

スポーツにおける心臓の代償性肥大と非代償性肥大を分類する 線維化バイオマーカーの検索

東京慈恵会医科大学	草 刈 洋一郎
(共同研究者) 同	南 沢 享
同	浦 島 崇
同	井 上 天 宏

Bio-Marker for Cardiac Fibrosis in Exercise Induced Cardiac Hypertrophy

by

Yoichiro Kusakari, Susumu Minamisawa

Department of Cell Physiology,

The Jikei University School of Medicine

Takashi Urashima

Department of Pediatrics,

The Jikei University School of Medicine

Takahiro Inoue

Department of Cardiac Surgery,

The Jikei University School of Medicine

ABSTRACT

Continuous pressure overload induces myocardial hypertrophy as an adaptive response. Cardiac fibrosis often follows hypertrophy to prevent myocytes from over-extension. However, massive fibrosis makes cardiac function impaired, which is a maladaptive response. Although a considerable number of studies have demonstrated a series of transcriptional pathways, it still remains equivocal which molecule (s) plays

an important role in initiation of cardiac fibrosis. Therefore, it is important to identify a molecular inducer of fibrosis as a therapeutic target for heart failure. A rat model of cardiac hypertrophy and fibrosis were generated by pulmonary artery banding (PAB).

Four to six weeks after operation, histological analyses with Masson Trichrome stain on short axis section of right ventricular papillary muscles identified that they could be clearly divided into the interstitial fibrosis group (Fibrosis; $17.1 \pm 1.5\%$ of fibrosis area) and the non-fibrotic, but hypertrophic group (Hypertrophy; $3.0 \pm 0.3\%$), in comparison with the sham-operated control (Sham; $2.5 \pm 0.2\%$). We comprehensively analyzed the mRNA expression of 29215 known rat genes in the right ventricle by using GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array (Affymetrix®) to compare a gene expression profile among Sham, Hypertrophy, and Fibrosis (n=3 each). We found that the expression levels of some genes that have not been recognized as a fibrosis-related molecule were significantly higher in Fibrosis than those in Sham and Hypertrophy. Among them, we selected FGF23 and Ncam1, and confirmed expression levels of these genes by RT-PCR (n=6 each). Using OLET-F rats under exercise, we found that adult exercise group rapidly gained body weight when they stopped exercise, and showed significantly higher expression levels of FGF23, Ncam1 and TGF-beta than those in OLET-F young exercise and OLET-F non-exercise group. These data suggest that 1) FGF23 and NCAM1 can be used for cardiac fibrosis-related biomarker and 2) stopping exercise followed by rapid weight gain would be one of the risk factors for cardiac fibrosis.

要 旨

心臓の病態末期には線維化が認められ、収縮不全や不整脈発症の原因因子と考えられている。しかしながら、その発症には未だに不明な点が多い。我々はラット圧負荷モデルを用いて、線維化特異的に増加する因子を網羅的解析にて検索した。圧負荷モデルにおいて線維化特異的に増加した因子は FGF23 と Ncam1 であった。この線維化特異的増加因子が、運動を行った動物モデルにおいても心筋線維化バイオマーカーとして有用かどうか確認するため、OLET-F ラットの自発運動群を用いた検討を行った。OLET-F ラットの壮年期運動群は運動解除によって急速に体重が増加した。一方

で、FGF23 と Ncam1 は壮年期運動群で若年期運動群や非運動群と比較して有意に増加していた。これらのことから、FGF23 と Ncam1 は新規心臓線維化バイオマーカーとして有用であるとともに、壮年期開始運動の途中離脱による急激な体重増加は心臓線維化のリスクが上昇する可能性が示唆された。

緒 言

安全なスポーツ振興のためには、簡便で安価な心臓の機能推測が必要となる。特に最近では、サッカーなどでのトップアスリートの突然死も報告されており、線維化を起こした心筋は特に不整脈の発症確率の高いことが考えられる^{1,2)}。そのため、

心臓線維化の存在を簡便にスクリーニングすることは、これまで捉えきれなかった病態を明らかにし、安全なスポーツ振興に寄与することが期待される。申請者らはこれまでの研究で、線維化を伴う心肥大は興奮収縮連関の破綻を示す非代償性心肥大であり、線維化していない心肥大は興奮収縮連関が保持された代償性心肥大であることを明らかにしてきた³⁾。

心臓の線維化は心筋興奮収縮連関の破綻を来すだけでなく前述したように不整脈発症原因の一つと考えられるため、心臓線維化の有無を明らかにすることは、心臓病態評価をする上で非常に有用と考えられる。

心臓線維化に対する検索・評価は、MRIを用いた画像評価で明らかにされつつある^{4,5)}。しかしながら、心電図・心エコー・採血・尿検査など一般臨床で用いられている検査法では線維化の存在を確認することが非常に困難である。そのため採血や尿検査で得られる生化学的な線維化バイオマーカーを探し出すことは、心臓線維化ならびに心臓の病態評価を簡便なものにすると期待される。

本研究では心臓に圧負荷をかけた動物モデルを用いて、組織学的線維化の有無から分類した心臓標本を網羅的に解析して線維化バイオマーカーを検索し、さらに運動による心臓に対しても同様に線維化バイオマーカーとして有用かどうかを検討・評価することで、スポーツにおける心臓の代償性肥大と非代償性肥大を分類することを可能にするバイオマーカーの検索を目的とする。

1. 研究方法・実験方法・調査方法

(1) 圧負荷心肥大における新規心筋線維化特異的バイオマーカーの検索。

心筋線維化の進展と興奮収縮連関破綻の相互関係を明らかにするため、肺動脈狭窄術によるラット右室圧負荷病態モデルを用いた。ラットはSD

ラット8週齢に対して、肺動脈狭窄手術を行い(PA Banding, n=25)、Sham手術群(Sham, n=12)と比較した。術後4から6週にて心筋摘出を行い、右室乳頭筋を用いて活動電位測定ならびに細胞内Ca²⁺と収縮張力の同時測定を行った。機能測定に用いた乳頭筋標本は、測定後に組織染色を行いMasson Trichrome染色によって線維化の有無を確認した。乳頭筋組織標本に対して免疫染色を施行し、細胞間情報伝達関連蛋白(コネキシン43, Cx43)の発現と線維化進展による空間的相互関係を評価した。

同一心臓サンプルを用いて網羅的解析を行い、線維化の進展に関連する新たな標的蛋白を同定した。DNAマイクロアレイにはAffymetrix社GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Arrayを用いた。サンプルは乳頭筋標本を得た同じサンプルの右室自由壁において行い、新規線維化関連遺伝子の探索を目指した。

(2) 遺伝性肥満モデルOLETFラットを用いた自発運動における心筋線維化バイオマーカー測定。

遺伝性肥満モデルOLETFラット(図1)を用い、



図1 OLETFラット

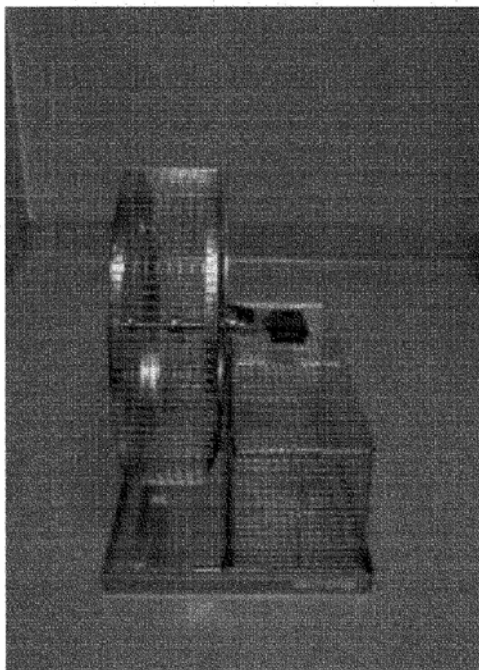


図2 回転ケージ

ヒト若年期相当の5~19週齢時に回転ケージ(図2)を用いた自発運動群(Young-Ex, n=7)とヒト壮年期相当の20~34週齢時に回転ケージを用いた自発運動群(Adult-Ex, n=7)を用いた。これらをOLETF安静群(Sed, n=8)とコントロール非運動群(非肥満発症モデル, Leto, n=8)と比較検討した。運動群は若年期・壮年期ともに、運動期間以外は回転ケージを外して安静状態として飼育した。それぞれ45週齢にて心臓摘出時に体重・心重量など測定後、標本を凍結した。凍結心室筋標本よりmRNAを抽出し、圧負荷モデルで明らかになった線維化バイオマーカーをqRT-PCR法を用いて確認した。

2. 研究結果・実験結果・調査結果

我々は線維化の有無を明確に評価する方法を確立するために、心臓圧負荷モデルを作成し、肥大と線維化の評価を行った。その上で、線維化の有無で肥大心臓を分類し、機能解析を行い、線維化と機能評価の妥当性を確認した。

我々はラット右室圧負荷心筋モデルを構築し、その特性について調べた。そこで明らかになった

のは、1)圧負荷モデルで右心肥大が起こったこと、2)肥大した全てで線維化が起こるわけではなく、肥大して線維化が起こらない心筋(Hypertrophy)と肥大して線維化が起こる心筋(Fibrosis)がある、ということであった。肺動脈狭窄術後、4~6週後の乳頭筋においてマッソン染色にて線維化面積の評価を行ったところ、乳頭筋肥大は同程度に起こしたにも関わらず、心筋線維化・非線維化の分別は図3で示した代表例同様に、面積比(%Fibrosis)においてもはっきり二相性になった。TFG-beta, CTGF, pro-collagen IIIなど各種線維化マーカーmRNA検索をしたところ、線維化心筋(Fibrosis)群ではそれぞれ著しいマーカーの増大を認めた。乳頭筋長軸像にてコネキシン43(Cx43)の免疫組織染色像を確認すると、Fibrosisで長軸方向細胞間結合部位にCx43が集積していない結果が見られた。Fibrosis群では細胞間信号情報伝達の減弱し、線維化が形態的な変化だけでなく、興奮収縮連関に対する機能的な影響も与える可能性が示唆された。

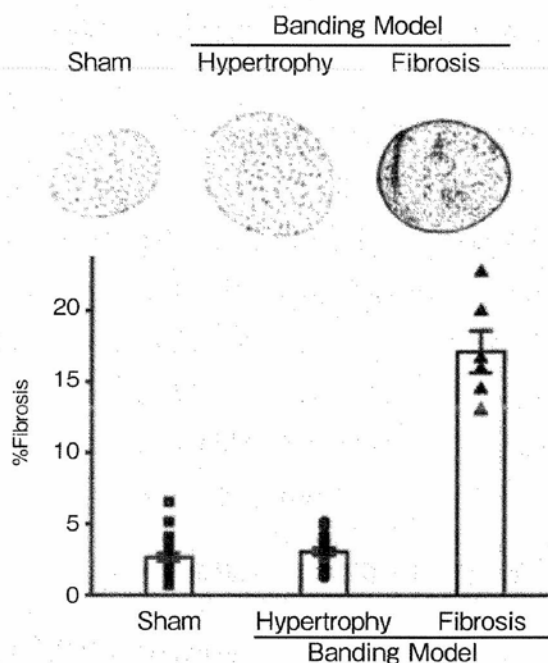


図3 Masson Trichrome染色による乳頭筋短軸像線維化(上図)と線維化面積(下図)。同等の右室圧負荷を行ったところ、乳頭筋の肥大程度は変わらなかったが、線維化面積は大きく異なる二つの群(Hypertrophy, Fibrosis)群に分類することが出来た

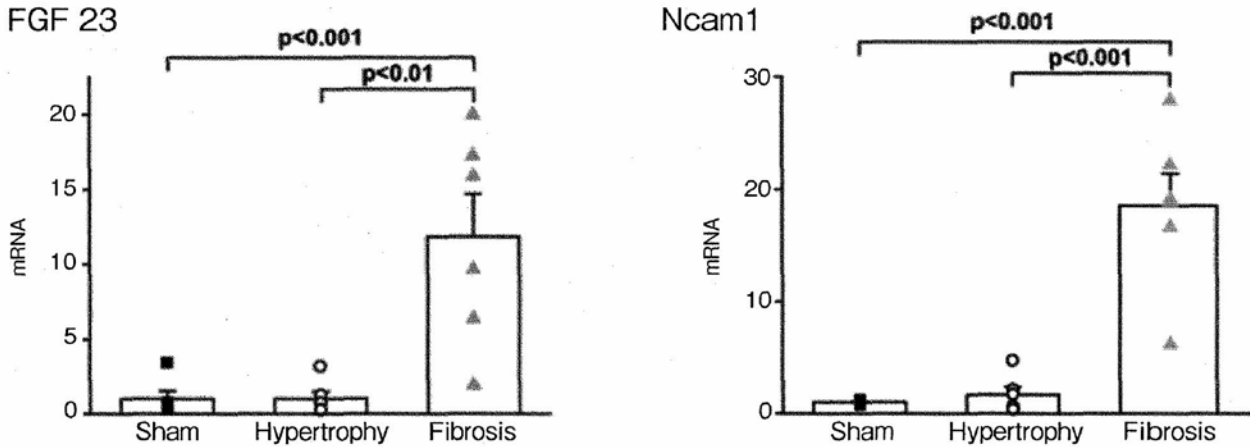


図4 右室圧負荷肥大心筋における線維化発症肥大標本 (Fibrosis) と非線維化発症肥大標本 (Hypertrophy) ならびに非手術標本 (Sham) との比較. FGF23とNcam1は有意差を持ってFibrosis群で増大していた (それぞれn=6)

乳頭筋を用いて収縮機能評価をしたところ, Sham群とHypertrophy群に比較して, Fibrosis群は有意に張力が減弱していた. Aequorin法で細胞内Ca²⁺濃度を同時測定したところ, Fibrosis群とHypertrophy群はSham群と比較してCa²⁺増大が明らかであった. この結果からFibrosis群はCa²⁺増大によっても収縮張力が保たれない, という非代償性変化であることが確認された. 一方でFibrosis群では細胞内Ca²⁺濃度のピークに至るまでの有意な時間延長が認められた. 組織学的所見と併せて考えると, その原因は細胞内Ca²⁺の伝播障害によるものと示唆された.

圧負荷心筋標本に対してDNAマイクロアレイによる網羅的解析を行ったところ (それぞれn=3), Hypertrophy群に比較してFibrosis群で1.4倍以上の増加群が12因子あった. それらをRT-PCR法を用いて発現確認したところ, 図4に示す通りFGF23とNcam1が有意差を持ってFibrosis群で増大していた (それぞれn=6). この2因子が新規心筋線維化特異的増加因子として明らかになった.

一方で運動における影響を検討するため, OLETFラットの安静群 (Sed), 若年期自発運動群 (Young-Ex), 壮年期自発運動 (Adult-Ex), および正常対照 (LETO-Sed) 群の体重変化を測

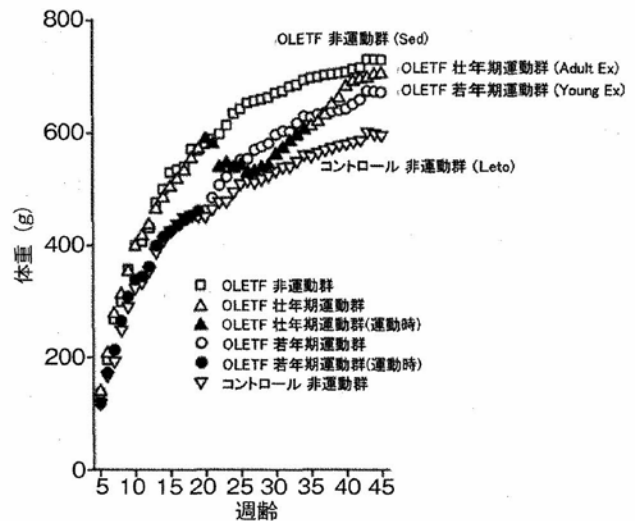


図5 OLETFラットにおける体重変化 (それぞれn=7~8). OLETF非運動群 (Sed)と比較して, OLETF壮年期運動群 (Adult Ex)は運動時 (▲)に速やかに体重減少するものの運動解除後には速やかに体重が回復する. 一方で, 若年期運動群 (Young Ex)は運動時 (●)において体重が減少しており, その影響が運動解除後も維持される傾向にあった

定した. その結果は, 図5に示すようにYoung-Ex群では自発運動期 (5~19週齢時)においてはSed群と比較して明らかに体重が低下しており, 運動解除後 (20週齢以降)も緩やかな体重回復傾向が見られたが, 実験終了時 (45週齢)でも体重はSed群と比較して低下していた. 一方で, Adult-Ex群では自発運動期 (20~34週齢時)において一過性の体重減少が見られた. しかしながら運動解除後 (35週齢以降)で, 体重の速やかな回復傾向が見られ, 実験終了時にはSed群と同

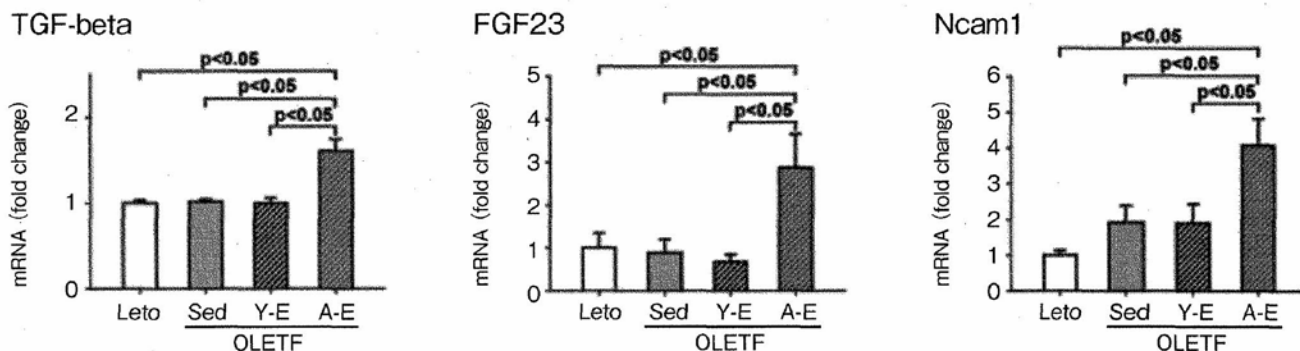


図6 OLETFラットにおける線維化関連因子の変化。TGF-beta (左図), FGF23 (中図), Ncam1 (右図)を示す。この3因子はすべて壮年期運動群 (Adult Ex) で増加していた (n=3~4)

等の体重であった。

運動時, 一日の平均走行距離は Young-Ex 群 $2.3.3 \pm 0.6$ (km), Adult-Ex 群 で 3.0 ± 0.4 (km) (mean \pm SD) であり, 両運動群間での有意差は見られなかった。これらのモデルラットに対して, 圧負荷心筋で明らかになった線維化特定増加因子の検索を行ったところ, Adult-Ex 群では他の群と比較して FGF23 と Ncam1 の mRNA レベルは有意差を持って増加していた (図 6)。また線維化促進因子である TGF-beta も, mRNA レベルで Adult-Ex 群では他の群と比較して有意に増加していた。一方で直接的な線維化マーカーと考えられている CTGF, pro-collagen III は Adult-Ex 群で有意な増加は認めなかった。

線維化面積を心室短軸組織切片に対して Masson Trichrome 染色によって行ったところ, 有意差は認められなかったが, Adult-Ex 群では他の群に対して線維化面積が増大していることが明らかになった (図 7)。

3. 考 察

現在, ANP などの心不全に対するバイオマーカーはいくつか確立されている⁶⁾。しかしながら, 慢性心肥大に対する線維化の有無を明らかにするバイオマーカーは未だ開発されていない。本研究の特色は, 網羅的な解析法を用いて, 心筋線維化決定因子とそれに伴うバイオマーカーの存在を明

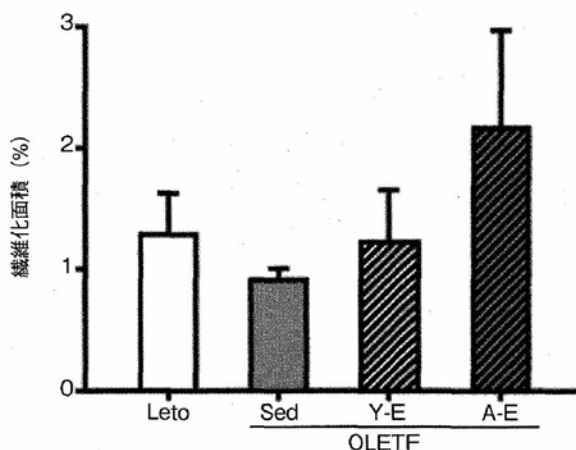


図7 OLETFラットにおける線維化面積の変化 (それぞれ n=7~8)。有意差は認められなかったが, 線維化面積は壮年期運動群 (Adult Ex) で増加傾向にあった

らかにし, 肥大に伴う線維化発症メカニズム解析と線維化発症予測を可能にすることである。

本研究の特徴は, 線維化発症が明白に二相性を成しており, 機能・形態両面から非常に分類しやすいモデルを用いて網羅解析を行ったことである。

肺動脈狭窄手術後, 同週令で同程度の肥大であるにもかかわらず, これらの標本群では線維化面積比 7~10% 前後の中間的・段階的な線維化は認められない。このことは心筋肥大後に線維化を短期間に引き起こす何らかのスイッチが存在していることを予想させる。これはこれら線維化マーカーが, 短期間に線維化を起こすスイッチとしての役割を持っている可能性が非常に低いことを示唆している。

本研究で明らかになったこととして、右室圧負荷により右心肥大が発症する。しかし、肥大心筋すべてが線維化するわけではない。線維化は起こるか・起こらないかの明確な二相性になっているということが挙げられる。一般的な線維化マーカーは、肥大心でも有意に増加しており、短期間に線維化を起こしうる決定因子とは考えがたい。線維化が起こると明らかな機能障害（心筋収縮機能の減弱とイオン伝播障害）が認められる。

本研究において、線維化の有無が明瞭に二分されるモデルを用いていることから、網羅的解析が線維化決定因子を同定する際に有効であることが考えられたので DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイを行った結果、右室圧負荷心肥大モデルにおいて、線維化の有無で明確に発現が異なる因子として FGF23 と Ncam1 が確認された。FGF23 は元々血中リン濃度の調節に関わっている因子として研究されていたが、近年になって心肥大との関連が報告されている⁷⁾。しかしながら、心臓線維化との関連ははまだ明らかにされていない。一方で Ncam1 も本来の名前である neural cell adhesion molecule 1 としてわかるように、一般的に神経系への発現で報告されてきた。しかし最近になって虚血性心疾患における関連性が最近報告されたが⁸⁾、心臓線維化との関連は明らかにされていない。これまでこれら二つの因子が線維化特定増加因子として明らかにならなかったのは、線維化の有無で分類できるモデルが無かったことに起因すると考えられる。我々が報告するこの2つの因子は、今後新たな心臓線維化マーカーとして有用である可能性が考えられた。

我々は心臓線維化マーカーの有用性を調べるため、糖尿病自然発症モデルラット (OLETF)⁹⁾ を用いて、回転ケージ自発運動を幼若時運動群と壮年期運動群の二群に対して運動負荷を行った。OLETF は心臓への影響として肥大と線維化を起こすことが知られている¹⁰⁾。体重変化では運動

群それぞれで運動期における体重減少が見られた。ただし、幼若時運動群は45週齢であっても体重が安静群と比較して低下していたのに対し、壮年期運動群では自発運動終了後にリバウンドと思われる速やかな体重増加が認められ、45週齢時には安静群とほぼ同等に体重が回復していた。

線維化マーカーとして考えられる因子をそれぞれの群で比較検討したところ、TGF-beta が有意差を持って壮年期運動群で増加していた。また、圧負荷心筋で明らかになった線維化特異的増加因子である FGF23 と Ncam1 の両者ともに有意差を持って壮年期運動群で増大していた。一方で、線維化面積においては有意差は認められなかったものの壮年期運動群で増加傾向が認められた。

以前の本学の鈴木らの研究で、壮年期運動群で運動継続中の線維化領域面積に対する評価を行っている。その結果によると、壮年期運動群の運動継続中では心臓線維化領域が非運動群と同等かむしろ減少していることが明らかになっている（未発表データ）。壮年期運動自体が心臓線維化への影響を認められなかったことから考えると、本研究の結果は壮年期に始めた運動を一定期間終了後に運動解除したことにより、急激な体重増加をもたらしたため、その体重リバウンドによる影響が心臓線維化へのスイッチになりつつあることが示唆される。

本研究の問題として、今回我々は OLETF ラットについて心エコーや張力測定などの心機能評価をしていないことが挙げられる。しかしながら、OLETF の壮年期運動群では、45週齢において線維化領域が増加傾向にあることと、線維化を起こす因子と考えられている TGF-beta が有意に増加していることから、このまま飼育期間を延長すると早晚心筋線維化が招来されることが予想される^{10,11)}。

一方で、OLETF ラットを用いた実験では、運動だけでなく食餌量を調節して体重維持を行った

群もある。これらは食餌量調節を解除すると急激な体重リバウンドが認められている。今後はこのような食餌量調節による急激な体重増加についても線維化マーカーを応用して検討したいと考えている。

以上のことから、FGF23とNcam1は新規心筋線維化マーカーとして有用性があり、壮年期の運動は途中離脱によって体重の急速なリバウンドが起こると、心筋線維化を招来する可能性が示唆された。

4. 主張・結論・結語・総括・まとめ

新規心筋線維化マーカーによって、運動離脱による心筋線維化の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団からの助成を受けて行われました。研究助成に対して厚く御礼申し上げます。早稲田大学大学院の上杉健君にはマイクロアレイを始め多くの実験を遂行してもらいました。東京慈恵会医科大学・臨床検査医学講座の鈴木政登教授と進藤大典君から貴重な運動モデルのサンプルと様々なご支援をいただき、新たなデータと解釈を得ることが出来ました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Patil H.R., O'Keefe J.H., Lavie C.J., Magalski A., Vogel R.A., McCullough P.A., Cardiovascular damage resulting from chronic excessive endurance exercise. *Missouri medicine.*, 109:312-321 (2012)
- 2) Waterhouse D.F., Ismail T.F., Prasad S.K., Wilson M.G., O'Hanlon R., Imaging focal and interstitial fibrosis with cardiovascular magnetic resonance in athletes with left ventricular hypertrophy: Implications for sporting participation. *British journal of sports medicine.*, 46 Suppl 1:i69-77 (2012)
- 3) Kusakari Y., Urashima T., Minamisawa S., Kurihara S., Impairment of E-C coupling in cardiac papillary

- muscle with fibrosis. *The journal of physiological sciences :The journal of physiological science.*, 63 (Suppl1) : S176 (2013)
- 4) Ho C.Y., Lopez B., Coelho-Filho O.R., Lakdawala N.K., Cirino A.L., Jarolim P., Kwong R., Gonzalez A., Colan S.D., Seidman J.G., Diez J., Seidman C.E., Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. *The New England journal of medicine.*, 363:552-563 (2010)
 - 5) Gulati A., Jabbour A., Ismail T.F., Guha K., Khwaja J., Raza S., Morarji K., Brown T.D., Ismail N.A., Dweck M.R., Di Pietro E., Roughton M., Wage R., Daryani Y., O'Hanlon R., Sheppard M.N., Alpendurada F., Lyon A.R., Cook S.A., Cowie M.R., Assomull R.G., Pennell D.J., Prasad S.K., Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA : the journal of the American Medical Association.*, 309:896-908 (2013)
 - 6) Volpe M., Rubattu S., Burnett J., Jr., Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: Current use and perspectives. *European heart journal.* (2013) (in Press)
 - 7) Faul C., Amaral A.P., Oskouei B., Hu M.C., Sloan A., Isakova T., Gutierrez O.M., Aguillon-Prada R., Lincoln J., Hare J.M., Mundel P., Morales A., Scialla J., Fischer M., Soliman E.Z., Chen J., Go A.S., Rosas S.E., Nessel L., Townsend R.R., Feldman H.I., St John Sutton M., Ojo A., Gadegbeku C., Di Marco G.S., Reuter S., Kentrup D., Tiemann K., Brand M., Hill J.A., Moe O.W., Kuro O.M., Kusek J.W., Keane M.G., Wolf M., Fgf23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of clinical investigation.*, 121:4393-4408 (2011)
 - 8) Tur M.K., Etschmann B., Benz A., Leich E., Waller C., Schuh K., Rosenwald A., Ertl G., Kienitz A., Haaf A.T., Brauninger A., Gattenlohner S., The 140-kd isoform of cd56 (ncam1) directs the molecular pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *The American journal of pathology.*, 182:1205-1218 (2013)
 - 9) Kawano K., Hirashima T., Mori S., Saitoh Y., Kurosumi M., Natori T., Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka long-evans tokushima fatty (oletf) strain. *Diabetes.*, 41:1422-1428 (1992)
 - 10) Lee J.E., Yi C.O., Jeon B.T., Shin H.J., Kim S.K.,

Jung T.S., Choi J.Y., Roh G.S., Alpha-lipoic acid attenuates cardiac fibrosis in otsuka long-evans tokushima fatty rats. *Cardiovascular diabetology.*, 11:111 (2012)

- 11) Davis J., Molkentin J.D., Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. *Journal of molecular and cellular cardiology.*, (2013) (in Press)