

基底膜由来 matricryptins の新規内因性心保護因子としての
役割解明

安田 純平
平成 29 年度

Elucidation of the role of basement membrane-derived matricryptins
as a novel endogenous cardioprotective factor

Jumpei Yasuda

2017

目次

I. 緒言	1
II. 第一章 モルモット単離心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル活性に及ぼす endostatin の影響	5
1. 緒言	6
2. 実験材料および実験方法	8
2-1. 実験材料	8
2-1-1. 試薬	8
2-1-2. 使用動物	8
2-2. 実験方法	8
2-2-1. モルモット心室筋細胞の単離	8
2-2-2. 膜電流の記録	9
2-3. 統計解析	10
3. 結果	11
3-1. モルモット単離心室筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネル電流に 及ぼす endostatin の影響	11
3-2. モルモット単離心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル電流に 及ぼす endostatin の影響	11
4. 考察	14
III. 第二章 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	17
1. 緒言	18
2. 実験材料および実験方法	20
2-1. 使用薬物	20
2-1-1. 試薬	20

2-1-2.	一次抗体	20
2-1-3.	二次抗体	20
2-2.	実験方法	21
2-2-1.	心線維芽細胞の単離培養法	21
2-2-2.	細胞増殖能の測定 (Cell counting assay)	22
2-2-3.	細胞遊走能の測定	23
2-2-4.	Western blotting	24
2-2-5.	心筋梗塞 (Myocardial infarction, MI) モデル作製	25
2-3.	統計解析	25
3.	結果	26
3-1.	心線維芽細胞の増殖能に及ぼす T3 peptide の影響	26
3-2.	心線維芽細胞の遊走能に及ぼす T3 peptide の影響	26
3-3.	心線維芽細胞における Akt リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響	27
3-4.	T3 peptide 誘導性細胞増殖および遊走に及ぼす PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 の影響	27
3-5.	心線維芽細胞における p70S6K リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響	28
3-6.	T3 peptide 誘導性 Akt リン酸化と細胞増殖に及ぼす $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide の影響	28
3-7.	MI モデルラットの梗塞領域における tumstatin 発現	29
4.	考察	41
IV.	第三章 H9c2 心筋芽細胞における H ₂ O ₂ 誘導性アポトーシスに及ぼす tumstatin 活性断片 T3 peptide の影響	44

1. 緒言	45
2. 実験材料および実験方法	47
2-1. 使用薬物	47
2-1-1. 試薬	47
2-1-2. 一次抗体	47
2-1-3. 二次抗体	47
2-2. 実験方法	47
2-2-1. 細胞の培養	47
2-2-2. Cell counting assay	48
2-2-3. DAPI 染色	48
2-2-4. Western blotting	48
2-2-5. ミトコンドリア膜電位の測定	49
2-2-6. 細胞内 ROS 産生測定	49
2-3. 統計解析	50
3. 結果	51
3-1. H ₂ O ₂ 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響	51
3-2. H9c2 心筋芽細胞における H ₂ O ₂ 誘導性 cleaved caspase-3 発現に及ぼす T3 peptide の影響	51
3-3. H9c2 心筋芽細胞における H ₂ O ₂ 誘導性 ミトコンドリア膜電位低下とミトコンドリア断片化に 及ぼす T3 peptide の影響	52
3-4. H9c2 心筋芽細胞における細胞内 ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響	53
4. 考察	61

V. 第四章	心筋虚血/再灌流障害に対する	
	T3 peptide の保護作用	65
1.	緒言	66
2.	実験材料および実験方法	67
2-1.	使用薬物	67
2-1-1.	試薬	67
2-1-2.	一次抗体	67
2-1-3.	二次抗体	67
2-2.	実験方法	67
2-2-1.	細胞の培養	67
2-2-2.	in vitro 虚血/再灌流障害モデル	67
2-2-3.	Cell counting assay	68
2-2-4.	Western blotting	68
2-2-5.	細胞内 ROS 産生測定	68
2-2-6.	ミトコンドリア由来 ROS 産生測定	69
2-2-7.	ex vivo 虚血/再灌流障害モデル (ランゲンドルフ灌流心)	69
2-2-8.	梗塞領域の測定	70
2-3.	統計解析	70
3.	結果	72
3-1.	OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響	72
3-2.	OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞のアポトーシス 関連タンパク質発現に及ぼす T3 peptide の影響	72
3-3.	OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内の	

ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響	73
3-4. OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内の ミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響	73
3-5. I/R 誘導性心機能低下に及ぼす T3 peptide の影響	73
3-6. I/R 誘導性心電図変化に及ぼす T3 peptide の影響	74
3-7. I/R 誘導性心筋梗塞領域形成に及ぼす T3 peptide の影響	75
4. 考察	87
VI. 総括	90
VII. 謝辞	97
VIII. 引用文献	98

I. 緒言

わが国の虚血性心疾患による死亡者数は約 7 万人にのぼり [44]、高血圧性心疾患発症リスクを有する高血圧症の総患者数は約 1000 万人以上であることから [43]、循環器疾患はまさに国民病と言える。とりわけ虚血性心疾患は世界各国における主要な死亡原因にもなっている [105]。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心臓の組織構造と機能の変化すなわち心リモデリングを引き起こす [38]。代表的な虚血性心疾患である心筋梗塞では、虚血ストレスによる心筋細胞死に伴い梗塞領域が形成される。その後心線維芽細胞が遊走、増殖、筋線維芽細胞へと分化し、コラーゲン、フィブロネクチンやヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) 産生を介して梗塞領域の修復を行う [38]。また非梗塞領域では心機能の低下に対する代償機構として、残存心筋細胞が肥大化し心拍出量を維持する [12]。高血圧症における心臓への圧過負荷に対しても心筋細胞の代償性肥大が起こるが、代償性肥大によっても機能を維持できなくなった心臓は心室腔の拡大や過剰な間質線維化から致死的な非代償性心不全に陥る [68]。現在臨床応用されている心不全治療薬の多くは心収縮力の維持と心臓への負荷を軽減する目的で使用されている。前者には強心配糖体 [82]、ホスホジエステラーゼ阻害薬 [63] やカルシウム感受性増強薬 [94] が、後者にはアドレナリン β 受容体遮断薬 [32]、利尿薬 [1]、そしてアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme, ACE) 阻害薬 [37]、アンジオテンシン II 受容体

阻害薬 (angiotensin II-receptor blocker, ARB) [25]をはじめとする抗レニン・アンジオテンシン系の阻害薬が用いられている。ACE阻害薬や ARB は心臓への前後負荷軽減作用以外に心肥大や線維化などの心リモデリング抑制作用を持ち、心不全の発症・進展を遅らせると考えられている [111]。しかしながら心リモデリングの制御機構については未だ不明な点が多く残されており、現在のところそれを主な標的とした心不全治療戦略は確立されていない。

虚血性心疾患や高血圧性心疾患の発症・進展に伴う心リモデリングにおいて ECM 産生だけではなく matrix metalloproteinases (MMPs) や cathepsins などの ECM 分解酵素の発現と活性も変化する [64]。これら ECM 分解酵素の阻害薬あるいは発現抑制が心不全モデル動物の予後を改善するという報告 [18, 31] があり、ECM の産生と分解が心リモデリングにおいて重要な役割を担う可能性が示唆されている。近年の研究で、ECM 分解酵素の作用により産生される多様な生理活性を持つ ECM 分解断片群 matricryptins が同定されている [83]。多くの matricryptins が抗血管新生作用と抗腫瘍作用を示すことから新規抗腫瘍薬としての応用が期待され、広く研究がなされている [62]。また matricryptins は抗腫瘍作用以外にも抗炎症作用 [7]、抗線維化作用 [93] や抗高血圧作用 [104] などを持つことが報告されており、その幅広い臨床応用の可能性が示唆されている。近年、心疾患患者や心疾患モデル動物において matricryptins の発現レベルが変動することが明らかにされており [47, 48, 66]、なかでも基底膜 ECM 由来の matricryptins に注目が集まっている。

もっとも研究が進んでいる基底膜由来 matricryptin である XVIII 型コラーゲン C 末端断片の endostatin は強力な血管新生阻害作用を持ち [67]、中国の国家食品薬品监督管理局ではそのリコンビナントタンパク質が非小細胞肺癌に対する抗腫瘍薬として既に認可されている [54]。また慢性心不全患者や肺高血圧症患者の血中 [15, 24] または圧負荷誘発心肥大や心筋梗塞モデル動物の心臓組織中において endostatin の発現レベルが増加することが報告されている [21, 35]。ラット心筋梗塞モデルへの endostatin 中和抗体投与が非梗塞領域の心リモデリングを悪化させるという報告 [35] から endostatin が心保護的に働く可能性が示唆されていたが、その詳細な作用機序は全く明らかにされていなかった。これまでに当研究室は endostatin が心線維芽細胞の遊走と増殖を促進することを明らかにし [70]、endostatin が心臓構成細胞において様々な生理活性を示す可能性を提示した。本研究では、endostatin が心筋細胞機能にも影響を及ぼすのではないかという仮説を立て、それを検証することを第一の目的とした。そこで第一章において心肥大や不整脈に関わる T 型 Ca^{2+} チャネル電流に及ぼす endostatin の影響を、モルモット単離心室筋細胞を用いて検討した。

Tumstatin は IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の C 末端断片である。Tumstatin の構造は endostatin と類似しており [26]、強力な抗血管新生作用と抗腫瘍作用を持つ [27]。ウサギ圧負荷誘発心肥大モデルやブタ虚血/再灌流障害モデルの心臓組織において tumstatin 発現が変動することが報告されており [47, 66]、心疾患において何らかの役割を果たしていると考えられるが、その詳細な役割は全く

明らかにされていない。本研究では、tumstatinが endostatinと同様に心臓構成細胞に対して生理活性を持つという仮説を立て、それを検証することを第二の目的とした。そこで第二章では、まず心臓の線維化やリモデリングに重要な役割を持つ心線維芽細胞機能に及ぼす tumstatin の影響を活性断片 T3 peptide を用いて検討した。次に第三章では、H9c2 心筋芽細胞を用いて H₂O₂ 誘導性アポトーシスに及ぼす T3 peptide の影響を検討した。最後に第四章において、虚血/再灌流誘導性心筋障害に及ぼす T3 peptide の影響を *in vitro* および *ex vivo* で検討した。

II. 第一章

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

1. 緒言

マウス血管内皮腫の培養上清から単離された endostatin は XVIII 型コラーゲンの C 末端(アミノ酸 184 残基)の分解により産生される分子量約 20 kDa のポリペプチドである [67]。Endostatin は強力な抗血管新生作用を持つことから抗腫瘍薬として臨床試験が進められ、中国の国家食品薬品监督管理局ではそのリコンビナントタンパク質が非小細胞肺癌に対する抗腫瘍薬として認可されている [54]。近年、循環器疾患患者の血中 endostatin 濃度が上昇すること [15, 24] や、心筋梗塞モデルラットや圧負荷誘発心肥大モデルマウスなどの心疾患モデル動物の心臓組織において endostatin 発現が亢進することが報告されている [21, 35]。このことから endostatin が心疾患の発症・進展に関与する可能性が考えられたが、その心臓における役割は未だ明らかにされていない。

心筋細胞は L 型 Ca^{2+} チャネルと T 型 Ca^{2+} チャネルの 2 種類の電位依存性 Ca^{2+} チャネルを細胞膜上に発現している [36]。L 型 Ca^{2+} チャネルは高電位開口型イオンチャネルであり、主に心筋の収縮作用に関与する [91]。一方、T 型 Ca^{2+} チャネルは低電位開口型イオンチャネルであり、膜電位の脱分極方向への微弱な電位変化によって開口する。成体の心臓における主な T 型 Ca^{2+} チャネル発現部位は洞房結節であり、ペースメーカー電位の発生に関与する [5]。心室筋細胞における T 型 Ca^{2+} チャネル発現は胎生期に認められ、細胞の成熟化に重要な役割を担う [99]。T 型 Ca^{2+} チャネル発現はラット、ネコやイヌなど多くの動物種で成熟後の心室筋細胞において消失する [75] が、例外的にモルモットの心室筋細胞では成熟

後も発現している [61]。また心肥大、心筋梗塞や心不全など病態時の心室筋細胞膜上において T 型 Ca^{2+} チャネルは再発現 [11, 60, 75]し、不整脈や心肥大の発症に関与すると考えられている [10, 98]。

Endostatin はヒト神経膠芽腫細胞株 U87 細胞において T 型 Ca^{2+} チャネル阻害を介して増殖と遊走を抑制することが報告されている [113]。そこで本章では endostatin が心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル阻害作用を持つという仮説を、ホールセル・パッチクランプ法による成熟モルモット心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル活性測定により検証した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 試薬

Recombinant mouse endostatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)。

2-1-2. 使用動物

動物の飼育および取り扱いには北里大学動物実験倫理委員会の審査を経て承認後(承認番号 13-052 および 14-122)、北里大学動物実験委員会規定のガイドラインを遵守して行った。実験には体重 248-602 g の雄性 Hartley 系モルモット(熊谷重安商店、宮城)を使用した。モルモットは使用時まで本学部 9 号館 1 階の小動物飼育室において室温 23.0 ± 2 °C、湿度 50-60% で固形飼料(CR-3, 日本クレア株式会社、東京)を給餌し、自由飲水で飼育した。

2-2. 実験方法

2-2-1. モルモット心室筋細胞の単離

モルモットの体重を測定後、70 mg/kg のペントバルビタールナトリウム(ナカライテスク株式会社、京都)を腹腔内投与することで麻酔した。麻酔下で気管切開を行い、カニューレを挿管してベンチレーター(MODEL SN -480-7, シナノ製作所、東京)による人工換気(換気量 4 cc, 55 回/分)下で開胸し心臓を摘出した。摘出した心臓を Langendorff 灌流装置に設置し、100% O₂ で飽和した 37 °C の normal 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

(HEPES)-Tyrode solution (143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.5 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5.5 mM Glucose, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl₂, 1N NaOH: pH 7.4)を大動脈より逆行性に冠血管に10分間灌流し瀉血した。その後、Ca²⁺-free HEPES-Tyrode solutionを10分間灌流させた後、collagenase [0.02% weight/volume (w/v),和光純薬工業株式会社、大阪]を溶解したCa²⁺-free solutionを30分間灌流した。Collagenase処理後の心臓に高K⁺低Cl⁻液【Kraft-Brühe (KB) solution】 [70 mM KOH, 50 mM L-Glutamic acid, 40 mM KCl, 20 mM Taurine, 20 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂ · 6H₂O, 10 mM Glucose, 1 mM Ethylene glycol bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid (EGTA), 10 mM HEPES, 1 N KOH: pH 7.4]を灌流した。心室筋を鉗で切り取り細切後、KB solution中で軽く振盪することで単離心室筋細胞を得た[74]。細胞浮遊液をナイロンメッシュで濾過し、使用するまで4℃の冷蔵庫内で保存した。

2-2-2. 膜電流の記録

膜電流はパッチクランプ法のホールセルクランプモードで記録した[29]。モルモットの単离心室筋細胞を倒立顕微鏡(IMT-2,オリパス工業株式会社、東京)に装着した灌流槽(容量1 ml)に入れ、Na⁺-K⁺- freeのbath solution [137 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5.4 mM CaCl₂, 20 mM CsCl, 5 mM Glucose, 10 N HCl: pH 7.4]を3 ml/minの速度で表面灌流した。灌流液の温度は36±1℃に保った。ガラスピペットはガラス管(1.5×90 mm, MODEL G-1.5,株式会社ナリシゲ、東京)をプーラー(MODEL PC-10,株式会社ナリシゲ)で引き伸ばして作成した。ガラ

スピペットを pipette solution (125 mM CsOH, 5 mM ATP-Mg, 15 mM EGTA, 20 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 1 N CsOH: pH 7.2) で満たし、パッチ電極とした。パッチ電極の先端(先端径が数 μm)と細胞膜間でギガオームシール(高抵抗接着)を形成した後により強い陰圧をかけることで細胞膜を破りホールセルクランプを形成した。-90 mV または -50 mV の保持電位を与えた後に脱分極刺激を行うことで膜電流(pA)を誘発した。膜電流の測定と記録には Patch/Whole Cell Clamp Amplifier CEZ-2400 (日本光電、東京)と Clampex 6.0 ソフトウェア(Molecular Devices/Axon Instruments, Union City, CA, U.S.A.)を使用した。Endostatin (30, 300 ng/ml)は bath solution に溶解し表面灌流により細胞に処置した。

2-3. 統計処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差で表した。統計処理は *Student's t-test* を行い評価した。危険率 5%未満 ($P < 0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. モルモット単離心室筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネル電流に及ぼす endostatin の影響

保持電位を -50 mV に置き、持続 300 msec の矩形波で -40 mV から 60 mV まで 10 mV 間隔の 11 段階の脱分極刺激を行い、高電位で開口する L 型 Ca^{2+} チャネル電流 (I_{CaL}) を誘発した。Endostatin (300 ng/ml, 5 分間前処置) は I_{CaL} に影響を及ぼさなかった [10 mV, control (Cont): -15.2 ± 2.0 pA/pF, endostatin: -14.8 ± 1.5 pA/pF, $n=11$) (図 1)。

3-2. モルモット単離心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル電流に及ぼす endostatin の影響

T 型 Ca^{2+} チャネル電流 (I_{CaT}) は保持電位 -90 mV から測定した全 Ca^{2+} チャネル電流 (I_{Ca}) と I_{CaL} の差から算出した [95] (図 2A)。算出した電流は T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 NiCl_2 (100 mM) により有意に抑制されたことから (Cont: -1.14 ± 0.20 pA/pF, NiCl_2 : -0.15 ± 0.17 pA/pF, $n=4$, $P < 0.01$ vs. Cont) (図 2A)、 I_{CaT} であることを確認した [50]。続いて I_{CaT} に及ぼす endostatin (300 ng/ml, 5 分間前処置) の影響を検討した。Endostatin は -20 mV をピークとする I_{CaT} を有意に抑制した (Cont: -1.18 ± 0.12 pA/pF, endostatin: -0.75 ± 0.10 pA/pF, $P < 0.05$ vs. Cont, $n=11$) (図 2B)。低濃度 endostatin (30 ng/ml, 5 分間前処置) は I_{CaT} に影響を及ぼさなかった (Cont: -0.85 ± 0.17 pA/pF, endostatin: -0.71 ± 0.16 pA/pF, $n=6$, data not shown)。

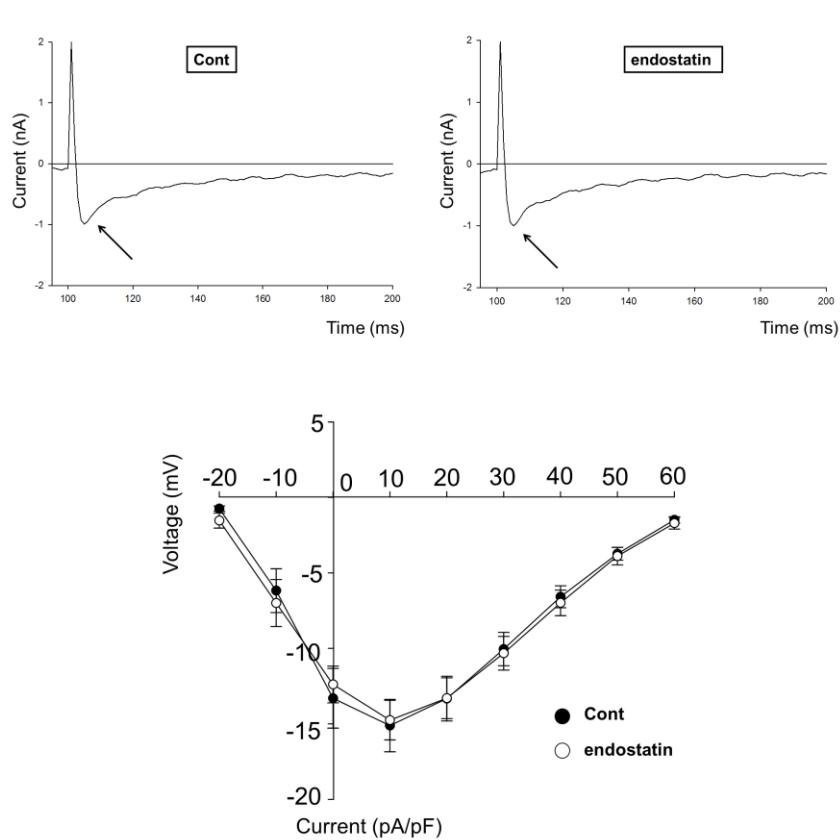


図 1 モルモット単離心室筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネル電流に及ぼす endostatin の影響

(上図)同一細胞における L 型 Ca^{2+} チャネル電流(矢印、刺激電位 10 mV)の典型図[左: control (Cont)、右: endostatin]。

(下図) Endostatin (300 ng/ml, 5 分間前処置)存在下(白丸)あるいは非存在下(黒丸)における電流電圧曲線。電流密度 (pA/pF)は細胞膜容量で補正した。結果は平均値±標準誤差で示した (n=11)。

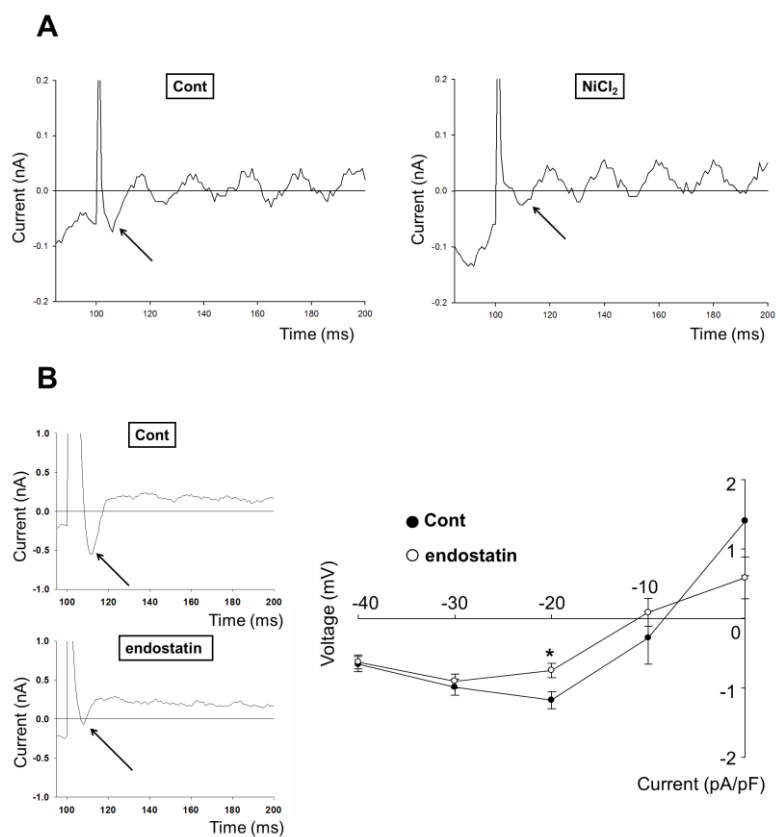


図 2 モルモット単離心室筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル電流に及ぼす endostatin の影響

(A)同一細胞における T 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (矢印、刺激電位 10 mV) の典型図 (左: Cont、右: NiCl_2)。 (B)同一細胞における T 型 Ca^{2+} チャンネル電流 (矢印、刺激電位 10 mV) の典型図 (左上: Cont、左下: endostatin)。 Endostatin (300 ng/ml, 5 分間前処置) 存在下 (白丸) あるいは非存在下 (黒丸) における電流電圧曲線。電流密度 (pA/pF) は細胞膜容量で補正した。結果は平均値 ± 標準誤差で示した (n=11)。

* $P < 0.05$ vs. Cont.

4. 考察

本章では、*matricryptins* の一つである *endostatin* がモルモット単離心室筋細胞膜上に発現する T 型 Ca^{2+} チャンネル電流を抑制することを初めて明らかにした。

Endostatin の血中濃度は健康なヒトでは約 40 ng/ml であり [96]、心筋梗塞や心肥大、心不全などの循環器疾患患者の血中濃度は約 200-300 ng/ml まで上昇する [24]。このことから、本章で用いた *endostatin* の濃度 300 ng/ml は病態生理学的にみて妥当な範囲内にあると言える。

Endostatin はヒト神経膠芽腫細胞株 U87 細胞の I_{CaL} には影響を及ぼさない [113]。また我々は以前、本研究と異なる組成の栄養液を用いたパッチクランプ法により、*endostatin* (300 ng/ml) がモルモット単離心室筋細胞の電位依存性 Ca^{2+} チャンネル電流には影響を及ぼさないことを明らかにしている [110]。したがって本研究において *endostatin* がモルモット心室筋細胞の I_{CaL} に影響を及ぼさなかった結果は、これらの報告と一致していた (図 1)。

I_{Ca} 値から I_{CaL} 値を除いて算出する古典的方法を用いてモルモット心室筋細胞の I_{CaT} を検討したところ、-30 mV から -20 mV でピークを示す微弱な内向き電流が記録された。またこの電流は T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 NiCl_2 処置により抑制された (図 2A)。

Zorn-Pauly らはモルモット心室筋細胞において -20 mV をピークとする NiCl_2 感受性 T 型 Ca^{2+} チャンネル電流を記録しており [115]、本研究で得られた結果と一致していた。*Endostatin* (300 ng/ml) は T 型 Ca^{2+} チャンネル電流を -20 mV において有意に抑制したが、-30 mV

および -40 mV では阻害せず、endostatin 処置下の I_{CaT} は -30 mV がピークであった(図 2B)。Bladen と Zamponi は $Na_v1.8$ 阻害薬 A803467 が tsA-201 細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネルを I_{CaT} の 50% 活性電位とピーク電流のシフトを伴って阻害すると報告している [4]。このことから、endostatin による I_{CaT} 阻害においても同様のピーク電流の過分極シフトが見られたのではないかと考えられる。

Endostatin は循環器疾患患者の血中濃度に近い 300 ng/ml において I_{CaT} を阻害したが、正常血中濃度に近い 30 ng/ml では影響を及ぼさなかった。このことから、心疾患病態において発現亢進する endostatin は心筋細胞に再発現する T 型 Ca^{2+} チャンネル活性を抑制する可能性が示唆された。T 型 Ca^{2+} チャンネルの 3 つの $\alpha 1$ -サブユニットをそれぞれ過剰発現させた HEK293 細胞において endostatin は 3 つの $\alpha 1$ サブユニットのうち $Ca_v3.3$ 活性には影響を及ぼさないが、 $Ca_v3.1$ と $Ca_v3.2$ の活性を抑制する [113]。心室筋細胞に発現する T 型 Ca^{2+} チャンネルは $Ca_v3.1$ と $Ca_v3.2$ であり、 $Ca_v3.2$ は心肥大発症に関与する [75]。また T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 efonidipine は、拡張型心筋症モデルである dominant-negative form of neuron-restrictive silencer factor トランスジェニックマウスにおいて不整脈や突然死を抑制する [42]。以上のことから、endostatin による T 型 Ca^{2+} チャンネル活性阻害は心保護作用に関わる可能性が示唆された。本章では endostatin の詳細な T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害機序を明らかにすることは出来なかったが、U87 細胞において endostatin は T 型 Ca^{2+} チャンネルを直接阻害している可能性が示唆されており [113]、今後更なる検討が必要である。

結論として、本章は XVIII 型コラーゲン分解断片 endostatin がモルモット心室筋細胞の 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。我々のグループの最近の研究において、endostatin がモノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットの肥大右心室において再発現する T 型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制することを明らかにした [34]。また small interfering RNA 投与による endostatin 発現抑制がモノクロタリン誘発肺高血圧症の右心不全を悪化させることも明らかにしている [34]ことから、endostatin が T 型 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は高いと考えられる。

III. 第二章

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

1. 緒言

心線維芽細胞は心臓を構成する主要な間葉系細胞であり、ECMネットワークの維持によって心臓の恒常性維持に寄与している[3, 77]。また心筋梗塞や心肥大などの心疾患発症時の心リモデリングにおいては、増殖、遊走、 α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞への分化、MMPsやコラーゲンの産生亢進などを介して創傷治癒に重要な役割を果たしている[38, 77]。例えば心筋梗塞後早期の創傷治癒過程において、心線維芽細胞は様々な炎症性反応に応答して梗塞領域に遊走し、増殖することが知られている[38, 90]。一方で過剰なコラーゲン蓄積の亢進は心臓線維症を引き起こし、弾性を失った心臓は心不全に陥る[56]。このように、心線維芽細胞機能の変化と心リモデリングには密接な関係があるため、心不全治療の重要な治療標的と成り得る。

Tumstatinは血管基底膜を構成するIV型コラーゲン $\alpha3$ 鎖が主にMMP-9により分解され産生される分子量約28 kDaのC末端フラグメントであり[28]、 $\alpha_v\beta_3/\alpha_3\beta_1$ インテグリンに結合することにより腫瘍における血管新生を抑制することが知られている[27]。またtumstatin活性断片のT3 peptide (69-88 アミノ酸残基)とT7 peptide (74-98 アミノ酸残基)は血管内皮細胞の増殖抑制やアポトーシス促進作用といった全長tumstatinと同様の生理活性を持つ[57]。心臓におけるIV型コラーゲン $\alpha3$ 鎖RNA発現は少ない[59]が、ウサギ圧負荷誘発心肥大モデルやブタ虚血/再灌流障害モデルの心臓組織におけるECM分解に伴いtumstatinタンパク質発現レベルが変化することが報告されている[47, 66]。このことから

tumstatin と心疾患との関連が示唆されているが現在のところ全く検討されていない。

当研究室は endostatin が心線維芽細胞の増殖と遊走を [70]、IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖分解断片 canstatin が心線維芽細胞の遊走を亢進すること [71] を明らかにした。そこで本章では tumstatin が心線維芽細胞の増殖と遊走能を調節するという仮説を、ラット心線維芽細胞機能に及ぼす tumstatin 活性断片 T3 peptide の影響を調べることにより検証した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用薬物

2-1-1. 試薬

Recombinant human T3 peptide (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, U.S.A.), LY294002 (和光純薬工業株式会社), cilengitide (Adooq Bioscience, Irvine, CA, U.S.A.)および interleukin (IL)-1 β (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, U.S.A.)。

2-1-2. 一次抗体

Anti-vimentin, anti-total-actin (Sigma Aldrich), anti-CD31 (DAKO, Gloustrup, Denmark), anti-collagen type I (Rockland, Philadelphia, PA, U.S.A.), anti-MMP-2 (協和ファーマケミカル株式会社、富山), anti-MMP-9 (EMDMillipore, Billerica, MA, U.S.A.), anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-p70S6K (Thr389), anti-total-Akt, anti-total-p70S6K (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.)および anti-tumstatin (Bioass Antibodies, Woburn, MA, U.S.A.)。

2-1-3. 二次抗体

Alexa 488 goat anti-mouse IgG, Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody および anti-mouse IgG horseradish peroxidase whole antibody (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.)。

2-2. 実験方法

2-2-1. 心線維芽細胞の単離培養法

動物の飼育および取り扱いには北里大学動物実験倫理委員会の審査を経て承認後(承認番号 15-047 および 16-057)、北里大学動物実験委員会規定のガイドラインを遵守して行った。実験には 4-8 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア株式会社)を使用し、本学部 9 号館の小動物飼育室において室温 22.0 ± 2 °C、湿度 50-60%、点灯時間 12 時間(午前 7 時～午後 7 時)で、固形飼料(CE2,日本クレア株式会社)を給餌し、自由飲水で飼育した。ペントバルビタールナトリウム(ナカライテスク株式会社)腹腔内投与(50-100 mg/kg)により深麻酔下においたラット頸部を切開し、気管カニューレを挿入した。ベンチレーター(MODEL SN-480-7,シナノ製作所)で送気下に胸部を切開し、心臓を摘出した。摘出した心臓を Langendorff 灌流装置に設置し、100% O₂ で飽和した 37 °C の normal HEPES-Tyrode solution を大動脈より逆行性に冠血管に灌流し瀉血した。その後、collagenase (0.02% w/v,和光純薬工業株式会社)を含む HEPES-Tyrode solution を 20-30 分間灌流した。Collagenase 処理後、心室組織を鉗で切り取り細切し、0.5% fetal bovine serum (FBS, Gibco/Life Technologies または HyClone/GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.)および抗生物質-抗真菌薬(100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B,ナカライテスク株式会社)添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 和光純薬工業株式会社) 40 ml に懸濁した。細胞懸濁液を 5 分間、1500 rpm、4 °C で遠心分離した。上清除去後 10% FBS 加 DMEM に再懸濁した細胞浮遊液を 2%ゼラチンでコーティングし

た 100 mm ディッシュに播種した。CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) 内で 90-120 分間培養し、浮遊細胞を除去した後に定着した細胞を培養した [69]。単離細胞は 1 代目から 5 代目まで継代培養し実験に用いた。細胞増殖能の検討では細胞密度が 30-50% になったもの、それ以外は細胞密度が 90% 以上になったものを 0.5% FBS 加 DMEM で 24 時間血清飢餓状態にした後に実験に使用した。

単離細胞の同定は免疫蛍光染色法を用いて行った。6 well プレートで培養した細胞を血清飢餓状態にした後、Tris buffered saline (TBS: pH 7.4) で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを用いて 4 °C で 10 分間固定した。TBS で 3 回洗浄後、0.2% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) を常温で 1 分間処置し脱膜化した。TBS で 3 回洗浄後、5% 正常ヤギ血清で 1 時間ブロッキングし、vimentin、collagen type I そして CD31 に対する一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。TBS で洗浄後、Alexa 蛍光色素で標識した二次抗体を室温で 1 時間反応させた後 TBS で洗浄した。さらに、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (同仁化学研究所、熊本) を室温で 5 分間反応させ核染色を行った後、蛍光顕微鏡 (BX-51, オリンパス工業株式会社) を用いて観察した。単離細胞は間葉系細胞マーカーの vimentin および線維芽細胞が産生する主要 ECM の collagen type I に強陽性で、内皮細胞マーカーの CD31 に陰性だった。これは以前に報告された心線維芽細胞の特性 [51] と一致していたことから、単離細胞が線維芽細胞であることが確認された。

2-2-2. 細胞増殖能の測定 (Cell counting assay)

心線維芽細胞の生細胞数を測定するために cell counting kit-8 (CC8, 同仁化学研究所) を用いて cell counting assay を行った [70]。6 well 細胞プレートに播種した心線維芽細胞の細胞密度が 30-50% になったところで 0.5% FBS 加 DMEM で 24 時間血清飢餓状態にした。T3 peptide (30-1000 ng/ml) で 24 時間刺激し、TBS で洗浄した後に CC8 試薬 (25 μ l/0.5 ml 培地) を加え、37 °C、5% CO₂ 下で 1 時間静置した。マイクロプレートリーダー (Tristar, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いて培地の吸光度 (485 nm) を測定した。

2-2-3. 細胞遊走能の測定

Transwell (メンブレンのポアサイズ: 8.0 μ m, Corning Incorporated, AZ, U.S.A.) の上部、下部を 2%ゼラチン(和光純薬株式会社)でコーティング (37 °C, 30 分間) した。1.0 \times 10⁵ 個/100 μ l の細胞を各 well 上部に播種し、T3 peptide (30, 300 ng/ml) を well 下部に処置して 37 °C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。なお、阻害薬は well の上部と下部に 30 分間前処置した。培養後、チャンバーに 100%メタノールを加え 15 分間室温で固定した後、20 倍希釈ギムザ染色液(ナカライテスク株式会社)で染色した。メンブレン上部の細胞を綿棒でこすり取った後、スライドグラスに乗せて、メンブレン下部を顕微鏡 (CKX-41, オリンパス工業株式会社) に接続したカメラ (True Chrome II plus: Terratechenos, 東京) を用いて、100 倍の視野でランダムに 3 箇所撮影し、遊走細胞数を対照群の細胞数で標準化してグラフ化した [70]。

2-2-4. Western blotting

T3 peptide で刺激した心線維芽細胞を TBS で洗浄後、氷上で 0.1% protease inhibitor mixture (ナカライテスク株式会社) 添加 lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerol phosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin)(Cell Signaling Technology) を 10 分間処置し可溶化して遠心分離後 (13000 rpm, 4 °C, 10 分間)、細胞タンパク質抽出液を得た。タンパク質濃度は、bicinchoninic acid 法 (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) を用いて定量した。等量のタンパク質抽出液 (10 μg) を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis で分離した (80-120 V, 1.5-2 時間) 後、ニトロセルロース膜 (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, U.S.A.) に転写した (400 mA, 1.5 時間)。転写膜を 3% ウシ血清アルブミン (抗リン酸化抗体を用いる場合) または 0.5% スキムミルク (抗 total タンパク質抗体を用いる場合) でブロッキングした後、各種一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。転写膜に結合した一次抗体はペルオキシダーゼ標識二次抗体 (10,000 倍希釈, 45 分間) と EZ-ECL 試薬 (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) を用いて可視化し ATTO light capture system (AE-6972, ATTO 株式会社、東京) により検出した。タンパク質のイコールローディングは抗 total-actin 抗体またはそれぞれのリン酸化タンパク質に対する抗 total タンパク質抗体で確認した。可視化したバンドは CS Analyzer 3.0 software (ATTO 株式会社) を用いて定量・解析した [70]。

2-2-5. 心筋梗塞(Myocardial infarction, MI)モデル作製

ラットの体重を測定後、イソフルラン(和光純薬工業株式会社)麻酔下(流量: 2L/分、導入: 5%、維持: 2.5%)で気管内挿管を行い、ベンチレーター(MODEL SN-480-7, シナノ製作所)を用いて人工換気(換気量: 5 cc/回、呼吸数: 80 回/分)を行った。術野を剃毛・消毒し、開胸手術を行った。左胸部第 3-4 肋間より開胸し、左肺と胸腺を避けて心臓を露出した。心膜の一部を切開し、左心耳直下の左冠動脈前下行枝を 6-0 ナイロン糸で結紮し血流を遮断することにより、心筋梗塞(MI)モデルを作製した。なお、偽手術(SHAM)では心膜の切開までは同様の手技で行ったが、冠動脈の結紮は行わなかった。閉胸後、術後鎮痛薬としてブプレノルフィン塩酸塩(大塚製薬株式会社、東京)を背部皮下に投与した(0.005 mg/100 g) [92]。MI モデルラットは術後 14 日間飼育後、ペントバルビタールナトリウム(ナカライテスク株式会社)深麻酔下(100 mg/kg, 腹腔内投与)で心臓を摘出し、梗塞領域(SHAM の場合は MI モデルの梗塞領域に対応する左心室組織)を切り取り、タンパク質を抽出して 2-2-4. Western blotting に用いた。

2-3. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価は分散分析【one-way analysis of variance (ANOVA)】を行った後に、*Dunnet's test* (図 3-6)、*Bonferroni's test* (図 7-9)あるいは *Student's t-test* (図 10)を行い評価した。危険率 5%未満($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. 心線維芽細胞の増殖能に及ぼす T3 peptide の影響

初めに位相差顕微鏡による細胞形態観察により、T3 peptide が単独で心線維芽細胞に毒性を示すかを検討した。細胞障害像の陽性対照として用いた炎症性サイトカイン IL-1 β (10 ng/ml, 48 時間) 刺激は細胞の円形化と脱落を特徴とする顕著な細胞障害性を示した。一方、T3 peptide (10-300 ng/ml, 48 時間) 刺激は細胞形態に影響を及ぼさなかった (n=6, data not shown)。次に cell counting assay により T3 peptide が心線維芽細胞の増殖能に及ぼす影響を検討した。T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間) 刺激は心線維芽細胞の増殖を有意に亢進した ($118.2 \pm 6.3\%$, $P < 0.05$ vs. Cont, n=11) (図 3)。

3-2. 心線維芽細胞の遊走能に及ぼす T3 peptide の影響

次に心線維芽細胞の遊走能に及ぼす T3 peptide の影響を Boyden chamber assay により検討した。T3 peptide (30, 300 ng/ml, 24 時間) 刺激は心線維芽細胞の遊走能を有意に亢進した (T3 peptide 30 ng/ml: $174.4 \pm 13.5\%$, $P < 0.01$, T3 peptide 300 ng/ml: $150.1 \pm 21.0\%$, $P < 0.05$ vs. Cont, n=8) (図 4)。次に心線維芽細胞の遊走に重要な役割を果たすことが知られる MMP-2 および MMP-9 [6, 72] のタンパク質発現を Western blotting により検討した。陽性対照として用いた IL-1 β (10 ng/ml, 48 時間) 刺激は顕著に MMP-2 および MMP-9 発現を増加させたが、T3 peptide (10-300 ng/ml, 48 時間) はこれらに影響を及ぼさなかった (n=5) (図 5)。

3-3. 心線維芽細胞における Akt リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/Akt シグナル経路は心線維芽細胞の増殖と遊走に重要な役割を果たすことが知られている [17, 19, 97]。そこで心線維芽細胞における Akt リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響を Western blotting により検討した。T3 peptide (300 ng/ml, 30 分) 刺激は Akt リン酸化を有意に亢進した ($153.6 \pm 16.0\%$, $P < 0.05$ vs. 0 min, $n=4$) (図 6A)。また。T3 peptide (10-300 ng/ml, 30 分) は 300 ng/ml をピークとして Akt リン酸化を濃度依存的に亢進した ($139.0 \pm 12.0\%$, Cont: $n=13$, 10 ng/ml: $n=14$, 30 ng/ml: $n=17$, 300 ng/ml: $n=13$) (図 6B)。一方、80°C、20 分間加熱して熱変性させた T3 peptide (300 ng/ml, 30 分) は Akt リン酸化に影響を及ぼさなかった ($n=4$, data not shown)。

3-4. T3 peptide 誘導性細胞増殖および遊走に及ぼす PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 の影響

T3 peptide 誘導性細胞増殖および遊走が Akt 活性化を介するかを PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 (10 μ M, 30 分間前処置) を用いて検討した。T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間) 誘導性細胞増殖 ($132.6 \pm 7.4\%$, $P < 0.01$ vs. Cont) を LY294002 は有意に抑制した ($108.5 \pm 9.5\%$, $P < 0.05$ vs. T3 peptide-alone treatment, Cont: $n=6$, T3 peptide-alone treatment: $n=8$, LY294002+T3 peptide: $n=7$) (図 7A)。また T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間) 誘導性細胞遊走 ($189.3 \pm 4.6\%$, $P < 0.01$ vs. Cont) を LY294002 は有意に抑制した ($47.6 \pm 8.6\%$, $P < 0.01$ vs. T3 peptide alone-treatment, $n=5$) (図 7B)。

3-5. 心線維芽細胞における p70S6K リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響

T3 peptide が Akt シグナル経路下流の p70S6K の活性化に及ぼす影響を検討した。T3 peptide (300 ng/ml, 30 分) は Akt のリン酸化および p70S6K のリン酸化を有意に亢進した (Akt; T3 peptide alone-treatment: $167.5 \pm 22.0\%$, $P < 0.01$ vs. Cont, n=9, p70S6K; T3 peptide alone-treatment: $198.3 \pm 34.9\%$, $P < 0.01$ vs. Cont, n=9)。LY294002 (10 μ M, 30 分間前処置) は T3 peptide 誘導性 Akt および p70S6K リン酸化を有意に抑制した (Akt; LY294002+T3 peptide: $6.9 \pm 2.2\%$, $P < 0.01$ vs. T3 peptide alone-treatment, n=9, p70S6K; LY294002+T3 peptide: $1.2 \pm 0.5\%$, $P < 0.01$ vs. T3 peptide alone-treatment, n=9) (図 8)。

3-6. T3 peptide 誘導性 Akt リン酸化と細胞増殖に及ぼす $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide の影響

次に T3 peptide による Akt リン酸化の機序を $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide (1 μ M, 30 分間前処置) を用いて検討した。Cilengitide は T3 peptide (300 ng/ml, 30 分) 誘導性 Akt リン酸化を抑制した (T3 peptide-alone treatment: $144.2 \pm 15.2\%$, $P < 0.05$ vs. Cont, cilengitide+T3 peptide: $111.1 \pm 12.7\%$, n=6) (図 9A)。また cilengitide は T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間) 誘導性心線維芽細胞の増殖を有意に抑制した (T3 peptide-alone treatment: $126.7 \pm 6.1\%$, $P < 0.01$ vs. Cont, cilengitide+T3 peptide: $109.3 \pm 6.0\%$, $P < 0.05$ vs. T3

peptide-alone treatment, Cont: n=10, T3 peptide-alone treatment: n=15, cilengitide+T3 peptide: n=15) (図 9B)。

3-7. MI モデルラットの梗塞領域における tumstatin 発現

最後に、MI モデルラットの梗塞領域における tumstatin タンパク質発現レベルを Western blotting により検討した。Tumstatin 発現は偽手術ラット (SHAM) と比較して MI モデルラット (術後 2 週間) の梗塞領域で有意に減少した (MI: $13.1 \pm 6.7\%$, $P < 0.05$ vs. SHAM, SHAM: n=4, MI: n=5) (図 10)。

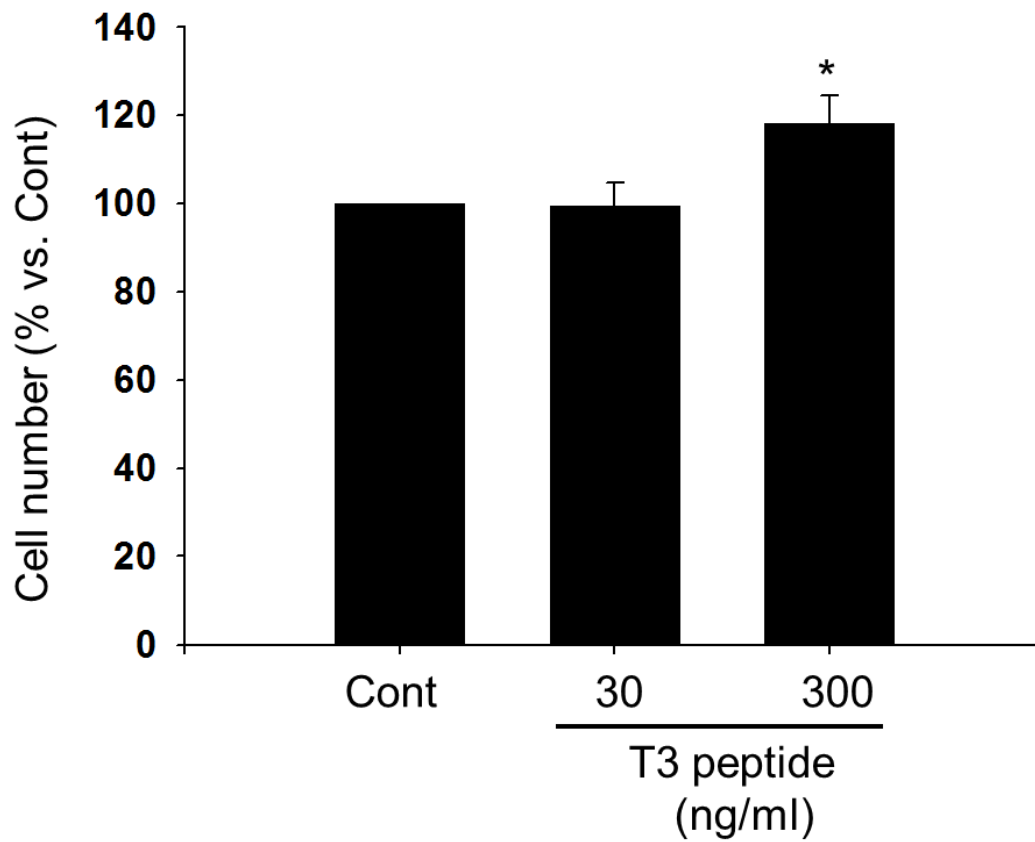


図3 ラット心線維芽細胞の増殖能に及ぼす T3 peptide の影響
 50-60%コンフルエントの心線維芽細胞を溶媒(Milli-Q水)あるいは
 T3 peptide (30, 300 ng/ml, 24時間)で刺激した。Cell counting
 assayは cell counting kit-8を用いた比色法により行った。溶媒処
 置群(Cont)で補正した細胞数を平均値±標準誤差で示した(n=11)。
 * $P < 0.05$ vs. Cont。

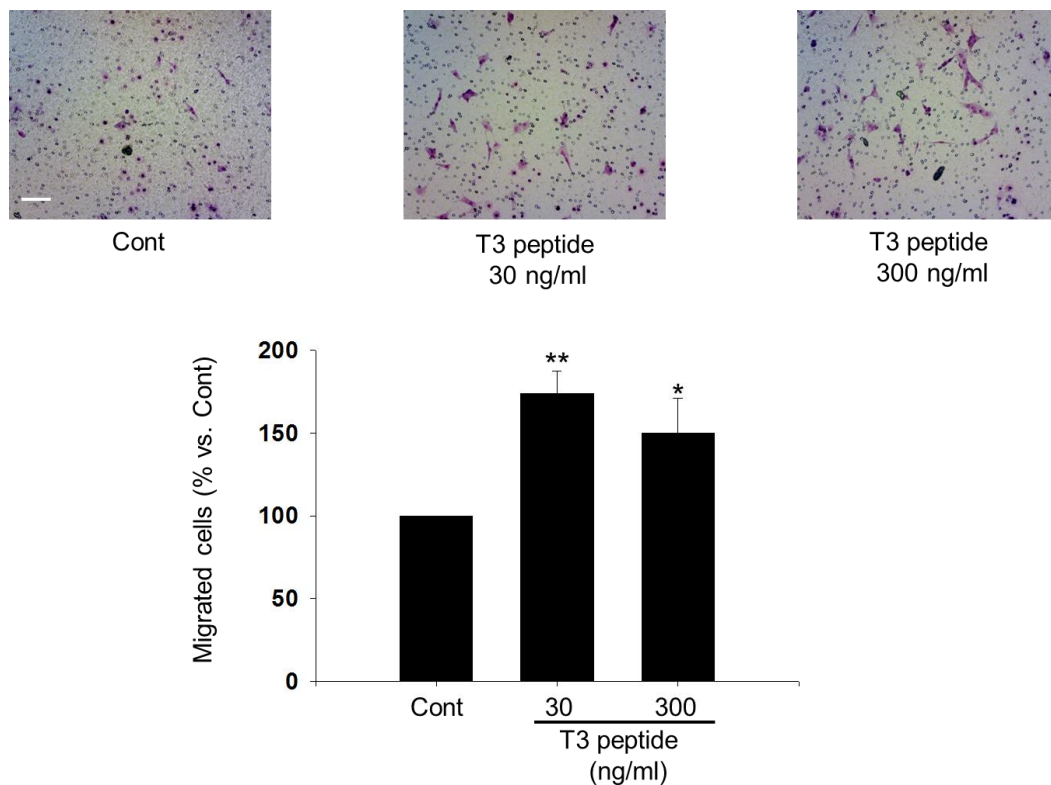


図 4 ラット心線維芽細胞の遊走能に及ぼす T3 peptide の影響
Transwell を用いた Boyden chamber assay により細胞遊走を検討した。 1.0×10^5 個の心線維芽細胞を upper chamber に播種し、溶媒 (Cont) あるいは T3 peptide (30, 300 ng/ml, 24 時間) を bottom well に処置した。

(上図) 代表的なギムザ染色後の遊走細胞像。スケールバーは 100 μm を表す。

(下図) Cont で補正した細胞数を平均値 \pm 標準誤差で示した (n=8)。

*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. Cont。

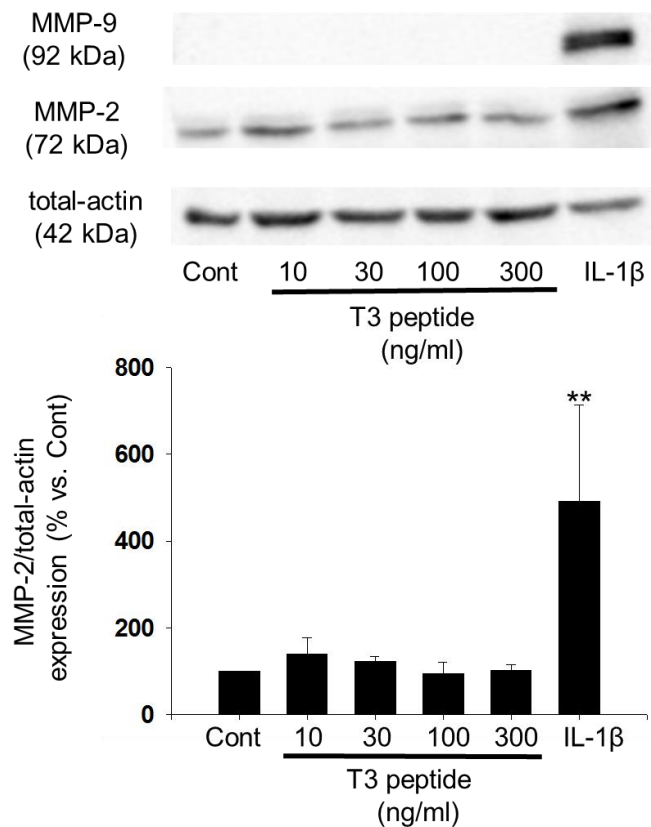


図 5 ラット心線維芽細胞における matrix metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9 発現に及ぼす T3 peptide の影響
T3 peptide (10-300 ng/ml, 48 時間)あるいは interleukin (IL)-1β (10 ng/ml, 48 時間)で刺激後、心線維芽細胞からタンパク質を抽出した。MMP-2, MMP-9 および total-actin の発現を Western blotting で検討した。

(上図)代表的な MMP-2, MMP-9 および total-actin のプロット像。
(下図) MMP-2 発現レベルは total-actin 発現で補正した値を Cont に対する比で表し平均値±標準誤差で示した (n=5)。

** $P < 0.01$ vs. Cont.

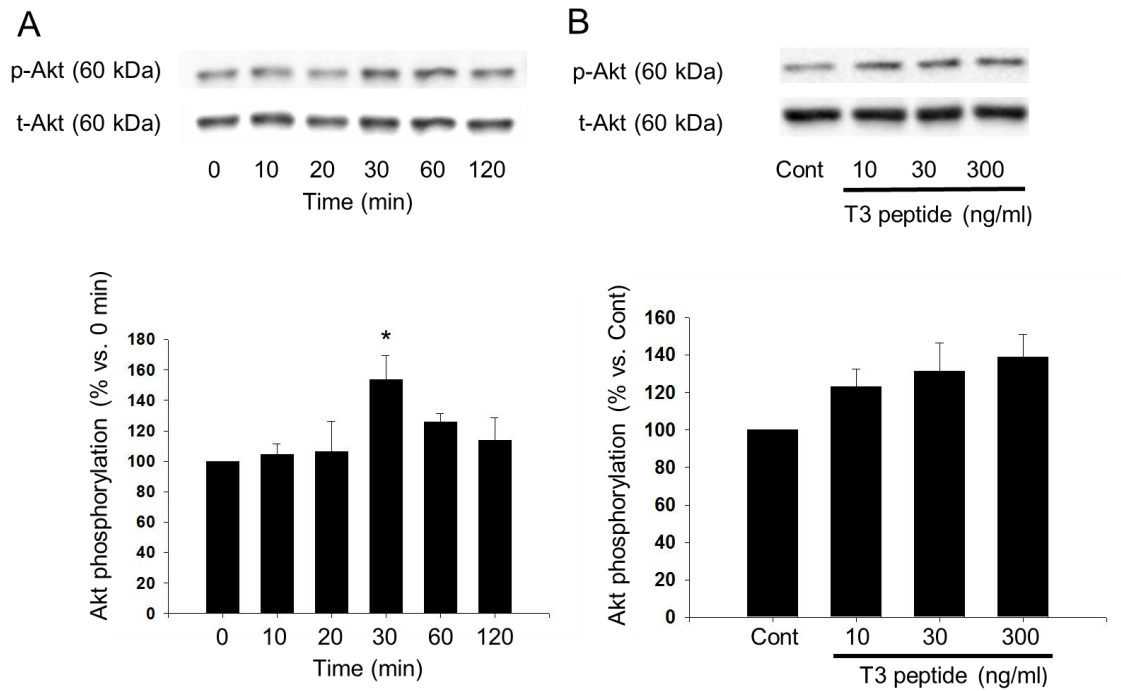


図 6 ラット心線維芽細胞における Akt リン酸化に及ぼす T3 peptide の影響

心線維芽細胞を T3 peptide [300 ng/ml, 0-120 分間(A)あるいは 10-300 ng/ml, 30 分間(B)]で刺激後、タンパク質を抽出した。Akt (Ser473)のリン酸化(p-Akt)および total-Akt (t-Akt)発現を Western blotting で検討した。

(A, B 上図)代表的な p-Akt および t-Akt のプロット像。

(A, B 下図) p-Akt レベルを t-Akt で補正した値を Cont に対する比で表し平均値±標準誤差で示した(A: n=4, B: Cont: n=13, 10 ng/ml: n=14, 30 ng/ml: n=17, 300 ng/ml: n=13)。

* $P < 0.05$ vs. Cont。

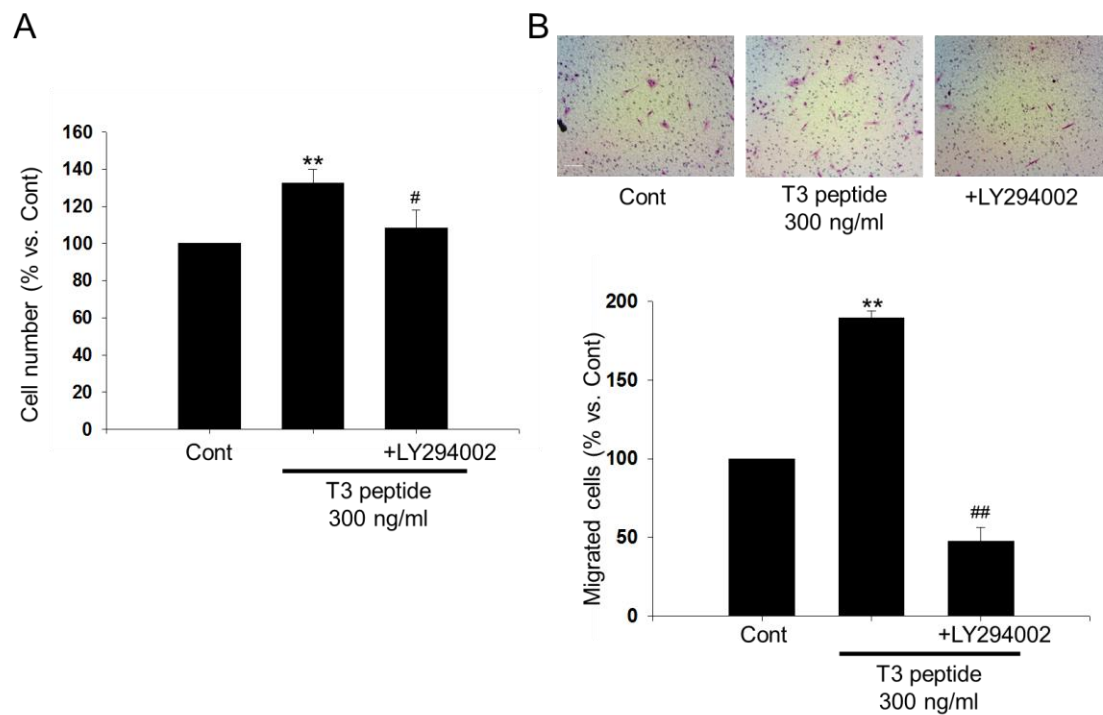


図 7 ラット心線維芽細胞の T3 peptide 誘導性増殖および遊走に及ぼす phosphoinositide 3-kinase/Akt 阻害薬 LY294002 の影響

(A)心線維芽細胞を LY294002 (10 μ M, 30 分間前処置)存在下もしくは非存在下で溶媒(Cont)あるいは T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間)で刺激した。Cell counting assay は cell counting kit-8 を用いて行った。Cont で補正した細胞数を平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont: n=6, T3 peptide-alone treatment: n=8, LY294002+T3 peptide: n=7)。** $P < 0.01$ vs. Cont、# $P < 0.05$ vs. T3 peptide-alone treatment。

(B)細胞遊走は Boyden chamber assay により検討した。1.0 \times 10⁵ 個の心線維芽細胞を upper chamber に播種し、溶媒(Cont)あるいは T3 peptide (300 ng/ml、24 時間)を bottom well に処置した。LY294002 (10 μ M、30 分間前処置)は T3 peptide 刺激の 30 分前に upper well と bottom well の両方に処置した。

(上図)代表的な遊走細胞のギムザ染色像。スケールバーは 100 μm を表す。

(下図) Cont で補正した細胞数を平均値 \pm 標準誤差で示した (n=5)。

** $P < 0.01$ vs. Cont、## $P < 0.01$ vs. T3 peptide-alone treatment。

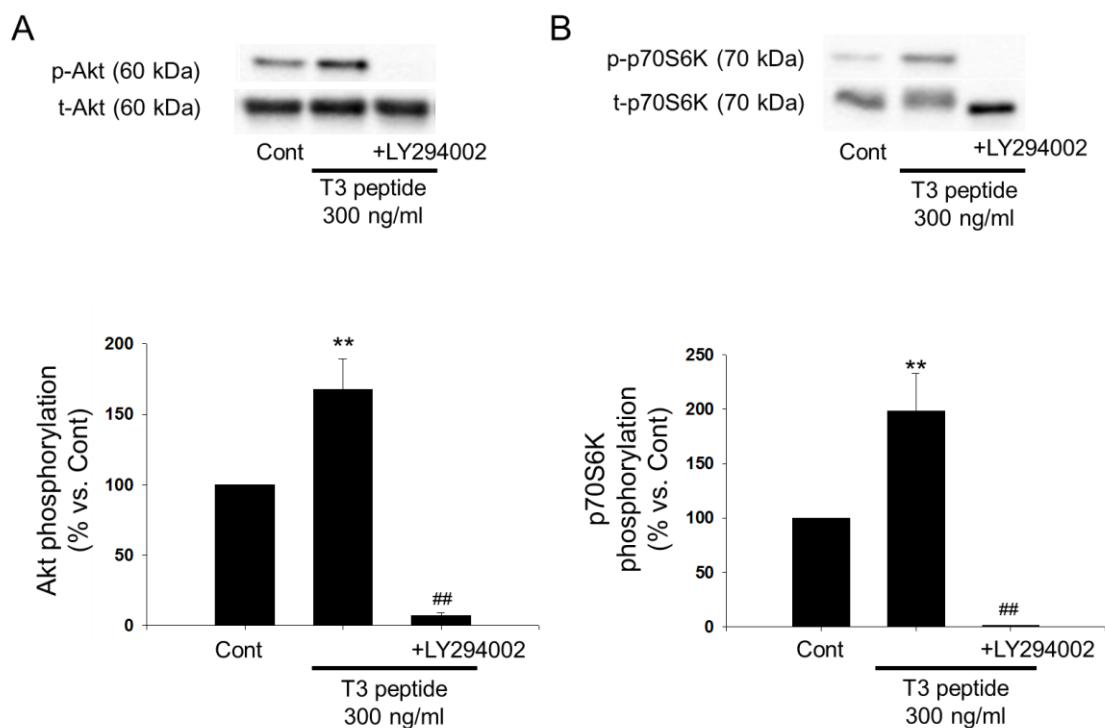


図 8 ラット心線維芽細胞における Akt と p70S6K の活性化に及ぼす T3 peptide の影響とそれに対する LY294002 の作用

LY294002 (10 μ M, 30 分間前処置)存在下もしくは非存在下で心線維芽細胞を溶媒(Cont)あるいは T3 peptide (300 ng/ml, 24 時間)で刺激しタンパク質を抽出した。p-Akt (Ser473)と p70S6K のリン酸化(p-p70S6K)および t-Akt と total-p70S6k (t-p70S6K)発現を Western blotting で検討した。

(A, B 上図)代表的な p-Akt, t-Akt, p-p70S6K および t-p70S6K ブロット像。

(A, B 下図) p-Akt, p-p70S6K レベルを t-Akt, t-p70S6K で補正した値を Cont に対する比で表し平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。

** $P < 0.01$ vs. Cont、## $P < 0.01$ vs. T3 peptide-alone treatment.

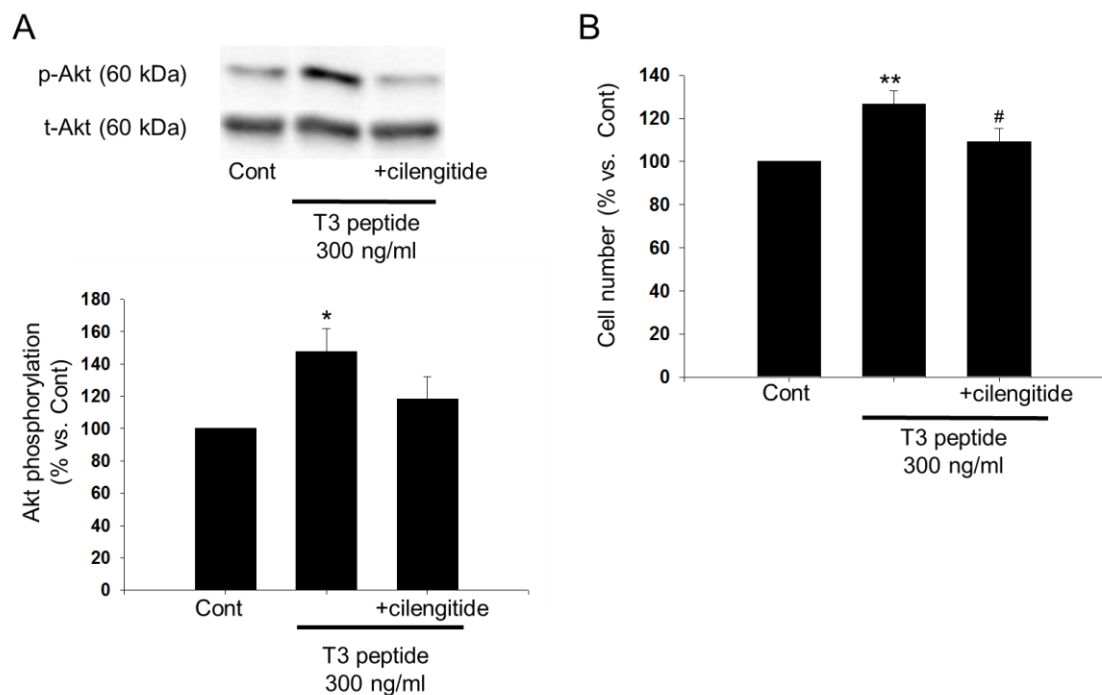


図9 T3 peptide誘導性ラット心線維芽細胞Aktリン酸化および増殖に及ぼす $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬cilengitideの影響

(A) Cilengitide (1 μ M, 30 分間前処置)存在下もしくは非存在下で心線維芽細胞を溶媒(Cont)あるいはT3 peptide (300 ng/ml, 24 時間)で刺激しタンパク質を抽出した。p-Akt (Ser473)およびt-Akt発現をWestern blottingで検討した。

(上図)代表的なp-Aktおよびt-Aktのプロット像。

(下図)p-Aktレベルをt-Aktで補正した値をContに対する比で表し平均値 \pm 標準誤差で示した(n=6)。* $P < 0.05$ vs. Cont。

(B)心線維芽細胞をcilengitide (1 μ M, 30 分間前処置)存在下もしくは非存在下で溶媒(Cont)あるいはT3 peptide (300 ng/ml, 24 時間)で刺激した。Cell counting assayはcell counting kit-8を用いて行った。Contで補正した細胞数を平均値 \pm 標準誤差で示した(Cont: n=10, T3 peptide-alone treatment, cilengitide+T3 peptide: n=15)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. T3 peptide-alone treatment.

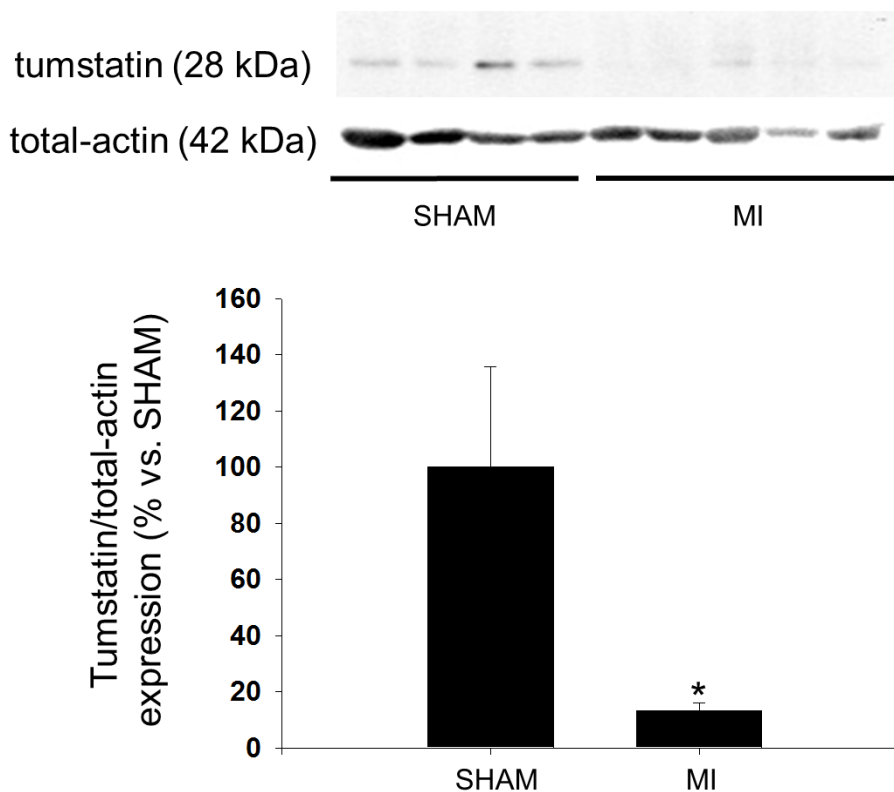


図 10 ラット心筋梗塞モデルの梗塞領域における tumstatin 発現
ラットの左冠動脈前下行枝を結紮し心筋梗塞モデルを作製した。
偽手術は開胸のみ行った。2週間後に心筋梗塞モデルラット
(Myocardial infarction, MI)と偽手術ラット (SHAM)から左心室組
織を摘出し、タンパク質を抽出して Western blotting を行った。
(上図)代表的な tumstatin および total-actin のプロット像。
(下図) Tumstatin 発現レベルを total-actin 発現で補正した値を
SHAM に対する比で表し平均値±標準誤差で示した (SHAM: n=4,
MI: n=5)。* $P < 0.05$ vs. SHAM。

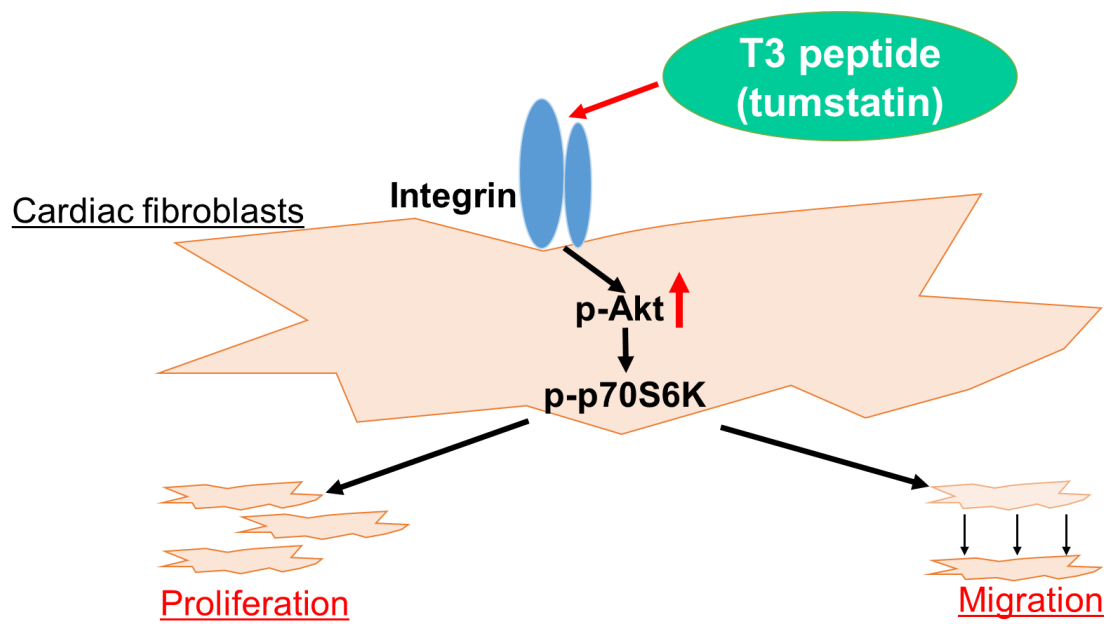


図 11 モデル

Tumstatin 活性断片である T3 peptide はラット心線維芽細胞においてインテグリンへの結合を介して Akt/p70S6K シグナル経路を活性化することで増殖と遊走能を亢進する。

4. 考察

本章では、tumstatin 活性断片 T3 peptide がインテグリン /PI3K/Akt 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(図 11)。

Tumstatin は IV 型コラーゲン α 3 鎖の C 末端フラグメントである(分子量約 28 kDa)。Tumstatin の正常マウス血中濃度は 336 ± 28 ng/ml であると報告されている[28]。T3 peptide は 245 個のアミノ酸からなる tumstatin の 69-88 番アミノ酸残基で分子量約 2.4 kDa である。よってモル濃度に換算すると約 12 分の 1 量であり、T3 peptide ~30 ng/ml が tumstatin の血中濃度に相当すると考えられる。Tumstatin は MMP-9 などにより IV 型コラーゲン α 3 鎖が分解され産生されるため、局所における tumstatin 濃度は血中濃度を大きく上回る可能性も考えられる。このことから、本研究で用いた 10-300 ng/ml という T3 peptide の濃度は生理的または病態生理的に見て妥当な範囲内にあると考えられる。

本研究において T3 peptide は心線維芽細胞の細胞形態に影響を及ぼさず、細胞障害性を示さなかった。これまでに、Wang らは tumstatin が非小細胞肺癌において Akt リン酸化を阻害することにより増殖を抑制することを明らかにした[100]。また、T3 peptide が血管内皮細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導することも報告されており[57]、本研究結果とは異なり tumstatin は細胞障害性を示すことが示唆される。この違いの要因の一つに T3 peptide の用量の違いが挙げられる。内皮細胞の増殖抑制や細胞死誘導作用を示す T3 peptide 濃度は 2.5-10 μ g/ml と非常に高い[27, 57]。一方、

本研究で用いた 10-300 ng/ml はこれらの報告と比べて極めて低い
ため、細胞障害性を示さなかった可能性が考えられる。もう一つ
の要因としては細胞種の違いが挙げられ、内皮細胞と線維芽細胞
では T3 peptide に対する反応性が異なる可能性も考えられた。

本研究において T3 peptide は心線維芽細胞における増殖能と遊
走能を有意に亢進した(図 3, 4)。心線維芽細胞は様々な MMPs を
産生するが、MMP-2 や MMP-9 が心線維芽細胞の遊走に重要な役
割を果たすことが知られている [71, 87, 101]。しかしながら本研
究では T3 peptide は MMP-2 および MMP-9 発現に影響を及ぼさな
かった(図 5)ことから、T3 peptide 誘導性遊走はこれら MMPs を介
さない可能性が示唆された。当研究室ではこれまでに endostatin
が Akt 活性化を介してラット心線維芽細胞の遊走能を亢進するこ
とを明らかにしている [70]。また線維芽細胞の増殖と遊走に
Akt/p70S6K シグナル経路が関与していることが報告されている
[53, 80]。本研究では、心線維芽細胞における Akt および p70S6K
のリン酸化を T3 peptide が有意に亢進した(図 6, 8)。さらに、
PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 は T3 peptide 誘導性細胞増殖および遊
走を有意に抑制した(図 7)。T3 peptide による Akt の活性化機構と
しては、受容体である $\alpha_v\beta_3/\alpha_3\beta_1$ インテグリンを介した focal
adhesion kinase/PI3K/Akt 経路の活性化が考えられる [86]。本研究
では、cilengitide は T3 peptide 誘導性 Akt リン酸化および心線維
芽細胞の増殖を有意に抑制した(図 9)。これらの結果から、T3
peptide は $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンへの結合を介して Akt/p70S6K 経
路を活性化させることで心線維芽細胞の増殖および遊走能を亢
進する可能性が示唆された。

ブタ虚血/再灌流障害モデルの心臓組織において endostatin の発現レベルは増加する [48] が、tumstatin の発現レベルは減少することが報告されている [47]。本研究では、術後 2 週間後の心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において tumstatin 発現レベルが減少していることを明らかにした (図 10)。心疾患における過剰な線維化は心機能の低下をもたらす [22, 55, 85]。一方で心線維芽細胞の増殖や遊走、線維産生といった活性化は心筋梗塞後の創傷治癒に重要な役割を果たしている [90]。そのため、心筋梗塞後の tumstatin 発現の減少は創傷治癒の遅延につながる可能性が考えられる。一方で、心筋の微小循環の低下が心不全の悪化要因であると報告されている [49] ため、抗血管新生因子である tumstatin 発現の減少は血管新生を介して心筋梗塞後の心保護作用につながる可能性が考えられる。心筋梗塞の進展における tumstatin の役割については更なる検討が必要である。

本章では、tumstatin 活性断片 T3 peptide がラット心線維芽細胞においてインテグリン/Akt/p70S6K シグナル経路の活性化を介して増殖能および遊走能を亢進することを明らかにした。これは tumstatin が心線維芽細胞の活性化を介して心筋梗塞後の創傷治癒を促進する可能性を示唆する知見である。

IV. 第三章

H9c2 心筋芽細胞における H_2O_2 誘導性アポトーシスに及ぼす
tumstatin 活性断片 T3 peptide の影響

1. 緒言

IV型コラーゲンは基底膜を構成する主要成分である。TumstatinはIV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の分解断片であり、主に糸球体基底膜に発現している[28]。これまでに、tumstatinは血管内皮細胞や腫瘍細胞の $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合することで抗血管新生作用や抗腫瘍作用を示すことが報告されている[27]。またtumstatinの活性断片であるT3 peptide (69-88 アミノ酸残基)やT7 peptide (74-98 アミノ酸残基)も同様に $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンへの結合を介して抗血管新生作用を示すことが報告されている[57]。近年、ウサギ圧負荷誘発心肥大モデルの心臓組織においてtumstatinの発現レベルが増加すること[66]やブタ虚血/再灌流障害モデルの心筋細胞や微小血管周囲の基底膜でtumstatin発現レベルが減少することが明らかとなった[47]。本研究の第二章ではT3 peptideが心線維芽細胞の増殖と遊走能を亢進することを明らかにしたことから、tumstatinが心疾患発症・進展において何らかの役割を担う可能性が示唆されている。しかしながら心筋細胞におけるtumstatinの病態生理学的役割は未だ不明である。

心筋梗塞は心血管疾患における心筋細胞死の主要な原因であり[45]、冠動脈閉塞に伴う低酸素ストレスによって生じる心臓組織障害を起こす。低酸素ストレスは Ca^{2+} 過負荷やミトコンドリア機能不全、活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)産生亢進など様々な機序によって心筋細胞にアポトーシスを誘導する[46][103]。これまでに、マウス心房由来HL-1細胞株において β_3 インテグリン活性化が酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制す

ることが報告されている[89]。また、インテグリン関連シグナルが抗酸化酵素の活性化に重要な役割を果たすことが知られている[9, 84]。そこで本章では、心筋細胞の酸化ストレス誘導性アポトーシスを tumstatin がインテグリンへの結合を介して抑制するという仮説を、T3 peptide が過酸化水素(H_2O_2)誘導性 H9c2 心筋細胞死に及ぼす影響を調べることにより検証した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用薬物

2-1-1. 試薬

Recombinant human T3 peptide (Phoenix Pharmaceuticals Inc.), H₂O₂ (和光純薬工業株式会社)および cilengitide (Adooq Bioscience)。

2-1-2. 一次抗体

Anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology)および anti-total-actin (Sigma-Aldrich)。

2-1-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody および anti-mouse IgG horseradish peroxidase whole antibody (Amersham Biosciences)。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞の培養

H9c2 心筋芽細胞を American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)より購入し使用した(ATCC number: CRL-1446, lot number: 62278037)。細胞は 10% FBS (HyClone/GE Healthcare)および抗生物質-抗真菌薬(100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B,ナカライテスク株式会社)添加 DMEM (和光純薬工業株式会社)中で 37 °C、5% CO₂

下で培養した。細胞は 6 well プレートに播種し、~80%コンフルエントまで培養後、無血清 DMEM 中で 24 時間血清飢餓状態にしてから実験に使用した。実験には継代数 15-40 の細胞を用いた。

2-2-2. Cell counting assay

H9c2 心筋芽細胞を T3 peptide (300-1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下あるいは非存在下で H₂O₂ (1 mM, 8 時間)により刺激した後、第二章、2-2. 実験方法、2-2-2. 細胞増殖能の測定(Cell counting assay)の項に準じ、cell counting assay を行った。

2-2-3. DAPI 染色

細胞核の形態を観察するために DAPI 染色を行った[69]。H9c2 心筋芽細胞を T3 peptide (300-1000 ng/ml, 30 分間前処置)存在下あるいは非存在下で H₂O₂ (1 mM, 8 時間)で刺激した後、DAPI 試薬(1 μg/ml,同仁化学研究所)を室温で 5 分間処置した。TBS で洗浄した後に CCD カメラ (Micropublisher 5.0 RTV, Roper Industries, Sarasota, FL, U.S.A.)を接続した蛍光顕微鏡 (BX-51,オリンパス工業株式会社)を用いて、染色像をランダムに 3 箇所撮影した。濃縮核および断片化核(アポトーシス様核)数の全核数に対する割合を算出した。

2-2-4. Western blotting

T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)存在下あるいは非存在下で H₂O₂ (1 mM, 6 時間)で H₂O₂ (1 mM, 8 時間)により刺激した H9c2 心筋芽細胞から 0.1% protease inhibitor mixture (ナカライテスク株

式会社)添加 lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerol phosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupetin) (Cell Signaling Technology)を用いて細胞タンパク質抽出液を得た。

Bicinchoninic acid 法 (Pierce)を用いて抽出液のタンパク質濃度を定量後、等量のタンパク質抽出液 (5 μg)を用いて、第二章、2-2. 実験方法、2-2-4. Western blotting の項に準じ、Western blotting を行った。

2-2-5. ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア膜電位測定は Mito Tracker Red 染色 (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)により行った [73]。T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)存在下あるいは非存在下で H_2O_2 (1 mM, 4 時間)により刺激した H9c2 心筋芽細胞を TBS で洗浄後、Mito Tracker Red 試薬 (100 nM)を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間処置した。CCD カメラ (Micropublisher 5.0 RTV, Roper Industries)を接続した蛍光顕微鏡 (BX-51,オリンパス工業株式会社)を用いて、染色像をランダムに 3 箇所撮影した。ミトコンドリア周囲長は Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)を用いて計測した。

2-2-6. 細胞内 ROS 産生測定

細胞内 ROS 産生の測定は 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)染色 (Invitrogen)により行った [76]。T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)存在下あるいは非存在下で H_2O_2 (1

mM, 10 分間)により刺激した H9c2 心筋芽細胞を TBS で洗浄後、DCF-DA 試薬(10 μ M)を 37 °C で 30 分間処置した。Cilengitide は T3 peptide の 30 分前に処置した。CMOS カメラ(True Chrome II plus: Terratechenos, 東京)を接続した蛍光顕微鏡(BX-51)を用いて、染色像をランダムに 3 箇所撮影した。蛍光強度は Image J ソフトウェア(National Institutes of Health)を用いて計測した。

2-3. 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計評価は分散分析(ANOVA)を行った後に、*Bonferroni's test* (図 12, 13, 15, 16)あるいは *Holm's test* (図 14)を行い評価した。危険率 5%未満($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. H₂O₂ 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響

初めに T3 peptide (30-1000 ng/ml)が H9c2 心筋芽細胞において単独で細胞障害性を示すか検討したが観察されなかった (data not shown, n=4)。次に T3 peptide が H₂O₂ 誘導性細胞障害に及ぼす影響を検討した。H₂O₂ (1 mM, 8 時間)刺激によって円形化や脱落など細胞死様の形態変化が観察され、T3 peptide (300, 1000 ng/ml, 30 分間前処置)はこれらを抑制した (n=6) (図 12A)。H₂O₂ (1 mM, 8 時間)刺激は H9c2 心筋芽細胞の生存率を低下させ、T3 peptide (300, 1000 ng/ml, 30 分間前処置)はこれを濃度依存的に抑制した (H₂O₂-alone treatment: 46.7±16.6%, $P<0.01$ vs. Cont, H₂O₂+T3 peptide 300 ng/ml: 60.6±18.8%, H₂O₂+T3 peptide 1000 ng/ml: 71.4±22.4%, $P<0.05$ vs. H₂O₂-alone treatment, n=6) (図 12B)。H₂O₂ (1 mM, 8 時間)刺激により核の濃縮や断片化といったアポトーシス様の核形態変化を起こした細胞の割合は T3 peptide (300, 1000 ng/ml, 30 分間前処置)により有意に減少した (Cont: 4.5±1.1%, H₂O₂-alone treatment: 26.9±16.5%, $P<0.05$ vs. Cont, H₂O₂+T3 peptide 300 ng/ml: 7.7±4.5%, H₂O₂+T3 peptide 1000 ng/ml: 6.4±3.5%, $P<0.05$ vs. H₂O₂-alone treatment, n=4) (図 13)。

3-2. H9c2 心筋芽細胞における H₂O₂ 誘導性 cleaved caspase-3 発現に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞において酸化ストレスは caspase-3 の活性化すなわち cleaved caspase-3 の発現誘導を介しアポトーシスを引き起

こす[106]。そこで T3 peptide が H₂O₂ 誘導性 cleaved caspase-3 発現に及ぼす影響を検討した。T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)は H₂O₂ (1 mM, 6 時間)誘導性 cleave caspase-3 発現誘導を有意に抑制した(H₂O₂-alone treatment: 1064±233.6%, *P*<0.01 vs. Cont, H₂O₂+T3 peptide 1000 ng/ml: 799.1±249.8%, *P*<0.01 vs. H₂O₂-alone treatment, n=4) (図 14)。

3-3. H9c2 心筋芽細胞における H₂O₂ 誘導性ミトコンドリア膜電位低下とミトコンドリア断片化に及ぼす T3 peptide の影響

H₂O₂ は H9c2 心筋芽細胞においてミトコンドリア膜電位の低下を伴うミトコンドリア機能障害を介してアポトーシスを誘導することが知られている[58]。そこで T3 peptide がミトコンドリア形態と機能に及ぼす影響を検討した。ミトコンドリアは融合してフィラメント状となることでミトコンドリア機能の維持に働き、膜周囲長は断片化ミトコンドリアよりも長い(図 15A Cont, 図 15B)。H₂O₂ 刺激は顆粒状へのミトコンドリア形態変化すなわち断片化を誘導する。断片化したミトコンドリアでは電子伝達系が障害され、スーパーオキシド(O₂⁻)産生が亢進する[88]。産生された O₂⁻ はミトコンドリアを傷害し、結果として膜電位を低下させ[88]、Mito Tracker Red 試薬への染色性が低下する(図 15A, H₂O₂, 矢印)。T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)は H₂O₂ (1 mM, 4 時間)誘導性ミトコンドリア膜電位低下を抑制した(n=5) (図 15A, 矢印および矢頭)。さらに T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置)は H₂O₂ (1 mM, 4 時間)誘導性ミトコンドリア断片化とそれに伴う膜周囲長の短縮を有意に抑制した(H₂O₂-alone treatment: 51.8±5.7%, *P*<0.01

vs. Cont, H₂O₂+T3 peptide 1000 ng/ml: 98.3±14.9%, *P*<0.01

vs. H₂O₂-alone treatment, n=5) (図 15B)。

3-4. H9c2 心筋芽細胞における細胞内 ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響

H₂O₂ は H9c2 心筋芽細胞において細胞内 ROS 産生の増加を介してミトコンドリアを傷害する [58]。そこで最後に T3 peptide が細胞内 ROS 産生能に及ぼす影響を検討した。T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置) は H₂O₂ (1 mM, 10 分間) 刺激による DCF-DA 染色強度の増加すなわち ROS 産生を抑制した。また α_vβ₃/α_vβ₅ インテグリン阻害薬 cilengitide (1 μM, 30 分間前処置) は T3 peptide による H₂O₂ 誘導性 ROS 産生の抑制作用を解除した (Cont: 1.7±2.1%, H₂O₂-alone treatment: 100%, *P*<0.05 vs. Cont, H₂O₂+T3 peptide 1000 ng/ml: 1.0±1.6%, *P*<0.05 vs. H₂O₂-alone treatment, H₂O₂+cilengitide+T3 peptide 1000 ng/ml: 91.2±80.4%, *P*<0.05 vs. H₂O₂+T3 peptide, n=4) (図 16)。

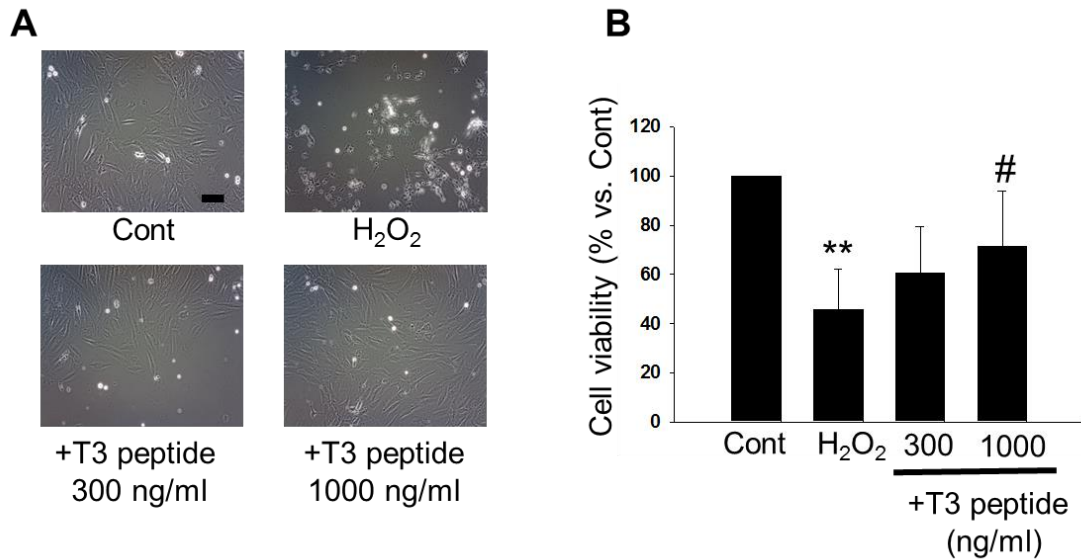


図 12 H₂O₂ 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響
 T3 peptide (300, 1000 ng/ml) 存在下あるいは非存在下で H9c2 心筋芽細胞を H₂O₂ (1 mM, 8 時間) により刺激した。(A) 溶媒 (Milli-Q 水、Cont)、H₂O₂ 単独刺激あるいは T3 peptide (300-1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下で H₂O₂ により刺激した H9c2 心筋芽細胞の代表的な位相差顕微鏡像。スケールバーは 100 μm を表す。(B) 生細胞数を cell counting assay kit-8 を用いた比色法により計測し、Cont で補正して平均値 ± 標準偏差で示した (n=6)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. H₂O₂-alone treatment.

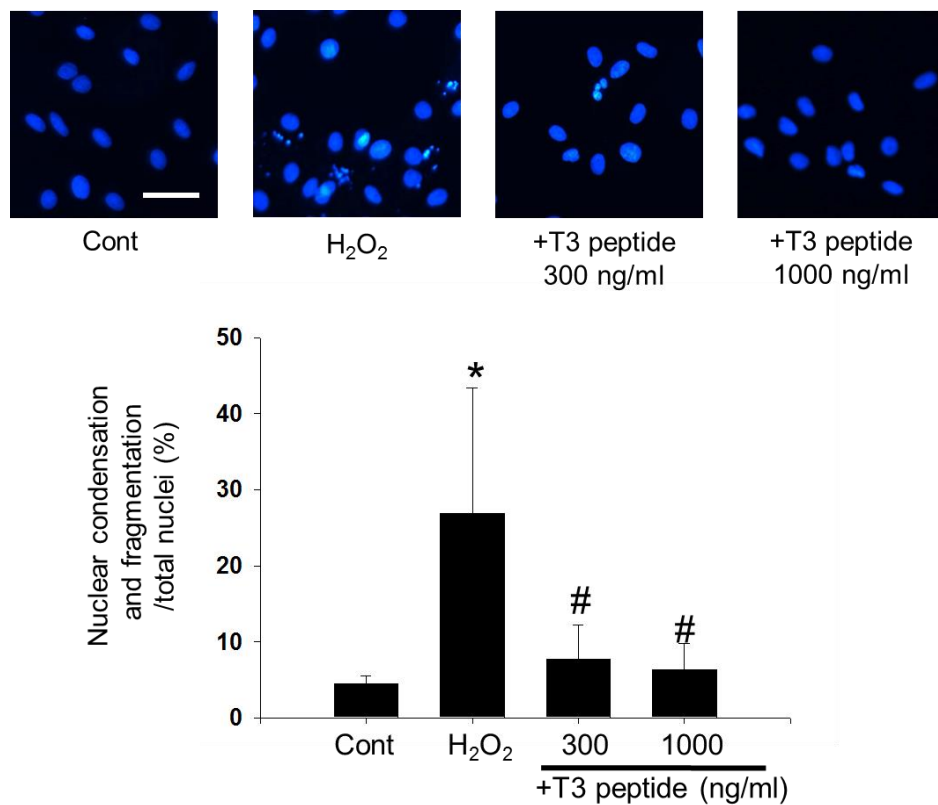


図 13 H₂O₂ 誘導性 H9c2 心筋芽細胞の核濃縮および断片化に及ぼす T3 peptide の影響

溶媒 (Cont)、H₂O₂ (1 mM, 8 時間) 単独刺激あるいは T3 peptide (300-1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下で H₂O₂ により刺激した H9c2 心筋芽細胞に 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 試薬 (1 μg/ml, 5 分間) を処置し、核形態を観察した。

(上図) 代表的な DAPI 染色像。スケールバーは 50 μm を表す。

(下図) 濃縮核および断片化核数の全核数に対する割合を平均値 ± 標準偏差で示した (n=6)。

* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. H₂O₂-alone treatment.

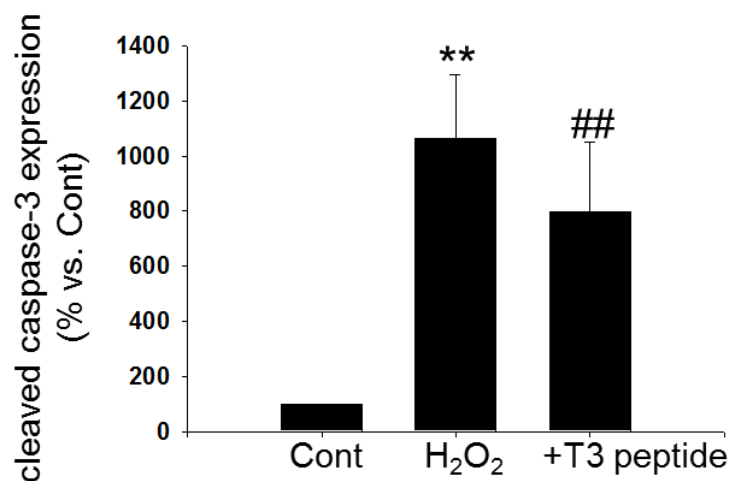
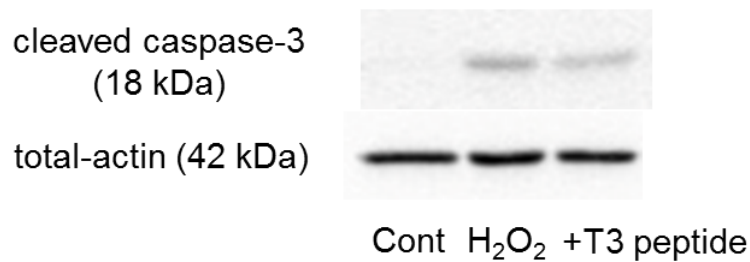


図 14 H9c2 心筋芽細胞における H₂O₂ 誘導性 cleaved caspase-3 発現誘導に及ぼす T3 peptide の影響

溶媒 (Cont)、H₂O₂ (1 mM, 6 時間) 単独刺激あるいは T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下で H₂O₂ により刺激した H9c2 心筋芽細胞からタンパク質を抽出した。Cleaved caspase-3 および total-actin 発現を Western blotting で検討した。

(上図) 代表的な cleaved caspase-3 および total-actin のプロット像。

(下図) Cleaved caspase-3 発現レベルを total-actin 発現で補正した値を H₂O₂ 単独刺激に対する比で表し平均値 ± 標準偏差で示した (n=4)。** $P < 0.01$ vs. Cont, ## $P < 0.01$ vs. H₂O₂-alone treatment。

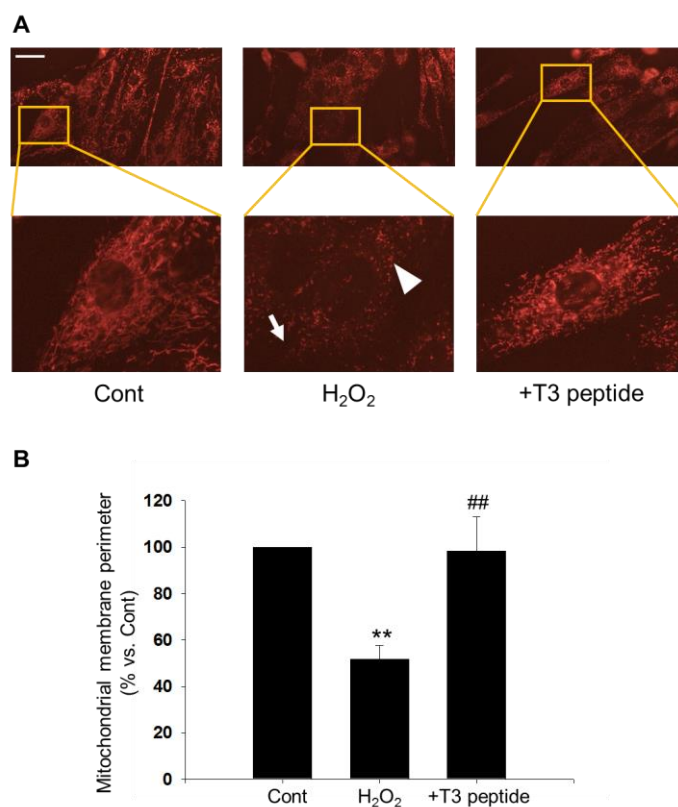


図 15 H9c2 心筋芽細胞における H₂O₂ 誘導性ミトコンドリア膜電位低下および断片化に及ぼす T3 peptide の影響

溶媒 (Cont)、H₂O₂ (1 mM, 4 時間) 単独刺激あるいは T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下で H₂O₂ により刺激した H9c2 心筋芽細胞に Mito Tracker Red 試薬 (100 nM, 30 分間) を処置し、ミトコンドリア膜電位と形態を観察した。

(A: 上図) 代表的な Mito Tracker Red 染色像 (赤色蛍光)。スケールバーは 50 μm を表す。

(A: 下図) 上図の一部を拡大した画像。矢印はミトコンドリア膜電位低下を表す。矢頭はミトコンドリア断片化を表す。(B) 画像解析ソフト (Image J) を用いてミトコンドリア膜周囲長を計測し、Cont で補正した値を平均値 ± 標準偏差で示した (n=5)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, ## $P < 0.01$ vs. H₂O₂-alone treatment.

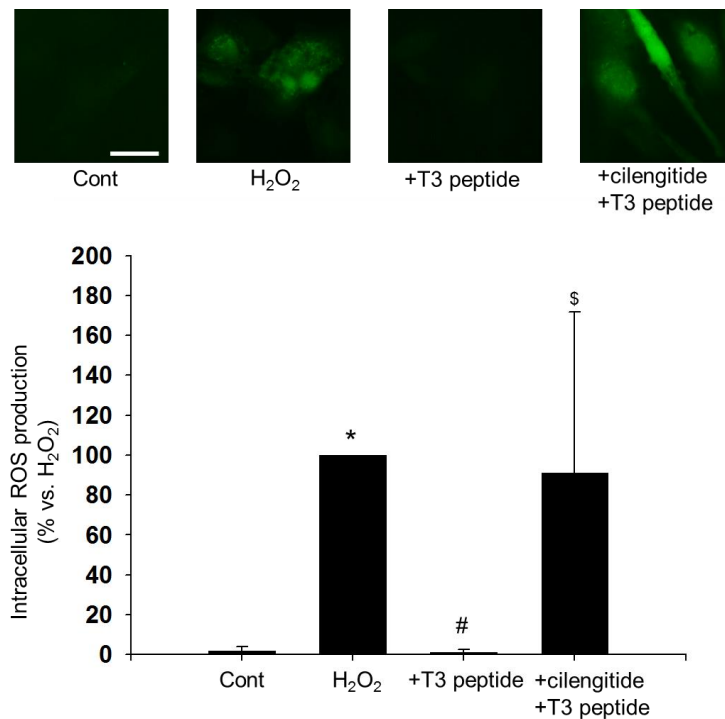


図 16 H9c2 心筋芽細胞における H₂O₂ 誘導性細胞内活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) 産生に対する T3 peptide の抑制作用とそれに及ぼす $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide の影響 H9c2 心筋芽細胞を溶媒 (Cont)、H₂O₂ (1 mM, 10 分間) 単独刺激あるいは T3 peptide (1000 ng/ml, 30 分間前処置) 存在下で H₂O₂ により刺激した。Cilengitide (1 μ M) は T3 peptide の 30 分前に処置した。H₂O₂ 刺激後、H9c2 心筋芽細胞に 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 試薬 (10 μ M, 30 分間) を処置し細胞内 ROS 産生を観察した。

(上図) 代表的な DCF-DA 染色像 (緑色蛍光)。スケールバーは 50 μ m を表す。

(下図) 画像解析ソフト (Image J) を用いて DCF-DA 蛍光強度を計測し、H₂O₂ 単独処置に対する比で表し平均値 \pm 標準偏差で示した (n=4)。

* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. H₂O₂-alone treatment, \$ $P < 0.05$ vs. +T3 peptide.

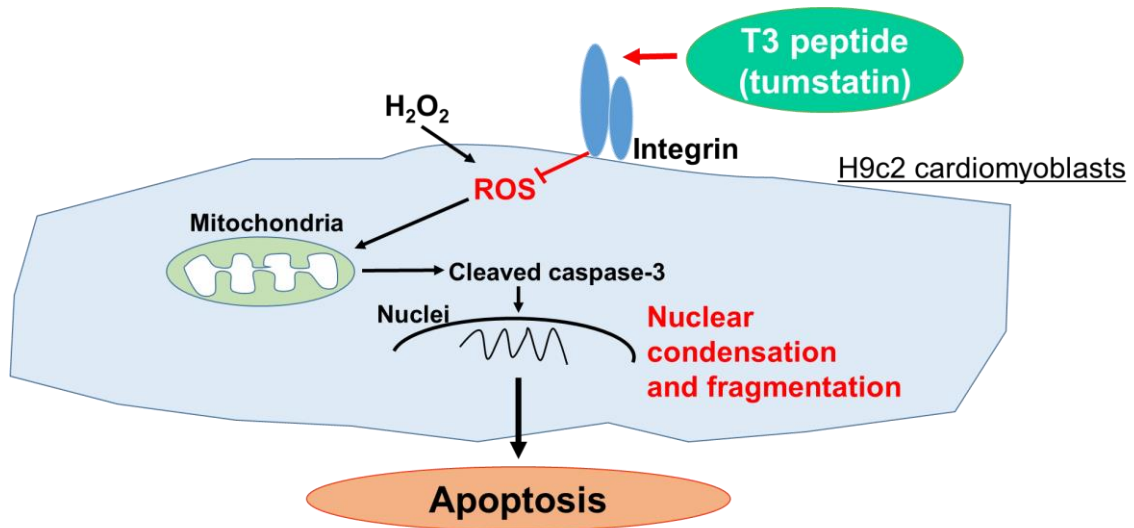


図 17 モデル

H9c2 心筋芽細胞において H₂O₂ は細胞内 ROS 産生の増加によりミトコンドリアを傷害し、caspase-3 の活性化 (cleaved caspase-3 発現誘導) を介してアポトーシスを起こす。T3 peptide はインテグリンとの結合を介して細胞内 ROS 産生を阻害して H₂O₂ 誘導性アポトーシスを抑制する可能性が示唆された。

4. 考察

本章では、tumstatin 活性断片 T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞において H₂O₂ 誘導性アポトーシスを抑制することを初めて明らかにした。またその機序は、インテグリンへの結合を介した細胞内 ROS 産生の抑制によることが示唆された(図 17)。

本研究において T3 peptide (30-1000 ng/ml) 単独処置は H9c2 心筋芽細胞に対して細胞傷害性を示さなかった (data not shown, n=4)。これに対して、T3 peptide が血管内皮細胞においてアポトーシス (細胞傷害性) を誘導する濃度は 2.5-10 µg/ml と報告されており [27, 57]、本研究で用いた T3 peptide の濃度は 30-1000 ng/ml と低かった為、細胞傷害作用を示さなかった可能性が考えられる。

本研究では、T3 peptide は H9c2 心筋芽細胞において H₂O₂ 誘導性細胞死、核の濃縮および断片化、cleaved caspase-3 発現誘導を抑制した(図 12-14)。これらの結果は T3 peptide が抗アポトーシス作用を有することを初めて明らかにしたものである。心筋梗塞後の心筋細胞におけるアポトーシスは心臓組織構造崩壊につながることから、T3 peptide は心筋細胞において酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制することで心保護作用を示す可能性が示唆された。しかしながら、T3 peptide によるアポトーシス抑制作用の詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

Bcl-2 ファミリータンパク質はミトコンドリアの機能調節を介してアポトーシスを制御することが知られている。また Akt は Bcl-2 発現を促進する [78] とともに Bax 発現を抑制することも知られている [20]。当研究室はこれまでに、tumstatin と同様に IV 型コラー

ゲンの分解断片である canstatin ($\alpha 2$ 鎖由来)が低酸素下の H9c2 心筋芽細胞において $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介して Akt リン酸化を亢進することを明らかにしている [40]。そのため、T3 peptide はインテグリンへの結合を介した Akt/Bcl-2 ファミリータンパク質の活性化によって H_2O_2 誘導性アポトーシスを抑制する可能性も考えられる。

Caspase-3 を活性化させる要因の 1 つはミトコンドリア傷害である [14]。ミトコンドリアの分裂はミトコンドリア傷害の特徴であり機能不全をもたらす。本研究で、T3 peptide は H_2O_2 誘導性ミトコンドリア分裂とそれに伴うミトコンドリア膜周囲長の短縮を抑制した (図 15)。ミトコンドリア分裂は dynamin-related protein (Drp) 1 によって促進される。当研究室ではこれまでに、canstatin がカルシニューリン/Drp 1 経路を介してイソプロテレノール誘導性ミトコンドリア分裂を抑制することを報告している [73]。Drp 1 の活性化は様々なリン酸化部位によって調整される。Ser 637 残基が Ca^{2+} /カルモジュリン依存性セリン/スレオニンホスファターゼのカルシニューリンにより脱リン酸化されると Drp1 は活性化し、ミトコンドリアの断片化を引き起こす [112]。カルシニューリンは細胞内 Ca^{2+} の増加によって活性化し [13]、ROS は様々な細胞で細胞内 Ca^{2+} 動態に影響を及ぼすことが知られている [23]。そのため、T3 peptide は細胞内 ROS 産生の抑制を介して Ca^{2+} /カルシニューリン/Drp 1 経路を阻害し、 H_2O_2 誘導性ミトコンドリア分裂を抑制する可能性が考えられる。

H_2O_2 はそれ自体が ROS であると同時に、NADPH oxidase (NOX) 由来の ROS 産生を増加させる [79]。本研究において T3 peptide は

H9c2 心筋芽細胞において H_2O_2 誘導性細胞内 ROS 産生を抑制することが明らかとなった(図 16)。T3 peptide の抗酸化作用機序として、 H_2O_2 を直接的に除去することや NOX 活性を阻害する可能性が考えられる。本研究では T3 peptide がどのような抗酸化作用機序を持つかを明らかにしておらず、今後更なる検討が必要である。

T3 peptide は内皮細胞においてインテグリンへの結合を介して抗血管新生作用を示すことが知られている [57]。本研究では、 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide が H_2O_2 誘導性細胞内 ROS 産生に対する T3 peptide の抑制作用を解除することを明らかにした(図 16)。また H9c2 心筋芽細胞においてインテグリンの α_v サブユニットが発現していることも確認した (data not shown, n=4)。このことから、T3 peptide は $\alpha_v\beta_3$ あるいは $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介して細胞内 ROS 産生を阻害すると考えられる。Qin らは ECM の一種であるフィブロネクチンがインテグリンへの結合を介して superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase や catalase など抗酸化酵素の活性を亢進することを報告している [81]。T3 peptide がインテグリンへの結合を介して抗酸化酵素活性を亢進するかどうか今後検討する必要がある。

結論として、本章では T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞においてインテグリンへの結合を介した細胞内 ROS 産生の阻害により H_2O_2 誘導性アポトーシスを抑制することを初めて明らかにした。Lauten らはブタ虚血/再灌流障害モデルの心筋細胞周囲の基底膜において tumstatin の発現レベルが減少することを報告している [47]。また第 2 章においてラット心筋梗塞モデルの梗塞領域において tumstatin 発現レベルが減少することを明らかにしている。心

筋梗塞や虚血/再灌流障害における過剰な酸化ストレスは心筋細胞障害を誘導する[2]。よって梗塞領域における tumstatin 発現減少は、酸化ストレス誘導性心筋細胞死と心臓組織障害の悪化につながる可能性が考えられる。本章の成果は tumstatin あるいはその活性断片 T3 peptide が虚血性心疾患に対する新規治療薬開発の礎となり得ることを提示するものである。

V. 第四章

心筋虚血/再灌流障害に対する T3 peptide の保護作用

1. 緒言

心筋梗塞に伴う冠動脈閉塞は低酸素・低栄養ストレスを介して心臓組織障害を起こす[30]。梗塞領域への早期血液灌流の再開は予後改善に重要な役割を担うが、再灌流による急激な酸素供給はむしろ ROS 産生や炎症反応の促進などを介して心筋障害、すなわち再灌流障害の要因となる[30]。そのため、心筋梗塞治療において再灌流障害の制御は重要な治療標的であり広く研究がなされてきた。

ブタ虚血/再灌流障害モデルの心筋細胞や微小血管周囲の基底膜において tumstatin 発現レベルが減少することが報告されている[47]。また第二章において、ラット心筋梗塞モデルの梗塞領域で tumstatin 発現レベルが減少することを明らかにしており、虚血性心疾患において tumstatin 発現が低下する可能性が示唆される。また第三章では、tumstatin が H₂O₂ 誘導性アポトーシスを抑制することを明らかにし、ROS 誘導性心筋障害に対して tumstatin が保護的に働く可能性が示唆された。以上のことから、第四章では ROS 産生や炎症反応により誘導される心筋虚血/再灌流障害に対して tumstatin が保護作用を示すという仮説を *in vitro* および *ex vivo* において虚血/再灌流障害モデルを用いて検証した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 使用薬物

2-1-1. 試薬

Recombinant human T3 peptide (株式会社ベックス、東京)。

2-1-2. 一次抗体

Anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology), anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, U.S.A.)および anti-total-actin (Sigma-Aldrich)

2-1-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody および anti-mouse IgG horseradish peroxidase whole antibody (Amersham Biosciences)。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞の培養

H9c2 心筋芽細胞は第三章、2-2. 実験方法、2-2-1. 細胞の培養の項に準じて培養し、実験に使用した。

2-2-2. in vitro 虚血/再灌流障害モデル

H9c2 心筋芽細胞を TBS で洗浄した後、培地を血清および glucose free DMEM (和光純薬株式会社)に交換した。その後、低酸素インキュベーター (BL-42MD, 十慈フィールド株式会社、東京)を

用いて 5% CO₂, 1% O₂, 37 °C の条件下で培養することで低酸素・低栄養刺激 [oxygen and glucose deprivation (OGD)] を与えた [52]。12 時間の OGD 刺激後、10% FBS を含む通常の細胞培養用 DMEM 培地に交換して 20% O₂, 5% CO₂ 条件下で培養することで再酸素化した [OGD/reoxygenation (OGD/R)] (図 18)。再酸素化 1-3 時間後、以下に示す各種解析を行った。T3 peptide (30-1000 ng/ml) は OGD 刺激中、培地中に処置した (図 18)。

2-2-3. Cell counting assay

H9c2 心筋芽細胞の生存性を測定するために OGD/R 刺激後、第二章、2-2. 実験方法、2-2-2. 細胞増殖能の測定の項に準じ、cell counting assay を行った。

2-2-4. Western blotting

T3 peptide (300 ng/ml, OGD 共処置) 存在下あるいは非存在下で OGD/R (12 時間/1 時間) 刺激した H9c2 心筋芽細胞から第二章、2-2. 実験方法、2-2-4. Western blotting の項に準じ、細胞タンパク質抽出液を得た後にタンパク質濃度を定量した。等量のタンパク質抽出液 (5 µg) を用いて Western blotting を行った。

2-2-5. 細胞内 ROS 産生測定

細胞内 ROS 産生能を測定するために T3 peptide (300 ng/ml, OGD 共処置) 存在下あるいは非存在下で H9c2 心筋芽細胞を OGD/R (12 時間/1 時間) 刺激した後、第三章、2-2. 実験方法、2-2-6. 細胞内 ROS 産生の項に準じ、DCF-DA 染色を行った。

2-2-6. ミトコンドリア由来 ROS 産生測定

ミトコンドリア由来 ROS 産生能を測定するために T3 peptide (300 ng/ml, OGD 共処置)存在下あるいは非存在下で H9c2 心筋芽細胞を OGD/R (12 時間/1 時間)刺激した。TBS で洗浄後、培地を Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない Hank's Balanced Salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich) に交換して Mito SOX Red 試薬 (5 μM , Life Technologies) を 37 °C で 10 分間処置した [73]。CCD カメラ (DP74, オリンパス工業株式会社) を接続した蛍光顕微鏡 (BX-51, オリンパス工業株式会社) を用いて、染色像をランダムに 3 箇所撮影した。蛍光強度は Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて計測した。

2-2-7. ex vivo 虚血/再灌流障害モデル(ランゲンドルフ灌流心)

動物の飼育および取り扱いには北里大学動物実験倫理委員会の審査を経て承認後(承認番号 16-057, 17-086)、北里大学動物実験委員会規定のガイドラインを遵守して行った。実験には 6-7 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア株式会社)を使用し、本学部 5 号館の小動物飼育室において室温 22.0 ± 2 °C、湿度 50-60%、点灯時間 12 時間(午前 7 時～午後 7 時)で、固形飼料(CE2)(日本クレア株式会社)を給餌し、自由飲水で飼育した。

ラットにウレタン (Sigma-Aldrich) の腹腔内投与 (1.5 g/kg) により深麻酔を施した。第一章、2-2. 実験方法、2-2-1. モルモット心室筋細胞の単離の項に準じてラット Langendorff 灌流心を作製し、100% O_2 で飽和した 37 °C の normal HEPES-Tyrode solution を大動

脈より逆行性に冠血管に灌流し瀉血・安定化させた。左心房を切開し、圧トランスデューサーを接続したバルーンカテーテルを挿入し、Milli-Q 水を注入し膨らませた後に左心室内腔圧を測定した [102]。また、心基部に陰極を、心尖部に陽極を設置して心電図を測定した。左心室内腔圧および心電図データの測定には Power Lab システムと Chart 8 ソフトウェア (ADI Instruments, New South Wales, Australia) を使用した。

心臓標本の安定化後、normal HEPES-Tyrode solution の灌流を 30 分間停止することで虚血 (ischemia, I) 刺激を与えた。その後、normal HEPES-Tyrode solution を 60 分間再灌流 (reperfusion, R) させた (I/R)。T3 peptide (300 ng/ml) は虚血 10 分前に normal HEPES-Tyrode solution 中に処置した (図 19)。

2-2-8. 梗塞領域の測定

I/R 刺激後、心臓標本をランゲンドルフ灌流装置から取り外して -80 °C で 10 分間、凍結した。心尖部より約 3 mm の部分で 2 mm 厚の輪切り標本を作製し、1% 2, 3, 5,-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 溶解 PBS 中 (37 °C) で 10 分間振とうした後、4% パラホルムアルデヒド溶液中で 1 晩固定した。固定した組織の画像をスキャナー (GT-9400UF, EPSON, 長野) により撮影した。撮影した画像の梗塞領域を Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて計測した。

2-3. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価は分散分析 (ANOVA)を行った後に、*Holm's test* (図 20, 21, 24, 25,表 1)あるいは *Bonferroni's test* (図 22, 23,表 2)を行い評価した。危険率 5%未満 ($P<0.05$)を有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響

初めに T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞において OGD/R 誘導性細胞障害に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。OGD/R (12 時間/3 時間) 刺激は H9c2 心筋芽細胞の生存率を低下させ、T3 peptide (30-1000 ng/ml) は 300 ng/ml をピークとしてこれを有意に抑制した (OGD/R-alone stimulation: $31.4 \pm 3.3\%$, $P < 0.01$ vs. Cont, OGD/R+T3 peptide 30 ng/ml: $36.2 \pm 3.3\%$, OGD/R+T3 peptide 300 ng/ml: $43.8 \pm 3.7\%$, $P < 0.01$ vs. OGD/R-alone stimulation, OGD/R+T3 peptide 1000 ng/ml: $40.6 \pm 4.3\%$, $P < 0.05$ vs. OGD/R-alone stimulation, $n=8$) (図 20)。

3-2. OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞のアポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす T3 peptide の影響

OGD/R 刺激は H9c2 心筋芽細胞にアポトーシスを誘導することが知られている [33]。そこで T3 peptide (300 ng/ml) が H9c2 心筋芽細胞において OGD/R によって誘導されるアポトーシス関連タンパク質 cleaved caspase-3 および Bax 発現に及ぼす影響を検討した。OGD/R (12 時間/1 時間) 刺激は cleaved caspase-3 発現および Bax 発現を亢進し、T3 peptide はこれを抑制する傾向を示した (cleaved caspase-3; OGD/R-alone stimulation: $369.8 \pm 94.4\%$, OGD/R+T3 peptide: $314.1 \pm 110.3\%$, $n=3$, Bax; OGD/R-alone stimulation: $175.4 \pm 48.9\%$, OGD/R+T3 peptide: $135.3 \pm 13.3\%$, $n=3$) (図 21)。

3-3. OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内の ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響

OGD/R は H9c2 細胞の ROS 産生を増加させることが知られている [33]。そこで T3 peptide (300 ng/ml) が H9c2 心筋芽細胞において OGD/R 誘導性細胞内 ROS 産生に及ぼす影響を検討した。OGD/R (12 時間/1 時間) 刺激は H9c2 心筋芽細胞内 ROS 産生を亢進し、T3 peptide はこれを有意に抑制した (Cont: $4.9 \pm 4.4\%$, OGD/R-alone stimulation: 100%, $P < 0.01$ vs. Cont, OGD/R+T3 peptide: $7.0 \pm 3.7\%$, $P < 0.01$ vs. OGD/R-alone stimulation, $n=4$) (図 22)。

3-4. OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内のミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞における OGD/R 誘導性細胞内 ROS 産生増加の機序としてミトコンドリア由来の ROS 産生増加があることが知られている [8]。そこで T3 peptide (300 ng/ml) が H9c2 心筋芽細胞において OGD/R 誘導性ミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす影響を検討した。OGD/R (12 時間/1 時間) 刺激はミトコンドリア由来 ROS 産生を亢進し、T3 peptide はこれを有意に抑制した (Cont: $14.6 \pm 7.9\%$, OGD/R-alone stimulation: 100%, $P < 0.01$ vs. Cont, OGD/R+T3 peptide: $10.8 \pm 2.8\%$, $P < 0.01$ vs. OGD/R-alone stimulation, $n=5$) (図 23)。

3-5. I/R 誘導性心機能低下に及ぼす T3 peptide の影響

次に T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置) が摘出心臓標本を用いた I/R モデルにおいて左室収縮機能に及ぼす影響を ex vivo で検

討した。I/R (30 分間/60 分間)刺激は摘出心臓標本の左室発生圧 (left ventricular developed pressure: LVDP)を低下させた。T3 peptide は再灌流 20 分後をピークとして I/R 誘導性 LVDP の低下を抑制する傾向を示した (Cont: 68.6 ± 7.7 mmHg, I/R-alone stimulation: 45.8 ± 19.1 mmHg, I/R+T3 peptide: 53.4 ± 12.5 mmHg, n=3) (図 24)。またこの時点(再灌流 20 分後)における左心室機能を解析したところ、T3 peptide は I/R 誘導性左室拡張末期圧 (left ventricular end diastolic pressure: LVEDP)上昇と最大収縮速度 (Max dP/dt)および最大弛緩速度 (Min dP/dt)の低下を抑制する傾向を示した (LVEDP; Cont: -16.2 ± 9.0 mmHg, I/R-alone stimulation: 5.4 ± 11.1 mmHg, I/R+T3 peptide: 3.3 ± 7.7 mmHg, Max dP/dt; Cont: 2701.5 ± 123.1 mmHg/s, I/R-alone stimulation: 2190.6 ± 727.5 mmHg/s, I/R+T3 peptide: 2373.3 ± 390.0 mmHg/s, Min dP/dt; Cont: -1847.5 ± 34.0 mmHg/s, I/R-alone stimulation: -1715.1 ± 387.6 mmHg/s, I/R+T3 peptide: -1759.7 ± 226.4 mmHg/s, n=3) (表 1)。また T3 peptide は I/R 誘導性心拍数 (Heart Rate)の増加を促進する傾向を示した [Cont: 164.5 ± 36.1 beat per minutes (BPM), I/R-alone stimulation: 202.4 ± 32.0 BPM, I/R+T3 peptide: 245.9 ± 20.1 BPM, n=3] (表 1)。

3-6. I/R 誘導性心電図変化に及ぼす T3 peptide の影響

次に T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置)が摘出心臓標本を用いた ex vivo I/R モデルにおいて心電図変化に及ぼす影響を検討した。左心室機能を解析した再灌流 20 分後において、I/R 刺激は RR 間隔を短縮させる傾向を示し、QRS 間隔を有意に延長させた (RR 間隔; Cont: 418.3 ± 112.5 msec, I/R-alone stimulation: 272.4 ± 35.6

msec, QRS 間隔; Cont: 17.6 ± 1.7 msec, I/R-alone stimulation: 39.4 ± 6.4 msec, n=3) (表 2)。T3 peptide は RR 間隔をより短縮させる傾向を示し、I/R 誘導性 QRS 間隔短縮を有意に抑制した (RR 間隔; 247.6 ± 20.8 msec, QRS 間隔; 17.5 ± 3.0 msec, $P < 0.05$ vs. I/R-alone stimulation, n=3) (表 2)。

3-7. I/R 誘導性心筋梗塞領域形成に及ぼす T3 peptide の影響

最後に T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置) が摘出心臓標本を用いた ex vivo I/R モデルにおいて心筋障害に及ぼす影響を組織学的に検討した。I/R (30 分間/60 分間) 刺激により心室筋組織全体に梗塞領域が形成され (Cont: $5.6 \pm 1.5\%$, I/R-alone stimulation: $27.9 \pm 9.0\%$, $P < 0.01$ vs. Cont, n=3)、T3 peptide はこれを有意に抑制した ($7.9 \pm 1.3\%$, $P < 0.05$ vs. I/R-alone stimulation, n=3) (図 25)。

	1% O ₂ 12 h	Normal O ₂
Cont	10% FBS DMEM	10% FBS DMEM
OGD/R	Oxygen and glucose deprivation	10% FBS DMEM
+T3 peptide	Oxygen and glucose deprivation T3 peptide	10% FBS DMEM

図 18 in vitro oxygen and glucose deprivation/ reoxygenation

(OGD/R)モデルの作製方法

H9c2 心筋芽細胞を Tris buffered saline (pH 7.4)で洗浄した後、培地を血清および glucose free の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)に交換し、低酸素インキュベーターを用いて 5% CO₂, 1% O₂, 37 °C の条件下で培養することで低酸素・低栄養刺激 (OGD)刺激を与えた。OGD 刺激 12 時間後、培地を 10% fetal bovine serum (FBS)を含む通常の DMEM に交換して O₂ (20% O₂)条件下で培養することで再酸素化した (OGD/R)。OGD/R 刺激 1-3 時間後、各種解析を行った。T3 peptide (30-1000 ng/ml)は OGD 刺激の間、培地中に処置した。

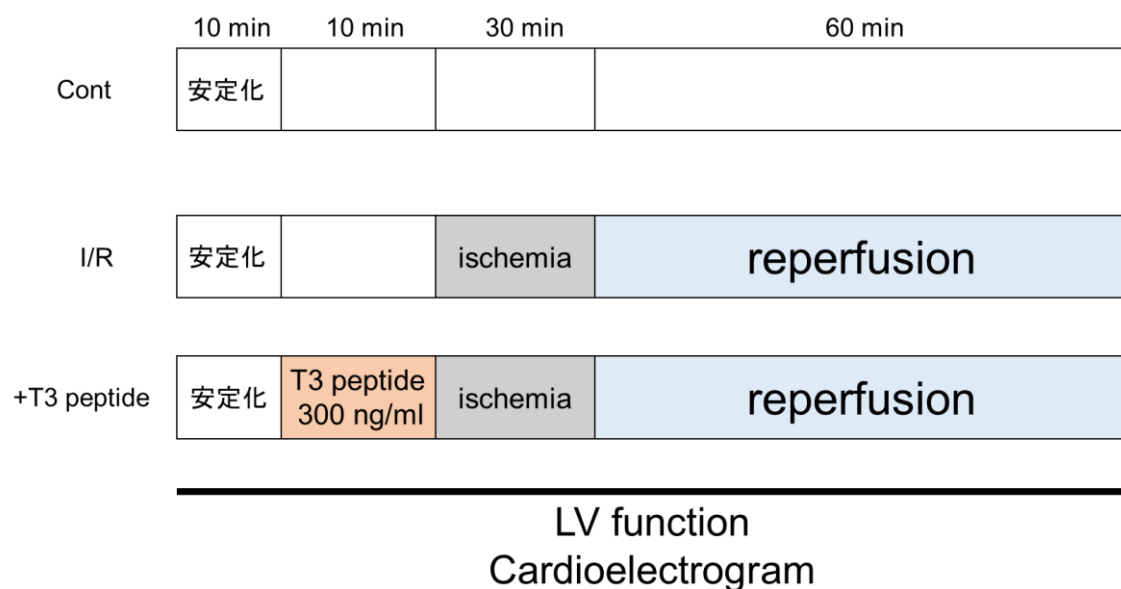


図 19 ex vivo 虚血/再灌流障害 (ischemia/reperfusion: I/R) モデルの作製方法

ラット摘出心臓組織を Langendorff 灌流装置に設置し、100% O₂ で飽和した 37 °C の normal 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)-Tyrode solution を大動脈より逆行性に冠血管に灌流し瀉血・安定化させた。左心房を切開し、Milli-Q 水で満たしたバルーンカテーテルを挿入して圧トランスデューサーに接続し、左心室内腔圧を測定した。心基部に陰極、心尖部に陽極を設置して心電図を測定した。10 分間の安定化後、normal HEPES-Tyrode solution の灌流を 30 分間停止することで虚血にし、normal HEPES-Tyrode solution を 60 分間再灌流させることで I/R モデルを作製した。T3 peptide (300 ng/ml) は虚血の 10 分前に normal HEPES-Tyrode solution 中に処置した。

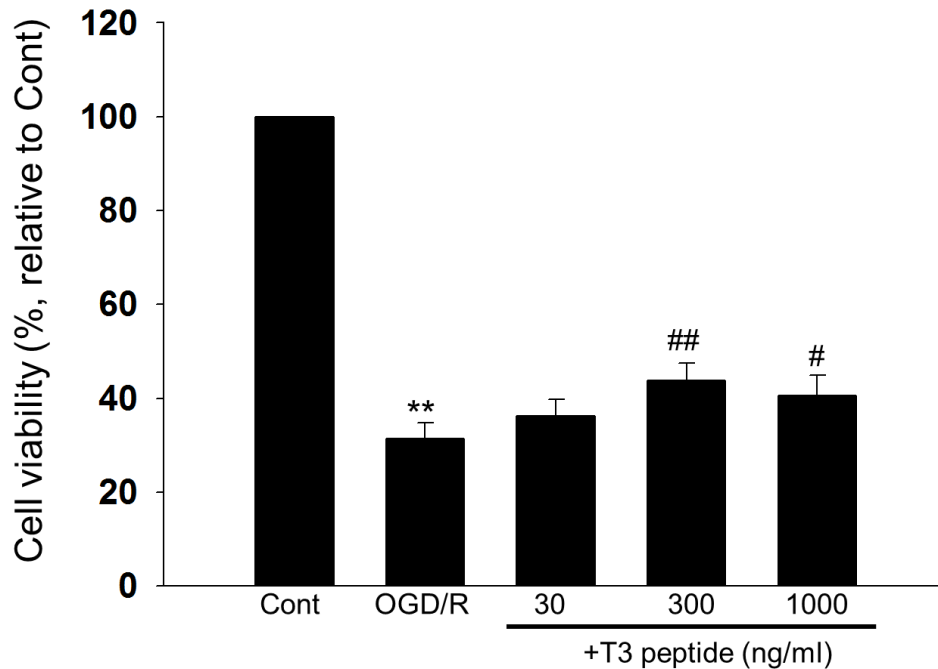


図 20 OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞を通常培地・通常酸素 (Cont)、OGD 単独刺激あるいは T3 peptide (30-1000 ng/ml, OGD 中に処置) 存在下で OGD の条件で 12 時間培養した後、通常培地、通常酸素下で 3 時間培養した (OGD/R)。生細胞数を cell counting assay kit-8 を用いた比色法により計測し、Cont で補正した値を平均値 ± 標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, #, ## $P < 0.05$, 0.01 vs. OGD/R stimulation。

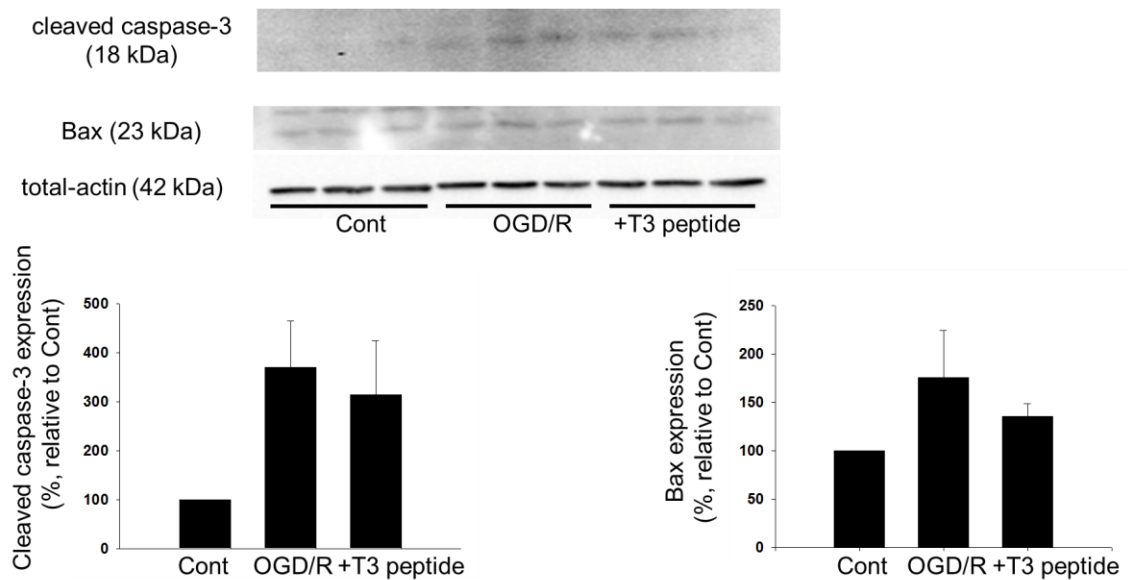


図 21 OGD/R 誘導性アポトーシス関連タンパク質発現に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞を通常培地・通常酸素 (Cont)、OGD 単独刺激あるいは T3 peptide (300 ng/ml, OGD 中に処置) 存在下で OGD の条件で 12 時間培養した後、通常培地、通常酸素下で 1 時間培養した (OGD/R)。H9c2 心筋芽細胞からタンパク質を抽出した後、cleaved caspase-3, Bax および total-actin 発現を Western blotting で検討した。

(上図) 代表的な cleaved caspase-3, Bax および total-actin のプロット像。

(下図) Cleaved caspase-3 (左下図) および Bax (右下図) 発現レベルを total-actin 発現で補正した値を Cont に対する比で表し平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。

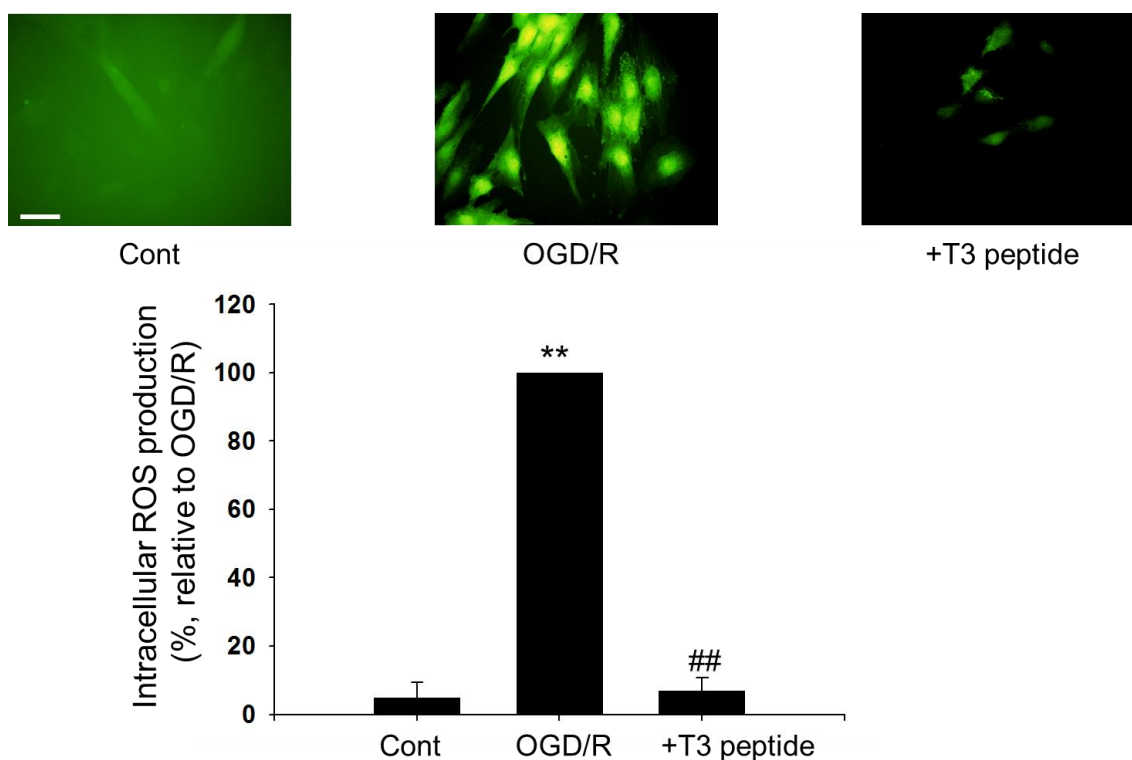


図 22 OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内の ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞を通常培地・通常酸素 (Cont)、OGD 単独刺激あるいは T3 peptide (300 ng/ml, OGD 中に処置) 存在下で OGD の条件で 12 時間培養した後、通常培地、通常酸素下で 1 時間培養した (OGD/R)。H9c2 心筋芽細胞に DCF-DA 試薬 (10 μ M, 30 分間) を処置し細胞内 ROS 産生を蛍光顕微鏡で観察した。

(上図) 代表的な DCF-DA 染色像 (緑色蛍光)。スケールバーは 50 μ m を表す。

(下図) 画像解析ソフト (Image J) を用いて DCF-DA 蛍光強度を計測し、OGD/R 単独刺激に対する比で表し平均値 \pm 標準誤差で示した (n=4)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, ## $P < 0.01$ vs. OGD/R-alone stimulation.

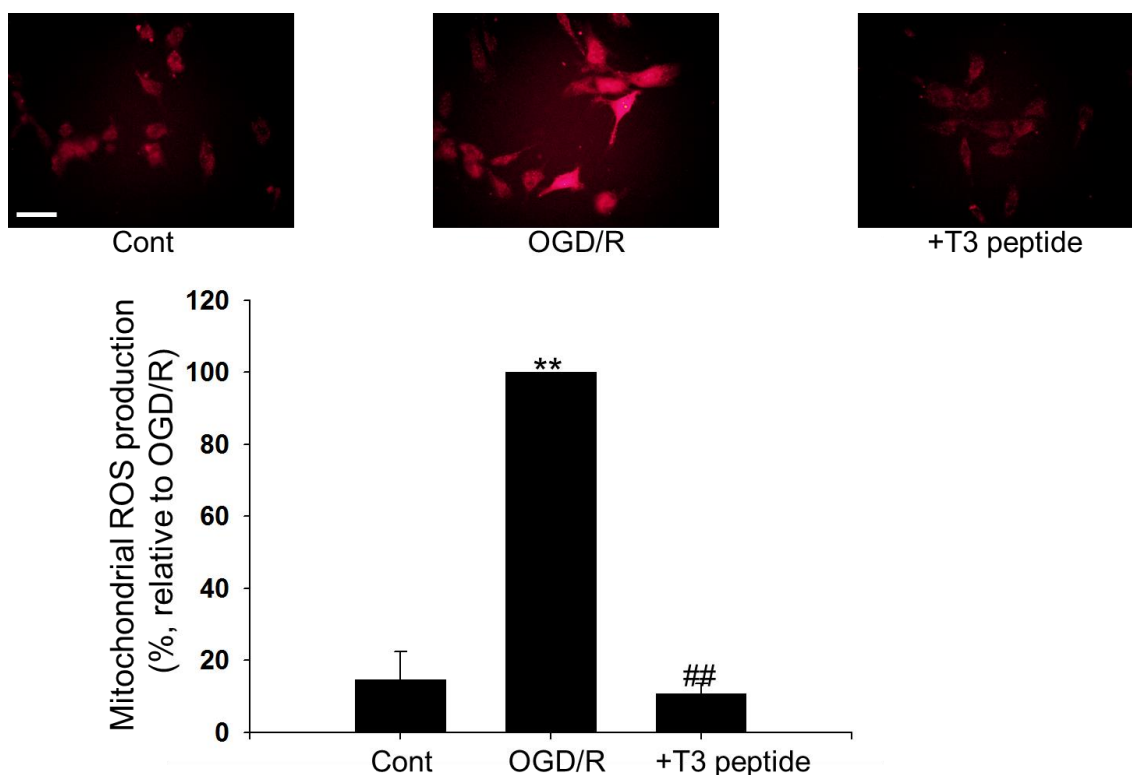


図 23 OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞内のミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす T3 peptide の影響

H9c2 心筋芽細胞を通常培地・通常酸素 (Cont)、OGD 単独刺激あるいは T3 peptide (300 ng/ml, OGD と共処置) 存在下で OGD の条件で 12 時間培養した後、通常培地、通常酸素下で 1 時間培養した (OGD/R)。H9c2 心筋芽細胞に Mito SOX Red 試薬 (5 μ M, 10 分間) を処置し、細胞内 ROS 産生を蛍光顕微鏡で観察した。

(上図) 代表的な Mito SOX Red 染色像 (赤色蛍光)。スケールバーは 50 μ m を表す。

(下図) 画像解析ソフト (Image J) を用いて Mito SOX Red 蛍光強度を計測し、OGD/R 単独刺激に対する比で表し平均値 \pm 標準誤差で示した (n=5)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, ## $P < 0.01$ vs. OGD/R-alone stimulation.

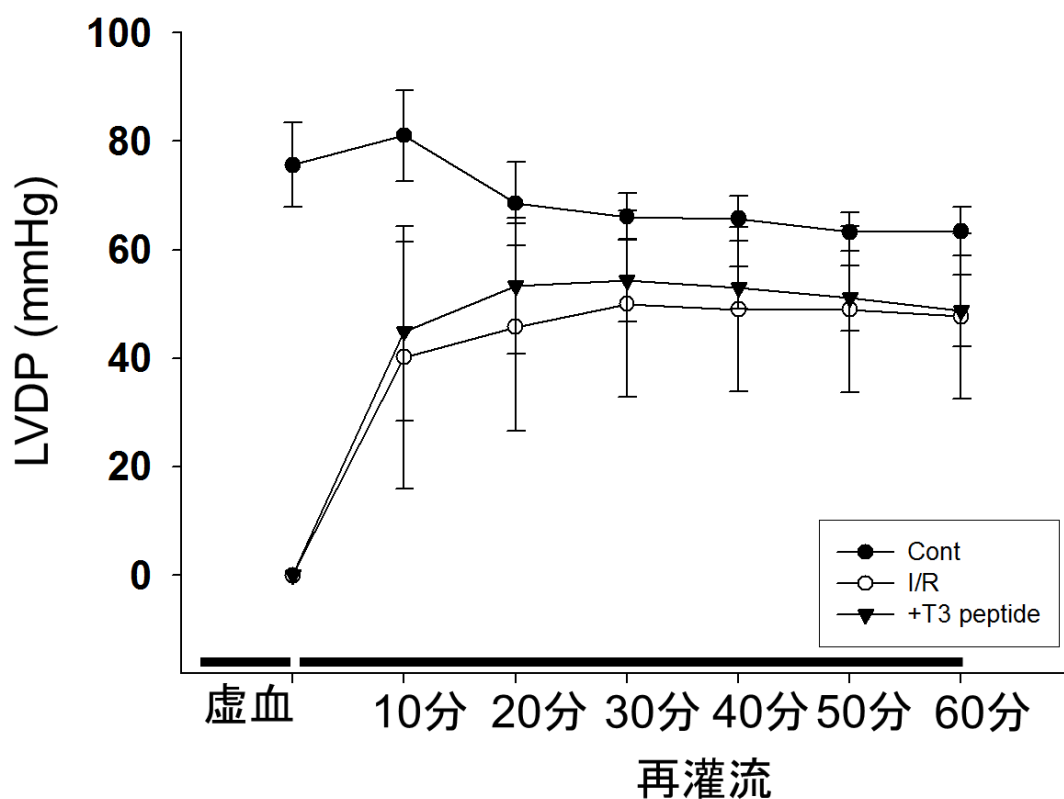


図 24 I/R 誘導性左室発生圧 (left ventricular developed pressure: LVDP) の経時的変化に及ぼす T3 peptide の影響

ラット摘出心臓標本を用いて ex vivo I/R モデルを作製した。ラット摘出心臓標本の左心房からバルーンカテーテルを挿入して、圧トランスデューサーに接続した。栄養液を持続的に灌流 (Cont, 黒丸)、I/R 単独刺激 (白丸) あるいは T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置) 存在下で I/R (下向き黒三角) の条件で、左心室内腔圧を測定した。再灌流直後から 10 分毎の左室発生圧 (LVDP: 最大収縮期圧から拡張末期圧を除いて求めた) を算出し平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。

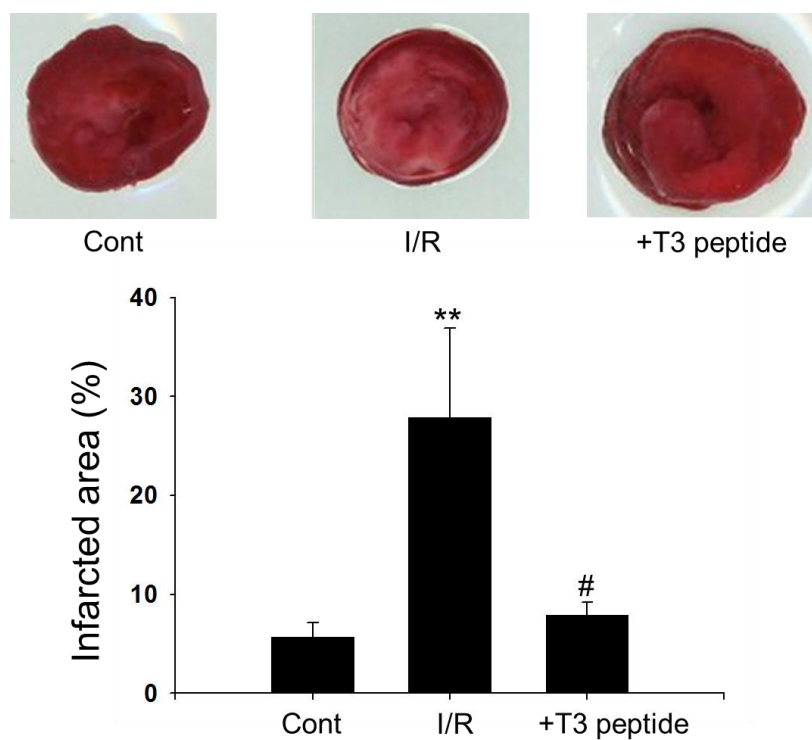


図 25 I/R 誘導性心筋梗塞領域形成に及ぼす T3 peptide の影響
 栄養液を持続的に灌流 (Cont)、I/R 単独刺激あるいは T3 peptide
 (300 ng/ml, 10 分間前処置) 存在下で I/R 刺激した心臓標本を
 -80 °C で凍結した。心尖部より約 3 mm の部分で 2 mm 厚の輪切り
 標本を作製し、2, 3, 5,-triphenyl tetrazolium chloride (TTC, 1%) 溶
 液で染色した。

(上図) 代表的な TTC 染色像 (生存領域: 赤色、梗塞領域: 白色) (n=3)。

(下図) 画像解析ソフト (Image J) を用いて TTC 未染色領域の面積を
 計測し、Cont で補正した値を平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。

** $P < 0.01$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. I/R-alone stimulation.

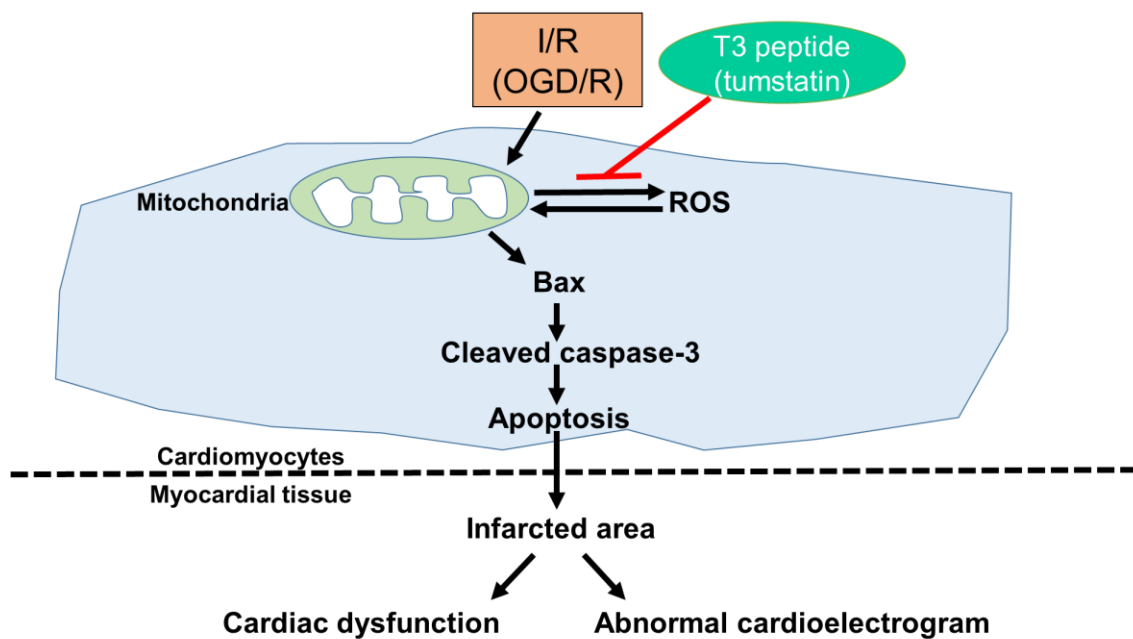


図 26 モデル

H9c2 心筋芽細胞における *in vitro* I/R (OGD/R) 刺激はミトコンドリア由来 ROS 産生の増加により、Bax/cleaved caspase-3 経路の活性化を介してアポトーシスを誘導する。またラット摘出心臓標本における *ex vivo* I/R 刺激は梗塞領域を形成し、それによる左室収縮機能および拡張機能低下や心電図異常が起こる。T3 peptide はミトコンドリア由来 ROS 産生の阻害を介して I/R 誘導性心筋細胞死を抑制することにより梗塞領域の減少、心機能低下および心電図以上の抑制すなわち心保護作用を示す可能性が示唆された。

	Cont	I/R	+T3 peptide
LVDP (mmHg)	68.56±7.68	45.76±19.05	53.36±12.48
LVEDP (mmHg)	-16.20±9.03	5.37±11.09	3.26±7.72
Max dP/dt (mmHg/s)	2701.47±123.12	2190.60±727.47	2373.31±389.96
Min dP/dt (mmHg/s)	-1847.46±34.01	-1715.05±387.59	-1759.65±226.4
Heart Rate (beat per minutes)	164.52±36.07	202.42±32.04	245.86±20.08

表 1 I/R 誘導性左心室機能低下と心拍数増加に及ぼす T3 peptide の影響

ラット摘出心臓標本の左心房からバルーンカテーテルを挿入して、圧トランスデューサーに接続した。栄養液を持続的に灌流 (Cont)、I/R 単独刺激あるいは T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置)存在下で I/R 刺激し、左心室内腔圧を測定した。再灌流 20 分後における左室機能を計測し平均値±標準誤差で示した(n=3)。

LVDP, left ventricular developed pressure (左心室発生圧)

LVEDP, left ventricular end diastolic pressure (左室拡張末期圧)

Max dP/dt,最大収縮速度

Min dP/dt,最大弛緩速度

Heart Rate,心拍数

	Cont	I/R	+T3 peptide
RR Interval (msec)	418.30±112.50	272.43±35.61	247.60±20.84
PR Interval (msec)	46.28±3.06	33.57±8.95	30.90±4.11
QRS Interval (msec)	17.60±1.65	39.39±6.43*	17.47±3.03 [#]

表 2 I/R 誘導性心電図変化に及ぼす T3 peptide の影響

ラット摘出心臓標本の心基部に陰極、心尖部に陽極を設置した。栄養液を持続的に灌流(Cont)、I/R 単独刺激あるいは T3 peptide (300 ng/ml, 10 分間前処置)存在下で I/R 刺激している間、心電図を測定した。再灌流 20 分後における測定値を平均値±標準誤差で示した(n=3)。

* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. I/R-alone stimulation。

RR Interval, RR 間隔

PR Interval, PR 間隔

QRS Interval, QRS 間隔

4. 考察

本章では、tumorstatin 活性断片 T3 peptide が *in vitro* OGD/R モデルにおいて H9c2 心筋芽細胞死を抑制すること、また *ex vivo* I/R モデル灌流心において梗塞領域の減少とそれに伴う心機能の低下や心電図変化を改善するという心保護作用を示すことを初めて明らかにした(図 26)。

本研究において、H9c2 心筋芽細胞において OGD/R (12 時間/3 時間)刺激により細胞死が起こることを確認した。そして T3 peptide (30-1000 ng/ml)はこの OGD/R 誘導性 H9c2 心筋芽細胞死を 300 ng/ml をピークとして有意に抑制した(図 20)。また T3 peptide は OGD/R (12 時間/1 時間)誘導性 Bax/cleaved caspase-3 経路の活性化を抑制する傾向を示した(図 21)。I/R 障害による心筋細胞死の誘導因子の 1 つが細胞内 ROS である。本研究において T3 peptide は OGD/R (12 時間/1 時間)誘導性細胞内 ROS 産生亢進を有意に抑制した(図 22)。これらは第三章において T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞の H₂O₂ 誘導性細胞内 ROS 産生亢進抑制を介して細胞保護作用を示すという結果と一致した。また T3 peptide は OGD/R (12 時間/1 時間)誘導性ミトコンドリア由来 ROS 産生亢進を有意に抑制した(図 23)。以上の結果から、T3 peptide はミトコンドリアにおける ROS 産生抑制作用を介して *in vitro* I/R (OGD/R モデル)による心筋細胞死を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、その詳細な作用機序は未解明のままである。I/R はミトコンドリア膜電位を低下させ、ミトコンドリアに存在する NOX 2 や NOX 4 を活性化することで ROS 産生を増加させる [39]。またミトコンド

リア内部には抗酸化酵素である SOD-2 が存在している [39]。T3 peptide はミトコンドリアにおいて NOX 活性阻害による ROS 産生の抑制あるいは SOD-2 活性化による ROS 除去の亢進により抗酸化作用を示す可能性が考えられるが、第三章で述べたように T3 peptide の抗酸化作用の詳細な機序解明のためには更なる検討が必要である。

これまでに、ラット摘出心臓標本では 30 分間の虚血後、再灌流を 60 分間行うことで梗塞領域が形成されることや心臓組織中に酸化ストレスの指標である脂質過酸化物質 malondialdehyde が蓄積することが報告されている [41, 102]。そこで同様の *ex vivo* I/R モデル(灌流心)を用いて検討を行ったところ、T3 peptide (300 ng/ml)の 10 分間前処置は I/R 誘導性梗塞領域形成を有意に抑制した(図 25)。また T3 peptide は再灌流 20 分後において I/R 誘導性 LVDP 低下、LVEDP 上昇および Max dP/dt と Min dP/dt の減少を抑制する傾向を示し(図 24,表 1)、心機能低下を改善した。更に T3 peptide は I/R 誘導性 QRS 間隔延長を有意に抑制した(表 2)。LVEDP 上昇の原因として心筋梗塞領域形成に伴う左室心筋硬度の増加、左室不均一性や Ca^{2+} 動態変化による心筋細胞の不活性化が知られている [114]。QRS 間隔延長は虚血性心疾患における心筋傷害に伴い起こる左脚ブロックの特徴的な所見であり [16]、左室収縮機能不全と関連する [65]。以上のことから、T3 peptide は I/R 誘導性心筋梗塞領域形成を阻害することで左室収縮機能および拡張機能低下と QRS 延長を抑制したと考えられる。一方で T3 peptide が心筋細胞の Ca^{2+} 動態に影響を及ぼすかは不明であり、今後更なる検討が必要である。加えて本研究では I/R において心拍数の増加と

RR 間隔の短縮傾向が認められ、T3 peptide はこれらを促進する傾向が認められた(表 1,表 2)。右心房のペースメーカー細胞には T 型 Ca^{2+} チャネルが発現しており、ペースメーカー電位発生に重要な役割を果たしている[5]。Tumstatin は第一章で検討した endostatin と構造が類似している[26]ことから、tumstatin の活性断片である T3 peptide も右房心筋細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル調節を介して心拍数に影響を及ぼす可能性が考えられる。

結論として本章では、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 I/R 誘導性心筋細胞死を抑制することを初めて明らかにした。また ex vivo では I/R 誘導性左室機能低下および心電図異常の抑制傾向を示すことも初めて明らかにした。その作用機序の 1 つは第三章で明らかにした細胞内 ROS 産生の抑制作用であると考えられる。第二章において tumstatin 発現はラット心筋梗塞モデルの梗塞領域で減少することを明らかにした。これらの結果から、tumstatin は心筋梗塞や I/R 障害に対して抗酸化作用を介して心保護作用を持つが、その発現低下が病態発症・進展の一因となる可能性が示唆された。したがって本章の成果はこれまでの結果と併せて、tumstatin あるいは T3 peptide が新規の虚血性心疾患治療戦略を生み出す基盤となり得ることを示唆するものである。

VI. 総括

[背景]

虚血性心疾患や高血圧性心疾患はわが国を含め世界各国における主要な死亡原因である。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心臓の組織構造と機能の変化すなわち心リモデリングを引き起こす。心リモデリングの制御機構については未だ不明な点が多く残されており、現在のところそれを主な標的とした心不全治療戦略は確立されていない。虚血性心疾患や高血圧性心肥大などの心疾患における心リモデリングにおいて、ECM産生と同時にECM分解酵素MMPsが活性化することが知られている。これに続発するECMの分解を介して生理活性をもつ分解断片matricryptinsが産生されることが最近の研究で明らかとなった。基底膜ECMに由来するmatricryptinsの発現レベルが心疾患において変動することが近年報告されているが、その詳細な役割は解明されていない。

最も研究が進んでいるmatricryptinsであるXVIII型コラーゲン由来のendostatinは慢性心不全患者の血中、または圧負荷誘発心肥大や心筋梗塞モデル動物の心臓組織中において発現レベルが増加する。またラット心筋梗塞モデルへのendostatin中和抗体投与が非梗塞領域の心リモデリングを悪化させるという報告もあり、endostatinが心保護的に働く可能性が示唆されていたが、その詳細な作用機序は全く明らかにされていなかった。本研究の第一章では、endostatinが心筋細胞機能に影響を及ぼすのではないかという仮説を立て、心肥大や不整脈に関わるT型Ca²⁺チャネル

電流に及ぼす endostatin の影響を、モルモット単離心室筋細胞を用いて検討した。

Tumstatin は IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖 C 末端非コラーゲン領域に由来し、抗血管新生作用と抗腫瘍作用を示す。ウサギ圧負荷誘発心肥大モデルやブタ I/R 障害モデルの心臓組織において tumstatin 発現レベルが変動することが報告されているが、その心臓に及ぼす影響については検討がなされていない。本研究の第二章では心臓の線維化やリモデリングに重要な役割を持つ心線維芽細胞機能に及ぼす tumstatin の影響を活性断片 T3 peptide を用いて検討した。次に第三章では H9c2 心筋芽細胞を用いて H_2O_2 誘導性アポトーシスに及ぼす T3 peptide の影響を検討した。最後に第四章において、I/R 誘導性心筋障害に及ぼす T3 peptide の影響を *in vitro* および *ex vivo* で検討した。

[方法・結果]

(第一章)

XVIII 型コラーゲン C 末端より産生される 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。また循環器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 endostatin 発現が亢進することも報告されている。T 型 Ca^{2+} チャネルは、心肥大、心筋梗塞や心不全など病態時の心室筋細胞膜上において発現し、心肥大や不整脈の発症・進展に関与すると考えられている。Endostatin はヒト神経膠芽腫細胞株 U87 細胞において T 型 Ca^{2+} チャネル阻害を介して増殖と遊走を抑制することが報告された。そこで第一章では endostatin が心室筋細胞

の T 型 Ca^{2+} チャネル活性に及ぼす影響を検討するため、T 型 Ca^{2+} チャネルを発現するモルモットの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た。Endostatin は心筋収縮に関与する L 型 Ca^{2+} チャネル活性には影響を及ぼさなかったが、T 型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制することが初めて明らかとなった。Endostatin は T 型 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 [107]。

(第二章)

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。Tumstatin は IV 型コラーゲンより産生され、抗血管新生作用と抗腫瘍作用を示す。またウサギ圧負荷誘発心肥大モデルやブタ I/R 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いることから tumstatin と心疾患との関連が示唆されている。そこで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 の影響を活性断片 T3 peptide を用いて検討した。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 は心線維芽細胞の増殖と遊走に関わる Akt とその下流シグナル因子である p70S6K のリン酸化を有意に亢進し、PI3K/Akt 経路阻害薬 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 $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンの阻害薬 cilengitide は T3 peptide 誘導性増殖および Akt リン酸化亢進を抑制した。心筋梗塞モデルラットの心臓組織において tumstatin タンパク質発現レベルが減少していた。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明らかにした。これは tumstatin が心線維芽細胞の活性化を介して心筋梗塞後の創傷治癒を促進する可能性を示唆する知見である [109]。

(第三章)

これまでに tumstatin 発現レベルがブタ I/R 障害モデルの心筋細胞や微小血管周囲の基底膜で減少することが報告されている。また本研究の第二章では心筋梗塞モデルラットの心臓組織において tumstatin 発現レベルが減少することを明らかにした。以上のことから、tumstatin が心疾患発症・進展において何らかの役割を担う可能性が示唆されるが、心筋細胞に及ぼす影響は検討されていない。心筋梗塞における I/R 障害は ROS 産生の増加を介して心筋細胞死を誘導する。そこで第三章では ROS の一種 H_2O_2 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_2O_2 誘導性生細胞数の低下、核の濃縮と断片化(アポトーシス様変化)及びアポトーシス関連タンパク質 caspase-3 の活性化すなわち cleaved caspase-3 発現誘導を有意に抑制した。さらにミトコンドリアの形態と膜電位を観察したところ、T3 peptide は caspase-3 活性化に関わる H_2O_2 誘導性ミトコンドリアの断片化と膜電位の低下を有意に抑制した。次にミトコンドリア膜電位低下の原因の1つである細胞内 ROS 産生を検討したところ、T3 peptide は H_2O_2 誘導性 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 がインテグリンへの結合を介して

H₂O₂ 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。これは tumstatin あるいはその活性断片 T3 peptide が虚血性心疾患に対する新規治療薬開発の礎となり得ることを提示するものである [108]。

(第四章)

第三章において tumstatin が I/R 障害に対し保護的に働く可能性が示唆された。第四章では、*in vitro* および *ex vivo* I/R 障害モデルを用いて tumstatin の心保護作用を検討した。*In vitro* においては、H9c2 心筋芽細胞を低栄養・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(OGD/R)で誘導した細胞死を T3 peptide は有意に抑制し、アポトーシス関連タンパク質 cleaved caspase-3 および Bax 発現増加を抑制する傾向を示した。また T3 peptide は細胞内 ROS 産生およびミトコンドリア由来 ROS 産生を有意に抑制した。ランゲンドルフ灌流装置を用いたラット摘出心臓組織における *ex vivo* の実験では、栄養液を灌流停止(虚血)後に再灌流すること(I/R)で左心室収縮および拡張機能が低下し心拍数が増加した。また I/R により心電図における RR 間隔の短縮と QRS 間隔の有意な延長が観察された。さらに I/R により塩化トリフェニルテトラゾリウムに未染色の梗塞領域が形成された。T3 peptide は I/R 誘導性左心室機能低下を抑制する傾向と心拍数および RR 間隔短縮を促進する傾向を示し、QRS 間隔延長および梗塞サイズを有意に減少させた。以上のことから、T3 peptide は I/R 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 I/R 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 あるいは T3 peptide が新規の虚血性心疾患治療戦略を生み出す基盤となり得ることを示唆するものである。

[考察と結論]

本研究の第一章では、モルモット単離心室筋細胞を用いた検討から、endostatin が心肥大や不整脈の発症・進展に関わると考えられる T 型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制することを明らかにした。また第二章では tumstatin 活性断片 T3 peptide がラット心線維芽細胞の増殖と遊走能を亢進することやラット心筋梗塞モデルの梗塞領域で tumstatin 発現が減少することを明らかにし、tumstatin が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示した。第三章では T3 peptide が H9c2 心筋芽細胞において酸化ストレス誘導性アポトーシスを抑制すること、さらに第四章では T3 peptide が I/R 誘導性心筋障害を抗酸化作用により抑制することを明らかにし、tumstatin が心筋梗塞による障害に対し保護的に働く可能性が示唆された。以上の結果から、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、心保護的に働く可能性が示唆された。今後これらの matricryptin が心疾患に対する新規治療薬開発の標的分子となることが大いに期待される (図 27)。

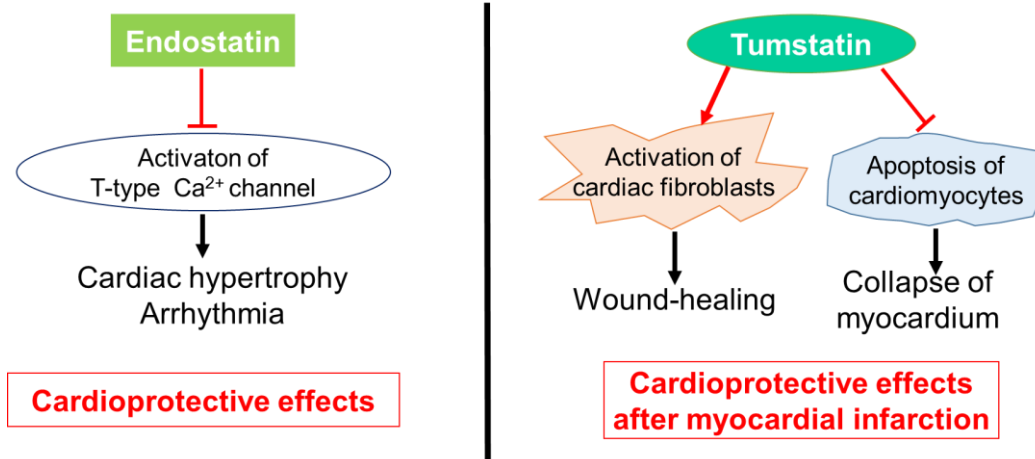


図 27 本研究の総括

Endostatin および tumstatin は心臓組織ならびにその構成細胞において抗血管新生作用以外の生理活性を示した。Endostatin は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 Ca²⁺チャネル活性の阻害を介して心保護作用を示す可能性が示唆された。一方、tumstatin は心線維芽細胞の増殖と遊走能亢進による創傷治癒の促進と心筋細胞におけるアポトーシス阻害作用を介して虚血性心疾患に対して保護的に働く可能性が示唆された。

VII. 謝辞

本研究の計画、遂行および論文作成にあたり、熱心かつ丁寧な御指導・御教授を賜りました北里大学獣医学部獣医薬理学研究室、山脇英之教授、岡田宗善准教授に深く感謝の意を表します。

また本研究遂行にあたりご助力いただきました福沢動物病院・福井佳奈氏および獣医薬理学研究室の皆様にご心から感謝を申し上げます。

VIII. 引用文献

1. Ambrosy, A., Goldsmith, S. R. and Gheorghide, M. 2011. Tolvaptan for the treatment of heart failure: a review of the literature. *Expert Opin. Pharmacother.* **12**: 961-976.
2. Becker, L. B. 2004. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.* **61**: 461-470.
3. Berk, B. C., Fujiwara, K. and Lehoux, S. 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J. Clin. Invest.* **117**: 568-575.
4. Bladen, C. and Zamponi, G. W. 2012. Common mechanisms of drug interactions with sodium and T-type calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **82**: 481-487.
5. Bladen, C., Hamid, J., Souza, I. A. and Zamponi, G. W. 2014. Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Mol. Brain.* **7**: 36.
6. Brown, R. D., Jones, G. M., Laird, R. E., Hudson, P. and Long, C. S. 2007. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**: 200-205.
7. Burgess, J. K., Boustany, S., Moir, L. M., Weckmann, M., Lau, J. Y., Grafton, K., Baraket, M., Hansbro, P. M., Hansbro, N. G., Foster, P. S., Black, J. L., and Oliver, B. G. 2010. Reduction of tumstatin in asthmatic airways contributes to angiogenesis,

- inflammation, and hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**: 106-115.
8. Chen, M., Wang, M., Yang, Q., Wang, Z., Zhu, Y., Zhang, Y., Wang, C., Jia, Y., Li, Y., and Wen, A. 2016. Antioxidant effects of hydroxysafflor yellow A and acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int. J. Mol. Med.* **37**: 1501-1510.
 9. Chen, X., Abair, T. D., Ibanez, M. R., Su, Y., Frey, M. R., Dise, R. S., Polk, D. B., Singh, A. B., Harris, R. C., Zent, R., and Pozzi, A. 2007. Integrin α 1beta1 controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 3313-3326.
 10. Chiang, C. S., Huang, C. H., Chieng, H., Chang, Y. T., Chang, D., Chen, J. J., Chen, Y. C., Chen, Y. H., Shin, H. S., Campbell, K. P. and Chen, C. C. 2009. The $\text{Ca}_v3.2$ T-type Ca^{2+} channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* **104**: 522-530.
 11. Clozel, J. P., Ertel, E. A. and Ertel, S. I. 1999. Voltage-gated T-type Ca^{2+} channels and heart failure. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **111**: 429-437.
 12. Cochain, C., Channon, K. M. and Silvestre, J. S. 2013. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *AntioxidRedox Signal.* **18**: 1100-1113.

13. Crabtree, G. R. 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* **276**: 2313-2316.
14. Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y. J. and Kitsis, R. N. 2004. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ. Res.* **95**: 957-970.
15. Damico, R., Kolb, T. M., Valera, L., Wang, L., Houston, T., Tedford, R. J., Kass, D. A., Rafaels, N., Gao, L., Barnes, K. C., Benza, R. L., Rand, J. L., Hamid, R., Loyd, J. E., Robbins, I. M., Hemnes, A. R., Chung, W. K., Austin, E. D., Drummond, M. B., Mathai, S. C. and Hassoun, P. M. 2015. Serum endostatin is a genetically determined predictor of survival in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**: 208-218.
16. Das, M. K., Cheriparambil, K., Bedi, A., Kassotis, J., Reddy, C. V., Makan, M., Dunbar, C. C. and Saul, B. 2001. Prolonged QRS duration (QRS \geq 170 ms) and left axis deviation in the presence of left bundle branch block: A marker of poor left ventricular systolic function? *Am. Heart J.* **142**: 756-759.
17. Diez, C., Nestler, M., Friedrich, U., Vieth, M., Stolte, M., Hu, K., Hoppe, J. and Simm, A. 2001. Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation. *Cardiovasc. Res.* **49**: 731-740.
18. Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L. E., Schoen, F. J., Kelly, R. A., Werb, Z., Libby, P. and Lee, R. T. 2000. Targeted deletion of matrix

- metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* **106**: 55-62.
19. Fix, C., Bingham, K. and Carver, W. 2011. Effects of interleukin-18 on cardiac fibroblast function and gene expression. *Cytokine* **53**: 19-28.
20. Gardai, S. J., Hildeman, D. A., Frankel, S. K., Whitlock, B. B., Frasch, S. C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D. L. and Henson, P. M. 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **279**: 21085-21095.
21. Givvimani, S., Tyagi, N., Sen, U., Mishra, P. K., Qipshidze, N., Munjal, C., Vacek, J. C., Abe, O. A. and Tyagi, S. C. 2010. MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3 in transition from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure. *Arch. Physiol. Biochem.* **116**: 63-72.
22. Goebel, B., Gjesdal, O., Kottke, D., Otto, S., Jung, C., Lauten, A., Figulla, H. R., Edvardsen, T. and Poerner, T. C. 2011. Detection of irregular patterns of myocardial contraction in patients with hypertensive heart disease: a two-dimensional ultrasound speckle tracking study. *J. Hypertens.* **29**: 2255-2264.
23. Gorlach, A., Bertram, K., Hudcova, S. and Krizanova, O. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* **6**: 260-271.

24. Gouya, G., Siller-Matula, J. M., Fritzer-Szekeres, M., Neuhold, S., Storka, A., Neuhofer, L. M., Clodi, M., Hulsmann, M., Pacher, R. and Wolzt, M. 2014. Association of endostatin with mortality in patients with chronic heart failure. *Eur. J. Clin. Invest.* **44**: 125-135.
25. Granger, C. B., McMurray, J. J., Yusuf, S., Held, P., Michelson, E. L., Olofsson, B., Ostergren, J., Pfeffer, M. A. and Swedberg, K. 2003. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet* **362**: 772-776.
26. Grant, M. A. and Kalluri, R. 2005. Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **70**: 399-410.
27. Hamano, Y. and Kalluri, R. 2005. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**: 292-298.
28. Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. and Kalluri, R. 2003. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* **3**: 589-601.
29. Hara, Y., Yamawaki, H., Shimada, M., Okada, K., Tanai, T.,

- Ichikawa, D., Miyake, K. and Kizaki, K. 2007. Anticholinergic effects of artemisinin, an antimalarial drug, in isolated guinea pig heart preparations. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 697-702.
30. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **123**: 92-100.
31. Hayashidani, S., Tsutsui, H., Ikeuchi, M., Shiomi, T., Matsusaka, H., Kubota, T., Imanaka-Yoshida, K., Itoh, T. and Takeshita, A. 2003. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**: H1229-1235.
32. Hori, M., Sasayama, S., Kitabatake, A., Toyo-oka, T., Handa, S., Yokoyama, M., Matsuzaki, M., Takeshita, A., Origasa, H., Matsui, K. and Hosoda, S. 2004. Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *Am. Heart J.* **147**: 324-330.
33. Huang, J., Liu, Z., Xu, P., Zhang, Z., Yin, D., Liu, J., He, H. and He, M. 2017. Capsaicin prevents mitochondrial damage, protects cardiomyocytes subjected to anoxia/reoxygenation injury mediated by 14-3-3beta/Bcl-2. *Eur. J. Pharmacol.* **819**: 43-50.
34. Imoto, K., Kumatani, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2016.

- Endostatin is protective against monocrotaline-induced right heart disease through the inhibition of T-type Ca^{2+} channel. *Pflugers Arch.* **468**: 1259-1270.
35. Isobe, K., Kuba, K., Maejima, Y., Suzuki, J., Kubota, S. and Isobe, M. 2010. Inhibition of endostatin/collagen XVIII deteriorates left ventricular remodeling and heart failure in rat myocardial infarction model. *Circ. J.* **74**: 109-119.
36. Jaleel, N., Nakayama, H., Chen, X., Kubo, H., MacDonnell, S., Zhang, H., Berretta, R., Robbins, J., Cribbs, L., Molkenin, J. D. and Houser, S. R. 2008. Ca^{2+} influx through T- and L-type Ca^{2+} channels have different effects on myocyte contractility and induce unique cardiac phenotypes. *Circ Res.* **103**: 1109-1119.
37. Jong, P., Yusuf, S., Rousseau, M. F., Ahn, S. A. and Bangdiwala, S. I. 2003. Effect of enalapril on 12-year survival and life expectancy in patients with left ventricular systolic dysfunction: a follow-up study. *Lancet* **361**: 1843-1848.
38. Jugdutt, B. I. 2003. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* **108**: 1395-1403.
39. Kalogeris, T., Bao, Y. and Korthuis, R. J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* **2**: 702-714.
40. Kanazawa, H., Imoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017.

- Canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis through activation of integrin/focal adhesion kinase/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyoblasts. *PLoS One* **12**: e0173051.
41. Ke, Z., Liu, J., Xu, P., Gao, A., Wang, L. and Ji, L. 2015. The Cardioprotective Effect of Icariin on Ischemia-Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Potential Involvement of the PI3K-Akt Signaling Pathway. *Cardiovasc. Ther.* **33**: 134-140.
42. Kinoshita, H., Kuwahara, K., Takano, M., Arai, Y., Kuwabara, Y., Yasuno, S., Nakagawa, Y., Nakanishi, M., Harada, M., Fujiwara, M., Murakami, M., Ueshima, K. and Nakao, K. 2009. T-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation* **120**: 743-752.
43. 厚生労働省 . 2014. 平成 26 年患者調査の概況 .
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/d1/05.pdf>
2018/01/05 閲覧
44. 厚生労働省 . 2016. 平成 28 年厚生労働省人口動態統計の概況 .
http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei16/d1/11_h7.pdf 2018/01/05 閲覧
45. Krijnen, P. A., Nijmeijer, R., Meijer, C. J., Visser, C. A., Hack, C. E. and Niessen, H. W. 2002. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.* **55**: 801-811.
46. Kuo, C. Y., Chiu, Y. C., Lee, A. Y. and Hwang, T. L. 2015. Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia. *Mitochondrion* **23**: 7-16.

47. Lauten, A., Gerhard-Garcia, A., Suhr, F., Fischer, J. H., Figulla, H. R. and Bloch, W. 2014. Impact of ischemia-reperfusion on extracellular matrix processing and structure of the basement membrane of the heart. *PLoS One* **9**: e92833.
48. Lauten, A., Majos, E., Muhlich, A., Wahlers, T., Weider, S., Fischer, J. H., Figulla, H. R. and Bloch, W. 2009. Ischemia-reperfusion injury activates early extracellular matrix processing and expression of endostatin in the heart with differential effects of temperature. *Basic Res. Cardiol.* **104**: 559-569.
49. Lauten, A., Ferrari, M., Goebel, B., Rademacher, W., Schumm, J., Uth, O., Kiehntopf, M., Figulla, H. R., and Jung, C. 2011. Microvascular tissue perfusion is impaired in acutely decompensated heart failure and improves following standard treatment. *Eur. J. Heart Fail.* **13**: 711-717.
50. Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L. and Perez-Reyes, E. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α_1H . *Biophys. J.* **77**: 3034-3042.
51. Li, R., Xiao, J., Qing, X., Xing, J., Xia, Y., Qi, J., Liu, X., Zhang, S., Sheng, X., Zhang, X. and Ji, X. 2015. Sp1 Mediates a Therapeutic Role of MiR-7a/b in Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis via Mechanism Involving the TGF-beta and MAPKs Pathways in Cardiac Fibroblasts. *PLoS One* **10**: e0125513.

52. Li, Y. Y., Xiang, Y., Zhang, S., Wang, Y., Yang, J., Liu, W. and Xue, F. T. 2017. Thioredoxin-2 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting autophagy and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes. *Am. J. Transl. Res.* **9**: 1471-1482.
53. Lian, H., Ma, Y., Feng, J., Dong, W., Yang, Q., Lu, D. and Zhang, L. 2012. Heparin-binding EGF-like growth factor induces heart interstitial fibrosis via an Akt/mTor/p70s6k pathway. *PLoS One* **7**: e44946.
54. Liang, R., Xie, H. Y., Lin, Y., Li, Q., Yuan, C. L., Liu, Z. H. and Li, Y. Q. 2015. Intraperitoneal Perfusion Therapy of Endostar Combined with Platinum Chemotherapy for Malignant Serous Effusions: A Meta-analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**: 8637-8644.
55. Liu, Y. J., Leng, X. P., Du, G. Q., Wang, X. D., Tian, J. W. and Ren, M. 2015. Two-dimensional longitudinal strains and torsion analysis to assess the protective effects of ischemic postconditioning on myocardial function: a speckle tracking echocardiography study in rabbits. *Ultrasonics* **56**: 344-353.
56. Ma, Y., de Castro Bras, L. E., Toba, H., Iyer, R. P., Hall, M. E., Winniford, M. D., Lange, R. A., Tyagi, S. C. and Lindsey, M. L. 2014. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch.* **466**: 1113-1127.
57. Maeshima, Y., Yerramalla, U. L., Dhanabal, M., Holthaus, K. A.,

- Barbashov, S., Kharbanda, S., Reimer, C., Manfredi, M., Dickerson, W. M. and Kalluri, R. 2001. Extracellular matrix-derived peptide binds to $\alpha_v\beta_3$ integrin and inhibits angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**: 31959-31968.
58. Mao, C. Y., Lu, H. B., Kong, N., Li, J. Y., Liu, M., Yang, C. Y. and Yang, P. 2014. Levocarnitine protects H9c2 rat cardiomyocytes from H_2O_2 -induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Int. J. Med. Sci.* **11**: 1107-1115.
59. Mariyama, M., Leinonen, A., Mochizuki, T., Tryggvason, K. and Reenders, S. T. 1994. Complete primary structure of the human $\alpha 3(IV)$ collagen chain. Coexpression of the $\alpha 3(IV)$ and $\alpha 4(IV)$ collagen chains in human tissues. *J. Biol. Chem.* **269**: 23013-23017.
60. Martinez, M. L., Heredia, M. P. and Delgado, C. 1999. Expression of T-type Ca^{2+} channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**: 1617-1625.
61. Mitra, R. and Morad, M. 1986. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 5340-5344.
62. Monboisse, J. C., Senechal, K., Thevenard, J., Ramont, L., Brassart-Pasco, S. and Maquart, F. X. 2012. Matrikines: a new anticancer therapeutic strategy. *Biol. Aujourd'hui.* **206**: 111-123.
63. Monrad, E. S., McKay, R. G., Baim, D. S., Colucci, W. S., Fifer, M. A., Heller, G. V., Royal, H. D. and Grossman, W. 1984.

- Improvement in indexes of diastolic performance in patients with congestive heart failure treated with milrinone. *Circulation* **70**: 1030-1037.
64. Muller, A. L. and Dhalla, N. S. 2012. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail. Rev.* **17**: 395-409.
65. Murkofsky, R. L., Dangas, G., Diamond, J. A., Mehta, D., Schaffer, A. and Ambrose, J. A. 1998. A prolonged QRS duration on surface electrocardiogram is a specific indicator of left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**: 476-482.
66. Nikolova, A., Ablasser, K., Wyler von Ballmoos, M. C., Poutias, D., Kaza, E., McGowan, F. X., Moses, M. A., Del Nido, P. J. and Friehs, I. 2012. Endogenous angiogenesis inhibitors prevent adaptive capillary growth in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Ann. Thorac. Surg.* **94**: 1509-1517.
67. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285.
68. Oka, T., Akazawa, H., Naito, A. T. and Komuro, I. 2014. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ. Res.* **114**: 565-571.
69. Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Levosimendan inhibits interleukin-1beta-induced apoptosis through activation of Akt

- and inhibition of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **769**: 86-92.
70. Okada, M., Oba, Y. and Yamawaki, H. 2015. Endostatin stimulates proliferation and migration of adult rat cardiac fibroblasts through PI3K/Akt pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **750**: 20-26.
71. Okada, M., Murata, N. and Yamawaki, H. 2017. Canstatin stimulates migration of rat cardiac fibroblasts via secretion of matrix metalloproteinase-2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **312**: C199-C208.
72. Okada, M., Suzuki, A., Yamawaki, H. and Hara, Y. 2013. Levosimendan inhibits interleukin-1beta-induced cell migration and MMP-9 secretion in rat cardiac fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **718**: 332-339.
73. Okada, M., Morioka, S., Kanazawa, H. and Yamawaki, H. 2016. Canstatin inhibits isoproterenol-induced apoptosis through preserving mitochondrial morphology in differentiated H9c2 cardiomyoblasts. *Apoptosis* **21**: 887-895.
74. Okada, M., Watanabe, S., Matada, T., Asao, Y., Hamatani, R., Yamawaki, H. and Hara, Y. 2013. Inhibitory effects of psychotropic drugs on the acetylcholine receptor-operated potassium current (IK_{ACh}) in guinea-pig atrial myocytes. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 743-747.
75. Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.*

- 83:** 117-161.
76. Phalitakul, S., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2013. Vaspin prevents methylglyoxal-induced apoptosis in human vascular endothelial cells by inhibiting reactive oxygen species generation. *Acta Physiol. (Oxf)*. **209**: 212-219.
77. Porter, K. E. and Turner, N. A. 2009. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol. Ther.* **123**: 255-278.
78. Pugazhenti, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E. and Reusch, J. E. 2000. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 10761-10766.
79. Qian, J., Keyes, K. T., Long, B., Chen, G. and Ye, Y. 2011. Impact of HMG-CoA reductase inhibition on oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelium cells. *J. Cell. Biochem.* **112**: 2480-2489.
80. Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zheng, J. Z., Shi, X., Flynn, D. C. and Jiang, B. H. 2004. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**: C153-163.
81. Qin, X. Q., Xiang, Y., Guan, C. X., Zhang, C. Q. and Sun, X. H. 2001. Integrin-ligands binding reaction upregulates the antioxidant activity of rabbit bronchial epithelial cells. *Sheng*

- Li Xue Bao* **53**: 41-44.
82. Rathore, S. S., Curtis, J. P., Wang, Y., Bristow, M. R. and Krumholz, H. M. 2003. Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure. *JAMA* **289**: 871-878.
83. Ricard-Blum, S., and Salza, R. 2014. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* **23**: 457-463.
84. Roggia, M. F. and Ueta, T. 2015. α 5 β 1 Integrin/FAK/PGC-1 α Pathway Confers Protective Effects on Retinal Pigment Epithelium. *PLoS One* **10**: e0134870.
85. Rossi, M. A. 1998. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J. Hypertens.* **16**: 1031-1041.
86. Sandilands, E., Schoenherr, C. and Frame, M. C. 2015. p70S6K is regulated by focal adhesion kinase and is required for Src-selective autophagy. *Cell Signal.* **27**: 1816-1823.
87. Schram, K., Ganguly, R., No, E. K., Fang, X., Thong, F. S. and Sweeney, G. 2011. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration. *Endocrinology* **152**: 2037-2047.
88. Shah, M. S. and Brownlee, M. 2016. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ. Res.* **118**: 1808-1829.

89. Shewchuk, L. J., Bryan, S., Ulanova, M. and Khaper, N. 2010. Integrin beta3 prevents apoptosis of HL-1 cardiomyocytes under conditions of oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**: 324-330.
90. Shinde, A. V. and Frangogiannis, N. G. 2014. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **70**: 74-82.
91. Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G. and Tuluc, P. 2014. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **3**: 15-38.
92. Sugiyama, A., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Pathophysiological roles of canstatin on myofibroblasts after myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **807**: 32-43.
93. Sumi, M., Satoh, H., Kagohashi, K., Ishikawa, H. and Sekizawa, K. 2005. Increased serum levels of endostatin in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Lab. Anal.* **19**: 146-149.
94. The EPOCH study group. 2002. Effects of pimobendan on adverse cardiac events and physical activities in patients with mild to moderate chronic heart failure: the effects of pimobendan on chronic heart failure study (EPOCH study). *Circ. J.* **66**: 149-157.
95. Tytgat, J., Vereecke, J. and Carmeliet, E. 1990. Mechanism of cardiac T-type Ca channel blockade by amiloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **254**: 546-551.
96. Urbanska-Rys, H. and Robak, T. 2003. High serum level of

- endostatin in multiple myeloma at diagnosis but not in the plateau phase after treatment. *Mediators Inflamm.* **12**: 229-235.
97. Valente, A. J., Yoshida, T., Gardner, J. D., Somanna, N., Delafontaine, P. and Chandrasekar, B. 2012. Interleukin-17A stimulates cardiac fibroblast proliferation and migration via negative regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1/DUSP-1. *Cell Signal.* **24**: 560-568.
98. Vassort, G., Talavera, K. and Alvarez, J. L. 2006. Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Cell Calcium* **40**: 205-220.
99. Wang, F., Gao, H., Kubo, H., Fan, X., Zhang, H., Berretta, R., Chen, X., Sharp, T., Starosta, T., Makarewich, C., Li, Y., Molkenkin, J. D. and Houser, S. R. 2013. T-type Ca^{2+} channels regulate the exit of cardiac myocytes from the cell cycle after birth. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**: 122-130.
100. Wang, W., Chen, P., Tang, M., Li, J., Pei, Y., Cai, S., Zhou, X. and Chen, S. 2015. Tumstatin 185-191 increases the sensitivity of non-small cell lung carcinoma cells to cisplatin by blocking proliferation, promoting apoptosis and inhibiting Akt activation. *Am. J. Transl. Res.* **7**: 1332-1344.
101. Wang, Y., Xu, F., Chen, J., Shen, X., Deng, Y., Xu, L., Yin, J., Chen, H., Teng, F., Liu, X., Wu, W., Jiang, B. and Guo, D. A. 2011. Matrix metalloproteinase-9 induces cardiac fibroblast migration, collagen and cytokine secretion: inhibition by salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytomedicine* **19**: 13-19.

102. Wang, Z., Wu, G., Liu, H., Xing, N., Sun, Y., Zhai, Y., Yang, B., Kong, A. N., Kuang, H. and Wang, Q. 2017. Cardioprotective effect of the xanthenes from *Gentianella acuta* against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Biomed. Pharmacother.* **93**: 626-635.
103. Wei, J., Tong, J., Yu, L. and Zhang, J. 2016. EMF protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury via heat shock protein 70 activation. *Chem. Biol. Interact.* **248**: 8-17.
104. Wenzel, D., Schmidt, A., Reimann, K., Hescheler, J., Pfitzer, G., Bloch, W. and Fleischmann, B. K. 2006. Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation. *Circ. Res.* **98**: 1203-1211.
105. World Health Organization. 2017. Fact sheet.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
2018/01/05 閱覽
106. Yang, Q., Yang, K. and Li, A. Y. 2015. Trimetazidine protects against hypoxia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by increasing microRNA-21 expression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**: 3735-3741.
107. Yasuda, J., Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Endostatin inhibits T-type Ca²⁺ channel current in guinea pig ventricular myocyte. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1289-1291.
108. Yasuda, J., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. T3 peptide, an active fragment of tumstatin, inhibits H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **807**: 64-70.

109. Yasuda, J., Fukui, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. T3 peptide, a fragment of tumstatin, stimulates proliferation and migration of cardiac fibroblasts through activation of Akt signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **390**: 1135-1144.
110. Yasuda, J., Takada, L., Kajiwara, Y., Okada, M. and Yamawaki, H. 2015. Endostatin inhibits bradykinin-induced cardiac contraction. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1391-1395.
111. Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Omura, T., Kim, S., Yamagishi, H., Toda, I., Teragaki, M., Akioka, K., Iwao, H. and Yoshikawa, J. 1999. Effects of candesartan and cilazapril on rats with myocardial infarction assessed by echocardiography. *Hypertension* **33**: 961-968.
112. Zaja, I., Bai, X., Liu, Y., Kikuchi, C., Dosenovic, S., Yan, Y., Canfield, S. G. and Bosnjak, Z. J. 2014. Cdk1, PKCdelta and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**: 710-721.
113. Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, D., Zhang, D., Qian, Z., Liu, C. and Tao, J. 2012. Inhibition of T-type Ca²⁺ channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br. J. Pharmacol.* **166**: 1247-1260.
114. Zile, M. R. and Brutsaert, D. L. 2002. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* **105**: 1503-1508.

115. Zorn-Pauly, K., Schaffer, P., Pelzmann, B., Bernhart, E., Lang, P. and Koidl, B. 2004. L-type and T-type Ca^{2+} current in cultured ventricular guinea pig myocytes. *Physiol Res.* **53**: 369-377.