

新規BMP拮抗分子に着目した心筋細胞の線維化機構の解明

小林洋輝¹⁾, 常見明子¹⁾, 村田悠輔¹⁾, 松岡友実¹⁾, 中村吉宏¹⁾, 阿部雅紀¹⁾

Functional analysis of novel BMP antagonist as causal factor of myocardial fibrosis

Hiroki KOBAYASHI¹⁾, Akiko TSUNEMI¹⁾, Yusuke MURATA¹⁾, Tomomi MATSUOKA¹⁾,
Yoshihiro NAKAMURA¹⁾, Masanori ABE¹⁾

要旨

研究代表者は、これまでの研究によりBMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)が末期腎不全の発症予測バイオマーカーであること、さらに腎線維化や近位尿管細胞のEMT誘導に関与する可能性を見出してきた。本研究ではこのNBL1の心筋における役割を明らかにすべく、細胞実験・動物モデル・臨床検体解析を通じて、NBL1の心筋線維化機構への関与を包括的に検討した。その結果、NBL1がEndMT様の応答を誘導すること、心筋ストレスモデルにおいて線維化・炎症を増強する可能性が示された。また、透析患者においてはNBL1自体のCVD予測能は確認されなかったが、多数の関連タンパク質が同定され、新たな多因子予測モデル構築の契機となった。

1. はじめに

研究代表者はこれまで、糖尿病性腎症患者の血漿中タンパク質を網羅的に解析し、BMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)が末期腎不全(ESRD)の発症を強力に予測するバイオマーカーであることを、世界で初めて報告した^{1,2)}。さらに、NBL1ノックアウトマウスにおいては腎線維化の進行が著明に抑制されることを確認している(未発表)。これらの所見は、NBL1が単なるバイオマーカーではなく、線維化の病態進展に関与する因子である可能性を示唆する。また、ヒト近位尿管細胞においてNBL1を添加して培養したところ、上皮間葉転換(EMT)様の変化が認められた。これまで、BMP7は腎線維化を抑制することが報告されており、その拮抗分子であるNBL1はBMP7の抗線維化作用を阻害すると考えられる。このことから、NBL1は腎臓のみならず、心筋におい

ても線維化の進展に関与している可能性があると考えた。

本研究では、①培養内皮細胞に対するNBL1の役割、②NBL1ノックアウトマウスを用いてNBL1が心臓の障害にどのような影響を及ぼすかについて検討した。また、③透析患者において、血中NBL1が心血管疾患の発症予測バイオマーカーになりうるかについて解析し、臨床的にもNBL1が新血管疾患の発症に関連するかについて検討した。

2. 対象及び方法

①培養細胞実験：HUVECを用いた内皮間葉転換(EndMT)解析

心筋線維化においては、線維芽細胞および筋線維芽細胞の活性化・増殖が中心的な役割を果たす。その線維芽細胞の一起源として、左心室や心室中隔に存在する心臓内膜細胞が、EndMTを経て線維芽細胞

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
研究責任者: 小林洋輝, kobayashi.hiroki@nihon-u.ac.jp

胞へと分化することが報告されている。EndMTは、内皮由来細胞が間葉系形質（ α -SMAやfibronectinの発現）を獲得し、線維化に直接関与する過程である。本研究では、NBL1がEndMTを誘導しうるかを評価するため、実験モデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を使用した。HUVECは心臓内膜細胞とは異なるが、内皮細胞としての表現型と応答性を有しており、EndMTに関する研究で広く活用されている細胞系である。そこで、HUVECをサブコンフルエントまで培養した後、リコンビナントNBL1が1000ng/mlになるように培地に添加して3～7日間培養した。遺伝子発現解析は、TRIzolで細胞を回収、total RNAを精製後に逆転写し、EndMTマーカーをリアルタイムPCRで解析した。またHUVECのマーカーであるVE-cadherinについては、固定後に蛍光免疫染色を行った。

②動物実験：NBL1ノックアウトマウスを用いた心筋障害モデルの作製と評価

次に、NBL1が心臓線維化に関与するかについて、非選択的 β アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテノールを用いた動物モデルで検討した（日本大学動物実験計画書 承認番号AP24MED031-1）。NBL1ノックアウト（KO）マウス（-/-）およびWTマウス（+/+）に対し、イソプロテノールを浸透圧ポンプ（Model 1004 pump、リザーバー容量100 μ l、ALZET Tech）に注入し、投与量が20 mg/kg/dayで7日間皮下持続投与することで心筋障害を誘導した。これは心肥大・線維化を再現可能な確立されたモデルであり、心筋ストレスに対する各群の反応を比較することで、NBL1の病態関与を検証した。マウス心臓は、Sirius Red染色やMasson trichrome染色による線維化評価を行い、あわせて線維化関連遺

伝子（COL1A1、 α -SMA、fibronectinなど）および炎症・損傷関連マーカーの発現量を検討した。

③臨床研究：維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討

日本大学医学部附属板橋病院の関連透析クリニック（6施設）に通院する維持血液透析患者を対象に保存血液検体を用いて血中NBL1を網羅的蛋白測定であるOlink explore HTを用いて測定し、将来の心血管イベント（致死性、非致死性の心筋梗塞、脳卒中、狭心症）の発症との関連をFold change analysisを用いて解析した。尚、本研究計画は日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会に受理され（RK-220308-1）、全参加患者からの同意書を取得している。

3. 結果

①培養細胞実験：HUVECを用いた内皮間葉転換（EndMT）解析

HUVECをリコンビナントNBL1 1000ng/ml添加した培地で3日間培養した後のEndMTに関連する遺伝子をリアルタイムPCRで解析したところ、コントロール群と比較して、NBL1添加群でfibronectinの有意な上昇が認められた（Fig.1）。また、HUVECにリコンビナントNBL1 1000ng/ml添加した培地で7日間培養した後に固定し、血管内皮細胞に特異的に発現し、内皮細胞の形態を維持するVE-cadherinに対する蛍光免疫染色を行った（Fig.2）。コントロールのHUVECでは、細胞間にVE-cadherinが認められていたが、NBL1で刺激したHUVECにおいては、EndMTを起こすTGF β 1（ポジティブコントロール）と同様に、VE-cadherinの発現の減少が認められた。これらの結果よりNBL1が内皮細胞の形態およ

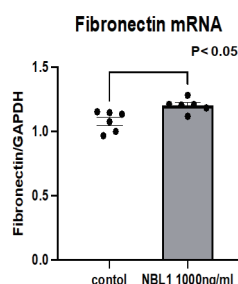


Fig 1. リアルタイムPCRによる発現解析（Day3）

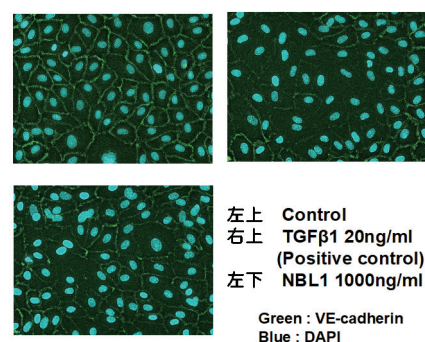


Fig 2. VE-cadherinの蛍光免疫染色（Day7）

び分子マーカーの変化を誘導し、EndMT様の細胞応答を促進する可能性があることを示している。今後は、NBL1がEndMTを誘導する際に関与する分子機構について、より詳細に検討する予定である。

②動物実験：NBL1ノックアウトマウスを用いた心筋障害モデルの作製と評価

NBL1ノックアウト (KO) マウス (-/-) および野生型 (WT) マウス (+/+) に対して、イソプロテレノールを20 mg/kg/dayで7日間、浸透圧ポンプを用いて皮下持続投与し、心筋障害モデルを作製した。投与前後の体重変化は、明確な減少傾向は認められなかった。一方、心臓重量比 (HW/BW) については、イソプロテレノール非投与のコントロール群と比較して、投与群では増加傾向が確認された。心臓組織からtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った結果、イソプロテレノール投与群では、コントロール群に比べて線維化関連遺伝子 (fibronectin, α -SMA, TGF- β 1, CTGF等) の発現が上昇しており、加えて、炎症性ケモカインであるMCP-1の発現も増加していた。また、Sirius Red染色では、投与群において、コラーゲン線維の増加が認められた。これらの結果は、イソプロテレノール投与によって心筋組織において線維化および炎症応答が惹起されることを示唆している。なお、現時点では統計学的検定に必要な実験頭数には達していないため、引き続き動物実験を継続中である。今後は、NBL1 KOマウスとWTマウス間で線維化や炎症応答に差異が認められるかどうかについて、組織学的および分子生物学的評価を通じて検討を進めていく予定である。

③臨床研究：維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討

注目していたNBL1については、血中濃度と2年以内のCVD発症との間に有意な関連は認められなかった。一方で、網羅的な探索により、多数の新規蛋白がCVDリスクと有意に関連することが明らかとなった。図に示すように (Fig.3 参照)、全5440蛋白のうち、152蛋白がCVD発症群で有意に上昇 ($\log_2 FC \geq 0.263$, $FDR < 0.1$)、15蛋白が有意に低下 ($\log_2 FC \leq -0.263$, $FDR < 0.1$) していた (図：Volcano plot)。これらの候補蛋白群には、NBL1が関与する重要な線維化 signaling である TGF- β pathway に含

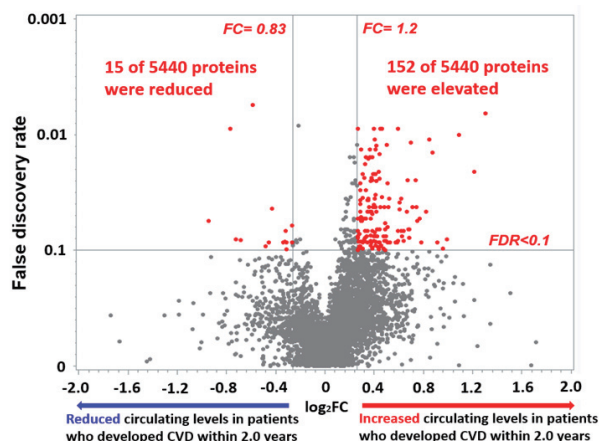


Fig 3. CVD発症群と非発症群における血中蛋白プロファイルの違い

まれる蛋白に加えて、以下のような生物学的特性が確認された：

- ・慢性炎症・免疫調節に関与するサイトカインやケモカイン様分子：慢性炎症状態が持続する透析患者では、軽微な免疫活性化がCVD進展の重要な引き金となる可能性があり、本研究で同定された複数の分子は、自然免疫系やT細胞活性と関連していた。
- ・血管構造や機能に関与する内皮細胞関連因子：血管内皮障害、血管リモデリング、マトリックス代謝に関与する因子が複数含まれており、透析患者に特有の動脈硬化の進行メカニズムを反映している可能性がある。
- ・代謝・ミトコンドリア機能に関与する酵素や構造蛋白：酸化ストレスやエネルギー代謝異常が心筋障害に波及する経路として注目されており、関連分子のいくつかはミトコンドリア局在や脂質代謝に関与していた。
- ・線維化や組織修復に関連する因子：特に心不全病態との関連が示唆される因子も複数含まれており、リモデリングに伴う組織硬化の進展が心血管イベントの背景にあることが示唆される。
- ・細胞ストレス応答やアポトーシスに関連する分子：カスパーゼ、ヒートショックタンパク、ユビキチン関連分子など、透析患者における細胞損傷と修復のバランス破綻を反映する可能性がある。

以上のように、本研究ではNBL1自体の有意性は確認されなかったものの、透析患者におけるCVD発症の新たな分子基盤が明らかとなった。今後は、

これらの蛋白を含む多因子予測モデルの構築、および外部コホートにおける再現性検証を通じて、個別化予防介入や治療標的の探索に発展させる必要がある。

4. 考察

本研究では、新規BMP拮抗分子であるNBL1が、心筋線維化の進展にどのように関与するかを、細胞実験、動物モデル、臨床検体の三段階で包括的に検討した。研究代表者がこれまでに糖尿病性腎症患者を対象とした研究で明らかにしてきたNBL1の腎線維化への関与に続き、本研究により、NBL1が腎臓に限らず心筋にも線維化促進因子として作用する可能性が示された。

まず、HUVECを用いた培養実験では、NBL1添加によってEndMT関連マーカーであるfibronectinの発現が有意に上昇し、内皮マーカーであるVE-cadherinの発現が減少したことが確認された。これらの結果は、NBL1が内皮細胞の形態的および分子的变化を誘導し、EndMT様の細胞応答を促進する可能性を示唆する。EndMTは心筋線維化における新たな線維芽細胞供給源として注目されており、心臓内皮細胞が間葉系細胞へと転換することで線維芽細胞を形成し、心筋組織のリモデリングに寄与する。この点で、NBL1がEndMT誘導因子として機能する可能性は、心筋線維化の分子機構を解明するうえで重要な意味を持つ。

次に、イソプロテレノール誘導心筋障害モデルを用いた動物実験では、NBL1 KO マウスではWTマウスに比べて線維化関連遺伝子 (fibronectin, α -SMA, TGF- β 1, CTGF) の発現上昇が抑制されており、加えてSirius Red染色でのコラーゲン沈着も軽度であった。これらの所見から、NBL1欠損はイソプロテレノールによる心筋線維化および炎症反応を抑制する保護的効果を有する可能性がある。また、炎症性ケモカインであるMCP-1の発現もWT群で有意に上昇し、NBL1が炎症応答の促進にも寄与することが示唆された。BMP7は本来、抗線維化・抗炎症作用を有することが知られており、NBL1はBMP7の作用を拮抗することで、TGF- β 経路を相対的に優位にし、線維化および炎症反応を促進すると考えられる。

さらに、維持透析患者における臨床的な解析で

は、NBL1の血中濃度と将来の心血管イベント発症との明確な相関は認められなかったものの、Olink explore HTによる網羅的評価により、CVD発症群で有意に変動する複数の候補タンパク質が同定された。これらの多くは、TGF- β /BMP経路、慢性炎症、血管内皮障害、代謝異常、ミトコンドリア機能、細胞ストレス応答などに関連しており、NBL1が直接・間接的に関与する可能性のある生物学的ネットワークの広がりを示している。特に、透析患者のような慢性炎症状態においては、軽度な分子変動が複合的に蓄積し、CVD発症リスクを高めることが想定され、NBL1を超えて今回同定した多様な血中タンパク質が複合的に病態に関与する可能性が示唆された。

NBL1はもともと神経芽細胞腫における腫瘍抑制因子として発見されたが、近年では線維化や炎症など多様な病態への関与が注目されている。今回の研究により、NBL1がBMPシグナルを介して腎・心いずれの臓器でも線維化を促進することが示され、心腎連関病態における中心的役割を担う可能性が明らかとなった。今後、NBL1の発現調節因子や作用機序をより詳細に解明すること、さらにはNBL1を標的とした治療介入の有効性をin vivoおよび臨床試験で検討することが期待される。さらに、維持透析患者を対象とした血中蛋白質の網羅的解析により同定した新規蛋白についてはNBL1とは別に、別コホートでのValidationや機能解析を進める予定である。

一方で、本研究にはいくつかの限界も存在する。まず、動物実験における検体数が限られており、統計学的有意差を明確に示すには更なる頭数の追加が必要である。また、EndMTの誘導においても、VE-cadherinやfibronectinに加えて、SnailやSlugといったトランスクリプションファクターの発現や細胞運動性の評価を通じた包括的解析が求められる。さらに、臨床検体解析においてNBL1の有意な予測能を認めなかったことから、その他の多因子予測モデルやパネルマーカーとしての応用を検討する必要がある。

以上より、NBL1はBMPシグナルを介して心筋線維化および炎症を促進する新たな分子であり、腎疾患のみならず心疾患の進展にも関与する可能性が示唆された。特に心腎連関病態における分子ターゲットとしての価値は高く、今後のトランスレーショナ

ルリサーチや創薬研究への応用が強く期待される。

5. 結語

本研究により、NBL1がBMPシグナルを抑制することを通じて心筋線維化および炎症に関与する可能性が示された。細胞・動物・臨床の各実験系で一貫した所見が得られ、NBL1が心腎連関に関与する共通の線維化促進因子であることが示唆された。今後、NBL1を標的とした診断法および治療法の開発が期待される。

謝辞

本研究は、令和6年度本部助成金(若手研究者助成金)の助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Kobayashi H, Looker HC, Satake E, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is a circulating protein associated with progression to end-stage kidney disease in diabetes. *Sci Transl Med* 2022;14(657):eabj2109.
- 2) Kobayashi H, Satake E, Murata Y, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2023;36(8):2245-2256.