

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09271

研究課題名(和文) 心筋梗塞後リモデリングにおける血管周囲性線維化の分子機序の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of myocardial fibrosis in ventricular remodeling after myocardial infarction

研究代表者

新谷 香(石田香)(Shintani-Ishida, Kaori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50345047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後の組織線維化を特徴とする心室リモデリングの機序を解明するため、タンパク質分解酵素であるカルパインと線維化誘導因子であるtransforming growth factor(TGF)-1の関係についてラット心筋梗塞モデルを用いて検討した。カルパインは心筋梗塞後早期に心臓血管の平滑筋で活性化しており、TGF-1の発現を誘導していた。カルパインはTGF-1の発現を抑制するmiRNA-133aの量を低下させた。以上の結果から、カルパインがmiRNAを調節してTGF-1を介した組織線維化を誘導するという新しい役割を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は罹患率が高く、突然死を引き起こすこともある。心不全は心筋梗塞後に発症することが多く、その機序を明らかにすることは治療や予防に重要である。本研究では心筋梗塞後に活性化するタンパク質分解酵素カルパインが心筋梗塞後の心不全発症にどのように関与しているかを動物モデルを用いて検討した。その結果、カルパインはタンパク質の発現量を制御するmiRNAの量を調節し、TGF-1という心筋線維化を引き起こす因子を増加させるという、これまで知られていなかった新しい役割を見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the mechanism of myocardial fibrosis, which is a critical feature of ventricular remodeling after myocardial infarction. We investigated whether a proteinase calpain is involved in transforming growth factor (TGF)-1-mediated myocardial fibrosis in a rat myocardial infarction model. Calpain was activated on coronary artery smooth muscle immediately after ischemia-reperfusion and induced TGF-1 expression. Calpain decreased the level of miRNA-133a, which suppresses TGF-1 expression. These results suggested a new role of calpain as a modulator of miRNA expression in TGF-1-mediated myocardial fibrosis.

研究分野：法医学

キーワード：心不全 心筋梗塞 カルパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全は罹患率が高い疾患の一つで、突然死を引き起こすこともある。心不全の原因は様々あるが、多くは心筋梗塞後の代償機転である心室リモデリングが破綻した結果である。予後不良な心室リモデリングは間質と血管周囲の線維化が特徴である。心不全を予防するためには、心筋梗塞から心室リモデリングに至る過程の早期の病態を理解するのが重要である。

心筋梗塞後の心室リモデリングには、線維化誘導因子であるアンジオテンシン II (AngII) やトランスフォーミング増殖因子 TGF- β 1 が深く関わっていることが知られている。カルシウム依存性タンパク質分解酵素であるカルパインは、心筋梗塞後に活性化し、心筋細胞内の細胞骨格タンパク質を分解することで、心筋梗塞を引き起こすことが知られている。しかし、心筋梗塞後の組織線維化とカルパイン活性化の関係は明らかでない。

2. 研究の目的

最近、肺高血圧症などで見られる肺血管の平滑筋細胞増殖において、カルパインが TGF- β を限定分解し、活性化することで Smad2/3 を介した組織線維化を誘導するという報告があった。一方、我々はラットを用いて急性心筋梗塞モデルを作製し、活性化したカルパインの局在を検討したところ、心臓血管の平滑筋でカルパイン-1 が活性化していることを見出した。そこで、本研究では AngII-TGF- β 1 経路を介した組織線維化とカルパインの関係を明らかにし、心筋梗塞後の心室リモデリングの早期病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット心筋梗塞モデルの作製

8 週齢の SD ラットを深麻酔下で開胸し、シルク糸を用いて左冠状動脈を結紮した。結紮後 30 分で再灌流し、5 分後に心臓を摘出した。カルパイン阻害剤 MDL28170 は 10% polyethylene glycol 400 (PEG) を含む PBS に溶解し、結紮 15 分後から 15 分間かけて、頸静脈から 15 mg/kg 投与した。ロサルタンは、結紮 10 分前から 40 分間かけて、頸静脈から 2 mg/kg 投与した。本実験計画は京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得ている。

(2) カルパインの活性化と局在

活性化したカルパイン-1 のみを認識する特異抗体 (抗 post-calpain-1 抗体) あるいは不活性化カルパインのみを認識する特異抗体 (抗 pre-calpain-1 抗体) を用いて、摘出した心臓切片の免疫組織化学染色でカルパインの局在を、心臓組織ライセートのウェスタンブロットティングでカルパイン量を分析した。

(3) TGF- β の定量

タンパク質の発現量はウェスタンブロットティング法、mRNA の発現量はリアルタイム RT-PCR 法で定量した。

(4) miRNA の定量

TaqManTM MicroRNA Assay (アッセイ ID: 002246、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて、リアルタイム RT-PCR 法で定量した。

(5) マイクロアレイによる miRNA の網羅的解析

Affymetrix GeneChipTM miRNA 4.0 Array を用いて、虚血再灌流 5 分後に採取した心臓の虚血領域と非虚血領域、MDL28170 を投与して虚血再灌流を行ったラットの虚血領域、以上の 3 群間で発現量に差異のある miRNA を探索した。

4. 研究成果

(1) カルパインの活性化

ラット左冠状動脈結紮による心筋梗塞モデルにおいて、虚血 30 分再灌流後 5 分に採取した心臓を虚血領域と非虚血領域に分け、カルパイン特異抗体を用いたウェスタンブロットティング法で μ -カルパインと m-カルパインの活性化を評価したところ、 μ -カルパインのみが虚血領域で活性化していた (図 1)。活性化したカルパインの局在を抗 post- μ -カルパイン抗体を用いて組織免疫化学染色を行うと、心臓血管の平滑筋が陽性となった (図 2)。この μ -カルパインの活性化は AngII 受容体 1 型 (AT1) 選択的拮抗薬であるロサルタン投与で抑制された。

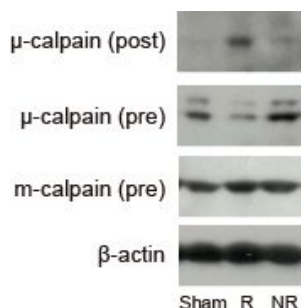


図 1 虚血再灌流 5 分後に採取した虚血領域 (R) と非虚血領域 (NR) のウェスタンブロット

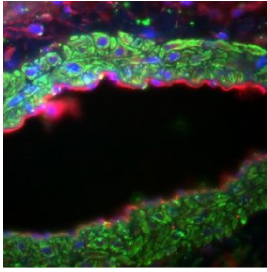


図2 心臓血管の免疫組織化学染色

緑：抗 post- μ -カルパイン抗体、赤：抗 CD31 抗体、青：DAPI

(2) TGF- β 1 の誘導

TGF- β 1 の発現をウェスタンブロッティング法で確認したところ、LAP(latency associated protein) が結合した不活性な latent TGF- β 1 の発現量が増加していた。カルパインは latent TGF- β 1 を限定分解し、TGF- β 1 を活性化するという報告があるが、限定分解された TGF- β 1 (mature dimer TGF- β 1) のバンドは認めなかった(図3)。カルパイン阻害剤 MDL28170 を投与したラットでは、虚血再灌流後の latent TGF- β 1 発現誘導が抑制された(図3)。一方、TGF- β 1 の mRNA 量は虚血再灌流 5 分後の時点では、虚血領域と非虚血領域で増加傾向であったが、統計的有意差は認めなかった(図4)。

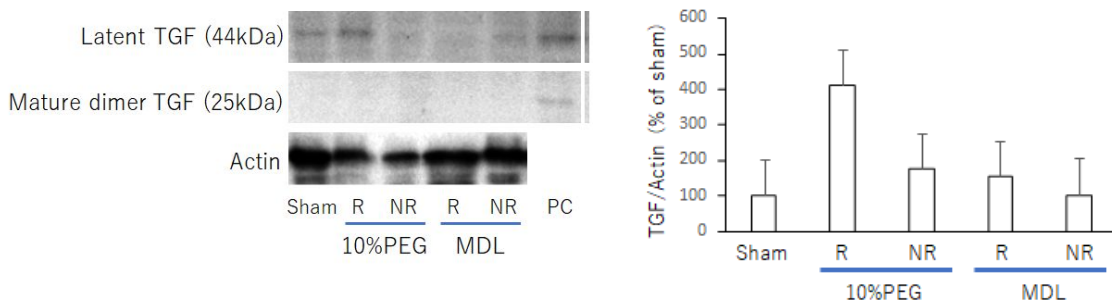


図3 虚血再灌流 5 分後に採取した虚血領域(R)非虚血領域(NR)の latent TGF- β 1 量、mature dimer TGF- β 1 量とカルパイン阻害剤の影響

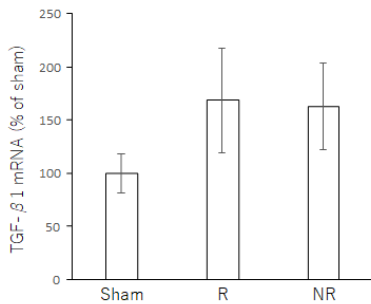


図4 虚血再灌流 5 分後に採取した虚血領域(R)非虚血領域(NR)の TGF- β 1 mRNA 量

(3) miRNA の関与

虚血再灌流後の latent TGF- β 1 タンパク質量の増加は転写レベルでの誘導とは考え難いことから、転写後の翻訳調節に関わる microRNA(miRNA)に着目した。miRNA-133a は心筋や骨格筋の分化を調節し、反応性心肥大の過程で miRNA-133a 量が低下する、心筋線維化に対して保護的に働く、TGF- β 1 の発現を抑制するなどの報告がある。そこで、miRNA-133a が虚血再灌流後の latent TGF- β 1 タンパク質の誘導に関与していると考え、miRNA-133a を定量した。その結果、miRNA-133a 量は虚血再灌流 5 分後に低下し、これをカルパイン阻害剤が抑制することを見出した(図5)。

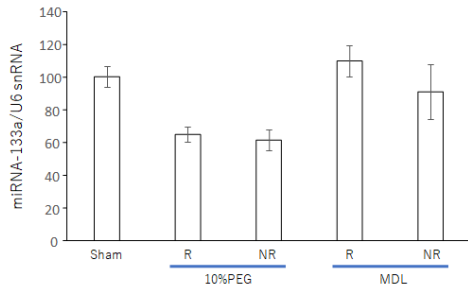


図5 虚血再灌流5分後に採取した虚血領域(R)非虚血領域(NR)のmiRNA133a量とカルパイン阻害剤の影響

カルパインがmiRNAの発現量を調節していることが示唆されたので、他に関与しているmiRNAがないかマイクロアレイ法を用いて網羅的に検索した(図6)。虚血領域群、非虚血領域群、MDL28170投与ラットの虚血領域群の3群で比較したところ、虚血領域群でのみ発現差があったmiRNAとしてmiR-127-3p、miR-193a-3p、miR-328a-3p、miR-540、miR-6239、miR-7674、miR-331-3p、miR-3102-3p、miR-532-3p、miR-744-5pなどが見出された。

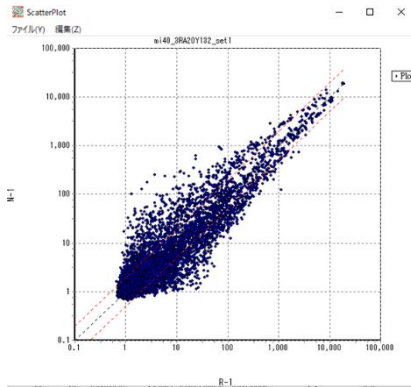


図6 虚血再灌流5分後に採取した虚血領域(R-1)と非虚血領域(N-1)のスクアッタープロット

(4) まとめ

本研究により、ラット左冠状動脈結紮による心筋梗塞モデルにおいて、虚血再灌流後5分というごく早期にカルパインが心臓血管の平滑筋で活性化し、線維化に関するTGF- β 1のlatent型の発現を誘導していた。Latent TGF- β 1の発現誘導にはmiRNA-133aが関与している可能性が示唆された。カルパインによるmiRNA-133a量の低下のメカニズムと組織線維化への関与について今後検討する必要がある。また、マイクロアレイによる網羅的解析によって、miRNA-133a以外にもカルパインが発現量を変化させる可能性のあるmiRNAが見出されたことから、カルパインの新しい役割として検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tojo Misa, Shintani-Ishida Kaori, Tsuboi Hajime, Nakamura Mami, Idota Nozomi, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Postmortem plasma pentraxin 3 is a useful marker of fatal acute coronary syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-44472-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Idota Nozomi, Nakamura Mami, Tsuboi Hajime, Ichioka Hiroaki, Shintani-Ishida Kaori, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Autoerotic asphyxia using a plastic bag loosely covering the head over a gas mask	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 69～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Mami, Idota Nozomi, Shintani-Ishida Kaori, Hitosugi Masahito, Ikegaya Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Simple, Frequent Indicator for Personal Identification? Postmortem and Antemortem Abdominal Computed Tomography Findings of a Charred Body	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Forensic Medicine and Pathology	6. 最初と最後の頁 56～59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1097/PAF.0000000000000522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shintani-Ishida K, Yoshida K
2. 発表標題 Ischemia-reperfusion induces calpain-1 activation in smooth muscle cells of coronary arteries via angiotensin II/TGF- 1
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学法医学教室ホームページ
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/hoi/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----