from Development of Inflammation in Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury
3. 学会等名 Joint Meeting of the European Society of Hypertension (ESH) and the International Society of Hypertension (ISH) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Muratsu, Fumihito Sanada, Yoshiaki Taniyama, Masaaki Iwabayashi, Kana Shibata, Nobutaka Koibuchi, Naruto Katsuragi, Ryoko Nakagawa, Atsuyuki Morishima, Katsuhiko Sakaguchi, Hiromi Rakugi, Ryuichi Morishita
2. 発表標題 Hepatocyte growth factor (HGF) preclude high-fat diet-induced obesity and improved insulin resistance in mice.
3. 学会等名 ERA-EDTA 2020: The 57th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、柴田佳那、葛城鳴門、鯉淵信孝、中川涼子、楽木宏実、森下竜一
2. 発表標題 Development of target therapy against chemoresistant triple-negative breast cancer
3. 学会等名 第43回日分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Ikeda-Iwabu, Yoshiaki Taniyama, Ryuichi Morishita
2. 発表標題 Periostin short-fragment including C-terminal exon17 via proteolytic cleavage is required for breast cancer metastasis
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kana Shibata, Yuka Ikeda-Iwabu, Ryuichi Morishita, Yoshiaki Taniyama
2. 発表標題 Analysis of the periostin splicing variant function for the triple negative breast
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 化学療法抵抗性のトリプルネガティブ乳癌への新規治療法の開発
3. 学会等名 AMED革新的医療技術創出拠点プロジェクト成果報告会(
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Muratsu, Yoshiaki Taniyama, Fumihiko Sanada, Kana Shibata, Rei Ohtsu, Atsuyuki Morishima, Katsuhiko Sakaguchi, Hiromi Rakugi, Ryuichi Morishita
2. 発表標題 Blockade of Periostin Protected from development of inflammation in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury.
3. 学会等名 ERA-EDTA 2019: The 56th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田佳那、谷山義明、眞田文博、村津淳、藤川龍弥、中川涼子、鯉淵信孝、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 Periostinのスプライシング・バリエントを標的とした画期的乳癌治療学法の開発
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、中川涼子、柴田佳那、鯉淵信孝、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 ペリオスチン選択的スプライシングバリエントによる乳がん治療抵抗性獲得メカニズムの解明
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原聖子、白見莉沙、笠原由紀、大石修史、柴田佳那、清水康広、石田雄之、金香佐和、細道 純、谷山義明、小野卓史
2. 発表標題 ペリオスチンスプライスバリエントの頭蓋骨および歯の形成における役割の解明
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 スプライシングバリエントを標的とした化学療法抵抗性トリプルネガティブ乳癌治療薬の開発
3. 学会等名 JHVS 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田(岩部)裕香、谷山義明、森下竜一
2. 発表標題 アイソフォーム特異的なペリオスチン・エクソン17抗体はSPR分析においてwnt3aとの結合を阻害する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 臨床応用までを本気で想定したゼロからの挑戦 ~ from Bed to Bench and Back ~
3. 学会等名 最先端医療イノベーションセンター・セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田佳那、谷山義明、眞田文博、村津 淳、大津 礼、藤川龍弥、中川涼子、ブルーレー・メイ・加和子、樂木宏実、森下竜一
2. 発表標題 Periostinのスプライシング・バリエーションを標的とした画期的乳癌治療法の開発
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 B75;化学療法抵抗性のトリプルネガティブ乳癌への新規治療法の開発
3. 学会等名 AMED橋渡し事業成果発表会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田文博
2. 発表標題 Specific inhibition of periostin alternative splicing variant ameliorated cardiac fibrosis after myocardial infarction.
3. 学会等名 Cardio Renal Diabetes Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 特異的ペリオスチン・スプライシングバリエント制御による新規トリプルネガティブ乳癌治療薬の開発
3. 学会等名 第3回DSANJ Bio Conference '19 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷山義明
2. 発表標題 ペリオスチンバリエントを標的とした糖尿病性網膜症治療法の開発
3. 学会等名 大阪大学先導的学際研究機構 創薬サイエンス部門、生命医科学融合フロンティア研究部門合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞田文博
2. 発表標題 Specific inhibition of periostin alternative splicing variant ameliorated cardiac fibrosis after myocardial infarction.
3. 学会等名 Cardio Renal Diabetes Conference 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fumihito Sanada, Yoshiaki Taniyama, Ryuichi Morishita	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューロサイエンス社	5. 総ページ数 7
3. 書名 Medical Science Digest	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Laboratory of Cellular and Molecular Cardiology https://www.cardiocentro.org/en/research/cellular-molecular-cardiology 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学 http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 哲也 (ISHIAKAWA TETSUYA) (80408369)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------