

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26850186

研究課題名(和文)心疾患におけるエンドスタチンの病態生理的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathophysiological roles of endostatin in heart disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではXVIII型コラーゲン分解断片エンドスタチンの心疾患における病態生理的役割を解明することを目的とした。その結果、エンドスタチンが心筋梗塞モデルラットの梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖と遊走を亢進し、モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心室由来肥大心筋細胞のT型カルシウムチャネル活性を阻害すること、さらにこれらの心疾患に対して心保護的に働くことなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify the pathophysiological roles of endostatin, a cleaved fragment of type XVIII collagen, in heart disease. We found that endostatin stimulated proliferation and migration of myofibroblasts isolated from the infarct area in a rat myocardial infarction model and inhibited T type calcium channel activity of hypertrophic cardiomyocytes isolated from the right ventricle in a rat monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy model. We also clarified that endostatin had cardioprotective effects on these heart diseases.

研究分野：獣医学

キーワード：循環器・高血圧 エンドスタチン 心筋梗塞 心肥大 筋線維芽細胞 T型カルシウムチャネル モノクロタリン RNA干渉

### 1. 研究開始当初の背景

コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどからなる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、細胞の分化・増殖調節にも関わる高分子体である。またマトリックスメタロプロテアーゼなどの分解酵素により産生亢進される ECM 分解断片群マトリクリプチンが様々な生理活性を持つことも明らかにされている。中でも XVIII 型コラーゲン分解産物エンドスタチンは強力な抗血管新生作用と抗腫瘍作用を示すため、抗関節炎薬・抗腫瘍薬としての応用が期待されている。また近年、様々な循環器疾患においてエンドスタチン発現レベルが増加することが報告されており、心疾患においてエンドスタチンが何らかの役割を果たしている可能性が十分に考えられる。そこでこれまでにエンドスタチンの心臓における生理的な作用についての検討を行ってきた。しかしこれらは正常の心臓組織及び構成細胞を用いた基礎的な検討であり、エンドスタチンの心疾患における病態生理的な役割について明らかにするには至っていない。病態心は正常の心臓とは多くの異なる性質を持つ細胞により構成されている。心線維芽細胞は心筋梗塞後の梗塞部で平滑筋の機能を併せ持つ筋線維芽細胞へと形質転換し、強力な ECM 産生能と収縮能により梗塞領域の治癒・瘢痕形成に関わる。一方、圧負荷誘発心肥大において心筋細胞は胎児型の遺伝子を再発現することが知られているが、その 1 つに心筋細胞の肥大化に関与する T 型カルシウムチャンネルがある。心疾患において発現が増加するエンドスタチンがこれら性質の変化した病態心由来の細胞に影響を及ぼす可能性は高いが、全く検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では心筋梗塞モデルラットの梗塞領域より単離した筋線維芽細胞 (遊走、増殖や ECM 産生)、圧負荷誘発心肥大モデルラットから単離した肥大心筋細胞 (イオンチャンネル活性) と摘出心筋組織標本 (収縮力及び心拍動の変化) を用い、それらに及ぼすエンドスタチンの影響について検討を行う。さらに心筋梗塞・圧負荷誘発心肥大モデル動物においてエンドスタチンの前駆体となる XVIII 型コラーゲン遺伝子を発現抑制した時の機能的・構造的変化について検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではリコンビナントマウスエンドスタチンを各処置に用いた。

(1) 雄性 Wistar ラットに気管内挿管を行いベンチレーターに接続し、イソフルラン麻酔下で人工換気した。その後左胸部を開胸し、左冠状動脈下行枝を結紮し、心筋梗塞モデル

を作成した。術後 14-19 日目にペントバルビタール麻酔下で心臓を摘出し、梗塞領域を無菌的に採取した。その梗塞領域を洗浄後、滅菌シャーレ上に静置し、10%牛胎児血清加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium 培地を加えて 10 日間培養した。その後シャーレ上に遊走、増殖した細胞を筋線維芽細胞とし、実験に供した。なお免疫蛍光染色法により、単離細胞を  $\alpha$ -smooth muscle actin 及び  $\alpha$ -vimentin 陽性の筋線維芽細胞であると同定した。各種阻害薬存在下もしくは非存在下でエンドスタチンを処置後、細胞増殖能を細胞カウント法および bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み法、細胞遊走能を Boyden chamber 法、そして各種タンパク質発現とリン酸化を Western blot 法を用いて検討した。

(2) 雄性 Wistar ラットにモノクロタリン 60 mg/kg を腹腔内投与し、モノクロタリン誘発肺高血圧モデルを作成した。また対照群には等容量の生理食塩水を投与した。モノクロタリン投与後 3 週間においてペントバルビタール麻酔下で心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置下でコラゲナーゼ処置を行った。その後右心室心筋細胞を単離し、ホールセルモードでパッチクランプ法を行い、カルシウム電流を測定した。保持電位を -90 mV とし、60 mV まで 15 段階の脱分極パルスを与えたときに得られた電流を全カルシウム電流 ( $I_{Ca}$ )、保持電位 -50 mV とし、60 mV まで 11 段階の脱分極パルスを与えたときに得られた電流を L 型カルシウムチャンネル電流 ( $I_{CaL}$ ) とし、両者の差分を T 型カルシウムチャンネル電流 ( $I_{CaT}$ ) とした。この測定方法を用い、細胞外液にエンドスタチンを還流したときの  $I_{CaT}$  の変化を検討した。また右心室組織における各種 T 型カルシウムチャンネル mRNA の発現はリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて検討した。

(3) 雄性 Wistar ラットにモノクロタリン 60 mg/kg を腹腔内投与し、モノクロタリン誘発肺高血圧モデルを作成した。また対照群には等容量の生理食塩水を投与した。モノクロタリン投与後 2 または 3 週間においてペントバルビタール麻酔下で右心房または右心室組織標本を摘出した。摘出した右心房標本と幅約 1.5 mm、長さ約 1 cm の短冊状に切った右心室標本を、栄養液を満たしたマグヌス管内に縦方向に懸吊した。その後トランスデューサー及び PowerLab システムを用い、右心房は心拍数を、右心室は電気刺激を与えながら収縮力を測定した。安定化後、右心房の心拍数や右心室の収縮力に及ぼすエンドスタチン単独処置の影響、そしてノルアドレナリンによる右心室の収縮反応に及ぼすエンドスタチンの影響について検討した。

(4) 雄性 Wistar ラットに気管内挿管を行いベンチレーターに接続し、イソフルラン麻酔

下で人工換気した。その後左胸部を開胸し、左冠状動脈下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。その後梗塞部位に in vivo トランスフェクション試薬と混和したエンドスタチン siRNA (前駆体である XVIII 型コラーゲンの siRNA) を注射し、遺伝子発現抑制を行った。対照群にはコントロール siRNA を注射した。術後 2 週間目にイソフルラン麻酔下で心エコー検査を行った後、ペントバルビタール麻酔下で心臓を摘出し、形態を観察した。

(5) 雄性 Wistar ラットにモノクロタリン 60 mg/kg を腹腔内投与し、モノクロタリン誘発肺高血圧モデルを作成した。また対照群には等容量の生理食塩水を投与した。モノクロタリン投与後 1 週間においてペントバルビタール麻酔下で in vivo トランスフェクション試薬と混和したエンドスタチン siRNA (前駆体である XVIII 型コラーゲンの siRNA) を右頸静脈より投与した。対照群にはコントロール siRNA を投与した。siRNA 投与後 1 週間目にイソフルラン麻酔下で心エコー検査を行った後に、ペントバルビタール麻酔下で右心室を摘出し、リアルタイム PCR 法と免疫組織化学染色によりエンドスタチン発現を確認し、ヘマトキシリン & エオシン染色により組織学的検査を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 心筋梗塞モデルラットの梗塞領域由来筋線維芽細胞の機能に及ぼすエンドスタチンの影響

エンドスタチン (100-3000 ng/ml, 24-48 時間処置) は筋線維芽細胞の増殖を亢進した。また、エンドスタチン (300-3000 ng/ml, 24 時間処置) は筋線維芽細胞の遊走も亢進した。一方、エンドスタチン (100-3000 ng/ml, 24-48 時間処置) は筋線維芽細胞の I 型コラーゲン分泌には影響を及ぼさなかった。エンドスタチンは Akt 及び extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を濃度依存的に亢進し、phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 阻害薬 wortmannin (100-1000 nM, 30 分前処置) 及び mitogen-activated protein kinase kinase/ERK 阻害薬 PD98059 (50  $\mu$ M, 30 分前処置) はエンドスタチン誘導性細胞増殖及び遊走を抑制した。以上の結果から、エンドスタチンは筋線維芽細胞の遊走と増殖を Akt 及び ERK 経路の活性化を介して促進することが明らかとなった。

(2) モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの肥大右心室筋細胞における T 型カルシウムチャネル活性に及ぼすエンドスタチンの影響

モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心室組織では対照群と比較し、T 型カルシウムチャネルサブタイプの  $Ca_v3.1$  および  $Ca_v3.2$  の mRNA 発現が亢進した。またモノ

クロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心室筋細胞において、顕著な  $I_{CaT}$  が観察され、エンドスタチン (300-1000 ng/ml, 5 分処置) はこれを濃度依存的に抑制した。以上の結果から、エンドスタチンはモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの肥大した右心室筋細胞における T 型カルシウムチャネル活性を抑制することが明らかになった。

(3) モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心房および右心室組織の機能に及ぼすエンドスタチン急性処置の影響

エンドスタチン (1-300 ng/ml) はモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心房組織の心拍数に影響を及ぼさなかった。また、右心室組織の収縮にも影響を及ぼさなかった。なお対照群にもエンドスタチンは影響を及ぼさなかった。さらにエンドスタチン (300 ng/ml, 30 分前処置) のノルアドレナリン (3 nM-10  $\mu$ M) による収縮に及ぼす影響についても検討したが、対照群、モノクロタリン投与群どちらの右心室組織においても影響を及ぼさなかった。以上の結果から、エンドスタチン急性処置はモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの肥大した心筋組織の拍動数や収縮力に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(4) 心筋梗塞モデルラットの梗塞領域におけるエンドスタチン遺伝子発現抑制の影響

心筋梗塞モデルラットの梗塞部位へのエンドスタチン siRNA 投与は、コントロール siRNA 投与群と比較し、左室収縮末期径が拡張し、拡張末期左室自由壁厚が減少し、左室内径短縮率が低下した。またエンドスタチン siRNA 投与群の左心室では、コントロール siRNA 投与群の左心室に比べて梗塞領域の菲薄化が観察された。以上の結果から、エンドスタチン siRNA 投与が心筋梗塞後の梗塞領域の菲薄化と心室内腔拡大を伴った心機能低下を引き起こすことが明らかとなった。

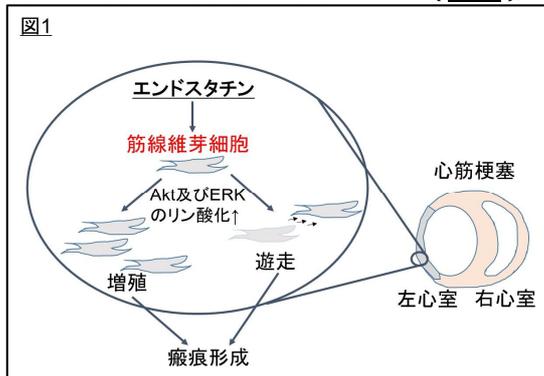
(5) モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットにおけるエンドスタチン遺伝子発現抑制の影響

モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットへのエンドスタチン siRNA 投与群では、生存率が低下した。また、エンドスタチン siRNA 投与は、モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットにおける右心室収縮機能の低下 (三尖弁輪収縮期移動距離の減少) をさらに悪化させた。モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心室組織において、エンドスタチンの蛋白発現 (免疫組織化学染色) と mRNA 発現 (リアルタイム PCR 法) は増加し、エンドスタチン siRNA はこれを抑制した。さらに組織学的検索において、モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットにおいて認められる心筋細胞の肥大に加えて、エンドスタチン siRNA 投与群では、心筋細胞の間隙が拡大す

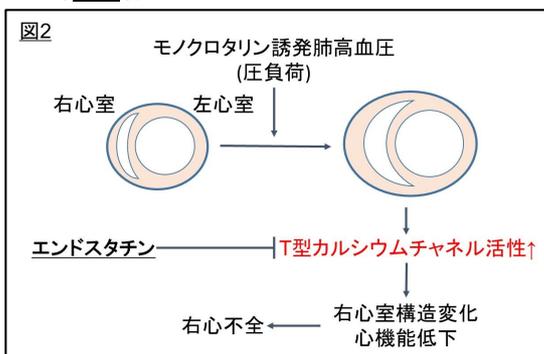
る像が認められた。以上の結果から、エンドスタチン siRNA 投与がモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットに対して右心室の構造変化を伴って右心機能を悪化し、さらに生存率を低下させることが明らかとなった。

(6)研究成果の総括及び今後の展望

本研究は、研究成果(1)においてエンドスタチンが心筋梗塞領域由来の筋線維芽細胞機能を亢進することを、研究成果(4)においてエンドスタチン siRNA 投与が心筋梗塞の梗塞領域の菲薄化を伴った機能不全を引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、エンドスタチンが心筋梗塞後の梗塞領域において Akt と ERK のリン酸化を介して筋線維芽細胞の増殖と遊走を亢進し、梗塞領域の治療、そして癒痕形成を促進することにより、予後を改善する可能性が示唆された(図1)。



一方、研究成果(2)では、モノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの右心室心筋細胞においてエンドスタチンがT型カルシウムチャネル活性を抑制することを明らかにした。また研究成果(3)においてモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの肥大した右心系心筋組織の機能にエンドスタチン急性処置は影響を及ぼさなかったが、研究成果(5)において、エンドスタチン siRNA 投与による慢性的なエンドスタチン発現抑制がモノクロタリン誘発右心肥大モデルラットの生存率を低下し、構造変化を伴って心機能不全を悪化することが明らかとなった。これらの結果から、モノクロタリン誘発肺高血圧に伴う圧負荷誘発右心肥大において増加したT型カルシウムチャネル活性をエンドスタチンが抑制することにより、右心室の構造変化や心機能不全に対し保護的に働く可能性が示唆された(図2)。



以上の研究成果より、エンドスタチンが心保護作用を持つ内因性生理活性物質であることが明らかになった。今後は本研究成果をもとに心保護作用が期待されるエンドスタチンを臨床応用する方法について検討することにより、新たな心不全治療法の確立に繋がることが期待される。

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 1 件)

Imoto K., Kumatani S., Okada M. and Yamawaki H. Endostatin is protective against monocrotaline-induced right heart disease through the inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Pflugers Arch.* 2016. 査読有、印刷中  
DOI: 10.1007/s00424-016-1810-0

〔学会発表〕(計 4 件)

井本 圭亮、熊谷 さやか、岡田 宗善、山脇 英之 Effects of endostatin on T-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and pathogenesis of monocrotaline-induced right heart disease. 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 日~3 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

岡田宗善、平野由佳、山脇英之 XVIII 型コラーゲン分解断片 endostatin は心筋梗塞領域の筋線維芽細胞機能を亢進する. 第 66 回日本薬理学会北部会 2015 年 9 月 18 日 富山国際会議場(富山県富山市)

井本 圭亮、熊谷 さやか、岡田 宗善、山脇 英之 モノクロタリン誘発肥大心の T 型カルシウムチャネル活性に及ぼす XVIII 型コラーゲン分解断片 endostatin の影響. 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7 日~9 月 9 日 北里大学獣医学部(青森県十和田市)

Okada M., Hirano Y. and Yamawaki H. Endostatin promotes proliferation and migration of rat myofibroblasts isolated from the infarcted area after myocardial infarction. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2015 2015 年 7 月 13 日~7 月 16 日 ニューオリンズ(アメリカ)

〔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 MUNEYOSHI )

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：30453509