

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08232

研究課題名(和文)慢性腎臓病における心筋肥大の機序解明

研究課題名(英文)The mechanism of left ventricular hypertrophy in CKD

研究代表者

中野 敏昭 (Nakano, Toshiaki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：10432931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) とインドキシル硫酸 (IS) がそれぞれ慢性腎臓病患者における左室肥大と関連することが報告されている。ISの心筋肥大作用におけるFGF23の関与について検討した。培養心筋細胞にISを投与すると心筋肥大マーカーが有意に増加した。FGF23を制御するGALNT3とFGF23はAhRを介して有意に増加し、ISはFGFR4を促進した。片腎摘出後マウスにおいて、IS投与は左室肥大を促進し、FGFR4を阻害するとIS投与群における心肥大は減少した。ISはGALNT3の発現増加によりFGF23の発現を増加させ、心筋細胞でのFGF23-FGFR4経路を介して心肥大を誘導する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにFGF23は心筋肥大との関連性が報告されているが、FGF23分泌刺激にはリン以外にも鉄欠乏や炎症など複数の刺激が影響することも示唆されている。また、FGF23が分解される機序やCKDでFGF23が上昇することに関与する機序は十分に解明されていない。CKDにおけるFGF23の動態、心筋細胞に対する生理活性を証明することで、CKDに合併率が高い心筋障害を予防できる可能性がある。また、これまでにインドキシル硫酸がFGF23の動態に影響するという報告はない。尿毒素の治療薬がFGF23の代謝や左室肥大の改善に影響する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and indoxyl sulfate (IS) are associated with left ventricular hypertrophy (LVH) in patients with chronic kidney disease. We investigated whether IS contributes to LVH associated with FGF23. In cultured cardiomyocytes incubated with IS, mRNA levels of the LVH markers were significantly upregulated. Levels of GALNT3, which regulates FGF23 O-glycosylation, and FGF23 were also upregulated in cultured cardiomyocytes. Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) phosphorylation was increased in cell lysates by IS administration. In mice, IS promoted LVH, whereas the inhibition of FGFR4 reduced heart weight and left ventricular wall thickness in IS-treated groups. In conclusion, IS increases FGF23 protein expression via an increase in GALNT3 expression, and activates FGF23-FGFR4 signaling in cardiomyocytes, leading to LVH.

研究分野：腎臓内科

キーワード：慢性腎臓病 インドキシル硫酸 FGF23 左室肥大 芳香族炭化水素受容体

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は世界的に増加の一途をたどっており、本邦においても成人の8人に1人がCKDに罹患している。この原因は、生活習慣病の増加と高齢者の増加により腎機能が低下する患者が増加しているためである。CKD患者に心血管合併症が多いこともよく知られており、心筋肥大による左室肥大症もCKDのステージが進行するほど罹患率が増加する(Stewart GA, et al. *Kidney Int* 2005)。CKD患者の死因の一位は心不全を含む心血管病であり、心筋肥大はCKD患者の心不全の予後不良因子である。近年、リン利尿ホルモンであるFGF23がCKDの進行とともに血中濃度が上昇し、FGF23の濃度は心筋肥大と相関することが報告された。また、FGF23をマウスの心臓内に注入すると心肥大が誘導されることが証明された。FGF23の分泌刺激はリン以外にも制御されている可能性が示唆されており、FGF23の分解に関しても不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、CKD患者の心筋障害に、インドキシル硫酸がFGF23の発現に影響があると考え、その仮説を検証する。これまでにインドキシル硫酸がFGF23の動態に影響するという報告はない。尿毒素の治療がFGF23の低下につながる可能性が示唆される。

## 3. 研究の方法

培養細胞は、ラット心筋細胞株(H9c2, 2-1)を用いて、インドキシル硫酸(IS)(Sigma-Aldrich)およびリコンビナントマウスFGF23(R&D Systems)を投与し、mRNAおよび蛋白を回収した。全ての動物実験は学内の動物実験倫理委員会の承認を得た実施要綱に基づいて行われた(承認番号:A19-274-0)。左室肥大を生じさせるため、8週齢のC57BL/6Jclマウス(CLEA Japan)オスのマウスに片腎摘出術(左腎臓の全摘出術)を行い、翌日より高リン食としてリン1.5g/100gに調整したものを与えた。この食餌はFGF23の誘導補助のために行われ、浸透圧ポンプを用いて100mg/kgのISを4週間持続皮下投与した。それらのマウスはFGFR4阻害薬であるH3B-6527(Selleck Biotech)を持続腹腔内投与を行った。心肥大や線維化に対するISの影響を確認するため、マウスは以下の五群に分けた:偽手術群、コントロール群、IS+(生理食塩水)NS群、NS+H3B群、IS+H3B群。すべてのマウスはday0に手術を行い、4週間の経過観察後、day28に安楽死を行い、採血および心臓を析出し解析を行った。

## 4. 研究成果

**FGF23 およびインドキシル硫酸は培養心筋細胞において肥大化マーカーと線維化マーカーを増加させる**

FGF23を培養心筋細胞H9c2に投与したところ、心肥大化マーカーであるBNP、beta MHC、線維化マーカーであるalpha SMA、collagen IのそれぞれmRNAの発現量が増加していた(図1)。また、同様に、培養心筋細胞にインドキシル硫酸(IS)を投与したところ、心肥大化マーカー(BNP、beta MHC)および線維化マーカー(alpha SMA、collagen I)が増加した(図2)。さらに、ISは培養心筋細胞において細胞溶解物中のFGF23蛋白およびFGFR4のリン酸化が促

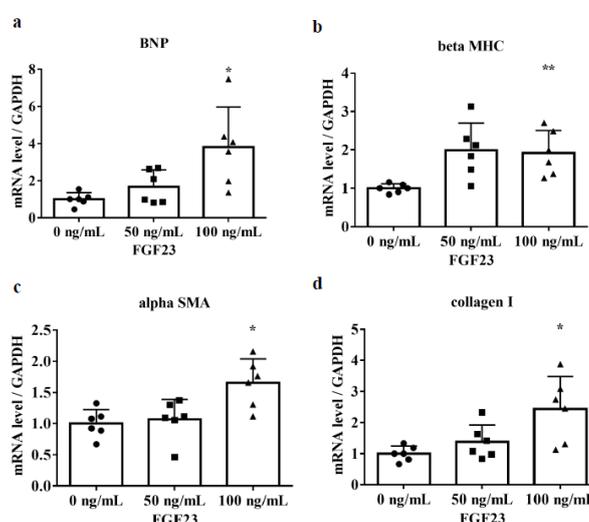


図1. FGF23は培養心筋細胞において肥大化マーカーと線維化マーカーを増加させる

進していた (図 3)。これらの結果から IS は心筋細胞株において FGF23 と FGFR4 のリン酸化発現を促し、肥大化マーカーと線維化マーカーを増加させることが明らかになった。

### IS は AhR と FGF23-FGFR4 経路を賦活化する

培養心筋細胞において IS の受容体である芳香族炭化水素受容体 (Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR) を siRNA を用いて抑制し、1mM の IS を投与して培養実験を行った。IS による FGF23 の発現増加は AhR の siRNA によって抑制された (図 4a,b)。HIF1 $\alpha$  は FGF23 の産生を制御する低酸素ストレスマーカーであるが、IS によって増加していた。この効果は AhR の siRNA によって抑制された。GALNT3 は FGF23 の O-結合型グリコシル化を制御するが、FGF23 および IS の投与によって発現が増加していた (図 4c,d)。IS 投与による GALNT3 の発現増加は AhR の siRNA により抑制された (図 4e,f)。これらの結果から IS は AhR を介して GALNT3 の発現を上昇し FGF23 蛋白の増加に影響していると考えられた。

### IS は心肥大を促進し、FGFR4 を阻害するとその影響は抑制される

慢性尋常病モデル (片腎摘出) マウスにおける検討では、IS+NS マウス群が他のマウス群と比較して心重量の増加と左室壁の肥厚がみられた (図 5)。体重、血圧、血清クレアチニン濃度、血清カルシウム濃度、血清リン濃度に有意な差はみられなかった。血清 IS 濃度は IS 投与群において増加傾向がみられた。FGFR4 を阻害すると IS 投与群の心重量増加や左室壁肥厚が抑制された (図 5)。

### AhR-FGF23-FGFR4 を介した IS による心肥大の機序

本研究では、左室肥大における IS と FGF23 の関係を検討した。心筋細胞株において IS が FGF23 と心肥大マーカーの mRNA 量を増加させることを発見した。これらの事実は IS が FGF23 の発現を増加させることで左室肥大を呈する可能性を示唆している。

IS は AhR における内因性の作用物質であり、GALNT3 遺伝子発現に必要である。GALNT3 は FGF23 の 178 チロシンを O-結合型グリコシル化することに

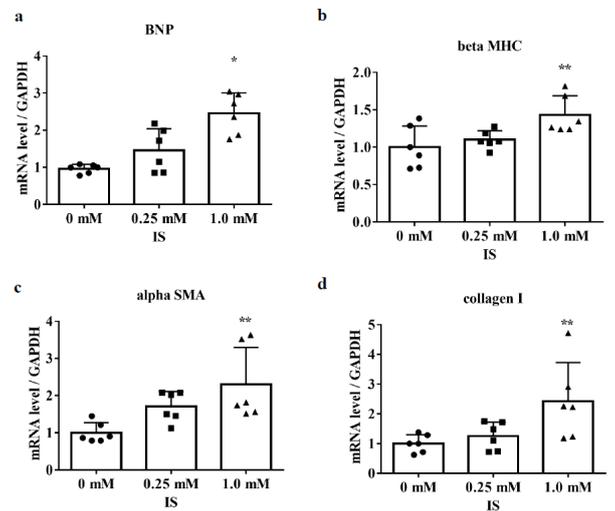


図2. インドキシル硫酸 (IS) は培養心筋細胞において肥大化マーカーと線維化マーカーを増加させる

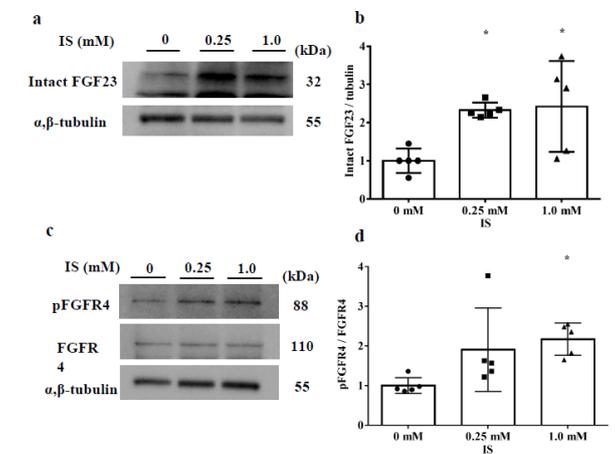


図3. IS は培養心筋細胞における FGF23 蛋白発現および FGFR4 のリン酸化を促進する

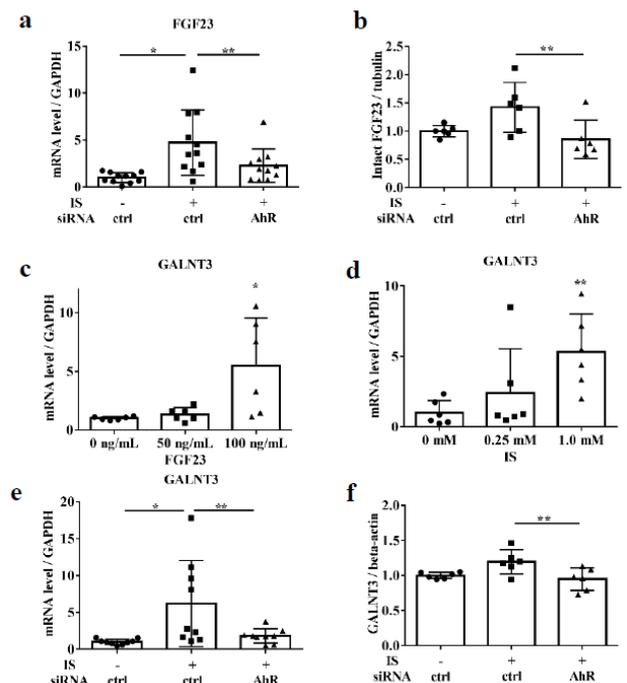


図4. IS は AhR と FGF23-FGFR4 経路を賦活化する

よってフーリンプロ蛋白転換酵素を阻害し、FGF23 の分解を抑制し、intact FGF23 を増加させる。本研究では、IS は GALNT3 と FGF23 を増加させ、この効果は AhR を抑制することで減少しており（図 4）、先程の機序を支持する結果である。

さらに、本研究では IS は血清の intact FGF23 は増やさずに心臓の intact FGF23 の蛋白発現を増加させており（図 5）、IS の FGF23 への影響は心臓のような組織に限局的な可能性を示唆している。CKD 患者における解剖試料で心臓における FGF23 の発現量と左室肥大が関連していることが近年報告されている（Leifheit-Nestler M, NDT 2016）。さらに、腎臓摘出後ラットで心臓における FGF23 の発現が報告されている（Leifheit-Nestler M, NDT 2017）。これらのエビデンスは、心臓における FGF23 の発現が血清 IS 濃度高値を含む尿毒症状態によって生じるという意見を支持している。

本研究では IS は FGF23 の蛋白発現だけでなく、FGF23 の mRNA 量も増加させていた。IS により誘導された GALNT3 は FGF23 の蛋白分解を抑制していた。従って、IS によって FGF23 の mRNA が増加する別の機序が考えられた。近年、炎症性サイトカインが心臓線維芽細胞や骨芽細胞において FGF23 産生の直接的な制御因子であると報告されている。骨芽細胞と骨細胞において、鉄欠乏もしくは低酸素への反応で誘導される HIF1 $\alpha$  は FGF23 の産生を亢進する（Farrow E, Proc Natl Acad Sci USA 2011）。IL-1 $\beta$  は HIF1 $\alpha$  に依存して FGF23 の mRNA 発現量を有意に増加させる（David V, Kidney Int 2016）。従って、幾つかの炎症性サイトカインは HIF1 $\alpha$  を介して FGF23 の mRNA 発現を誘導する。これらの知見に基づき、本研究では尿毒性心筋症における IS-FGF23-FGFR4 経路という新たな仮説を提唱する（図 6）。

要約すると、本研究では、培養実験、動物実験ともに IS が AhR と FGF23-FGFR4 経路を介して LVH を促進した。IS は AhR を介して GALNT3 と HIF1 $\alpha$  も増加させ、FGF23 の安定化をもたらした。これらの成果は IS-AhR-FGF23-FGFR4 経路の阻害をすることで CKD 患者の LVH 予防の新たな治療戦略になることが期待される。

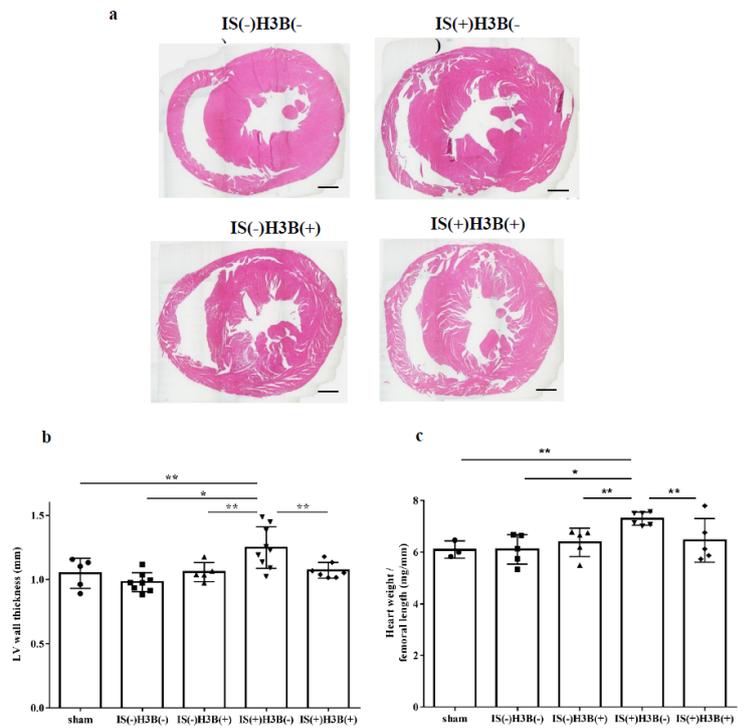


図5. ISは心肥大を促進し、FGFR4を阻害するとその影響は抑制される

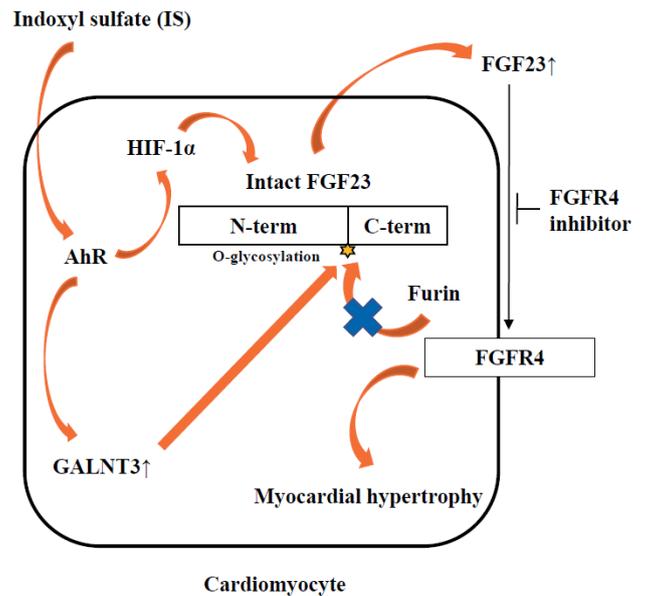


図6. ISはAhR-FGF23-FGFR4を介して心筋肥大を引き起こす

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishimoto Hiroshi, Nakano Toshiaki, Torisu Kumiko, Tokumoto Masanori, Uchida Yushi, Yamada Shunsuke, Taniguchi Masatomo, Kitazono Takanari	4. 巻 10
2. 論文標題 Indoxyl sulfate induces left ventricular hypertrophy via the AhR-FGF23-FGFR4 signaling pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 990422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2023.990422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Kishimoto Hiroshi, Tokumoto Masanori	4. 巻 14
2. 論文標題 Direct and indirect effects of fibroblast growth factor 23 on the heart	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1059179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2023.1059179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岸本啓志、中野敏昭
2. 発表標題 インドキシル硫酸はFGFR4・FGF23経路を介して心筋細胞の肥大を促進する。
3. 学会等名 Japan Kidney Council 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本啓志、中野敏昭、鳥巢久美子、山田俊輔、徳本正憲、谷口正智、北園孝成
2. 発表標題 インドキシル硫酸はFGFR4・FGF23経路を介して心筋細胞の肥大を促進する。
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Kishimoto, Toshiaki Nakano, Shunsuke Yamada, Kumiko Torisu, Masanori Tokumoto, Masatomo Taniguchi, Takanari Kitazono
2. 発表標題 Indoxyl sulfate induces cardiomyocyte hypertrophy via FGF23-FGFR4 signaling pathway
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 俊輔  (Yamada Shunsuke)  (10419608)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	鳥巣 久美子  (Torisu Kumiko)  (20448434)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------