

# 学位論文抄録

Human Epididymis Protein 4 Predicts Progressive Fibrosis and Cardiovascular Events in Patients with Dilated Cardiomyopathy

(Human Epididymis Protein 4 は拡張型心筋症における進行性の間質線維化に寄与し心血管予後を予測する)

山本 正 啓

指導教員

辻田 賢一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器内科学

## Abstract of the Thesis

### **Background**

Cardiac fibrosis plays a crucial role in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCM). Human epididymis protein 4 (HE4) is a secretory protein expressed in activated fibroblasts that exacerbates tissue fibrosis. In the present study, we investigated the clinical utility of HE4 measurement in patients with DCM and its pathophysiological role in preclinical experiments *in vivo* and *in vitro*.

### **Methods and Results**

We measured serum HE4 levels of 87 patients with DCM. Endomyocardial biopsy expressed severe fibrosis only in the high HE-4 group ( $p < 0.0001$ ). Echocardiography showed that left ventricular end-diastolic diameter tend to decrease over time ( $58 \pm 7.3$  to  $51 \pm 6.6$  mm,  $p < 0.0001$ ) in the low HE4 group ( $< 59.65$  pmol/L [median value]). HE4 was significantly associated with risk reduction of mortality and cardiovascular hospitalization in multivariate Cox model. *In vivo*, HE4 was highly expressed in kidney and lung tissue of mouse, and scarcely expressed in heart. In genetically induced DCM mouse model, HE4 expression increased in kidney but not in heart and lung. *In vitro*, supernatant from HE4-transfected human embryonic kidney cells (HEK) 293T cells enhanced transdifferentiation of rat neonatal fibroblasts and increased expression of fibrosis-related genes, and was accompanied by the activation of ERK signaling in cardiac fibroblasts. Treatment with an inhibitor of upstream signal of ERK or a neutralizing HE4 antibody canceled the profibrotic properties of HE4.

### **Conclusions**

HE4 functions as a secretory factor activating cardiac fibroblasts, thereby inducing cardiac interstitial fibrosis. HE4 could be a promising biomarker for assessing ongoing fibrosis and a novel therapeutic target in DCM.

## 学位論文抄録

【 目的 】 拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy; DCM) は左室の拡大とそれに伴う収縮力低下や循環不全で定義される心臓疾患であり、その予後は非常に悪い。DCM の病理学的な特徴の一つとして進行性の心筋間質線維化が挙げられ、線維化の進行はさらにその予後を悪化させることが示されているが、進行性の線維化を評価する指標はこれまで存在しなかった。近年、Human epididymis protein 4 (HE4) が通常の間質線維芽細胞においては発現しておらず、活性型線維芽細胞 (筋線維芽細胞) への分化により特異的に発現し、かつ細胞外へ分泌されることが示された。このような背景から、DCM における HE4 血中濃度測定の臨床的意義およびその機序の解明を目的とし、基礎・臨床の両面から検討を行うこととした。

【 方法・結果 】 初めに DCM 患者における HE4 の挙動を明らかにすべく当施設にて 2009 年 1 月から 2018 年 12 月の間に拡張型心筋症と診断された 87 例の評価を行った。HE4 の中央値 (59.65 pmol/L) で 2 群に分け比較を行ったところ、心筋生検サンプルを用いた病理学的検討にて HE4 高値群でより膠原線維領域が広範囲であることが示された ( $p < 0.0001$ )。なお、HE4 高値群において有意に推定糸球体濾過量 (eGFR) が低値であった ( $p < 0.0001$ )。血中 HE4 値を測定した後の経過を平均 1.8 年フォローしたところ、HE4 低値群においてのみ経時的な左室病的リモデリングの改善が認められ (左室拡張末期径の縮小 [平均値: 58→51mm;  $p < 0.0001$ ]、左室拡張末期容積係数の縮小 [平均値: 90→59ml/m<sup>2</sup>;  $p < 0.0001$ ]、左室駆出率の改善 [平均値: 35→49%;  $p < 0.0001$ ]、さらにこの患者群では心血管イベントの発生率も有意に低いことが示され (ログランク検定:  $p < 0.0001$ )、多変量解析においても HE4 が独立した予後規定因子であることが示された。続いて、変異トロポニン T をノックインした DCM モデルマウスにおいて DCM 病態における HE4 の発現プロファイルを確認したところ、腎臓での HE4 発現が野生型マウスと比較し有意に亢進することが確認された ( $p = 0.038$ )。ヒトの腎細胞由来である Human Embryonic Kidney cells 293T (HEK 293T) 細胞にプラスミドを用いて HE4 を過剰発現させ、その培養上清を心臓線維芽細胞に加えたところ、I 型コラーゲンや活性型線維芽細胞の指標とされる  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) や Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の増加が確認された。さらに、細胞内シグナルを評価したところ、HE4 を過剰発現させた HEK 293T 細胞の培養上清を加えた群において Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) が有意に亢進していた。さらに ERK の活性化を阻害する、もしくは Anti HE4 抗体を加えるといったキャンセル実験を行った。その結果、HE4 を含む培養上清を加えることで誘発される心臓の線維芽細胞における線維化と関連する因子の蛋白量や messenger RNA 量の増加がキャンセルされた。

【 考察 】 HE4 はその血中濃度の増減から有用なバイオマーカーとなり得るのみでなく、それ自体が進行性の心臓線維化に寄与している可能性が示唆される。また、その機序として、特に DCM の病態においては腎臓由来の HE4 が心臓の線維芽細胞の活性化を促すことで心臓の線維化を惹起している可能性が示された。

【 結論 】 HE4 は進行性の線維化に関連し、DCM 患者における将来の左室リモデリングや心血管イベント発生とも関連することが示唆された。線維化に寄与する機序としては、腎臓由来の HE4 が心臓の線維芽細胞内の ERK のリン酸化を介した活性化型線維芽細胞への分化を促すことが示唆された。HE4 の血中濃度測定は DCM の新たな治療戦略に寄与する可能性があるものと考えられる。