

平成 23 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790696
 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相互作用の心血管疾患における機能解析
 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・特任准教授
 研究者番号：30431381

研究成果の概要（和文）：動脈硬化、心筋梗塞などの心血管疾患において、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することを目標とし研究をすすめている。現在まで、1、心筋梗塞後の組織修復に Syndecan-4 や $\alpha 9$ インテグリンが役割を担っていること、2、血管障害後の新生内膜形成において Syndecan-4 が役割を担っていること、を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The interactions between extracellular matrix proteins and integrins play pivotal roles in the development of many cardiovascular diseases, including cardiac remodeling after myocardial infarction (MI) and atherosclerosis. We had two major novel findings as below. 1) Syndecan-4 and alpha9 integrin plays a critical role in the cardiac healing process after MI. 2) Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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)、テネーシン (TN)、トロンボスポニン (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、リウマチ性関節炎においては、トロンピンに切断された 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たてている。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。一方、我々は細胞膜に存在するマトリックスのひとつ Syndecan-4 が OPN と結合し、その働きを制御していることを報告した。Syndecan-4 は、インテグリンと共受容体として働くことは知られていることから、生体において重要な役割を担っているものと考えた。

2. 研究の目的

動脈硬化、心筋梗塞など難治性心血管疾患における、matricellular protein(トロンピン切断型 OPN、TN-C、TN-X)、Syndecan-4 と、その受容体のひとつ $\alpha 9$ インテグリンの病態における意義を、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)、 $\alpha 9$ インテグリン

心筋梗塞 トロンピン切断型 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($\alpha 9$ 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、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、 $\alpha 9$ 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)、Syndecan-4

①、血管障害 Syndecan-4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Syndecan-4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、1、2、4週間後に、大動脈組織を摘出し、HE染色による組織学的検討を行い、新生内膜病変、炎症細胞浸潤、平滑筋細胞増殖などに対するSyndecan-4欠損の影響を調べる。更にその機序の検討のため、野生型マウスとSyndecan-4欠損マウスから血管平滑筋細胞を培養し、成長因子添加による反応性の違いを、細胞増殖試験や遊走試験で検討する。またウエスタンブロッティングにより細胞内シグナル伝達経路を調べる。以上により、Syndecan-4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Syndecan-4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Syndecan-4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/ $\alpha 9$ インテグリンの心筋梗塞の項目に準ずる。以上により、Syndecan-4の心筋梗塞後心修復過程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)、 $\alpha 9$ インテグリン

マウスの心筋梗塞モデルにおける $\alpha 9$ 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した。これまでに心筋細胞、心筋線維芽細胞などでその発現を確認した。現在、心筋梗塞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が、現在までのところ、 $\alpha 9$ インテグリンが心筋梗塞後の組織修復に重要な役割を果たしているという結果が得られている。 $\alpha 9$ 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 $\alpha 9$ 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- $\alpha 9$ 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)、Syndecan-4

血管障害モデルにおける Syndecan-4 の機能の解析では、Syndecan-4 が、障害血管の平滑筋細胞の増殖と遊走の制御に働くのみならず、骨髄に存在する平滑筋前駆細胞の動員にも関与し、新生内膜形成に重要な役割を担っていることが示された。

心筋梗塞モデルにおける Syndecan-4 の機能の解析では、心臓の Syndecan-4 の発現を real time PCR および免疫染色により解析した。その結果、Syndecan-4 は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ことがわかった。現在 Syndecan-4 欠損マウスに心筋梗塞を作成し、その疾患に対する直接的な効果を確認中である。近年、Syndecan-4 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、その役割を明らかにすることにより新たな治療法の確立につながる可能性があると考えられる。

以上の研究を通じて、 $\alpha 9$ インテグリン、Syndecan-4、OPN など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 7 件)

①、Ikessue, M., **, Matsui, Y., **, et al

(11 名中 2 番目、*corresponding author、**equally contributed) Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** In press、査読有

②、Kurotaki, D., Matsui, Y., et al (16 名中 5 番目) CSF-1-Dependent Red Pulp Macrophages Regulate CD4 T Cell Responses. **J Immunol.**, 2011;186:2229. 査読有

③、Nakayama, Y., Matsui, Y., et al (6 名中 5 番目) Blockade of interaction of alpha9 integrin with its ligands hinders the formation of granulation in cutaneous wound healing. **Lab Invest.** 2010;90:881. 査読有

④、Morimoto, J., Matsui, Y., et al (4 名中 3 番目) Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases. **Curr Drug Targets.** 2010;11:494. 査読有

⑤、Kurokawa, M., Matsui, Y., et al (14 名中 6 番目) Regulatory role of DC-derived osteopontin in systemic allergen sensitization. **Eur J Immunol.** 2009;39:3323. 査読有

⑥、Matsui, Y., Matsui, Y., et al (10 名中 6 番目) Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. **Arthritis Rheum.** 2009;60:2362. 査読有

⑦、Kanayama, M., Matsui, Y., et al (18 名中 5 番目) Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. **J Immunol.** 2009;182:8015. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①、Masahiro Ikessue, Yutaka Matsui, et al. : Role of Syndecan-4 in Neointimal Hyperplasia and Atherosclerosis. American Heart Association scientific sessions 2010(米・シカゴ)11月14日-16日, 2010

②、松井裕: 心筋梗塞における Syndecan4 の機能解析。第 99 回日本病理学会総会 (東京) 4月27日-29日, 2010

③、Masahiro Ikessue, Yutaka Matsui, et al. : Role of Syndecan-4 in Neointimal Hyperplasia and Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2010 scientific sessions (米・サンフランシスコ) 4月8日-10日, 2010

④、Keiko Danzaki, Yutaka Matsui, et al. :

Interleukin-17 Deficiency Accelerates Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2010 scientific sessions (米・サンフランシスコ) 4月8日-10日, 2010

⑤、Yutaka Matsui, Masahiro Ikesue, Daichi Ohta, Keiko Danzaki, Tetsuhito Kojima, Toshimitsu Uede : Syndecan-4 protects from cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.

⑥、Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : The role of osteopontin in the cardiovascular diseases. 第61回日本細胞生物学会 Workshop (名古屋), 6月2日-4日, 2009.

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・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