

平成 23 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590867

研究課題名 (和文) 心筋梗塞後リモデリングにおける ADAMTS4 の役割と治療応用

研究課題名 (英文) Role of ADAMTS4 in ventricular remodeling after myocardial infarction

研究代表者

草地 省蔵 (KUSACHI SHOUZOU)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：30214943

研究成果の概要 (和文)：

心筋梗塞における ADAMTS4 の発現を検討した。梗塞心の梗塞辺縁領域に強い ADAMTS4 の発現誘導を認めた。次に ADAMTS4 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。まず、ADAMTS4 ノックアウトマウスの心臓形成には明らかな異常は認めなかった。次に ADAMTS4 ノックアウトマウスを用いて心筋梗塞を作成し、野生型と比較した。梗塞後の生存率には有意な差はなく、炎症細胞の浸潤度および梗塞後の心機能にも有意な差は見られなかった。以上より、19 ある他の ADAMTS メンバーが ADAMTS4 ノックアウト心筋梗塞マウスにおいて代償的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We examined the ADAMTS4 expression and distribution in myocardial infarction. ADAMTS4 was strongly induced after myocardial infarction, especially in the infarct marginal zone. In ADAMTS4 null mice, heart development was normal. We then produced myocardial infarction in ADAMTS4 null mice and compared with that in wild type mice. There was no significant difference regarding the survival, inflammatory cell infiltration, and cardiac function after myocardial infarction. Accordingly, it is suggested that other ADAMTS members compensate the role of ADAMTS4 in the null mice in our infarction model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

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：心筋梗塞、ADAMTS

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞後に起きる左室リモデリングは組織再構築の典型例であり、心筋梗塞の予後を規定する因子である。細胞外マトリックスはコラーゲンやプロテオグリカンの集合体から形成され、心臓における主要な細胞外マトリックス成分のひとつがバーシカンである。ヒアルロン酸結合性プロテオグリカンであるバーシカンはそのノックアウトマウスは心内膜欠損を来し致死性的となるなど、心臓形成やリモデリングにとって重要である。

申請者は、近年行っている心血管疾患における細胞外マトリックスの役割についての研究過程で、この心臓に重要であるバーシカンが、心筋梗塞の治癒過程で分解されてしまうことを発見した。さらに後述するように、バーシカン分解酵素であるADAMTSファミリーのうち、ADAMTS4が心筋梗塞後に一過性に発現上昇することを見出した。

左室リモデリングにおいて細胞外マトリックスの合成と分解は重要なファクターである。これまでコラーゲンの分解とコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の重要性が強く認識されている(*J Clin Invest.* 2005; 115(3): 599-)が、バーシカンの分解及びその分解酵素が左室リモデリングにどのように作用しているかは不明である。

バーシカンを分解する酵素群はADAMTS (A disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin-1)ファミリーと呼ばれるメタロプロテアーゼの一群である。このうちバーシカン分解に関わるのは、ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15の6種類であるが、我々のグループはADAMTS1が心筋梗塞の超急性期に上昇する虚血誘導遺伝子であることを既に発見し、報告した(Nakamura et al., *J Biochem.* 2004; 136(4): 439-46.)。ADAMTS1の発現パターンはバーシカン分解の経過と比較すると一致せず、他のADAMTSがバーシカン分解に関与していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、心筋梗塞(MI)後左室リモデリングにおける細胞外マトリックス成分、バーシカン分解におけるADAMTSの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) MIにおけるADAMTS4発現動態の検討：心筋梗塞モデルラットを作成しADAMTS4の発現の変化を検討。
- (2) ADAMTS4ノックアウトマウス的心臓における表現型の検討：ADAMTS4ノックアウトマウス的心臓を解析
- (3) 心臓への遺伝子発現導入・発現阻害のための予備的実験：発現コンストラクトの作成
- (4) ADAMTS4ノックアウトマウスでの心筋梗塞作製：マウス心筋梗塞を作成
- (5) ADAMTS4ノックアウトマウス梗塞後リモデリング解析：梗塞後の心臓を摘出し解析

4. 研究成果

(1) 心筋梗塞におけるADAMTS4の発現検討

雄性SDラットを用いて、心筋梗塞モデルを作製し、経時的に心臓を摘出し、リアルタイムPCR法によるADAMTS4のmRNA発現に関する定量的評価・解析を行った。次に免疫染色法・ウェスタンブロッティング法によるタンパクレベルでのADAMTS4の評価・解析を行った。心筋梗塞後のADAMTS4はそれぞれ固有の発現パターンを示した。このことより、それぞれのADAMTS4が心筋梗塞の治癒過程において固有の役割を担っていることが示された。

(2) ノックアウトマウスにおける心臓表現型の解析

ADAMTS4ノックアウトマウスを本学動物実験施設に搬入し、飼養を開始した。心筋梗塞を作成に取り掛かっており、心筋梗塞後、7日目の心臓をノックアウトマウス5匹、野生型5匹でそれぞれ作成した。生存率には明らかな差は現在までの匹数においてはほとんど見られなかった。

(3) ADAMTS4ノックアウトマウスでの心筋梗塞作製

ADAMTS4ノックアウトマウスおよび野生型C57/B6マウスを用いて、心筋梗塞モデルを作製し、経時的に心臓を摘出し、2日・7日・28日と経時的に血圧測定、心臓超音波検査を実施し、心筋梗塞後の心機能の変化について検討を行った。血圧測定、心臓超音波検査にては今回検討した範囲では有意な差は認めなかった。

次にADAMTS4ノックアウトマウスでの梗塞心臓における表現型の解析を行った。まず、心筋梗塞作成後の生存率に関して、術後の心臓

破裂の発生頻度には差はなかった。その後心臓を摘出しHE染色・アザン染色などを行い、線維化の有無などについて検討した。

(4) ADAMTS4ノックアウトマウス梗塞後リモデリング解析

ADAMTS4ノックアウトマウス心筋梗塞モデルを作製した。バーシカン分解が細胞浸潤に影響を与えることが予想されるので、F4/80陽性細胞として検出される炎症細胞浸潤の程度などを野生型の場合と比較を行った。梗塞後7日目の時点における細胞浸潤とバーシカン分解の関連を検討したが、野生型と有意な差は認めなかった。

ADAMTS欠損が生理的機能に影響を与える可能性が新たに考えられたので、梗塞後7日目の時点における心機能・左室駆出率など生理的機能を心臓エコー検査などにて検討したが、明らかな差は見られなかった。

今回の結果の考察として、部位または病態特異的な代償メカニズムが働いている可能性が考えられる。すなわち、ADAMTS4以外の他のバーシカン分解酵素が代わりに働いている可能性が挙げられる。現在ADAMTSには19種類が知られており、このうちバーシカン分解酵素として働くものはADAMTS4のほかADAMTS1, 4, 5, 9などがある。これら他のADAMTSメンバーの発現動態など、さらに詳細なADAMTSの解析により、左室リモデリングのメカニズムの解明につながるものと考えられた。

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19件)

- ① 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、10番目、
Olmесartan reduces arterial stiffness and serum adipocyte fatty acid-binding protein in hypertensive patients. **Heart Vessels**. 査読有、2011 in press
- ② 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計11名、10番目、
AHR, a novel acute hypoxia-response sequence, drives reporter gene expression under hypoxia in vitro and in vivo. **Cell Biol Int**. 査読有、35(1)巻、2011、pp.1-8
- ③ 草地 省蔵、計6名、6番目、
Association of circulating levels of leptin and adiponectin with metabolic syndrome and coronary heart disease in patients with various coronary risk factors. **Int Heart J**. 査読有、52(1)巻、2011、pp.17-22
- ④ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、10番目、
Significant relationship between changes in brachial-ankle pulse wave velocity relative to blood pressure elevation and coronary artery disease. **Coron Artery Dis**. 査読有、21(7)巻、2011、pp.407-413
- ⑤ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、8番目、
Connective tissue growth factor induction in a pressure-overloaded heart ameliorated by the angiotensin II type 1 receptor blocker olmesartan. **Hypertens Res**. 査読有、33(12)巻、2010、pp.1305-1311
- ⑥ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、10番目、
Effect of cilnidipine on normal to marginally elevated urine albumin-creatinine ratio in asymptomatic non-diabetic hypertensive patients: an exponential decay curve analysis. **Clin Drug Investig**. 査読有、30(10)巻、2010、pp.699-706
- ⑦ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計11名、11番目、
Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. **Atherosclerosis**. 査読有、211(1)巻、2010、pp.164-169
- ⑧ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計18名、15番目、
Impact of olmesartan on progression of coronary atherosclerosis a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the OLIVUS (impact of OLmesartan on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) trial. **J Am Coll Cardiol**. 査読有、55(10)巻、2010、pp.976-982
- ⑨ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計10名、10番目、
Cardio-ankle vascular index is independently associated with the severity of coronary atherosclerosis and left ventricular function in patients with ischemic heart disease. **J Atheroscler Thromb**. 査読有、17(3)巻、2010、pp.249-258
- ⑩ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、9番目、
ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. **J Biol Chem**. 査読有、2009、284(24)巻、pp.16325-16333
- ⑪ 草地 省蔵、廣畑 聡、計10名、9番目、
The 3'-untranslated region of ADAMTS1 regulates its mRNA stability. **Acta**

- Med Okayama.** 査読有、63(2)巻、2009、pp.79-85
- ⑫ 廣畑 聡、計9名、
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9 (ADAMTS9) expression by chondrocytes during endochondral ossification.
Arch Histol Cytol. 査読有、72(3)巻、2009、pp.175-185
- ⑬ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、10番目、
Relationship between activin A level and infarct size in patients with acute myocardial infarction undergoing successful primary coronary intervention.
Clin Chim Acta. 査読有、401(1-2)巻、2009、pp. 3-7
- ⑭ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、小川 弘子 計10名、8番目、
Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes.
Glycobiology. 査読有、19(1)巻、2009、pp.83-92
- ⑮ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計10名、10番目、
Serum N-3 polyunsaturated fatty acid levels correlate with the extent of coronary plaques and calcifications in patients with acute myocardial infarction.
Circ J. 査読有、72(11)巻、2008、pp.1836-1843.
- ⑯ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計11名、10番目
Association of new arterial stiffness parameter, the cardio-ankle vascular index, with left ventricular diastolic function.
J Atheroscler Thromb. 査読有、15(5)巻、2008、pp.261-268.
- ⑰ 草地 省蔵、廣畑 聡、小川 弘子 計10名、10番目、
Association of corrected QT dispersion with symptoms improvement in patients receiving cardiac resynchronization therapy.
Heart Vessels. 査読有、23(5)巻、2008、pp.325-33.
- ⑱ 草地 省蔵、廣畑 聡、三好 亨、計10名、10番目、
Prone position is essential for detection of pulmonary vein pseudostenosis by enhanced multidetector computed tomography in patients who undergo pulmonary vein isolation.
Circ J. 査読有、72(9)巻、2008、pp.1460-1464.
- ⑲ 草地 省蔵、廣畑 聡、小川 弘子、計12名、12番目

Increased blood pressure levels relative to subjective feelings of intensity of exercise determined with the Borg scale in male patients with hypertension.
Clin Exp Hypertens. 査読有、30(3)巻、2008、pp.191-201

[学会発表] (計 24 件)

- ① 発表者名：Masanari Obika、
発表表題：ADAMTS1 inhibit angiogenesis by inducing apoptosis in endothelial cells: in vitro and in vivo study.
学会等名：第4回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム、
発表年月日：2011年2月8日、発表場所：岡山県岡山市
- ② 発表者名：Satoshi Hirohata、
発表表題：ADAMTS1 プロモーターは急性低酸素応答性に遺伝子を発現する
学会等名：第8回がんとハイポキシア研究会、発表年月日：2011年1月29-30日、
発表場所：北海道札幌市
- ③ 発表者名：山地 博介、
発表表題：肺静脈電気隔離術5年後に右上肺静脈の dormant conduction で再発した発作性心房細動の一例
学会等名：日本循環器学会中国地方会、
発表年月日：2010年12月4日、
発表場所：島根県松江市
- ④ 発表者名：Toru Miyoshi、
発表表題：Cd44 Contributes to the Development of Abdominal Aortic Aneurysm in Mice Through the Interaction With Hyaluronic Acid and the Recruitment of Macrophages
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術集会、
発表年月日：2010年11月13-17日、
発表場所：アメリカ合衆国・シカゴ
- ⑤ 発表者名：Kazuhiro Dan、
発表表題：Chronic Kidney Disease is a Strong Predictor Related to the Severity of Coronary Artery Lesion in Patients with Stable Angina Pectoris
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術集会、
発表年月日：2010年11月13-17日、
発表場所：アメリカ合衆国・シカゴ
- ⑥ 発表者名：荒井 靖典、
発表表題：安定狭心症において、病変重症度は eGFR の低下に関連するが、酸化 LDL と別のメカニズムが関連する。
学会等名：第58回日本心臓病学会
発表年月日：2010年9月17-19日、
発表場所：東京都
- ⑦ 発表者名：広畑 聡、
発表表題：プロテアーゼ活性に依存しない血管内皮細胞への作用により

- ADAMTS1 は腫瘍の発育を阻害する。
学会等名：第7回 日本病理学会 カン
ファレンス
発表年月日：2010年8月6-7日、
発表場所：岡山県岡山市
- ⑧ 発表者名：Kagawa K、
発表表題：Ox-LDL (MDA-LDL) is strongly
influenced by LDL/HDL-C ratio, and
significantly higher in patients with ACS
than SAP or normal coronary.
学会等名：第42回 日本動脈硬化学会・
学術集会
発表年月日：2010年7月15-16日
発表場所：岐阜市
- ⑨ 発表者名：Ohtsuka H、
発表表題：Sexual Difference of Risk Factors
Related to Plaque Vulnerability: A Study
with VH-IVUS 学会等名：第42回 日本
動脈硬化学会・
学術集会
発表年月日：2010年7月15-16日
発表場所：岐阜市
- ⑩ 発表者名：村上 正明、
発表表題：虚血性心疾患③
当院での Endeavor stent の使用経験
学会等名：第7回 日本病理学会 カン
ファレンス
発表年月日：2010年6月11-12日
発表場所：鳥取県米子市
- ⑪ 発表者名：Satoshi Hirohata、
発表表題：ADAMTS1 is a Novel
Biomarker for Acute ischemia/reperfusion in
Myocardial infarction Patients
学会等名：第73回日本循環器学会総会
発表年月日：2010年3月5-7日
発表場所：京都市
- ⑫ 発表者名：Toru Miyoshi、
発表表題：The role of CD44 in the
Development of Experimental Abdominal
Aortic Aneurysm
学会等名：第73回日本循環器学会総会
発表年月日：2010年3月5-7日
発表場所：京都市
- ⑬ 発表者名：Hiroko Ogawa、
発表表題：Distribution of Plaque-Targeting
Fluorescent Accumulation were associated
with condensed Vascular Formation from the
Vasa Vasorum in Atherosclerotic Plaque
学会等名：第73回日本循環器学会総会
発表年月日：2010年3月5-7日
発表場所：京都市
- ⑭ 発表者名：Higashiya S、
発表表題：Association of Increased Plasma
Adipocyte Fatty Acid-binding Protein With
Coronary Artery Disease in Men.
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術
集会
- 発表年月日：2009年11月14-18日
発表場所：オーランド
- ⑮ 発表者名：Kamikawa S、
発表表題：A Novel Cationic Protein
Reduced Infarcted Size and Protected
Myocytes From Oxidative Stress Through
Modification of Akt Signaling.
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術
集会
発表年月日：2009年11月14-18日
発表場所：オーランド
- ⑯ 発表者名：Hirohata S、
発表表題：ADAMTS-1 is an Endothelial
Cell-specific Hypoxia-inducible Gene.
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術
集会
発表年月日：2009年11月14-18日
発表場所：オーランド
- ⑰ 発表者名：Toru Miyoshi、
発表表題：Serum Adipocyte Fatty
Acid-Binding Protein Levels are
Independently Associated with Coronary
Atherosclerosis.
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術
集会
発表年月日：2008年11月8-12日
発表場所：アメリカ・ニューオーリンズ
- ⑱ 発表者名：Youko Kaji、
発表表題：The Impact of Increased
Augmentation Index of Radial Pressure
Waveform on Paroxysmal Atrial Fibrillation.
学会等名：アメリカ心臓協会(AHA) 学術
集会
発表年月日：2008年11月8-12日
発表場所：アメリカ・ニューオーリンズ
- ⑲ 発表者名：加地容子、
発表表題：高血圧患者における発作性心
房細動と Augmentation index の増加との
関係
学会等名：第31回日本高血圧学会総会
発表年月日：2008年10月9-11日
発表場所：札幌市
- ⑳ 発表者名：土井正行、
発表表題：高血圧患者へのオルメサルタ
ン投与によるアディポサイトカインへの
影響
学会等名：第31回日本高血圧学会総会
発表年月日：2008年10月9-11日
発表場所：札幌市
- 21 発表者名：中津高明、
発表表題：未治療高血圧患者の低値微量
アルブミン尿に対する Cilnidipine 効果
学会等名：第31回日本高血圧学会総会
発表年月日：2008年10月9-11日
発表場所：札幌市
- 22 発表者名：Toru Miyoshi、
発表表題：Association between serum

adipocyte fatty acid-binding protein and the extent of coronary atherosclerosis.

学会等名：6th Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases Congress 2008

発表年月日：2008年9月25-28日

発表場所：中国・香港

23 発表者名：間島圭一

発表表題：第10回時間循環血圧研究会

発表年月日：2008年7月26日

発表場所：東京都

24 発表者名：遊木陽子、

発表表題：非糖尿病患者のHEM-9000AI 諸

指標と尿中微量アルブミン排泄量の関連

学会等名：第8回臨床血圧脈波研究会

発表年月日：2008年6月7日

発表場所：東京都

〔図書〕（計1件）

①著者名：Kohichiro Iwasaki, et al

出版社：Nova Biomedical Books

書名：Angioplasty Research Progress

Coronary Pressure Measurement for the Decision Making of Percutaneous

発行年：2009

総ページ数：12

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：再灌流療法の治療効果を判定する方法

発明者：廣畑 聡、白井真一、草地省蔵、

権利者：岡山大学

種類：国際特許 PCT 出願

番号：PCT/J P 2009/069224

出願年月日：2009年11月11日

国内外の別：国外

名称：新規DNA断片およびその用途

発明者：廣畑 聡、二宮善文、草地省蔵、オ

メル ファルク ハティポール

権利者：岡山大学

種類：国際特許出願

番号：PCT/J P 2009/051907

出願年月日：2009年4月2日

国内外の別：国外・国内

名称：再灌流療法の治療効果を判定する方法

発明者：廣畑 聡、白井真一、草地省蔵、

権利者：岡山大学

種類：特許出願

番号：特願 2008-289118

出願年月日：平成20年11月11日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：急性虚血性疾患の診断薬

発明者：廣畑 聡、白井真一、草地省蔵、

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特許第 4195492 号

出願年月日：平成20年10月3日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草地 省蔵 (KUSACHI SHOUZOU)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：30214943

(2) 研究分担者

三好 亨 (MIYOSHI TORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70444651

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90332791

小川 弘子 (OGAWA HIROKO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70423283 (H20~H21)