

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780289

研究課題名(和文) 心臓リモデリングにおけるmatricryptinsの作用に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Basic study on the role of matricryptins in cardiac remodeling

研究代表者

岡田 宗善 (OKADA, MUNEYOSHI)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：30453509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞外マトリックス分解産物matricryptinsの心臓における作用解明を目的とした基礎的な検討を行った。そしてmatricryptinsの一つendostatinがラット心線維芽細胞の増殖や遊走を促進し、マウス左心房筋のブラジキニン誘発性収縮を抑制することを明らかにした。また他のmatricryptinであるcanstatinがラット心線維芽細胞においてシクロオキシゲナーゼ-2発現を増加し、マトリックスメタロプロテアーゼ-2及び-9分泌促進を介して細胞遊走を促進することや、分化型H9c2心筋芽細胞においてイソプロテレノール誘導性細胞死を抑制することなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The fundamental study was performed to elucidate the role of matricryptins, bioactive fragments of extracellular matrix, in the heart. Endostatin, one of the matricryptins, increased the proliferation and migration of rat cardiac fibroblasts, and inhibited bradykinin-induced left atrial contraction in mice. In addition, another matricryptin canstatin increased the expression of cyclooxygenase-2 and cell migration through the secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat cardiac fibroblasts, and inhibited isoproterenol-induced cell death in differentiated H9c2 cardiomyoblasts.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：循環器 心臓リモデリング 細胞外マトリックス Matricryptins Endostatin Canstatin 心線維芽細胞 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

高血圧、弁膜症や心筋梗塞などにより障害を受けた心臓は、代償性に収縮能を変化させると共に心肥大や線維化などの組織構造の変化、すなわち心臓リモデリングを引き起こす。このような病的な心臓リモデリングにより弾性を失った心臓は機能不全を起こし、最終的には心不全へと陥る。そのため心臓リモデリング機構の解明及びその制御は、心不全治療において重要な意義を持つ。細胞外マトリックス(ECM)は組織の構造支持体として働くだけでなく、様々な情報伝達機構をも併せ持ち、組織の恒常性維持に重要な役割を担っている。ECMはmatrix metalloproteinases (MMPs)などの分解酵素により切断され、断片化されるが、近年、この遊離されたECM断片の中で様々な生物活性を持つ matricryptins が同定されており、その生理的・病理的な役割について注目が集まっている。中でも XVIII 型コラーゲンの分解産物 endostatin は血管新生阻害作用や抗腫瘍作用などを持つことが広く知られており、その抗腫瘍薬としての応用が期待されている。また近年、その発現レベルと循環器疾患との関連が報告されており、endostatin が心臓においても何らかの作用を示すと考えられているが、その詳細な役割については未だ明らかにされていない。また endostatin 以外にも IV 型コラーゲンの分解産物 canstatin、arresten、tumstatin や VIII 型コラーゲンの分解産物 vastatin、そしてパルカンの分解産物 endorepellin など様々な matricryptins が同定されているが、これらの心臓における役割についても全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究は matricryptins の中で XVIII 型コラーゲン分解産物の endostatin と IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖分解産物の canstatin に着目し、それらの心筋収縮力への影響、心線維芽細胞機能(MMPs 産生、細胞増殖、細胞遊走)、または心筋細胞の細胞死に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Endostatin 及び canstatin については、マウスリコンビナント蛋白を購入し、実験に用いた。

(2) ddY マウスより左心房筋標本を摘出し、Krebs Henseleit 液の入ったマグヌス装置に設置して基礎張力 0.5 g をかけ、5 msec の矩形波で 2 Hz の電気刺激を与えることにより収縮させた。左心房筋の収縮力はトランスデューサー及び PowerLab システムを用いて測定した。安定化後、ブラジキニン、endostatin や N-アセチルシステインを処置し、収縮力の変化について検討した。

(3) Wistar ラットの心臓を摘出し、ランゲン

ドルフ装置に設置して灌流心とし、コラゲナーゼ処置を行った。その後心室より心線維芽細胞を単離培養し、*passage* 2-5 の細胞を実験に用いた。Endostatin または canstatin を処置した後に位相差顕微鏡により細胞形態を観察した。増殖能は細胞数計測法、遊走能は Boyden chamber 法を用いて測定した。また細胞増殖と遊走の両者により促進される創傷治癒能を、wound healing assay により測定した。また細胞中の蛋白質の発現やリン酸化、そして培養液中への MMPs 分泌は Western blot 法により測定した。

(4) ラット心筋芽細胞株である H9c2 細胞に対し、レチノイン酸を長時間処置することにより心筋細胞へと分化させた。この分化型 H9c2 心筋芽細胞を用いてイソプロテレノール誘導性細胞死に対する canstatin の影響について検討した。生細胞数の変化を細胞数計測法により、cleaved caspase-3 発現の変化を Western blot 法により検討した。

4. 研究成果

(1) マウス左心房筋におけるブラジキニン誘発性収縮に及ぼす endostatin の影響

Endostatin (100-1000 ng/ml) 単独処置はマウス左心房筋の収縮には影響を及ぼさなかった。一方、endostatin (300 ng/ml, 30 分前処置) は、ブラジキニン (1 μ M) 誘発性収縮を有意に抑制した。またこの endostatin によるブラジキニン誘発性収縮抑制作用は、抗酸化薬 N-アセチルシステイン (10 mM) の共処置により解除された。以上の結果から endostatin は活性酸素種依存性にマウス左心房筋のブラジキニン誘発性収縮を抑制することが明らかとなった (図 1)。

(2) ラット心線維芽細胞における endostatin の役割

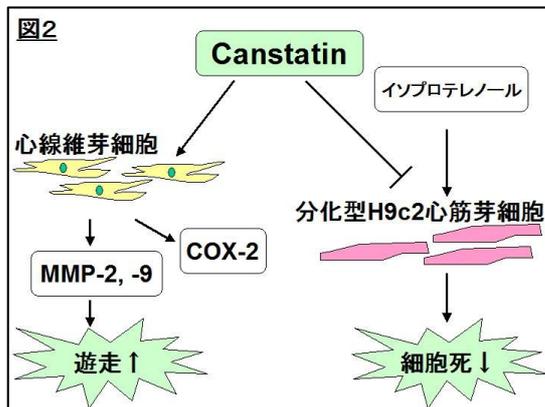
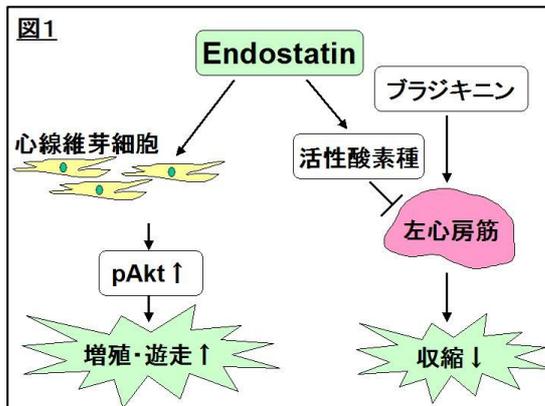
Endostatin (100-3000 ng/ml, 24 時間処置) は、ラット心線維芽細胞に対して細胞形態の変化のような細胞障害性は示さなかった。一方 endostatin (100-3000 ng/ml, 24 時間処置) は心線維芽細胞の増殖能と遊走能を有意に亢進した。また endostatin (100-3000 ng/ml, 16-20 時間処置) は創傷治癒能も有意に亢進した。細胞内シグナルの変化について検討したところ、endostatin (100-3000 ng/ml, 20 分処置) は Akt (Ser473) のリン酸化を有意に亢進した。また PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 (10 μ M, 30 分前処置) は endostatin 誘導性の細胞増殖と遊走を抑制した。以上の結果から、endostatin は Akt の活性化を介してラット心線維芽細胞の増殖と遊走を促進することが明らかとなった (図 1)。

(3) ラット心線維芽細胞における canstatin の役割

Canstatin (10-250 ng/ml, 48 時間処置) は、ラット心線維芽細胞の cyclooxygenase

(COX)-2 発現、そして培養液中への MMP-2 及び-9 分泌を濃度依存的に亢進した。また canstatin (10-250 ng/ml, 24 時間処置)は細胞遊走能も濃度依存的に亢進し、この遊走は MMP-2 及び-9 阻害薬である CTTHWGFTLC ペプチド(10 μM, 30 分前処置)により阻害された。以上の結果から、canstatin はラット心線維芽細胞の COX-2 発現を亢進し、MMP-2 及び-9 分泌促進を介して細胞遊走を促進することが明らかとなった(図2)。

(4)分化型 H9c2 心筋芽細胞のイソプロテレノール誘導性細胞死に及ぼす canstatin の影響
レチノイン酸(10 nM)長期処置により心筋細胞へと分化させた H9c2 細胞に対し、イソプロテレノール(100 μM, 48 時間)を処置すると細胞死が誘導され、生細胞数が減少する。Canstatin (10-250 ng/ml, 30 分前処置)はこのイソプロテレノールによる生細胞数の減少を濃度依存的に抑制した。またアポトーシスの指標である cleaved caspase-3 発現のイソプロテレノールによる増加に対しても canstatin は濃度依存的な抑制作用を示した。以上の結果から、分化型 H9c2 心筋芽細胞において canstatin がイソプロテレノール誘導性細胞死を抑制することが明らかとなった(図2)。



(5)研究成果の総括及び今後の展望

これまで endostatin に関する研究の多くがその血管新生阻害作用や抗腫瘍作用に焦点を当てたものであった。研究成果(1)及び(2)から、endostatin が心臓において血管新

生阻害作用以外の生理的な作用を持つことが初めて明らかとなった。また現在のところ、canstatin に関する報告は世界的に見て乏しく、そのほとんどが腫瘍や血管新生に関するものである。心臓における canstatin の発現動態や作用については全く報告されていないことから、本研究成果(3)及び(4)は先進的で意義のあるものと言える。

(1)の研究成果では、心線維芽細胞の増殖や遊走を促進する作用を持つことから、endostatin が線維化をはじめとした心臓リモデリングに關与する可能性が示唆された。また(2)の研究成果では、ブラジキニンによる心筋収縮に対して抑制作用を持つことから、endostatin が心機能を調節する1因子であることが明らかとなった。(3)の研究成果では、心線維芽細胞の MMPs 分泌を介して遊走を促進し、炎症性蛋白質の COX-2 発現を増加することなどから、canstatin が心臓リモデリングを促進するような役割を持つ可能性が示唆された。一方で(4)の研究成果では、canstatin が心筋細胞の細胞死抑制という心保護作用を持つことが明らかとなった。

今後は本研究成果をもとに、各種心疾患モデルを用いて endostatin 及び canstatin のより詳細な病態生理学的役割を解明する必要がある。それにより得られた研究成果がこれら matricryptins を標的とした新たな心不全治療法の確立に繋がっていくことが期待される。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

(1) 岡田宗善、高田璃羅、山脇英之。Endostatin はマウス左心房筋の bradykinin 誘発性収縮を抑制する。第156回日本獣医学会学術集会。2013年9月20日。岐阜県岐阜市。

(2) 岡田宗善、大場遥子、山脇英之。Endostatin increases proliferation and migration of rat cardiac fibroblasts. 第87回日本薬理学会年会。2014年3月20日。宮城県仙台市。

(3) 村田直紀、岡田宗善、山脇英之。Canstatin increases matrix metalloproteinases secretion and cyclooxygenase-2 expression in rat cardiac fibroblasts. 第87回日本薬理学会年会。2014年3月20日。宮城県仙台市。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
北里大学獣医薬理学研究室ホームページ
<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 宗善 (OKADA MUNAYOSHI)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：30453509