

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590813

研究課題名（和文）肥大心の間質線維化病変の可逆性に関する基礎的研究と治療法の開発

研究課題名（英文）Basic study of regression of hypertensive myocardial fibrosis and the development of treatment strategies.

研究代表者 吉田 恭子（今中恭子）（Kyoko Imanaka-Yoshida）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00242967

研究成果の概要：

高血圧心では、心筋細胞肥大とともに間質に線維化が見られ心機能不全の原因となるが、治療開始する際、患者はある程度の罹病期間を経て線維化病変が形成されている。本研究では、マウス高血圧モデルを用い、すでに出来上がった線維化病変が可逆的かどうかを検討した。高血圧による心筋細胞肥大は比較的早期に回復しうるが、一度形成された間質線維化病変の消褪には、何らかの積極的治療を行わなければ長い時間を必要とすることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：循環器内科学・実験病理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓、線維化、高血圧、細胞外基質、テネイシン、心肥大、マウス

1. 研究開始当初の背景

高血圧心では、心筋細胞肥大とともに間質に線維化が見られる。一般に心臓の線維化は拡張能を低下させ心機能不全を来すと考えられ、高血圧心の線維化の治療は循環器病領域におけるもっとも重要な課題の一つとして、精力的に研究が進められている。最近、高血圧心にみられる線維化の本態はangiotensinII-aldosterone系により惹起された血管周囲の炎症であり、特にマクロファージが重要な役割を演じるという考え方

が注目されている。

我々は、これまで、線維化病変はコラーゲンからなる膠原線維がいきなり沈着されて形成されるのではなく、テネイシンC、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなど複数のマトリックス分子の産生沈分解からなる多段階反応であることを明らかにし、特にそのなかで特にその一つテネイシンC分子に注目して線維化の分子メカニズムの研究を行ってきた。テネイシンCは正常成体の心臓には発現しないが、炎症や線維化に伴っ

て発現し、強い生物活性をもつ。一般に線維化促進分子と考えられ、実際、局所投与したテネイシンCは膠原線維形成を促進し、テネイシンC欠損マウスでは高血圧性心臓線維化病変の程度が有意に軽い。その一方 *in vitro* でMMPの発現、活性を上げ理論的には線維化抑制的に働かうという二面性を持ち線維化進行における役割は単純ではない。しかし、線維化病変の進行を制御する重要な分子の一つであることは明らかである。

2. 研究の目的

(1)実際に投薬を開始する際、患者はある程度の罹病期間を経てすでにいろいろな程度の線維化病変が形成されているはずである。本研究では、マウスにangiotensinII負荷して心臓線維化を誘導したのち負荷を中止してその回復過程を解析することにより、すでに出来上がった線維化病変が可逆的か、すなわち薬剤治療が可能かどうかを明らかにする。

(2)線維化病変の進行と消褪は連続的な現象であり、線維化の程度はマトリックスの産生、分解のバランスにより決定される。線維化の治療とはこのバランスを人為的に調整することであり、いいかえれば、線維化進行あるいは自然消褪時の分子メカニズムを解明することに他ならない。そこで、本研究ではテネイシンCを一つの具体的な標的候補と考え、線維化治療における潜在的役割を解析する。

3. 研究の方法

(1)マウスモデル

8週令体重20gのメスBalb/c系マウスの背部皮下にマイクロオスモティックポンプ(alza Co. palo Alto, CA)を埋め込み、angiotensinII (AgII) を500ng/min/kg 4週間持続投与、および飲料水に1%のNaCl負荷した後、AgII投与を中止し、12週後まで経過観察を行った。

全身状態： アンジオテンシンII投与開始後、毎週のモデル動物の体重、尾血管による血圧測定をおこなった。

(2)組織、遺伝子解析

AgII 4週投与、中止後4、12週後にマウスを犠牲剖検し心臓を摘出して、パラフィン標本作製、RNAの抽出を行った。

①心肥大の評価

a. 心筋細胞の大きさ：HE染色標本を組織画

像解析により、心筋細胞横径を測定した。値は、おなじ週令の正常controlま
b. リアルタイムRT-PCRによりBNP発現レベルの解析を行った。

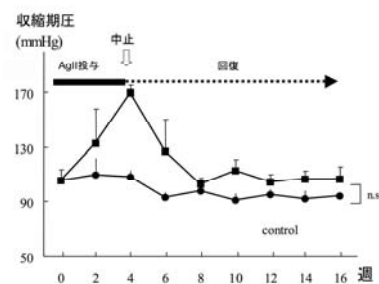
②線維化の評価

a. 線維化率の定量評価：Sirius red 染色した組織切片をNIH Imageを用いて画像解析し、線維化率を定量した。

b. 組織形態学的解析：テネイシンC、ヒアルロン酸の沈着を免疫組織学的に解析した。

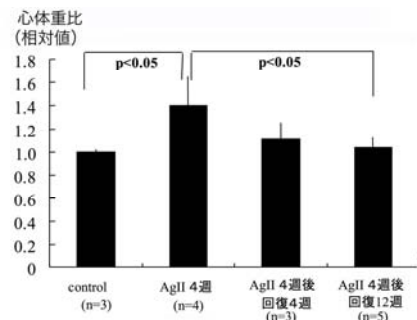
4. 研究成果

(1)血圧は AgII 投与により収縮期血圧170mmHg程度に上昇したが、中止後4週で正常値まで下降した。

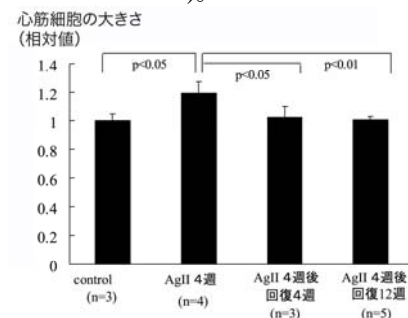


(2)心肥大の改善

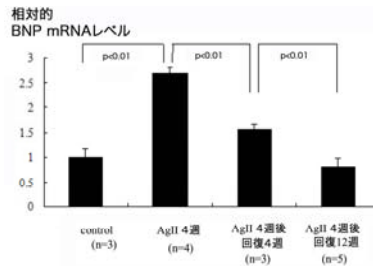
心体重比はAgII4週投与でコントロールに比べ有意に増加したが (1.40 ± 0.24 vs 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$) 投与中止後減少し、中止後12週後にはコントロールと有意差が見られなくなった (1.04 ± 0.08 vs 1 ± 0.05).



心筋細胞の大きさも同様に、AgII4週投与でコントロールに比べ有意に増加したが (1.19 ± 0.24 vs 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$) 投与中止後減少し、中止後12週後にはコントロールと有意差が見られなくなった (1.00 ± 0.02 vs 1 ± 0.01).



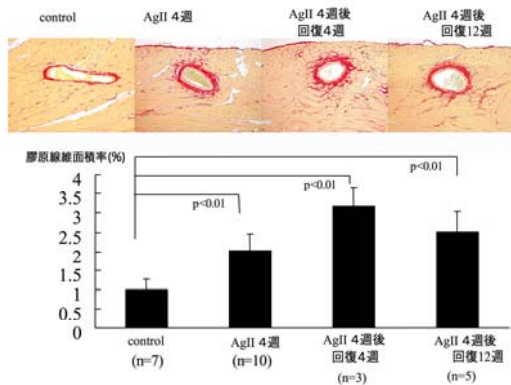
BNPのmRNAレベルはAgII4週投与でコントロールに比べ有意に上昇し、中止後4週後には低下した。



(3) 線維化病変の改善

①線維化病変の量的変化

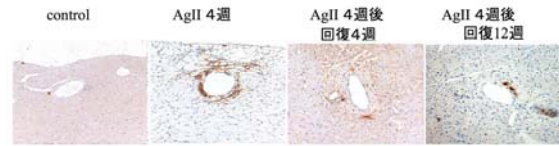
AgII 4週間投与により、心筋内の血管周囲を中心として明らかな線維化病変が形成され、膠原線維面積率はコントロールに比べ有意に増加した(2.03±0.42 vs 1±0.27, p<0.01)。AgII 投与中止後、12週まで明らかな組織形態の改善は認められず、膠原線維面積率は中止後12週後もコントロールより有意に高値を示した。



②線維化病変の質的变化線維化病変初期に沈着すると考えられるヒアルロン酸は AgII 4週間投与により線維化病変が形成される血管周囲に沈着増加がみられた。しかしAgII 投与を中止して血圧が正常化した後も、明らかな減少は求めず、むしろ沈着領域が周囲心筋細胞間に伸展していく像が見られた。



テネイシン C は、コントロールの心臓には発現が見られないが、AgII 4週間投与により血管周囲の病変部位に発現が見られ、AgII 4週間投与中止後4週以内に発現が明らかに減少した。



(テネイシン C の発現)

(4) テネイシン C によるマトリックス分解系の生体内での制御

テネイシン C 心臓特異的テネイシン C 過剰発現マウスを作成し、野生型、さらにノックアウトマウスで心筋組織の MMP 活性を zymography で検討したが有意な差は見られなかった。

(5) 総括

① 高血圧による心筋細胞肥大は比較的早期に回復しうるが、一度形成された間質線維化病変の消褪には、積極的治療を行わなければ長い時間を必要とすることが示唆される。

② 成熟した膠原線維からなる完成した線維化病変の治癒は容易ではないが、高血圧のコントロールにより、たとえばテネイシン C の減少など線維化病変の構成成分は変化する。

③ さらに線維化病変が進行する状態ではテネイシン C の発現が上昇しているが、進行がとまれば減少する。したがってテネイシン C の発現は膠原線維量そのものではなく、現在 active に線維化病変が進行していることを反映し、少なくとも現在以上の進行防止治療のための指標として用いることができる。

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 16 件)

1. Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, and Kitaura Y. High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: Expression of tenascin-C as a possible marker for inflammation. *Human Pathol* (in press), 査読有

2. Kurita T, Onishi K, Dohi K, Takamura T, Fujimoto N, Tanigawa T, Imanaka-Yoshida K, Wada H, Nobori T, Ito M. Conventional therapy with an ACE inhibitor diminishes left ventricular dyssynchrony during the progression of heart failure. *Int J Cardiol* (in press), 査読有

3. Ishii, K., Imanaka-Yoshida K., Yoshida T., Sugimura Y. Stromal tenascin-C regulates epithelial cell differentiation in mouse prostate. *Dev Biol* 324:310-9 (2008), 査読有
4. Odaka K., Uehara T., Arano Y., Adachi S, Tadokoro H., Yoshida K., Hasegawa H, Imanaka-Yoshida K., Yoshida T., Hiroe M., Irie T, Tanada S and Komuro I. 2008. *Noninvasive detection of cardiac repair after acute myocardial infarction in rats by 111 In Fab fragment of monoclonal antibody specific for tenascin-C.* *Int Heart J.* 49: 481-92. (2008), 査読有
5. Suzuki H., Kinoshita N., Imanaka-Yoshida K., Yoshida T., and Taki W., 2008. Cerebrospinal fluid tenascin-C increases preceding the development of chronic shunt-dependent hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 39: 1610-2. , 査読有
6. Kajimoto M., Shimono T., Hirano K, Miyake Y., Kato N, Imanaka-Yoshida K., Shimpo H and Miyamoto K., 2008. Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: a canine model experiment. *J Vasc Surg.* 48: 1306-14.
7. Mitani, Y., Maruyama, J., Jiang, B.H., Sawada, H., Shimpo, H., Imanaka-Yoshida, K., Kaneda, Y., Komada, Y., and Maruyama, K., 2008. Atrial natriuretic peptide gene transfection with a novel envelope vector system ameliorates pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 136: 142-9.
8. 今中恭子、廣江道昭、吉田利通、テネイシンC、*Heart View* 8:124-129、2008、査読無
9. 廣江道昭、今中(吉田) 恭子、吉田利通、テネイシンCの心臓リモデリングにおける有用性、*医学の歩み*、224、408-413、2008、査読無
10. 吉田利通、石垣共基、今中-吉田恭子、組織リモデリングにおけるテネイシンの役割、*生体の科学*、591、123-128、2008、査読無
11. Nishikubo, K., Imanaka-Yoshida, K., Tamaki, S., Hiroe, M., Yoshida, T., Adachi, Y., and Yasutomi, Y., 2007. Th1-type immune responses by Toll-like receptor 4 signaling are required for the development of myocarditis in mice with BCG-induced myocarditis. *J Autoimmun.* 29: 146-53. 査読有
12. El-Karef, A., Kaito, M., Tanaka, H., Ikeda, K., Nishioka, T., Fujita, N., Inada, H., Adachi, Y., Kawada, N., Nakajima, Y., Imanaka-Yoshida, K., and Yoshida, T., 2007. Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 46: 664-73. 査読有
13. Nishioka, T., Suzuki, M., Onishi, K., Takakura, N., Inada, H., Yoshida, T., Hiroe, M., and Imanaka-Yoshida, K., 2007. Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49: 261-8. 査読有
14. Sawada, Y., Onoda, K., Imanaka-Yoshida, K., Maruyama, J., Yamamoto, K., Yoshida, T., and Shimpo, H., 2007. Tenascin-C synthesized in both donor grafts and recipients accelerates artery graft stenosis. *Cardiovasc Res.* 74: 366-76. 査読有
15. Terasaki, F., Okamoto, H., Onishi, K., Sato, A., Shimomura, H., Tsukada, B., Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Yoshida, T., Kitaura, Y., and Kitabatake, A., 2007. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J.* 71: 327-30. 査読有
16. Yamamoto K., Onoda K., Sawada Y., Fujinaga, K, Imanaka-Yoshida K., Yoshida T, and Shimpo H. 2007. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia and medial thickening in a vein

graft model. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 13: 322-30. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Kurita T, Onishi K, Sakuma H, Nakajima I.H, Fujimoto N, Ishida N, Dohi K, Okamoto S, Imanaka-Yoshida K, Ito M. Incremental prognostic values of serum tenascin-C levels to late gadolinium enhancement by cardiac magnetic resonance in patients with dilated cardiomyopathy. 第73回日本循環器学会総会・学術集会2009年3月22日, 大阪

2. Imanaka-Yoshida K, Hara M, Namikata M, Yoshida T, Schwartz RJ, Hiroe M, Miyagawa-Tomita S. Tenascin-C may play a significant role in maturation of coronary arteries in mouse. Weinstein Cardiovascular Development Conference 2008, May, 15-17 Houston, Texas, USA

3. Imanaka-Yoshida K, Nishioka T, Onishi K, Tsutsui H, Yoshida T, Hiroe M. Deletion of Tenascin-C prevents left ventricular remodeling and cardiac failure after myocardial infarction. Basic Cardiovascular Science Conference 2008, July 28-31, 2008, Keystone Colorado, USA

4. Hiroe M, Onishi K, Fujimoto N, Sato A, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Incremental value of tenascin-C and BNP levels for predicting prognosis in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. Basic Cardiovascular Science Conference 2008, July 28-31, 2008, Keystone Colorado, USA

5. Yoshida T, Nagaharu K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition like change through recruitment of $\alpha_5\beta_1$ integrin and phosphorylation of focal adhesion kinase by Src in breast cancer

cells. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting 2008 December 13-17, San Francisco CA, USA

6. Imanaka-Yoshida K, Nishioka T, Nagano Y., Onishi K, Yoshida T. Tenascin-C may accelerate adverse cardiac remodeling and cardiac failure. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, 2008 December 13-17, San Francisco CA, USA

7. Imanaka-Yoshida K, Onishi K, Tsutsui H, Hiroe M. Tenascin-C promotes cardiac remodeling and hypertrophy during myocardial repair. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会 2008 年 3 月 28-30 日, 福岡

8. Terasaki F, Kitaura Y, Onishi K, Sato A, Hiroe M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Serum tenascin-C is a novel surrogate for assessing the severity of heart failure, ventricular remodeling and prognosis of dilated cardiomyopathy. 第 71 回日本循環器学会総会・学術集会 2008 年 3 月 28-30 日, 福岡

9. 飛田理世、長野由佳、西岡朋弘、吉田利通、今中恭子、テネイシン C 過剰発現マウスの作製とそれを用いた組織傷害モデルでの解析 第 96 回日本病理学会総会、2007 年 3 月 13-15 日、大阪

10. 田中裕子、吉田利通、今中-吉田恭子 高血圧性心筋線維化病変は可逆性か？ 第 96 回日本病理学会総会、2007 年 3 月 13-15 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 恭子 (今中恭子)

(IMANAKA-YOSHIDA KYOKO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00242967

(2) 研究分担者

大西 勝也 (ONISHI KATSUYA)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：4034322