

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461110

研究課題名(和文) ADAMTS4とTGF- β の制御による左室リモデリングへの作用

研究課題名(英文) The role of ADAMTS in cardiovascular disease

研究代表者

草地 省蔵 (KUSACHI, Shozo)

岡山大学・保健学研究科・特命教授

研究者番号：30214943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞外マトリックス分解酵素ADAMTSの左室リモデリングおよび線維化における役割とその制御メカニズムを検証することである。本研究では、まず基質を互いに共有しともにアグリカナーゼとして知られるADAMTS4とADAMTS5のダブルノックアウトマウスを作成した。ダブルノックアウトマウスは正常に産まれた。次にApoEノックアウトマウスとのトリプルノックアウトマウスを作成した。トリプルノックアウトマウスに高脂肪食を負荷し、動脈硬化巣形成への作用を検討したところ、ApoE単独ノックアウトマウスと比較して有意な差を認め、新たな創薬へと結びつく興味ある知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the role of ADAMTS in cardiovascular disease. We used ADAMTS knockout mouse in this study. First, we produced ADAMTS4/ADAMTS5 double knockout mouse. Because ADAMTS4 (aggrecanase-1) and ADAMTS5 (aggrecanase-2) share the substrates, one of these two molecule may compensate the biological function in a single knockout mouse, we decided to produce double knockout mouse. The double knockout mice were survived and there was no dwarfism observed. There was no particular abnormality in the tissue development. We then cross double knockout mice with ApoE knockout mouse. ApoE knockout mouse is used for atherosclerosis study. We succeeded to produced triple knockout mice and we gave them high-fat diet. It was interesting that there was a significant difference in the development of atherosclerosis between ApoE single and triple knockout mice.

研究分野：循環器病学

キーワード：心臓病学 ECM

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞後に起きる左室リモデリングは心筋梗塞の予後を規定する重要な因子である。コラーゲンやプロテオグリカンなど細胞外マトリックス (ECM) とその分解酵素 (matrix metalloproteinase: MMP) の重要性は広く認識されている。例えば、MMP を阻害する TIMP-3 ノックアウトマウスでは心筋梗塞後リモデリングが促進する (*J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(6): 733-743.)。申請者らはヒト心筋梗塞患者において入院時血清 MMP-1 濃度がリモデリングを反映することを見出し報告した (*Heart* 1997; 78(3): 278-84.)。ADAMTS ファミリーは 1997 年に発見された ECM 分解酵素である (*J Biol Chem* 1997; 272(1): 556-562)。申請者らは ADAMTS1 の心筋梗塞における発現パターンの解析などの研究を行ってきた (*J Biochem (Tokyo)* 2004; 136(4): 439-46.)。ADAMTS の基質としては心臓に豊富な ECM タンパクであるパーシカンなどのプロテオグリカンがある。

実は、ECM のうち MMP が主に分解するのはコラーゲンであり、ADAMTS が主となって分解するのはプロテオグリカンである。このことから、MMP だけでなく ADAMTS も左室リモデリングに役割を持っていると考えられるが、まだその機能は明らかにされていない。

最近、中国の研究者からマウス心筋梗塞における ADAMTS4 と ADAMTS8 の発現解析が報告されたが機能的な解析まで行っているグループはない。後述するように、特に ADAMTS が線維化に深く関わる報告が肝疾患などでみられているが心臓での役割は未知である。最近になり、TGF- β が ADAMTS1 の発現を制御するといった報告 (*Cancer Res.* 2008; 68(22): 9541-9550.) や ADAMTS が様々な細胞外マトリックス分子と相互作用することが示されている (*J Biol Chem.* 2005; 280(41): 34796-34804)。最新の研究情報により、ADAMTS の役割の一部に TGF- β の活性化が考えられた (Bourd-Boittin et al., *Hepatology* 2011; 54(6): 2173-84.)。つまり、左室リモデリングにおいて ADAMTS と TGF- β の間には活性化と発現制御の相互作用が存在しており、互いに作用して、協調的或いは代償的に働くと仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究では、ADAMTS 欠損マウスを用いた心血管疾患モデルの解析を通じて、左室リモデリングにおける ADAMTS の役割と TGF- β の重要性を解明する。

3. 研究の方法

本研究では、まず我々が所有している ADAMTS4 欠損マウスを用いて心筋梗塞モデルを作成することで、リモデリングに対する直接の役割を明らかにする。次に、他の ADAMTS がどう作用するかを検討した上で、必要があればダブルノックアウトマ

ウスを作成し、その作用を検証することを目指す。

4. 研究成果

ADAMTS4 ノックアウトマウスを用いた心筋梗塞リモデリング実験

ADAMTS4 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いた麻酔下に開胸し冠動脈を結さつして心筋梗塞モデルを作成した。対照として開胸のみで結さつを行わないシャム群を設定した。心筋梗塞作成後 7 日目および 28 日目での左室内腔径や心機能を心臓超音波検査で計測した。左室径 (LVDD) は野生型で 2.42mm、ADAMTS4 ノックアウトマウスでは 2.30mm と有意な差は認めなかった。心収縮力の指標である FS に関しては、野生型 35.44%、ADAMTS4 ノックアウトマウスでは 35.58% とほぼ同等であった。これらのことは左室リモデリングには大きな差が出ないことを示している。この原因の一つとして ADAMTS4 と基質を共有している他の ADAMTS が代償性に働いている可能性が考えられた。すなわち、他の ADAMTS とのダブルノックアウトマウスを作成する必要性が示された。

従って直ちに ADAMTS4 と ADAMTS5 のダブルノックアウトマウスを作成する実験に取り掛かった。ADAMTS4 ノックアウトマウスと ADAMTS5 ノックアウトマウスをそれぞれ交配することでダブルノックアウトマウス作成を目指したが、ADAMTS5 ノックアウトマウスの繁殖率が予想より低く難渋した。しかしながら粘り強く交配を続けた結果ダブルノックアウトマウスを樹立することに成功した。しかしながら、ダブルノックアウトマウスは発生的には明らかな異常は認めなかった。そこで、遺伝学的な疾患モデルとして動脈硬化の研究に広く用いられている ApoE ノックアウトマウスとの交配を行うことを計画した。トリプルノックアウトマウスの樹立に成功し、同マウスに高脂肪食負荷を開始した。

高脂肪食を負荷した ApoE 単独ノックアウトマウスと比べて、トリプルノックアウトマウスに高脂肪食を負荷したところ、動脈硬化薬形成に有意な差が見られ、ADAMTS が動脈硬化治療のターゲットとなる可能性が示された。

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 10 件)

Komatsubara I, Kondo J, Akiyama M, Takeuchi H, Nogami K, Usui S, Hirohata S, Kusachi S. Subclavian steal syndrome: a case report and review of advances in diagnostic and treatment approaches. *Cardiovasc Revasc Med.* 2016;17(1):54-8. 査読有

doi: 10.1016/j.carrev.2015.11.001.

Yamamoto K, Okano H, Miyagawa W, Visse

R, Shitomi Y, Santamaria S, Dudhia J, Troeberg L, Strickland DK, Hirohata S, Nagase H. MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1. *Matrix Biol.* 2016 pii: S0945-053X(16)30031-2. 査読有 doi:10.1016/j.matbio.2016.03.007.

Altuntas A, Halacli SO, Cakmak O, Erden G, Akyol S, Ugurcu V, Hirohata S, Demircan K. Interleukin-1 induced nuclear factor- κ B binds to a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9 promoter in human chondrosarcoma cells. *Mol Med Rep.* 2015 ;12(1):595-600. 査読有 doi: 10.3892/mmr.2015.3444.

Ishii H, Kamikawa S, Hirohata S, Mizutani A, Abe K, Seno M, Oohashi T, Ninomiya Y. Eosinophil Cationic Protein Shows Survival Effect on H9c2 Cardiac Myoblast Cells with Enhanced Phosphorylation of ERK and Akt/GSK-3 under Oxidative Stress. *Acta Med Okayama.* 2015;69(3):145-53. 査読有

Inagaki J, Takahashi K, Ogawa H, Asano K, Hatipoglu OF, Zeynel Cilek M, Obika M, Ohtsuki T, Hofmann M, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp Cell Res.* 2014; 323(2):263-75. 査読有 doi:10.1016/j.yexcr.2014.03.002

Miyoshi T, Hirohata A, Usui S, Yamamoto K, Murakami T, Komatsubara I, Kusachi S, Ohe T, Nakamura K, Ito H. Olmesartan reduces inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention: results from the OLIVUS trial. *Heart Vessels.* 2014 Mar;29(2):178-85. 査読有 doi: 10.1007/s00380-013-0343-0.

Yamaji H, Murakami T, Hina K, Higashiya S, Kawamura H, Murakami M, Kamikawa S, Hirohata S, Kusachi S. Usefulness of dabigatran etexilate as periprocedural anticoagulation therapy for atrial fibrillation ablation. *Clin Drug Investig.* 2013 Jun; 33(6):409-18. 査読有 doi:10.1007/s40261-013-0081-1.

Kamikawa S, Miyoshi T, Doi M, Orita N,

Sangawa M, Nakatsu T, Noguchi Y, Hirohata S, Kusachi S, Nakamura K, Ito H. Reduced Diurnal Variation of Heart Rate is Associated With Increased Plasma B-Type Natriuretic Peptide Level in Patients With Atrial Fibrillation. *Clin Cardiol.* 2013 Jul; 36(7): 394-400. 査読有 doi:10.1002/clc.22128.

Murakami T, Yamaji H, Numa K, Kawamura H, Murakami M, Higashiya S, Kamikawa S, Hina K, Hirohata S, Kusachi S. Adaptive-servo ventilation combined with deep sedation is an effective strategy during pulmonary vein isolation. *Europace.* 2013 Jul; 15(7): 951-6. 査読有 doi:10.1093/europace/eut007.

Kajiya M, Miyoshi T, Doi M, Usui S, Iwamoto M, Takeda K, Nosaka K, Nakayama R, Hirohata S, Kusachi S, Nakamura K, Ito H. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with complex coronary lesions in patients with stable coronary artery disease. *Heart Vessels.* 2013; 28(6): 696-703. 査読有 doi:10.1007/s00380-012-0310-1

〔学会発表〕(計8件)

Satoshi Hirohata, Keiichi Asano, Junko Inagaki, Takashi Ohtsuki, Nao Yamanokuchi, Shogo Watanabe, Toshitaka Oohashi. Distribution of versican and its degradation by ADAMTS protease in the tumor microenvironment. KSBMB International Conference 2016 韓国ソウル市 2016年5月18-20日

Satoshi Hirohata. The diverse function of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-1 (ADAMTS1). TIDRC International Symposium - Inflammation and Tumor microenvironment- 韓国ソウル市 2016年5月17日

Satoshi Hirohata, Omer Faruk Hatipoglu, Eriko Kusunoki, Takashi Ohtsuki, Junko Inagaki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya. ADAMTS1 null mice demonstrated omphalocele phenotype. ゴードンカンファレンス matrix metalloproteinase 米国メイン州・サンデーリバー. 2015年8月2-7日

Junko Inagaki, Katsuyuki Takahashi, Hiroko Ogawa, Omer Hatipoglu, Mehmet Cilek, Masanari Obika, Takashi Ohtsuki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya, Satoshi Hirohata. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic

endothelial cell-specific VEGF receptor.
The 18th International Vascular Biology
Meeting みやこめっせ (京都市) 2014 年 4 月
14-17 日

豊永慎二、間島圭一、中津高明、廣畑 聡、草地省蔵 低酸素運動負荷時の血圧応答と
家庭血圧の関連 第 37 回日本高血圧学会総
会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2014 年 10 月
17 - 19 日

Hirofumi Kumashiro, Satoshi Hirohata,
Asami Yamanishi, Chiho Tomioka, Shozo
Kusachi Red Cell Distribution Width Is an
Important Factor for Evaluatiin of
Diastolic Dysfunction in Chronic
Hemodialysis Patients. 第 78 回日本循環器
学会総会 東京都 2014 年 3 月 21-23 日

Satoshi Hirohata, Omer Faruk
Hatipoglu, Eriko Kusunoki, Takashi
Ohtsuki, Junko Inagaki, Shozo Kusachi,
Yoshifumi Ninomiya. ADAMTS1 null mice
demonstrated omphalocele phenotype. ゴー
ドンカンファレンス matrix
metalloproteinase 2013 年 5 月 18-24 日
イタリア・バルガ市

Hirofumi Kumashiro, Satoshi Hirohata,
Asami Yamanishi, Chiho Tomioka, Shozo
Kusachi Red cell distribution width is an
effective tool for detecting diastolic
dysfunction in chronic hemodialysis
patients. 欧州心不全会議 (ESC) ポルトガ
ル リスボン 2013 年 5 月 25-31 日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草地 省蔵 (KUSACHI, Shozo)
岡山大学・大学院保健学研究科・特命教授
研究者番号：30214943

(2) 研究分担者

廣畑 聡 (HIROHATA, Satoshi)
岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：90332791

小川 弘子 (OGAWA, Hiroko)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：70423283