

平成21年6月16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790540

研究課題名（和文）心臓弁に発現する血管新生・骨形成抑制因子ペリオスチンの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of antiangiogenic factor periostin in the cardiac valve

研究代表者

伯野 大彦（HAKUNO DAIHIKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80286476

研究成果の概要：

本研究では、ストレス反応性蛋白ペリオスチンの心臓弁膜症進展における役割を解析した。ペリオスチンはマウス胎生期より心臓弁特異的に発現し、ヒト正常弁では内皮細胞下で α -smooth muscle actin と共発現しており、病的弁では血管新生と共にその発現領域は約4倍に増加した。*In vitro* ではペリオスチンは内皮細胞の血管新生能を有意に増強した。高脂肪食負荷により、野生型マウスでは大動脈弁の有意な肥厚、弁輪部の血管新生・線維化の増加を認めたと、ペリオスチン遺伝子欠損マウスではそれらの変性が軽減しており、ペリオスチンの弁変性作用が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓弁、血管新生、VEGF、matrix metalloproteinase

1. 研究開始当初の背景

わが国における高齢者人口の増加および食生活の欧米化にともない、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患が近年著しく増加している。一方、心臓の弁の変性機序は血管の動脈硬化のそれと類似していることが指摘されてお

り、加齢による変性を原因とする心臓弁疾患も近年増加傾向にある。心臓弁は正常な心室機能を保つために必須の組織であるが、ひとたび変性が進むと不可逆的で有効な薬物根治療法はなく、外科的弁置換術が唯一の根治療法である。これまで心臓弁膜症発症に至る分子機序の解明はなおざりに

されてきたが、最近弁変性の機序に関する基礎的研究が進み、単球、Tリンパ球などの炎症性細胞浸潤やLDLの取り込みが弁の変性石灰化の重要な原因であることが報告された。しかしながら、HMG還元酵素阻害薬（スタチン）による石灰化大動脈弁の狭窄予防効果は最近の前向き無作為臨床試験では否定的であった（N Engl J Med, 352, 2389-97, 2005）。

生体において、軟骨と眼球は代表的な無血管組織であることが知られており、これらの組織では無血管性が保てなくなり血管浸潤が生じると、関節炎や失明などの重篤な疾患に至ることが知られている。我々は、正常な心臓弁が心臓の他の部位とは異なり組織学的に無血管野であることに着目し、弁が発現する血管新生阻止因子をスクリーニングした。その結果、軟骨や眼球に特異的に発現するコンドロモジュリンI (Chm-I) がマウス、ラット、ヒト成体の心臓でも健常弁に特異的に発現していることを見出した。動脈硬化モデルであるApoE遺伝子欠損マウスの弁や、ヒトの感染性心内膜炎、リウマチ性弁膜症、および動脈硬化性弁膜症症例の変性弁では、Chm-Iの発現低下領域に一致してVEGF-Aの発現および血管新生の亢進を認めること、Chm-I遺伝子欠損マウスでは弁における血管新生が亢進し肥厚変性が進行することを発見し、Chm-Iが心臓弁における血管新生を抑制することにより弁の機能を維持していることを報告した（Nat Med, 12, 1151-59, 2006）。一方で、他の弁変性関連因子も健常弁の機能維持に関与している可能性が示唆された。マウスの大動脈弁狭窄症モデルはこれまで知られていなかったが、野生型マウスに高脂肪高炭水化物食を一定期間投与することで肥満、高脂血症、高血糖および大動脈弁の有意な変性と狭窄をきたすことが最近報告された（J Am Coll Cardiol, 47, 850-55, 2006）。したがって、このモデルを用いて上記の弁変性関連因子による効果を検証することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの成果を受けて、心臓弁間質細

胞においてChm-I以外に発現する弁変性関連因子を同定し、心臓弁膜症発症の分子機序をさらに解明することを目的とする。我々は、健常弁と弁膜症の変性弁とに発現するmRNAを遺伝子チップ解析し、変性弁で発現が有意に変化する因子のうち、血管新生および骨形成促進あるいは抑制活性を示す遺伝子をスクリーニングした。本研究ではこれらのうち、「ペリオスチン」に焦点をあて、病的変性弁における発現の変化、培養弁細胞の分泌と機能解析、ペリオスチン遺伝子欠損マウスの作製と弁表現型の解析、ペリオスチン精製蛋白関連製剤投与による弁変性予防効果の検証を行うことを計画している。

3. 研究の方法

(1) マウス、ラット、ヒトの健常弁および変性弁におけるペリオスチンの発現解析 野生型マウスに高脂肪高炭水化物食を16週間投与することで、形態的、機能的に大動脈弁の有意な変性石灰化と狭窄をきたす（変性狭窄弁モデル）ことが知られている。そこで、通常食あるいは高脂肪高炭水化物食を16週間投与してそれぞれ野生型あるいは変性狭窄弁を有するマウスを作製する。次に、ウサギ抗マウスペリオスチンポリクローナル抗体を用いてこのマウスの弁の免疫染色を行い、ペリオスチン陽性細胞密度を解析する。陰性対照抗体には正常ウサギ血清を用いる。同時に、血管新生、炎症性細胞浸潤、脂肪沈着、石灰化といった弁の変性を確認するために抗VEGF抗体、抗Von Willebrand factor抗体、抗CD11b抗体による免疫染色、Sudan III染色、von Kossa染色を施行する。さらに、剖検例、心臓弁膜症手術例におけるヒト加齢変性性、リウマチ性、感染性心内膜炎後の弁の病理標本作製し、同様の染色を行う。抗ペリオスチン抗体はすでに東京工業大学大学院生命理工学研究科 工藤明教授と共同研究計画を結んでおり、供与を受ける予定である。ヒト変性弁は、剖検例に関しては本大学病理学教室 岡田保典教授、手術例に関しては本大学心臓血管外科 四津良平教授の協力を得て症例を集めている。なお、

マウスの心臓弁の単離は極めて困難であるためペリオスチン発現量の定量的評価として、ラットの野生型および変性狭窄弁モデルの弁を立体型顕微鏡下で採取し、定量的 PCR 法、Western blot 法によりそれぞれ mRNA、蛋白レベルでの変化を検討する。

(2) ペリオスチン蛋白の機能解析

In vitro解析 最近我々が確立したラット弁間質細胞の explant culture を行い、この培養上清あるいは弁間質細胞でヒト冠動脈内皮細胞を刺激して、内皮細胞の遊走能や血管腔形成能を解析する。内皮細胞の遊走能は8 μ m フィルター孔付き24 ウェルの modified Boyden chamber を用いて各刺激による遊走細胞数を計測する。血管腔形成能については、低増殖因子マトリゲル®で前処置した24 ウェル内の培養内皮細胞を一定時間刺激後、顕微鏡1視野あたりに形成した管腔構造長の総和を解析する。これらの実験に必要な方法、技術はすでに我々の研究室に全て準備されている(Nat Med, 12, 1151-59, 2006で報告)。一方、増殖因子TGF β およびBMP2/4刺激により弁間質細胞が骨芽細胞に分化しAlkaline phosphataseやOsteopontinなどの骨基質を産生することが知られている。同様の方法で弁間質細胞を刺激し、骨芽細胞への分化能や骨基質産生能の解析を行う。

ペリオスチン遺伝子欠損マウスの作製 (1)で変性弁におけるペリオスチン蛋白の発現変化を確認したのち、ペリオスチン遺伝子欠損マウスを作製する。ペリオスチン遺伝子欠損 BL6/J マウスはすでに前出の東工大 工藤教授のもとで作製中である。

ペリオスチン遺伝子欠損マウスの弁の表現型解析 上記で作製した遺伝子欠損マウスの弁の表現型を解析する。高脂肪高炭水化物食投与による弁の血管新生、変性石灰化および狭窄の程度を免疫染色、心臓超音波を用いて野生型群と比較検討する。前出の特異的抗体による免疫染色を行い、VEGF および Von Willebrand factor 陽性細胞数、弁断面の毛細血管密度、石灰化面積を定量的に解析する。心臓超音波では M モードおよびカラード

ップラーにより大動脈弁の肥厚、弁通過部の駆出血乱流、弁口面積を定量的に計測する。

(3) ペリオスチン蛋白関連製剤投与による大動脈弁の変性、狭窄予防効果の検討

上記の遺伝子欠損マウスで弁の変性が野生型と比較して変化していることを確認したのち、前出の大動脈弁狭窄症モデルマウスにおいてペリオスチン精製蛋白関連製剤の腹腔内反復投与が弁の変性石灰化や狭窄の進行を阻止できるか否かを免疫染色、心臓超音波を用いて解析する。分泌型蛋白であるペリオスチンは、哺乳類 COS 細胞あるいは大腸菌において活性型蛋白を発現させたのち高圧液体クロマトグラフィーで精製する。

4. 研究成果

(1) マウス、ラット、ヒト心臓弁におけるペリオスチンの発現 RT-PCR, Western blot および免疫組織染色の結果、ペリオスチンはマウス胎生 10.5 日より心臓弁特異的に発現しており、以後成獣に到るまで心臓では弁特異的な発現が認められた。また、高齢 ApoE 遺伝子欠損マウスの心臓弁では石灰化をともなう弁変性をきたすことが知られているが、免疫染色ではこの弁においてペリオスチンの発現は有意に亢進していた。さらにヒト正常弁、変性弁(加齢変性あるいはリウマチ性)各 8~15 例の免疫染色および Western blot を行ったところ、変性弁では正常弁に比してペリオスチンの発現領域は約 4~8 倍に増加し、コンドロモジュリン I の発現低下、および VEGF の発現亢進および毛細血管密度の増加も認められた。興味深いことに、ペリオスチンと弁における血管新生抑制因子であるコンドロモジュリン I との発現はお互いに排他的であり、正常弁ではペリオスチン、コンドロモジュリン I の発現はそれぞれ表層の内皮細胞直下、弁中心部に認められ、ペリオスチンは主にエラスチン、 α smooth muscle actin、vimentin と共発現していた。

(2) ペリオスチン蛋白の in vitro 機能解析

組み換え型ヒトペリオスチン蛋白を用いて、ヒト冠動脈内皮細胞の血管腔形成能および遊走能にお

よぼす影響を解析した。マトリゲル®でコートした 24 ウェルを用いて解析を行った結果、ペリオスチン蛋白刺激により血管腔形成能、遊走能はそれぞれ 87%、73%と有意に増加し、ペリオスチンの血管新生作用が示された。一方、VEGF との相乗作用は認められなかった。

(3) ペリオスチン遺伝子欠損マウスの表現型解析
野生型 (WT) あるいはペリオスチン遺伝子欠損マウス (KO) に高脂肪食 (HF) を 4 ヶ月間投与した。心エコー上、WT+HF 群で大動脈弁は肥厚し大動脈・僧帽弁輪部の高エコー域が約 1.5~2 倍増加したのに対し、KO+HF 群ではその変化は有意に減少した。同部位の免疫染色では、WT+HF 群においてペリオスチン、vWF、コラーゲン I、 α smooth muscle actin 陽性領域の増加を認めたが、KO+HF 群では有意に軽減しており、Western blot においても同様の結果が得られた。以上より、高脂肪食負荷による大動脈弁の有意な肥厚、弁輪部の血管新生・線維化の増加が一部ペリオスチンの増加によるものであることが示され、同因子の弁変性作用が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

伯野 大彦. The Potent Angiogenic Factor Periostin Accelerates Degeneration and Sclerosis of the Cardiac Valve Complex. The 25th Annual Meeting of the International Society of Heart Research Japanese Section, Symposium 4 (Myocardial disease and vascular remodeling) 2008 年 12 月 8 日(横浜).

伯野 大彦. 血管新生因子ペリオスチンは心臓弁複合体の変性・硬化を促進する. 第 30 回心筋生検研究会ミニシンポジウム 1: 動物モデルからヒト疾患への展開, 2008 年 11 月 28 日(津).

Hakuno D. The Potent Angiogenic Factor Periostin Accelerates Degeneration and Sclerosis of the Cardiac Valve Complex. The 81st American Heart Association Scientific Sessions, 2008 年 11 月 11 日(New Orleans, USA).

伯野 大彦. A potent angiogenic factor periostin accelerates degeneration of the cardiac valves. 第 12 回日本心不全学会学術集会, 2008 年 10 月 17 日(東京).

伯野 大彦. Periostin is a potent angiogenic factor and involved in degeneration of the cardiac valves. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 2008 年 3 月 30 日(福岡).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伯野 大彦 (HAKUNO DAIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80286476

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者