

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15683

研究課題名(和文)変性性僧帽弁疾患に対する新規治療薬の探索：メトホルミンに着目した基礎的研究

研究課題名(英文) Exploring a novel therapeutic agent for myxomatous mitral valve disease: basic studies focusing on Metformin

研究代表者

亀島 聡 (Kameshima, Satoshi)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：80826363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：変性性僧帽弁疾患(MMVD)は犬で最も多い心疾患で、トランスフォーミング増殖因子(TGF) や骨形成タンパク質(BMP)の発現増加に伴う弁膜肥厚により生じるが、それを抑える治療薬は存在しない。2型糖尿病治療薬メトホルミンは、TGF/BMPの作用を抑えることが報告されているが、僧帽弁の肥厚に及ぼす影響は知られておらず、その解明を本研究の目的とした。ラット心臓弁由来間質細胞においてメトホルミンは、TGF/BMPによるシグナル分子の活性化、および形質変化に伴うマーカータンパク質の発現増加を抑制した。また、ラット摘出僧帽弁においてメトホルミンは、TGF による弁膜肥厚を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりメトホルミンがTGF およびBMPによるラット僧帽弁膜の変性を抑制する可能性が示された。将来的には、上述した作用の詳細なメカニズムの解明とイヌ僧帽弁組織を用いた検討を経て、自然発症MMVD罹患動物の病態に及ぼすメトホルミンの影響を調査する予定である。メトホルミンが弁膜変性の悪化を防ぐ可能性を示すことができれば、既存薬とは異なる薬効を有する新たなMMVD治療薬となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common heart disease in dogs. Mitral valvular thickening associated with increased expression of transforming growth factor (TGF) superfamily members including TGF and bone morphogenetic protein (BMP) can cause MMVD. However, no therapeutic agent inhibits the development of valvular thickening. While metformin, an oral medication prescribed for type 2 diabetes, is reported to have inhibitory role against the differentiating effects of TGF and BMP, its effect on mitral valvular thickening is unknown. The aim of this study was to explore it. In rat valvular interstitial cells, metformin inhibited TGF- or BMP-induced activation of the signaling molecules and increase in the expression of differentiation marker proteins including α -smooth muscle actin and alkaline phosphatase. Moreover, metformin decreased TGF-induced valvular thickening of isolated rat mitral valves.

研究分野：獣医循環器学

キーワード：変性性僧帽弁疾患 犬 メトホルミン トランスフォーミング増殖因子 骨形成タンパク質

1. 研究開始当初の背景

高齢の伴侶動物において心疾患は、腫瘍性疾患や腎疾患と並び罹患率の高い疾患の1つであり、中でも変性性僧帽弁疾患(MMVD)は犬で最も多い心疾患である。MMVDの原因は僧帽弁尖の構造変化による肥厚である。これにより心臓内の血液は左心室から左心房へと逆流し、全身的にうっ血することで心不全の病態に陥り死に至る。現在、MMVDに対する治療法は、心不全への進展抑制またはその症状の緩和を目的とした対症療法のみであり、弁膜の構造変化を直接抑制する治療薬は存在しない。

トランスフォーミング増殖因子(TGF) β および骨形成タンパク質(BMP)は弁の形態学的な恒常性維持に関わるタンパク質で、弁膜疾患の病態においてそれらの組織中発現レベルは増加する。TGF β およびBMPは、弁膜構成細胞である間質細胞(VIC)や内皮細胞の形質転換、弁膜組織におけるムコ多糖の過剰蓄積、細胞外基質の分解、線維化、軟骨形成などを促進することで弁膜の構造を変化させる。BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI)はTGF β /BMPに対するデコイ(おとり)受容体として機能し、下流のシグナル伝達を阻害する。MMVD罹患動物の僧帽弁組織において、BAMBIのmRNA発現レベルが低下することが報告されている。

2型糖尿病治療薬であるメトホルミンは、近年糖尿病以外の新たな適用疾患の探索が行われている薬物の1つである。メトホルミンはラット肝星細胞において、BAMBIのmRNA発現レベルを増加させること、ヒト大動脈弁間質細胞においてTGF β による骨芽細胞様変化を抑制することが報告されている。一方、我々はこれまでにラット心臓弁膜由来VICにおいてメトホルミンがBAMBI mRNA発現を増加させることを明らかにしてきた。しかし、メトホルミンがBAMBI発現の増加を介してTGF β およびBMPによる心臓弁膜の構造変化を抑制するか否かはわかっていない。

2. 研究の目的

以下の2点について明らかにすることを本研究の目的とし、弁膜変性に対する新規治療候補薬としてのメトホルミンの可能性を探索する。

- ・TGF β またはBMPによるVICの形質転換に及ぼすメトホルミンの影響
- ・TGF β によるラット摘出僧帽弁の変性に及ぼすメトホルミンの影響

3. 研究の方法

(1) TGF β によるVICの筋線維芽細胞様変化に及ぼすメトホルミンの影響：コラゲナーゼを用いてラット房室弁由来のVICを単離し、実験に供した。VICにメトホルミンを単独処置またはTGF β 1と共処置した。TGF β シグナル分子および筋線維芽細胞マーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)のタンパク質またはmRNA発現をそれぞれウエスタンブロット法(WB)および定量的PCR法(qPCR)により検討した。TGF β シグナル分子の1つであるSmad2の核内移行を免疫蛍光染色により検討した。また、small interfering (si)RNAを用いて標的遺伝子のノックダウンを行った。

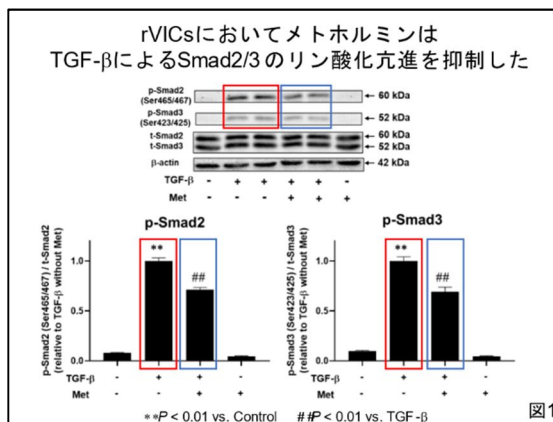
(2) BMPによるVICの骨芽細胞様変化に及ぼすメトホルミンの影響：VICにメトホルミンおよびBMP4を共処置した。BMPシグナル関連分子のタンパク質発現をWBにより、骨芽細胞マーカーのmRNA発現をqPCRにより検討した。またアルカリホスファターゼ(ALP)の活性を比色法により測定した。加えて、siRNAを用いて標的遺伝子のノックダウンを行った。

(3) TGF β によるラット摘出僧帽弁の変性に及ぼすメトホルミンの影響：ラットから僧帽弁の前尖および後尖をそれぞれ摘出し、血清不含培地中で器官培養した。メトホルミンおよびTGF β 1を共処置した。僧帽弁組織の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色により形態学的評価を行った。また α -SMA、collagen IおよびTGF β シグナル関連分子のタンパク質発現をWBにより検討した。

4. 研究成果

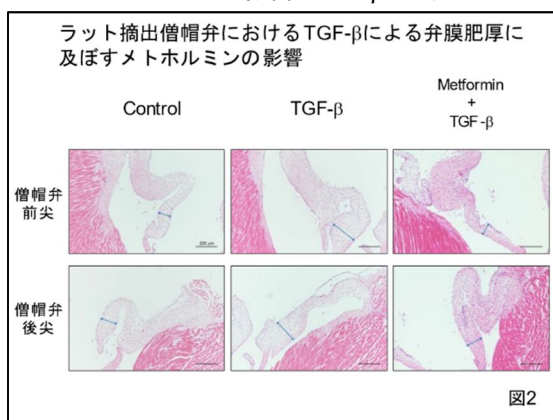
(1) TGF β によるVICの筋線維芽細胞様変化に及ぼすメトホルミンの影響：ラット房室弁より単離した細胞は、vimentin陽性、 α -SMA陰性、CD31(内皮細胞マーカー)陰性であり、VICであることを確認した。TGF β 1処置により α -SMA発現およびシグナル分子Smad2/3のリン酸化が亢進し、メトホルミンはそれらを抑制した(図1)。またメトホルミンはTGF β 1によるSmad2の核内移行を抑制した。加えてメトホルミンは、BAMBIのmRNA発現を増加させた。しかし、BAMBI遺伝子に対するsiRNAを用いた遺伝子ノックダウンは、メトホルミンによるTGF β 1誘導性Smad2/3リン酸化の抑制に影響を及ぼさなかった。次にTGF β シグナルに対する抑制性分子であるSmad7、protein phosphatase (PP)2CA、PPM1AのmRNA発現に及ぼすメトホルミンの影響を検討したところ、メトホルミンはPPM1AのmRNA発現を増加させた。しかし、PPM1A遺伝

子ノックダウンは、メトホルミンによる TGFβ1 誘導性 Smad2/3 リン酸化の抑制に影響を及ぼさなかった。一方、細胞内のエネルギーセンサーである AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化薬としても使用されるメトホルミンは、AMPK の活性化を介して TGFβシグナルを抑制することが報告されている。そこで AMPKα1/2 の遺伝子をノックダウンし、同様の実験を行ったが、メトホルミンによる TGFβ1 誘導性 Smad2/3 リン酸化の抑制には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、メトホルミンが Smad2/3 のリン酸化を阻害することで TGFβ1 による VIC の筋線維芽細胞様変化を抑制する可能性が示されたが、その詳細なメカニズムを明らかにすることはできなかった。一方で、メトホルミンが Smad2/3 のリン酸化のみならずタンパク質発現レベルを減少させることを明らかにしており、現在その機序の解明も含めて検討を継続している。



(2) BMPによるVICの骨芽細胞様変化に及ぼすメトホルミンの影響：BMP4処置によりALPのmRNA発現およびSmad1/5のリン酸化が亢進し、メトホルミンはそれらを抑制した。またメトホルミンはBMP4によるALP活性の亢進を抑制した。BAMBIまたはAMPKの遺伝子ノックダウンは、メトホルミンによるBMP4誘導性Smad1/5リン酸化の抑制に影響を及ぼさなかった。研究成果(1)と同様に、メトホルミンによるBMP4誘導性Smad1/5リン酸化抑制のメカニズムは明らかにできなかったため、その機序の解明に向けた検討を継続中である。

(3) TGFβによるラット摘出僧帽弁の変性に及ぼすメトホルミンの影響：TGFβ1の処置により摘出僧帽弁の前尖・後尖共に自由縁(弁の先端部分)が肥厚し、メトホルミンはこれを抑制した(図2)。一方、メトホルミンは摘出僧帽弁におけるSmad2/3、collagen Iおよびα-SMAの発現レベルを減少させた。以上の結果から、メトホルミンはSmad2/3の発現を減少させることで、TGFβによる弁構成細胞の活性化を阻害し、続く弁膜肥厚を抑制する可能性が示唆された。今後は弁膜組織中の線維化領域および酸性ムコ多糖蓄積量、培養上清または弁組織中のマトリックスメタロプロテアーゼ活性などを測定し、弁膜変性に対するメトホルミンの抑制作用の詳細を明らかにする予定である。



(4) 本研究成果のまとめ：本研究結果からメトホルミンは、TGFβまたはBMPによる細胞内シグナルの活性化を阻害しVICの形質転換を抑制することで、僧帽弁膜の変性を抑制的に制御する可能性が示唆された。本研究期間ではその詳細な機序の解明に至らなかったが、少なくともBAMBI発現の増加を介する可能性は低いと考えられる。今後も機序の解明に向けて継続的に研究を行う必要がある。また本研究では、当初計画していた心臓弁由来内皮細胞およびMMVDモデル動物を用いた検討ができなかった。ラット心臓弁内皮細胞の単離は難しく、また得られる細胞数が不十分であるため、イヌを含む大型動物の弁膜組織から単離する必要がある。現在予備的な実験として、ヒト臍帯静脈内皮細胞およびラット大動脈内皮細胞を用いてTGFβ/BMPによる形質転換に及ぼすメトホルミンの影響を検討している。また現在報告されているMMVDモデル動物は、モデルの成立までに長期間を要するものが多く、より簡易で短期間かつ確実に作製できるMMVDモデル動物を確立する必要がある。現在、上述した条件を満たすモデル動物の作製を計画しており、実現した場合は、新規MMVDモデル動物の病態に及ぼすメトホルミンの影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小俣 和也, 亀島 聡, 木村 祐哉, 伊藤 直之
2. 発表標題 Bone morphogenetic protein 4によるラット心臓弁間質細胞の骨芽細胞様変化に及ぼすmetforminの影響
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本 和樹, 亀島 聡, 木村 祐哉, 伊藤 直之
2. 発表標題 Transforming growth factor- によるラット心臓弁由来間質細胞の形質転換に及ぼすmetforminの影響
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------