

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860589

研究課題名(和文) 組織トロンビンに関する研究

研究課題名(英文) The Investigation of Tissue Thrombin

研究代表者

伊藤 敬一 (Ito, Keiichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70646843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症患者の血液では血液凝固カスケードの最終産物であるトロンビンが亢進している事が報告されている。そのため、拡張型心筋症ではこの組織トロンビンが亢進している可能性がある。そこで、我々は拡張型心筋症モデルマウス(8710;K210 knock-in mice (B6;129-Tnnt2 tm2Mmto)) (DCMマウス)を用いて組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与しているかどうかを検討した。DCMマウスに直接的トロンビン阻害薬であるダビガトランを投与すると心機能および生存率の改善が認められた。以上より組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Thrombin is a serine protease known to be the final product of the coagulation cascade. A state of coagulability is increased in patients with dilated cardiomyopathy (DCM). The purpose of this study is to investigate the role of thrombin in the pathogenesis of DCM. We investigated the involvement of thrombin in the development of DCM using knock-in mice with a deletion mutation of cardiac troponin T that causes human DCM (DCM mouse)(B6;129-Tnnt2 tm2Mmto) and assessed the effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran on DCM mice. Dabigatran administration significantly improved fractional shortening according to the echocardiographic examination and the survival outcomes. In addition, a strong thrombin expression was observed in the heart tissues on the Western blot analysis in the 8710;K210 knock-in mice. In conclusion, tissue thrombin is involved in the pathogenesis of DCM and thrombin inhibition can be beneficial for the treatment of DCM.

研究分野：循環器内科学

キーワード：拡張型心筋症 トロンビン

1. 研究開始当初の背景

血液凝固カスケードの最終産物であるトロンピンは protease activated receptor-1 を介して、胃の収縮、障害血管の修復、血小板凝集など様々な生理的作用を示すことが知られている。トロンピンは様々な組織に存在し内皮細胞や線維芽細胞でもその存在が確認されている。我々は心臓においても組織トロンピンが存在する事をヒトの剖検心を用いて免疫組織学的に証明した (Ito, K, PloS One, 2013)。一方、拡張型心筋症患者の血液では血液中のトロンピンが亢進している事が報告されている。心臓組織にもトロンピンは存在するため、拡張型心筋症ではこの組織トロンピンが亢進している可能性がある。

2. 研究の目的

我々は拡張型心筋症モデルマウス (Δ K210 knock-in mice (B6;129-*Tnt2*^{tr210})) を用いて組織トロンピンが拡張型心筋症の病態に関与しているかどうかを検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

拡張型心筋症モデルマウス (DCM 群) に対して、4 週目から 8 週目まで直接的トロンピン阻害薬であるダビガトランを 6g/日投与した群 (DCM+D 群) および wild type (Wild 群) の 3 郡を比較検討した。4 週および 8 週のマウスをイソフルランにより吸入麻酔し、心収縮能を測定した。また、8 週のマウスの心臓を凍結し、RNA を抽出し、BNP の mRNA の発現量を検討した。また、心臓に発現している種々の蛋白質量を検討するため、ウェスタンブロットを行い比較検討した。さらに、心臓組織の TUNEL 染色を行い各群でのアポトーシスを比較検討した。さらに、血液中のトロンピン活性を調べるため、Sensolyte Thrombin Activity Assay kit (72129) (Anaspec, Fremont, CA) を用いて検討した。また、実際にトロンピンが心臓組織に取り込まれている事を確認するため、10 単位のトロンピンを

HiLyte 647 にて蛍光標識し、トロンピンの動態を観察した (C57/BL6 Control 群: 1 匹 PBS 投与、Thrombin 群 2 匹: Thrombin 投与)。さらに、マイクロアレイにて Wild 群と比較して DCM 群で上昇し、DCM+D 群で減少する遺伝子を検索した。

4. 研究成果

DCM 群では Wild 群と比較して心重量の増加が認められたが、ダビガトラン投与により心重量の増加が抑制されていた (図 1)。

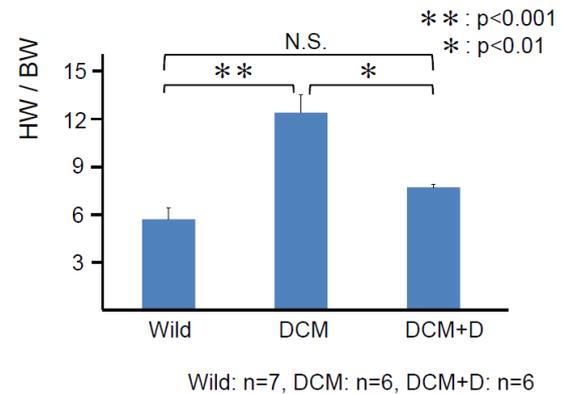


図 1. 各郡の心重量比

また、心臓超音波検査では DCM 群では左室収縮能の低下が認められたが、ダビガトラン投与により改善が認められた (図 2)。

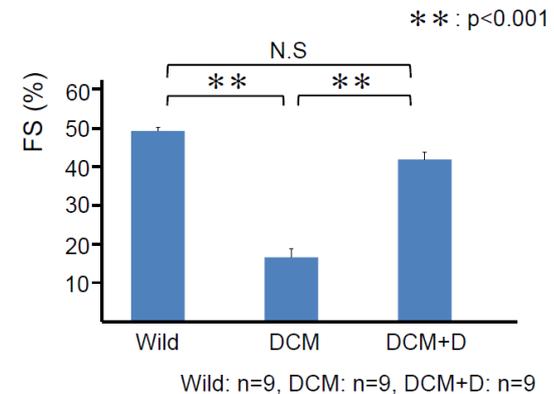


図 2. 各郡の心収縮能の比較

次に、ダビガトランを投与し、トロンピンを抑制する事で、拡張型心筋症病態において、生存率を改善する事ができるかどうかを検討した。DCM 群と DCM+D 群の生存率を比較すると、生存率も DCM+D 群の方が DCM 群と比

較して改善されていた (図3)。

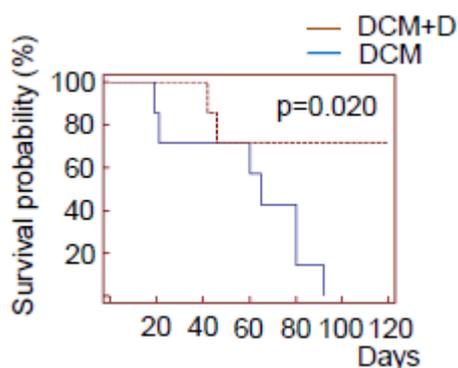


図3 . 生存曲線の比較 (各群 n=7)

心臓における蛋白質発現をウェスタンブロット法を用いて検討すると Wild 群と比較して DCM 群では有意にトロンビンの発現が増加していた。トロンピンを抑制する事により心機能および生存率の改善が見られた (図4)。

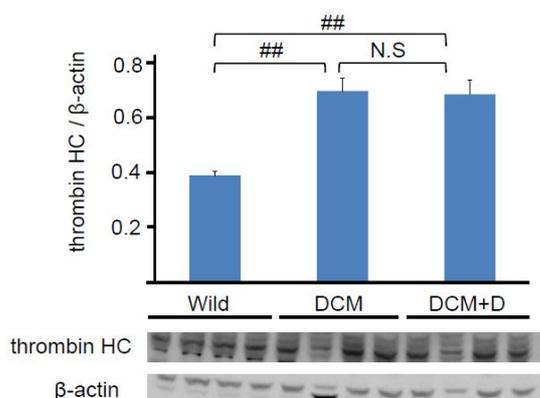


図4 . 心臓におけるトロンピン発現 (各群 n=7)

また、心臓組織中の BNP を PCR を用いて調べると、ダビガトラン投与により BNP は有意に減少していた (図5)。

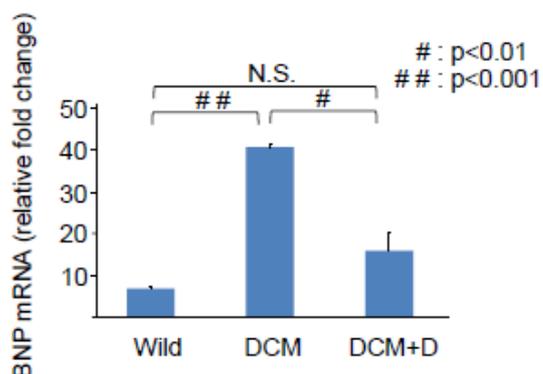


図5 . BNP mRNA の比較検討

このメカニズムを調べるためマイクロアレイを用いて原因遺伝子を検討した。その結果、Casq1・Postn・Myh7 の3つの遺伝子が候補に挙げたが (図6A) 蛋白質発現をウェスタンブロット法にて検討すると、いずれもダビガトランで有意に抑制されていなかった (図6B)。

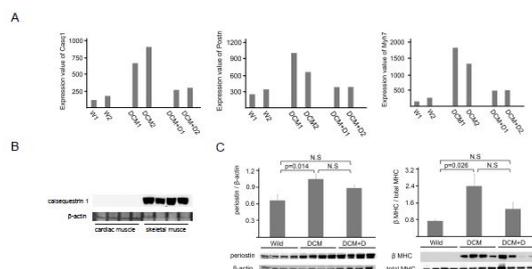


図6 . マイクロアレイ結果

TUNEL 染色を行った結果、DCM 群で見られた TUNEL 陽性細胞がダビガトラン投与により抑制されアポトーシスの関与が考えられた (Wild 群 : n=6, DCM 群 : n=7, DCM+D 群 : n=5) (図7)。

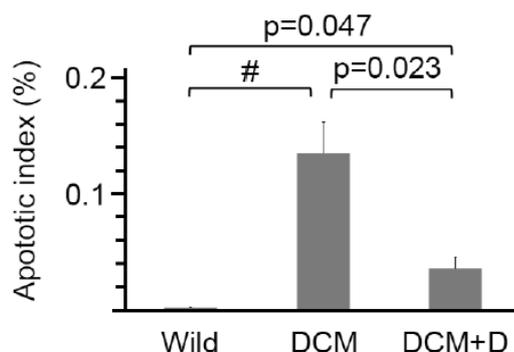


図7 . 心筋アポトーシスの比較検討

また血中のトロンピン活性は DCM 群で上昇し、ダビガトラン投与により抑制された (図8A) 。そして、HiLyte 647 にて蛍光標識したトロンピンを観察すると、心臓では2時間をピークに弱い取り込みが見られ (図8B) また、肝臓では2時間をピークに強い取り込みが観察された (図8C) 。図8D に2時間での実際のイメージングを示した。

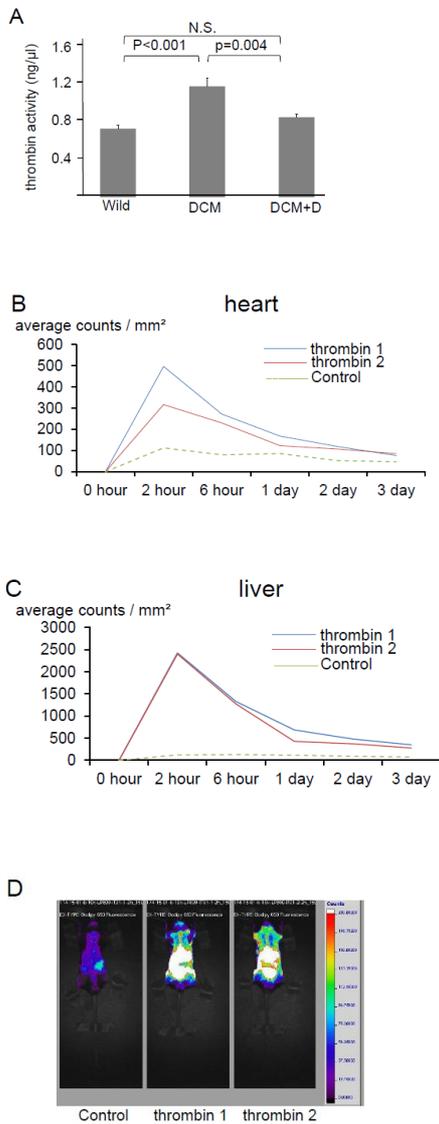


図8 . A 血中のトロンビン活性、B 心臓でのトロンビン経時的変化、C 肝臓でのトロンビンの経時的変化、D 2時間でのイメージング

以上の結果より組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与してい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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Keiichi Ito, Kenichi Hongo, Taro Date, Yusuke Kashiwagi, Takuya Yoshino, Tomohisa Nagoshi, Susumu Minamisawa, Michihiro Yoshimura. Thrombin is a Novel Target of the Treatment of Dilated

Cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2015 November 7-11, 2015 Orlando, Florida 32789, United States.

〔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 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 敬一 (Ito Keiichi)

東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科 助教

研究者番号：70646843

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：