

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461121

研究課題名(和文)心-肺腎連関に与えるミッドカインの役割の解明

研究課題名(英文)Development of the role of midkine on the cardio-renal association

研究代表者

宍戸 哲郎 (SHISHIDO, Tetsuro)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60400545

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)：腎臓病において、心臓リモデリングが観察されることが知られているが、我々はその肥大に先立って腎臓と血中のミッドカイン濃度が亢進することを見出した。その上昇はGPCR依存性に細胞内シグナルの活性を促、MAPK活性の亢進、ANPなどような胎児型遺伝子発現の亢進と心肥大に関与していた。さらにミッドカインノックアウトマウスで腎臓病モデルを作成すると、これらの細胞内シグナルや心臓肥大が野生型マウスと比べて抑制されており、心不全の進展が抑制されていることを超音波心臓図で確認した。これらのことから、腎臓から発現するミッドカインが心臓リモデリングの進展に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has known that cardiac remodeling is observed during chronic kidney disease. We found that levels of midkine in the kidney and serum has been increased before remodeling occurred. Circulating midkine modulates intracellular signaling through GPCR, and induces cardiac hypertrophy, including increased ANP expressions.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミッドカイン 心肥大 腎不全

1. 研究開始当初の背景

日本での心血管病による死亡はその 30.8% を占め、心不全で死亡する症例数が増加している。加齢、糖尿病、慢性腎臓病、慢性呼吸不全は、自覚症状がない早期の心不全、いわゆる隠れ心不全の危険因子と考えられている。近年、高齢化や慢性腎臓病、慢性呼吸機能低下の患者が増加していること、心不全が顕在化すると治療が困難なため、自覚症状のない心不全の進展機序の解明が急務となっている。

上皮成長因子受容体 (EGFR) は、上皮成長因子などの ligand により 2 量体となりチロシンキナーゼドメインがリン酸化され下流にシグナルを伝えるチロシンキナーゼ型受容体であり、下流シグナルとして Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) - p90RSK, Phosphoinositide-3 Kinase - Akt などが知られている。Angiotensin II (Ang II), Endothelin 1 (ET1) などにより EGFR が間接的に活性化されるが、我々は、その下流に位置する MAPK-RSK シグナルの亢進によって心肥大や心不全の進行を惹起することを報告している。(Circ Res 2012, Circ Res 2008, Circ 2006)。また MAPK-p90RSK の活性化は、 β -catenin /TCF, NFAT, GATA4 の転写活性が亢進したり、ヒストン H3S10 リン酸化とエピジェネティック修飾が起こることで、心臓機能障害、血管平滑筋増殖を促すなど重要な役割を果たしている (Nat Rev Mol Cell Biol. 2008, J Biol Chem. 2012)。その一方で、心臓老化や心不全の進展に関して、EGFR の活性化機構には、不明な点も多い。そこで、チロシンキナーゼ活性を変化させる細胞外因子について心不全患者血清を用いて検討を行い、Midkine (MK) に着目した。血中濃度 MK 濃度が心不全増悪と相関すること、MK 濃度が心不全患者の予後を規定する独立した因子であることを見出した。MK は胎生期に肺、腎臓、脳で強く発現し、神経細胞の分化、平滑筋細胞の遊走と増殖に関与する細胞外分泌タンパクである (Cancer Lett. 2004)。成人期には、慢性腎臓病で発現が亢進すること、低酸素で誘導される転写因子 HIF family によって MK 発現が亢進し、循環 MK は腎肺連関に関与することが示唆されている (J Clin Invest. 2009)。MK は胎生期に肺、心臓、腎臓、脳で強く発現し、神経細胞の分化、平滑筋細胞の遊走と増殖、心筋細胞分化に関与する細胞外分泌タンパクである (Cancer Lett. 2004)。成人期には、慢性腎臓病、低酸素状態によって、腎臓、肺、心臓で発現が亢進し、肺循環障害や臓器障害を引き起こすことから、循環血液中の MK は腎肺連関に関与することが示唆されている (J Clin Invest. 2009)。腫瘍細胞では MK が膜貫通チロシンホスファターゼ (PTP) や LDL 受容体様タンパク (LRP) に結合後、MAPK, p90RSK 活性が亢進することで、抗 apoptosis 作用や細胞増殖作用を示す (Neurosci Res. 2003)。我々は、マウスに大動

脈縮窄術 (TAC) を行い MK の発現が腎臓と肺で亢進し、心腎肺連関に MK が関与する可能性を見出した。また、心臓特異的 MK 過剰発現 (MK-TG) マウスを作成し、圧負荷による心肥大と心機能低下が野生型マウスに比べ早期に出現することを明らかにした。MK の心筋細胞への作用機序が不明であるため、MK 刺激による TKR 活性に関して array assay を行い、MK 刺激で EGFR 活性が特にリン酸化されていることを見出した。最近、Nucleolin が EGFR と協調作用することが報告され、EGFR, Nucleolin と MK の相互作用が、細胞内シグナル伝達経路とエピジェネティック制御に関して重要な役割を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

慢性腎臓病、慢性呼吸不全は、心不全の危険因子である。低酸や酸化ストレスによって腎臓や肺から Midkine (MK) が分泌され、心臓、肺動脈血管平滑筋に存在する上皮成長因子受容体活性を亢進し、心筋細胞肥大と機能障害、右心負荷の亢進を制御している可能性があると考えている。本研究の目的は、慢性腎臓病での MK による心血管機能障害の分子機構を明らかにし、心腎連関の治療と予防への新たな治療目標を解明することである。そのために、以下の目標を掲げ、達成していく。

MK による EGFR 活性の亢進と MK による細胞障害、細胞増殖を引き起こす分子メカニズムの解明

MK による遠隔臓器相互作用 (心腎肺連関) を介した心臓機能障害機序の解明

臓器虚血時における MK 発現亢進のメカニズムとその臓器障害を予防、治療する方法の解明

3. 研究の方法

培養心筋細胞を用いて、MK による心筋細胞障害や平滑筋細胞増殖を引き起こす分子メカニズムを解明する。そのために、培養心筋細胞を用いて、MK による刺激後の ERK1/2-p90RSK 活性、PI3K-AKT 活性、JAK/STAT 活性を Western blotting 法で検討する。肥大や増殖作用を明らかにするために、胎児型遺伝子発現を BNP-luc plasmid を用いた reporter assay で、心筋細胞サイズを測定し MK による心筋細胞肥大を in vitro で明らかにしていく。

野生型マウスを用いて腎臓機能障害モデル (5/6 腎臓摘出手術) を行い、心臓リモデリングを評価するとともにチロシンキナーゼ活性に関する array assay を行い EGFR の関与を明らかにする。

培養心筋細胞を用いて、MK による EGFR 活性の亢進を評価する。そのために、培養心筋細胞を用いて MK 刺激による EGFR 活性の変化とそのメカニズムの解明を siRNA, inhibitor を用いて検討するとともに、MK-EGFR シグナルが心筋細胞肥大にどの程

度関与するか luciferase assay, western blotting, 心筋細胞サイズの変化を評価する。

MK ノックアウトマウスにも野生型マウスと同様に腎機能障害モデルにおける心筋保護作用を評価する。血圧の変化を tail cuff 法で評価する。

野生型マウスへMK 受容体阻害薬を投与し、腎機能障害時における心臓リモデリングに対する保護効果を超音波心臓図、Western blotting, 胎児型遺伝子発現レベル、組織変化を評価することで検討する。

4. 研究成果

定常状態において、ノックアウトマウスと野生型マウス間に体重・心機能・生存率の差は認めなかった。腎摘野生型マウスにおいては血中MK 濃度および腎臓でのMK 産生がシャム群に比べ優位に亢進していた。腎摘ノックアウトマウスは腎摘野生型マウスに比べ腎摘後の心肥大形成が有意に抑制され、生存率も腎摘野生型マウスと比較して腎摘ノックアウトマウスで有意に良好であった。心臓抽出蛋白で Receptor tyrosine kinase Array を行うと、いくつかのチロシンキナーゼ活性が亢進していることを発見した。その中でも上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) のリン酸化が腎摘後にもっとも亢進していたことから、MK によってEGFR を介する心肥大シグナルに焦点を絞って検討を続けた。心肥大シグナルであるERK1/2, AKT のリン酸化は腎摘野生型マウスにおいて亢進していたが、腎摘ノックアウトマウスでは ERK1/2, AKT のリン酸化が抑制されていた。新生児仔ラット心筋細胞をMK で刺激したところ、EGFR, ERK1/2, AKT のリン酸化が亢進していた。また、luciferase assay では、心肥大のマーカーである胎児型遺伝子 BNP の発現がMK 刺激により亢進していた。形態学的にもMK 刺激により心筋細胞の肥大が観察されたが、EGFR インヒビターの前投与またはEGFR siRNA の前処置によりMK 刺激によるBNP の発現・心肥大は有意に抑制された。また、EGFR transactivation のインヒビターであるTAPI-2 を前投与したが、MK によるBNP の発現・心肥大には変化がなかった。これらのことから、MK はEGFR シグナルを介して心筋細胞に作用し、ERK1/2・AKT のリン酸化を介し心肥大形成に関与することが示唆された。MK 抑制は慢性腎臓病における心肥大、さらには心リモデリング抑制のための新たな治療ターゲットと成り得る可能性が示唆された。

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42件)

1) Honda Y, Shishido T, Takahashi T, Watanabe T, Netsu S, Kinoshita D, Narumi T, Kadowaki S, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto

T, Kishida S, Kadomatsu K, Takeishi Y, Kubota I: Midkine Deteriorates Cardiac Remodeling via Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Chronic Kidney Disease. *Hypertension*. 2016;67:857-865.

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06922

査読有

2) Kadowaki S, Shishido T, Honda Y, Narumi T, Otaki Y, Kinoshita D, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Additive clinical value of serum brain-derived neurotrophic factor for prediction of chronic heart failure outcome. *Heart Vessels*.2016; 31:535-544 doi: 10.1007/s00380-015-0628-6. 査読有

3) Kadowaki S, Shishido T, Sasaki T, Sugai T, Narumi T, Honda Y, Otaki Y, Kinoshita D, Takahashi T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Ishigami A, Takeishi Y, Kubota I: Deficiency of Senescence Marker Protein 30 Exacerbates Cardiac Injury after Ischemia/Reperfusion. *Int J Mol Sci*.2016; 17:pii: E542 doi: 10.3390/ijms170405424. 査読有

4) Narumi T, Shishido T, Otaki Y, Kadowaki S, Honda Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Kinoshita D, Yokoyama M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Tanaka A, Woo CH, Abe J, Takeishi Y, Kubota I: High-mobility group box 1-mediated heat shock protein beta 1 expression attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 82: 1-12

doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.018. 査読有

5) Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Funayama A, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Deficiency of long pentraxin PTX3 promoted neointimal hyperplasia after vascular injury. *J Atheroscler Thromb*. 2015; 22(4): 372-378

doi: 10.5551/jat.26740 査読有

6) Netsu S, Shishido T, Kitahara T, Honda Y, Funayama A, Narumi T, Kadowaki S, Takahashi H, Miyamoto T, Arimoto T, Nishiyama S, Watanabe T, Woo CH, Takeishi Y, Kubota I: Midkine exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 3; 443: 205-210

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.083. 査読有

7) Sasaki T, Shishido T, Kadowaki S, Kitahara T, Suzuki S, Katoh S, Funayama A, Netsu S, Watanabe T, Goto K, Takeishi Y, Kubota I: Diacylglycerol kinase exacerbates cardiac injury after ischemia/reperfusion. *Heart Vessels*. 2014 ; 29: 110-118. doi: 10.1007/s00380-013-0366-6.

査読有

[学会発表](計60件)

1) Kinoshita D, Shishido T, Takahashi T, Yokoyama M, Nishiyama S, Takahashi H,

Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Konta T: Midkine Contributes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension via Cell Surface Nucleolin, American Heart Association 2016, New Orleans (America) ; November 2016, 2) 宍戸 哲郎 Cardiac nuclear High Mobility Group Box 1 in regulating cardiac remodeling, Symposium 4 「 Reverse cardiac remodeling mechanisms and therapeutic strategies」第33回国際心臓研究会日本部会 (ISHR 2016). 東京コンベンションホール (東京都中央区); 2016年12月16・17日

3) Honda Y, Shishido T, Netsu S, Otaki Y, Kinoshita D, Yokoyama M, Kadowaki S, Narumi T, Funayama A, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Growth factor midkine deteriorates cardiac hypertrophy via epidermal growth factor receptor signaling: A novel mediator of cardio-renal interaction. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago (America); November 2014

〔図書〕(計1件)

宍戸 哲郎 医学のあゆみ 2017.01

〔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

宍戸 哲郎 (SHISHIDO, Tetsuro)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60400545