

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659385

研究課題名(和文)心房細動の分子機構 - カテプシンKの役割及び遺伝子治療への応用

研究課題名(英文)Cysteine Protease Cathepsin K: A New Biomarker in Patients with Atrial Fibrillation

研究代表者

成 憲武 (Xian Wu, Cheng)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：30378228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年、不全期心筋にけるカテプシンKの高発現やその抑制による心室リモデリングの改善が報告されている。しかし、心房筋レベルでの検討はない。我々は、心房細動(AF)心房筋におけるカテプシンKの発現ならびに活性の増加を明らかにした。アンジオテンシン受容体拮抗薬は、心房細動持続時間、NADPHオキシダーゼの活性化による酸化ストレス産生やカテプシンKの発現/活性化を抑制し、心房筋リモデリングやその線維化を改善することが明らかになった。さらに、カテプシンKは有意に群より非AF群で高値だった。以上より、カテプシンKが新たなAF心房リモデリングのバイオマーカーや治療ターゲットになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We sought to determine the link between atrial fibrillation (AF) and plasma CatK levels and to investigate the expression and therapeutic target for CatK. Plasma levels of CatK were measured in patients with AF (paroxysmal AF [PAF]; persistent AF [PeAF]) and control subjects. AF had higher CatK than did controls. PeAF had higher CatK levels than PAF. CatK was correlated left atrial diameter in all subjects. The levels of atrial tissue angiotensin II, AT1R, gp91phox, p-p38MAPK, and CatK; O2-; and CatK activity; and fibrosis were greater in rabbits with AF than in that of controls, and these changes were reversed by AT1R blocker (ARB). Olmesartan decreased the CatK expression induced by angiotensin II in neonatal myocytes. These data indicated that increased plasma CatK levels are linked with the presence of AF. ARB appears to be effective in alleviating atrial fibrosis in a rabbit AF model, partly reducing AT1R-p38MAPK-dependent and -independent CatK activation, thus preventing AF.

研究分野：医薬薬学

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：カテプシンK 心房細動 心房リモデリング マトリックス蛋白 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者社会を迎えた本邦においては、心房細動 (atrial fibrillation) が益々増加する傾向にあり、社会的にみても、心房細動の発症機序解明及び治療が極めて重要であることは疑いの余地がない。その機序として、心房筋の肥大と間質の線維化などの構造的リモデリングが心房細動発症と深く関連し、そのプロセスにおいて、細胞外マトリックス蛋白分解酵素やアポトーシスは重要であると知られている。

システイン・プロテアーゼであるカテプシンはライソゾームで種々蛋白の scavenger として働く蛋白分解酵素として認識されてきた。近年、我々は、カテプシン中のカテプシン K は、心血管細胞より分泌され、細胞外コラーゲンやエラスチンを分解し、血管新生や血管リモデリングへの関与を明らかにした (*Circ Res* 2003; *Am J Pathol* 2004, 2006)。さらに、世界に先駆け心房筋におけるカテプシンの研究を行い、不全期心房筋でのカテプシン K の高発現や培養心房筋細胞のアポトーシスへの関与を明らかにした (*Hypertension* 2006; *Am J Pathol* 2008; *JCVI* 2009) が、心房筋レベルでの検討はされていない。最近、申請者は、これらのカテプシンの分子・細胞レベル機能に関する最新研究成果を心疾患や動脈硬化を基盤とする血管疾患発症・進展機序、血中濃度や血管組織分布の臨床意義、薬物治療の分子ターゲットへの新規応用の展望や問題点を総説として纏めた (*Hypertension* 2011; *World Journal of Hypertension* 2011)。

### 2. 研究の目的

心房細動は発症頻度が高く、慢性化しやすい不整脈である。その機序として心房筋のリモデリング、特に間質の線維化がその発生と慢性化に重要である。線維化形成においてアポトーシスと細胞外マトリックス蛋白分解酵素は欠かせない存在である。システインプロテアーゼ・カテプシン K (cysteine protease: cathepsin K) は、培養心房筋細胞より分泌され、細胞外マトリックス蛋白を分解し、抗アポトーシス作用を有することが示されている。さらに近年、不全期心房筋での高発現や抑制による心室リモデリングの改善が報告されている。しかし、心房筋レベルでの検討はない。我々は、心房筋細胞由来カテプシン K の心房リモデリング及び心房細動発症への関与を提唱し、そのプロセスにおける新たな分子機構-カテプシン K の役割解明を本研究の目的とした。本研究により、正常心房筋や発作性と慢性心房細動心房筋におけるカテプシン K 変化やその機能を明らかにするとともに、新規遺伝子治療法やバイオマーカーを提供する。

### 3. 研究の方法

本研究は、基礎研究と臨床研究に分けて行った。まず、心房細動の新たな分子機構解明-カテプシン K 役割究明及び遺伝子治療開発に焦点

を絞って次の実験を行う。

- (1) ウサギ高頻度ペースング誘発心不全モデルにおいて、カテプシンファミリーの発現変化のスクリーニングをするとともに、培養心房筋細胞におけるカテプシン K 発現調節の検討
- (2) 同モデルへのカテプシン K 選択的と非選択的阻害剤の 4 週間投与と高頻度ペースング後、麻酔開胸下で電気生理学的検討を行うとともに、心房の組織学的検討
- (3) カテプシン K とシスタチン C 遺伝子欠損マウスに短時間高頻度ペースング誘発による心房細動発症と心房線維化を野生型マウスとの比較検討。

臨床研究では、対照群と発作性および持続性心房細動患者の血中カテプシン K、シスタチン C、炎症性物質、ANP、BNP、コラーゲン代謝産物、心房直径、心房圧や心機能との網羅的且つ多面的解析を行った。

### 【平成 24 年度】

#### (1) ウサギ高頻度ペースング誘発心不全モデルの作成とカテプシンファミリーの発現変化および心房線維化形成の組織学的評価

本研究におけるウサギ高頻度ペースング誘発心不全モデルは、連携研究者である嶋野が報告した (*Shimano M, et al. Heart Rhythm. 2008; 5:451-9*) モデルと同じモデルを使用した。麻酔開胸下、心外膜リードを右室の free wall に留置し、ペースメーカーを背部皮下に植え込み、同時にテレメトリー発信機を植え込む。毎分 400 回の高頻度ペースングを 4 週間行い、心不全を作成し、次の検討を行った：

Microarray 法を用い、正常と心房細動心房筋におけるカテプシンファミリー、炎症性サイトカインや増殖因子 (transforming growth factor, peroxisome proliferator-activated factor (PPAR), / , and ) などの発現変化の網羅的解析を行った。

組織学的検討：Masson trichrome 染色による心房筋線維化、TUNEL 蛍光法による心房筋アポトーシス、CD68 や CD4/8 抗体などの染色による炎症性細胞浸潤やリンパ細胞の浸潤などの検討を行った。

ラット胎児心房筋細胞を用い、細胞レベルでのカテプシン K 発現調節機序、その酵素依存性コラーゲンとエラスチン分解能や心房筋細胞の低酸素誘導下でのアポトーシスへの関与の有無を検討した。

#### (2) 心房筋細胞におけるカテプシン K の発現制御機序およびアポトーシスへの関与の有無究明

ラット胎児心房筋細胞を単離し、炎症性サイトカイン [interleukin-1 (IL-1), tumor-necrosis-factor (TNF- )], angiotensin II や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激によるカテプシン K 発現変化およびその酵素依存性コラーゲンとエラスチン分解能の検討。

選択的 (D00087420) と非選択 (E64d) カ

テブシン K を用い、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や低酸素誘導によるアポトーシスにおけるその役割検討。

### (3) 臨床研究：心房細動の新規バイオマーカー：血中カテブシン K の評価

研究対象：対照群、発作性と持続性心房細動群；150 例/群（平成 24 年 4 月～平成 25 年 3 月）。

診断：自覚症状、身体検査および臨床検査による診断を行う（冠動脈撮影、心エコーや心カテテル検査による心筋症、弁膜症や先天性心疾患などを排除）。

対象者のベースラインデータ採集及びデータベース：患者の家族歴や薬物治療などのベースラインデータ採集及びデータベース作成。

評価項目：ア) 血液生化学検査：一般血液検査や血漿 BNP 濃度などの検討；イ) エコーによる心機能及び血行動態測定；ウ) 心臓カテテル検査。

最新型マルチプル ELISA 法とラジオイムノアッセイ法を用いて、カテブシン K、シスタチン C、血中炎症性サイトカイン（IL-1，IL-6，IL-8，IL-10，IL-18，TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$ ，MCP-1，ICAM-1，VCAM-1，hs-CRP）蛋白分解酵素（MMPs，Cathepsins）I 型コラーゲン代謝産物（I-PINP，intact procollagen type I N-terminal propeptide；ICTP，carboxyl-terminal telopeptide of collagen type I）の評価を行った。

#### 【平成 25 年度】

### (1) ウサギ高頻度ペースング誘発心不全モデルにおけるカテブシン K の阻害剤の薬物効果評価

ペースング誘発心不全モデルを作成し、選択的（D00087420）と非選択的（E64d）カテブシン K 阻害剤を 4 週間投与し、非投与群とアンジオテンシン受容体拮抗薬投与群（ポジティブ対照群）との次の比較検討を行った：

Masson trichrome 染色による心房筋繊維化を治療群と非治療群との比較検討。

TUNEL 蛍光法と ssDNA 染色法を用い、カテブシン阻害剤の心房筋における抗アポトーシスの評価。

蛍光（FITC）ラベルした基質用い、心房筋抽出蛋白におけるコラーゲンやエラスチン分解能の評価。

CD68 や CD4/8 抗体染色による炎症性細胞浸潤やリンパ細胞浸潤の評価。

ELISA 法を用い、心房筋における炎症性サイトカイン（IL-1，IL-10，IL-18，TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$ ，MCP-1，ICAM-1，VCAM-1）と増殖因子（TGF- $\beta$ ）レベルの評価。

ELISA 法あるいは放射法を用い、血中カテブシン K、シスタチン C と I 型コラーゲン代謝産物（I-PINP，ICTP）の測定。

Western blotting 法を用い、PI3K/Akt，MAPK と toll-like receptor 経路の活性化やリン酸

化レベルの検討。

### (2) マウス対外式短時間高頻度ペースング誘発心不全モデルの作成

カテブシン K とシスタチン C 遺伝子欠損マウスに体外式ペースング（短時間高頻度：1000 回/分、2 時間/日）誘発による心不全モデルを作成、心房繊維化を野生型マウスとの次の比較検討を行った。

両遺伝子操作マウスと野生型マウスとの心房筋繊維化の比較検討。

炎症性細胞浸潤、アポトーシス、血中のカテブシン K、コラーゲン代謝産物や炎症性サイトカインの検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床研究成果

カテブシン K は有意に non-atrial fibrillation (non-AF) 群より AF 群で高値だった (AF vs non-AF: 13.1 $\pm$ 6.7ng/ml vs 5.3 $\pm$ 2.9ng/ml, P<0.01)。

interferon-1 (IL-1)、高感度 C-reactive protein (CRP) やコラーゲン分解代謝物 carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) も AF 群で有意に高値だった (P<0.05)。

AF 群の中ではカテブシン K、IL-1 は発作性心房細動 (paroxysmal AF, PAF) 群に比べて持続性心房細動 (persistent AF, PsAF) 群で高値だった (P<0.05)。

Spearman's correlation test ではカテブシン K は IL-1 (P<0.01)、ICTP (P<0.05)、左房径 (P<0.05) と有意に相関し、多変量解析ではカテブシン K が独立した AF の予測因子だった。

アブレーション 1 年後の再発群では非再発群と比較し、カテブシンは有意に高値だった (再発群 vs 非再発: 14.3 $\pm$ 4.4ng/ml vs 11.7 $\pm$ 4.1ng/ml, P<0.01) だった。

### (2) 基礎研究成果

ウサギ高頻度ペースング誘発心不全-AF モデルを作成し、心房筋におけるカテブシンファミリーの発現変化のスクリーニングを行った。その結果、他のカテブシン比較し、カテブシン K 蛋白発現が AF 群で有意な増加を認められ、この高発現は心房筋におけるコラーゲン活性の上昇と密接に関連することが明らかにされた。

アンジオテンシン受容体拮抗剤 olmesartan 投与は、AF 持続時間、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼの活性化による酸化ストレス産生、gp91phox 発現、p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) リン酸化やカテブシン K の発現/活性化を抑制し、心房筋リモデリングやその線維化を改善することが明らかになった。

## 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 17件)

Jiang H, Cheng XW, Shi GP, Hu L, Inoue A, Yamamura Y, Wu H, Takeshita K, Li X, Huang Z, Song H, Asai M, Hao CN, Unno K, Koike T, Oshida Y, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M. Cathepsin K-Mediated Notch1 Activation Contributes to Neovascularisation in Response to Hypoxia. *Nature Communications*. 2014 (in press). 査読有.

Hong SH, Jang HH, Lee SR, Lee KH, Woo JS, Kim JB, Kim WS, Min BI, Cho KH, Kim KS, Cheng XW, Kim W. Impact of Lysophosphatidylcholine on Survival and Function of UEA-1<sup>+</sup>acLDL<sup>+</sup> Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease. *Heart & Vessels*. 2014. [Epub ahead of print]. 査読有.

Kimura K, Cheng XW, Inoue A, Hu L, Koike T, Kuzuya M.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mTOR and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced MuRF-1 expression in C2C12 cells. *Nutrition Research*. 34(4): 368-374. 2014. 査読有. DOI: 10.1016/j.nutres. 2014.02.003.

Hu L, \*Cheng XW, Song H, Inoue A, Jiang H, Li X, Shi GP, Kozawa E, Okumura K, Kuzuya M. Cathepsin K Activity Controls Injury-Related Vascular Repair in Mice. *Hypertension*. 63(3):607-15. 2014. 査読有. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02141.

Cheng XW, Sasaki T, Kuzuya M. Digesting the Atherosclerosis-like Lesion-Based Remodeled Vasculature: The Role of Cysteine Cathepsins in Venous Disorder (*editorial*). *Thrombosis and Haemostasis*. 112(1). 2014. [Epub ahead of print]. 査読有. DOI: 10.1160/TH13-10-0889.

\*Cheng XW, Kikuchi R, Ishii H, Yoshikawa D, Hu L, Takahashi R, Shibata R, Ikeda N, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Circulating Cathepsin K as a Potential Novel Biomarker of Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis*. 228:211-216. 2013. 査読有. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.004.

\*Cheng X, Murohara T, Kuzuya M. GLP-1R Agonists for the Prevention of Cardiac Injury in STEMI Patients Undergoing PCI: Something New and Promising, or Not? *International Journal of Cardiology Metabolic and Endocrine*. 1:1-3. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.ijcme.2013.10.003

Yamada T, Hirashiki A, Cheng XW, Okumura T, Shimazu S, Okamoto R, Shinoda N, Isobe S, Takeshita K, Shinji N, Kondo T, Murohara T. Relationship between Myocardial Fibrosis and Left Ventricular Function in Nonischemic

Dilated Cardiomyopathy: A Comparison Focal and Interstitial Fibrosis. *Journal of Cardiac Failure*. 19 (8):557-564. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.cardfail.2013.05.018.

Wu HX, Cheng XW, Hao C, Zhang Z, Yao H, Murohara T, Dai Q. Regulation of Apelin and its Receptor Expression in Adipose Tissues of Obesity Rats with Hypertension and Cultured 3T3-L1 Adipocytes. *Experimental Animals*. 2013 (acceptance). 査読有.

Song H, Nan YS, \*Cheng XW. Circulating cf-DNA: A Promising, Noninvasive Tool for Assessment of Early Cardio-Metabolic Risk (*editorials*). *Atherosclerosis*. 233:307-309. 2013. 査読有. DOI:10.1016/j.atherosclerosis. 2013.11.081.

Okumura T, Hirashiki T, Yamada S, Funahashi H, Oshima S, Kono Y, Cheng XW, Takeshita K, Murohara T. Association between cardiopulmonary comparison with peak VO<sub>2</sub> and VE/VCO<sub>2</sub> slope. *International Journal of Cardiology*. 162(3): 234-239. 2013. 査読有. DOI:10.1016/j.ijcard. 2011.05.065.

Okamoto R, Hirashiki A, Cheng XW, Shinoda N, Okumura T, Takeshita K, Bando Y, Murohara T. Usefulness of serum cardiac troponins T and I to predict cardiac molecular changes and cardiac damage in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *International Heart Journal*. 54(4):202- 206. 2013. 査読有. DOI: 10.1536/ihj.54. 202.

Hayashi D, Ohshima S, Isobe S, Cheng XW, Unno K, Funahashi H, Shinoda N, Okumura T, Hirashiki A, Kato K, Murohara T. Increased <sup>99m</sup>Tc-sestamibi washout reflects impaired myocardial contractile and relaxation reserve during dobutamine stress due to mitochondrial dysfunction in dilated cardiomyopathy. *The Journal of American College and Cardiology*. 61(19):2007-2017. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.01.074.

Hara Y, Noda A, Miyata S, Minoshima M, Sugiura M, Kojima J, Otake M, Furukawa M, Cheng XW, Nagota K, Murohara T. Effect of Aged Garlic Extract on Left Ventricular Diastolic Function and Fibrosis in Rats Model of Hypertension. *Experimental Animals*. 62(4):305-310. 2013. 査読有. DOI: /10.1538/expanim.62.305.

Hao CH, Shi YQ, Huang JJ, Li HY, Huang ZH, Cheng XW, Lu W, Duan JL. The power combination of blood-pressure parameters to predict the incidence of plaque formation in carotid arteries in elderly. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 6(6):461-469. 2013. 査読有. www.ijcem.com/ISSN:1940-5901/IJCEM1305006.

Fujita M, \*Cheng XW, Inden Y, Yoshida N, Kitamura K, Shimano M, Hu L, Shi GP, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T. Mechanisms with

Clinical Implications for Atrial Fibrillation-Associated Remodeling: Cathepsin K Expression, Regulation, and Therapeutic Target and Biomarker. *Journal of the American Heart Association*. 2(6):e000503. 2013. 査読有. DOI: 10.1161/JAHA.113.000503.

Sasaki T, Nakamura K, Sasada K, Okata S, **Cheng XW**, Suzuki S, Murohara T, Sato K, Kuzuya M. Matrix Metalloproteinase-2 deficiency Impairs Aortic Atherosclerotic Calcification in atherosclerotic in ApoE-deficient old mice. *Atherosclerosis*. 227:43-50. 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.008.

〔学会発表〕(計 7件)

**Cheng XW**. The Progress in Angiogenesis Research: Focusing on Notch1 Activation and Cathepsin K. *Myocardial Ischemia Symposium in Korea 2013 (MIS-Korea)*. 2013年9月28日. ソウル(韓国).

**Cheng XW**. Cathepsin K-A Classical Bone Biomarker in Cardiovascular Disease: The heart is not alone anymore. *The 3rd East Asia International Cardiovascular Symposium*. 2013年8月9日. 哈爾濱(中国).

姜海英, **成 憲武**, 胡麗娜, 井上愛子, 史国平, 奥村健二, 葛谷雅文. Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-Induced Neovascularization in Cathepsin K-Deficient Mice: Impact on Noich1 activation. 第77回日本循環器学会. 2013年3月15日. パシフィコ横浜(横浜市).

Jiang HY, **Cheng XW**, Shi GP, Hu L, Inoue A, Song H, Huang Z, Okumura K, Kuzuya M. Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-Induced Neovascularization in Cathepsin K-Deficient Mice. *American Heart Association. Scientific Sections 2012*. 2012年11月5日. ロサンゼルス(アメリカ).

**Cheng XW**. Anti-Vascular Aging: Impact on Exercise and EPCs. *The 3rd International Symposium on the Frontiers in Cardiovascular Diseases (3rd ISFC)*. 2012年9月22日. 廈門市(中国).

藤田雅也, **成 憲武**, 因田恭也, 吉田直樹, 嶋野祐之, 奥村健二, 室原豊明. Cysteine Protease Cathepsin K: A New Biomarker in Patients with Atrial Fibrillation. 第60回日本心臓病学会学術集会. 2012年9月15日. ホテル日航金沢ほか(金沢市).

**成 憲武**, 胡麗娜, 井上愛子, 佐々木健, 木村薫, 室原豊明, 葛谷雅文. Exploration of Mechanisms of Atherosclerotic Plaque Rupture From A New and Simple Mouse Model of Plaque Rupture. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会(シンポジウム). 2012年7月19日. ヒルトン福岡シーホーク(福岡市).

〔図書〕(計 1件)

**成 憲武**, 室原豊明. 医薬ジャーナル社. 血管新生研究の最先端 - 血管新生研究の最先端. 血管新生におけるインテグリンの役割. 佐藤靖史, 高倉伸幸編. 2013. 332(226-233)ページ.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成 憲武 (XIAN WU CHENG)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号: 30378228

### (2) 研究分担者 なし