

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19377

研究課題名(和文)心線維芽細胞由来CNPの心筋リモデリングにおける役割とその治療的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of cardiac fibroblast-derived CNP in myocardial remodeling and its therapeutic significance

研究代表者

南 丈也(minami, takeya)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00647208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、心臓筋線維芽細胞由来CNPの心筋リモデリングにおける役割とそこに関わる分子機序を、CNP及びGC-Bの心臓構成細胞特異的ノックアウトマウスなどの遺伝子改変動物を駆使して明らかにし、その心肥大及び心不全発症予防における意義を示すことを目的とした。筋線維芽細胞特異的CNPノックアウトマウスでは圧負荷による心肥大がコントロールのマウスと比べて増悪した。筋線維芽細胞由来CNPが病的な心筋リモデリングに保護的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the role of C type natriuretic peptide(CNP) secreted from cardiac myofibroblast on cardiac remodeling and the molecular mechanism involved in it by using cardiac constituent cell specific CNP or GC-B knockout mice, and is to clarify the significance of CNP on prevention of cardiac hypertrophy and heart failure. In this study, cardiac hypertrophy due to pressure overload exacerbated in myofibroblast-specific CNP knockout mice compared with control mice. These data suggested that the myofibroblast-derived CNP plays a protective role in pathological myocardial remodeling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：分子心臓病学

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界的な心血管病の有病率の増加に伴い、さまざまな心血管病の最終病態でありいまだ予後不良の症候群である慢性心不全の増加が問題となっており、その病態解明に基づく新規治療標的の同定と新規予防・治療法の開発が切に望まれる。慢性心不全に至る過程では、心筋に対する圧負荷や虚血による組織障害をベースにした心筋リモデリングがおこる。心筋リモデリングの過程では心筋細胞の肥大や機能不全に加え、心臓線維芽細胞の増殖や炎症細胞の浸潤とそれに伴う線維化、更には血管新生など、複数の構成細胞間における相互作用が重要な役割を果たす。特に近年、この過程における心筋細胞と心臓線維芽細胞とのクロストークに注目がされているが、まだその詳細は不明な点が多い。申請者らのグループは以前より心筋リモデリングにおける心筋細胞と心臓線維芽細胞とのクロストークに注目し研究を行っており、エンドセリン-1 やカルディオトロフィン-1 などの液性因子や細胞外マトリックス分子が線維芽細胞から分泌され、心筋細胞の肥大やANP、BNP 産生亢進に関与することを示してきた(Harada, et al. *Circulation* 96(10), 3737-3744,1997; Kuwahara, et al. *Circulation* 100(10), 1116-1124,1999; Ogawa, et al. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32(5), 765-776,2000.)。また心筋より分泌されたANP、BNPが心臓線維芽細胞の増殖抑制や心筋細胞肥大抑制に働いたり、虚血時の炎症細胞浸潤に影響を及ぼすことも明らかにし、心筋リモデリング過程におけるANP、BNP の局所因子としての重要性を明らかにしてきた(Harada, et al. *Circulation* 96(10), 3737-3744,1997;Kinosita, et al. *Circ Res.* 106(12):1849-1860,2010; Izumi, et al. *J. Clin. Invest.* 108(2), 203-213,2001.)。一方、ナトリウム利尿ペプチドファミリーはANP、BNP に加えC 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)より構成されるが、CNP は薬理学的実験では線維芽細胞増殖抑制作用などが知られているが、CNP の全身におけるノックアウトは顕著な低身長を示し、またその多くが成獣までに死亡することから、CNP の病的な心筋リモデリングにおける役割を検討することは困難であり、心筋リモデリングにおけるin vivo での生理的意義は不明であった。この問題を克服するために、最近申請者らはCNP およびその特異的受容体であるguanylyl cyclase-B(GC-B)のflox マウスの作成に成功した。そこでCNP の心臓における役割を見るために、心筋細胞および心臓線維芽細胞におけるCNP およびGC-B の遺伝子発現を検討したところ、GC-B は両者に発現するが、CNP は心臓線維芽細胞に高発現しており、心筋細胞での発現は低いことが明らかとなった。興味深いことにCNP の心臓線維芽細胞にお

ける遺伝子発現量は、CNP の主要な分泌組織の一つである小脳における発現と同程度であり、十分機能しうる量であることが想定された。このことはANP、BNP が心筋細胞から分泌されるのに対し、CNP は心臓線維芽細胞から分泌され、局所因子として心筋リモデリングに重要な役割を果たす可能性を示唆する。実際、線維芽細胞増殖抑制作用はANP、BNP よりもCNP のほうが強力であるとする報告もある。

## 2. 研究の目的

本研究では心臓線維芽細胞特異的CNP ノックアウトマウス、心筋特異的GC-B ノックアウトマウス、心臓線維芽細胞特異的GC-B ノックアウトマウス、CNP 過剰発現マウス、CNP ノックアウトラットなどの遺伝子改変動物を用いて、病的な心筋リモデリングにおける心臓線維芽細胞由来CNP の意義を明らかとし、その作用部位、作用機序の同定を試み、最終的には心不全予防・治療薬としてのCNP の可能性に迫ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、独自に開発したCNP およびその特異的受容体であるGC-B の細胞特異的ノックアウトマウス、CNP 過剰発現マウス、CNP ノックアウトラットなどの遺伝子改変動物を用いて、これらモデルマウス・ラットにおける心臓発症時の表現型を分子生物学的、生化学的、生理学的解析アプローチにより多面的に解析し、加えて培養細胞での解析も並行して行うことにより、CNP の心臓線維芽細胞由来局所因子としての作用の解明と、その分子機序解明、治療標的としての有効性の検討を行う。

## 4. 研究成果

我々は、心臓に於いて、心臓線維芽細胞にCNP が豊富に発現していることを見出し、この発現レベルは従来こう発現する組織として知られる小脳に匹敵するレベルであり、心臓機能維持における心臓線維芽細胞由来CNPの局所因子としての役割に興味を持たれた。しかし、CNPノックアウトマウスは著しい短軀を示し70% 以上が成獣になる前に死亡するため、心臓線維芽細胞に発現するperiostin-cre (Postn-cre) マウスとCNP-flox/floxマウスとを交配し、心臓線維芽細胞特異的CNPノックアウトマウス(CNP cmfKO)の作製した。このマウスは、全身ノックアウトと異なり、通常通り発育し、特に成長過程に於いて死亡することは無く成獣になった。

このマウスを用いて大動脈縮窄による圧負荷モデル(TACモデル)を作製し、病的な心筋リモデリングにおける心臓線維芽細胞由来CNPの意義を解析したところ、CNP cmfKOは対象マウ

スと比べて圧負荷による心肥大、心筋リモデリングが増悪することを見出した(図1)。このことにより、心線維芽細胞由来のCNPが心室への圧負荷に対して保護的に作用している可能性が示唆された。

次に、CNPが作用する標的細胞について検討するために、まずCNPの受容体であるGC-B-flox/floxマウスとalpha-MHC-creマウスを交配させた心筋特異的GC-Bノックアウトマウス(GC-B cmKO)を作製し、これを用いてTACモデルを作製し、心肥大・心筋リモデリングに対するCNPの心筋細胞への直接作用の有無について検討した。

まず、GC-B cmKOマウスについては、全身ノックアウトと異なり、通常通り発育し、特に成長過程に於いて死亡することは無く成獣になった。このマウスを用いてTACモデルを作製し、コントロールのsham手術群と比較したところ、GC-B cmKOのTACで心肥大・病的

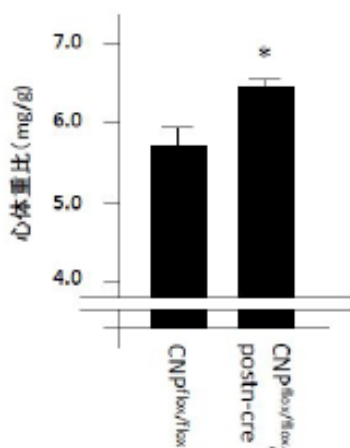


図1、心線維芽細胞特異的CNPノックアウトマウスでは大動脈縮窄による圧負荷心肥大が亢進する

の有意な増悪は認めなかった。これらの結果から、心筋線維芽細胞由来CNPが圧負荷による心肥大・病的心筋リモデリングに対して保護効果を示していること、しかしながら、その効果は心筋細胞へのCNPの直接的な作用ではないこと、が考えられた。

更に、CNPが心筋線維芽細胞自身にオートクライン、パラクライン的に作用する可能性を考え、periostin-creマウスとGC-B-flox/floxマウスとの掛け合わせによる筋線維芽細胞特異的GCBノックアウトマウス(GC-B cmfKO)を作製し、其れについて、TACモデルを作製し、心肥大・病的心筋リモデリングへの影響について検討を開始しており今後も引き続き解析を進める予定である。また、加えて、CNP過剰発現マウスは骨伸長が著しく解析困難であるが、CNPの発現の程度の弱い骨伸長の程度の弱いマウスを用いてTACモデルの作製を行い、CNPの過剰発現による心肥大・病的心筋

リモデリングへの影響についても検討中である。

また、我々はZinc finger nuclease systemを用いて、CNP遺伝子を欠失するラットの作製に成功した。興味深いことに、CNPノックアウトラットはCNPノックアウトマウスと同様に短躯であったが、胎生期や生後早期の死亡は認められず、そのすべてが今のところ成獣まで生存している。このようなCNPのノックアウトラットを用いて、マウス同様に圧負荷モデル、心筋梗塞モデルをin vivoで作製し、その表現系をコンディショナルノックアウトマウス同様に解析することにより、CNPの全身における欠失時と心臓構成細胞特異的欠失時との共通点や差異を検討し、心臓線維芽細胞由来CNPの心筋リモデリングに対する作用とその分子機序をラットとマウスの両方で検証することにより、より明確化することを試みている。また併行して、このCNP KOラットの心臓から初代培養により得られた線維芽細胞と心筋細胞をもちいて、CNPを介した細胞間クロストークの病的心筋リモデリングに関わるシグナルについてのin vitroでの詳細な検討も予定している。

#### 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3件)

1) Nakao K, Kuwahara K, Nishikimi T, Nakagawa Y, Kinoshita H, Minami T, Kuwabara Y, Yamada C, Tokudome T, Nagai-Okatani C, Minamino N, Nakao YM, Yasuno S, Ueshima K, Sone M, Kimura T, Kangawa K, Nakao K.

Endothelium-derived C-type natriuretic peptide contributes to regulation by maintaining endothelial integrity. Hypertension 2017;69:289-296

2) Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Honjo H, Kamiya K, Nakao K, and Kimura T.

The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischemic cardiomyopathy. Cardiovasc. Res.2016;109:162-173

3) Nishikimi T, Nakagawa Y, Ikeda M, Tabei K, Fujishima A, Takayama K, Akimoto K, Yamada C, Nakao K, Minami T, Kuwabara Y, Kinoshita H, Tsutamoto T, Ishimitsu T, Kangawa K, Kuwahara K, Nakao K.

Pro-B-type natriuretic peptide is cleaved intracellularly: impact of distance between O-glycosylation and cleavage sites. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;309:R639-649.

[学会発表] (計5件)

1) 第 79 回日本循環器学会学術集会  
2015.4.24-4.26 大阪

Stenosis distal to chronic total coronary occlusion  
(CTO) site improves in chronic phase after  
recanalization

Minami Takeya, Hiroaki Tabuchi, Nyein Chan  
Aung, Tatsuya Sugimoto, Hiroaki Fujie, Naofumi  
Oyamada, Tetsuzo Kanemori, Ichiro Hamanaka,  
Kinzo Ueda

2) 第 43 回日本集中治療医学会学術集会  
2016.2.13 兵庫

低体温療法および P C I が奏功した重症 3  
枝病変を伴う CPA 症例—当院の心停止後症  
候群に対する取り組み—

南 丈也、Tay Zar、Wai Phyo、富士榮博昭、  
小山田尚史、金森徹三、浜中一郎、上田欽造

3) 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016.3.  
18 宮城、仙台

The renovated program for the management of  
asymptomatic deep vein thrombosis in  
perioperative period. Minami Takeya、Tay Zar、  
Wai Phyo、

富士榮博昭、小山田尚史、金森徹三、浜中一  
郎、上田欽造

4) 第 25 回日本心血管インターベンション治  
療学会学術集会 2016.7.7 東京

The mild to moderate stenosis after  
stenting to Chronic Total Occlusion(CTO) of  
superficial femoral artery

(SFA) could be observed without re-intervention.  
SFA CTO 治療後に認めた中等度以下のステ  
ント内狭窄は再インターベンションせずに  
経過観察可能である。

南丈也、Tay Zar、Wai Phyo、富士榮博昭、小  
山田尚史、金森徹三、浜中一郎、上田欽造

5) The 81st Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society 2017.3.17-3.19 金沢

Adipocyte-derived adrenomedullin suppresses  
age-and obesity-related increase in blood pressure  
Kosai Cho, Takeya Minami, Koichiro Kuwahara,  
Toshio Nishikimi, Hideaki Kinoshita, Kenji

Moriuti, Kaoru Koike, Kenji Naoto Minamino,  
Kangawa Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita,  
Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura

〔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

京都大学医学部附属病院循環器内科心血管  
内分泌代謝グループホームページ

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/cat236/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南丈也(MINAMI TAKEYA)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00647208