

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790537

研究課題名 (和文)

血漿CTGFの高血圧性心肥大バイオマーカーとしての有用性—基礎的検討

研究課題名 (英文)

Basic study of plasma CTGF as a useful biomarker for hypertensive cardiac hypertrophy

研究代表者

篠畑 綾子 (SHINOHATA RYOKO)

岡山大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：70335587

研究成果の概要 (和文)：

本研究では圧負荷モデルラットにおける心肥大の発生と血中結合組織成長因子 (CTGF) 濃度の推移との関連について検討を行った。血中 CTGF 濃度は左室壁肥厚をきたさない術後3日目から2週目にかけて、一部の圧負荷ラットで高値例が認められたが、圧負荷群と対照群 (sham群) で統計学的には有意な差は認められなかった。術後3週目以降に圧負荷ラットにて左室壁厚に有意な増加が認められたが、その血中 CTGF 濃度は2群間で有意な差は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

I studied the association of serum (or plasma) CTGF levels with progression of cardiac hypertrophy in experimentally pressure-overloaded (PO) rats. The CTGF levels were increased in some rats within 2 weeks after operation without left ventricular hypertrophy, but no statistical significant difference was found between the PO and the sham groups. There were significant increases in left ventricular wall thickness of the PO rats after the third week of the operation, but the CTGF levels were similar between the two groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：病態検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：CTGF、心肥大、高血圧、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧性心肥大は日常診療でもよく認められる病態であり、心肥大をきたすことが知ら

れているが、大規模疫学調査において心肥大が心不全をはじめとする心血管病変の独立した危険因子であることが明らかとなり (N

Eng J Med 1990; 322: 1561-1566.

Circulation 2001; 104: 1615-1621)、血圧コントロールによる心肥大の進行抑制をはかることが重要視されている。

一方、結合組織成長因子(CTGF)は心臓リモデリングにおける線維化に機能すること(Cardiovasc Res. 2007; 74: 196-206)、in vitroの実験系でCTGFが心筋細胞の肥大をもたらすこと(BBRC 2008; 370: 274-278)などが報告され、さらに、ラット圧負荷モデルの実験において、CTGFのmRNAが3日目という早期に発現することが我々の実験でも明らかになった(Hypertens Res 2010; 1305-1311)。このことから、高血圧性心肥大の発症メカニズムにおいてCTGFが重要な役割を果たしていると考えられるが、高血圧症の病態変化と血中CTGF濃度変化の関連については明らかにされていない。

また、臨床検査では心不全マーカーとして血漿脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が用いられており、心筋mRNAのCTGF/BNP比高値群で心筋線維化や拡張障害が強いことが報告されているが(Hypertens 2007;49: 1120-1127)、高血圧症での血中BNPとCTGF濃度の関係については解明されていない。

## 2. 研究の目的

高血圧症における心肥大、心不全発症を予知するバイオマーカーとしての血中CTGF測定を見据え、本研究では、その基礎となるラット圧負荷モデルにおける血中CTGF濃度と心臓の形態、機能ならびに血中BNP濃度について、その経時的関係を明らかにすることを目的とした。具体的には以下のテーマを設定した。

- (1) ELISA法によるラット血中CTGF定量法の検討
- (2) ラット圧負荷モデルにおける血中CTGF、BNP濃度と心臓の形態的、機能的変化の

解析

## 3. 研究の方法

### (1) ラット血中CTGF定量法の検討

血中CTGF濃度の定量法は、Bao Jらの報告している(Transplant Proc 2008; 40: 2361-2364)ワンステップ競合的ELISA法を参照し、市販の抗体を用いた測定系を検討した。抗体は既報で用いられたものを含め、ラットCTGFと交差反応する4種類の市販抗CTGF抗体 (H-55, L-20; Santa Cruz Biotechnology. NM100-724, Novus Biologicals. PA1-22376, Thermo Scientific)を用いた。

### (2) ラット圧負荷モデルにおける血中CTGF、BNP濃度と心肥大の経時的解析

雄性SDラット(体重 250-350g)を用い、40 mg/kg 体重のペントバルビタールを腹腔内投与し、麻酔を行った。腹部大動脈を腎動脈分岐部で結紮し、圧負荷心肥大モデルを作製した (pressure overload群, PO群)。また対照として、開腹、腹部大動脈露出のみを行い閉腹したものを作製した (sham群)。各群5例を作製し、0日目(術前)と、術後3、7、14、21、28日目に経時的変化を観察した。観察は、まず(ProSound SSD-4000; ALOKA社)心臓超音波検査にて壁厚、内径および収縮機能などを計測した後、尾静脈より採血を行った。得られた血液は遠心分離し、測定までに保存を要した場合は、検体を-80℃で凍結保存した。計画当初は検体として血漿を使用予定であったが、測定用検体としては血清を使用した。

血中CTGFはrat CTGF用 ELISA kit(Usncn Life Science社)を用いて、BNP濃度はAssay Max Rat BNP-32 ELISA kit (AssayPro社)を用いて、それぞれ測定した。

統計解析は2群間の比較にはt検定を用い、数値は平均値±標準偏差で示した。 $P < 0.05$ を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット血中CTGF定量法

4種の抗体をそれぞれに用いたウェスタンブロット法にてラット血清との反応特異性を検討したところ、いずれの抗体でも単一バンドを確認することができた。しかし、これらの抗体を用いたELISA法による測定を試みたが、0.1-10 ng/mlの目標範囲で十分な定量性を得ることができなかった。そのため、より高感度な市販CTGF測定キットを用いて以下の検討を行った。

##### (2) 心形態・機能の推移

###### ①心肥大の進行

拡張末期心室中隔厚は、0日目ではPO群とsham群に有意な差は認められず、その後も術後14日目に至るまで有意な差は認められなかった(0日目: PO群  $1.4 \pm 0.1$  mm, sham群  $1.4 \pm 0.1$  mm,  $P = 0.89$ ) (図1)。術後21日目以降はPO群においてsham群に比べて有意な壁肥厚が認められた(21日目: PO群  $1.7 \pm 0.1$  mm, sham群  $1.4 \pm 0.1$  mm,  $P < 0.01$ ) (28日目: PO群  $1.9 \pm 0.1$  mm, sham群  $1.5 \pm 0.1$  mm,  $P < 0.01$ )。

拡張末期左室後壁厚についても、心室中隔厚と同様の変化が認められた(図2)。

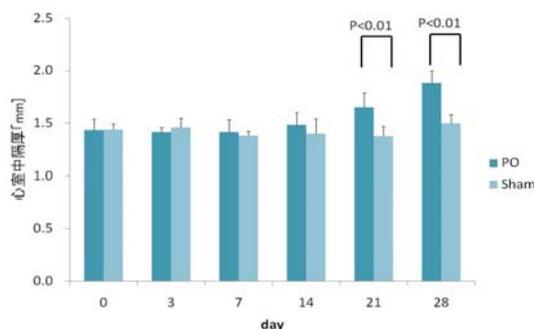


図1. 拡張末期心室中隔厚の推移

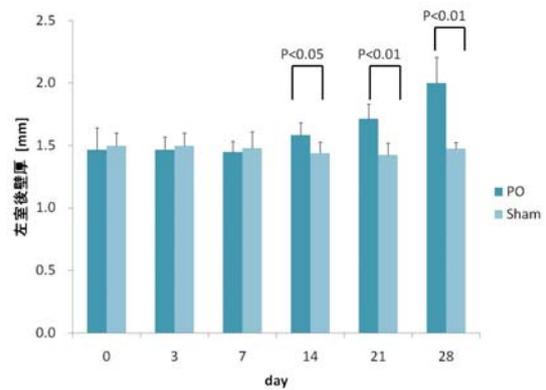


図2. 拡張末期左室後壁厚の推移

###### ②左室内径の変化

左室拡張末期径は、0日目から28日目まで、いずれにおいてもPO群、sham群に有意な差は認められなかった(0日目: PO群  $6.3 \pm 0.4$  mm, sham群  $6.4 \pm 0.2$  mm,  $P = 0.68$ ) (28日目: PO群  $6.5 \pm 1.0$  mm, sham群  $6.9 \pm 0.2$  mm,  $P = 0.35$ )。

左室収縮末期径についても、拡張末期径と同様、0日目から28日目まで、いずれにおいてもPO群とsham群の間に有意な差は認められなかった(0日目: PO群  $2.6 \pm 0.3$  mm, sham群  $2.7 \pm 0.3$  mm,  $P = 0.34$ ) (28日目: PO群  $3.0 \pm 0.6$  mm, sham群  $3.1 \pm 0.4$  mm,  $P = 0.80$ )。

###### ③左室収縮能の推移

左室駆出率は0日目から28日目に至るまで、PO群とsham群間で有意な差を認めず、また全観察期間を通じて、大きな変化は認められず、良好な収縮能を有していた(表1)。

	PO	Sham	$P$
0日目	92.3 ± 1.8	90.9 ± 2.3	NS
3日目	91.6 ± 2.2	90.6 ± 2.3	NS
7日目	88.5 ± 3.5	88.1 ± 1.8	NS
14日目	91.1 ± 3.0	89.1 ± 0.8	NS
21日目	88.7 ± 3.7	88.1 ± 0.1	NS
28日目	89.3 ± 2.6	89.9 ± 3.5	NS

NS, not significant

以上より、腹部大動脈結紮によって術後3週間目以降に明らかな左室肥大をきたすモデルラットが作製できた。また、その心肥大の進行は緩やかであること、駆出率が保たれており心不全に至る前段階のものであることが確認できた。

### (3) 血中CTGF、BNPの推移

#### ①血中CTGF

ラット血中CTGFの推移を図3に示す。0日目ではPO群とsham群に有意な差は認められなかった (PO群  $0.36 \pm 0.36$  ng/ml、sham群  $0.35 \pm 0.39$  ng/ml、 $P=0.97$ )。術後3日目から14日目にかけて、PO群のうち3例において血中CTGFが1 ng/mlを超える高値が見られたが、その増加の程度や時期には個体差が大きく、PO群とsham群の間に有意な差は認められなかった。さらに術後3日目から14日目の間の血中CTGF濃度最高値と、最も心肥大をきたした28日目の心室中隔厚、左室後壁厚との相関についても検討を行ったが、有意な相関は認められなかった (ピアソン相関係数  $r=0.41$ ,  $r=0.10$ )。

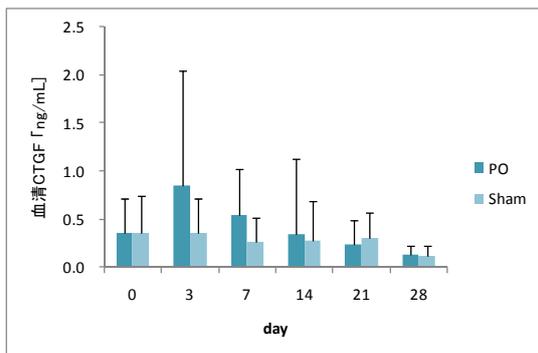


図3. 血中CTGFの推移

#### ②血中BNP

血中BNPは0日目から28日目に至るまで、著明な変動は認められなかった(図4)。また、CTGFとBNPの比 (CTGF/BNP) を求め、PO群、sham群の2群間で比較を行ったが、有意

な差は検出されなかった。

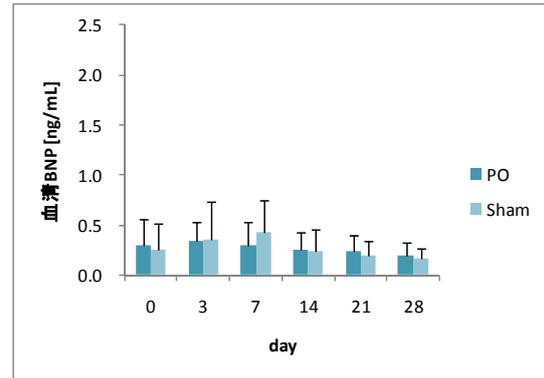


図4. 血中BNPの推移

以上より、圧負荷ラットにおいて血中CTGFは心肥大発生前に増加する可能性が示唆された。また、その増加は既報 (Hypertens Res 2010; 1305-1311) のCTGF mRNAの増加に矛盾しないものであった。しかしながら、その増減には個体差が大きく、高血圧性心肥大の発症バイオマーカーとして単独で用いることは困難であった。今回得られた血中CTGF濃度は非常に低濃度であり、用いた定量法の検出感度の下限付近であった。今後の課題としては、より高感度で再現性のよいCTGF定量法を再検討するとともに、症例数を重ね個体内の動態や背景因子について検討していくことが必要であると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

篠畑 綾子 (SHINOHATA RYOKO)  
 岡山大学・大学院保健学研究科・助教  
 研究者番号：70335587