

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06428

研究課題名(和文) 基底膜IV型コラーゲン 1鎖分解断片arrestenの心臓における役割

研究課題名(英文) The role of arresten, a cleaved fragment of basement membrane type IV collagen alpha 1 chain, in the heart

研究代表者

岡田 宗善 (Okada, Muneyoshi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30453509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Arrestenは心筋細胞周囲の基底膜を構成するIV型コラーゲン 1鎖由来の生理活性断片であるが、その心臓における役割は未だ明らかにされていない。そこで本研究はげっ歯類の心臓構成細胞、摘出心筋標本および心肥大を伴う高血圧症モデルを用いて検討を行った。その結果、arrestenが心線維芽細胞の遊走能やangiotensin II (AngII)による新生仔心筋細胞の肥大化を促進すること、また摘出心房筋標本の収縮・拍動数に影響を及ぼすことなど、心臓において様々な生理活性を持つことを明らかにした。さらにAngII誘発高血圧症モデルの肥大化した左心室組織においてarresten発現は増加傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からarrestenが心臓において様々な生理活性を有する内因性因子であることが示唆された。また心肥大病態において発現が変動したことから、arrestenが心疾患の発症・進展において何らかの病態生理学的役割を担う可能性が考えられた。本研究結果を基に更に検討を行うことにより、arrestenを標的とした新規心疾患治療戦略の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Arresten is a bioactive fragment of type IV collagen 1 chain which constitutes the basement membrane around cardiomyocytes. However, its function in the heart has not been clarified. In this study, we used rodent cardiac cells, isolated cardiac tissue and hypertension model with cardiac hypertrophy to investigate the function of arresten in the heart. This study demonstrated that arresten has various physiological activities, such as promotion of migration in cardiac fibroblasts and cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II (AngII) in neonatal cardiomyocytes as well as changes in contraction and beating rate of atria. Furthermore, the expression of arresten tended to increase in hypertrophied left ventricular tissue from a rodent model of AngII-induced hypertension. This study suggests that arresten is an endogenous factor with various physiological activities in the heart.

研究分野：循環薬理学

キーワード：Extracellular matrix Arresten 心筋細胞 心線維芽細胞 心房筋 高血圧 Angiotensin II 心肥大

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞周囲を取り囲む細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM)は組織構造を維持するために必須の高分子群である。近年、ECMの分解に伴い、もとのECMとは異なる生理活性を持つ“matricryptins”と呼ばれるECM分解断片が産生されることが明らかになっている。中でも基底膜コラーゲン由来のmatricryptinsはその抗血管新生・抗腫瘍作用が注目され、広く研究されてきた。一方、申請者はこれまでに XVIII 型コラーゲン分解断片 endostatin、IV 型コラーゲン 2 鎖分解断片 canstatin や 3 鎖分解断片 tumstatin が心臓において細胞保護作用をはじめとした様々な機能を発揮することを明らかにし、matricryptins が新たな心不全治療の標的因子となる可能性を見出してきた。また IV 型コラーゲン 1 鎖由来 matricryptin である arresten は正常ラット心臓組織において 2 鎖由来の canstatin と同様に高発現することを明らかにしていたが、研究開始当初、その心臓における役割は全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は IV 型コラーゲン 1 鎖 C 末端断片 arresten の心臓における病態生理学的役割を解明することを目的とし、各種心臓構成細胞(ラット心線維芽細胞および心筋細胞; in vitro)、マウス摘出心房筋標本(ex vivo)および angiotensin II (AngII)誘発高血圧症モデルラット(in vivo)を用いて検討を行った。具体的には大腸菌発現系を用いて作製したリコンビナントラット arresten タンパク質(1)を用い、ラット心線維芽細胞に及ぼす影響(2)、ラット新生仔心筋細胞の酸化ストレス誘導性細胞死(3)や isoproterenol および AngII 誘導性肥大(4)に及ぼす影響、ラット成体心室筋細胞の電位依存性カルシウムイオンチャネル活性に及ぼす影響(5)や摘出心房筋標本の収縮能や拍動数に及ぼす影響(6)を検討した。また AngII 誘発高血圧症モデルラットの肥大化した左心室組織における arresten 発現の変化(7)も検討した。

### 3. 研究の方法

(1) Wistar ラット組織由来の IV 型コラーゲン 1 鎖遺伝子 arresten 領域を導入した組換えプラスミドを大腸菌に形質転換し、6×Histidine (His-tag)を付加したリコンビナントタンパク質を発現・回収した。SDS-PAGE と Western blotting を用いて目的のタンパク質が得られたことを確認した。以下(2)から(6)の実験では、ここで得られたリコンビナント arresten タンパク質を使用した。

(2) Wistar ラットの心臓からコラーゲナーゼ処理により心線維芽細胞を単離培養した。各種阻害薬存在/非存在下で arresten を処置後、遊走能を Boyden chamber assay により、各種タンパク質発現やリン酸化を Western blotting により検討した。

(3) Wistar ラットの新生仔の心臓から酵素処理により心筋細胞を単離培養した。Arresten 存在下で酸化ストレスとして H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM)で 4-6 時間刺激後、Western blotting により cleaved caspase-3 発現を解析し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染色で核形態を観察した。

(4) (3)と同様に Wistar ラットの新生仔より心筋細胞を単離培養した。Arresten 存在下で isoproterenol (10 μM)または AngII (1 μM)で 48 時間刺激後、心筋細胞マーカー troponin T-C の抗体を用いた免疫蛍光染色法により細胞面積を計測した。

(5) Wistar ラット成体の心臓からコラーゲナーゼ処理により心室筋細胞を単離した。Arresten 単独または AngII (1 μM)と共処置し、パッチクランプ法のホールセルモードにより電位依存性カルシウムイオンチャネル活性を測定した。

(6) ddY マウスより摘出した左右心房筋標本に arresten を処置し、マグヌス法により機能実験を行った。

(7) Wistar ラットに浸透圧ポンプを用いて AngII (500 ng/kg/min)を 4 週間投与し、高血圧症モデルを作製した。対照群には生理食塩水を投与した。テイルカフ法により血圧測定を行った後、摘出した左心室の重量を測定した。さらに Western blotting により左心室組織における arresten 発現を検討した。

### 4. 研究成果

(1)ラット arresten 領域を導入した組換えプラスミドから得られた His-tag 付きリコンビナントタンパク質の分子量は約 28 kDa であり、想定されたものと一致した。また抗 arresten 抗体および抗 His-tag 抗体に陽性であることから、本実験で得られたリコンビナントタンパク質が arresten であることを確認し、以下(2)から(6)の実験に使用した。

(2)ラット心線維芽細胞において arresten (250 ng/ml) 刺激は遊走能、matrix metalloproteinase (MMP)-9 分泌を促進し、extracellular-signal regulated kinase (ERK)を活性化した。MEK 阻害薬 PD98059 処置は arresten による遊走能亢進と MMP-9 分泌を抑制した。Arresten が結合することが報告されている  $\alpha_1\beta_1$  integrin の阻害薬である obtustatin の処置は arresten による ERK 活性化を抑制する傾向を示した。

(3)ラット新生仔心筋細胞において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性 cleaved caspase-3 発現増加およびアポトーシス

様凝縮核の増加に arresten (500 ng/ml)前処置は影響を及ぼさなかった。

(4) Arresten 前処置はラット新生仔心筋細胞における isoproterenol 誘導性肥大には影響を及ぼさなかったが、AngII 誘導性肥大を 100 ng/ml において増強した。

(5)ラット心室筋細胞において arresten (100 ng/ml)単独処置は電位依存性カルシウムイオンチャンネル活性に影響を及ぼさなかった。また AngII (1  $\mu$ M)との共処置も電位依存性カルシウムイオンチャンネル活性には影響を及ぼさなかった。

(6)マウス摘出左心房筋標本において arresten (10-500 ng/ml)は陽性変力作用を誘導した。<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> integrin 阻害薬 obtustatin 前処置は arresten 誘導性陽性変力作用を抑制する傾向を示した。一方、マウス摘出右心房筋標本において arresten 累積処置(10-500 ng/ml)は陰性変時作用を誘導する傾向を示した。

(7) AngII 誘発高血圧症モデルラットでは収縮期血圧が顕著に増加し、左心室重量が増加した。肥大化した左心室組織において対照群と比較して arresten 発現が増加する傾向を示した。これら成果の一部は国内学会において発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 宗善、栗原 秀弥、森 将就、大谷 紘資、山脇 英之
2. 発表標題 Expression of arresten and its role in the heart of rats with angiotensin II-induced hypertension
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原 秀弥、岡田 宗善、大谷 紘資、山脇 英之
2. 発表標題 IV型コラーゲン 1鎖分解断片arrestenがラット新生仔心筋細胞の酸化ストレス誘導性細胞死およびangiotensin II誘導性肥大に及ぼす影響
3. 学会等名 第34回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山 彰、田嶋 志帆、山本 理幾、大谷 紘資、岡田 宗善、山脇 英之
2. 発表標題 Arresten, a cleaved fragment of type IV collagen 1 chain, regulates functions of cardiac fibroblasts and left atria
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学獣医薬理学研究室  
<http://www.vmas.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------