

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790560
 研究課題名（和文）高血圧性心リモデリングの機序を、in vivo で心筋構成細胞別に解析する試み
 研究課題名（英文）Development of the method to investigate the mechanism of hypertensive remodeling using laser microdissection
 研究代表者
 池田 理望（IKEDA AYAMI）
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：80412500

研究成果の概要（和文）：本研究では、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、心臓から心筋細胞、血管構成細胞、血管周囲浸潤細胞を選択的に分別採取し、各組織別に遺伝子解析を加え比較検討する新しい研究法を開発した。脳卒中易発症性自然高血圧発症ラット（SHR-SP）の肥大心と正常血圧ラットWKYの心臓の冷凍切片から、心筋細胞と血管を個別に分別採取したところ、心筋組織では、SHR-SPにおいてWKYと比較して、心筋肥大遺伝子マーカーBNPが著増していたが平滑筋マーカー α -SM発現は見られなかった。血管組織では α -SMが著増していたがBNPは認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We sought to establish the method to selectively collect the myocardium, vessels, and perivascular infiltrating cells from the heart sections and to compare gene expression profile of each tissue component between normotensive and hypertensive hearts using laser microdissection method. Real-time RT-PCR analysis showed that BNP, a marker of the cardiomyocytes, was expressed in the myocardial samples, but not in the vascular samples, whereas alpha-SMA, a marker of smooth muscle cells, was detected only in the vascular samples. Moreover, BNP was more upregulated in stroke-prone spontaneously hypertensive rats than in WKY rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：高血圧、分子生物学、高血圧性臓器障害

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では、近年加速度的に高齢者人口が増加しており、心血管疾患の罹病率が急増している。心不全は種々の心疾患の終末像で、患者の予後のみならず QOL を悪化させる。高血圧性心臓病を基盤とする心不全は、わが国における心不全の約半数を占めるが、収縮能は保たれた拡張不全例を含めるとさらに多くの症例が見逃されている可能性がある。高血圧が心肥大や心不全を引き起こす機序には多くの研究がなされているが、拡張障害の発症進展、肥大心の不全心化の分子機序は未解決であり、現在のところ根本的治療法も開発されていない。

(2) これまで、ある刺激に対する遺伝子発現変化を心筋全体として解析することはできたが、心筋の個々の構成細胞群ごとに網羅的解析を行うことができなかった。このため、心筋細胞、血管構成細胞、間質線維芽細胞、浸潤炎症細胞が複雑な相互関係をもって関与している心筋肥大や線維化などの心筋リモデリングの機序を解明することが難しかった。

(3) 我々は、圧負荷肥大心拡張障害モデルや血圧変動高血圧モデルを独自に開発し、血圧上昇や血圧変動が炎症性サイトカインの発現をきたし、心筋内血管周囲にマクロファージ浸潤を主体とする炎症を引き起こすこと、それが心筋リモデリング（心肥大・心筋線維化）や心機能障害（収縮障害・拡張障害）の原因になることを明らかにしてきた (Kawahara et al. *Circulation* 2002; Kuwahara et al. *Hypertension* 2004; Tokuda et al. *Hypertension* 2004; Kai et al. *Hypertens Res* 2006)。しかし、これら炎症性サイトカインの発現が、血管、血管周囲の炎症細胞、線維芽細胞、心筋細胞の主にとどの部分に関与しているかの詳細は、未だ解明されていない。

(4) 近年開発されたレーザーマイクロダイセクション法 (LMD) は、顕微鏡下で組織標本の微細領域（細胞 1 個も可能）をレーザー光で切離し回収するシステムで、この新しい手技を用いることで、採取したサンプルから DNA・mRNA・タンパク質を抽出し、微細領域の分析が可能となる。

2. 研究の目的

本研究は、レーザーマイクロダイセクション法 (LMD 法) を用いて、高血圧性肥大心の心筋細胞、血管構成細胞、血管周囲浸潤細胞を選択的に分別採取し、各組織別に遺伝子解析を加え比較検討することにより、心筋肥大、心

筋線維化、血管リモデリング、炎症細胞浸潤などのメカニズムを細胞群ごとに明らかにし、それらの相互関係を解明することによって、根本的な高血圧性臓器障害の治療法を開発することを目標にしたものである。

3. 研究の方法

(1) LMD 法の確立

① 標本作製:

正常血圧モデル WKY ラットおよび高血圧肥大心モデル SHR-SP ラットより心臓を取り出し、凍結切片標本作製。

② 分離回収:

・LMD 法を用いて心筋内血管、血管周囲間質、心筋層を個別に分離回収。

③ mRNA 抽出:

・各組織構成成分より mRNA を回収。

④ 組織特異的回収の確認:

・リアルタイム RT-PCR 法により、各組織特異的に発現する遺伝子（血管-血管平滑筋ミオシン α -SM、心筋細胞-BNP など）が各サンプル特異的に検出することが出来るかを確認。

⑤ 遺伝子発現解析:

・ジューチップ法あるいはマイクロアレイ法を用いて各サンプルごとの遺伝子発現プロファイルを検討。

(2) 高血圧肥大心における心筋構成細胞別遺伝子発現変化の検討

① 動物モデルとプロトコール:

・脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHR-SP) と正常血圧ラット (WKY) を飼育し、血圧正常期の 3 週令から、高血圧性臓器障害期の 24 週令まで 1 週間ごとに血圧・体重測定。

・生存曲線を作成。

・解剖により脳卒中死、心不全死、その他の死亡に分類した。

② 機能的評価:

・24 週齢で心エコー図法を施行。

③ 組織学的・分子遺伝子学的検討:

・心エコー図測定後犠牲死させ、心臓を回収。定法に従い組織染色、免疫組織染色および心筋タンパク抽出を行った。

④ LMD 法:

・24 週齢で犠牲死した後、直ちに凍結切片を作成。LMD 法により心筋内血管、血管周囲間質、心筋層を個別に分離回収。

・各組織構成成分より mRNA を回収。

・ジューチップ法あるいはマイクロアレイ法を用いて各サンプルごとの遺伝子発現プロファイルを検討。

4. 研究成果

(1) LMD 法の開発

・分離回収：WKY および SHR-SP においてカウンターステイニングのみで容易に心筋層と血管の個別分離回収が可能であった。しかしながら、SHR-SP においても血管周囲組織は線維化が主体でほとんど細胞成分（浸潤細胞）が認められなかった。また、少数の浸潤細胞を回収する際には細胞の同定のために細胞特異的な免疫組織染色が必要と思われた。しかしながら mRNA 分解を避けながら免疫染色を行うことに大変難儀した。今後も引き続き染色条件の最適化を行う必要がある。

・レーザー光量・カウンターステイニングの最適化：LMD 法を用いて心筋標本より各構成組織を回収する際にレーザー光量およびカウンターステイニングの濃度・染色時間が mRNA 回収効率に大きな影響を及ぼすことがわかった。そこで、これらの最適化を行った。

・組織 mRNA 抽出の最適化：従来法では LMD 法により回収された mRNA の純度が低いことが明らかとなった。そこで、数種類の mRNA 抽出法を比較検討。某社の mRNA 抽出キットによりもっとも高収率の回収が可能となった。

・構成組織特異的 mRNA 回収：心筋細胞サンプルについては 1 標本切片で、血管壁サンプルについては数枚の標本切片から血管断面数個～10 個を回収することで、リアルタイム RT-PCR 法やジーチップ・マイクロアレイ法に十分な mRNA 収量が得られた。しかしながら、血管周囲組織についてはかなりの切片を回収してもごく微量しか mRNA を抽出しえずリアルタイム RT-PCR 法やジーチップ法で解析可能な収量・品質の RNA は未だに得られていない。上述のように、今後、免疫染色による細胞同定を併用するなどして細胞（組織）選別と mRNA 回収の効率の改善が必要である。したがって以降の研究では、心筋層と血管の分別のみを行った。

・構成組織特異的回収の検証：心筋細胞分子マーカー BNP と血管平滑筋細胞分子マーカー α -SM のリアルタイム RT-PCR を行った。心筋層サンプルでは BNP 発現が見られるが α -SM 発現は見られなかった。一方、血管サンプルからは α -SM 発現が認められるも BNP 発現は明らかでなかった。以上のことから、心筋および血管特異的にサンプルが回収でき、組織特異的に mRNA を回収する手技を確立したと考えた。

(2) 高血圧肥大心における心筋構成細胞別遺伝子発現変化の検討

① SHR-SP および WKY の自然経過：

・SHR-SP では 4-5 週齢から有意に血圧が上昇した。その後血圧は経時的に上昇した。20 週齢より脳卒中と突然死により死亡する個体

が出現し 24 週齢までに生存率は約 80% となった。

・WKY では全期間中血圧の変化はなく、死亡した個体はなかった。

② 高血圧性肥大心の組織学的検討：

・SHR-SP を 24 週齢で屠殺し心筋リモデリングの組織学的検討を行った。

・同週齢の WKY に比して著明な心筋肥大、心筋内血管中膜肥厚が認められた。

・線維化に関しては血管周囲に反応性線維化を軽度認めたが明らかな置換性線維化は見られなかった。

・炎症細胞浸潤も WKY とほとんどに変わりなかった。

③ 心筋特異的・血管特異的遺伝子発現変化の評価：

・SHR-SP と WKY の凍結心筋切片から、LMD 法で心筋と血管を個別に採取、組織別に RNA を抽出した。

・心筋組織では、SHR-SP において WKY と比較して、心筋肥大遺伝子マーカー BNP が著増していたが平滑筋マーカー α -SM 発現は見られなかった。

・血管組織では α -SM が著増していたが BNP は認めなかった。心臓全体から通常法で回収した mRNA サンプルでは α -SM の変化は明らかではなかった。これは、LMD 法により血管特異的な変化をとらえたものである。

・LMD 法で回収した組織特異的サンプルを用いたジーチップ法およびマイクロアレイ法による遺伝子プロファイル解析を現在推し進めているところである。

④ 薬物治療効果の評価：高血圧期、前高血圧期の SHR-SP にアンジオテンシン受容体拮抗薬を投与。

・高血圧進展に及ぼす効果、生存曲線に及ぼす効果、高血圧性心リモデリングに及ぼす分子生物学的・免疫組織学的効果、各心臓構成細胞別発現プロファイルへの効果を検討中である。

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 2 件）

1. Kudo H, Ikeda A, (他 11 名 7 番目). Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension* 54:832-838, 2009.
2. Koga M, Ikeda A, (他 10 名 5 番目). Mutant MCP-1 Therapy Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Malignant Melanoma in Mice. *Biochem Biophys Res Comm* 365:279-284, 2008.

[学会発表] (計7件)

1. Mori T, Ikeda A, (他7名6番目).
Enhanced cardiac inflammation and myocardial fibrosis in ovariectomized, pressure-overloaded rats -A possible mechanism of aggravation of diastolic dysfunction in the post-menopause- American Heart Association Scientific Meeting 2009.
2009年11月14-18日. Orlando, Florida, USA.
2. 安岡逸、池田理望、(他4名2番目).
レーザーマイクロダイセクション法を用いた心筋構成細胞の選択的遺伝子発現解析法. 日本心不全学会総会.
2009年10月31日. 福岡市.
3. Kajimoto H, Ikeda A, (他4名4番目).
Asymmetric dimethylarginine induces endothelial dysfunction in renal failure mice. 日本循環器学会学術集会.
2009年3月21日. 大阪市.
4. Ikeda A, (他5名1番目).
Selective collection and comprehensive gene expression analysis of each tissue component of the heart using laser microdissection method. 日本循環器学会学術集会.
2009年3月21日. 大阪市.
5. 池田理望(他4名1番目). レーザーマイクロダイセクション法を用いた心筋構成細胞の選択的遺伝子発現解析法の開発。日本高血圧学会総会.
2008年10月11日. 札幌市.
6. Takayama N, Ikeda A, (他4名8番目).
Simvastatin attenuates large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy, but not myocardial fibrosis, by inhibiting Ras-ERK and Rho A pathways in hypertensive rats. -New cardioprotective effects of statins- 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research.
2008年9月17-20日. Atlanta, USA.
7. Kajimoto H, Ikeda A, (他3名4番目). Role of Asymmetric Dimethylarginine in endothelial dysfunction in renal failure mice. 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research.
2008年9月17-20日. Atlanta, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 理望 (IKEDA AYAMI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：80412500

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者