

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790508
 研究課題名（和文）細胞外マトリックスタンパクとインテグリンの病態における意義の検討

研究課題名（英文）Role of the interaction of extracellular matrix with integrin in the cardiovascular disease

研究代表者

松井 裕（MATSUI YUTAKA）

北海道大学遺伝子病制御研究所・マトリックスメディスン研究部門・特任准教授

研究者番号：30431381

研究成果の概要：

動脈硬化症、心筋梗塞など難治性心血管疾患において、オステオポンチンをはじめとする細胞外マトリックスタンパクとその受容体であるインテグリンが果たす役割を、中和抗体や遺伝子改変マウスを用いて検討し、最終的には疾患の新たな治療法開発につなげることを目標とし、研究をすすめている。現在、様々な疾患モデルを作成し、中和抗体や遺伝子改変マウスを用いて、その治療効果を確認中である。以上の研究を通じて、個々の分子の役割のみならず、分子間相互作用や相乗効果、ひいては組織再構築の分子機構の全容に近づきたいと考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス（ECM）は、当初細胞間に沈着した構成物としか考えられていなかったが、近年、ECM とインテグリン受容体を介した細胞との相互作用が、細胞の接着、増殖、運動などの調節に深く関与していることが明らかとなってきている。ECM のうち、特にオステオポンチン（OPN）、テネシン（TN）、トロンボスポンジン（TSP）などを含む matricellular protein と呼ばれる一群は、発生、創傷治癒、組織再構築過程をダイナミックに調節していることが明らかになっている。しかし、それらの病態における個々の

役割の相違、相互作用や、調節に関する詳細なメカニズムは不明である。

従来より、我々及び当研究室（北海道大学遺伝子病制御研究所マトリックスメディスン研究部門及び同分子免疫分野）では、matricellular protein であるオステオポンチン（OPN）に着目し、その様々な病態（薬剤誘発性肝炎、動脈硬化、心臓線維化、リウマチ性関節炎など）における役割の検討を行ってきた。その結果、OPN 欠損マウスでは、薬剤誘発性肝炎、動脈硬化、心臓線維化の進展が抑制されることを報告した。これらの研究成果により、様々な病態における創傷治癒、

組織再構築過程の中で、OPN が key player として重要であることが示された。更に、リュマチ性関節炎においては、トロンビンに切断された OPN では、既知の GRGDS 配列からなるドメインとは全く別の新規の機能ドメイン (SLAYGLR 配列) が出現し、その新規機能ドメインに対する中和抗体を投与することにより病態の進行を阻止できることを報告した。この報告はヒト難治性疾患に対する新たな治療法の可能性を示唆する重要な知見と考えられる。更に興味深いことにこの新規機能ドメインには $\alpha 9$ インテグリン結合部位が含まれるため、我々は $\alpha 9$ インテグリンが OPN の受容体として重要であるという仮説を立てている。更に $\alpha 9$ インテグリンは、matricellular protein のうち、創傷治癒、組織再構築に重要な役割を持つなど OPN と多くの共通点を持ちながら異なる分子である TN-C の受容体でもあり、その点からも、 $\alpha 9$ インテグリンの創傷治癒、組織再構築に対する役割が推測されるが、現在まで $\alpha 9$ インテグリンの研究は、欠損マウスが生後早期に死亡し、特異的モノクローナル抗体が存在しないことより、ほとんどなされていなかった。最近分子免疫分野では、マウス $\alpha 9$ インテグリンに対するモノクローナル抗体を樹立することに成功し、 $\alpha 9$ インテグリンの様々な病態における意義を解明することを可能にした

2. 研究の目的

動脈硬化、心筋線維化など難治性心血管疾患における、matricellular protein (トロンビン切断型 OPN、TN-C、TN-X) と、その受容体である $\alpha 9$ インテグリンの病態における意義を、特に

(1)、全長型 OPN とトロンビン切断型 OPN の役割の相違

(2)、OPN 中の GRGDS 配列と SLAYGLR 配列の役割の相違

(3)、OPN と $\alpha 9$ インテグリンの役割の相違

(4)、OPN、TN-C、TN-X の役割の相違

の見地から明らかにし、病態の全体像を解明することである。

3. 研究の方法

(1)、OPN/ $\alpha 9$ インテグリン

①、動脈硬化 トロンビン切断型 OPN および $\alpha 9$ インテグリンの動脈硬化病変における直接的な役割を調べる目的で、ApoE 欠損マウスに angiotensinII を浸透圧ポンプを用いて持続注入することにより動脈硬化モデルを作製し、対照群 (コントロール抗体投与群) と、治療群 (トロンビン切断型 OPN 中和抗体または $\alpha 9$ インテグリン中和抗体投与群) に分け、週 1 回 4 週間の各抗体の投与を行い、投与後 2 又は 4 週間後に、大動脈組織を摘出し、oil

red O 染色による動脈硬化病変の面積計測と、HE 染色、マッソントリクローム染色による組織学的検討を行い、動脈硬化病変、線維化、炎症細胞浸潤、平滑筋細胞増殖などに対する中和抗体投与の影響を調べる。更に生化学的検討として、定量的 PCR、ウエスタンブロッティングによる OPN、 $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリン、 $\alpha 4$ インテグリン、コラーゲン-I/III/IV などの mRNA、蛋白レベルの発現、ザイモグラフィによる MMP-2/9 の活性、免疫染色によるマクロファージ、好中球、T 細胞、血管平滑筋細胞、OPN、 $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリン、 $\alpha 4$ インテグリン蛋白の発現などを経時的に検討する。以上により、トロンビン切断型 OPN 中和抗体または $\alpha 9$ インテグリン中和抗体投与の動脈硬化における役割とその作用機序について詳細に検討する。

②、心筋梗塞 同様にトロンビン切断型 OPN および $\alpha 9$ インテグリンの心筋梗塞後再構築に対する直接的な役割を調べる目的で、C57BL/6 野生型マウスにおいて、心筋梗塞を作製する。対照群 (コントロール抗体投与群) と、治療群 (トロンビン切断型 OPN 中和抗体または $\alpha 9$ インテグリン中和抗体投与群) に分け、週 1 回 4 週間の各抗体の投与を行い、生存率を観察すると共に手術 14 日、28 日後に心臓超音波検査法により心機能を計測し、心収縮力低下、心拡大、心肥大などに対する中和抗体投与の影響を調べる。手術 28 日後に心臓組織を摘出し、HE 染色、マッソントリクローム染色、TTC 染色など組織学的検討を行い、心筋梗塞面積、炎症細胞浸潤、心筋線維化などに対する中和抗体投与の影響を調べる。更に生化学的検討として、定量的 PCR やウエスタンブロッティングによる ANF、BNP、コラーゲン-I/III/IV、OPN、 $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリン、 $\alpha 4$ インテグリン mRNA、蛋白レベルの発現、ザイモグラフィによる MMP-2/9 の活性、免疫染色によるマクロファージ、好中球、T 細胞、OPN、 $\beta 1$ インテグリン、 $\alpha 9$ インテグリン、 $\alpha 4$ インテグリン蛋白の発現、毛細血管二重染色による血管新生の程度、TUNEL 染色によるアポトーシスなどを経時的に検討する。以上により、トロンビン切断型 OPN 中和抗体または $\alpha 9$ インテグリン中和抗体投与の心筋梗塞後心臓再構築における役割とその作用機序について詳細に検討する。

(2)、TN-C/X

①、血管障害 TN-C/X の血管病変における直接的な役割を調べる目的で、対照群として C57BL/6 野生型マウスと、同週令の C57BL/6 バックグラウンドの TN-C 欠損マウス、TN-X 欠損マウス、TN-C/TN-X 欠損マウスにおいて、ワイヤーによる血管障害を引き起こし、血管障害後血管再構築モデルを作製する。モデル

作製後の評価項目は上記 OPN/ α 9 インテグリンの動脈硬化の項目に準ずる。以上により、TN-C/X の血管障害後血管再構築における役割とその作用機序について詳細に検討する。②、心筋梗塞 同様に TN-C/X の心筋梗塞後再構築に対する直接的な役割を調べる目的で、対照群として C57BL/6 野生型マウスと、同週令の C57BL/6 バックグラウンドの TN-C 欠損マウス、TN-X 欠損マウス、TN-C/TN-X 欠損マウスにおいて、心筋梗塞を作製する。モデル作製後の評価項目は上記 OPN/ α 9 インテグリンの心筋梗塞の項目に準ずる。以上により、TN-C/X の血管障害後血管再構築における役割とその作用機序について詳細に検討する。

4. 研究成果

1、 α 9 インテグリン

マウスの心筋梗塞モデル、自然発症動脈硬化モデルなどにおける α 9 インテグリンの発現を免疫染色法、real-time PCR 法などを用いて解析中である。今までに心筋細胞、心筋線維芽細胞、動脈硬化病変などでその発現を確認した。現在、様々な疾患モデルに中和抗体を投与してその治療効果を確認中である。 α 9 インテグリンは、現在まで動物モデルで使用可能な抗体がなく、さらに欠損マウスは生後数日で致死になることから、その心血管疾患における働きは全く不明であった。本研究により、これらの病態において α 9 インテグリンが役割を持っていることが明らかになれば、新たな治療法につながる可能性があると考えられる。更に、OPN は既にこれらの病態において重要であることが示されているが、その機序として、OPN- α 9 インテグリンの相互作用が関係しているかどうかということも重要な検討課題であると考えられる。この点に対しても、OPN 欠損マウスや OPN 中和抗体などを用いることにより明らかにすることが可能であると考えられる。

2、TN-C/X

マウス心筋梗塞モデルにおける心臓の TN-C/X の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、TN-C は OPN 同様正常心では発現を認めないが心筋梗塞発症後経時的にその発現が亢進するのに対し、TN-X は正常心で発現を認めるがその発現は発症後もほとんど変わらず、これら発現パターンの相違からその病態における役割も異なる可能性が示唆された。現在、これらのマウスで疾患モデルを作成し、その疾患に対する直接的な効果を確認中である。近年、OPN や TN を含むマトリックス細胞間蛋白質は、インテグリンとの相互作用を介し、細胞の接着、増殖、運動などに深く関与していることが明らかとなってきているが、それらの病態における個々の役割の相違、相互作用や協調

効果など詳細は不明である。更に、TN-C は心臓の修復過程に関与していることが示唆されるがその直接的な役割は不明であり、また TN-X は遺伝的疾患 Ehlers-Danlos syndrome の原因遺伝子の一つと考えられているが、心血管疾患における役割はほとんど不明である。OPN 欠損マウスとの比較によりこれらの分子の個々の役割を明らかにすることが可能であり、更には、ダブル欠損マウスを作成することで各分子の相互作用や相乗効果を検討することも可能であると考えられる。

以上の研究を通じて、 α 9 インテグリン、TN-C/X、OPN などマトリックス細胞間蛋白質の組織再構築における個々の役割のみならず、分子間相互作用や相乗効果、ひいては組織再構築の分子機構の全容に近づきたいと考えている。

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 6 件)

①、Koyu, I., Matsui, Y., et al (11 名中 10 番目)、The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. **Matrix boil.**, 28:11-19(2009) 査読有

②、Matsui, Y., et al (11 名中 1 番目)、Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart. **Circ Res.**, 103:1309-1318(2008) 査読有

③、Matsui, Y., et al (8 名中 1 番目) Molecular Mechanisms and Physiological Significance of Autophagy during Myocardial Ischemia and Reperfusion. **Autophagy.**, 4:409-415(2008) 査読有

④、Kon, S., Matsui, Y., et al (14 名中 9 番目) Heparan sulfate proteoglycan, syndecan-4 regulates osteopontin mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. **J Exp Med.**, 205:25-33(2008) 査読有

⑤、Matsui, Y., et al (8 名中 1 番目) Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. **Circ Res.**, 100:914-922(2007) 査読有

⑥、Saito, Y., Matsui, Y., et al (14 名中 11 番目) Osteopontin small interfering RNA protects mice from fulminant hepatitis. **Hum Gene Ther.**, 18:1205-1214(2007) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①、Matsui Yutaka, et al.、Lats2 is an endogenous regulator of apoptosis and

myocyte size in the heart、Scientific Sessions of American Heart Association 2008、November 9, 2008、New Orleans, Louisiana, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 裕 (MATSUI YUTAKA)

北海道大学遺伝子病制御研究所・マトリックスメディシン研究部門・特任准教授

研究者番号：30431381

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし