

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590833

研究課題名（和文）動脈硬化性大動脈弁・血管病変進展におけるストレス応答性分泌蛋白の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation for the role of stress-responsive secretory proteins on the progression of atherosclerotic aortic valves and vascular diseases

研究代表者

伯野 大彦（HAKUNO DAIHIKO）

防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号：80286476

研究成果の概要（和文）：本研究では、ストレス応答性分泌蛋白ペリオスチンの心臓弁および血管における動脈硬化促進作用を *in vitro*, *in vivo* で包括的に解析した。ペリオスチン/apoE 二重遺伝子欠損マウスにおいて、大動脈弁および大動脈壁の肥厚・石灰化が有意に軽減していた。また、ペリオスチン刺激によるマウス骨髄由来 CD14 陽性細胞の血管内皮細胞への接着能、浸潤能が有意に亢進した。ラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞における抗アポトーシス、Akt 活性化作用が認められた。また、ペリオスチン刺激により弁間質細胞の骨基質産生能、骨髄由来 CD14 陽性細胞における CD14 発現が有意に亢進した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we comprehensively analyzed the role of periostin, stress-responsive secretory protein, on atherogenesis in aortic valve and aorta both *in vitro* and *in vivo*. The thickening and calcification of aortic valves and aorta were significantly reduced in periostin/apoE double knockout mice. Furthermore, The capacity of adhesion and invasion of murine bone marrow-derived CD14 positive cells into endothelial cells was enhanced by periostin administration. In rat valvular interstitial cells and aortic smooth muscle cells, periostin administration exerted anti-apoptosis and akt activation. Periostin also promoted bone matrix production by valvular interstitial cells and CD14 expression in murine bone marrow-derived CD14 positive cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

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：動脈硬化、血管新生、マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景
近年動脈硬化性大動脈弁および血管疾患は増加傾向にあるが、これらの病変進展におけ

る分子機序はなお不明な点が多い。我々は以前心臓弁の網羅的遺伝子解析によりストレス応答性分泌蛋白ペリオスチンを同定した。

これまでの研究からペリオスチン発現がヒト硬化変性大動脈弁において外来性炎症性細胞や筋線維芽細胞で著明に亢進しており、血管新生やMMP分泌増加を介して弁変性を加速させることを見いだした。したがって、同蛋白は弁および血管内皮への炎症性細胞の接着・浸潤能亢進、血管新生、MMP分泌増加作用により悪循環を形成し、動脈硬化性大動脈弁・血管病変の進展に重要な役割を果たしていることが推測された。

2. 研究の目的

本研究ではヒト正常弁、弁膜症変性弁、および動脈硬化病変の病理標本のほか、ラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞、ヒト冠動脈内皮細胞、マウス骨髄由来およびヒト末梢血由来CD14陽性細胞を用い、さらに動物モデルとしてペリオスチン遺伝子欠損マウス、動脈硬化モデルマウスとしてのapolipoprotein E (apoE) 遺伝子欠損マウス、およびこれらの二重遺伝子欠損マウスを用いて、大動脈弁および血管の動脈硬化性病変進展におけるペリオスチンの発現と機能を *in vitro*, *in vivo* の両面から解析することを目的とする。さらに、同因子と心臓弁保護因子コンドロモジュリン-I との相互作用、診断マーカー、治療標的としての可能性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 硬化変性弁・動脈硬化病変におけるペリオスチンの発現解析

①43 週齢以降の高齢 apoE 遺伝子欠損マウスの半数以上が心エコー上有意な大動脈弁狭窄症をきたすことが知られている (*J Am Coll Cardiol* 5:134-141, 2005)。この高齢 apoE 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの大動脈弁および大動脈、ヒト石灰化大動脈弁 (弁膜症手術例) と正常弁 (剖検例)、ヒト大動脈硬化例と正常例におけるペリオスチンの発現領域および発現量をペリオスチン抗体による免疫染色、Western blot を用いて比較解析する。ヒト試料は本大学病理学教室、心臓血管外科学教室の協力を得て収集予定である。硬化変性弁および動脈硬化病変においてペリオスチンと vWF、 α -smooth muscle actin、vimentin、単球/マクロファージマーカーCD14 との共免疫蛍光染色を行いペリオスチン分泌細胞を同定する (これまでの研究でヒト硬化変性弁では確認済みである)。

②高齢 ApoE 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの骨髄由来 CD14 陽性細胞、大動脈弁狭窄症あるいは動脈硬化性疾患 (頸動脈狭窄、虚血性心疾患) 罹患者と正常人の末梢血由来 CD14 陽性細胞を flow cytometry で回収後、無刺激、TNF- α あるいは過酸化水素で刺激し、

各群におけるペリオスチンの発現を免疫染色、Western blot で比較解析する。ヒト血液は説明・同意文書によるインフォームドコンセントを得たのちに採取予定である。

(2) ペリオスチンの *in vivo* 機能解析
週齢をマッチさせた野生型マウス、高齢 apoE 遺伝子欠損マウス、およびペリオスチン/apoE 二重遺伝子欠損マウスを用いて、大動脈弁および大動脈の硬化変性、石灰化を心エコー、免疫染色 (ペリオスチン、CD14、 α -smooth muscle actin、vWF、VEGF、MMP、ADAMTS、collagen I、骨基質蛋白 osteocalcin に対する抗体を用いる)、von Kossa 染色、oil red O 染色、および Western blot により比較解析する。ApoE 遺伝子欠損マウス、ペリオスチン遺伝子欠損マウスは当教室にて飼育中である。

(3) ペリオスチンの *in vitro* 機能解析

①接着・浸潤能解析 マウス骨髄由来 CD14 陽性細胞を flow cytometry で回収後、ペリオスチン刺激による同細胞の血管内皮細胞への接着能、Modified Boyden chamber を用いた浸潤能の解析を行う。また、ペリオスチン刺激による細胞接着・浸潤関連シグナル focal adhesion kinase の活性化を Western blot で解析する。

②増殖能、アポトーシス解析 ペリオスチン刺激によるラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞の増殖能を BrdU により解析する。ラット弁間質細胞の *in vitro* 培養に関しては、我々が新たに開発した、最表層の弁内皮細胞を除去した後に explant 培養する手法を用いて行う。ペリオスチン刺激による同細胞の無血清培養下アポトーシスの変化を annexin V の免疫蛍光染色で調べる。さらに、細胞生存に重要な kinase である Akt の活性化を Western blot で解析する。

③分化能、骨基質産生能解析 ラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞、マウス骨髄由来 CD14 陽性細胞を用いて、ペリオスチン刺激による同細胞の骨芽細胞への分化能および骨基質産生能を解析する。具体的には、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Cbfa1、Msx2 の発現を定量的 PCR で解析する。また、骨基質蛋白である osteocalcin および osteopontin の発現と分泌を Western blot、ELISA を用いて解析する。

(4) ペリオスチンとコンドロモジュリン-I との相互作用の解析

我々のこれまでの研究からペリオスチンとコンドロモジュリン-I との発現様式および機能が相反することが示されており、相互作用を有する可能性が考えられる。ペリオスチン遺伝子欠損マウス、コンドロモジュリン-I 遺伝子欠損マウス (*Nat Med* 12:1151-1159, 2006) の大動脈弁、大動脈、骨髄由来 CD14 陽性細胞をそれぞれコンドロモジュリン-I 抗

体、ペリオスチン抗体を用いた免疫染色、Western blot により解析し、野生型マウスと比較検討する。

4. 研究成果

(1) 硬化変性弁・動脈硬化病変におけるペリオスチンの発現解析 まず、50 週齢の高齢 apoE 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの大動脈弁および大動脈におけるペリオスチンの発現領域および発現量を、ペリオスチン抗体による免疫染色、Western blot を用いて比較解析したところ、高齢 apoE 遺伝子欠損マウスの大動脈弁、大動脈ともに野生型のそれと比較して、発現領域、発現量は約 4 倍、5 倍増加していた。また、ヒト石灰化大動脈弁（弁膜症手術例）、ヒト大動脈硬化例（大動脈瘤手術例）においても、正常例と比較してペリオスチンの発現領域および発現量は有意に増加していた。興味深いことに、ペリオスチン発現細胞の 2 重免疫蛍光染色を行ったところ、vWF、collagen I とは一致しなかったが、 α -smooth muscle actin、vimentin、活性化単球マーカー CD14 との一致を認め、ペリオスチンが組織内に浸潤した筋線維芽細胞や炎症性細胞から分泌されている可能性が示唆された。

(2) ペリオスチンの *in vivo* 機能解析 ペリオスチン/apoE 二重遺伝子欠損マウスを作製後、45 週齢の野生型マウス、apoE 遺伝子欠損マウス、およびペリオスチン/apoE 二重遺伝子欠損マウスを用いて、大動脈弁および大動脈の硬化変性・石灰化を心エコーで観察した。大動脈弁、大動脈ともに、ペリオスチン/apoE 二重遺伝子欠損マウスにおいて大動脈弁、大動脈壁の肥厚・石灰化が Western blot、免疫染色にて有意に軽減していた。

(3) ペリオスチンの *in vitro* 機能解析

① 接着・浸潤能解析 マウス骨髄由来 CD14 陽性細胞を回収後、ペリオスチン刺激による同細胞の血管内皮細胞への接着能、Modified Boyden chamber を用いた浸潤能の解析を行ったところ、接着・浸潤能ともに有意に亢進していた。また、ペリオスチン刺激により細胞接着・浸潤関連シグナル focal adhesion kinase も活性化された。

② 増殖能、アポトーシス解析 ペリオスチン刺激によるラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞の増殖能を BrdU により解析したが、増殖能は不変であった。ペリオスチン刺激による同細胞の無血清培養下アポトーシスを annexin V の免疫蛍光染色、Akt の活性化で解析したところ、弁間質細胞においてアポトーシス抑制、Akt 活性化が認められた。

③ 分化能、骨基質産生能解析 ラット弁間質細胞・大動脈平滑筋細胞、マウス骨髄由来 CD14 陽性細胞を用いて、ペリオスチン刺激に

よる同細胞の骨芽細胞への分化能および骨基質産生能を定量的 PCR、Western blot、ELISA を用いて解析した。その結果、ペリオスチン刺激により弁間質細胞の骨基質産生能、骨髄由来 CD14 陽性細胞における CD14 発現が有意に亢進した。

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 4 件)

- ① 伯野大彦、ペリオスチンと心臓弁膜症特集「*Matricellular タンパク*」、臨床化学、査読無、42 巻、2013、44-49
- ② 伯野大彦、木村成卓、吉岡正豊、福田恵一、Role of Angiogenetic Factors in Cardiac Valve Homeostasis and Disease、*Journal of Cardiovascular Translational Research*、査読有、4 巻、2011、727-740
DOI:10.1007/s12265-011-9317-8
- ③ 伯野大彦、木村成卓、吉岡正豊、向井万起男、木村徳宏、岡田保典、四津良平、宿南知佐、開祐司、工藤明、小川聡、福田恵一、Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents、*Journal of Clinical Investigation*、査読有、120 巻、2010、2292-2306
- ④ 伯野大彦、福田恵一、心臓弁膜症と血管新生抑制因子コンドロモデュリン-1、*Vascular Medicine*、査読無、73 巻、2010、168-176

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伯野大彦、吉岡正豊、木村成卓、福田恵一、Role of Angiogenetic Factors in Cardiac Valve Homeostasis and Disease、Bit's 3rd Annual International Congress of Cardiology、2011 年 12 月 4 日、北京 (中国)
- ② 伯野大彦、木村成卓、吉岡正豊、木村徳宏、岡田保典、四津良平、開祐司、工藤明、小川聡、福田恵一、Periostin Advances Cardiac Valve Degeneration by Inducing Angiogenesis and Matrix Metalloproteinase Production、American Heart Association Scientific Sessions、2010 年 11 月 15 日、シカゴ (米国)

[図書] (計 1 件)

伯野大彦、福田恵一、南山堂、循環器疾患のサイエンス、2010、7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伯野 大彦 (HAKUNO DAIHIKO)

防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号：80286476