

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08190

研究課題名(和文) 圧負荷心肥大における心筋線維化発症を予測する分子バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Biomarkers of cardiac fibrosis in pressure overloaded heart.

研究代表者

草刈 洋一郎 (Kusakari, Yoichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80338889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：圧負荷による肥大心筋において、線維化した心筋のみにFGF23が増加していることを発見した。FGF23が心臓線維化のキ因子となるかどうかを確認するため、心臓線維芽細胞をFGF23単独で刺激したが、何ら変化はみられなかった。しかしながら、FGF23とTGF-betaの同時刺激すると、TGF-beta単独刺激より線維化が促進された。このことから、FGF23はTGF-betaなどのサイトカインの作用を増強し線維化発症に関与するものである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that the expression level of FGF23 in cardiac hypertrophy with fibrosis was significantly stronger than that of cardiac hypertrophy without fibrosis. To investigate whether FGF23 was a key factor of cardiac fibrosis, we applied FGF23 on cardiac fibroblast. FGF23 did not show any changes. However, FGF23 tended to promote trans-differentiation of fibroblasts stimulated by TGF-beta. These results indicate that FGF23 is identified as a novel fibrosis-related gene and may enhance the effect of cytokines (ex TGF-beta) in initiation of cardiac fibrosis.

研究分野：心筋生理学

キーワード：線維化 圧負荷

1. 研究開始当初の背景

線維化が起こる心筋と起こらない心筋

我々は肺動脈狭窄手術にて、ラット右室圧負荷心筋モデル(Banding model)を構築し、その特性について調べてきた(Kusakari Y et al. J Physiol Sci. 62:S24. 2012)。

そこで明らかになったのは、

肥大して線維化しない心筋(Hypertrophy)と肥大して線維化する心筋(Fibrosis)がある、ということであった(図1)。

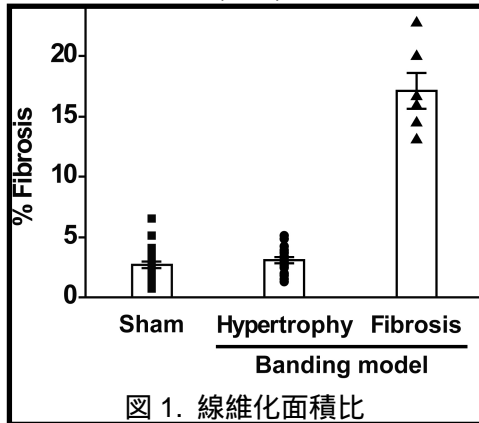


図1. 線維化面積比

このことは心筋肥大後に

線維化を短期間に引き起こす何らかのスイッチが存在していることを予想させる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、肥大心筋における

- A) 線維化発症のONとOFFのスイッチの存在を確認すること、
- ならびに
- B) 線維化発症の予測を可能とするバイオマーカー探索と、それを標的とする新規治療法の開発を目的とした研究計画を立案した。

3. 研究の方法

- 1) モデル動物作成・心機能測定
ラット肺動脈狭窄モデルを作成し、術後、適宜心エコーで機能評価を行い、術後4週で心臓・肺を摘出する。摘出した心臓・肺・肝臓・腎臓の重量測定を行い、心臓については以下の機能・形態解析を行う。
- 2) 定量プロテオミクス解析、DNA マイクロアレイ、生化学的検索
網羅的解析ならびにウェスタンやRT-PCRの生化学的解析を進める。心臓での線維化決定因子の検索・解析、肺を用いてバイオマーカーの検索・解析を行う。
Sham、非線維化群、線維化群の解析を行い、決定因子の割り出しを行う。
- 3) 機能測定
心臓から右室乳頭筋を摘出し、Aequorinを用いて線維化した部分を含んだ状態での細胞内Ca²⁺濃度と収縮機能測定を行う。
a) 細胞内Ca²⁺濃度と収縮張力測定

b) 活動電位持続時間の測定

c) 収縮蛋白系Ca²⁺感受性変化の測定

- 4) 超微細構造測定
電子顕微鏡下にて超微細構造変化について測定する。
a) 電子顕微鏡による筋節長の解析
b) 筋細胞内部(ミトコンドリアなど)の構造変化の解析
c) T管、筋小胞体などの構造変化の解析
- 5) 線維化決定因子解析と治療効果解析
再度網羅的解析を行い、機能形態解析と併せて治療効果を判定する。

6) 培養細胞

培養細胞系の実験を開始する。

心臓の線維化は心筋細胞と非心筋細胞(主に線維芽細胞)との細胞間コミュニケーションが重要だと考えている。平成27年度で得られた結果を裏付けするため、線維化発症メカニズムと治療効果について細胞実験で確認していく。細胞分離の効率に関しては、心筋細胞で主に発現している□-MHC(図8)と線維芽細胞で主に発現しているVimentin(図9)をmRNAで測定し、十分に分離されていることを確認した。この分離培養系を用いて、それぞれの細胞でのFGF23とNCAM1の発現、炎症刺激に対する反応、ならびに抗線維化治療薬投与時の効果について検討していく。線維芽細胞は数日培養して形態変化を追跡し、更に線維化促進へ重要な役割を持つ筋線維芽細胞への分化も併せて追跡する。筋線維芽細胞への分化は免疫組織染色にて特異的に発現するα-SMA発現にて確認する。

4. 研究成果

心筋細胞と線維芽細胞のFGF23発現を確認したところ、FGF23は心筋細胞で有意に発現しており、受容体であるFGFR1の発現は線維芽細胞で多く発現していた。このことは、それぞれの細胞で出し手と受け手が発現していることを示唆する。病態心臓の心臓線維化発症にFGF23が関連しているかどうか確認を行った。拡張型心筋症モデルマウスにおいて、線維化発症とFGF23の発現が関連していることが示唆された。また、2型糖尿病モデルラット(OLETFラット)を用いた、回転ケージによる自発運動群と無運動群の比較においても心臓線維化とFGF23mRNAレベルの相関が認められた。細胞レベルでの確認をするために、ラット心臓線維芽細胞にリコンビナントFGF23を投与したところ、FGF23投与で線維芽細胞は筋線維芽細胞への分化を示さなかった。一方で、TGF-betaとFGF23で72時間刺激したところ、免疫染色においてFGF23単独刺激では何ら変化はみられなかったが、α-SMA陽性細胞はFGF23とTGF-betaの同時刺激で、TGF-beta単独刺激より増加する傾

向があった。このことは、FGF23はTGF-betaの作用を増強することで筋線維芽細胞への誘導を亢進させるとを示唆する。リアルタイムPCRによる遺伝子発現量解析でも、FGF23とTGF-beta同時刺激によるalpha-SMA発現量はTGF-beta単独刺激よりもFGF23とTGF-betaの同時刺激において高値傾向であった。一方で、alpha-SMA以外の線維化関連遺伝子の発現量に変化は認められなかった。FGFR1をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、FGF23による増強作用は減弱した。このことから、FGF23はFGFR1を介して、TGF-betaなどのサイトカインの作用を増強し線維化発症に関与するものであ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 8件)

- 1) Lü P, Jiao Q, Shimura D, Kusakari Y, Liu F, Minamisawa S. Distinct vascular remodeling pattern of adult rats with carotid-jugular shunt. *Ann Vasc Surg*. 2018 Mar 1. pii: S0890-5096(18)30185-7. doi: 10.1016/j.avsg.2017.12.011.
- 2) Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, Fujimoto Y, Akaike T, Inoue T, Minamisawa S. Impairment of excitation-contraction coupling in right ventricular hypertrophied muscle with fibrosis induced by pulmonary artery banding. *PLoS One*. 12(1):e0169564. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0169564.
- 3) Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J, Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S, Yoshimura M. Tissue thrombin is associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 228:821-827. 2017. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.176.
- 4) Fujimoto Y, Urashima T, Kawachi F, Akaike T, Kusakari Y, Ida H, Minamisawa S. Pulmonary hypertension due to left heart disease causes intrapulmonary venous arterialization in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 154(5):1742-1753. 2017. doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.06.053.
- 5) Ohira T, Higashibata A, Seki M, Kurata Y, Kimura Y, Hirano H, Kusakari Y, Minamisawa S, Kudo T, Takahashi S, Ohira Y, Furukawa S. The effects of heat stress on morphological properties and intracellular signaling of denervated and intact soleus muscles in rats. *Physiol Rep*. 5(15). : e13350. 2017. doi: 10.14814/phy2.13350.
- 6) Fujimoto Y, Urashima T, Shimura D, Ito R, Kawachi S, Kajimura I, Akaike T, Kusakari Y, Fujiwara M, Ogawa K, Goda N, Ida H, Minamisawa S. *PLoS One*. ;11(2):e0148666. doi: 10.1371/journal.pone.0148666. 2016.
- 7) Onda A, Kono H, Jiao Q, Akimoto T, Miyamoto T, Sawada Y, Suzuki K, Kusakari Y, Minamisawa S, Fukubayashi T. A new mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. *Muscle Nerve*. 54(4):788-91, 2016. doi: 10.1002/mus.25202.
- 8) Shimura D, Kusakari Y, Sasano T, Nakashima Y, Nakai G, Jiao Q, Jin M, Yokota T, Ishikawa Y, Nakano A, Goda N, Minamisawa S. Heterozygous deletion of Sarcoplipin maintains normal cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Oct 30: 2015. doi: 10.1152/ajpheart.00411.2015.

[学会発表](計 13件)

- 1) 碓井 文雄, 草刈 洋一郎, 南沢 享. 乳頭筋過伸展による線維化関連因子の発現変化とミトコンドリア内部の崩壊. 筋生理の集い. 2017.
- 2) 草刈 洋一郎, 碓井 文雄, 南沢 享. 乳頭筋過伸展による線維化関連因子の発現変化. 第 247 回東京談話会. 2017.
- 3) Usui F, Yamada Y, Kusakari Y, Minamisawa S. Diastolic overstretch of isolated rat papillary muscle reduced force development and increased gene expression of fibrosis-related factors. 第 134 回成医会総会. 2017
- 4) Fujimoto Y, Urashima T, Kawachi F, Akaike T, Kusakari Y, Minamisawa S. Pulmonary hypertension due to left heart disease caused intrapulmonary venous arterialization in rats. 第 94 回日本生理学会学術集会. 2017.
- 5) Usui F, Yamada Y, Kusakari Y, Minamisawa S. Gene expression of fibrosis-related factors in isolated rat papillary muscle with diastolic overstretch. 2017.
- 6) Kuga K, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S. FGF23 promote cardiac fibrosis by activating FGFR1 in presence of TGF-β stimulation. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016).

- 2016.
- 7) 久我 和寛、草刈 洋一郎、南沢 享. FGF23による TGF- β を介した心臓線維化促進効果. 心血管膜輸送研究会 2016 「心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略」 2016.
 - 8) Fujimoto Y, Urashima T, Shimura D, Ito R, Kajimura I, Akaike T, Kusakari Y, Goda N, Ida H, Minamisawa S. Low output leads hepatic fibrosis in right heart failure model rats. 第 93 回日本生理学会学術集会. 2016.
 - 9) Ohira T, Sudoh M, Kusakari Y, Minamisawa S. Effect of heat stimulus on skeletal muscle properties. 第 93 回日本生理学会学術集会. 2016.
 - 10) Yamada Y, Akaoka M, Watanabe M, Kasai Y, Kusakari Y, Minamisawa S. Vitamin B1 pretreatment preserves cardiac function against ischemia-reperfusion injury. 第 93 回日本生理学会学術集会. 2016.
 - 11) 大平 宇志、須藤 正道、草刈 洋一郎、南沢 享. 長期宇宙滞在に伴う宇宙飛行士の骨格筋機能低下に対する予防策として温熱刺激の有効性の検討. 筋生理の集い. 2015.
 - 12) 笠井 裕平、山田 祐輝、赤岡 宗紀、渡邊 政人、草刈 洋一郎、南沢 享. ビタミン B1 の虚血再灌流における心保護メカニズム. 第 132 回成医会総会. 2015.
 - 13) Kasai Y, Yamada Y, Ikegami T, Kudo Y, Kusakari Y, Matsui T, Minamisawa S. Vitamin B1 preserves cardiac function against ischemia-reperfusion injury. Biomedical Sciences and Health Disparities Symposium. Honolulu. Hawaii. USA. 2015.

〔その他〕

アウトリーチ活動

開催日[2017.7.21]

【ひらめき ときめきサイエンス】

働き者の心臓を見て、触って、聴いて、知りつくそう

開催日[2016.7.29]

【ひらめき ときめきサイエンス】

働き者の心臓を見て、触って、聴いて、知りつくそう

開催日[2015.7.31]

【ひらめき ときめきサイエンス】

働き者の心臓を見て、触って、聴いて、知りつくそう

ホームページ等

東京慈恵会医科大学・細胞生理学講座

ホームページアドレス。

http://sminamis.m38.coreserver.jp/Jikei_Cell_Physiology/Welcome.html

6. 研究組織

- (1)研究代表者 草刈 洋一郎

(KUSAKARI, Yoichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80338889

- (2)研究分担者 南沢 享

(MINAMISAWA, Susumu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：40257332

研究分担者 岩本 武夫

(IWAMOTO, Takeo)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：90568891

- (3)連携研究者

()

研究者番号：

- (4)研究協力者 久我 和寛

(KUGA, Kazuhiro)

山田 祐輝

(YAMADA, Yuki)

碓井 文雄

(USUI, Fumio)