

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09135

研究課題名(和文) 心不全状態での肝臓機能の破綻が心臓リモデリングへ与える影響

研究課題名(英文) Selenoprotein P, a liver-derived secretory protein, regulates pressure overload-induced cardiac remodeling

研究代表者

薄井 莊一郎 (Usui, Soichiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50507043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓から分泌されるヘパトカインであるセレノプロテインP (SeP)は、高血糖とインスリン抵抗性の病態形成に關与する。臨床的にインスリン抵抗性は、新規心不全発症の独立した危険因子だが、SePの心不全形成における役割は明らかでない。本研究では、心不全形成にかかわるSePの効果を検討するため、SePノックアウトマウス(KO)に横行大動脈縮窄モデルを作成した。SePKOは、WTと比較し、心不全死が有意に改善した。また、大動脈縮窄2週間後の左室重量、肺重量ならびに線維化の指標は、SePKOで有意に小さかった。これらの検討から、内因性のSePの欠損は圧負荷により誘導される心不全を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Selenoprotein P (SeP) is a liver-derived secretory protein that impairs insulin signal transduction and induces insulin resistance and hyperglycemia. Although clinical studies suggest the insulin resistance is an independent risk factor of heart failure, the role of SeP in pathogenesis of chronic heart failure is not well understood. We investigated the role of SeP in the regulation of cardiac remodeling in response to pressure overload. Transverse aortic constriction (TAC) was subjected to SeP knockout (KO) and wild-type (WT) mice for 2 weeks. The mortality rate following TAC was significantly decreased in SeP KO mice compared to WT mice. LV weight/body weight (BW) and Lung weight/BW were significantly smaller in SeP KO mice than in WT mice. Furthermore, mRNA expression of collagen 1 α 1 significantly less in SeP KO compared to WT. These results suggest that the absence of endogenous SeP attenuated cardiac hypertrophy, dysfunction and fibrosis in response to pressure overload in mice

研究分野：循環器内科

キーワード：心臓リモデリング 心不全 心肝連関 ヘパトカイン

研究成果の概要

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患、高血圧性心機能障害、糖尿病性心筋障害、さらには弁膜症や心筋症など種々の心疾患の終末像である心不全は、我が国において約 200 万人が罹患している。進行した肺がんや胃がんの累積死亡率はそれぞれ 5 年で 70%、50% であるが、心不全の死亡率は、自覚症状が比較的軽度である NYHA I/II の患者であっても累積死亡率は 4 年で 40% にのぼるとの報告がある。このため、背景となる心疾患の発症を低下させると同時に、心不全の発症および増悪をコントロールすることが求められている。

心筋細胞の肥大・アポトーシスといった心臓リモデリングが不全心臓形成のメカニズムに重要な役割を持つことが示唆されている。高血圧や動脈硬化による血管病により増大する心負荷に対して、心臓は肥大することによって適応するが、持続的な負荷の増加は、行き過ぎた肥大をもたらし、心筋細胞アポトーシス、線維化、炎症の持続を誘導し、心臓リモデリングを加速させ慢性心不全という予後不良な病態を作り出す。申請者は、心筋梗塞後リモデリングのメカニズムに炎症性サイトカイン産生と心筋アポトーシスが重要であること (Circulation Research 2007) や、タンパク質品質管理を担うユビキチン連結酵素 MAFbx が炎症性サイトカインなどを介して不全心臓形成に関与すること (Circulation Research 2011, Circulation: Heart Failure 2014) を報告してきた。こうした心臓のリモデリングの機構は、血液による酸素供給、骨髄からの細胞動員、腎臓による体液調整など多臓器からの液性および神経性の影響を受けており、炎症性サイトカイン、タンパク質品質管理機構も多臓器から種々の影響を受けていることが示唆されている。

肝臓は糖や脂質代謝を通して心臓に影響を及ぼすことが考えられるが、それに加えて、最近、我々が見いだした新しい肝臓の作用が心不全における心臓リモデリングに影響を及ぼしている可能性がある。我々は包括的発現遺伝子解析から、内臓脂肪からアディポカインが産生されると同様に、肝臓からヘパトカインであるセレノプロテイン (SeP) が産生され (内臓脂肪からのアディポカインに対して我々はヘパトカインと命名) 肝臓と骨格筋のインスリン作用を障害し、糖尿病を悪化させることを世界ではじめて示した (Cell Metabolism 2010)。さらに、SeP は血管新生阻害効果を有すること、運動抵抗性を誘導することが示されている。こうした結果から SeP は全身に多彩な効果をもたらす、2 型糖尿病や生活習慣病の新たな治療標的のひとつと考えられるようになってきている。とりわけ、SeP が有するインスリン抵抗性の亢進は心不全発症リスクを上昇させることが知られており、また、心不全患者ではインスリ

ン抵抗性が惹起されていることが示されている。

我々は先の研究で、心筋梗塞に陥った心臓から放出される因子が肝臓に働き、肝臓から VEGF や TGF が放出され心筋に作用するという結果を示し、心臓と肝臓を結ぶ関連 (心肝連関) のモデルを提唱している (図 1: Circulation: Cardiovascular Genetics 2010)。こうした我々の独創的な研究から、我々が示してきた心不全状態における炎症性サイトカイン、およびタンパク質品質管理機構の障害に基づく心臓リモデリング機構の破綻に、心肝連関、とりわけインスリン抵抗性を惹起する SeP の作用があるか否かを明らかにする必要があると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス心不全モデルを用い、心不全状態における心臓と肝臓との関係 (心肝連関) を明らかにする。さらにヘパトカインが心肝連関を担う実体であると考え、SeP ノックアウトマウスを、肝インスリン抵抗性破綻モデルとし、インスリン抵抗性を基盤にした外部環境の恒常性の破綻が、心臓の内部環境に変化をもたらす、炎症性サイトカインやタンパク質品質管理機構を介して不全心臓発症に関与するか、心不全治療の新たな介入点になりうるかを探求する。

3. 研究の方法

ヘパトカインに着目し、圧負荷による心不全モデルにおいて臓器連関 (心肝連関) が存在し、インスリン抵抗性の破綻が心不全病態形成に連関するメカニズムを検証するため、以下の検討を行う。

A: 圧負荷による心不全状態が、肝臓遺伝子プロファイリング与える影響の解析 (心肝連関の検証)

・圧負荷心不全モデル

マウスを麻酔後、現有する人工呼吸器管理下に開胸し、実体顕微鏡下に横行胸部大動脈を結紮し圧負荷モデルを作成する。大動脈に圧較差が作成されていることを小動物用超音波検査器にて確認する。

・発現遺伝子プロファイル解析

圧負荷心不全モデルの肝臓組織から RNA を抽出して、DNA チップ (オリゴヌクレオシド・マイクロアレイ; Affymetry 社) を用いて包括的に発現遺伝子を解析する。定量化された結果を解析ソフト BRB array tool・MetaCore を用いて階層的クラスタリング解析、パスウェイ解析をおこなう。

B: 心不全状態におけるインスリン抵抗性の破綻が、心臓リモデリングに与えるインパクトの解明

・ヘパトカイン SeP の定量的解析

圧負荷心不全モデルの肝臓より RNA を抽出して、Real-time 定量的 RT-PCR 法 (Applied Biosystems 社) を用いて SeP の遺伝子発現レベルを検討する。

・SeP 遺伝子欠損マウス

SeP 遺伝子欠損マウスとその同腹のワイルド

タイプマウス(12-16週齢) セレノプロテインPのExon2にNeomycineカセットを挿入し作成したノックアウトマウスは米国ヴァンダービルト大学 Burk 教授より入手。

・心機能評価

モデル作成後2週後に心臓、肺、肝臓を摘出し重量を測定する。体重および脛骨長で補正し、心肥大および臓器うっ血を評価する。

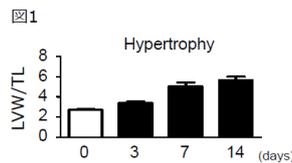
・心臓リモデリングの評価

心臓より RNA を抽出して Real-time 定量的 RT-PCR 法 (Applied Biosystems 社) を用いて心臓リモデリングのマーカーである胎児遺伝子や線維化マーカーの発現を評価する。

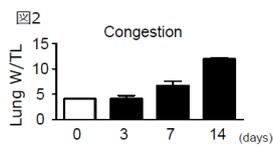
4. 研究成果

A: 圧負荷による心不全状態が、肝臓遺伝子プロファイリング与える影響の解析 (心肝連関の検証)

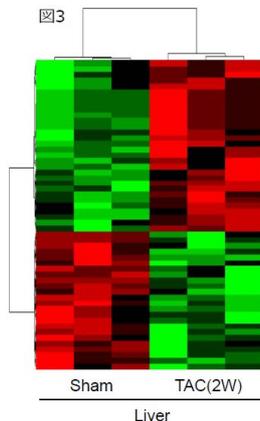
野生型マウスを麻酔後、人工呼吸器管理下に開胸し、実体顕微鏡下に横行胸部大動脈を結紮し圧負荷モデルを作成した。大動脈に圧較差が作成されていることを小動物用超音波検査器 (VEVO®2100-70MHz) にて確認した。大動脈結紮 14 日後で結紮前後の圧較差は平均 40-50mmHg あることを確認した。野生型マウスに、大動脈結紮圧負荷モデルを作成し、時間経過を観察した。手術後 3 日、7 日、14 日観察後、心臓、肺臓を摘出し臓器重量を測定した。心筋の肥大を反映する、心重量は、偽手術群と比較して、大動脈結紮 7 日後に有為に増加し、14 日後も更なる増加が確認されたが、7 日目との有意差はなかった (図 1)。



うっ血を反映する、肺重量は、偽手術群と比較して、大動脈 7 日後に有意に増加し、14 日後はさらに増加が認められた。7 日目と比較して 14 日後の肺重量は有意に増大していた (図 2)。これらの検討から、大動脈結紮 7 日後では、圧負荷により心筋肥大が形成され、14 日後では、肥大による適応が破たんし、圧過負荷により心不全が形成されていると考えられた。



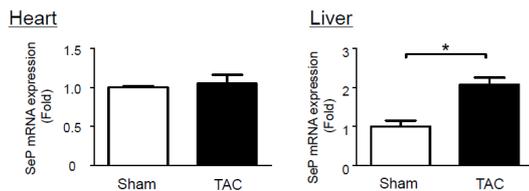
心不全状態が形成された、14 日後の肝臓より mRNA を抽出し、偽手術群 (n=3) と大動脈結紮群 (n=3) で cDNA マイクロアレイを行った。25467 の遺伝子を検討し、圧負荷の有無を P=0.001 で識別できる遺伝子を 54 同定した (図 3)。



B: 心不全状態におけるインスリン抵抗性の破綻が、心臓リモデリングに与えるインパクトの解明

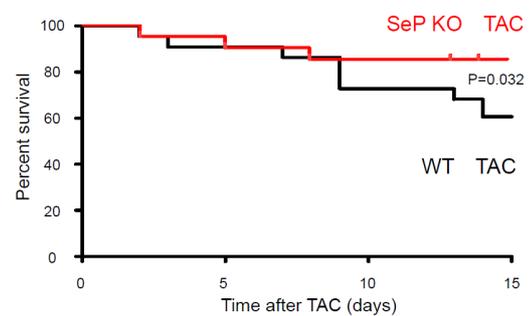
心不全状態が形成された、14 日後の心臓、肝臓より mRNA を抽出し、偽手術群と大動脈結紮群で RT-PCR 法にて SeP mRNA 発現を検討した。心臓での SeP の発現は、定常状態でその発現は同定できるが、圧負荷による発現変化は確認できなかった。一方、肝臓での SeP 発現は、心臓での圧負荷 (心不全) により上昇することを確認した (図 4)。

図4

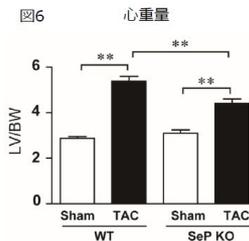


そこで内因性の SeP が心不全病態形成における役割を検討するために、SeP 遺伝子欠損 (SePKO) マウスを用いた。SePKO マウスとその同腹の野生 (WT) マウスに大動脈縮窄による圧負荷誘導性心不全モデルを作成した。術後 14 日目までの検討で、WT マウスと比較して SePKO マウスでは生存が有意に改善した (図 5)。

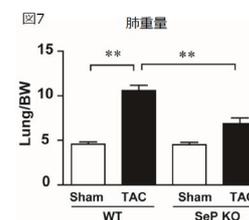
図5



術後 14 日目の検討で、心臓、肺臓、肝臓を摘出し臓器重量を確認した。心肥大を反映する心重量は、偽手術群と比較して、大動脈縮窄により、SeP 遺伝子欠損マウスおよび野生マウスのいずれにおいても有意に増大していたが、大動脈縮窄による心重量は、SeP 遺伝子欠損マウスにおいて野生マウスと比較すると有意に抑制されていた (図 6)。



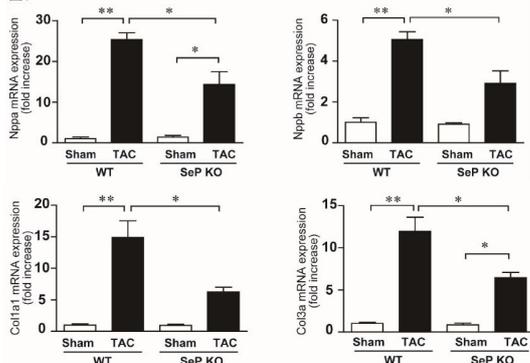
さらに、左心不全によるうっ血を反映する肺重量は、偽手術群と比較して、大動脈縮窄により、SeP 遺伝子欠損マウスおよび野生マウスのいずれにおいても有意に増大していたが、大動脈縮窄による肺重量は、SeP 遺伝子欠損マウスにおいて野生



マウスと比較すると有意に抑制されていた (図7)。

心臓リモデリングの進展にともなって、心臓での胎児遺伝子や線維化マーカーの発現が亢進することが知られているが、これらの遺伝子発現に関しても、大動脈縮窄により誘導される遺伝子発現は SeP 遺伝子欠損マウスにおいて野生マウスと比較すると有意に抑制されていた (図8)。

図8



これらの結果から、SeP 遺伝子欠損マウスでは、圧負荷により誘導される心不全形成、心臓リモデリングが抑制されていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 7件) すべて査読あり

- Nasti A, Sakai Y, Seki A, Buffa GB, Komura T, Mochida H, Yamato M, Yoshida K, Ho TTB, Takamura M, Usui S, Wada T, Honda M, Kaneko S. The CD45+ fraction in murine adipose tissue derived stromal cells harbors immune-inhibitory inflammatory cells. **Eur J Immunol.** 2017 Dec;47 (12): 2163-2174.
- Ohkura SI, Usui S, Takashima SI, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Inagaki Y, Sugimoto N, Kitano T, Takamura M, Wada T, Kaneko S, Takuwa Y. Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. **PLoS One.** 2017 Aug 3;12(8):e0182329.
- Takatori O, Usui S, Okajima M, Kaneko S, Ootsuji H, Takashima SI, Kobayashi D, Murai H, Furusho H, Takamura M. Sodium 4-Phenylbutyrate Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Reducing the Unfolded Protein Response. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** 2017 May;22(3):283-292.
- Pongkan W, Takatori O, Ni Y, Xu L, Nagata N, Chattipakorn SC, Usui S, Kaneko S, Takamura M, Sugiura M, Chattipakorn N, Ota T. β -Cryptoxanthin exerts greater

cardioprotective effects on cardiac ischemia-reperfusion injury than astaxanthin by attenuating mitochondrial dysfunction in mice.

Mol Nutr Food Res. 2017 May 20. doi: 10.1002/mnfr.201601077.

- Takamura M, Kurokawa K, Ootsuji H, Inoue O, Okada H, Nomura A, Kaneko S, Usui S. Long-Term Administration of Eicosapentaenoic Acid Improves Post-Myocardial Infarction Cardiac Remodeling in Mice by Regulating Macrophage Polarization. **J Am Heart Assoc.** 2017 Feb 21;6(2). pii: e004560. doi: 10.1161/JAHA.116.004560.
 - Takamura M, Usui S, Inoue O, Ootsuji H, Takashima SI, Nomura A, Kato T, Murai H, Furusho H, Sakai Y, Kaneko S. Adipose-derived regenerative cells exert beneficial effects on systemic responses following myocardial ischemia/reperfusion. **Cardiol J.** 2016;23(6):685-693.
 - Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. Altered gene expression in T-cell receptor signalling in peripheral blood leucocytes in acute coronary syndrome predicts secondary coronary events. **Open Heart.** 2016 Jun 30;3(1):e000400.
- [学会発表](計 5件)
- Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. Low Expression of a Mesenchymal Stem Cell Marker CD271 in Peripheral Blood in Acute Coronary Syndrome Predicts Repetitive Coronary Interventions at de novo Lesions AHA 2017 (国際学会) 11.13.2017
 - S. Usui, M. Takamura, H. Misu, H. Murai, H. Furusho, S. Takashima, T. Takamura, I. Oto, S. Kaneko. Endogenous selenoprotein P mediates pressure overload-induced cardiac hypertrophy ESC2017 (国際学会) 8.27.2017
 - O. Inoue, S. Usui, S. Takashima, T. Kato, H. Murai, H. Furusho, H. Takamura, S. Kaneko, M. Takamura,

Human Adipose Tissue Inflammation
Decreases CD271-Positive Adipose Derived
Stem Cells and Deteriorates Therapeutic
Angiogenesis of Cell Transplantation for
Critical Limb Ischemia
AHA 2016 (国際学会)
11.13.2016

4. O. Inoue, **S. Usui**, S. Takashima, T. Kato, H. Murai, H. Furusho, H. Takemura, S. Kaneko, M. Takamura,
Systemic insulin resistance and adipose tissue inflammation predict decreased therapeutic mesenchymal stem cells for autologous transplantation in patients with cardiovascular disease
ESC2016 (国際学会)
8.28.2016
5. A. Chikata, **S. Usui**, S. Takashima, T. Kato, H. Murai, S. Kaneko, J. Sadoshima, M. Takamura
Endogenous MAFbx Mediates Cardiac Rupture After Myocardial Infarction in Mice
AHA 2015 (国際学会)
11.8.2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

薄井 莊一郎 (USUI, Soichiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50507043