

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19790527
 研究課題名（和文） CCN1 の心臓における機能解析と新しい心疾患治療の開発
 研究課題名（英文） Functional analysis of CCN1 in hearts and development of new therapy for heart disease
 研究代表者 吉田 善紀 (YOSHIDA YOSHINORI)
 京都大学 物質 細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 特定拠点助教
 研究者番号：20447965

研究成果の概要：

胎生期の心外膜細胞に発現する遺伝子をスクリーニングすることにより多数の遺伝子を同定し、その中の1つである細胞外マトリックスタンパク CCN1 に着目した。CCN1 は胎生期および心筋障害時に発現が上昇する。われわれは CCN1 が心筋細胞を酸化ストレスから保護することを明らかにした。心筋梗塞モデルラットにリコンビナント CCN1 タンパクを徐放投与したところ心機能の改善が認められた。また CCN1 は血管平滑筋細胞の増殖を促進し、ラットバルーン障害モデルにおいて新生内膜の肥厚に関与していると考えられ、CCN1 をノックダウンすることによりバルーン障害モデルラットにおいて新生内膜肥厚が抑制されることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

われわれは胎生期の心外膜組織に発現する遺伝子をスクリーニングし細胞外マトリックスタンパク Cyr61 を見出した。Cyr61 は血管新生作用を持つことは知られていたが、心臓におけるその役割は不明であった。われわれは心筋細胞に Cyr61 を遺伝子導入し発現させることによりあるいはリコンビナントタンパクを投与することにより Cyr61 が酸化ストレスに対して保護的に働き細胞死を抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

Cyr61 が in vitro で心筋細胞保護的に働くことが明らかになったが in vivo での作用を明らかにする。

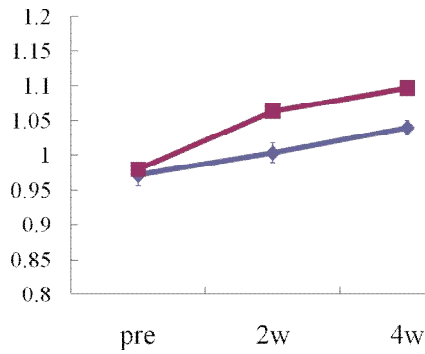
3. 研究の方法

Cyr61 の心臓での作用を vivo で解析するため心筋梗塞モデルラットに Cyr61 を投与することにより、心機能の改善の観察する。またそのメカニズムを解析する。

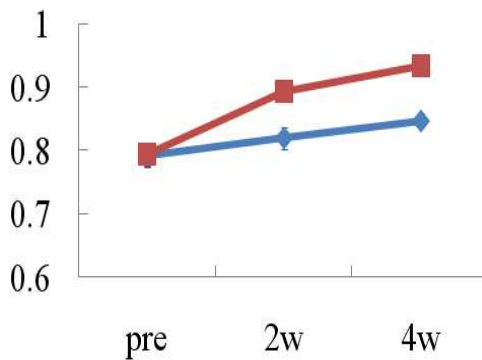
4. 研究成果

心筋梗塞モデルラットに精製した CCN1 タンパクを徐放投与し2および4週後に心機能を評価した。心エコー検査により CCN1 投与群において心拡大の抑制と左室短縮率の低下の抑制が認められた。またカテーテル検査による圧測定検査により dP/dt の改善と EDP の上昇の抑制が認められた。

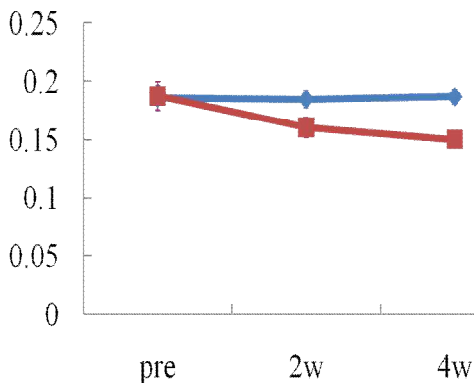
左室拡張末期径 赤 CCN1 群、青対照群



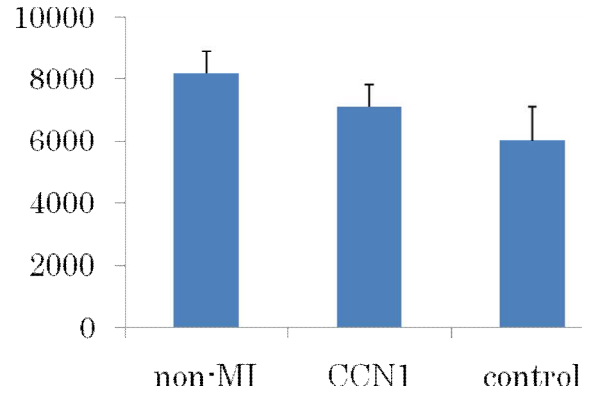
左室収縮末期径 赤 CCN1 群、青 対照群



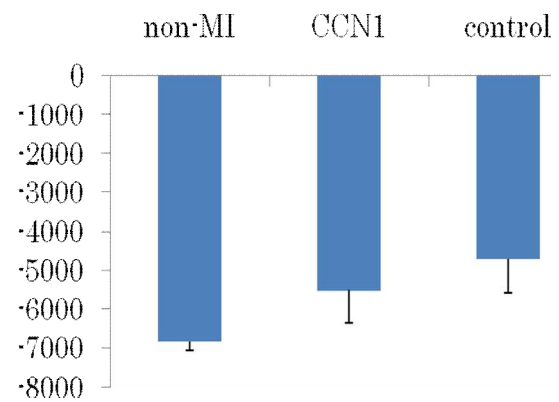
左室短縮率 赤 CCN1 群、青対照群



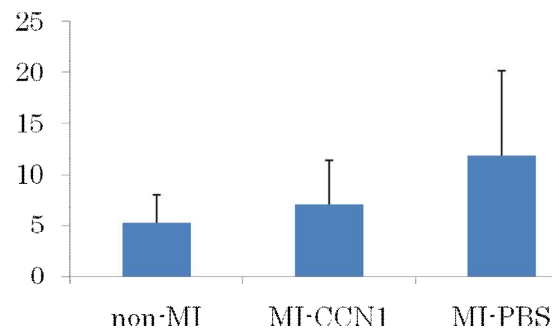
LV dP/dt max



LV -dP/dt min

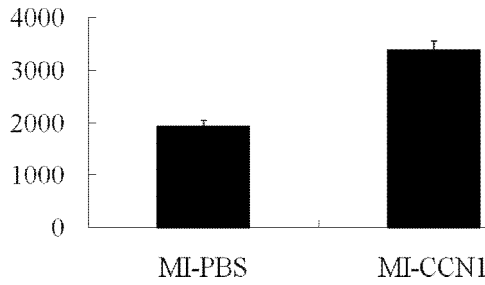


LV EDP (mmHg)

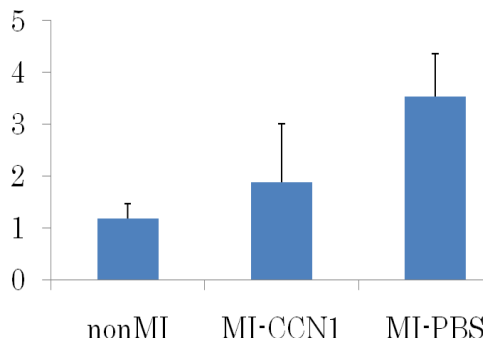


これらの心機能の改善のメカニズムをしらべるため心臓組織の解析を行い CCN1 投与群において線維化が抑制され毛細血管の密度が上昇していることが認められた。このため CCN1 は梗塞心において血管新生と線維化の抑制を通して心機能の改善に寄与することが示された。

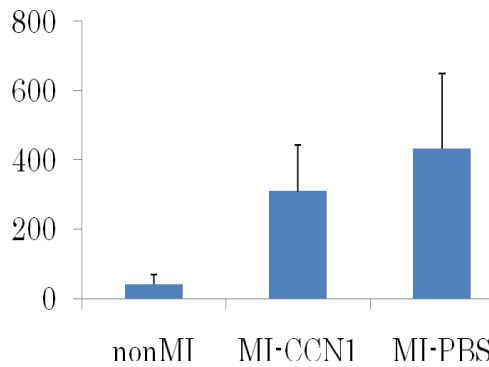
毛細血管密度 (/mm²)



線維化領域(%)

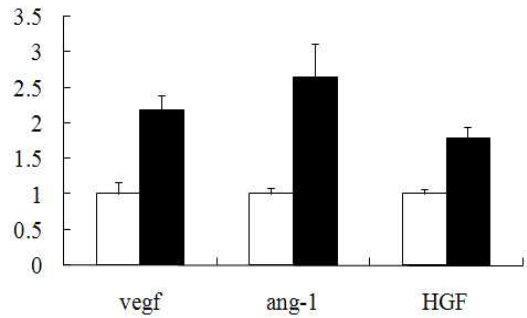


血漿 BNP 濃度 (pg/ml)



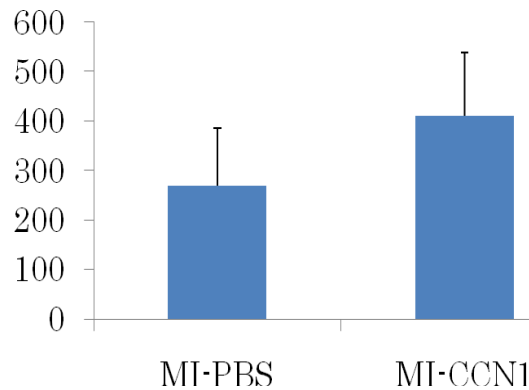
またこれらの心臓組織における遺伝子の発現を調べたところ VEGF,angiopoietin1,HGF などの分泌因子の発現が上昇していることが認められた。

梗塞近傍部での遺伝子発現(白: 対照群、黒: CCN1 群)

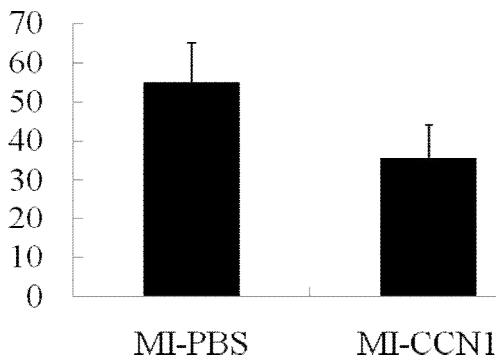


また組織の検索により心筋梗塞近傍部において CCN1 投与群において TUNEL 陽性細胞の減少と、Ki-67 陽性心筋細胞の増加が認められ、梗塞後の心筋組織の再生に関与している可能性が示唆された。CCN1 は CD34 陽性細胞の接着に関与しているとの報告もあり、心筋梗塞後に CCN1 が CD34 を介した血管新生や心筋の再生に関与している可能性が考えられ、現在これらのメカニズムについて探索を行っている。

K-67 陽性心筋細胞 (/10⁵ 細胞)



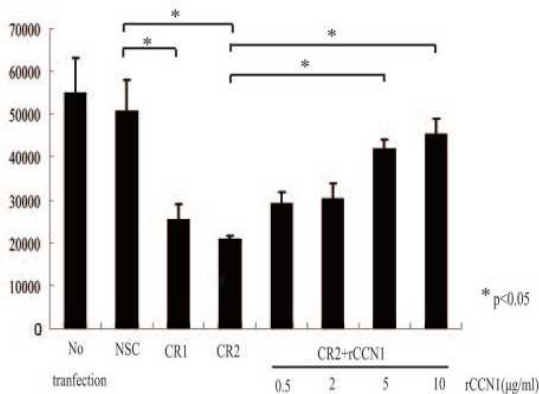
TUNEL 陽性細胞 (/10⁵ 細胞)



また CCN1 は血管平滑筋細胞の増殖を促進し、ラットバルーン障害モデルにおいて新生内膜の肥厚に関与していると考えられ、レンチウイルスにより CCN1 をノックダウンすることにより培養平滑筋細胞の増殖が抑制された。バルーン障害モデルラットにおいては CCN1 のノックダウンにより新生内膜肥厚が抑制されることを見出した。

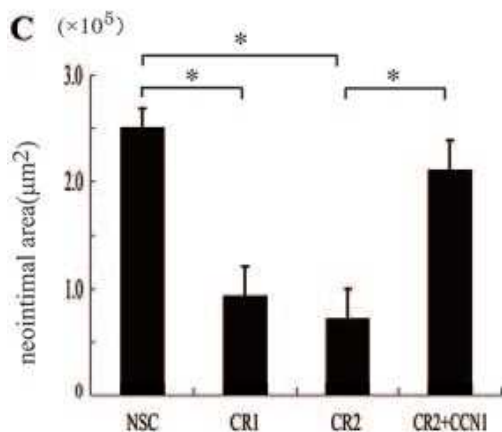
siRNA による CCN1 のノックダウンによる平滑筋細胞増殖の抑制

NSC:対照群 CR1, CR2: siRNA(CCN1)
CR2+CCN1: siRNA(CCN1)+CCN1 発現



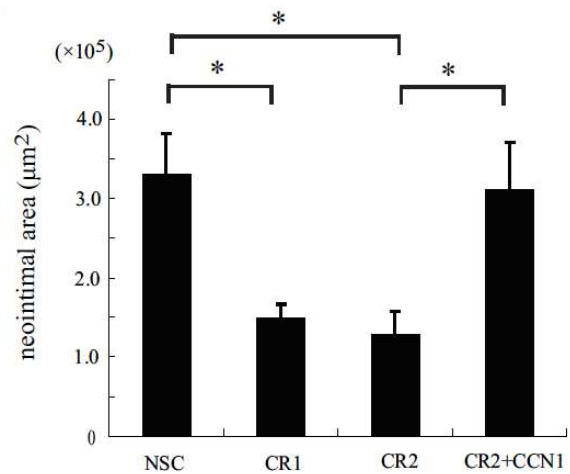
siRNA による CCN1 のノックダウンによる新生内膜形成の抑制 (14 日後)

NSC:対照群 CR1, CR2: siRNA(CCN1)
CR2+CCN1: siRNA(CCN1)+CCN1 発現



siRNA による CCN1 のノックダウンによる新生内膜形成の抑制 (28 日後)

NSC:対照群 CR1, CR2: siRNA(CCN1)
CR2+CCN1: siRNA(CCN1)+CCN1 発現



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kojima Y, Ono K, Inoue K, Takagi Y, Kikuta KI, Nishimura M, Yoshida Y, Nakashima Y, Matsumae H, Furukawa Y, Mikuni N, Nobuyoshi M, Kimura T, Kita T, Tanaka M., Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque, *Atherosclerosis*. 2009

Matsumae H, Yoshida Y, Ono K, Togi K, Inoue K, Furukawa Y, Nakashima Y, Kojima Y, Nobuyoshi M, Kita T, Tanaka M, CCN1 knockdown suppresses neointimal hyperplasia in a rat artery balloon injury model, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jun;28(6):1077-1083.

Yoshida Y, Togi K, Matsumae H, Nakashima Y, Kojima Y, Yamamoto H, Ono K, Nakamura T, Kita T, Tanaka M, CN1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin-Akt pathway, *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 13;355(3):611-618.

[学会発表](計 1件)

第71回日本循環器学会総会

CCN1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin Akt pathway.

[その他]

ホームページ等

http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/ym_hp2009/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 善紀 (YOSHIDA YOSHINORI)

京都大学 物質 - 細胞システム統合拠点

iPS細胞研究センター 特定拠点助教

研究者番号: 20447965