





論文審査の要旨および担当者

学位申請者	安田 純平 (DV15009 獣医薬理学)		
学位論文題目	基底膜由来 <b>matricryptins</b> の新規内因性心保護因子としての役割解明		
担当者	主査 北里大学教授	中村 和市	
	副査 北里大学教授	佐々木 宣哉	
	副査 北里大学准教授	久留主 志朗	
	副査 大阪府立大学大学院准教授	東 泰孝	

論文審査の要旨 (3,000 字以内)

虚血性心疾患における低酸素・低栄養ストレスや高血圧症における持続的な圧過負荷は、組織の構造支持体である細胞外マトリックス (**extracellular matrix, ECM**) の産生と分解を伴う心リモデリングを引き起こす。**ECM** の分解により産生される **matricryptins** は抗血管新生作用をはじめとする生理活性を持つ。近年、心疾患患者の血中や心疾患モデル動物の心臓組織において基底膜 **ECM** 由来の **matricryptins** である XVIII 型コラーゲン分解断片 “**endostatin**” や IV 型コラーゲン  $\alpha 3$  分解断片 “**tumstatin**” の発現が変化することが明らかとなった。本研究はこれら基底膜由来 **matricryptins** の心臓における未知の役割を解明することを目的とした。

## 1. モルモット単離心室筋細胞の T 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性に及ぼす **endostatin** の影響

**Endostatin** は強力な血管新生阻害作用を持つことから抗腫瘍薬として開発が進められてきた。T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは心疾患病態時の心室筋細胞において発現し、不整脈や心肥大の発症・進展に関与すると考えられている。第一章では正常心室筋細胞においても T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを発現するモルモット単離心室筋細胞を用いてホールセル・パッチクランプ法により膜電流を測定し、**endostatin** が心筋細胞の T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性を抑制することを初めて明らかにした(Yasuda et al. *J. Vet. Med. Sci.* 2015)。本研究結果から、**endostatin** が T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性阻害を介した心保護作用を持つ可能性が示唆された。

## 2. ラット心線維芽細胞機能に及ぼす **tumstatin** 活性断片 T3 peptide の影響

心筋梗塞による心筋障害において、心線維芽細胞は障害部位へ遊走、増殖することで創傷治癒に重要な役割を果たしている。またブタ虚血/再灌流障害モデルの心臓組織において **tumstatin** 発現が変化することが報告されており、**tumstatin** と心筋梗塞を含めた虚血性心疾患との関連が示唆されている。第二章では初代培養ラット心線維芽細胞機能に及ぼす **tumstatin** 活性断片 T3 peptide (69-88 アミノ酸残基)の影響を検討した。T3 peptide は心線維芽細胞の増殖と遊走能を有意に亢進した。T3 peptide は Akt とその下流シグナル因子 p70S6K のリン酸化を有意に亢進し、**phosphatidylinositol 3-kinases/Akt** 阻害薬 LY294002 は T3 peptide 誘導性増殖、遊走を

有意に抑制した。また tumstatin 受容体として知られる  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  インテグリン阻害薬 cilengitide は T3 peptide 誘導性増殖および Akt リン酸化亢進を抑制した。本章では T3 peptide がインテグリン/Akt/p70S6K シグナル経路の活性化を介してラット心線維芽細胞の増殖と遊走能を亢進することを初めて明らかにした。Tumstatin が心筋梗塞後の治癒を促進する可能性が示唆された (Yasuda et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2017)。

### 3. H9c2 心筋芽細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性アポトーシスに及ぼす T3 peptide の影響

心筋梗塞における虚血/再灌流障害は活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生増加を介して心筋細胞死を誘導する。第三章では ROS の一種 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響を検討した。T3 peptide は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性の生細胞数低下、核のアポトーシス様変化およびアポトーシス関連タンパク質 caspase-3 の活性化を有意に抑制した。さらに T3 peptide は caspase-3 活性化に関わる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性ミトコンドリアの断片化と膜電位の低下および細胞内 ROS 産生を有意に抑制した。Cilengitide は T3 peptide による ROS 産生抑制作用を解除した。本章では、H9c2 心筋芽細胞において T3 peptide がインテグリンを介して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性細胞内 ROS 産生を抑制することにより、ミトコンドリア傷害/caspase-3 活性化/アポトーシスを阻害し細胞保護作用を示すことを初めて明らかにした (Yasuda et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2017)。

#### 4. 心筋虚血/再灌流障害に対する T3 peptide の保護作用

第四章では、*in vitro* および *ex vivo* 虚血/再灌流障害モデルを用いて第三章で明らかにした **tumstatin** の心保護作用を検討した。*In vitro* において、**T3 peptide** は低栄養・低酸素下で培養(虚血)後、正常栄養・正常酸素下で培養(再灌流障害)することで誘導した **H9c2** 心筋芽細胞死と細胞内 ROS 産生を有意に抑制した。*Ex vivo* においては、ランゲンドルフ灌流装置を用いてラット摘出心臓組織を栄養液の灌流停止(虚血)後に再灌流することで虚血/再灌流障害モデルを作製した。**T3 peptide** は虚血/再灌流誘導性の左室機能低下を抑制する傾向を示すと共に、心電図 QRS 間隔延長および塩化トリフェニルテトラゾリウムに未染色の梗塞領域形成を有意に抑制した。よって **T3 peptide** は虚血/再灌流誘導性心筋梗塞領域形成を阻害することで左室機能低下と心電図異常を抑制したと考えられる。本章では、**T3 peptide** が **H9c2** 心筋芽細胞(*in vitro*)およびラット摘出心臓標本(*ex vivo*)において虚血/再灌流誘導性心筋細胞死を抑制し、心保護作用を示すことを初めて明らかにした。本章の成果はこれまでの結果と併せて、**tumstatin** または **T3 peptide** が新規の虚血性心疾患治療戦略を生み出す標的となり得ることを示唆するものである。

本研究の第一章では、**endostatin** が心肥大や不整脈の発症・進展に関わると考えられる心筋細胞の T 型  $Ca^{2+}$ チャネル活性を抑制することを初めて明らかにした。第二章では **tumstatin** 活性断片 **T3 peptide** がラット心線維芽細胞の活性化を介して心筋梗塞後の創傷治癒に関与する可能性を初めて示した。第三章と第四章では **T3 peptide** が抗酸化作用を介して虚血/再灌流障害に対して保護的に働

く可能性が初めて示唆された。

### 【論文審査の結果】

本研究は、基底膜由来 **matricryptins** の心臓における未知の役割を解明することを目的とした。結果、**endostatin** および **tumstatin** が心疾患病態形成において抗血管新生作用以外の生理活性を示し、心保護的に働くことが初めて示唆された。今後、本研究結果を礎として、これらの **matricryptin** が心疾患に対する新規治療薬開発の標的となることが大いに期待される。

本論文の著者は、在学3年間でこの成果をまとめて早期修了対象者として論文を提出した。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。更に、著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位の授与に値すると判断した。