

令和元年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08028

研究課題名(和文)心疾患病態形成におけるIV型コラーゲン分解産物カンスタチンの役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of canstatin, a cleaved fragment of type IV collagen, in the development of cardiac disease

研究代表者

岡田 宗善 (Okada, Muneyoshi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30453509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カンスタチンは心筋細胞周囲の基底膜を構成するIV型コラーゲン 2鎖の分解産物である。本研究は心臓におけるカンスタチンの病態生理学的役割と発現調節機構を解明することを目的とし、検討を行った。その結果、カンスタチンが心筋芽細胞の低酸素誘導性アポトーシスを抑制し、筋線維芽細胞の機能や心室筋細胞のイオンチャネル活性を制御することを明らかにした。さらに心疾患モデルにおいてカンスタチンが心保護的に働くことや、心筋梗塞におけるカンスタチン発現減少機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からカンスタチンが心保護的に働く内因性生理活性物質であることが示唆された。本研究成果を基盤として、カンスタチンを標的とした新たな心疾患治療戦略の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Canstatin is a cleaved fragment of type IV collagen 2 chain, which is a component of basement membrane surrounding cardiomyocytes. This project aimed to clarify the pathophysiological role and regulatory mechanism of canstatin in heart. It has been demonstrated that canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis in cardiomyoblasts and regulates cellular functions of myofibroblasts and ion channel activity of ventricular myocytes. It has been also revealed that canstatin exerts cardioprotective effects on experimental models of cardiac disease. Further, mechanism of decrease in canstatin expression in myocardial infarction was clarified. This study suggested that canstatin is an endogenous bioactive molecule working cardioprotectively. Based on the results of this study, it is expected that development of novel strategies for cardiac disease treatment targeting canstatin will progress.

研究分野：循環薬理学

キーワード：薬理学 心疾患 カンスタチン 心筋梗塞 細胞死 心肥大 筋線維芽細胞 カルシウムチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM) は組織の構造支持と恒常性維持に重要な役割を担う分子群である。近年これら ECM の分解産物群であるマトリクリプチンが血管新生阻害作用をはじめとした様々な生理活性を持つことが明らかとなり、内因性抗腫瘍因子として臨床応用が期待されている。申請者はこれまで、マトリクリプチンのひとつ XVIII 型コラーゲン分解産物エンドスタチンが心臓において様々な生理活性を持つことを明らかにした。このような研究背景から、マトリクリプチンが血管新生阻害作用以外の多面的な作用を介して心臓リモデリングの進展に関与する可能性があると考えた。IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖分解産物のカンスタチンは、抗血管新生作用や抗腫瘍作用を示すことが知られている。申請者はこれまで、カンスタチンが心線維芽細胞の遊走促進作用を示すことやイソプロテレノール誘発心筋芽細胞死を抑制することなど、カンスタチンが心臓において抗血管新生以外の生理活性を持つことを明らかにしてきた。しかしながら心疾患発症におけるカンスタチンの病態生理学的役割には不明な点が多く残されていた。またカンスタチンの産生源となる IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖は心筋細胞周囲基底膜の主要な構成成分であるが、心臓組織におけるカンスタチン発現調節機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は各種心臓構成細胞(in vitro)と心疾患モデル(ex vivo, in vivo)を用い、心疾患におけるカンスタチンの病態生理学的役割ならびに発現調節機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) H9c2 心筋芽細胞における低酸素誘導性アポトーシス、(2)ラット心筋梗塞モデルの梗塞領域由来筋線維芽細胞の機能、そして(3)ラット心室筋細胞の L 型カルシウムチャネル活性に及ぼすカンスタチンの影響を検討した。さらに(4)ラット心筋梗塞モデルの梗塞領域におけるカンスタチン発現調節機構、(5) ex vivo 心筋梗塞モデル灌流心におけるカンスタチン発現抑制の効果、そして(6)モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットへのカンスタチン慢性投与の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) H9c2 心筋芽細胞において低酸素刺激により誘導したアポトーシスに及ぼすカンスタチンの影響を検討した。細胞カウント法により細胞生存率を、Western blotting によりタンパク質発現とリン酸化を検出した。さらに免疫蛍光染色により α_v インテグリンの局在を検討した。
(2) Wistar ラットの左冠動脈前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。術後 2 週間の梗塞領域から explant 法により筋線維芽細胞を単離培養した。筋線維芽細胞にカンスタチンを処置し、細胞カウント法により細胞増殖能、Boyden chamber assay により細胞遊走能を測定した。また Western blotting によりタンパク質発現とリン酸化を、コラーゲンゲル収縮法により細胞収縮能を検討した。
(3) Wistar ラットに IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の small interfering (si)RNA を頸静脈内投与し、カンスタチン発現抑制を行った。siRNA 投与 2 日後に心電図検査を行い、心臓摘出後ランゲンドルフ灌流装置を用いて心室筋細胞を単離した。Western blotting によりカンスタチン発現を検討した。免疫蛍光染色により心室筋細胞におけるカンスタチンの局在を検討した。ホールセルパッチクランプ法により L 型カルシウムチャネル電流(I_{CaL})を測定した。
(4) Wistar ラットの左冠動脈前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。術後 1 日及び 3 日目に心臓を摘出し、Western blotting と免疫組織化学染色を用いてタンパク質の発現と局在を検討した。またカテプシン S siRNA 投与によりカテプシン S 発現抑制したラットにおいて冠動脈結紮術を行い、心臓組織におけるカンスタチン発現を検討した。
(5) Wistar ラットに IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の siRNA を頸静脈内投与し、カンスタチン発現抑制を行った。siRNA 投与 2 日後に心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流装置に設置後、左冠動脈前下行枝を結紮し ex vivo 心筋梗塞モデルを作製した。Triphenyl tetrazolium chloride 染色により梗塞領域を評価し、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)染色により心臓組織におけるアポトーシスを検出した。
(6) Wistar ラットにモノクロタリン(MCT)を単回腹腔内投与し、肺高血圧症モデルを作製した。カンスタチンまたは溶媒は連日腹腔内投与した。MCT 投与 3 週間後、カテーテル法により肺動脈圧測定を行った。その後心臓を摘出し重量を測定した。右心室組織切片をヘマトキシリンエオシン染色とピクロシリウスレッド染色し、心筋細胞の大きさと線維化を評価した。

4. 研究成果

(1) カンスタチンは低酸素誘導性細胞生存性の低下及び cleaved caspase-3 発現増加を抑制した。 $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬の cilengitide は低酸素誘導性障害に対するカンスタチンの細胞保護作用を解除した。カンスタチンは低酸素条件下で focal adhesion kinase (FAK)と Akt のリン酸化を亢進し、それらは cilengitide により抑制された。Akt 経路阻害薬の LY294002 はカンスタチン誘導性 Akt リン酸化を抑制し、カンスタチンの細胞保護作用を解除した。低酸素条件下では、 α_v インテグリンは接着斑に局在した。以上の結果から、カンスタチンは H9c2 心筋芽細胞において α_v インテグリンを介して FAK/Akt 経路を活性化し、低酸素誘導性アポトーシスを抑制することが明らかになった(PLoS One 2017)。

(2) カンスタチンは梗塞領域由来筋線維芽細胞の遊走能には影響を及ぼさなかったが、増殖能、matrix metalloproteinases 分泌および cyclooxygenase (COX)-2 発現を増加し、コラーゲンゲル収縮を抑制した。カンスタチンは Akt リン酸化を亢進し、LY294002 はカンスタチン誘導性増殖を抑制した。COX-2 阻害薬の NS-398 はカンスタチンによるコラーゲンゲル収縮抑制を解除した。心筋梗塞 2 週間後の梗塞領域におけるカンスタチン発現は、非梗塞領域と比べて減少した。以上の結果から、カンスタチンは筋線維芽細胞機能を調節するが、梗塞領域において発現が減少することが明らかになった(Eur. J. Pharmacol. 2017)。

(3) カンスタチンは心室筋細胞の α_v インテグリンに局在した。ラットへの IV 型コラーゲン α_2 鎖 siRNA 投与は心室におけるカンスタチン発現を抑制した。カンスタチン発現抑制した心室筋細胞の I_{CaL} は control siRNA 投与群と比べて増加しており、カンスタチン処置はこれを抑制した。IV 型コラーゲン α_2 鎖 siRNA 投与ラットでは QT 間隔の短縮傾向と T 波の増高が認められた。以上の結果から、カンスタチンは心室筋細胞の L 型カルシウムチャネル活性の調節を介して心機能の安定化に寄与する可能性が示唆された(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018)。

(4) 全身臓器におけるカンスタチン発現を検討したところ、カンスタチンは心臓に特に多く発現していた。冠動脈結紮術後 1 日及び 3 日目の梗塞領域におけるカンスタチン発現は非梗塞領域と比べて低下した。またカンスタチン分解酵素として知られるカテプシン S 発現が梗塞領域において増加した。siRNA 投与によりカテプシン S 発現を抑制したラット心臓では、梗塞領域におけるカンスタチン発現減少が解除された。以上の結果から、心筋梗塞後の梗塞領域において増加したカテプシン S によりカンスタチンは速やかに分解され、発現が減少することが明らかになった(J. Vet. Med. Sci. 2019)。

(5) IV 型コラーゲン α_2 鎖 siRNA 投与によるカンスタチン発現抑制により ex vivo 心筋梗塞モデルの梗塞領域が拡大し、TUNEL 染色陽性細胞、すなわちアポトーシス細胞の数が増加した。以上の結果から、正常心臓組織に発現するカンスタチンは心筋梗塞における虚血ストレスに対し保護的に働く可能性が示唆された(第 31 回北里大学バイオサイエンスフォーラム, 2018 年)。

(6) カンスタチン慢性投与は MCT 誘発肺高血圧症モデルラットにおける肺動脈圧の亢進には影響を及ぼさなかった。一方、カンスタチン慢性投与は MCT による右心室重量/左心室重量比の増加、右心室組織における心筋細胞肥大化や線維化を抑制した。以上の結果から、カンスタチン慢性投与は肺高血圧症による圧負荷誘発右心肥大及び線維化を抑制することが明らかになった(未発表データ)。

本研究成果の一部を総説論文としてまとめ、公表した(Biol. Pharm. Bull. 2017; 日本薬理学雑誌 2018; J. Pharmacol. Sci. 2019)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Sugiyama A., Mitsui A., **Okada M.**, Yamawaki H. Cathepsin S degrades arresten and canstatin in infarcted area after myocardial infarction in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有. 2019. 81: 522-531. DOI: 10.1292/jvms.18-0674
2. **Okada M.**, Yamawaki H. A current perspective of canstatin, a fragment of type IV collagen alpha 2 chain. (review) *J. Pharmacol. Sci.* 査読有. 2019. 139: 59-64. DOI: 10.1016/j.jphs.2018.12.001
3. Imoto K., Hirakawa M., **Okada M.**, Yamawaki H. Canstatin modulates L-type calcium channel activity in rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有. 2018. 499: 954-959. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.026
4. **岡田 宗善**, 山脇 英之. 新たな心不全治療標的分子としての基底膜由来 matricryptins の可能性. (総説) *日本薬理学雑誌*. 査読有. 2018. 151: 106-110. DOI: 10.1254/fpj.151.106
5. **Okada M.**, Imoto K., Sugiyama A., Yasuda J., Yamawaki H. New insights into the role of basement membrane-derived matricryptins in the heart. (review) *Biol. Pharm. Bull.* 査読有. 2017. 40: 2050-2060. DOI: 10.1248/bpb.b17-00308
6. Sugiyama A., **Okada M.**, Yamawaki H. Pathophysiological roles of canstatin on myofibroblasts after myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 査読有. 2017. 807: 32-43. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.04.027
7. Kanazawa H., Imoto K., **Okada M.**, Yamawaki H. Canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis through activation of integrin/focal adhesion kinase/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyoblasts. *PLoS One*. 査読有. 2017. 12: e0173051. DOI: 10.1371/journal.pone.0173051

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 伊藤 瑠美、杉山 彰、岡田 宗善、山脇 英之. RNA 干渉法による canstatin 発現抑制が ex vivo ラット灌流心における冠動脈結紮による梗塞形成に及ぼす影響. 第 31 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2018 年
2. Imoto K., Hirakawa M., Okada M., Yamawaki H. Effects of canstatin on L-type Ca^{2+} channel activity in rat ventricular cardiomyocytes. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto). (国際学会) 2018 年
3. Sugiyama A., Mitsui A., Okada M., Yamawaki H. Regulatory mechanisms for expression of matricryptins after myocardial infarction in rats. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto). (国際学会) 2018 年
4. Okada M. Elucidation of the role of canstatin, a proteolytic fragment of extracellular matrix, in cardiac diseases. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto). (国際学会) 2018 年
5. 平川 真樹、岡田 宗善、山脇 英之. ラット心室筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネル活性制御における canstatin の役割. 第 30 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2017 年
6. 杉山 彰、伊藤 瑠美、岡田 宗善、山脇 英之. ラット心筋梗塞後の病変形成における IV 型コラーゲン分解産物 canstatin の役割解明. 第 30 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2017 年
7. 三井 彩加、岡田 宗善、山脇 英之. ラット心筋梗塞モデルにおける matricryptins の発現動態とその調節機構について. 第 30 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2017 年
8. 杉山 彰、岡田 宗善、山脇 英之. Canstatin regulates function of myofibroblasts after myocardial infarction. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017 年
9. 岡田 宗善、金澤 礼樹、山脇 英之. Molecular mechanisms underlying the canstatin-mediated inhibition of hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017 年
10. 杉山 彰、岡田 宗善、山脇 英之. ラット心筋梗塞モデル由来筋線維芽細胞機能に及ぼす canstatin の影響. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年
11. 金澤 礼樹、岡田 宗善、山脇 英之. Canstatin は低酸素誘導性 H9c2 細胞死を抑制する. 第 159 回日本獣医学会学術集会. 2016 年

〔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：
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：
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)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。