

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591092

研究課題名(和文) 切断プロラクチンの周産期心筋症への関与

研究課題名(英文) Involvement of cleaved prolactin in peripartum cardiomyopathy

研究代表者

針谷 敏夫 (Harigaya, Toshio)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70135557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロラクチンは、プロテアーゼであるカテプシンD(CathD)により切断されることで、N末端側約16kDaの断片となり、その抗血管新生作用からバソインヒビン(Vi)と命名されている。Viは、妊婦の周産期心筋症(PPCM)や妊娠高血圧症候群(PIH)発症に関与することが示唆され、本研究において患者血中のVi値、CathD値を測定し疾患との関連性について検討した。PPCM及びPIHではVi値およびCathD活性が健康妊産婦に比べとも高い結果が得られ、今後両因子を診断マーカーとしたPPCMおよびPIH罹患リスク設定が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)： It is well known that prolactin (PRL) has modified into several variants. One of these variants, N-terminal PRL which is cleaved by cathepsinD (CathD), is named vasoinhibins (Vi) because of its anti-angiogenic and pro-apoptotic properties. Vi has been reported the possibility to cause for peripartum cardiomyopathy (PPCM) and pregnancy induced hypertension (PIH) syndrome. In order to clarify these pathogenic mechanisms, we tried to detect Vi value and CathD activity in patient's blood and determine the relationship between these factors and diseases.

Vi content and CathD activity in PPCM and PIH patients are higher than these of control healthy pregnant women. These results seem to suggest that measurement of Vi content and CathD activity is useful for early detection of PPCM and PIH in pregnant women.

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：周産期心筋症 プロラクチン バソインヒビン

1. 研究開始当初の背景

(1) 周産期心筋症 (PPCM) は、それまで健康だった女性が妊娠を機に心不全を発症する特異な心筋症である。アメリカでは発症率も高く、国家規模の調査や対策が進められているのに対し、わが国においては長らくその疾患概念すら周知されていなかった。しかしながら、連携研究者である国立循環器病研究センターの神谷千津子医師らにより全国調査が進められ、我が国における発症率は約 2 万出産に 1 人、約 5% が母体死亡、約 6 割が心機能を回復、妊娠高血圧症候群 (PIH) との合併率 40% などが明らかとなった。このように、PPCM は母子の生命予後を脅かす重大な疾患であるにもかかわらず、長い間、明確な原因は解明されていなかった。しかしながら、授乳ストレスを軽減する目的で投与した、抗プロラクチン薬プロモクリプテンが有効であることは経験的に知られていた。

(2) プロラクチンは、本来の授乳ホルモンとして以外にも多岐にわたる機能を有し、血管新生促進作用もその一つに挙げられる。一方でプロラクチンがカテプシン D などのプロテアーゼ切断を受けることで生成される切断プロラクチンは、抗血管新生因子でありプロラクチンとは拮抗関係にあることが明らかになっている。プロラクチンのみならず、成長ホルモン、胎盤性ラクトゲンなどの成長ホルモン/プロラクチンファミリーに属するホルモンがプロテアーゼ切断を受けた N 末端側断片は抗血管新生作用をもち、バソインヒピンと総称されている。この切断プロラクチンを始めとしたバソインヒピンは、その抗血管新生作用によって循環器系疾患を引き起こす可能性が示唆されており、2007 年には PPCM の原因が切断プロラクチンであるとの報告がなされた (Hilfiker-Kleiner, et al [2007] *Cell*)。

2. 研究の目的

本研究では、切断プロラクチンの周産期心筋症への関与を明らかにするため以下 2 点を目的とした。(1) 血清中から切断プロラクチンおよびその切断酵素カテプシン D の簡便な測定法の開発を行い、周産期心筋症と妊娠高血圧症候群の検体血清を用いた切断プロラクチン診断法の臨床検査への応用、実用化を検証 (2) 切断プロラクチンがどのようなメカニズムで周産期心筋症を引き起こすのかを明らかにするための、周産期心筋症モデル細胞およびモデル疾患動物の作成

3. 研究の方法

(1) 測定法の確立と臨床検査への応用、実用化検証

切断プロラクチンおよびカテプシン D 測定法の確立

血中切断プロラクチンは、プロラクチン抗体を用いた免疫沈降法と、アジレント社のバイオアナライザーによるキャピラリー電気泳動によって検出を行った。血漿の免疫沈降

後に、プロラクチン抗体を用いたウェスタンブロットを行い、沈降しバイオアナライザーで検出したタンパク質が切断プロラクチンであることを確認した。バイオアナライザーで検出したタンパク質量は Fluorescence Unit (FU) で示した。カテプシン D 活性は、Sensolyte Cathepsin D Assay Kit により、血中カテプシン D 活性を測定した。測定間補正に用いたキャリブレーションとしての健常非妊娠女性の血中カテプシン D 活性値を 100% とし、患者検体のカテプシン D 活性を示した。この方法は Hilfiker-Kleiner らと同法である。

患者検体測定結果の蓄積と解析

血中切断プロラクチンとカテプシン D が疾患の危険因子となる可能性を確認しているが、検体数が少なく診断基準の開発へ至っていない。本研究では周産期心筋症検体の測定を行い、今までの測定結果に加えて、新たな症例の測定を行うことで測定データの蓄積を行う。患者検体は国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て収集し、EDTA-2Na 真空採血管で採血後 30 分以上静置し、遠心分離によって血漿を採取した。血漿は使用まで -80 で保存し、切断プロラクチン値、カテプシン D 活性を測定した。また、受託臨床検査によって血中脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、プロラクチンを測定した。加えて、採血時点において心エコー検査を行い、左室駆出率 (LVEF)、左室短縮率 (%FS) を得た。蓄積した測定データは心機能、心不全マーカー等との相関解析を行い、臨床検査へ応用、実用化が可能か検証した。

(2) 心筋症モデル細胞およびモデルマウスの作成

心筋症モデル細胞の作成

切断プロラクチンが心筋細胞、血管内皮細胞へ与える影響を調査した。大腸菌を宿主として組み換え体切断プロラクチンを作成し、エンドトキシンによる細胞毒性がないことを確認した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞とラット由来心筋株化細胞を通常条件下で培養し、組み換え体切断プロラクチンで刺激をすることで細胞への影響を調査した。切断プロラクチン刺激後 24 時間後に MTS assay によってミトコンドリア活性を測定した。

心筋症モデル動物の作成

心筋症モデル疾患動物の作成にあたり、まずプロラクチンが心臓へ与える影響を明らかにするために、高プロラクチン血症マウスの作出を目指した。高プロラクチン血症化は腎臓被膜下への下垂体移植により行った。比較対象として唾液腺を同様に移植した。移植後 3 週間で解剖を行い、剖検時に腎臓被膜下への下垂体の定着を確認した。解剖時に体重、心重量、脛骨長を測定した。移植した下垂体は、プロラクチン抗体を用いた免疫組織化学

法を用いてプロラクチンの産生を確認した。解剖時に心臓を採取し、組織切片を作成して毛細血管染色を行った。染色後、画像解析ソフトにより心臓組織切片中の毛細血管が占める割合を求めた。同様に膠原線維染色を行い、心臓の線維化を確認した。また、採取した心臓から RNA を抽出し、qRT-PCR を行うことで心不全関連遺伝子、血管新生関連遺伝子の発現量を確認した。心不全関連遺伝子は、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA)、ミオシン重鎖 (MHC)、ミオシン重鎖 (MHC)、von willebrand factor を、血管新生関連遺伝子は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を解析した。上記項目により、心臓へプロラクチンが与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 測定法の確立と臨床検査への応用、実用化検証

切断プロラクチン測定法の確立

切断プロラクチンは、血漿中 IgG を除去したのち、プロラクチン抗体を使用した免疫沈降を行い、沈降タンパク質をアジレント社のバイオアナライザーにて検出している。免疫沈降後の検体にプロラクチン抗体を用いたウェスタンブロットを行い、沈降しバイオアナライザーで検出したタンパク質が切断プロラクチンであることを確認した。その結果、ウェスタンブロットのバンドと同様の分子量にバイオアナライザーでタンパク質が検出され、バイオアナライザーで検出された 16kDa のタンパク質は切断プロラクチンであることが確認できた。

患者検体測定結果の蓄積と解析

本研究において、周産期心筋症の発症直後 (出産 1-2 週後)、発症 1-2 週後、3 ヶ月後、半年後、1 年後までの 5 点において、最大 32 例の検体を収集した。比較対象として出産 1 ヶ月前、出産直後、出産 1 ヶ月後の健常妊娠者の検体を用いた。その結果、周産期心筋症では発症直後と発症 1-2 週後では健常妊娠と比較して 2 倍程度有意に高い切断プロラクチン値を検出した。同様にカテプシン D 活性においても、発症直後と発症 1-2 週後では 2 倍程度有意に高い値を示した。また、発症 1 年後においても健常妊娠出産 1 ヶ月後よりも高い切断プロラクチン値、カテプシン D 活性を示し、周産期心筋症では切断プロラクチンが恒常的に高い可能性を示した。

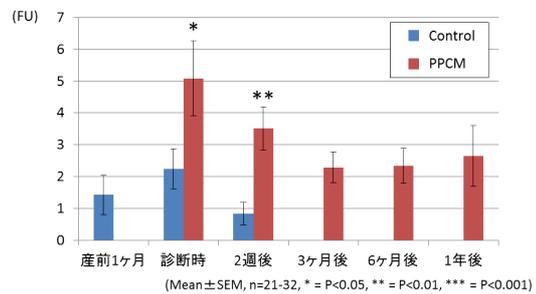


図1-A. PPCM、Controlにおける血中切断プロラクチン値

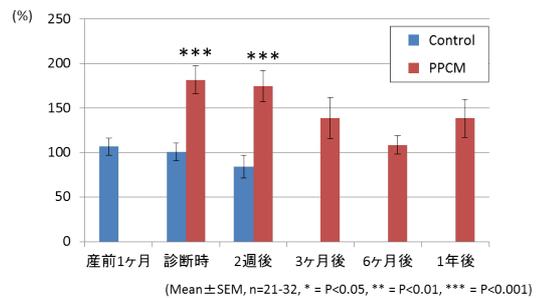


図1-B. PPCM、Controlにおける血中カテプシンD活性

周産期心筋症の症状と切断プロラクチン、カテプシン D の関連性を明らかにするために、相関解析を行った。切断プロラクチンまたはカテプシン D と、心機能を表す左室駆出率 (LVEF)、左室内径短縮率 (%FS)、心不全マーカーである血中脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、血中プロラクチン (PRL) との相関を解析した。その結果、切断プロラクチンと LVEF、%FS が有意な負の相関を示し、またプロラクチンと有意な正の相関を示すことが明らかになった。カテプシン D も同様に、LVEF、%FS と有意な負の相関を示し、また血中 BNP と有意な正の相関を示した。これらの結果から心不全と切断プロラクチン、カテプシン D が関連する可能性が明らかとなった。

	vs	標本数	相関係数	P value	相関関係
切断プロラクチン	LVEF	131	-0.194	<0.05	↘
	%FS	127	-0.160	<0.10	↘
	PRL	128	-0.190	<0.05	↗
カテプシンD	LVEF	131	-0.236	<0.01	↘
	%FS	127	-0.214	<0.05	↘
	BNP	129	-0.184	<0.05	↗

図2. PPCMにおける症状との相関解析

以上の結果から、周産期心筋症患者では、切断プロラクチン値、カテプシン D 活性が高く、また心不全の程度と相関することを示し、切断プロラクチンおよびカテプシン D が周産期心筋症の診断において有効な予測因子と成る可能性を示した。

(2) 心筋症モデル細胞およびモデルマウスの作成

心筋症モデル細胞の作成

切断プロラクチンが心筋細胞、血管内皮細胞に与える影響を調査した。切断プロラクチン溶解 Buffer 添加群と比較して、切断プロラクチン添加では血管内皮細胞におけるミ

トコンドリア活性が有意に低下した。一方、心筋細胞に対しては切断プロラクチンの影響が確認出来なかった。

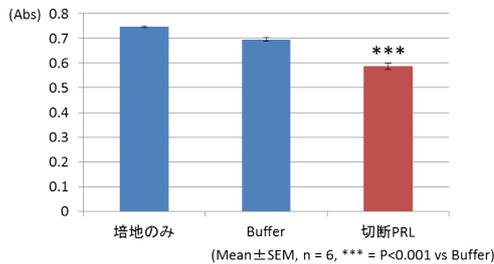


図3-A. 血管内皮細胞における切断プロラクチンの影響

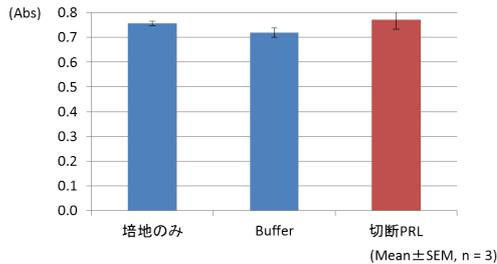


図3-B. 心筋細胞における切断プロラクチンの影響

以上より、切断プロラクチンが心筋細胞に対して影響を与えないが、血管内皮細胞に対してミトコンドリア活性を低下させることが明らかになった。

心筋症モデル動物

高プロラクチン血症化は腎臓被膜下への下垂体移植により行った。移植後3週間で解剖を行い、剖検時に腎臓被膜下への下垂体の定着を確認した。移植した下垂体は、プロラクチン抗体を用いた免疫組織化学法を用いてプロラクチンの産生を確認した。その結果、移植した下垂体においてプロラクチンが産生されていることが確認できた。体重、心重量に変化は認められなかった。また、心臓の組織切片を作成し、毛細血管を染色することで心臓の毛細血管占有率を算出した結果、高プロラクチン血症マウスにおいて、コントロールと比較して毛細血管占有率が増加している傾向がみられた。

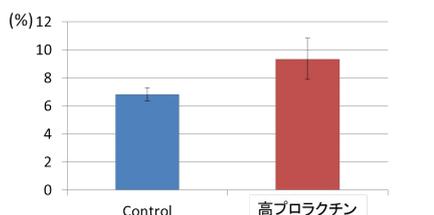
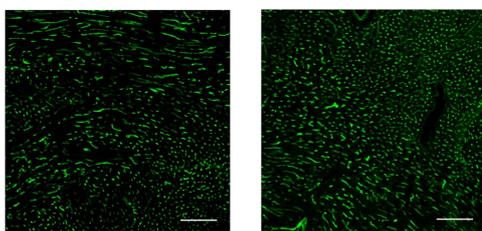


図4. 高プロラクチン血症マウスにおける心臓血管占有率

同様に心臓線維化率は高プロラクチン血症マウスで増加している傾向がみられた。qRT-PCRによる心臓中の遺伝子発現解析によって、心不全関連遺伝子に有意な発現の変化はみられなかったが、血管新生関連遺伝子の発現が上昇していた。

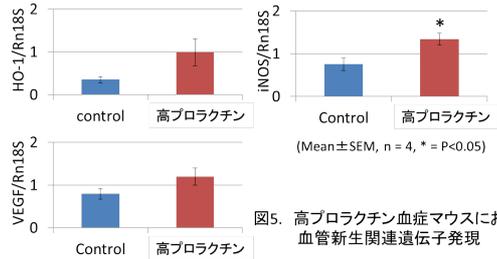


図5. 高プロラクチン血症マウスにおける血管新生関連遺伝子発現

以上の結果から、周産期心筋症において、切断プロラクチンが心筋細胞ではなく血管内皮細胞に影響を与える可能性を示した。また、誘導型一酸化窒素合成酵素は、血管内皮細胞の生存に関わる一酸化窒素の合成を行う酵素であり、プロラクチンが血管内皮細胞に作用すると、ヘムオキシゲナーゼ-1の発現が増加し、それによって血管内皮細胞増殖因子の発現が増加して血管新生が促進される。上記遺伝子の発現が高プロラクチン血症マウスにおいて上昇していたことから、プロラクチンは心臓に対して血管新生促進的に働く可能性を示し、切断プロラクチンと拮抗的に作用することで心臓を保護していることが予測される。

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2件)

Ishida M, Maehara M, Watanabe T, Yanagisawa Y, Takata Y, Nakajima R, Suzuki M, Harigaya T. Vasoinhibins, N-terminal mouse prolactin fragments, participate in mammary gland involution. Journal of Molecular Endocrinology 52(3):279-87, (2014) 査読あり
doi: 10.1530/JME-13-0189.

中嶋亮順、廣田飛鳥、鈴木美香、大田千景、神谷千津子、池田智昭、石田充代、針谷敏夫「妊娠高血圧症候群および周産期心筋症患者血中におけるバソインヒピン、カテプシン D の検出」日本妊娠高血圧学会雑誌 第19巻 pp.171-172 (2012) 査読あり

[学会発表](計17件)

中村恵理、生駒直也、廣田飛鳥、渡辺つかさ、中嶋亮順、神谷千津子、池田智明、石田充代、針谷敏夫「バソインヒピンおよびカテプシン D の周産期心筋症、妊娠高血圧症候群との関連性解析」第28回下垂体研究会、2013年8月、岩手県花巻市

R. Nakajima, A. Hirota, T. Watanabe, E. Nakamura, N. Ikoma, C. Kamiya, T. Ikeda, M. Ishida, T. Harigaya "Correlation between Vasoinhibin and CathepsinD Serum Levels in Pregnancy Induced Hypertension Syndrome Patients" The Endocrine Society's 95th Annual Meeting. (2013年6月). サンフランシスコ、USA

A Hirota, T Watanabe, R Nakajima, M Suzuki, C Ota, C Kamiya, T Ikeda, M Ishida, T Harigaya: "Detection of Vasoinhibin and CathepsinD in Peripartum Cardiomyopathy and Pregnancy-Induced Hypertension Patient's Blood" The Endocrine Society's 94th Annual Meeting. (2012年6月). ヒューストン、USA

廣田飛鳥、中嶋亮順、石田充代、針谷敏夫:
"心筋細胞における切断プロラクチン及び
プロラクチンレセプターの解析" 日本
下垂体研究会. (2011年8月25-27日). 岡
山

R. Nakajima, H. Nakamura, K. Yanagiya, M. Suzuki, M. Ishida, T. Harigaya:
"Analysis of cleaved prolactin in heart
and cardiomyocyte" The Endocrine
Society's 93th Annual Meeting. (2011
年6月). ボストン, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

針谷 敏夫 (HARIGAYA, Toshio)
明治大学・農学部・教授
研究者番号: 70135557

(2) 研究分担者

石田 充代 (ISHIDA, Michiyo)
明治大学・農学部・講師
研究者番号: 20445860

(3) 連携研究者

神谷 千津子 (KAMIYA, Chizuko)
独立行政法人国立循環器病研究センター・周産期・婦人科部・医師
研究者番号: 10551301