

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591045

研究課題名(和文)大動脈狭窄症の発症と進展におけるミッドカインの役割

研究課題名(英文)The role of midkine in the onset and progression of aortic stenosis

研究代表者

林 秀晴(Hayashi, Hideharu)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50135258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈弁狭窄手術後の検体の染色により、弁間質細胞でのmidkineを確認した。しかし、弁疾患のない癌や重症感染症の剖検例でも染色される例があった。手術検体のmidkineのmRNAの発現を検討したが、石灰化が著しくて、組織内の弁間質細胞の密度が少ないため、midkineのmRNAを抽出できなかった。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study was to investigate the role of midkine in the progression of aortic stenosis (AS). From the preparation after operation of AS, the existence of midkine was confirmed in valve interstitial cell (VIC) by HE-stain and immunostaining of midkine. Next, in many preparations of aortic valve from autopsied patients showed the existence of midkine. In many patients who showed the staining of midkine without AS had malignancy or severe infectious disease.

We, next, investigated the expression of mRNA of midkine using RT-PCR method, but the density of VIC in the valve was too low to identify the mRNA of midkine, because of severe calcification of the valve.

研究分野：循環器内科

キーワード：大動脈狭窄症 midkine 免疫染色 mRNA 石灰化

1. 研究開始当初の背景

大動脈弁狭窄症 (AS) は、高齢者 (75 歳以上) の 2-4% で認められ、重症 AS の予後は極めて不良である。有効な薬物療法が存在しないため、根治には大動脈弁置換術 (Aortic valve replacement: AVR) または、経カテーテル的大動脈弁植え込み術を必要とする。一方で高齢者の AS 症例では治療リスクが高く、手術件数の増加は医療経済的にも問題となる。そのため、AS の発症様式と病態進展における機構の解明が重要な課題となっている。

AS の原因として、石灰化大動脈弁狭窄 (calcific aortic valve stenosis: CAVS) が最も多い。CAVS は加齢に伴う退行性変性と考えられてきたが、大動脈弁内皮の破綻、炎症性細胞浸潤と遊走、LDL コレステロールの蓄積、リン脂質代謝系の活性化など、動脈硬化に類似した過程を有する病態であると認識されるようになってきた。加えて、CAVS の特徴として、骨形成過程が重要である。これまでの研究により、CAVS の病態に関与する因子として、遺伝的素因、環境因子、代謝因子、細胞内情報伝達物質などが明らかとなっている。これらの因子が、弁の粗結合組織 (stroma) に存在する間質細胞を、線維芽細胞から骨芽細胞に変化させ、異所性の骨形成が進行すると考えられる。

成長因子ファミリーに属するミッドカイン (Midkine: MK) は、発生中期に強く発現し、神経系の発達にかかわるサイトカインとして発見された。成人の組織ではほとんど検出されないが、組織の傷害により発現が誘導される。MK の生物活性には、抗アポトーシス作用、炎症細胞遊走、サイトカイン誘導、血管新生などがあり、炎症への関与が示唆される。脳梗塞、虚血性心疾患、動脈硬化などの疾病との関連も明らかとなっ

てきた。細胞膜に存在する MK レセプターは、受容体型蛋白質チロシンフォスファターゼ (PTPase) や low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5) などにより構成される複合体である。一方 Lrp5 は、骨代謝において骨形成に重要な役割を担う Wnt-β カチン系シグナルのレセプターとしても重要であり、慢性関節リウマチと MK との関連も報告されている。さらに CAVS では Lrp5 の発現亢進が認められている。

このように、MK は炎症過程と骨形成過程のいずれにも関与するサイトカインで、CAVS の発症と病態の進展に重要な細胞内情報伝達物質の可能性があるが、今までに CAVS における MK の発現や病態に及ぼす効果についての詳細な検討はない。

2. 研究の目的

大動脈弁狭窄症 (Aortic Stenosis: AS) の発症、進展におけるミッドカイン (Midkine: MK) の関与とその役割を明らかにする

3. 研究の方法

- ・ 大動脈弁狭窄症の手術検体から組織標本を作製し、HE 染色、midkine 免疫染色により、弁間質細胞 (Valve Interstitial Cell: VIC) 内に midkine が存在するかを検討する
- ・ 剖検症例の大動脈弁を組織標本として、同様に midkine の存在を確認する
- ・ 手術検体において RT-PCR 法により midkine の mRNA レベルでの発現を検討。

4. 研究成果

本研究の目的は、大動脈弁狭窄症 (Aortic Stenosis: AS) の発症、進展におけるミッドカイン (Midkine) の関与とその役割を明らかにすることである。

大動脈弁狭窄症の手術検体から組織標本を作製し、HE 染色、midkine 免疫染色により、弁間質細胞 (Valve Interstitial Cell: VIC) 内に midkine が存在することを確認した。次に剖検症例の大動脈弁を用い組織

標本を作製して検討した結果、剖検症例でも midkine に染色される症例が多く確認された。大動脈弁疾患を有さないのに midkine が検出された剖検例の多くは癌や肺炎などの重傷感染症症例である。midkine は種々の悪性腫瘍や感染症で発現が著しく亢進することが知られているため、弁膜症以外の病態が関与している可能性が考えられた。

そこで、手術検体において RT-PCR 法により midkine の mRNA レベルでの発現を検討したが、手術検体の石灰化が著しく、手術検体から mRNA を抽出するための弁組織内の VIC の密度が少ないため、midkine の mRNA を同定出来なかった。弁組織からの VIC 由来の mRNA 採取の効率化を、種々の方法で検討中である。

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 8 件)

- (1) Ohtani H, Katoh H, Tanaka T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. Nitric Oxide. 26:95-101, 2012.
- (2) Saitoh T, Satoh H, Kumazawa A, Nobuhara M, Machii M, Tanaka T, Shiraki K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Ultrasound analysis of the relationship between right internal jugular vein and common carotid artery in the left head-rotation and head-flexion position. Heart Vessels 28:620-625, 2013.
- (3) Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Funaki M, Hayashi H: Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes: A novel *ex vivo* myocardial insulin-resistance model. Exp Cell Res 319: 955-966, 2013.
- (4) Machii M, Satoh H, Shiraki K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Ohtani H, Wakabayashi Y, Ukigai H, Tawarahara K, Hayashi H: Distribution of late gadolinium enhancement in end-stage hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy: Differential diagnosis and prediction of cardiac outcome. Magnetic Resonance Imaging 32: 118-124, 2014.
- (5) Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Watanabe T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Microtubule disorganization affects the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. Circ. J. 78: 1206-1215, 2014.
- (6) Suwa K, Satoh H, Sano M, Nobuhara M, Saitoh T, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Tawarahara K, Ohtani H, Wakabayashi Y, Takase H, Terada H, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H: Functional, morphological and electrocardiographical abnormalities in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy and apical aneurysm: correlation with cardiac MR. Open Heart. 1(1): e000124, 2014.
- (7) Sano M, Satoh H, Suwa K, Nobuhara M, Saitoh T, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Shimoyama K, Suzuki D, Ogawa N, Takehara Y, Sakahara H,

Hayashi H: Characteristics and clinical relevance of late gadolinium enhancement in cardiac magnetic resonance in patients with systemic sclerosis. Heart Vessels. 2014 Jul 5. [Epub ahead of print]

- (8) Watanabe T, Saotome M, Nobuhara M, Sakamoto A, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Funaki M, Hayashi H: Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance. Exp Cell Res 323:314-325, 2014.

[学会発表](計 9 件)

- (1) Sakamoto A, Hosoya N, Yoshizaki T, Kageyama S, Takeuchi R, Murata K, Nawada R, Onodera T, Takizawa A, Saotome M, Satoh H, Hayashi H: Lower serum eicosapentaenoic acid predicts the incidence of paroxysmal atrial fibrillation during hospital stay in patients with acute coronary syndrome. AHA Scientific Sessions 2013. 2013.11.16-20
- (2) Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Reactive oxygen species (ROS) from excessive mitochondrial fatty acid (FA) oxidation attenuates myocardial insulin-signaling in differentiated H9c2 myocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society, 2013/3, Yokohama.
- (3) Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Perhexiline restored

myocardial insulin-resistance through mitochondrial protection from fatty acid (FA) overload in differentiated H9c2 myocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society, 2013/3, Yokohama.

- (4) Watanabe T, Saotome M, Nobuhara M, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Alteration in Mitochondrial Morphology by Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) Manipulates Insulin-Resistance in Differentiated H9c2 Cardiomyocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society, 2013/3, Yokohama.
- (5) Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Microtubule stabilization alters mitofusin-2 expression and Opens MPTP via the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} releases-dependent pathway in cardiac myocytes. The 78th Meeting of Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2014.
- (6) Nonaka D, Katoh H, Kumazawa A, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Intracellular renin preserves mitochondrial function and protects cardiomyocytes from ischemic injury in diabetic heart. The 78th Meeting of Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2014.
- (7) Sakamoto A, Saotome M, Watanabe T, Nobuhara M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Eicosapentaenoic acid inhibits palmitate-induced mitochondrial fragmentation and membrane potential depolarization in differentiated H9c2 myocytes The 78th Meeting of Japanese Circulation

- Society, Tokyo, March, 2014.
- (8) Sakamoto A, Saotome M, Watanabe T, Nobuhara M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Eicosapentaenoic acid inhibits palmitate-induced mitochondrial fragmentation and membrane potential depolarization in differentiated H9c2 myocytes. The 78th Meeting of Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2014.
- (9) Sano M, Satoh H, Suwa K, Nobuhara M, Saitoh T, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Cardiac magnetic resonance can detect cardiac involvement in systemic sclerosis even in patients without any abnormalities in screening tests. The 78th Meeting of Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2014.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 林秀晴 (企画編集): 心筋症の画像診断. 循環器内科. Vol.73 (No.4) 科学評論社. P371-504, 2013.
- (2) 加藤秀樹、林秀晴: 心筋梗塞の再発予防. 循環器疾患最新の治療. 2014-2015. 南江堂. P125-126, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀晴 (HAYASHI HIDEHARU)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 501353258

(2) 研究分担者

佐藤 洋 (SATO HIROSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30293632

早乙女 雅夫 (SAOTOME MASAO)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70509512

加藤 秀樹 (KATOH HIDEKI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80314029

(3) 連携研究者

()

研究者番号: