

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780227

研究課題名（和文）

MMP を介した心筋線維化のメカニズム解析：心筋線維化治療に向けた基礎的検討

研究課題名（英文）

Analysis of the fibrogenic mechanism mediated by MMP activity: basic study to an anti-fibrotic therapy.

研究代表者

堀 泰智 (HORI YASUTOMO)

北里大学・獣医学部・小動物第2内科学研究室・講師

研究者番号：20406896

研究成果の概要（和文）：

本研究では心不全患者における新たな心筋線維化治療の確立と臨床応用を最終目標とし、イソプロテレノール誘発心疾患モデルラットにおいて MMP 阻害作用を持つドキシサイクリン (DOX) を投与し、MMP の発現・活性化を介した心筋線維化の調節機序について精査した。心疾患モデルラットでは、コントロール群に比較して有意な心肥大・心筋線維化がみられた。一方、DOX の投与は心疾患モデルラットの心肥大・心筋線維化を有意に低下させた。また、心筋における MMP-2 の発現・活性は心疾患モデルラットにおいて有意に増加していたが、DOX の投与によって有意に低下した。以上のことから、MMP-2 の発現・活性は心疾患モデルラットにおける心筋線維化の進行に重要な働きを持つことが示唆された。また、MMP 阻害薬の投与は心疾患患者における心筋線維化を改善することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Our objective was to investigate the effects of doxycycline, a matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (MMPi) on  $\beta$ -agonist-induced myocardial fibrosis and MMP expression. Rats were divided into 3 groups: control, isoproterenol (ISO), and isoproterenol with doxycycline (ISO + DOX). Compared to the control, ISO induced the myocardial hypertrophy and cardiac fibrosis, but were attenuated by co-treatment with DOX. MMP-2 activity also increased in the ISO treatment, but decreased by co-treatment with DOX. Similarly, immunoblotting showed significant increase in MMP-2 level in the ISO, and decreased levels in the DOX co-treatment. Our results suggest that the enhanced expression of MMP-2 plays a prominent role in promoting myocardial fibrosis in  $\beta$ -agonist signaling pathway, and that MMP-inhibiting compounds may attenuate myocardial fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：内科・治療

### 1. 研究開始当初の背景

神経体液性調節因子の長期的活性化は心筋線維化の直接的要因であると考えられている。また、心筋線維化は心機能を低下させるため、心不全患者の生命予後を決定する最も重要な要因の一つである。このことから心疾患の治療において、心筋線維化の抑止を目的とした神経体液性調節因子のコントロールは標準的な内科療法となっているが、心筋線維化および心不全への進展を完全に制御することは困難である。

コラーゲン分解酵素であるマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)は心不全患者の心筋細胞や線維芽細胞で産生される酵素であり、コラーゲンを分解するため心筋線維化を抑制すると考えられてきた。しかし、近年、心筋線維化が進行している心疾患モデル動物やヒトにおいてMMPの発現・活性は亢進していることが報告されている。

しかし、MMPを介した心筋線維化の調節機序については未だ十分に解明されておらず、心不全患者における心筋線維化の抑止を目的とした新たな治療法の確立は進んでいない。

### 2. 研究の目的

上述から、MMPを介した心筋線維化の調節機序を解明し、MMP調節による新たな心筋線維化治療を確立することは心不全患者の生命予後を改善させるために急務であると考えられる。本研究では心不全患者における新たな心筋線維化治療の確立と臨床応用を最終目標としてMMPの発現・活性化を介した心筋線維化の調節機序ならびにMMP阻害薬による心筋線維化と心機能に関する治療効果の解析を目的とした。

#### (1) MMPの発現・活性化を介した心筋線維化の調節機序の解明

神経体液性調節因子は、心不全患者で亢進しており心筋線維化の進行に深く関与している。同様に、神経体液性調節因子は心筋においてコラーゲン分解酵素であるMMPの発現・活性を亢進することが報告されている。これらのことからMMPは心筋線維化の調節に重要な役割を持つと考えられているが、MMPの発現・活性化を介した心筋線維化の調節機序は十分に解明されてない。

本研究では心筋線維化の制御を目的とし、

心筋線維化に関わる神経体液性調節因子、細胞障害・心筋肥大因子を指標として、MMPの活性を調節した環境下において心筋線維化のメカニズムを解明する。

#### (2) MMP阻害薬による心筋線維化と心機能に関する治療効果の解析

心不全患者における心筋線維化は、心機能を低下させ心不全を引き起こす直接的要因であると考えられている。MMPの発現は心筋線維化の調節に深く関わっていると考えられるが、MMP阻害薬が心不全治療薬として心機能に与える効果は十分に解明されていない。このため超音波やカテーテル検査などを指標とした心機能や血行動態の解析は、MMP阻害薬を用いた心不全治療の発展に大きく貢献する情報となる。

さらに、MMP阻害による心筋線維化の治療効果を病理組織学的に検討し、心機能との関連性からMMP阻害薬を用いた心筋線維化治療の臨床応用に向けた基礎的情報を解析する。

### 3. 研究の方法

研究には雄のWistar Kyoto rat(4週齢)を使用した。ラットはコントロール群、心疾患モデルラット群、心疾患モデル+ドキシサイクリン(DOX)群の3群に分けた。心疾患モデルラットは浸透圧ポンプを用いて交感神経作動薬(イソプロテレノール, ISO: 2.0 mg/kg/日)を14日間連続投与することで作成した。同時に、心疾患モデルラット+ドキシサイクリン群にはMMP阻害作用を持つドキシサイクリン(25 mg/kg/日)を1日2回、腹腔内に14日間連続投与した。コントロール群には生理食塩水を投与した。

組織学的変化を解析するため、左心室を切除し、ホルマリン固定した後、定法に従いアザン染色を用いて心筋線維化率ならびに心筋横断面積を算出した。また、左心室のMMP活性・発現量を精査するため、ザイモグラフィ法を用いてMMP活性を評価し、ウェスタンブロット法を用いてMMP-2ならびにMMP-9の発現量を解析した。

### 4. 研究成果

心筋におけるMMP-2活性はコントロール群に比較してイソプロテレノール誘発心疾患モデルラットにおいて有意に増加していた( $P < 0.001$ )。ドキシサイクリンの併用群で

はイソプロテレノール誘発心疾患モデルラットに比較して MMP-2 の活性は有意に低下していた ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1)。このことからイソプロテレノールは交感神経受容体を介して細胞外酵素である MMP の活性化を刺激したが、ドキシサイクリンはイソプロテレノールによる MMP 活性を抑制したと考えられる。

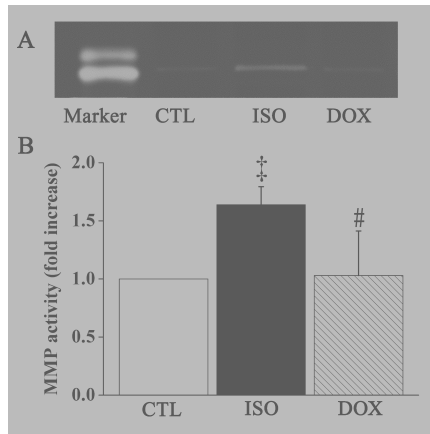


Fig. 1 左心室における MMP-2 活性の比較  
 上図：ザイモグラフィーによる MMP-2 活性の比較 (72 kDa)  
 下図：各群間における MMP-2 活性の比較  
 コントロール群 (CTL)、イソプロテレノール誘発心疾患モデルラット群 (ISO)、ドキシサイクリン併用群 (DOX)。  
 † vs. CTL;  $P < 0.001$ , # vs. ISO;  $P < 0.01$

イソプロテレノール誘発心疾患モデルラットでは心重量・心筋横断面積が増加し ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )、アザン染色からコラーゲン線維の増生が確認された ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2 上図 B, E)。これらは心肥大ならびに心筋線維化が、イソプロテレノールによって刺激されたことを示唆している。一方、ドキシサイクリンの投与はイソプロテレノール誘発心疾患モデルラットの心筋横断面積・心筋線維化を有意に低下させた ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2 上図 C, F)。

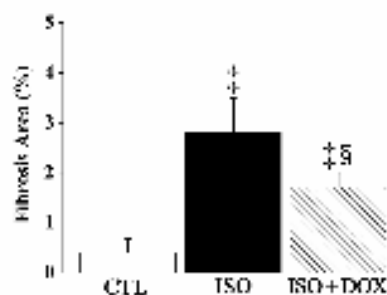
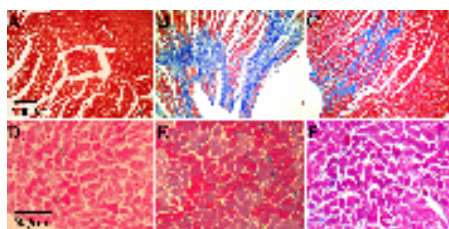


Fig. 2 各群間における左心室の病理組織学的解析 (上図) ならびに心筋線維化率の比較 (下図)

CTL 群 (上図 A, D)、ISO 群 (上図 B, E)、ISO+DOXY 群 (上図 C, F)。

‡ vs. CTL;  $P < 0.001$ , § vs. ISO;  $P < 0.05$ .

また、心筋における MMP-2 の発現はイソプロテレノール誘発心疾患モデルラットにおいて有意に増加していたが ( $P < 0.01$ )、ドキシサイクリンの投与によって MMP-2 の発現・活性は有意に低下した ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3)。

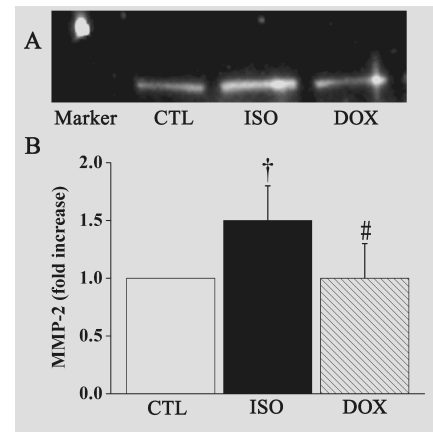


Fig. 3 左心室における MMP-2 発現量の比較  
 上図：ウェスタンブロットによる MMP-2 発現量の比較 (72 kDa)  
 下図：各群間における MMP-2 活性の比較  
 CTL 群、ISO 群、DOX 群。

† vs. CTL;  $P < 0.01$ , # vs. ISO;  $P < 0.01$

さらに、ドキシサイクリンがイソプロテレノールの効果を受容体レベルで抑制している可能性を考慮し、心エコー図検査を用いてイソプロテレノールとドキシサイクリンを併用した時の心機能を評価した。イソプロテレノールは容量依存性に心拍数ならびに左心室内径短縮率を増加させたが、ドキシサイクリンはこれらの作用に影響しなかった (Fig. 4)。これらのことから、イソプロテレノールによって交感神経受容体が刺激され心拍数ならびに左心室収縮能が増加したが、ドキシサイクリンはイソプロテレノールの作用を受容体レベルでは干渉していないことが示唆される。

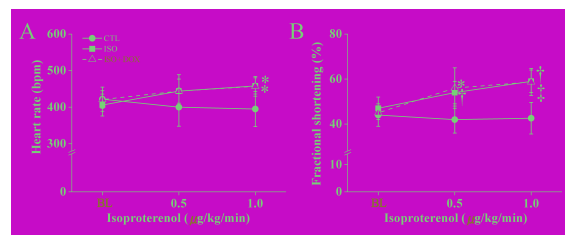


Fig. 4 イソプロテレノール投与時の心拍数 (A) ならびに左心室内径短縮率 (B) の比較

\*  $P < 0.05$  vs. ベースライン(BL), †  $P < 0.01$  vs. BL, ‡  $P < 0.001$  vs. BL.

#### 考察

イソプロテレノールは過去の報告と同様に心筋線維化ならびに心肥大を誘導した。さらに、MMP-2 の発現・活性も亢進しており、これらは心筋リモデリングの進行と一致していた。このことは心疾患モデルラットの心筋において、MMP の発現・活性は心筋リモデリングの進行に深く関与している可能性を示唆している。

一方、MMP 阻害作用を持つドキシサイクリンはイソプロテレノール誘発心疾患モデルラットにおける MMP-2 の活性を抑制した。このことはドキシサイクリンがイソプロテレノールによって誘導された MMP の活性化を細胞外で阻害したことを示唆している。さらに、ドキシサイクリンはイソプロテレノールによる心筋線維化・心肥大の進行を抑制すると共に、MMP-2 の発現も抑制していた。これらのことからドキシサイクリンは MMP-2 の機能を細胞外で抑制するばかりではなく、交感神経刺激による心筋リモデリングを抑制することが明らかとなった。

最後に、イソプロテレノールは容量依存性に心拍数ならびに左心室内径短縮率を増加させたが、ドキシサイクリンはこれらの作用に影響しなかった。このことは、ドキシサイクリンがイソプロテレノールの作用部位である交感神経の受容体レベルでは干渉していないことを示唆している。これらから、ドキシサイクリンは交感神経受容体を介した MMP の発現・活性には関与せず、細胞外で MMP の活性を阻害していることが推察される。

従って、本研究において細胞外 MMP-2 の活性阻害によって MMP-2 発現量が低下していた理由については不明であるが、細胞外での MMP-2 活性は直接的・間接的に細胞内の心筋線維化調節に関与していることが推察される。現在、我々は細胞レベルでの MMP 機能と心筋線維化調節機序との関係について研究を勧めている。

以上のことから、MMP-2 の発現・活性は心疾患モデルラットにおける心筋線維化の進行に重要な働きを持つことが示唆された。また、MMP 阻害薬の投与は心疾患患者における心筋線維化を改善することが期待される。

#### 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 1 件)

堀 泰智, 国広章一, 佐藤真伍(9 名, 1 番目). Doxycycline attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis and matrix metalloproteinase activity in rats. *Biol Pharm Bull*. 査読有 2009; 32: 1678-1682.

[学会発表] (計 1 件)

ラット心筋線維芽細胞における MMP の働き  
佐野直哉, 堀 泰智(8 名, 2 番目)  
北里大学ハイテクリサーチセンター研究中間報告会, 2009 年 7 月 25 日, 北里大学(青森)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀 泰智 (HORI YASUTOMO)

北里大学・獣医学部・小動物第 2 内科学研究室・講師

研究者番号: 20406896