

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590819

研究課題名（和文）PAI-1の冠動脈微小血管保護作用の解明と心筋梗塞の新規治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the protective effect of PAI-1 in coronary microvascular wall and application to the new treatment of myocardial infarction

研究代表者

金子 壮朗（KANEKO TAKEAKI）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90455634

研究成果の概要（和文）：PAI-1は心筋梗塞領域の血管壁を保護し、血管内皮細胞と基底膜の接着を安定化させ、心筋梗塞後の心筋間質への出血や炎症細胞浸潤を抑制することで心破裂を抑制し、梗塞後の心筋リモデリングを抑制することが明らかとなった。心筋梗塞後の血管破綻、心破裂抑制の機序としてuPA亢進によるプラスミノゲン-プラスミン系の活性化の結果MMPs（MMP-9, MMP-2）の活性亢進が細胞外マトリクスを分解することにより、冠動脈微小血管壁を分解し心破裂を起こし易くしている機序が研究成果から示唆された。

研究成果の概要（英文）：PAI-1 protected the coronary vessel walls of the myocardial infarct area and stabilized the adhesion of vascular endothelial cells to the basement membrane and inhibited a cardiac rupture by inhibiting bleeding and the inflammatory cells infiltration to cardiac interstitium after MI, and it was found to inhibit cardiac remodeling after MI.

An activation of plasminogen-plasmin system due to uPA activity which was suppressed by PAI-1 activity was associated with the mechanism of coronary microvascular collapse and cardiac rupture after myocardial infarction. It was suggested that an activation of MMPs (MMP-9, MMP-2) degraded an extracellular matrix and developed cardiac rupture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：循環器、分子生物学、動脈硬化、心筋梗塞、心破裂、心筋リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

PAI-1は従来から知られている血管内の線溶系抑制因子としての作用の他に、冠動脈微小血管での内皮細胞の維持及び血管壁基底膜を構成する細胞外マトリクスの維持に保護的な作用を発揮していることが明らかにさ

れ近年注目されている。PAI-1はAngiotensin IIが強く作用する心筋梗塞領域の血管壁でのuPA活性と拮抗することで血管壁を保護し、血管内皮細胞と基底膜の接着を安定化させ、マクロファージの血管壁への侵入を抑制することで冠動脈微小血管での内皮細胞の維

持及び血管壁基底膜を構成する細胞外マトリクスの維持に保護的な作用を発揮していることが明らかにされつつある。PAI-1 は血管内皮細胞の心筋間質への出血や炎症細胞浸潤を抑制することで心筋梗塞急性期合併症の心破裂を抑制することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は心筋梗塞におけるPAI-1の心血管保護作用を証明し、そのメカニズムを解明することで心筋梗塞合併症の心破裂を予防する為の新たな治療法を確立することを目的とする。

(1)PAI-1TGマウスに心筋梗塞モデルを作成し、血管内皮基底膜におけるPAI-1強発現が、梗塞後の出血や白血球浸潤を抑制し、心破裂率を減少させ、梗塞後心筋リモデリングを抑制することをin vivoで証明する。

(2)心破裂のメカニズムとして、plasminogen-plasmin systemの活性化がMMPsを介してマトリクスを分解し、内皮細胞の基底膜からの剥離を促進することを証明する。

## 2. 研究の方法

(1)PAI-1 transgenic mouse の樹立：  
PAI-1 TG mouse はマウスエンドセリンプロモーター(-5.9Kbp)に正常な代謝活性を持つ Human PAI-1 の遺伝子コード領域を結合した遺伝子を導入したマウスである。

Angiotensin II(Ang II)はエンドセリンプロモーターを活性化させる作用がある。このマウスの原型となった stable PAI-1 mouse (PAI-1 活性持続マウス) は PAI-1 蛋白の立体構造を維持する遺伝子突然変異を施したマウスで、正常で6分間の PAI-1 血中代謝活性時間を5日間まで延長したもので冠動脈内に PAI-1 を過剰発現する。このマウスは生後6カ月に冠動脈血栓閉塞を起こし自然に心筋梗塞を引き起こすことが報告されている。同マウスはエンドセリンプロモーターの活性により PAI-1 が過剰発現することから血管内皮細胞から最も多くの PAI-1 を発現している。

我々はこの遺伝子改変プラスミドを元に点突然変異を入れ、正常の代謝活性時間(6分間)を持つ PAI-1 TG mouse を作成した。このマウスの Human PAI-1 の発現臓器として心臓で強発現することが証明されている。また血清 PAI-1 antigen は正常マウス PAI-1 の2倍(1~2ng/ml)の発現が認められた。このマウスは血管内皮細胞を AngII で刺激するとエンドセリンプロモーターの活性化に伴い

内皮細胞下の血管周囲に高濃度に PAI-1 が蓄積すると考えられ、冠動脈血管内皮細胞下の基底膜での PAI-1 発現を研究する上で大変重要なモデルマウスと考えられる。この遺伝子改変マウスを元にして以下の研究を行った。

(1)PAI-1 transgenic mouse と Wild type mouse、PAI-1 knockout mouse との比較：  
独自に開発したマウスエンドセリンプロモーターによりヒトPAI-1を血管内皮細胞で強発現する PAI-1 TG mouse と WT mouse 及び PAI-1 KO mouse を比較することで心筋梗塞直後の PAI-1 の働きを明確にする。

(2)マウスに心筋梗塞モデルを作成：  
PAI-1 TG mouse, WT mouse, PAI-1 KO mouse (20-27g)を用い左冠動脈前下行枝結紮による心筋梗塞モデルを作成する。心筋梗塞後(0, 2, 4, 7, 28日)の死亡率、心破裂率を比較検討する。急性期の出血性変化や炎症細胞浸潤の程度、また心破裂の頻度、梗塞巣サイズの違い、心筋線維化の程度を組織学的に比較検討する。

(3)心筋梗塞後の左室心機能を測定：  
血管内皮基底膜にPAI-1を強発現させたPAI-1 TG mouse と WT mouse、PAI-1 KO mouse との心筋梗塞後の左室心機能を心エコー検査で調べ、心筋梗塞後の心機能の変化及び心拡大の程度を比較する。

(4)心筋梗塞後の心臓組織の分析と炎症性サイトカイン及び凝固、線溶因子の解析：  
心筋梗塞後の心臓を採取し(ホルマリン標本、凍結標本)、心臓の組織切片を作成する。各種染色(MT, HE, Prussian blue, Mac-3, CD 45, laminin)を行い、出血性変化、炎症細胞浸潤の程度、及び心筋線維化や細胞外マトリクスの分解の程度を定量的に比較検討する。

(5)心筋梗塞領域での凝固、線溶因子及びマトリクス構成蛋白の解析：  
心筋梗塞マウスの梗塞心筋組織、血液サンプルを採取し、凝固、線溶因子(PAI-1, uPA)や細胞外マトリクス分解に関わる蛋白活性(MMPs, plasminogen-plasmin)の経時的变化を蛋白レベル(Zymography, ELISA, Western blot)で測定する。

## 3. 研究成果

PAI-1TG(TG)マウスと正常(WT)マウスの心筋梗塞モデルでは、血中 PAI-1 濃度は両マウス群とも2日後に著明高値となり経時的に次第に低下傾向を示した。梗塞心筋組織内の PAI-1 濃度も両マウスとも2日後に著明高値となり経時的に次第に低下傾向を示し、両マ

ウス群ともに有意差は無かった。しかし、PAI-1TG (TG) マウスの心筋では human PAI-1 の発現が 2 日後ではコントロール (梗塞前マウス) と同様であったが、4 日後から 7 日後に掛けて増加を認め、コントロールの約 2 倍量 (20ng/ml) 以上の human PAI-1 濃度の増加を認めることが確認され、この増加分がトランスジェニックマウスとして PAI-1 濃度を増加させていることが確認された。この PAI-1 濃度の増加は心筋梗塞後 28 日後まで同様に持続していることを確認した。

(2) PAI-1TG (TG) マウスと正常 (WT) マウスに心筋梗塞モデルを作成すると、死亡率は正常マウスで有意に増加していた。心筋梗塞後の心破裂率は正常マウスと比較し、PAI-1TG マウスで有意に低下した (WT 24.2% vs. TG 11.7%,  $n=34$ ,  $P<0.05$ )。また両マウス群ともに心筋梗塞後 4 日から 7 日にかけて心破裂を起こすマウスの確立が高かった。

(3) 心エコー検査の結果から PAI-1TG マウスでは心筋梗塞 28 日後の左室拡張末期径は正常マウスと比較し、より小さい傾向があり、左室リモデリングが抑制されることが分った (WT  $5.15 \pm 0.68$  mm vs. TG  $4.31 \pm 0.27$  mm,  $P<0.05$ )。

(4) 心筋梗塞 28 日後の左室心機能 (%FS) は正常マウスと比較し PAI-1TG マウスで温存されていることが分った mice (WT 11% vs. TG 17%, % fractional shortening)。

(5) 梗塞心筋の組織診断より、心筋梗塞サイズは WT マウスと比較し PAI-1 TG マウスでは縮小していた ( $P<0.05$ )。

(6) 心筋梗塞領域の組織像は正常マウスと比較し PAI-1TG マウスでは出血像の程度は軽度であり、炎症細胞浸潤は著明に抑制されていた。一方、PAI-1KO マウスでは正常マウスと比較し梗塞後の心破裂率は著しく高率となり、心筋梗塞領域に著しい出血像を認め、心筋梗塞後 2 日後の早期から顕著な炎症細胞浸潤を伴っていた。また、その程度は PAI-1TG マウスと比較しても明らかに顕著であった。

(7) 炎症細胞浸潤の程度を経時的に定量すると、PAI-1TG マウスでは正常マウスと比較し、心筋梗塞 4 日後では好中球 (CD45 (+) cell) 浸潤が有意に低下していた ( $P<0.05$ )。また、マクロファージ (Mac-3 (+) cell) の浸潤は正常マウスと比較し、心筋梗塞 4~7 日後に PAI-1TG マウスで有意に低下していた ( $P<0.01$ )。

(8) PAI-1TG マウスと正常マウス及び PAI-1KO

マウスに心筋梗塞を作成し、時系列で心筋細胞を採取し心筋梗塞領域でのマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性を zymography で測定した。

PAI-1TG マウスでは正常マウスと比較し心筋梗塞後の MMP 活性が有意に抑制されていた。一方 PAI-1KO マウスでは心筋梗塞後の MMP 活性が有意に増加していた。

(9) 正常マウスでは MMP-9 活性は心筋梗塞直後から著しく増加しているが、PAI-1TG マウスでは心筋梗塞直後から MMP-9 活性が増加しているものの、4 日後から有意に低下していた ( $P<0.01$ )。

(10) 正常マウスでは MMP-2 活性は心筋梗塞直後か次第に増加し 7 日目がピークとなるが、PAI-1TG マウスでは MMP-2 活性は 4~7 日後に有意に低下していた ( $P<0.05$ )。

以上の結果より心筋梗塞直後からエンドセリンプロモーター活性により血管内皮細胞で PAI-1 を過剰発現する PAI-1TG マウスでは MMPs (MMP-9, MMP-2) 活性の抑制が血管内皮細胞の保護に関与し、冠動脈血管外への白血球やマクロファージの炎症細胞浸潤を抑制することで心破裂の抑制や心筋梗塞後急性期の心筋リモデリングの抑制に強く関与していることが示唆された。

結論として、冠動脈微小血管壁での PAI-1 過剰発現は心破裂を抑制していることが PAI-1 TG マウスで証明された。またこのメカニズムとして、血管基底膜の細胞外マトリクスでの MMPs (MMP-9, MMP-2) 活性の抑制が血管内皮の保護に関与し、好中球やマクロファージ等の炎症細胞が血管壁から心筋間質へ浸潤する過程を抑制していることが示唆された。

これらの成果は国内学会 (日本循環器学会)、国際学会 (AHA) で発表報告し注目を集めた。今後はこれらの研究成果を発展させ、心筋梗塞後リモデリングの機序解明、心筋梗塞後急性期心破裂の予防治療への臨床応用のために更なる研究が必要と考える。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

#### ① 金子壮朗

PAI-1 Overexpression Ameliorates Cardiac Rupture after Myocardial Infarction in

PAI-1 Transgenic Mice via Inhibiting  
Inflammatory Cell Accumulation and MMPs  
Activity、第77回日本循環器学会、2013年03  
月17日、パシフィコ横浜(神奈川)

② 金子壮朗

Overexpression of Plasminogen Activator  
Inhibitor-1 Ameliorates Cardiac Rupture  
after Experimental Myocardial Infarction  
in PAI-1 Transgenic Mice via Inhibiting  
Inflammatory Cell Accumulation and MMPs  
Activity、American Heart Association  
scientific sessions 2012、2012年11月4日、  
Los Angeles Convention Center(USA)

③ 金子壮朗

Overexpression of PAI-1 Reduces Cardiac  
Rupture after Myocardial Infarction in  
PAI-1 Transgenic Mice by Inhibiting  
Inflammatory MMPs Activity、第75回日本循  
環器学会、2011年8月3日、パシフィコ横浜(神  
奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 壮朗 (KANEKO TAKEAKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90455634

(2) 研究分担者

筒井 裕之 (TSUTSUI HIROYUKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70264017

石森 直樹 (ISHIMORI NAOKI)  
北海道大学病院・助教  
研究者番号：70399848

(3) 連携研究者

なし