

肺動脈性肺高血圧症ラットの右心不全発症・進展における  
細胞外マトリックス関連タンパク質と線維芽細胞の役割解明

井本 圭亮

Elucidation of the role of extracellular matrix-related proteins and  
fibroblasts on initiation and progression of right heart failure in  
pulmonary arterial hypertensive rats

Keisuke Imoto

## 目次

I.緒言 .....	1
II.第一章. XVIII型コラーゲン分解断片 endostatin は右心室心筋細胞 の T 型 $Ca^{2+}$ チャネル活性抑制を介して肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 誘発右心不全を改善する .....	5
1.緒言 .....	6
2.実験材料および実験方法 .....	7
2-1.実験材料 .....	7
2-1-1.試薬 .....	7
2-1-2.一次抗体 .....	7
2-1-3.二次抗体 .....	8
2-1-4.使用動物 .....	8
2-1-5.使用細胞 .....	8
2-2.実験方法 .....	9
2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデル .....	9
2-2-2.右心室心筋細胞の単離 .....	9
2-2-3. RNA 抽出と polymerase chain reaction (PCR) .....	10
2-2-4. $Ca^{2+}$ チャネル電流測定(パッチクランプ法).....	10
2-2-5.タンパク質抽出と Western blotting.....	11
2-2-6. RNA 干渉法 .....	12
2-2-7.心エコー検査 .....	13
2-2-8.組織学的検索 .....	13
2-3.統計解析 .....	14
3.結果 .....	14
3-1. MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における $I_{CaT}$ の測定	

.....	14
3-2. MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における $I_{CaT}$ に及ぼす endostatin の影響 .....	15
3-3. siRNA 投与実験 .....	15
3-4. 組織学的検索 .....	16
4. 考察 .....	31
III. 第二章 . PAH モデルラットの右心室における <b>matricellular proteins</b> の発現動態 .....	34
1. 緒言 .....	35
2. 実験材料および実験方法 .....	35
2-1. 実験材料 .....	36
2-1-1. 試薬 .....	36
2-1-2. 使用動物 .....	36
2-2. 実験方法 .....	36
2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデル .....	36
2-2-2. 心エコー検査 .....	36
2-2-3. RNA 抽出と Real-time PCR .....	37
2-3. 統計解析 .....	37
3. 結果 .....	37
3-1. MCT 投与ラットにおける肺動脈圧、右心室収縮機能、右心室 組織重量の評価 .....	37
3-2. MCT 投与ラットの右心室における <b>matricellular proteins</b> mRNA 発現解析 .....	38
4. 考察 .....	48
IV. 第三章 . PAH モデルラットにおける右心室由来線維芽細胞 (RVFb)	

の形質転換 .....	52
1. 緒言 .....	53
2. 実験材料および実験方法 .....	53
2-1. 使用薬物 .....	55
2-1-1. 試薬 .....	55
2-1-2. 一次抗体 .....	55
2-1-3. 二次抗体 .....	55
2-1-4. 使用動物 .....	56
2-2. 実験方法 .....	56
2-2-1. RVFb の単離・培養 .....	56
2-2-2. 免疫蛍光染色 .....	57
2-2-3. タンパク質抽出と Western blotting .....	57
2-2-4. 細胞増殖能評価 [Cell counting assay 及び Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay] .....	57
2-2-5. 細胞遊走能評価 (Boyden chamber assay) .....	58
2-2-6. Gelatin zymography .....	59
2-2-7. RNA 抽出と Real-time PCR .....	59
2-2-8. $[Ca^{2+}]_i$ 測定 .....	59
2-3. 統計解析 .....	60
3. 結果 .....	60
3-1. MCT-RVFb における $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現 .....	60
3-2. MCT-RVFb における細胞増殖及び遊走能 .....	61
3-3. MCT-RVFb における MMP-9 の産生及び活性 .....	61
3-4. MCT-RVFb における細胞内シグナル分子の活性化 .....	62
3-5. MCT-RVFb における SOCE .....	62

3-6. MCT-RVFB における細胞増殖、遊走、MMP-9 産生能に各種阻 害薬が及ぼす影響 .....	62
4. 考察 .....	78
V. 第四章. POSTN は RVFB の iNOS 発現誘導を介して右心収縮機能障 害に関与する .....	82
1. 緒言 .....	83
2. 実験材料および実験方法 .....	84
2-1. 使用薬物 .....	84
2-1-1. 試薬 .....	84
2-1-2. 一次抗体 .....	84
2-1-3. 二次抗体 .....	85
2-1-4. 使用動物 .....	85
2-2. 実験方法 .....	85
2-2-1. POSTN 組換えタンパク質の作製 .....	85
2-2-2. MCT 誘導性 PAH モデル .....	87
2-2-3. RVFB の単離 .....	87
2-2-4. 細胞培養 .....	87
2-2-5. タンパク質抽出と Western blotting .....	88
2-2-6. 免疫組織化学染色 .....	88
2-2-7. NO 産生測定 .....	88
2-2-8. LTCC を介した Ca <sup>2+</sup> 流入の測定 .....	89
2-3. 統計解析 .....	89
3. 結果 .....	89
3-1. MCT 投与ラットの右心室における POSTN タンパク質発現	89
3-2. MCT 投与ラットの右心室における iNOS 発現 .....	90

3-3. MCT-RVfb における iNOS 発現、VASP, ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化 .....	90
3-4. POSTN 組換えタンパク質が RVfb の ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化に及ぼす影響 .....	90
3-5. POSTN 組換えタンパク質が RVfb の iNOS 発現と NO 産生に及ぼす影響 .....	91
3-6. POSTN 組換えタンパク質が RVfb の IL-1 $\beta$ 発現に及ぼす影響 .....	91
3-7. RVfb における POSTN 誘導性 iNOS 発現と NO 産生に及ぼす NF- $\kappa$ B、ERK1/2 及び JNK 阻害薬の影響 .....	91
3-8. POSTN で刺激した RVfb の培養上清が H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性に及ぼす影響 .....	92
4. 考察 .....	110
VI. 総括 .....	115
VII. 謝辞 .....	122
VIII. 引用文献 .....	123

## I. 緒言

肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)は、肺動脈壁のリモデリング・肥厚を介した内腔の狭窄による肺動脈圧の亢進(右心カテーテル検査で平均肺動脈圧が 25 mmHg 以上)を臨床所見とする慢性進行性疾患である[35]。我が国において PAH は難治性呼吸器疾患(指定難病)に指定されており、その患者数は年々増加傾向にある。PAH 患者における肺動脈圧亢進による右心後負荷の増大は右心肥大を誘発し、やがては致命的な右心不全を発症する[35,97,98]。20 年以上前までの PAH 治療には血管拡張作用を期待してカルシウム拮抗薬が使用されていたが、多くの PAH 患者にとって有効な治療法とは成り得なかった[94]。一方、1990 年代後半からはホスホジエステラーゼ 5 阻害薬、エンドセリン受容体拮抗薬やプロスタサイクリン製剤など数多くの肺動脈拡張薬が開発・臨床応用されるようになり、現在までに PAH 患者の予後や生存率はかなり改善されてきている[1]。しかしながら、突発性または家族性 PAH 患者を対象として国内で行われた調査によると現在の治療法を持ってしても患者の平均余命は 15 年程度であり、新たな PAH 治療法の開発が待ち望まれている[67]。PAH 患者の主な死亡原因は右心不全である[98]。このことから、右心不全の制御を標的とした治療法の開発が PAH 患者のさらなる予後改善に繋がることが期待される。現在、急性右心不全を発症した PAH 患者に対し、心機能の維持を目的としてミルリノンやドブタミンなどの強心薬を用いた対症療法が行われているが、これらの長期的予後改善効果のエビデンスは乏しい[55]。PAH 誘発右心不全を予防・治療するための新規薬物の開発が待ち望まれるが、そのためには未だ不明な点が多い PAH 誘発右心不全の発



症・進展機構の解明が喫緊の課題である。

細胞間隙に存在する細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)は組織構造の保持に働くコラーゲン、フィブロネクチンやプロテオグリカンなどで構成される高分子複合体であり、細胞-細胞間あるいは細胞-ECM間の情報伝達を媒介することで細胞増殖、遊走や分化など様々な細胞機能を調節する(図1)[2,93,96]。近年、心不全患者あるいは心疾患モデル動物において、ECM分解断片群 matricryptins や分泌型ECM成分 matricellular proteins などのECM関連タンパク質の血中濃度や心臓組織における発現が増加することが報告されている[23,73]。また、圧負荷誘発心肥大や心筋梗塞モデル動物において様々な matricellular proteins が心肥大や心線維化に関与することが明らかになっている[23]。一方、PAH患者やPAHモデル動物においても、いくつかのECM関連タンパク質の心臓における発現レベルが変動することが報告されている[4,25,34,65]。このことから、PAH誘発右心不全の発症・進展において、これらECM関連タンパク質が重要な役割を担う可能性が考えられるが、現在のところほとんど明らかにされていない。そこで本研究は、ECM関連タンパク質を介した右心不全の発症・進展機構を解明し、新規PAH誘発右心不全治療薬の標的となる因子を探索することを目的とした。

近年、PAH患者においてXVIII型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖由来の matricryptin である endostatin の血中濃度が増加することが報告されており、病態との関連が示唆されている[19]。そこで第一章では、PAH誘発右心不全の発症・進展における endostatin の病態生理学的役割の解明を目的とし、モノクロタリン(monocrotaline: MCT)誘導性PAHモデルラットの右心不全発症・進展における役割を検討した。PAHモデル動物の心臓において osteopontin (OPN)や tenascin (Tn) C

などいくつかの *matricellular proteins* 発現が亢進することが明らかになっているが[34,65]、未だ発現動態が不明なものが多く残されている。そこで第二章では、MCT 投与 2 週後の右心肥大あるいは 3 週後の右心不全を発症したラットの右心室における各種 *matricellular proteins* mRNA 発現の変化を検討した。心臓組織において非心筋細胞の大半を占める心線維芽細胞は、ECM 関連タンパク質の主要な産生源であり、心臓の恒常性維持において重要な役割を担う[2,11]。一方、心線維芽細胞は心疾患の発症・進展時に形質転換し、増殖、遊走や ECM 産生能などの亢進を介して病態形成に関わると考えられている[63]。しかしながら、PAH 誘発右心不全における右心室線維芽細胞の形質は不明である。そこで第三章では、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室由来線維芽細胞 (*right ventricular fibroblast: RVFb*) の形質を解析した。さらに第四章では、第二章において MCT 誘導性 PAH モデルラットの不全心において発現が増加することを明らかにした *periostin (POSTN)* が RVFb の機能調節を介して右心不全の発症要因と成り得るか検討した。

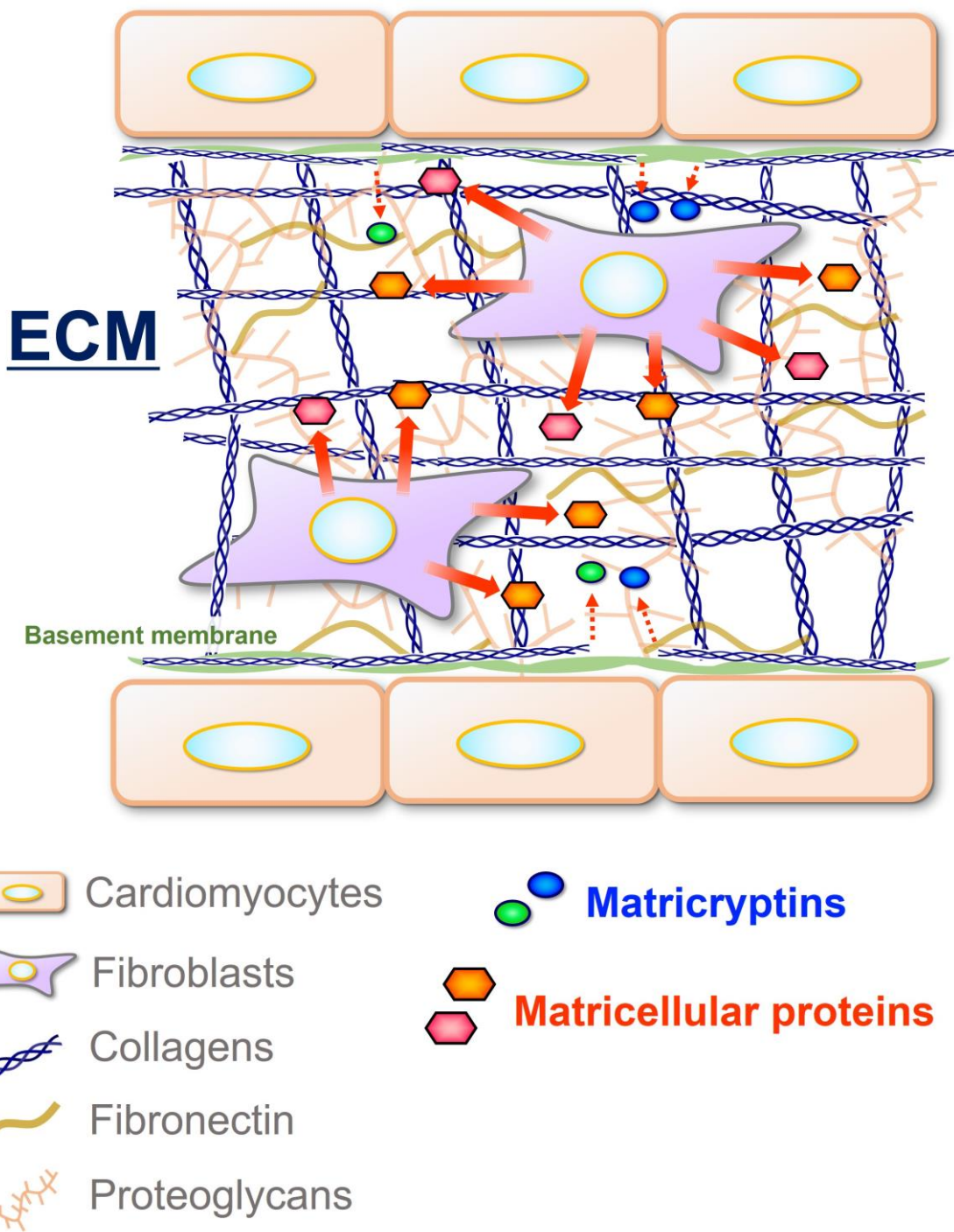


図 1 心臓細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の模式図

## II. 第一章

XVIII型コラーゲン分解断片 *endostatin* は右心室心筋細胞の T型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性抑制を介して PAH 誘発右心不全を改善する

## 1. 緒言

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の変化は、細胞増殖、遊走、分化、形質転換、ネクローシスやアポトーシスなど様々な細胞機能調節に関わる [6,9,29]。興奮性細胞における主要な  $\text{Ca}^{2+}$  流入装置である電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルには、L 型、P/Q 型、N 型、R 型及び T 型の 5 種のサブタイプがある [105]。心筋細胞には L 型と T 型が発現し、このうち高電位活性型の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel: LTCC) は、心筋細胞の興奮-収縮連関の開始を担う [53]。一方、低電位活性型の T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel: TTCC) は、平滑筋や腫瘍細胞の増殖、分泌細胞のホルモン分泌、神経細胞の活動電位の発火や心臓洞房結節における洞調律を制御することが知られている [105]。心室筋細胞においては、胎生期にのみ TTCC は発現し、生後 1 週間程でその発現は消失する [53]。しかしながら、PAH や全身性高血圧症による圧負荷誘発心肥大や拡張型心筋症を起こした心臓において、TTCC は心室筋細胞に再発現し、細胞内への持続する  $\text{Ca}^{2+}$  流入を介して  $\text{Ca}^{2+}$  依存性シグナル経路の活性化や電气的リモデリングを誘導し心肥大や不整脈発症の要因となる [14,50,91]。TTCC の孔形成  $\alpha 1$  サブユニットには  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $3.2$  及び  $3.3$  の 3 種のアイソフォームが存在する [105]。 $\text{Ca}_v3.2$  遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比べて圧負荷誘発心肥大が減弱することが報告されている [14]。

PAH 患者において、基底膜 ECM の構成成分である XVIII 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖の C 末端分解断片 endostatin の血中濃度が増加することが報告されている [19,88]。このことから PAH 誘発右心不全において endostatin が何らかの役割を担う可能性が考えられるが、未だ検討はなされていない。Endostatin は強力な抗血管新生作用を有する

内因性生理活性物質であり、中国では非小細胞性肺がんに対する抗腫瘍薬として認可されている[59,88]。一方、endostatinは神経膠芽腫細胞株U87においてTTCC活性阻害を介して増殖と遊走を抑制することも明らかにされている[108,109]。当研究室ではこれまで、ヒト、マウスやラットと異なり成体においてもTTCCを発現するモルモットの心室筋細胞において、endostatinがTTCC電流( $I_{CaT}$ )を抑制することを明らかにした[103]。そこで第一章では、MCT誘導性PAHモデルラットの右心室由来心筋細胞に再発現したTTCCの活性に及ぼすendostatinの影響を検討した。さらにRNA干渉法によるendostatin発現抑制がMCT投与ラットの右心不全発症・進展に及ぼす影響を検討することにより、PAH誘発右心不全におけるendostatinの病態生理学的役割を検討した。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2-1. 実験材料

#### 2-1-1. 試薬

MCT (和光純薬,大阪)、recombinant mouse endostatin、collagen 18  $\alpha$ 1 chain (COL18A1) small interfering RNA (COL18 siRNA)及び control (cont) siRNA (ニッポンジーン,富山)。

#### 2-1-2. 一次抗体

抗 total-actin (t-actin)抗体 (Sigma-Aldroch, St. Louis, MO, USA)、抗 endostatin 抗体 (Bioss, Woburn, MA, USA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。

### 2-1-3.二次抗体

Horseshoe peroxidase (HRP)標識抗ウサギ IgG 抗体及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)。

### 2-1-4.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承認後(承認番号 15-021)、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,東京)を使用した。ラットは使用時まで本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において室温  $23.0\pm 2$  °C、湿度 50-60%、12 時間/12 時間の概日周期下で、固形飼料(CE-2,日本クレア)を給餌し自由飲水で飼育した。

### 2-1-5.使用細胞

H9c2 心筋芽細胞 (passage 30-40, ATCC, Manassas, VA, USA)は、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Gibco/Life Technologies, UK)を含む 1%抗生物質-抗真菌剤混合溶液(100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 mg/ml amphotericin B,ナカライテスク,京都)添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich)中で培養した(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。コンフルエントになった細胞を 0.05% Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (ナカライテスク)により剥離後、10% FBS 添加 DMEM 中に懸濁して新たなシャーレに播種し継代した。細胞を 6-well シャーレに播種し、培養後に実験に用いた。

## 2-2.実験方法

### 2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデル

MCT を 1 N HCl により溶解後、1 N NaCl で pH7-8 に中和した。その後、滅菌生理食塩水を加えて 24 mg/ml の MCT 溶液とした。4-5 週齢の雄性 Wistar ラットに MCT (60 mg/kg) を単回腹腔内投与し、MCT 誘導性 PAH モデル(MCT 群)を作製した。対照群(Cont 群)には等量の滅菌生理食塩水を投与した。

### 2-2-2.右心室心筋細胞の単離

MCT あるいは滅菌生理食塩水の投与から 3 週後のラットにペントバルビタールナトリウム溶液(70 mg/kg, ナカライテスク)を腹腔内投与し、深麻酔した。その後、ラットに気管カニューレを挿管し、ベンチレーター(MODEL SN-480-7, シナノ製作所, 東京)による送気(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% O<sub>2</sub> で酸素化した 37 °C の normal 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-Tyrode 溶液[143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5.5 mM Glucose, 5 mM HEPES, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>-free normal HEPES-Tyrode 溶液は含まない), 1 N NaOH で pH7.4 に調整]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、Ca<sup>2+</sup>-free normal HEPES-Tyrode 溶液を 10 分間灌流した後、0.02% (w/v) コラゲナーゼ(和光純薬)添加 Ca<sup>2+</sup>-free normal HEPES-Tyrode 溶液を 40-60 分間灌流した。コラゲナーゼ処置後、修正 Kraft-Bruhe (KB) 溶液(70 mM KOH, 50 mM L-Glutamic acid, 40 mM KCl, 20 mM Taurine, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mM Glucose, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1N KOH で pH7.4 に



調整)を灌流して洗浄した後、心臓から右心室を分離し、修正 KB 溶液中で震盪することで心室筋細胞を単離した。細胞は 2-2-3.  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル電流測定で使用するまで 4 °C の冷蔵庫内で保存した。

### 2-2-3. RNA 抽出と polymerase chain reaction (PCR)

滅菌 TBS により洗浄した細胞を ISOGEN (和光純薬) または TRI REAGENT (Molecular Research Center, Montgomery, OH, USA) を用いて可溶化した後、定法に従いフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行って総 RNA を抽出した。1  $\mu\text{g}$  の総 RNA を ReverTra Ace qPCR master mix (東洋紡, 大阪) を用いて逆転写反応により cDNA にした後、Quick Taq (R) HS DyeMix (東洋紡) を用いて PCR を行った [94 °C, 2分 → (94 °C, 30秒 → 62 °C, 30秒 → 68 °C, 30秒,  $\text{Ca}_v3.1$ : 27 cycle,  $\text{Ca}_v3.2$ : 29 cycle,  $\text{Ca}_v3.3$ , glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 35 cycle)]。PCR 増幅産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動により分離した。Real-time PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて 96-well PikoReal リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により行った [95 °C, 1分 → (95 °C, 15秒 → 60 °C, 30秒), 40 cycle → 60 °C, 30秒]。全ての mRNA 発現量は  $\Delta\Delta\text{C}_q$  法により解析した。使用したプライマーの配列は表に示した (表 1)。

### 2-2-4. $\text{Ca}^{2+}$ チャネル電流測定 (パッチクランプ法)

$\text{Ca}^{2+}$ チャネル電流の測定と記録は Patch/Whole Cell Clamp Amplifier CEZ-2400 (日本光電, 東京) と Clampex 6.0 または 10 ソフトウェア (Molecular Devices/Axon Instruments, Union City, CA, USA) を用いてパッチクランプ法の voltage-clamp mode で行った。細胞を倒

立顕微鏡 (IMT-2, オリンパス, 東京) に装着した灌流槽 (1 ml) に播種し、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -free の bath 溶液 [137 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 1 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM CsCl, 5 mM Glucose, 10 N HCl で pH7.4 に調整] を流速 3 ml/分 で表面灌流した。灌流液の温度は  $37 \pm 1$  °C に保った。ガラスピペットはガラス管 (1.5 × 90 mm, MODEL G-1.5, ナリシゲ, 東京) をプーラー (MODEL PC-10, ナリシゲ) で引き伸ばして作製した。このガラスピペットに pipette 溶液 (125 mM CsOH, 5 mM ATP-Mg, 15 mM EGTA, 20 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 1 N CsOH で pH7.2 に調整) を充填してガラス電極とした。この状態のガラスピペットの電気抵抗は 2-3 M $\Omega$  であった。電極の先端を細胞膜に密着させギガオームシールを形成した後、電極内に陰圧をかけて細胞膜を破り whole-cell clamp 状態を形成した。その後、保持電位 -50 mV からテスト電位 0 mV への脱分極刺激を 10 秒おきに加えて約 5 分間安定化させた。保持電位を -90 mV とし、-80 mV から -60 mV まで 10 mV ずつ脱分極刺激を与えることで全  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流 [高電位活性型である LTCC 電流 ( $I_{\text{CaL}}$ ) と低電位活性型である TTCC 電流 ( $I_{\text{CaT}}$ ) を合わせたもの] を測定した。次に保持電位を -50 mV とし、-40 mV から -60 mV の脱分極刺激を与えることで、高電位活性型電流である  $I_{\text{CaL}}$  のみを測定した。 $I_{\text{CaT}}$  は全  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流と  $I_{\text{CaL}}$  の差分 (subtraction) をとることで評価した。各種薬物は bath 溶液中に溶解し、細胞に表面灌流することで処置した。

#### 2-2-5. タンパク質抽出と Western blotting

滅菌 Tris-buffered saline (TBS) で洗浄した細胞に、0.1% protease inhibitor mixture (ナカライテスク) 添加 lysis buffer [1% Triton X-100, 20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM

sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupetin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)]を加えて可溶化した。可溶化した抽出液を遠心分離(13,000 rpm, 4 °C, 10 分)後、上清を回収してタンパク質サンプルとした。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid 法(Pierce, Rockford, IL, USA)を用いて定量した。10  $\mu\text{g}$  のタンパク質サンプルを sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)で分離(80-120 V, 1.5-2 時間)後、polyvinylidene fluoride (PVDF)膜(ATTO,東京)に転写した(400 mA, 1.5 時間)。転写膜を 0.5%スキムミルクでブロッキング後、一次抗体(1:500 希釈)を反応させた(4 °C,オーバーナイト)。翌日、ペルオキシダーゼ標識二次抗体(1:10,000 希釈)を反応させた(60 分)後、EZ-ECL system (Biological Industries, Kibbutz, Beit-Heamek, Israel)を用いて可視化した。サンプルのイコールローディングは抗 t-actin 抗体で確認した。可視化バンドは CS Analyzer 3.0 software (ATTO)を用いて定量解析した。

#### 2-2-6. RNA 干渉法

6-well シャーレ中の H9c2 心筋芽細胞に 1-well あたり 2.4  $\mu\text{g}$  の *COL18* siRNA あるいは cont siRNA を GenePORTER 2 Transfection Reagent (Genlantis, San Diego, CA, USA)を用いて最終濃度 200 nM でトランスフェクションした。siRNA 投与 24 時間後に mRNA を、48 時間後にタンパク質を抽出し、*COL18* siRNA による endostatin 発現抑制効果を確認した。

その後、in vivo で siRNA 投与実験を行った。MCT あるいは滅菌生理食塩水の投与から 1 週後のラットをイソフルラン(和光純薬, 1.8 L/分, 1-3%)により吸入麻酔し、頸部皮膚を切開後、右頸静脈を露出

した。次に in vivo jet-PEI (Molecular Research Center)を用いて、20  $\mu$ g の *COL18* siRNA あるいは cont siRNA を総量 300  $\mu$ l になるように 5% glucose 溶液で希釈し、右頸静脈より投与した。圧迫止血の後に皮膚を縫合した。Cont 群に cont siRNA を投与した群(Cont-cont si 群)、Cont 群に *COL18* siRNA を投与した群(Cont-*COL18* si 群)、MCT 群に cont siRNA を投与した群(MCT-cont si 群)、MCT 群に *COL18* siRNA を投与した群(MCT-*COL18* si 群)の 4 群を作製した。siRNA 投与から 1 週後に心エコーによる心機能検査、臓器の摘出と重量測定ならびに組織学的検索を行った。また MCT 投与後から 2 週間のラットの生存率を検討した。使用した siRNA 配列は表に示した(表 1)。

#### 2-2-7.心エコー検査

ラットをイソフルラン(1.8 L/分, 1-3%)吸入麻酔下で腹位に保定し、iE33 (Philips, WA, USA)を用いて心機能検査を行った。心拍数(Heart rate: HR)が  $400\pm 20$  になるよう麻酔深度を調整した。心尖部四腔断面像から Mモードを用いて三尖弁輪部収縮期移動距離(tricuspid annular plane systolic excursion: TAPSE)を測定し、右心収縮機能を評価した。心基部短軸断面像からパルスドップラーモードを用いて肺動脈血流の加速時間(acceleration time: AcT)と駆出時間(ejection time: ET)を測定し、肺高血圧の指標となる AcT/ET 比を算出した。

#### 2-2-8.組織学的検索

ラットにペントバルビタール(70 mg/kg)を腹腔内投与し、深麻酔下で心臓と肺を摘出した。摘出した心臓から左心室と右心室を分離した。組織の重量を測定後、右心室の一部を組織学的検索のために 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)に浸漬し、4  $^{\circ}$ C で固定した。

固定した右心室組織を 37 °C で一晩再固定し、水道水で 6 時間水洗した。組織をパラフィンに置換[70%エタノール(2 時間)→80%エタノール(2 時間)→90%エタノール(2 時間)→99%エタノール(2 時間)→100%エタノール(2 時間×2)→キシレン(2 時間×3)→加熱したパラフィン(60 °C, 2 時間×2)の順に浸漬]し包埋した後、組織標本ブロックを作製した。組織標本ブロックをマイクロトーム(PR-50,大和光機, 埼玉)に設置し、4 μm の厚さで薄切した。薄切切片を 42 °C に加温した蒸留水に浮かべ伸展させてからスライドガラスに載せ乾燥させた(42 °C, オーバーナイト)。脱パラフィン[キシレンまたはレモゾール(5 分×3)→100%エタノール(2 分×2)→95%エタノール(2 分)→80%エタノール(2 分)→70%エタノール(2 分)→50%エタノール(2 分)→蒸留水(5 分)の順に浸漬]した後、hematoxylin and eosin (H&E)染色と免疫組織化学染色に用いた。免疫組織化学染色は Dako LSAB2 Kit/HRP (DAB, Dako, Glostrup, Denmark)を用いて avidin-biotin complex (ABC) 法により定法に従って行った。

### 2-3. 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表した。2 群間の比較には *Student-t* 検定を用いた。また多群比較には ANOVA で分散分析した後 *Tukey* の *post-hoc test* により全ての 2 群間の比較を行い評価した。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. MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における $I_{CaT}$ の測定

MCT 投与ラットの右心室では  $Ca_v3.1$  及び  $Ca_v3.2$  の mRNA 発現が有

意に亢進した(図2A, n=6, 図2B,  $Ca_v3.1$ , Cont: n=5, MCT: n=6;  $Ca_v3.2$ , n=6,  $p<0.05$ )。これらの結果はTakebayashiらの報告と一致しており[91]、MCT投与により右心室においてTTCCが再発現することを確認した。当研究室ではこれまで、モルモット心室筋細胞を用いて保持電位 -90 mVからの脱分極刺激で得られる全 $Ca^{2+}$ チャネル電流と保持電位 -50 mVからの脱分極刺激で得られる $I_{CaL}$ の差分として検出される内向き電流が $I_{CaT}$ であること確認している[103]。本章においても同様の電流刺激プロトコルと灌流液を用いて $I_{CaT}$ を測定した。MCT投与ラットの右心室より単離した心筋細胞において $I_{CaT}$ が検出された(図3A, B, n=6,  $p<0.05$  at -20 mV,  $p<0.01$  at -10 to 40 mV)が、Cont群の心筋細胞では検出されなかった(図3A, B, n=5)。

### 3-2. MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における $I_{CaT}$ に及ぼす endostatin の影響

MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞の  $I_{CaT}$  に及ぼす endostatin の影響を検討したところ、endostatin (300, 1000 ng/ml, 5分)処置は  $I_{CaT}$  を有意に抑制した(図4A, n=14; 図4B, n=5,  $p<0.05$ )。

### 3-3. siRNA 投与実験

H9c2 心筋芽細胞において  $COL18$  siRNA 処置により  $COL18A1$  mRNA 発現(図5A, n=6,  $p<0.05$ )及び endostatin タンパク質発現(図5B, n=3,  $p=0.057$ )が減少することを確認した。ラットに  $COL18$  siRNA を投与し endostatin タンパク質発現抑制を行った結果、MCT- $COL18$  si群のみ生存率が低下した(図6, n=10)。心エコー検査の結果、MCT- $COL18$  siRNA 群では、MCT-cont si群と比較して TAPSE の低下が亢進する傾向を示した(図7C, D, 表2, MCT-cont si: n=8, MCT- $COL18$  si:

n=7)。MCTを投与した両群でAcTとAcT/ET比が有意に低下したが、MCT-cont si群とMCT-COL18 si群の間に差はなかった(図7G, H, 表2, MCT-cont si: n=9, MCT-COL18 si: n=8)。組織重量の評価の結果、MCTを投与した両群で肺重量が有意に増加したが、MCT-cont si群とMCT-COL18 si群の間に差はなかった(表3, n=9)。MCT-cont si群における右心室重量/尾部長比[right ventricular weight (RVW)/tail length (TL)]及び右心室重量/左心室重量比[RVW/left ventricular weight (LVW)]の増加をMCT-COL18 siRNAは亢進する傾向を示した(表3, n=9)。

#### 3-4. 組織学的検索

右心室組織の免疫組織化学染色の結果、MCT-cont si群においてendostatinタンパク質発現が亢進し(図8C, n=7,  $p<0.05$ )、MCT-COL18 si群ではその増加が有意に抑制された(図8D, n=8,  $p<0.05$ )。Real-time PCRにより右心室におけるCOL18A1 mRNA発現を解析した結果、同様の傾向が認められた(図8F, n=3-7)。H&E染色の結果、MCT-cont si群において心筋細胞の肥大化が観察された(図9C, n=7)。一方、MCT-COL18 si群では心筋細胞の肥大化に加え、顕著な心筋細胞密度の低下と拡大した細胞間隙への間質細胞の浸潤・増生が観察された(図9D, n=7)。

プライマー配列

Target		Primer sequences	Accession number
Ca <sub>v</sub> 3.1	Forward	5'-GGGAAATCTGAGCAAAGGGG-3'	NM_001193140
	Reverse	5'-CGGTGACACAGGAGACGAAA-3'	
Ca <sub>v</sub> 3.2	Forward	5'-TCTTCATTGTCATGGCGGGCA-3'	NM_153814
	Reverse	5'-CGCATACTGGGGACTCGGTT-3'	
Ca <sub>v</sub> 3.3	Forward	5'-AAGCTGGTCTGCAATGACGA-3'	NM_020084
	Reverse	5'-AGTTTTCAAAGGTGGCGTGC-3'	
GAPDH <sup>a)</sup>	Forward	5'-GAGAATGGGAAGCTGGTCAT-3'	NM_017008
	Reverse	5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCA-3'	
COL18A1	Forward	5'-GGCCCGCATCTTTTCTTTTCG-3'	AF189709.1
	Reverse	5'-AGTCCTCCACGTCTCACAGT-3'	

Small interfering (si) RNA配列

Target		Sequences	Accession number
COL18A1	Sense	5'-UCGUCAACCUGAAGGAUGAdTdT-3'	AF189709.1
	Antisense	5'-UCAUCCUUCAGGUUGACGAdTdT-3'	

表 1 プライマー及び siRNA 配列

a) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



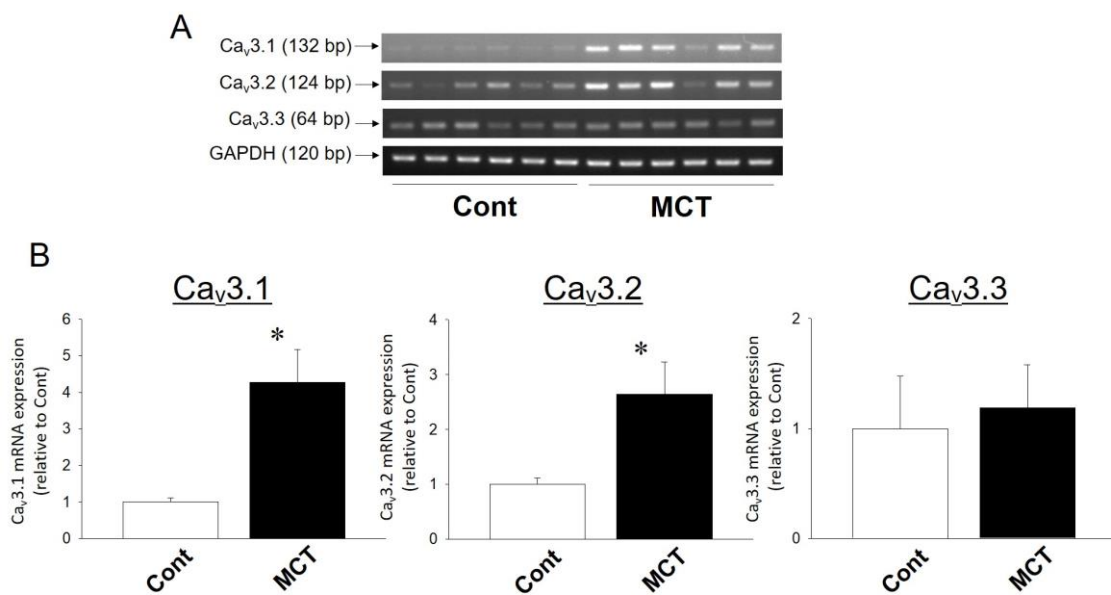


図 2 Monocrotaline (MCT)投与ラットの右心室における Ca<sub>v</sub>3 アイソフォーム mRNA 発現

(A) MCT (60 mg/kg)投与ラット(MCT)と対照群(Cont)の右心室より総RNAを抽出し、cDNAへ逆転写した後に reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR)により Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 及び Ca<sub>v</sub>3.3 mRNA 発現を解析した (n=6)。Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, Ca<sub>v</sub>3.3 及び glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA 増副産物の典型的な電気泳動像。(B) Ca<sub>v</sub>3.1 (Cont: n=5, MCT=6), Ca<sub>v</sub>3.2 (Cont: n=6, MCT=6)及び Ca<sub>v</sub>3.3 (Cont: n=5, MCT=5) mRNA 発現を Real-time PCR により解析した。ΔΔCq 法により定量した GAPDH mRNA に対する Ca<sub>v</sub>3 mRNA 発現量を Cont 群で標準化した。\**p*<0.05 vs. Cont.

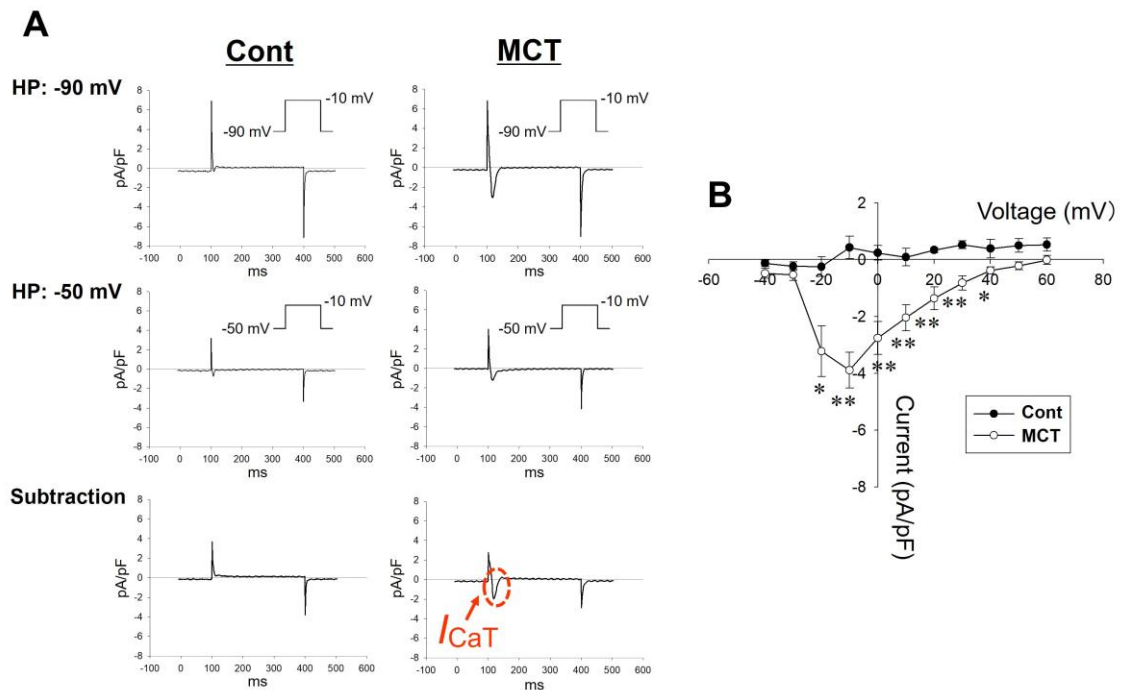


図 3 MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル電流 ( $I_{\text{CaT}}$ ) の測定

MCT (60 mg/kg) 投与ラット (MCT) と Cont 群 (Cont) の右心室由来心筋細胞における  $I_{\text{CaT}}$  を測定した。(A) Cont 群 (左図) 及び MCT 投与 (右図) ラットの右心室由来心筋細胞における  $I_{\text{CaT}}$  の典型図 (下段)。保持電位 (holding potential: HP) -90 mV (上段) と -50 mV (中段) から -10 mV への脱分極刺激で得られた電流実測値の差分を取ることで  $I_{\text{CaT}}$  を評価した。(B)  $I_{\text{CaT}}$  ピーク値の電流-電圧曲線。得られた電流ピーク値 (pA) を細胞膜容量 (pF) で補正した (pA/pF)。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した (Cont: n=5, MCT: n=6)。\*, \*\*  $p < 0.05, 0.01$  vs. Cont.

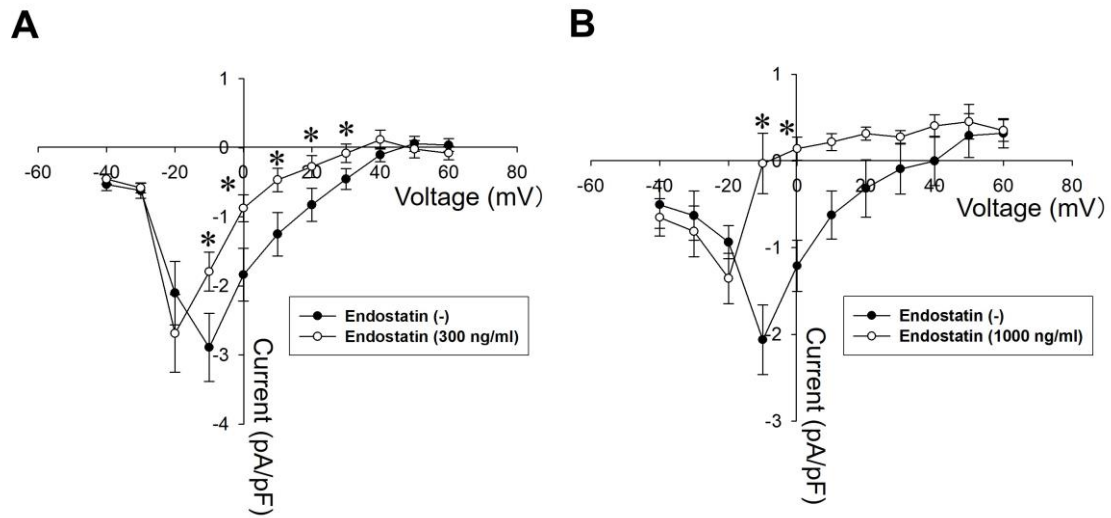


図 4 MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における  $I_{CaT}$  に及ぼす endostatin の影響

MCT (60 mg/kg)投与ラットの右心室由来心筋細胞において  $I_{CaT}$  を測定した [Endostatin (-)]後、endostatin [A, Endostatin (300 ng/ml, n=14); B, Endostatin (1000 ng/ml, n=5)]を 5 分間灌流処置して  $I_{CaT}$  を測定した。得られた電流ピーク値 (pA)を細胞膜容量 (pF)で補正した (pA/pF)。結果は平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$  vs. Endostatin (-)。

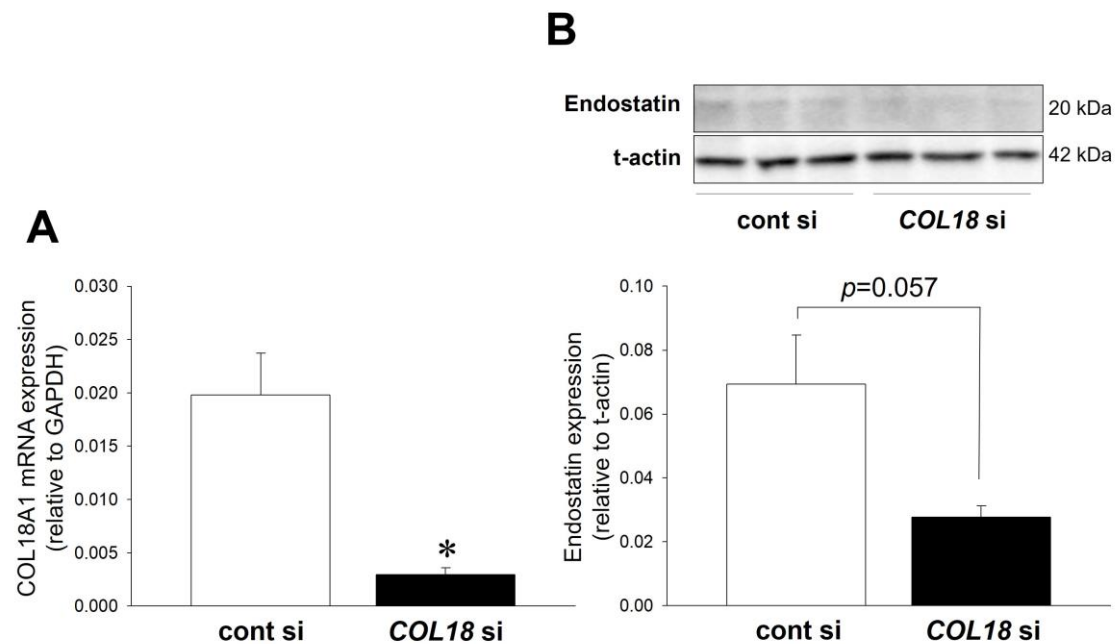


図 5 H9c2 心筋芽細胞における small interfering (si) RNA による collagen 18  $\alpha$ 1 chain (COL18A1) mRNA ならびに endostatin タンパク質発現抑制の確認

(A) H9c2心筋芽細胞にCOL18A1 siRNA (*COL18* si)またはcontrol (cont) siRNA (cont si)を処置し、24時間後に総RNAを抽出した。RNAをcDNAに逆転写した後、Real-time PCRによりCOL18A1 mRNA発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$ 法を用いてGAPDH mRNAに対するCOL18A1 mRNA発現量を表した(n=6)。(B) H9c2心筋芽細胞に*COL18* siまたはcont siを処置し、48時間後に総タンパク質を抽出した。Western blottingによりendostatinタンパク質発現を解析した。(上図) Endostatin及びtotal (t)-actinの典型的なプロット像。(下図) t-actinに対するendostatinタンパク質発現量で表した。\* $p < 0.05$  vs. cont si.

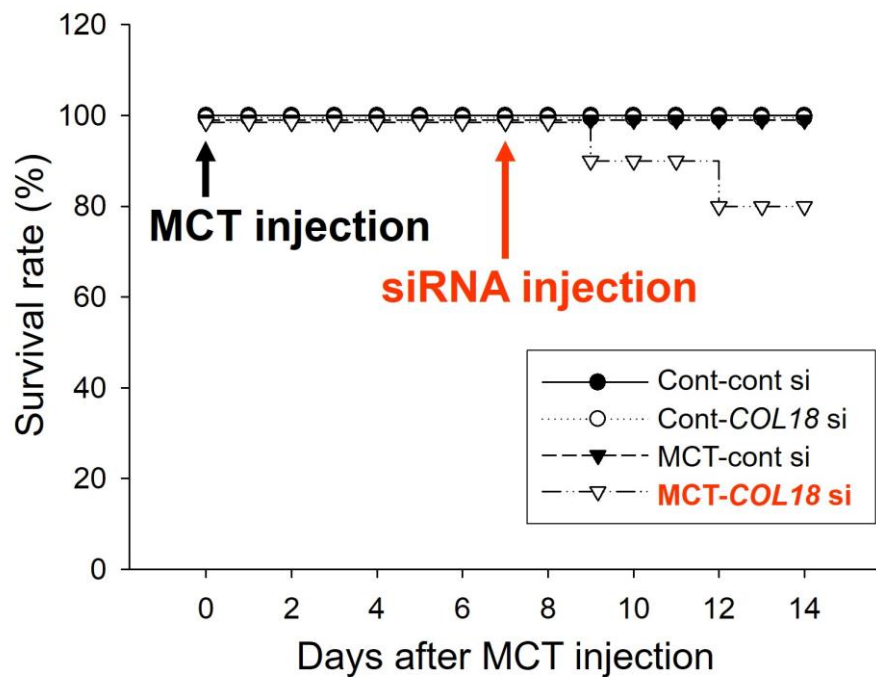


図 6 MCT 投与ラットの生存率に及ぼす *COL18* si の影響

MCT (60 mg/kg) 投与 1 週後の MCT 投与ラットと Cont 群に *COL18* si または cont si (20  $\mu$ g) を投与し、その後 1 週間 (MCT 投与から 2 週間) の生存率の推移をグラフ化した。(●) cont si を投与した Cont 群 (Cont-cont si, n=4)。(○) *COL18* si を投与した Cont 群 (Cont-*COL18* si, n=4)。(▼) cont si を投与した MCT 群 (MCT-cont si, n=9)。(▽) *COL18* si を投与した MCT 群 (MCT-*COL18* si, n=10)。

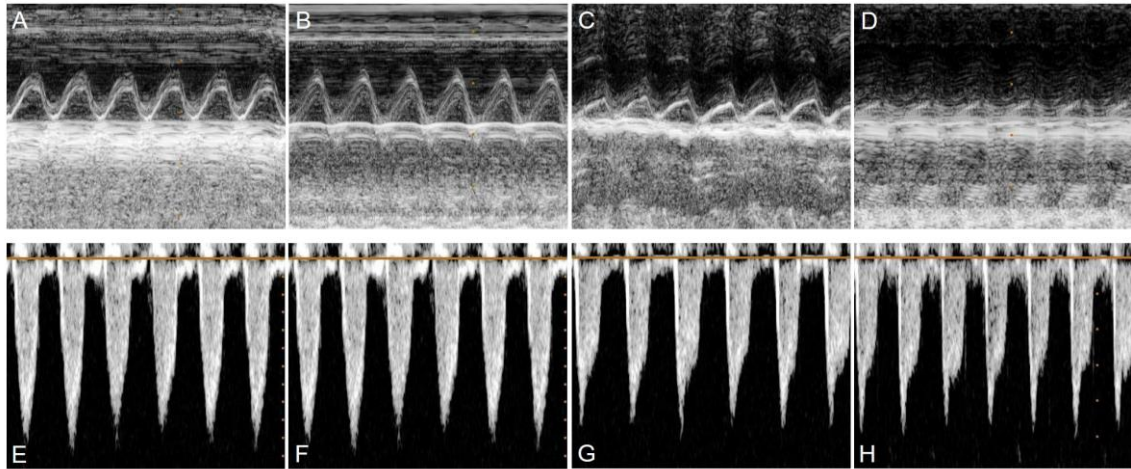


図 7 Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)及び肺動脈血流ドップラー画像の典型図

MCT (60 mg/kg)投与 1 週後の MCT 投与ラットと Cont 群に *COL18* si または cont si (20  $\mu$ g)を投与し、その 1 週後に心エコー検査を行った。(A-D)心尖部四腔断面像の M モード画像から TAPSE を測定した。(E-H)心基部短軸断面像からパルスドップラーモードにより肺動脈血流を測定した。血流開始から肺動脈血流速度が最大になるまでの時間[acceleration time (AcT)]と血流開始から終了までにかかった時間[ejection time (ET)]を計測した。(A, E) Cont-cont si (n=3-4)。(B, F) Cont-*COL18* si (n=3-4)。(C, G) MCT-cont si (n=8-9)。(D, H) MCT-*COL18* si (n=7-8)。

	Cont-cont si	Cont-COL18 si	MCT-cont si	MCT-COL18 Si
HR <sup>a)</sup>	412.0±13.3	413.3±5.3	412.0±8.4	414.7±11.0
TAPSE <sup>b)</sup> (mm)	2.77±0.23	2.60±0.18	2.11±0.41*	1.85±0.22**, #
AcT <sup>c)</sup> (ms)	33.7±5.3	29.6±5.4	23.8±2.9*	24.1±5.9*
ET <sup>d)</sup> (ms)	83.3±5.7	88.7±4.2	88.5±9.4	95.2±8.1
AcT/ET <sup>e)</sup>	0.40±0.04	0.36±0.07	0.27±0.04**, #	0.25±0.04**, #

表 2 心エコー検査の結果

MCT (60 mg/kg)投与1週後のMCT投与ラット(MCT群)と対照(Cont)群にcollagen 18  $\alpha$ 1 chain (COL18A1) small interfering (si) RNA (*COL18* si)またはcontrol (cont) siRNA (cont si)を投与(20  $\mu$ g)し、その1週後に心エコー検査を行った[cont siを投与したCont群(Cont-cont si, n=3-4), *COL18* siを投与したCont群(Cont-*COL18* si, n=3-4), cont siを投与したMCT群(MCT-cont si, n=8-9), *COL18* siを投与したMCT群(MCT-*COL18* si, n=7-8)。a) Heart rate; b) Tricuspid annular plane systolic excursion; c) Acceleration time; d) Ejection time; e) AcT/ET比.\*, \*\* $p$ <0.05, 0.01 vs. Cont-cont si, # $p$ <0.05 vs. Cont-*COL18* si.

	Cont-cont si	Cont- <i>COL18</i> si	MCT-cont si	MCT- <i>COL18</i> si
BW <sup>a)</sup> (g)	214.6±18.9	213.4±13.7	180.7±19.3	179.3±24.5
TL <sup>b)</sup> (cm)	12.6±0.4	13.2±0.5	11.8±0.9 <sup>#</sup>	12.0±0.7
LW <sup>c)</sup> (mg)	1036.8±38.9	1057.6±39.2	1363.4±143.1 <sup>**</sup>	1438.6±245.2 <sup>***, #</sup>
RVW <sup>d)</sup> (mg)	173.3±30.8	176.1±13.2	219.4±38.4	230.3±52.0
LVW <sup>e)</sup> (mg)	526.9±28.1	519.7±59.0	463.9±55.0	442.1±46.3
LW/BW	4.87±0.42	4.98±0.35	7.61±0.97 <sup>***, #</sup>	8.16±1.66 <sup>***, ##</sup>
RVW/ BW	0.81±0.13	0.83±0.09	1.22±0.23 <sup>*, #</sup>	1.29±0.25 <sup>***, #</sup>
RVW/ TL	13.7±2.1	13.4±1.2	18.8±3.4	19.2±3.3 <sup>*, #</sup>
RVW/ LVW	0.33±0.06	0.34±0.06	0.48±0.12	0.52±0.10 <sup>*</sup>

表 3 体重、組織重量の評価

Cont-cont si (n=4), Cont-*COL18* si (n=4), MCT-cont si (n=9), MCT-*COL18* si (n=9). a) Body weight; b) Tail length; c) Lung weight; d) Right ventricular weight; e) Left ventricular weight.

\*, \*\* $p < 0.05$ , 0.01 vs. Cont-cont si,

#, ## $p < 0.05$ , 0.01 vs. Cont-*COL18* si.



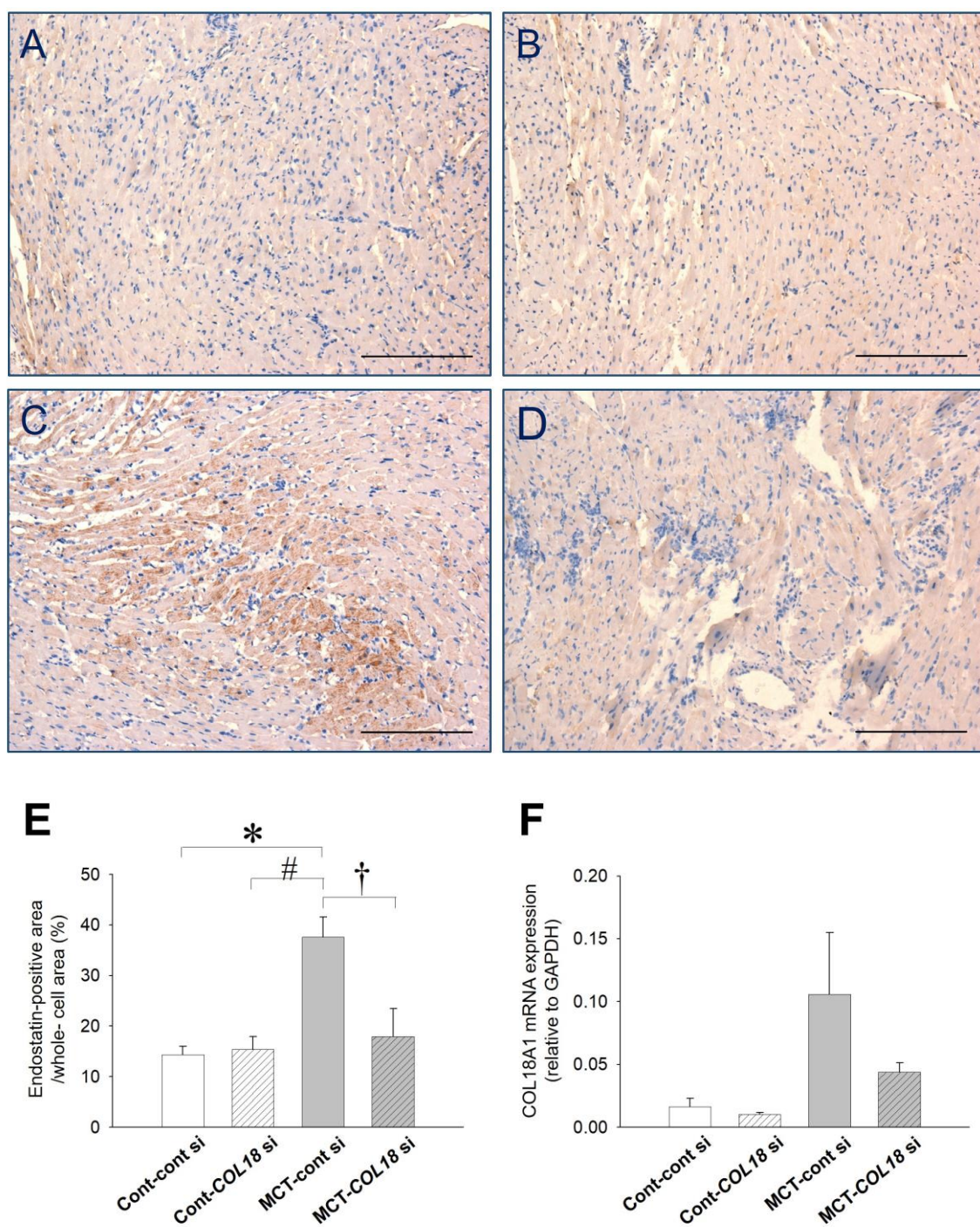


図 8 *COL18* si による endostatin 発現抑制の確認

MCT (60 mg/kg)投与1週後のMCT投与ラットとCont群に*COL18* siまたはcont si (20  $\mu$ g)を投与し、その1週後に右心室組織における

endostatin発現を検討した。(A-D)右心室組織におけるendostatin発現を免疫組織化学染色により評価し、Cont-cont si (A, n=3), Cont-COL18 si (B, n=4), MCT-cont si (C, n=6)及びMCT-COL18 si (D, n=7)の典型像を示した。茶色: endostatin, Scale, 200  $\mu$ m. (E)全細胞領域に対するendostatin発現陽性領域(%)を定量した。(F) Real-time PCRにより右心室組織におけるCOL18A1 mRNA発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$ 法を用いてGAPDH mRNAに対するCOL18A1 mRNA発現量を表した [Cont-cont si (n=3), Cont-COL18 si (n=3), MCT-cont si (n=6), MCT-COL18 si (n=7)]。\* $p < 0.05$  vs. Cont-cont si, # $p < 0.05$  vs. Cont-COL18 si, † $p < 0.05$  vs. MCT-cont si.

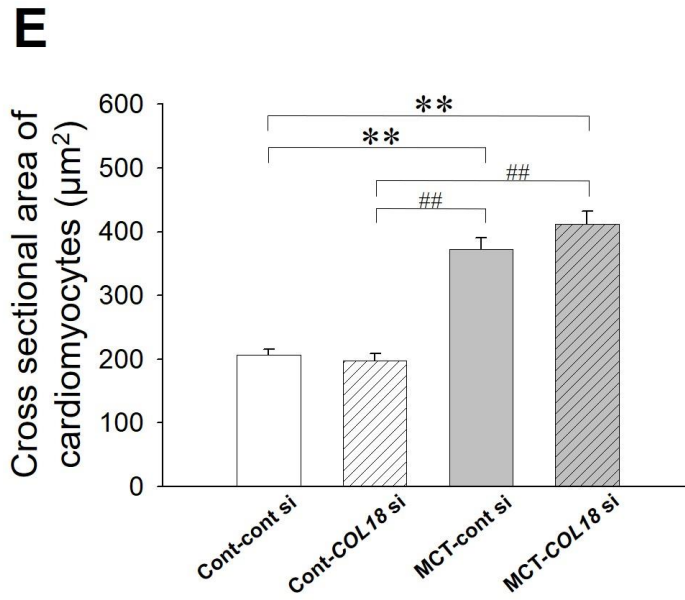
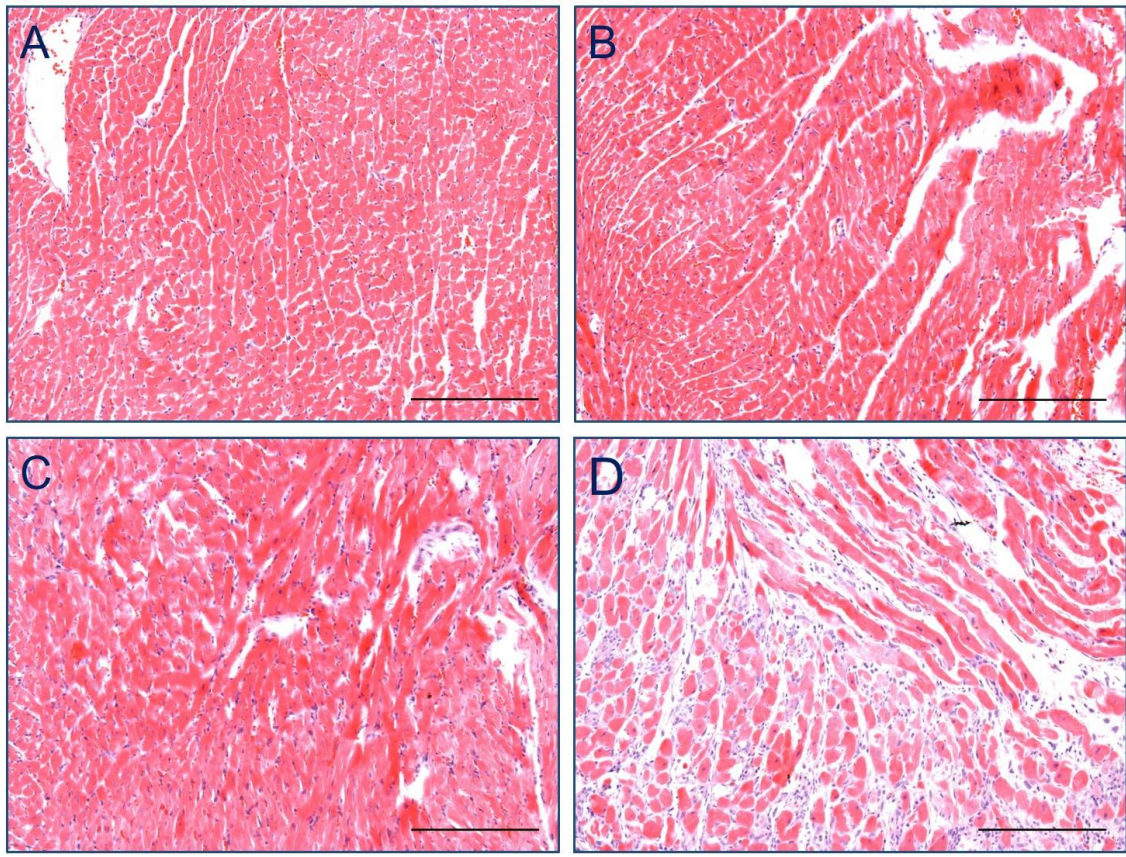


図 9 右心室組織構造の評価

MCT (60 mg/kg)投与1週後のMCT投与ラットとCont群にCOL18 siま

たは cont si (20  $\mu$ g)を投与し、その1週後に右心室組織構造を評価した。(A-D)右心室組織構造を Hematoxylin and eosin 染色により評価し、Cont-cont si (A, n=3), Cont-COL18 si (B, n=4), MCT-cont si (C, n=6)及びMCT-COL18 si (D, n=7)の典型像を示した。Scale, 200  $\mu$ m. (E)心筋細胞横断面積( $\mu$ m<sup>2</sup>)を定量した。 \*\* $p$ <0.01 vs. Cont-cont si, ## $p$ <0.01 vs. Cont-COL18 si.

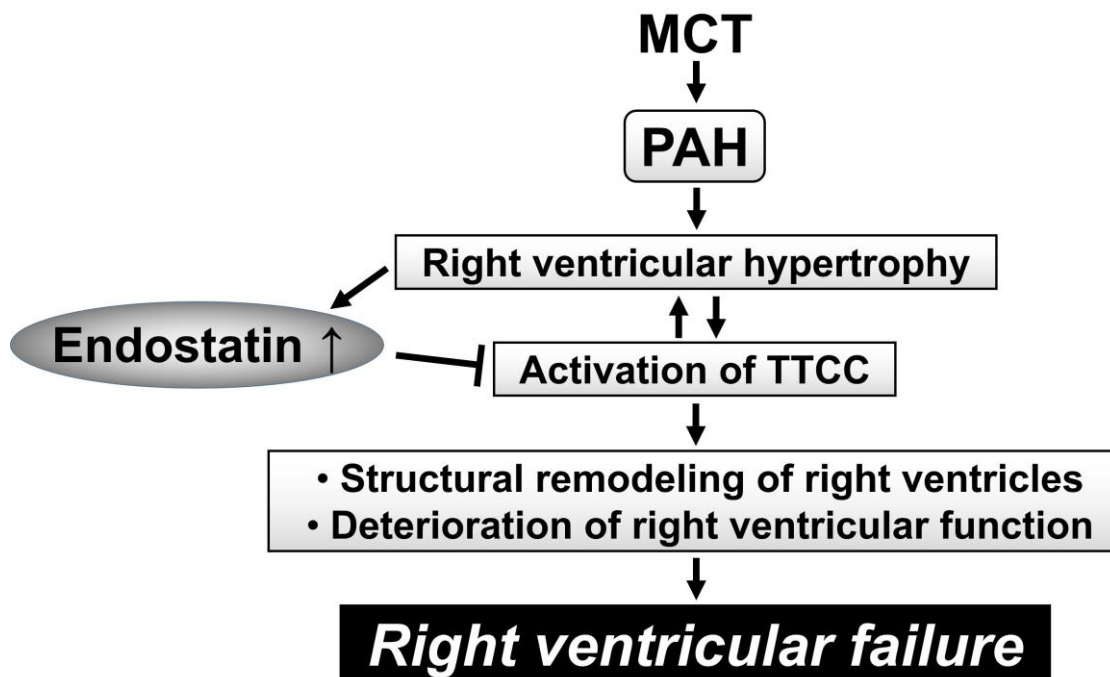


図 10 第一章のまとめ

MCT 誘発肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) モデルラットの肥大右心室において発現が亢進した endostatin は、心筋細胞に再発現した T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel: TTCC) の活性阻害を介して右心室組織構造のリモデリングならびに右心機能の低下を抑制することで心保護的に働く可能性が示唆された [42]。

#### 4. 考察

本章では、MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞の  $I_{CaT}$  を endostatin が抑制することに加え、COL18 si による endostatin 発現抑制が MCT 投与ラットにおける右心不全の病態を悪化させることを初めて明らかにした。これらの結果から、endostatin は TTCC の活性阻害を介して右心保護作用を示すことが示唆された(図 10)。

Takebayashi らによる報告[91]と同様に、本章でも MCT 投与ラットの右心室組織において TTCC アイソフォームである  $Ca_v3.1$  及び  $Ca_v3.2$  の mRNA 発現が有意に増加することを確認した(図 2)。また、MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞における低電位活性型の  $Ca^{2+}$ 電流は、Hagiwara や Takebayashi らの報告[32,91]と同様に -10 mV にピークがあったことから、この電流が  $I_{CaT}$  であることが確認された(図 3)。

本章は MCT 投与ラットの右心室由来心筋細胞において増加した  $I_{CaT}$  を、endostatin が抑制することを初めて明らかにした(図 4)。健康なヒトにおける endostatin の血中濃度は約 149 ng/ml (130.6-176.9 ng/ml)である[4]。一方、高い死亡リスクを持つ心不全患者では、endostatin 血中濃度は 245 ng/ml 以上にまで増加することが報告されている[30]。このことから、本章では endostatin を 300 ng/ml の濃度で使用した。Zhang らは、 $Ca_v3.1$  及び 3.2 遺伝子の過剰発現系を用いて、endostatin が  $Ca_v3.1$  及び 3.2 を介した電流をそれぞれ 24.1% 及び 28.4%抑制すること示した[108]。さらに、その抑制が G タンパク質共役型受容体やタンパク質チロシンキナーゼに非依存的であったことから、endostatin は TTCC に直接結合し、TTCC 活性を抑制する可能性を示した[108]。一方、endostatin は細胞膜表面に存在する

$\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  及び  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンに結合することが知られている [81]。ネコ心房筋細胞において、基底膜由来の ECM タンパク質であるラミニンは  $\beta_1$  インテグリンへの結合を介して  $\beta_1$  アドレナリン受容体刺激による LTCC 電流の増強を抑制する [99]。このことから、endostatin はインテグリンへの結合を介して  $I_{CaT}$  を抑制する可能性が考えられる。Endostatin による TTCC 活性抑制機構の解明にはさらなる検討が必要である。

次に、*Col18* si による endostatin 発現抑制が MCT 投与ラットの右心不全発症・進展に及ぼす影響を検討した。MCT 投与ラットにおいて認められる肺高血圧の指標である AcT/ET 比の低下や肺重量/体重比の増加に、*COL18* si による endostatin 発現抑制はほとんど影響を及ぼさなかった (図 7G, H, 表 2, 3)。このことから、endostatin の発現抑制は、MCT 誘導性 PAH モデルラットの肺高血圧症の病態には大きな影響を及ぼさないと考えられた。一方、MCT-cont si 群と比較して MCT-*COL18* si 群においては観察期間内に死亡する個体が認められ、右心室重量の増加や右心機能低下が亢進した (図 6, 7C, D, 表 2, 3)。TTCC は圧負荷誘発心肥大に関与すると考えられている [14]。本章の結果から、*COL18* si による endostatin 発現抑制は MCT 投与ラットの右心室に再発現した TTCC 活性を亢進することで PAH 誘発右心不全の病態進展を促進することが示唆された (図 10)。一方、TTCC は持続的な細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を誘導することで不整脈の発症要因となることも知られている [50]。拡張型心筋症モデルマウスを用いた研究において、TTCC の活性阻害は静止膜電位を過分極側へシフトさせることで不整脈を抑制し突然死を予防することが報告されている [50]。このことから、*COL18* si による endostatin 発現抑制により活性亢進した TTCC を介した持続的な細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が不整

脈を誘発し、MCT-COL18 si 群で認められたラットの死亡要因となった可能性も考えられる。

右心室の組織学的検索の結果、これまでの当研究室の研究結果と一致して、MCT 群において心筋細胞の肥大が認められた(図 9C-E)。一方、MCT-COL18 si 群では心筋細胞密度が低下し、その細胞間隔への間質細胞の浸潤・増生像が観察された(図 9D)。このことから、MCT-COL18 si 群では心筋細胞の傷害からアポトーシス誘導が起こったことが推察された。Ca<sub>v</sub>3.1 遺伝子を過剰発現した MCF-7 ヒト乳癌細胞ではアポトーシスが誘導されることや、Ca<sub>v</sub>3.2 を介した細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入が ROS 産生を介して悪性中皮腫細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている[68,78]。また、細胞内への過剰な Ca<sup>2+</sup>流入による Ca<sup>2+</sup>/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CaMKII) シグナル経路の活性化は、アポトーシスを誘導する[111]。このことから、MCT-COL18 si 群では TTCC を介して流入した Ca<sup>2+</sup>によって心筋細胞のアポトーシスが誘導されたことで右心不全の病態が悪化した可能性も考えられる。Endostatin 発現抑制による TTCC の活性化が PAH 誘発右心不全を悪化させるメカニズムの解明には、さらに詳細な検討が必要である。

結論として第一章では、endostatin が MCT 投与ラットの右心室心筋細胞に再発現した TTCC の活性を抑制すること、endostatin の発現抑制が MCT 投与ラットにおける右心不全の病態を悪化させることを初めて明らかにした。これらのことから、endostatin は TTCC 活性の抑制を介して右心保護作用を示すことが示唆された。今後は endostatin を標的とした新たな右心不全治療法の開発が期待される。



### III. 第二章

PAH モデルラットの右心室における *matricellular proteins* の発現動態

## 1. 緒言

第一章では、ECM 分解断片 *endostatin* が PAH 誘発右心不全において心保護的に働くことを明らかにした。ECM には *endostatin* の産生源であるコラーゲンやプロテオグリカンなどの構造的 ECM タンパク質の他に、非構造的の ECM タンパク質が存在する [74,93]。非構造的の分泌型 ECM 成分である *matricellular proteins* は、成長因子、サイトカイン、プロテアーゼ、他の ECM 成分や細胞膜受容体など様々な分子に結合することが知られており、細胞-細胞間または細胞-ECM 間のシグナル伝達を媒介する調節因子である [93]。ECM リモデリングとそれによる心筋-ECM 間相互作用の破綻は心筋細胞同士の協調的な収縮を障害し心収縮不全の発症要因となると考えられている [5,96]。様々な心疾患において発現レベルが増加する *matricellular proteins* は、圧負荷誘発心肥大や心筋梗塞モデル動物において心肥大や心線維化に関与することが明らかになっている [23]。近年、PAH モデル動物の心臓組織において TnC や OPN などの *matricellular proteins* の発現が増加することが明らかになった [34,65]。しかしながら、PAH 誘発右心不全の発症・進展における発現動態が判明していない *matricellular proteins* は数多く残されている。そこで第二章では、右心肥大期の MCT (2 週) 投与ラット及び右心不全発症期の MCT (3 週) 投与ラットの右心室における各種 *matricellular proteins* の mRNA 発現変化を検討した。

## 2. 実験材料および実験方法

## 2-1.実験材料

### 2-1-1.試薬

MCT (和光純薬)

### 2-1-2.使用動物

動物の飼育および取り扱いは北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 16-043)、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)を使用した。ラットは使用時まで本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において室温  $23.0\pm 2$  °C、湿度 50-60%、12 時間/12 時間の概日周期下で、固形飼料(CE-2,日本クレア)を給餌し自由飲水で飼育した。

## 2-2.実験方法

### 2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデル

MCT 誘導性 PAH モデルラットを第一章 2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデルの項に準じて作製し、MCT 投与 2 週及び 3 週後に実験に用いた。

### 2-2-2.心エコー検査

MCT 投与 2 週及び 3 週後に第一章 2-2-7.心エコー検査の項に準じて心エコー検査を行った。肺動脈血流の AcT/ET 比と TAPSE を測定し、加えて心尖部四腔断面像から右心室収縮末期面積(right ventricular end-systolic dimension: RVESD)を測定し右心収縮機能を評価した。

### 2-2-3. RNA 抽出と Real-time PCR

ペントバルビタール(70 mg/kg)の腹腔内投与によりラットを深麻酔し、開胸して心臓を摘出した。摘出した心臓から右心室のみを分離し細切した後、第1章 2-2-5. RNA 抽出と PCR の項に準じて総 RNA を抽出し Real-time PCR を行った。使用したプライマーの配列は表 4 に示した(表 4)。

### 2-3. 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表した。2 群間の比較のために *Student-t* 検定を用いた。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. MCT 投与ラットにおける肺動脈圧、右心室収縮機能、右心室組織重量の評価

心エコー検査により MCT 投与ラットの肺動脈圧と右心機能を検討した。MCT (2 週)投与ラットでは、Cont 群と比較して AcT/ET 比が有意に低下し、MCT (3 週)投与ラットでは AcT/ET 比の低下がさらに亢進した(表 5)。次に、右心収縮機能の評価として TAPSE と RVESD を測定した。MCT (2 週)投与ラットでは、Cont 群と比較して TAPSE が有意に低下し、MCT (3 週)投与ラットでは TAPSE の低下がさらに亢進した(表 5)。また、MCT (2 週)投与ラットでは、Cont 群と比較して RVESD に有意な差は見られなかったが、MCT (3 週)投与ラットでは Cont 群と比較して RVESD が有意に増加した(表 5)。

### 3-2. MCT 投与ラットの右心室における matricellular proteins mRNA 発現解析

各種 matricellular proteins [Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)ファミリー: SPARC 及び hevin; thrombospondin (TSP)ファミリー: TSP-1, -2 及び -4; CCN ファミリー: CCN1 及び CCN5; Tn ファミリー: TnC 及び TnN; POSTN 及び OPN]の mRNA 発現を解析した。

SPARC ファミリーの mRNA 発現は MCT (2 週)投与ラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットでは変化しなかった(図 11)。TSP-1 及び -2 の mRNA 発現は MCT (2 週)投与ラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットでは変化しなかった(図 12A, B)。一方、TSP-4 の mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進し、MCT (3 週)投与ラットではより顕著に亢進した(図 12C)。CCN1 mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットにおける亢進は MCT (2 週)投与ラットと比較して軽度だった(図 13A)。CCN5 mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットでは MCT (2 週)投与ラットと比較してより顕著に亢進した(図 13B)。TnC mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで同程度亢進した(図 14A)。新規 Tn ファミリーメンバーである TnN mRNA 発現は MCT (2 週)投与ラットの右心室において有意に減少したが、MCT (3 週)投与ラットでは変化しなかった(図 14B)。POSTN mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進し、MCT (3 週)投与ラットでは MCT (2 週)投与ラットと比較してより顕著に亢進した(図 15A)。OPN mRNA 発現は

MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットにおける亢進は MCT (2 週)投与ラットと比較して軽度だった(図 15B)。

Target	Primer sequences	Accession number
SPARC <sup>a)</sup>	Forward: 5'-GACAGGGTTACCTGTGGGTG-3' Reverse: 5'-AATGATGGTTCTGGCAGGGG-3'	NM_012656.1
Hevin	Forward: 5'-AACACGGAAAACCCCACTGT-3' Reverse: 5'-CCACAAGCTTGGTCGAGGAT-3'	NM_012946.1
TSP <sup>b)</sup> -1	Forward: 5'-TCGGGGCAGGAAGACTATGA-3' Reverse: 5'-ACTGGGCAGGGTTGTAATGG-3'	NM_001013062.1
TSP-2	Forward: 5'-TCGCCGTAGGTTTCGATGAG-3' Reverse: 5'-TAGTCATCGTCCCGGTCAGT-3'	NM_001169138.1
TSP-4	Forward: 5'-GCTACATCAGGGTGCGGTTT-3' Reverse: 5'-ACAGCGGTACTTGAGGTTGG-3'	NM_017133.1
CCN1	Forward: 5'-GGATCTGTGAAGTGCGTCCT-3' Reverse: 5'-ATCGGACTGGTTCTGGGGAT-3'	NM_031327.2
CCN5	Forward: 5'-CAAGGGACACGGTGACATGA-3' Reverse: 5'-GGGCACACACCATTGAGAGA-3'	NM_031590.1
Tn <sup>c)</sup> C	Forward: 5'-CGCAAAAATGGACGTGAGGA-3' Reverse: 5'-AGGTTATCCAGTCCAAGCCAG-3'	NM_053861.1
TnN	Forward: 5'-CACAGCAGGGGATGCTCTTA-3' Reverse: 5'-CTTATACCACCAGCCGCCAT-3'	NM_001107189.2
POSTN <sup>d)</sup>	Forward: 5'-TGCAAAAAGACACACCTGCAAA-3' Reverse: 5'-GGCCTTCTCTTGATCGCCTT-3'	NM_001108550.1
OPN <sup>e)</sup>	Forward: 5'-CCAGCCAAGGACCAACTACA-3' Reverse: 5'-AGTGTTTGCTGTAATGCGCC-3'	NM_012881.2
GAPDH	Forward: 5'-GAGAATGGGAAGCTGGTCAT-3' Reverse: 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCA-3'	NM_017008.4

表 4 プライマー配列

- a) Secreted protein acidic and rich in cysteine;
- b) Thrombospondin;
- c) Tenascin;
- d) Periostin;
- e) Osteopontin.

	2 weeks		3 weeks	
	Cont	MCT	Cont	MCT
AcT/ET	0.35±0.01	0.23±0.01**	0.41±0.02	0.16±0.01**
TAPSE (cm)	0.34±0.03	0.25±0.02*	0.41±0.03	0.15±0.01**
RVESD <sup>a)</sup> (cm <sup>2</sup> )	0.17±0.02	0.13±0.02	0.18±0.01	0.25±0.02*

表 5 心エコー検査の結果

MCT (2 週)投与ラットと Cont 群(2 weeks-Cont, 2weeks-MCT: n=5)、  
MCT (3 週)投与ラットと Cont 群(3 weeks-Cont: n=6; 3 weeks-MCT:  
n=9)。 a) Right ventricular end-systolic dimension.

\*. \*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. Cont.



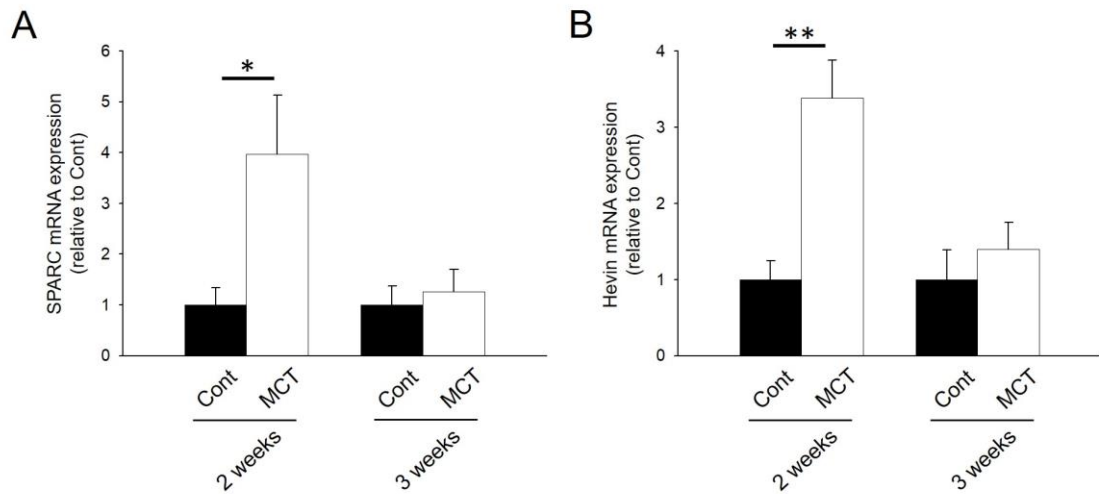


図11 MCT (2週及び3週)投与ラットの右心室における secreted protein acidic and rich in cysteine: SPARC)ファミリー (SPARC及び hevin)の mRNA 発現

MCT (2週及び3週)投与ラットと Cont 群の右心室より総 RNA を抽出し、Real-time PCR により SPARC (A)及び hevin (B)の mRNA 発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$  法を用いて定量した GAPDH mRNA に対する SPARC 及び hevin mRNA 発現量を Cont 群で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (2 weeks-Cont, MCT: n=5; 3 weeks-Cont: n=7, 3 weeks-MCT: n=9)。\*、\*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. Cont.

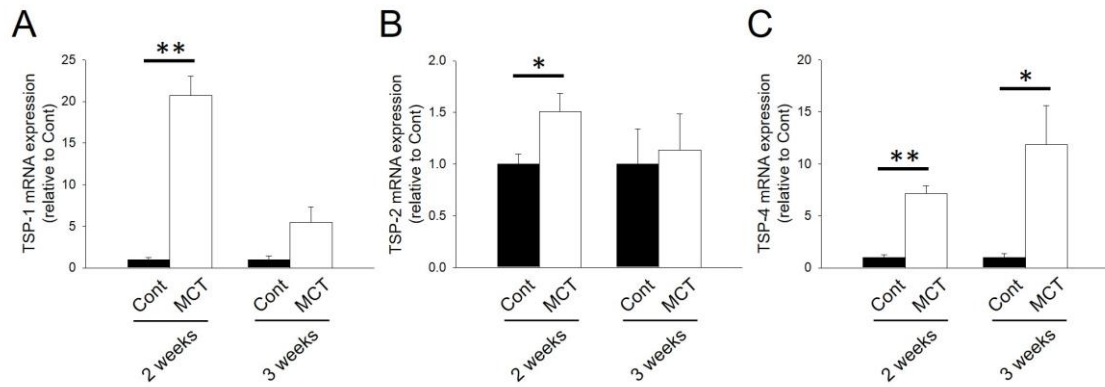


図12 MCT (2週及び3週)投与ラットの右心室における thrombospondin (TSP)ファミリー(TSP-1, -2及び-4)の mRNA 発現 MCT (2週及び3週)投与ラットと Cont 群の右心室より総 RNA を抽出し、Real-time PCR により TSP-1 (A), TSP-2 (B)及び TSP-4 (C)の mRNA 発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$  法を用いて定量した GAPDH mRNA に対する TSP-1, TSP-2 及び TSP-4 mRNA 発現量を Cont 群で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(2 weeks-Cont, 2 weeks-MCT: n=5; 3 weeks-Cont: n=7, 3 weeks-MCT: n=9)。

\*, \*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. Cont.

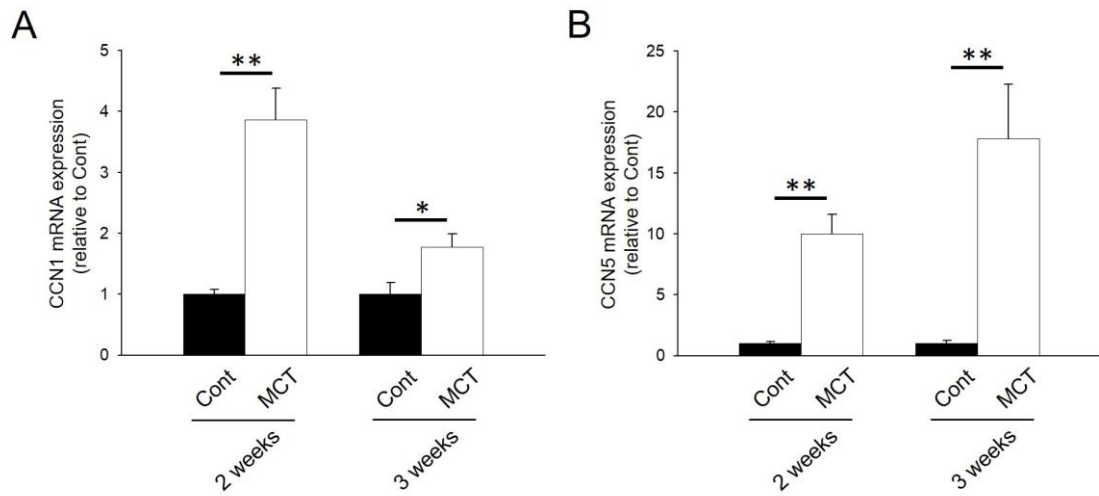


図13 MCT (2週及び3週)投与ラットの右心室におけるCCNファミリー (CCN1及びCCN5)のmRNA発現

MCT (2週及び3週)投与ラットとCont群の右心室より総RNAを抽出し、Real-time PCRによりCCN1 (A)及びCCN5 (B)のmRNA発現を解析した。 $\Delta\Delta C_q$ 法を用いて定量したGAPDH mRNAに対するCCN1及びCCN5 mRNA発現量をCont群で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (2 weeks-Cont, 2 weeks-MCT: n=5; 3 weeks-Cont: n=7, 3 weeks-MCT: n=9)。\*、\*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. Cont.

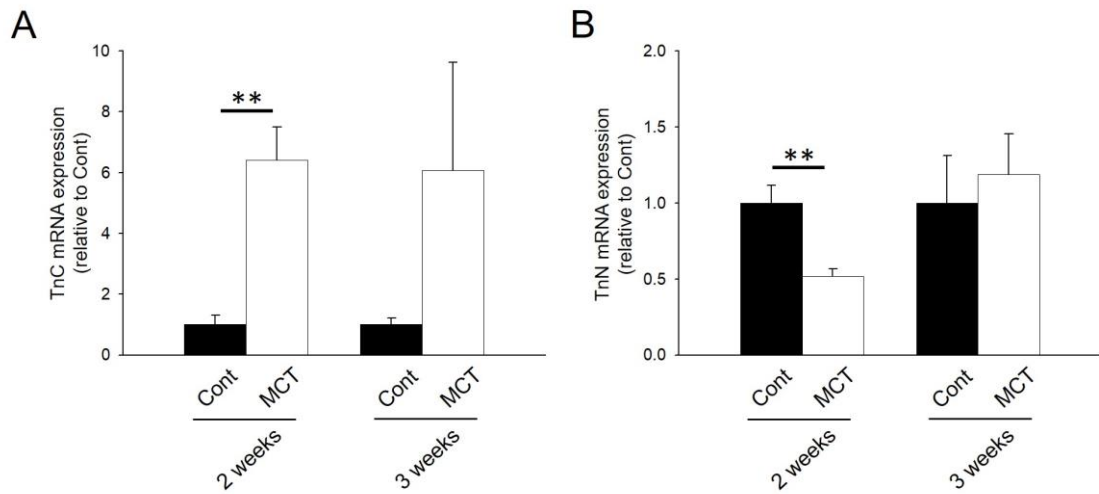


図 14 MCT (2週及び3週)投与ラットの右心室における tenacin (Tn)ファミリー (TnC及びTnN)の mRNA 発現

MCT (2週及び3週)投与ラットと Cont 群の右心室より総 RNA を抽出し、Real-time PCR により TnC (A)及び TnN (B)の mRNA 発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$  法を用いて定量した GAPDH mRNA に対する TnC 及び TnN mRNA 発現量を Cont 群で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (2 weeks-Cont, 2 weeks-MCT: n=5; 3 weeks-Cont: n=7, 3 weeks-MCT: n=9)。\*\* $p < 0.01$  vs. Cont.

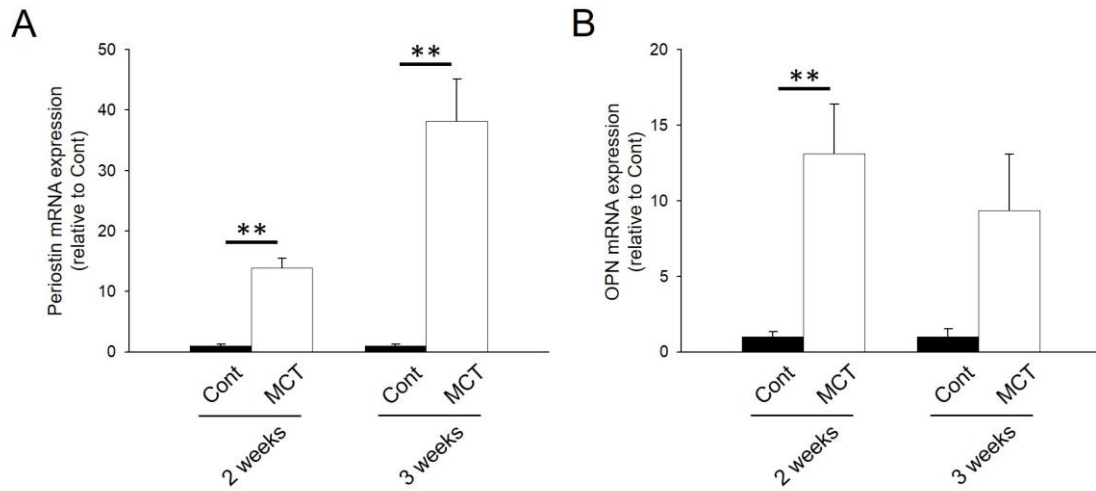


図 15 MCT (2週及び3週)投与ラットの右心室における periostin (POSTN)及び osteopontin (OPN)の mRNA 発現

MCT (2週及び3週)投与ラットと Cont 群の右心室より総 RNA を抽出し、Real-time PCR により POSTN (A)及び OPN (B)の mRNA 発現を解析した。 $\Delta\Delta Cq$  法を用いて定量した GAPDH mRNA に対する POSTN 及び OPN mRNA 発現量を Cont 群で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (2 weeks-Cont, 2 weeks-MCT: n=5; 3 weeks-Cont: n=7, 3 weeks-MCT: n=9)。\*\* $p < 0.01$  vs. Cont.

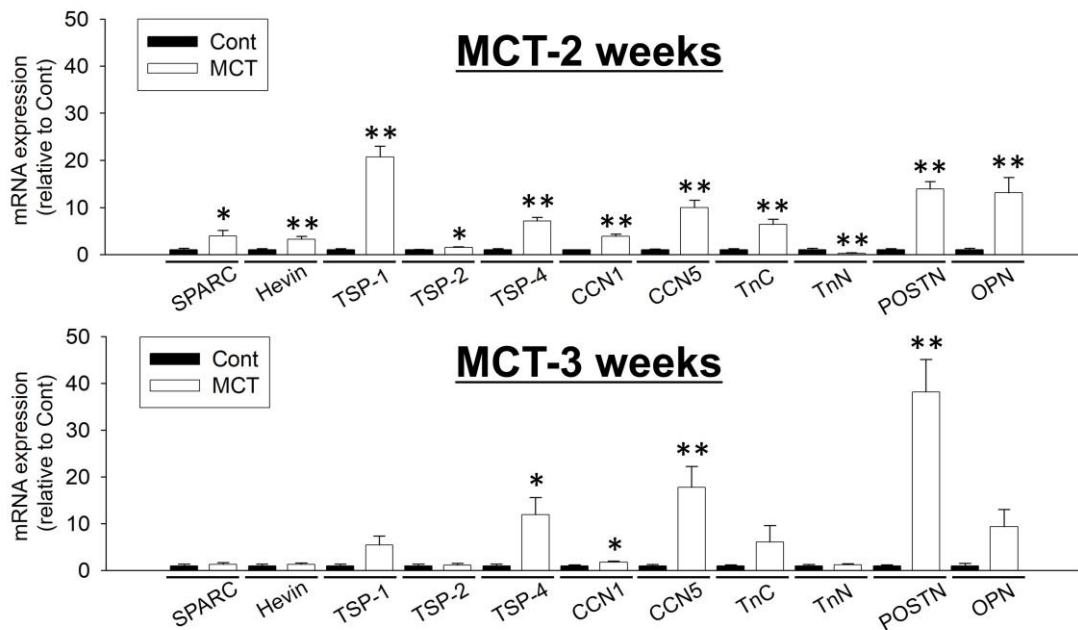


図 16 第二章のまとめ

MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心肥大期に当たる MCT (2 週) 投与ラットの右心室では、TnN を除く多くの *matricellular proteins* の mRNA 発現が有意に亢進した。このことから、PAH 誘発右心肥大から右心不全への移行に数多くの *matricellular proteins* が関与することが示唆された。一方、右心不全期に当たる MCT (3 週) 投与ラットの右心室では SPARC ファミリー、TSP-1 及び-2 mRNA 発現は大きく変化しなかったが、TSP-4、CCN5 及び POSTN mRNA は持続して発現が有意に亢進した。このことから、TSP-4、CCN5 と POSTN は PAH 誘発右心不全の進展に関与する可能性が考えられた [43]。

#### 4. 考察

本章は MCT 投与ラットの右心肥大から右心不全への移行に伴う各種 *matricellular proteins* mRNA の発現変化を明らかにした。以前の報告と同様に、MCT (2 週)投与ラットにおける右心肥大と MCT (3 週)投与ラットにおける肺動脈圧の亢進ならびに右心収縮機能の悪化すなわち右心不全の発症が確認された(表 5)。

SPARC ファミリー mRNA 発現は Cont 群と比べて、MCT (2 週)投与ラットにおいて有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットでは発現に差は見られなかった(図 11)。このことから、SPARC ファミリーの発現変化は PAH 誘発右心肥大から右心不全への移行に関与する可能性が考えられた。PAH 誘発右心不全発症・進展における SPARC ファミリーの役割解明には、さらなる検討が必要である。

同様に TSP-1 及び-2 の mRNA 発現は、MCT (2 週)投与ラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットでは発現に有意な差は見られなかった(図 12A, B)。圧負荷誘発心肥大において TSP-1 及び-2 は心臓リモデリングを抑制することで心保護的に働く可能性が示唆されている[23]。本章の結果から、TSP-1 及び-2 の発現変化は PAH 誘発右心肥大から右心不全への移行に関与する可能性が考えられた。PAH 誘発右心不全発症・進展における TSP-1 及び-2 の役割解明には、さらなる検討が必要である。一方、TSP-4 mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進した(図 12C)。TSP-4 は、圧負荷誘発心肥大において心線維化を抑制することで心保護作用を示すことが報告されている[26]。また、TSP-4 は心臓への機械刺激に対する代償性の心収縮力増強反応に関わることも報告されている[17]。このことから、MCT (2 週及び 3 週)投与ラットに

において持続する TSP-4 の発現亢進は、心線維化の抑制または右心収縮機能保持のための代償性機構である可能性が考えられる。

CCN1 mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットにおける亢進は MCT (2 週)投与ラットと比較して軽度だった(図 13A)。CCN1 は圧負荷誘発肥大左心室において発現が亢進するが、その病態生理学的役割は明らかになっていない[23]。一方、CCN1 は酸化ストレスにより心筋細胞において発現が増加し、 $\beta_1$  インテグリンへの結合を介して心筋細胞死を抑制することが報告されている[104]。酸化ストレスは PAH 誘発右心不全の発症要因の 1 つであることから、CCN1 の発現変化は心筋細胞の酸化ストレスへの応答に何らかの影響を及ぼすことで PAH 誘発右心肥大から右心不全への移行に関与する可能性が考えられる。CCN5 mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットにおける亢進は MCT (2 週)投与ラットと比較してより顕著であった(図 13B)。興味深いことに、CCN5 は心不全患者や圧負荷誘発左心肥大モデル動物の心臓においては発現が減少することが報告されている[47]。CCN5 は心臓、肺、肝臓など様々な臓器において、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ シグナル経路の活性阻害を介して線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制することで線維化を抑制する[47,102,106]。このことから、MCT (2 週及び 3 週)投与ラットにおける CCN5 の持続する発現亢進は、心線維芽細胞の機能調節を介して心線維化を抑制することで、PAH 誘発右心肥大から右心不全発症への移行に関与する可能性が考えられる。PAH 誘発右心不全の発症・進展における CCN ファミリーの役割解明にはさらなる検討が必要である。



TnC mRNA 発現は MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで同程度亢進した(図 14A)。Hessel らは、高濃度の MCT (80 mg/kg, 4 週)投与により作製した右心不全モデルラットの右心室において TnC 発現が亢進することを報告しており、細胞-ECM 間の脱接着作用や  $\beta_6$  インテグリンの発現減少作用により心筋細胞の配列異常を誘導することで右心収縮不全の要因となる可能性を提示している [34]。本章において、MCT (3 週)投与ラットは右心不全を発症した。このことから、MCT (2 週及び 3 週)投与ラットにおける TnC mRNA 発現の持続的な亢進は、右心収縮不全の誘導を介して PAH 誘発右心不全の進展に関与する可能性が考えられる。一方で興味深いことに、新規 Tn ファミリーメンバーである TnN mRNA 発現は MCT (2 週)投与ラットにおいて有意に減少した(図 14B)。TnN は海馬において神経細胞の遊走を制御することが報告されている以外、その生理活性作用は不明である [66]。PAH 誘発右心不全の病態における TnN の役割解明には、さらなる検討が必要である。

POSTN mRNA 発現は、MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットで有意に亢進したが、MCT (3 週)投与ラットにおける亢進は MCT (2 週)投与ラットと比較してより顕著であった(図 15A)。POSTN は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化やコラーゲン発現に関与することから [18,48,60,87]、圧負荷誘発左心肥大や心筋梗塞などの心疾患における心線維化と密接に関わると考えられている [54,69,85]。このことから、POSTN は心線維化の促進を介して PAH 誘発右心不全の発症・進展に関与する可能性が考えられる。一方、POSTN は喘息やアトピー性真皮炎などの様々な炎症性疾患にも関与することが報告されている [46]。炎症性サイトカイン、ECM 分解酵素の一種 matrix metalloproteinases (MMPs)や誘導型一酸化窒素合成酵素

(inducible nitric oxide synthase: iNOS)などが関連する炎症反応は心不全の発症要因となることから、POSTNによる炎症促進作用がPAH誘発右心不全の発症・進展に関与する可能性が考えられる。

OPN mRNA発現は、MCT (2週及び3週)投与両方のラットで亢進したが、MCT (3週)投与ラットにおける増加はMCT (2週)投与ラットと比較して軽度だった(図 15B)。OPNは、MCT (60 mg/kg, 3週)投与ラットの右心室において発現が亢進することが報告されているが[65]、その病態生理学的役割は不明である。OPNは心筋細胞においてAkt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ シグナル経路の活性化を介して圧負荷誘発左心肥大を誘導することが報告されている[101]。このことから、OPNは右心室心筋細胞におけるAkt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ シグナル経路の活性化を介してPAH誘発右心肥大に関わる可能性が考えられる。

結論として第二章では、右心肥大期に当たるMCT (2週)投与ラット及び収縮不全を発症した右心不全期に当たるMCT (3週)投与ラットの右心室における各種matricellular proteinの発現動態を初めて明らかにした(図 16)。これらの知見は、今後PAH誘発右心不全の新たな発症・進展機構の解明に役立つことが期待される。

## IV. 第三章

PAH モデルラットにおける RVFb の形質転換

## 1. 緒言

第二章において、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室組織において様々な *matricellular proteins* mRNA 発現が変化することを明らかにした。このことから、*matricellular proteins* による右心室構成細胞の機能調節が、PAH 誘発右心不全の発症・進展に関与することが示唆された。*Matricellular proteins* などの ECM 関連タンパク質の多くは線維芽細胞によって産生される [2,11]。その一方で、数多くの *matricellular proteins* が心線維芽細胞の機能を調節することも知られている [18,48,87]。

圧負荷誘発左心肥大の末期像として認められる心臓間質の線維化は心不全の発症要因の 1 つと考えられている [5,101]。心線維化形成には、心線維芽細胞における増殖、遊走能の亢進、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 発現の増加を特徴とする筋線維芽細胞への分化、コラーゲンなどの ECM や MMPs, cathepsins といった ECM 分解酵素の活発な産生が密接に関連すると考えられている [51,80]。また、圧負荷誘発左心肥大モデルマウスの左心室線維芽細胞では CaMKII の活性化を介した細胞増殖能の亢進が認められる [61]。さらに冠動脈疾患による心不全患者の左心室由来の心線維芽細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) チャンネルを介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入の増加により collagen type I 産生が亢進する [82]。このように心線維芽細胞の機能調節に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性シグナルが関与することが強く示唆されているが、PAH 誘発右心不全における RVFb の形質や、その調節機構は全く明らかにされていない。そこで第三章では、MCT (2 週) 投与ラットの右心室由来線維芽細胞 (MCT-RVFb) の筋線維芽細胞マーカー ( $\alpha$ -SMA 及び collagen type I) 発現、細胞増殖、遊走能ならびに

MMP-9 産生能を Cont 群の右心室由来線維芽細胞 (CONT-RVfb) と比較検討した。さらに、これら形質を調節する  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構ならびに  $\text{Ca}^{2+}$  依存性シグナル経路の解明を試みた。

## 2.実験材料および実験方法

### 2-1.使用薬物

#### 2-1-1.試薬

Angiotensin II (Ang II, Sigma Aldrich)、YM58483 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)、autocamtide-2-related inhibitory peptide (AIP, Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA, USA)、PD98059、MCT (和光純薬)及びSP600125 (Jena Bioscience, Jena, Germany)。

#### 2-1-2.一次抗体

抗phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)抗体、抗phospho-c-Jun N-terminal kinase (JNK)抗体、抗total-JNK抗体、抗phospho-p38 MAPK抗体、抗phospho-Akt (Ser473)抗体、抗total-Akt抗体、抗phospho-CaMKII (Thr286)抗体(Cell Signaling Technology)、抗total-p38 MAPK抗体、抗total-ERK1/2抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗total-actin抗体、抗total-CaMKII抗体(GeneTex)、抗MMP-9抗体(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)、抗 $\alpha$ -SMA抗体(Dako, Santa Clara, CA, USA)及び抗collagen type I抗体(Rockland, Limerick, PA, USA)。

#### 2-1-3.二次抗体

HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences)。

#### 2-1-4.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承認後(承認番号 16-043 及び 17-085)、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 4-6 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用した。ラットは使用時まで本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において室温  $23.0\pm 2$  °C、湿度 50-60%、12 時間/12 時間の概日周期下で、固形飼料(CE-2,日本クレア)を給餌し自由飲水で飼育した。

### 2-2.実験方法

#### 2-2-1. RVFb の単離・培養

MCT 誘導性 PAH モデルラットを第一章 2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデルの項に準じて作製し、MCT 投与 2 週後に心臓を摘出した。摘出した心臓を Langendorff 灌流装置に設置し、100% O<sub>2</sub> で酸素化した 37 °C の normal HEPES-Tyrode 溶液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、0.02% (w/v) コラゲナーゼを加えた normal HEPES-Tyrode 溶液を 20 分灌流した。コラゲナーゼ処置後、心臓から右心室のみを分離し、無血清の DMEM 中で細切し、細胞を分散した。細胞懸濁液を遠心分離(360 g, 3 分, 4 °C)した後、細胞沈渣を 10% FBS 添加 DMEM 中で再懸濁し、シャーレに播種した後 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。90 分後、培養上清を捨て洗浄した後、接着した細胞を RVFb として 10% FBS 添加 DMEM 中で培養した(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。コンフルエントになった細胞は 0.05% Trypsin-EDTA で剥離し、10% FBS 添加 DMEM 中に懸濁してから継代した。細胞を 6-well シャーレに播種し実験に用いた。

### 2-2-2.免疫蛍光染色

無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした RVFb を 4% パラホルムアルデヒド (和光純薬) で固定した後、0.2% Triton X-100 で脱膜化した。その後、5% 正常ヤギ血清 [normal goat serum (NGS)]/TBS で 1 時間ブロッキングし、5% NGS/TBS で希釈した一次抗体 (1:500 希釈) を載せ反応させた (4 °C, オーバーナイト)。翌日、抗 rabbit IgG Alexa Fluor 568 抗体または抗 mouse IgG Alexa488 抗体 (1:1,000 希釈) を載せ 1 時間、暗所で反応させた。細胞核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で 10 分間染色した。Full high-definition HDMI カメラ (TrueChrome II Plus, Tucsen, Fujian, China) を装着した蛍光顕微鏡 (BX-51, オリンパス) を用いて写真を撮影した。

### 2-2-3.タンパク質抽出と Western blotting

タンパク質抽出と Western blotting は、第一章 2-2-4.タンパク質抽出と Western blotting の項に準じて行った。無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした RVFb の培養上清を回収した後、タンパク質を抽出した。これら培養上清 (20  $\mu$ l) とタンパク質 (10  $\mu$ g) を用いて Western blotting を行った。転写膜にはニトロセルロース膜 (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA) を使用し、ブロッキングには 0.5% スキムミルク (総タンパク質の検出) または 3% ウシ血清アルブミン (リン酸化タンパク質の検出) を用いた。

### 2-2-4.細胞増殖能評価 [Cell counting assay 及び Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay]

細胞増殖能は Cell counting assay と BrdU incorporation assay に



より評価した。Cell counting assayはCell counting kit-8 (CCK8, 同仁化学研究所, 熊本)を用いて行った。RVFbを50,000 cells/wellの密度で6-wellシャーレに播種し、10% FBS添加DMEM中で24時間後培養した後、培地交換し各種阻害薬の処置または無処置下で、48時間培養した(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。その後、CCK8試薬を1時間処置した後、マイクロプレートリーダー(Tristar, LB941, Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いて培地の吸光度(波長485 nm)を測定した。BrdU incorporation assayは、BrdU incorporation assay kit (Exalpha Biologicals, Inc., Shirley, MA, USA)を用いて行った。RVFbを1,562-25,000 cells/wellの密度で96-wellマイクロプレートに播種し、10% FBS添加DMEM中で24時間培養した後、培地交換しBrdU試薬を処置して24時間培養した(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。その後、細胞を固定し、抗BrdU抗体を1時間反応させた後、HRP標識二次抗体を30分間反応させ、暗所でtetramethylbenzidine peroxidase基質を30分間反応させた。マイクロプレートリーダー(Tristar, LB941)を用いて培地の吸光度比(波長450 nm/波長560 nm)を測定した。

#### 2-2-5.細胞遊走能評価(Boyden chamber assay)

細胞遊走能は8-mm孔のTranswell chamber (Corning Life Science)を用いてBoyden chamber assayにより評価した。2% gelatinでチャンバーをコーティングした後、RVFbを50,000 cells/wellの密度でチャンバー上層に播種し、各種阻害薬を処置または無処置下で、10% FBS添加DMEM中で24時間培養した(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。遊走した細胞を100% methanolで固定し、ギムザ染色を行った。Full high-definition HDMIカメラ(TrueChrome II Plus, Tucsen)を装着した位相差顕微鏡(CKX-41, Olympus)を用いて無作為に選んだ3視野の写真を

撮影し、遊走細胞数を測定した。

#### 2-2-6. Gelatin zymography

培養上清中に分泌された MMP-9 の活性を Gelatin zymography によって評価した。無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした RVFb の培養上清を回収し、20  $\mu$ l を gelatin (1.8 mg/ml) を添加したアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離した。ゲルを extraction buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5 に調整), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5% Triton X-100] 中で洗浄した後、incubation buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5 に調整), 5 mM CaCl<sub>2</sub>] 中で 18 時間インキュベートした (37 °C)。その後、ゲルを 0.5% Coomassie Brilliant Blue 染色液 (ナカライテスク) で 10 分間染色し、蒸留水で洗浄することで分解された gelatin のバンドを検出した。スキャナー (GT-9400UF, エプソン, 長野) を用いてゲルの画像をコンピュータ内に取り込んだ後、CS analyzer 3.0 software (ATTO) によりバンドの解析を行った。

#### 2-2-7. RNA 抽出と Real-time PCR

総 RNA 抽出ならびに Real-time PCR は、第一章 2-2-5. RNA 抽出と PCR の項に準じて行った。無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした RVFb から総 RNA を抽出した。使用したプライマーの配列は表に示した (表 6)。

#### 2-2-8. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定

2% gelatin でコーティングしたカバーガラス上に播種しコンフルエントになった RVFb を、Ca<sup>2+</sup>プローブである Fura-2 AM (ナカライテスク) を添加した Ca<sup>2+</sup>-free Normal HEPES-Tyrode 溶液 (bath 溶液)

中で 30 分間インキュベートした (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。カバーガラスを測定チャンパーに設置し、bath 溶液を 4 ml 入れた後、2 波長蛍光測定器 (CAM-230, 日本分光, 東京) を用いて波長 340 nm と 380 nm の励起光を交互に当て、波長 500 nm の蛍光を測定することで [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の指標となるそれぞれの蛍光強度 (F340 ならびに F380) の比率 (F340/F380: F) を算出した。F は基底状態の値 (F<sub>0</sub>) で標準化して表した (F/F<sub>0</sub>)。小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離を Ang II (100 nM, 5 分) により誘起し、2 mM CaCl<sub>2</sub> を処置することで小胞体 Ca<sup>2+</sup> の枯渇により誘導される Ca<sup>2+</sup> 流入 (store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: SOCE) を測定した。

### 2-3. 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表した。2 群間の比較には *Student-t* 検定を用いた。また多群間の比較は ANOVA で分散分析した後 *Bonferroni* の post-hoc test により全ての 2 群間の比較を行い評価した。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. MCT-RVFb における $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現

CONT-RVFb と MCT-RVFb の筋線維芽細胞マーカー ( $\alpha$ -SMA 及び collagen type I) タンパク質発現を比較した。免疫蛍光染色を行った結果、MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して抗  $\alpha$ -SMA 抗体及び抗 collagen type I 抗体陽性染色像の染色強度が低下していた (図 17A)。Western blotting の結果、MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して  $\alpha$ -SMA 及び collagen type I タンパク質発現が有意に減少していた (図 17B, CONT-RVFb: n=7, MCT-RVFb: n=8; 図 17C, n=6,  $p < 0.01$ )。また、MCT (3 週) 投与ラット由来 MCT-RVFb においても同様に、

CONT-RVFbと比較して $\alpha$ -SMA及びcollagen type Iタンパク質発現が減少していた(図20A, B, n=3)。

### 3-2. MCT-RVFbにおける細胞増殖及び遊走能

CONT-RVFbとMCT-RVFbの細胞増殖能をCell counting assay及びBrdU incorporation assayにより検討した。MCT-RVFbの増殖能はCONT-RVFbと比較して有意に亢進した(図18A, CONT-RVFb: n=14, MCT-RVFb: n=15; 図18B, n=5,  $p<0.01$ )。CONT-RVFbとMCT-RVFbの細胞遊走能をBoyden chamber assayにより検討した。MCT-RVFbの細胞遊走能はCONT-RVFbと比較して有意に亢進した(図18C, D, n=3,  $p<0.05$ )。

### 3-3. MCT-RVFbにおけるMMP-9の産生及び活性

MMP-9は細胞遊走や炎症反応の促進に関与することが知られている[20,72,86]。そこで、CONT-RVFbとMCT-RVFbのMMP-9発現・分泌及び活性を検討した。MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してMMP-9の細胞内発現及び培養上清中への分泌が有意に亢進した(図19A, n=12,  $p<0.05$ ; 図19B, n=9,  $p<0.01$ )。培養上清中に分泌されたMMP-9の活性をGelatin zymographyにより検討した。MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してMMP-9前駆体(pro-MMP-9)のGelatin分解活性が有意に亢進した(図19C, n=3,  $p<0.01$ )。また、MCT(3週)投与ラット由来MCT-RVFbにおいても同様にCONT-RVFbと比較してMMP-9発現の有意な増加が認められた(図20C, n=3)。

### 3-4. MCT-RVFb における細胞内シグナル分子の活性化

次に、心線維芽細胞において細胞増殖、遊走やMMP-9発現に関与する細胞内シグナル分子であるCaMKII, ERK1/2, JNK, p38 MAPK及びAktの活性を検討した。MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してCaMKII, ERK1/2及びJNKのリン酸化が有意に亢進した(図19D, E,  $n=9$ ,  $p<0.01$ ; 図19F,  $n=6$ ,  $p<0.05$ )。一方、p38 MAPKとAktのリン酸化に有意な差は見られなかった( $n=3$ , データ未掲載)。

### 3-5. MCT-RVFb における SOCE

細胞内への過剰なCa<sup>2+</sup>の流入はCaMKII, ERK1/2及びJNKの活性化に関与することが知られている[31,33,100]。心線維芽細胞の機能はCRACチャネルやtransient receptor potential (TRP)チャネルにより調節されることが報告されている[31,33,82]。そこで、CONT-RVFbとMCT-RVFbにおけるCRACチャネルの孔形成サブユニット(Orai1及び3)とその活性調節に関わる小胞体センサータンパク質STIM1及びTRPC3, M7のmRNA発現をReal-time PCRにより検討した。MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してOrai1及びSTIM1のmRNA発現が有意に亢進した(図21A,  $n=3$ , Orai1:  $p<0.01$ , STIM1:  $p<0.05$ )。さらに、Fura-2を用いた[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定によりAng II誘導性小胞体Ca<sup>2+</sup>遊離によるSOCEを検討した。MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してSOCEが有意に亢進した(図21B, D, CONT-RVFb:  $n=6$ , MCT-RVFb:  $n=7$ ,  $p<0.05$ )。一方、Ang II (100 nM)により誘導される小胞体Ca<sup>2+</sup>遊離に差はなかった(図21B, C, CONT-RVFb:  $n=6$ , MCT-RVFb:  $n=7$ )。

### 3-6. MCT-RVFb における細胞増殖、遊走、MMP-9 産生能に各種阻害

## 薬が及ぼす影響

次に、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/ERKシグナル経路阻害薬 (PD98059), JNK阻害薬 (SP600125), CaMKII阻害薬 (AIP) 及びCRACチャネル阻害薬 (YM58483)がMCT-RVFbの細胞増殖及び遊走能に及ぼす影響を検討した。MCT-RVFbの細胞増殖能の亢進はPD98059により抑制されたが、SP600125, AIP及びYM58483は影響を及ぼさなかった(図22A, n=3)。MCF-RVFbの細胞遊走能の亢進はPD98059により抑制される傾向を示し、SP600125, AIP及びYM58483により有意に抑制された(図22B, n=5,  $p < 0.01$ )。またPD98059とSP600125の共処置は、PD98059単独処置と比較してより顕著な抑制を示した(図22B, n=5,  $p < 0.05$ )。MCT-RVFbのMMP-9発現亢進はPD98059, AIP及びYM58483により有意に抑制された(図23, n=4,  $p < 0.01$ )。一方、SP600125はMCT-RVFbのMMP-9発現亢進に影響を及ぼさなかった(図23, n=4)。最後に、MCT-RVFbにおけるSOCE, CaMKII, ERK1/2及びJNKの相関関係を検討した。MCT-RVFbにおけるCaMKIIのリン酸化亢進はYM58483により抑制された(図24A, n=3,  $0.52 \pm 0.16$  vs. DMSO)。MCT-RVFbにおけるJNKのリン酸化亢進はYM58483及びAIPにより有意に抑制された(図24C, n=3,  $p < 0.01$ )。一方、YM58483とAIPはMCT-RVFbにおけるERK1/2のリン酸化亢進には影響を及ぼさなかった(図24B, n=3)。

Target	Primer sequences		Accession number
TRP <sup>a)</sup> C3	Forward	5'-GCTGGAGGGGCGTCAAC-3'	NM_021771
	Reverse	5'--GGATGTTGCCGTACTGCGT-3'	
TRPM7	Forward	5'-AGAGATGTGGTTGCCCCCTA-3'	NM_053705
	Reverse	5'-TGCCCCATACTTTCCAACCG-3'	
Orai1	Forward	5'-TGATGAGCCTCAACGAGCAC-3'	NM_001013982
	Reverse	5'-ACCATCGCTACCATGGCGAA-3'	
Orai3	Forward	5'-TAAGCTCAAAGCCTCCAGTCG-3'	NM_001014024
	Reverse	5'-TGCAGGCACTAAATGCCACT-3'	
STIM <sup>b)</sup> 1	Forward	5'-TCCTCTCTTGACTCGCCACA-3'	NM_001108496
	Reverse	5'-CCACCCACACCAATCACGATA-3'	
RPL <sup>c)</sup> 13	Forward	5'-AAGATCCGCAGACGCAAGG-3'	NM_031101
	Reverse	5'-CTGTAGGGCACCTCACGATG-3'	

表6 プライマー配列

- a) Transient receptor potential;
- b) Stromal interaction molecule;
- c) Ribosomal protein L.

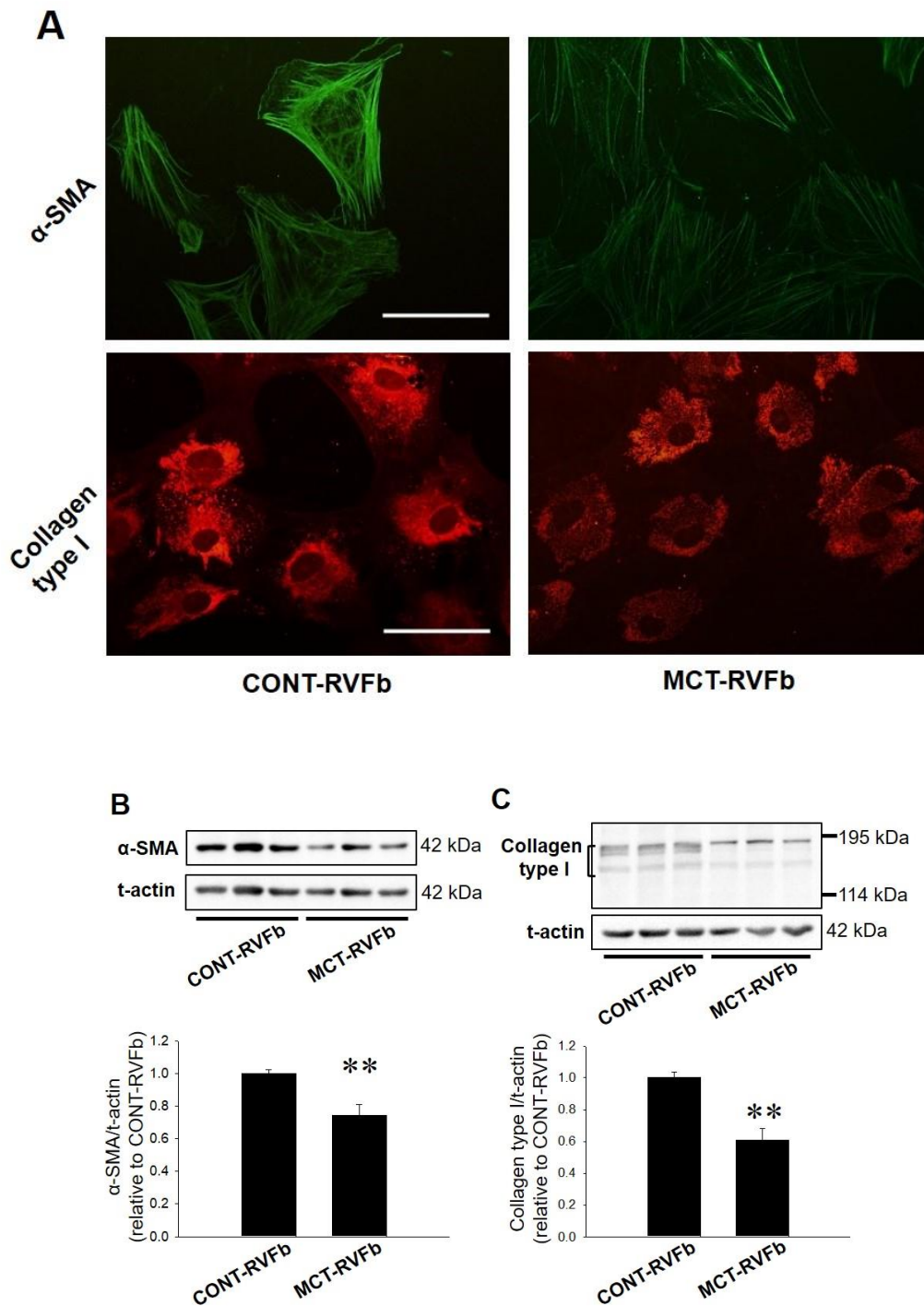


図 17 MCT誘導性PAHモデルラットの右心室由来線維芽細胞(MCT-RVFb)における $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)及びcollagen type I発



現

MCT (2週)投与ラットとCont群の右心室由来線維芽細胞(MCT-RVFb及びCONT-RVFb)における $\alpha$ -SMAならびにcollagen type Iタンパク質発現を検討した。(A) CONT-RVFb (左図)及びMCT-RVFb (右図)を無血清Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)中で24時間スタベーションした後、免疫蛍光染色を行った。典型的な抗 $\alpha$ -SMA抗体(上図,緑色蛍光)及び抗collagen type I抗体(下図,赤色蛍光)陽性像(n=3)。Scale, 50  $\mu$ m. (B, C)無血清DMEM中で24時間スタベーションしたCONT-RVFb及びMCT-RVFbを可溶化しタンパク質を抽出した後、Western blottingを行った。(上図)  $\alpha$ -SMA (B), collagen type I (C)及びt-actinの典型的なプロット像。(下図) t-actinに対する $\alpha$ -SMA (CONT-RVFb: n=7, MCT-RVFb: n=8)及びcollagen type I (n=6)発現量をCONT-RVFbで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

\*\* $p < 0.01$  vs. CONT-RVFb.

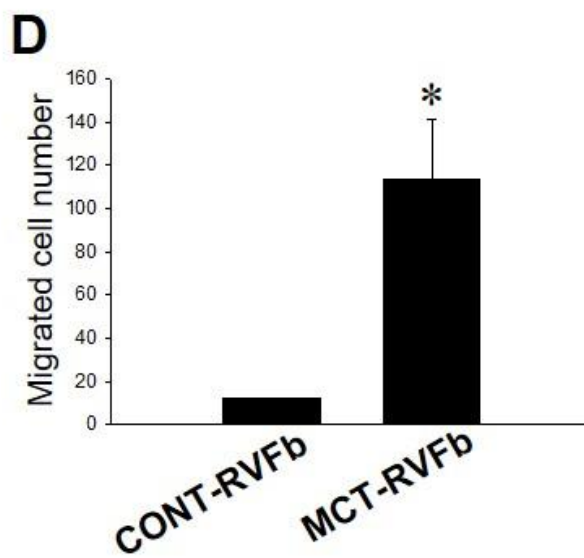
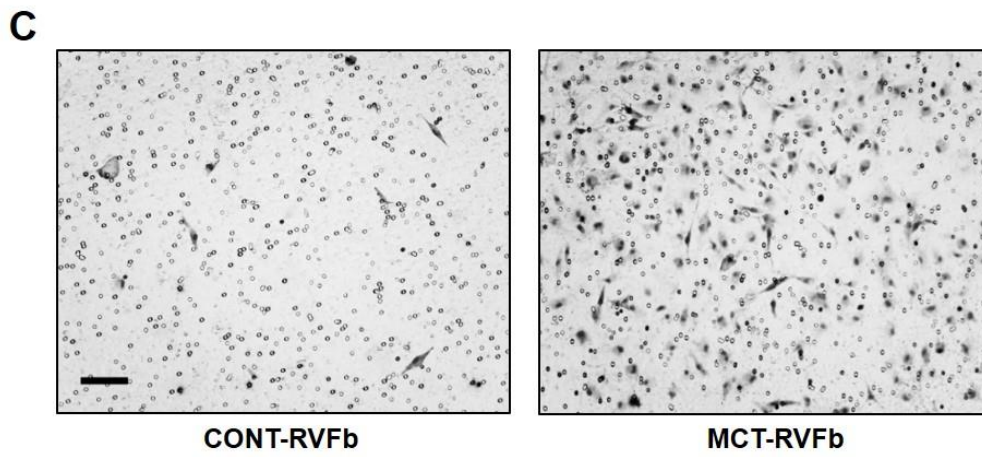
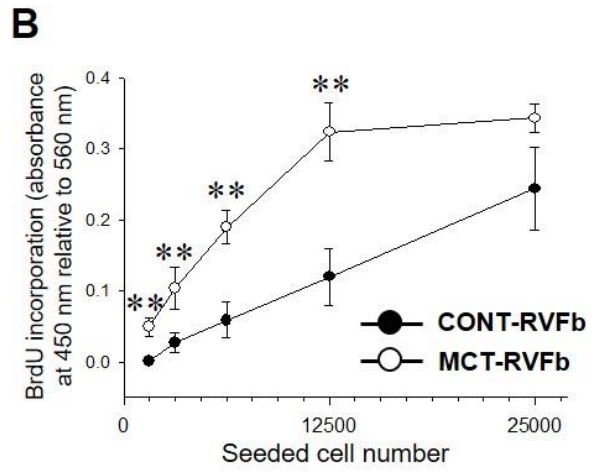
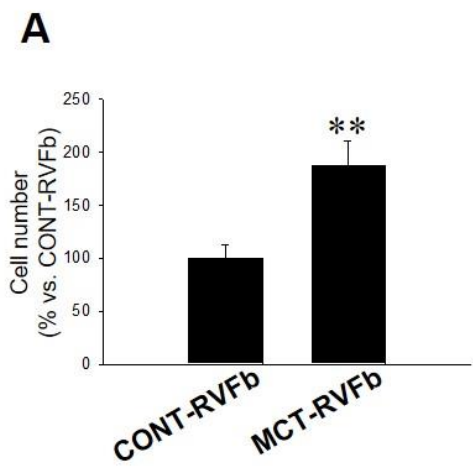


図 18 MCT-RVFbにおける細胞増殖、遊走能

MCT-RVFbとCONT-RVFbの細胞増殖能をCell counting assay (A)とBrdU incorporation assay (B)により、細胞遊走能をBoyden chamber assay (C, D)により検討した。(A) CONT-RVFb及びMCT-RVFbを50,000 cells/wellの密度で6-wellシャーレに播種した後、定着した細胞を10%添加DMEM中で48時間培養した。生存細胞数はCell Counting Kit-8を用いた比色法で評価し、CONT-RVFbの生細胞数で標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した(CONT-RVFb: n=14, MCT-RVFb: n=15)。(B) CONT-RVFb及びMCT-RVFbを1,562-25,000 cells/wellの密度で96-wellプレートに播種した後、定着した細胞にBrdU試薬を処置し10%添加DMEM中で24時間培養した。細胞を固定し、抗BrdU抗体を1時間反応させた後、horseradish peroxidase標識二次抗体を反応させた。Tetramethylbenzidine peroxidase基質を加え発色させた後、波長560 nmに対する波長450 nmの吸光度を測定した。結果は平均値±標準誤差で示した(n=5)。(C) CONT-RVFb及びMCT-RVFbを50,000 cells/wellの密度で2% gelatinコーティングしたチャンバー上層に播種した後、無血清DMEM中で24時間培養した。チャンバー下層に遊走した細胞をギムザ染色した。(C)チャンバー下層に遊走したCONT-RVFb (左図)及びMCT-RVFb (右図)の典型的なギムザ染色像。(D) CONT-RVFbの遊走細胞数で標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した(n=3)。

\*, \*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. CONT-RVFb.

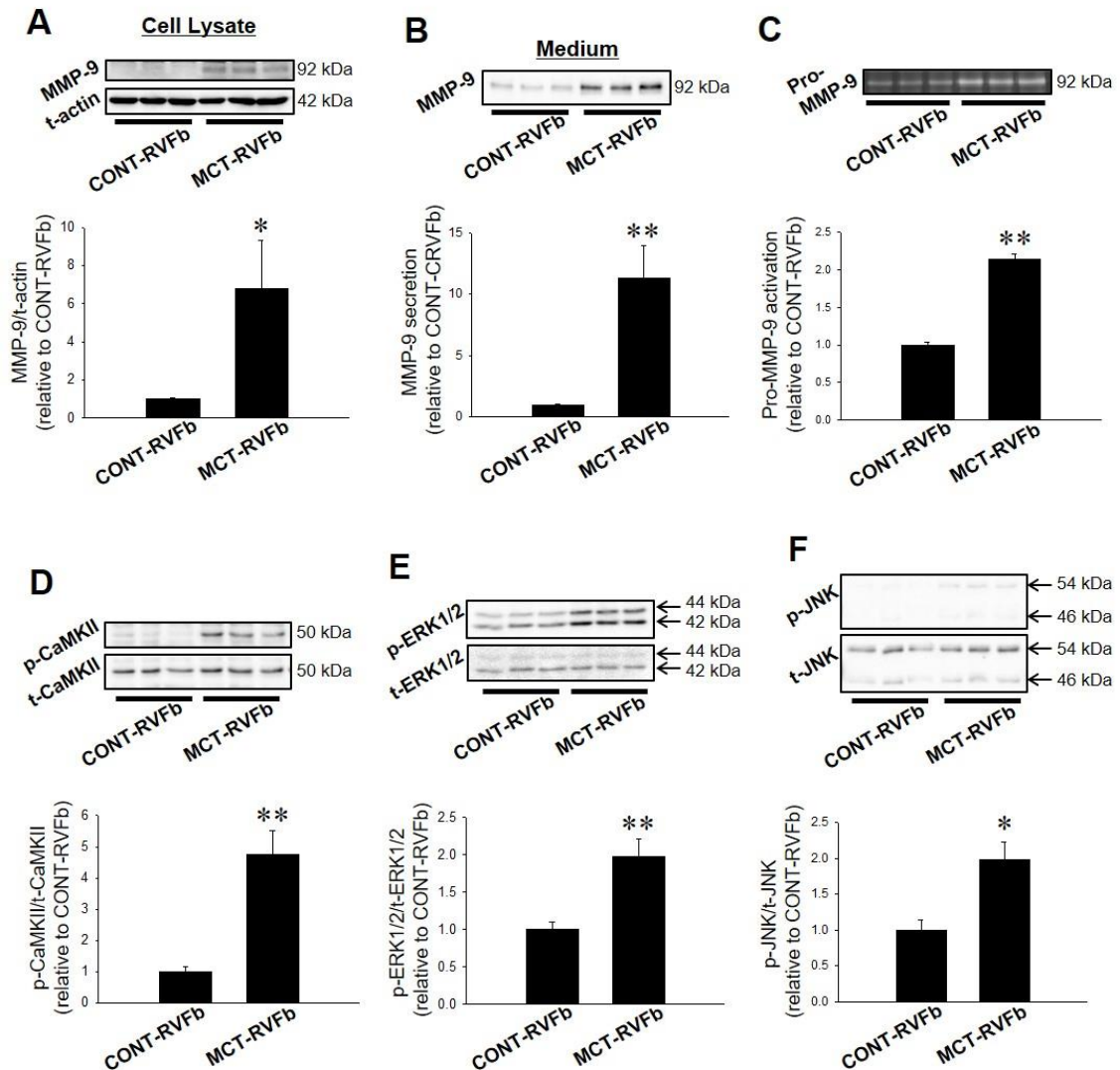


図19 MCT-RVFbにおける matrix metalloproteinase (MMP)-9産生及び活性と細胞内シグナル分子の活性  
 (A, B)無血清DMEM中で24時間スタベーションしたCONT-RVFb及びMCT-RVFbの培養上清を回収し、細胞可溶化タンパク質を抽出した後、Western blottingによりMMP-9タンパク質発現を検討した。(上図)細胞内タンパク質(Cell Lysate, A, n=12)及び培養上清(Medium, B, n=9)中のMMP-9及びt-actinの典型的なブロット像。(下図)t-actin (A)及び総タンパク質濃度(B)に対するMMP-9発現量を、CONT-

RVFbで標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した。(C)無血清DMEM中で24時間スタベーションしたCONT-RVFb及びMCT-RVFbの培養上清を回収し、Gelatin zymographyによりMMP-9活性を検討した。(上図)MMP-9前駆体(pro-MMP-9)の典型的なザイモグラフ像。(下図)総タンパク質濃度に対するMMP-9活性を、CONT-RVFbで標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した(n=3)。(D-F)無血清DMEM中で24時間スタベーションしたCONT-RVFb及びMCT-RVFbを可溶化しタンパク質を抽出した後、Western blottingによりCa<sup>2+</sup>/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (CaMKII), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)及びc-Jun N-terminal kinase (JNK)のリン酸化を検討した。(上図)リン酸化CaMKII (p-CaMKII)及び総CaMKIIタンパク質(t-CaMKII) (D, n=9), p-ERK1/2及びt-ERK1/2 (E, n=9)、p-JNK及びt-JNK (F, n=6)の典型的なブロット像。(下図)総タンパク質に対するリン酸化タンパク質発現量をCONT-RVFbで標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した。  
\*, \*\* $p < 0.05, 0.01$  vs. CONT-RVFb.

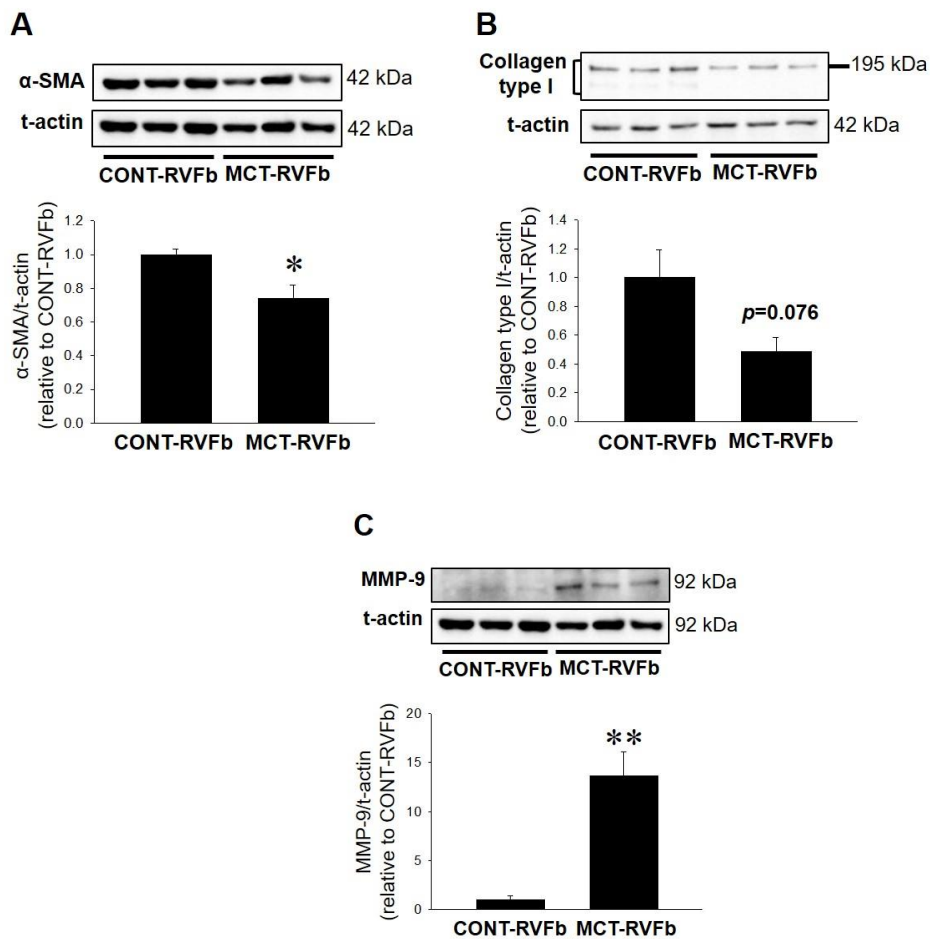


図 20 MCT (3週)投与ラット由来MCT-RVFbにおける $\alpha$ -SMA, collagen type I及びMMP-9発現

無血清DMEM中で24時間スタベーションしたCONT-RVFb及びMCT-RVFbから可溶化タンパク質を抽出した後、Western blottingにより細胞内の $\alpha$ -SMA (A), collagen type I (B)及びMMP-9 (C)タンパク質発現を検討した。(上図) $\alpha$ -SMA, collagen type I, MMP-9及びt-actinの典型的なブロット像。(下図)t-actinに対する $\alpha$ -SMA, collagen type I及びMMP-9発現量をCONT-RVFbで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。\* \*\* $p<0.05, 0.01$  vs. CONT-RVFb.

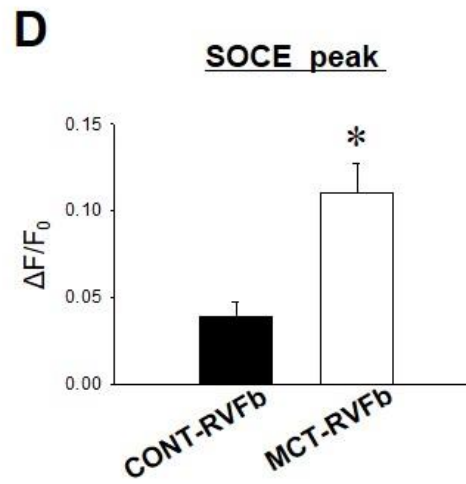
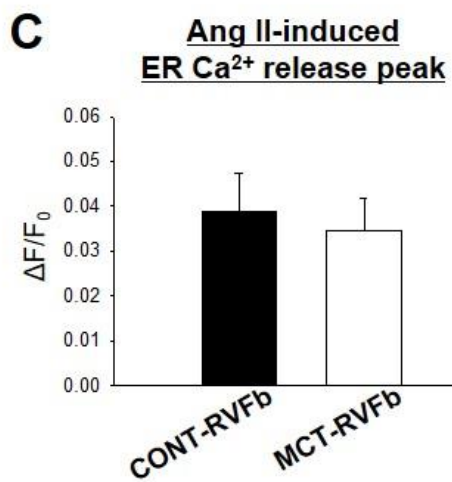
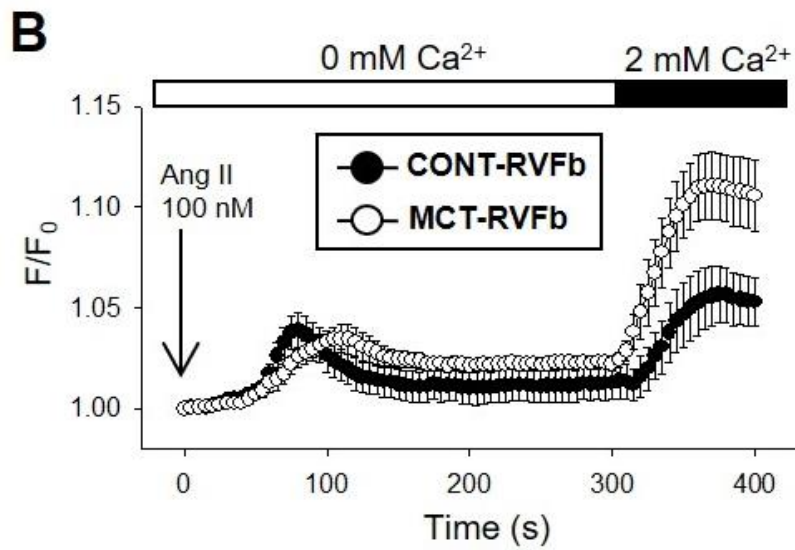
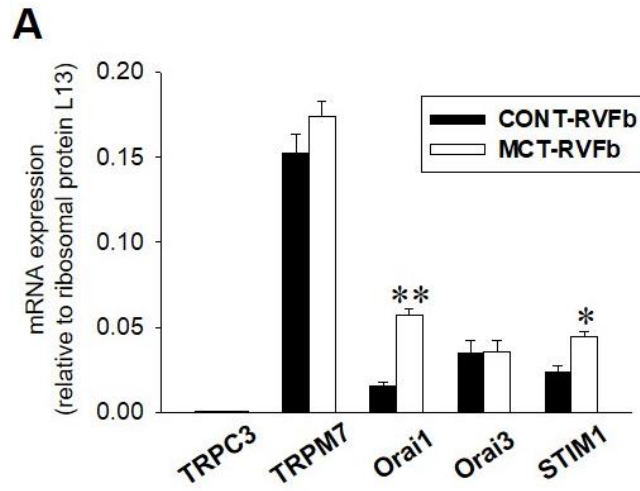


図 21 MCT-RVFbにおける各種カチオンチャネル mRNA 発現及び store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE)

(A) 無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした CONT-RVFb 及び MCT-RVFb から総 RNA を抽出し cDNA を作製した後、Real-time PCR により transient receptor potential (TRP) チャネル (TRPC3 及び M7)、 $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) チャネル (Orai1 及び 3) 及び stromal interaction molecule (STIM) 1 の mRNA 発現を解析した。 $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法を用いて定量した reboosomal protein L (RPL) 13 mRNA 発現量で標準化した。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。(B-D) CONT-RVFb 及び MCT-RVFb における SOCE を  $\text{Ca}^{2+}$  プローブである Fura-2 AM を用いた細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 測定法により評価した。2% gelatin でコーティングしたカバーガラス上に播種しコンフルエントになった細胞に Fura-2 AM を取り込ませた後、2 波長蛍光測定器を用いて波長 340 nm と 380 nm の励起光を交互に当て、波長 500 nm の蛍光を観測することで  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の指標となるそれぞれの蛍光強度 (F340 ならびに F380) の比率 (F340/F380: F) を測定した。F は基底状態の値 ( $F_0$ ) により標準化した ( $F/F_0$ )。小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を Ang II (100 nM, 5 分) により誘起した後、2 mM  $\text{CaCl}_2$  を処置することで小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  の枯渇により誘導される  $\text{Ca}^{2+}$  流入 (SOCE) を測定した。Ang II 誘導性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離 (C) 及び SOCE (D) による  $F/F_0$  の最大変化 ( $\Delta F/F_0$ ) をグラフに示した (CONT-RVFb: n=6, MCT-RVFb: n=7)。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。\*、\*\*  $p < 0.05, 0.01$  vs. CONT-RVFb.



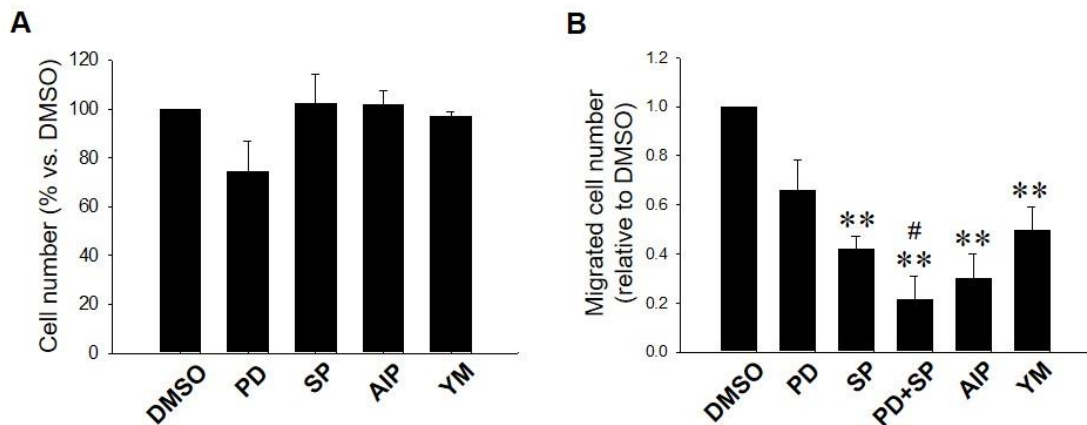


図22 MCT-RVFbの細胞増殖、遊走能に各種阻害薬が及ぼす影響

MCT-RVFbの細胞増殖能をCell counting assay (A)により、細胞遊走能をBoyden chamber assay (B)により評価した。(A) MCT-RVFbを50,000 cells/wellの密度で播種した後、定着した細胞を阻害薬無処置下(DMSO)あるいはmitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/ERK シグナル経路阻害薬[PD98059 (PD), 50  $\mu$ M], JNK阻害薬[SP600125 (SP), 10  $\mu$ M], CaMKII阻害薬(AIP, 5  $\mu$ M)及びCRACチャネル阻害薬[YM58483 (YM), 10  $\mu$ M]処置下で10%添加DMEM中で48時間培養した。生存細胞数はCell Counting Kit-8を用いた比色法で評価し、DMSOで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(n=3)。(B) MCT-RVFbを50,000 cells/wellの密度で2% gelatinコーティングしたチャンバー上層に播種した後、阻害薬無処置下(DMSO)あるいはPD (50  $\mu$ M), SP (10  $\mu$ M), AIP (5  $\mu$ M)及びYM (10  $\mu$ M)処置下で24時間培養した。チャンバー下層に遊走した細胞をギムザ染色した。遊走細胞数をDMSOで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(n=5)。\*\* $p$ <0.01 vs. DMSO, # $p$ <0.05 vs. PD.

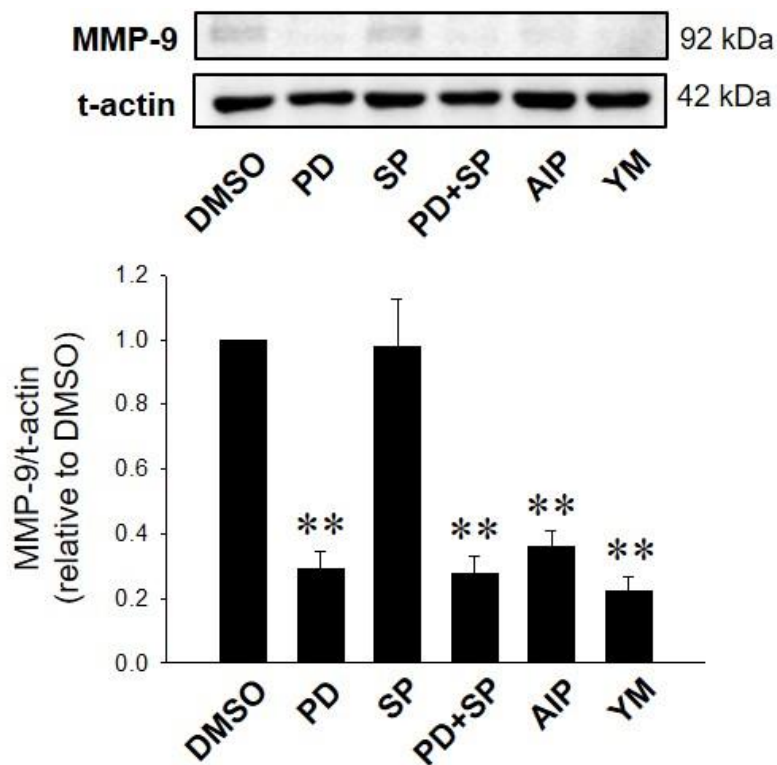


図 23 MCT-RVFbのMMP-9発現に各種阻害薬が及ぼす影響

(A, B)阻害薬無処置下(DMSO)あるいはPD (50  $\mu$ M), SP (10  $\mu$ M), AIP (5  $\mu$ M)またはYM (10  $\mu$ M)処置下で24時間培養したMCT-RVFbを可溶化しタンパク質を抽出した後、Western blottingによりMMP-9タンパク質発現を検討した。(上図)MMP-9及びt-actinの典型的なブロット像。(下図)t-actinに対するMMP-9発現量をCONT-RVFbで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(n=4)。\*\* $p$ <0.01 vs. DMSO.

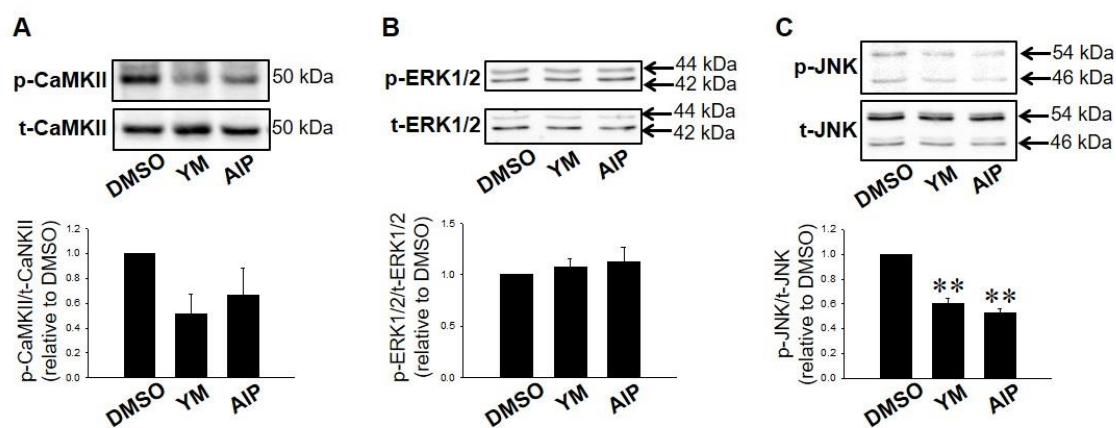


図24 MCT-RVFbの細胞内シグナル活性に各種阻害薬が及ぼす影響 (A, B)阻害薬無処置下(DMSO)あるいはYM (10  $\mu$ M)またはAIP (5  $\mu$ M)処置下で24時間培養したMCT-RVFbを可溶化しタンパク質を抽出した後、Western blottingによりCaMKII, ERK1/2及びJNKのリン酸化を評価した。(上図) p-CaMKII及びt-CaMKII (A), p-ERK1/2及びt-ERK1/2 (B)ならびにp-JNK及びt-JNK (C)の典型的なブロット像。(下図)総タンパク質に対するリン酸化タンパク質発現量をCONT-RVFbで標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(n=3)。

\*\* $p < 0.01$  vs. DMSO.

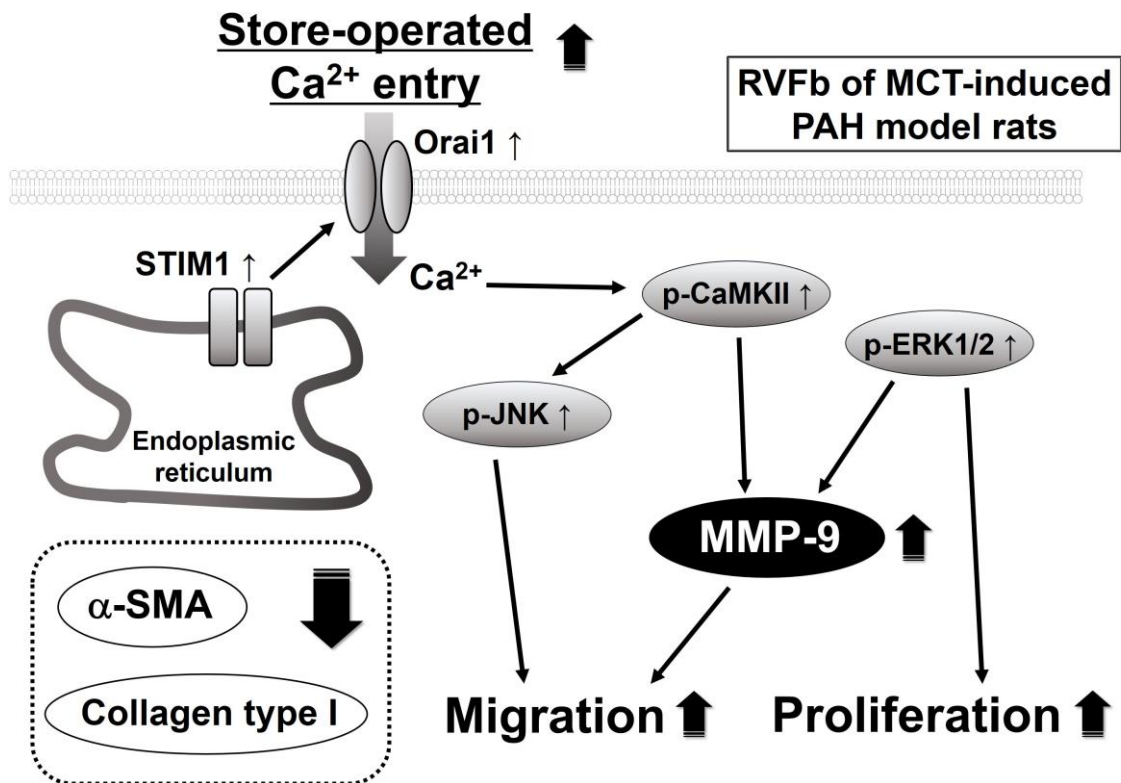


図 25 第三章のまとめ

MCT-RVFbはCONT-RVFbと比較してα-SMA及びcollagen type I発現が減少したが、細胞増殖、遊走能が亢進した。STIM1及びOrai1 mRNA発現増加によるSOCEの増加は、CaMKIIを活性化する。MCT-RVFbにおける細胞増殖能の亢進はERK1/2の活性化を介して誘導される。一方、MCT-RVFbにおける細胞遊走能の亢進は、SOCE/CaMKIIシグナル経路及びERK1/2の活性化を介して産生が亢進するMMP-9と、SOCE/CaMKII/JNKシグナル経路の活性化を介して誘導されることが明らかになった[44]。

#### 4. 考察

本章では、MCT 投与ラットにおける RVFb の形質変化とその調節の分子機構を明らかにした。MCT-RVFb は CONT-RVFb と比較して  $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現が減少していたことから、筋線維芽細胞とは異なる形質であった(図 17, 25)。この形質は MCT 投与 3 週後の RVFb においても同様であった(図 20)。心筋梗塞において心線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA, collagen type I 及び MMPs は梗塞後の時間経過に伴いその発現が変化すると考えられている[24,83]。心筋梗塞後初期においてネクロシスを起こした心筋細胞が分泌する炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 ファミリーは心線維芽細胞の MMPs 産生を誘導する一方で、 $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現を阻害することで筋線維芽細胞への分化を抑制する[24]。Ikeda らは、肺高血圧症による圧負荷誘発右心肥大において、右心室組織の IL-1 $\beta$  mRNA 発現が増加することを報告している[41]。このことから、MCT-RVFb の形質は IL-1 ファミリーなどの炎症性サイトカインにより誘導される心筋梗塞後初期に見られる形質に近いものであると考えられる。本章では MCT-RVFb におけるこれらの形質転換を誘導する因子を明らかにすることはできなかった。筋線維芽細胞への分化には TGF- $\beta$ 1 シグナル経路が関与するが[5]、MCT-RVFb の培養上清において TGF- $\beta$ 1 は検出されなかった(n=3, データ未掲載)。このことから、MCT-RVFb の形質変化に TGF- $\beta$ 1 の傍分泌作用は関与しないと考えられた。プロスタサイクリン誘導體である Ilopost は SU5416/hypoxia 誘導性右心不全モデルラットの右心室における collagen type I 発現を抑制することや、ヒト心線維芽細胞において MMP-9 発現を誘導する一方で collagen type I 分解を促進すること

が報告されている[28]。また、epidermal growth factor (EGF)は歯根膜由来内皮前駆細胞の細胞増殖、遊走能を亢進する一方で、筋線維芽細胞への分化を抑制する[49]。これらのことから、プロスタサイクリンや EGF が MCT-RVFb の形質転換に関与する可能性が考えられる。本研究第四章において MCT-RVFb の形質転換を引き起こすメカニズムのさらなる検討を行った。

本研究において、MCT-RVFb の細胞増殖能は CONT-RVFb と比較して亢進した(図 18)。心線維芽細胞の増殖には ERK, Akt 及び CaMKII の活性が関与する[38,61,71]。MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して ERK1/2 及び CaMKII の活性が有意に亢進した(図 19D, E)。MCT-RVFb の細胞増殖能は PD98059 により抑制されたが、AIP はこれに影響を及ぼさなかった(図 22A)。これらの結果から、MCT-RVFb の細胞増殖能は、ERK1/2 シグナルの活性化を介するが、 $[Ca^{2+}]_i$  増加には依存しないことが明らかになった(図 25)。Ikeda らは、肺動脈結紮誘導性右心不全の発症・進展には酸化ストレスにより活性化した Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2/ERK1/2 シグナル経路が関与することを示している[41]。このことから、MCT-RVFb における ERK1/2 の活性化には、酸化ストレスにより誘導される Rho kinase シグナル経路の活性化が関与する可能性が考えられる。

MCT-RVFb の細胞遊走能は CONT-RVFb と比較して有意に亢進した(図 18C, D)。心線維芽細胞の遊走には ERK1/2 及び JNK の活性化が関与することが報告されている[13,72]。MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較してこれら分子の活性が有意に亢進した(図 19E, F)。また、PD98059 及び SP600125 は MCT-RVFb の細胞遊走能を抑制し、PD98059 と SP600125 の共処置により遊走抑制作用が亢進され

た(図 22B)。これらのことから、MCT-RVFb の細胞遊走能は、それぞれ ERK1/2 と JNK が関与する 2 つの独立したシグナル経路により調節されることが明らかになった。

MCT-RVFb では心線維芽細胞の遊走促進作用を有する MMP-9 の発現、分泌や活性が有意に亢進した(図 19A-C)。MCT (3 週)投与ラットの RVFb においても同様の結果が得られた(図 20)。MMP-9 発現は CaMKII, ERK1/2, JNK, p38 MAPK 及び Akt など様々なシグナル分子によって調節される[40,57,64,100]。MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して CaMKII, ERK1/2 及び JNK の活性が有意に亢進した(図 19D-F)。これらの分子は細胞内への過剰な Ca<sup>2+</sup>の流入により活性化されることが知られている[31,33,100]。MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して SOCE を担う Orai1 及び STIM1 の mRNA 発現が有意に亢進しており(図 21A)、SOCE の有意な増加が認められた(図 21B, D)。MCT-RVFb の MMP-9 発現亢進は PD98059, YM58483 及び AIP により有意に抑制されたが、SP600125 はこれに影響を及ぼさなかった(図 23)。また、YM58483 は MCT-RVFb の CaMKII 活性を抑制したが、ERK1/2 活性には影響を及ぼさなかった(図 24B)。このことから、MCT-RVFb の MMP-9 産生とそれによる細胞遊走能の亢進は、ERK1/2 及び SOCE/CaMKII シグナルによって調節されることが示唆された(図 25)。一方、MCT-RVFb の細胞遊走能亢進に関わる JNK の活性は、YM58483 及び AIP により有意に抑制された(図 24C)。このことから、MCT-RVFb の細胞遊走能亢進は、MMP-9 に依存しない SOCE/CaMKII/JNK シグナル経路によっても制御されることが明らかになった(図 25)。細胞膜における接着斑の形成は talin, paxillin や tensin などの細胞膜アダプタータンパク質の活性化により促進される[10,58]。JNK は paxillin の活性化を介して

様々ながん細胞の遊走を促進することが報告されている[58]。このことから、MCT-RVFbにおいて活性化したJNKは、接着斑形成を介して細胞遊走能を亢進する可能性が考えられる。心線維芽細胞におけるCRACチャンネルを介したSOCEの増加は心不全の発症要因となることが示唆されている[82]。このことから、MCT-RVFbにおけるSOCEの増加はCaMKII及びJNKの活性化を引き起こし、それによる細胞遊走能の亢進を介してPAH誘発右心不全の発症・進展に関与する可能性が考えられた。

結論として第三章では、MCT-RVFbがCa<sup>2+</sup>依存性(SOCE/CaMKII)及びCa<sup>2+</sup>非依存性(ERK1/2)シグナル経路の活性化を介して細胞増殖、遊走能が亢進した炎症性の形質であることを初めて明らかにした(図25)。これらの知見は、RVFbを標的とした新規PAH誘発右心不全の治療戦略の開発に貢献することが期待される。



## V. 第四章

POSTN は RVFb の iNOS 発現誘導を介して右心収縮機能障害に関与する

## 1. 緒言

Fasciclin familyの一つであるPOSTNは、分子量約90 kDaの matricellular proteinである[36,92]。POSTNは線維化、腫瘍、炎症など様々な病態に関与することが知られており、細胞-ECM間の相互作用を介して、細胞増殖、遊走、分化や上皮-間葉転換など様々な細胞機能を調節する[3,18,46,90]。心筋梗塞、心肥大や心線維化など様々な心疾患モデル動物の心臓において、POSTN発現が増加する[85,89,110]。POSTNは心線維芽細胞の機能調節を介して心疾患の発症・進展に関与すると考えられている[69,85]。第二章においてMCT誘導性PAHモデルラットの右心室においてPOSTN mRNA発現が顕著に増加することを明らかにした。さらに第三章において、MCT誘導性PAHモデルラットのRVFbが増殖、遊走能が亢進した炎症性の形質転換を起こすことを明らかにした。しかしながら、PAH誘発右心不全の発症・進展におけるPOSTNとRVFbとの関連は明らかにされていない。

一酸化窒素(nitric oxide: NO)の合成酵素には、neuronal NOS, endothelial NOSそしてiNOSの3つのアイソフォームがある[95]。圧負荷誘発左心肥大や虚血性疾患により誘発される心不全において、心臓におけるiNOS発現が増加する[22,95]。IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインは心線維芽細胞においてiNOS発現を誘導する[70]。ラット摘出心臓を用いた実験で、炎症性サイトカインにより発現誘導されるiNOS由来のNOが心収縮機能を障害することが報告されている[84]。また、iNOS遺伝子欠損により、圧負荷誘発左心肥大モデルマウスの心収縮機能の低下が改善することから、iNOSによるNO産生の亢進は心収縮機能障害の原因の1つと考えられる[21,107]。ヒト

軟骨細胞において、POSTNは nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)の活性化を介して iNOS 遺伝子発現を誘導することが報告されている[15]。そこで本章では、POSTNが RVFbの iNOS 発現と NO 産生を亢進するかを検討した。さらに、POSTNが心収縮機能を障害することで PAH 誘発右心不全発症・進展に関与するとの仮説を検証するために、RVFbにおいて POSTNにより産生亢進した NOが、H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性に及ぼす影響を検討した。

## 2.実験材料および実験方法

### 2-1.使用薬物

#### 2-1-1.試薬

MCT (和光純薬)、N ( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 同仁化学研究所)、BAY11-7082 [Merck Millipore (calbiochem)], PD98059, SP600125 及び sodium nitroprusside (SNP, Sigma Aldrich)。

#### 2-1-2.一次抗体

抗 POSTN 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA)、抗 6xHistidine 抗体 (和光純薬)、抗 GAPDH 抗体 (GeneTex)、抗 iNOS 抗体 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA または Bioss)、抗 phospho-vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) (Ser239) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 t-actin 抗体、抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 phospho-JNK 抗体、抗 total-JNK 抗体、抗 phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 total-ERK1/2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology または Bioss)、抗 total-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 及び抗 IL-1 $\beta$  抗体 (Santa Cruz

Biotechnology)。

### 2-1-3. 二次抗体

HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体及び HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)。

### 2-1-4. 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承認後(承認番号 16-043, 17-085 及び 18-022)、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 4-7 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用した。ラットは使用時まで本学部 5 号館 2 階の小動物飼育室において室温  $23.0 \pm 2$  °C、湿度 50-60%、12 時間/12 時間の概日周期下で、固形飼料(CE-2, 日本クレア)を給餌し自由飲水で飼育した。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. POSTN 組換えタンパク質の作製

全ての遺伝子組換え実験は北里大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認後に行った(承認番号 3918)。ラット POSTN mRNA (Accession number: KM117173.1) 全長を図 25A に示すプライマーを用いて PCR により増幅した後、増幅産物を pET-22b (+) plasmid vector [Merck Millipore (Novagen)] の 6xHistidine (His-tag) 配列の上流にライゲーションした(図 26A)。POSTN 配列を挿入した plasmid を TOP10 *E. coli* competent cell [Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)] に加え、氷上で 30 分間静置した後、heat-shock を与えた(42 °C, 30 秒)。Super optimal broth with catabolite repression

medium を 500  $\mu$ l 加え、攪拌することにより菌を回復させた(37 °C, 1 時間)。形質転換された TOP10 *E. coli* は、コロニー選択のため ampicillin 添加 Luria-Bertani (LB) agarose 培地中で培養した(37 °C, オーバーナイト)。Ampicillin により選別されたコロニーから菌を採取し、LB 液体培地中で培養した(37 °C, 12-16 時間)。その後、plasmid を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Venlo, Netherland) を用いて抽出し、タンパク質発現用の BL21 *E. coli* competent cell (BioDynamics Laboratory, 東京)に形質転換した。Ampicillin 添加 LB agarose 培地中で培養後、コロニー選択した菌を LB 液体培地に入れ、OD<sub>600</sub> が 0.6 になるまで 37 °C で攪拌した後、isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (ナカライテスク)を加えてさらに 2 時間攪拌することにより、His-tagged POSTN タンパク質の発現を誘導した。菌液を遠心分離し(2,580 g, 20 分, 4 °C)、得られた沈殿に Tris-HCl buffer (20 mM Tris, pH7.9 に調整)を加え超音波ホモジナイザー(UD-100, TOMY, 東京)で破碎した。遠心分離(21,100 g, 20 分, 4 °C)によりペレットを回収し、equilibration buffer (5 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 8 M urea, pH7.9 に調整)を加え、氷上でピペッティングすることで溶解した。溶解した菌液を遠心分離し(21,100 g, 20 分, 4 °C)、上清を 0.45  $\mu$ m 径のフィルターに通してタンパク質サンプルを回収した。His60 Ni Superflow Resin and Gravity Column (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)を用いて、以下の手順により回収したタンパク質サンプルから POSTN 組換えタンパク質を精製した。カラムにサンプル全量を入れ、攪拌することで His60 Ni resin に His-tagged POSTN を吸着させた(4 °C, 1 時間)。カラムを wash buffer (60 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 8 M urea, pH7.9 に調整)で洗浄した後、equilibration buffer で洗浄し

た。His60 Ni resin に吸着した His-tagged POSTN を elution buffer (1 M imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 8 M urea, pH7.9 に調整)により抽出し、PlusOne Mini Dialysis Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)を用いて L-arginine (500 mM)添加 phosphate buffered saline (PBS)中で透析した。精製した POSTN 組換えタンパク質は、抗 POSTN 抗体及び 6xHistidine 抗体を用いた Western blotting により 85-90 kDa の分子量であることを確認した(図 26B, C)。

#### 2-2-2. MCT 誘導性 PAH モデル

第一章 2-2-1. MCT 誘導性 PAH モデルの項に準じて、MCT 誘導性 PAH モデルラットを作製し、MCT 投与から 2 週及び 3 週後に実験に用いた。

#### 2-2-3. RVFb の単離

第三章 2-2-1. RVFb の単離培養の項に準じて、MCT (3 週)投与ラットと Cont 群より RVFb を単離した。また同様の方法を用いて、無処置の雄性 Wistar ラット(4-6 週齢)から RVFb を単離した。

#### 2-2-4.細胞培養

RVFb (passage 1-5)と H9c2 心筋芽細胞(passage 16-28) は、第三章 2-2-1. RVFb の単離・培養及び第一章 2-1-5.使用細胞の項に準じて培養した。細胞は 6-well または 12-well シャーレに播種し実験に用いた。無処置のラットより単離した RVFb は、BAY11-7082, PD98059 または SP600125 の 30 分間の前処置または無処置下で、POSTN 組換えタンパク質(100-1000 ng/ml)または PBS (溶媒)で刺激した。

#### 2-2-5. タンパク質抽出と Western blotting

タンパク質抽出と Western blotting は、第三章 2-2-3. タンパク質抽出と Western blotting の項に準じて行った。MCT (2 週及び 3 週) 投与ラットの摘出心臓から分離した右心室を 0.1% protease inhibitor mixture 添加 lysis buffer により可溶化しタンパク質を抽出した。10  $\mu$ g のタンパク質を用いて Western blotting を行った。

#### 2-2-6. 免疫組織化学染色

右心室の免疫組織化学染色は、抗 POSTN 抗体と抗 iNOS 抗体を用いて第一章 2-2-8. 組織学的検索の項に準じて行った。

#### 2-2-7. NO 産生測定

RVFb による NO 産生は NO プローブ 4,5-diamino-fluorescein (DAF-2, 積水メディカル, 東京) を用いて測定した。6-well シャーレに播種した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした後、POSTN 組換えタンパク質または溶媒で 24 時間刺激した。培地を physiological salt solution (PSS, 1.2 ml) に交換した後、L-NAME (600  $\mu$ M) の処置または無処置下で DAF-2 (100 nM) を処置した (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 10 分)。陰性対照として PSS 200  $\mu$ l を回収し、NOS の基質である L-arginine (1 mM) を処置した (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 120 分) 後、再度 PSS 200  $\mu$ l を回収した。マイクロプレートリーダー (Tristar, LB941) を用いて、回収した PSS に波長 485 nm の励起光を当てた時の波長 535 nm の蛍光強度を測定した。120 分後の測定値 (F<sub>120</sub>) と陰性対照 (F<sub>0</sub>) の差分 ( $\Delta$  Fluorescence) を NO 産生量として計測した。

### 2-2-8. LTCC を介した $\text{Ca}^{2+}$ 流入の測定

LTCC を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、第三章 2-2-8.細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 測定の項に準じて、Fura-2 AM を用いた  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定法により測定した。カバーガラス上に播種しコンフルエントになった H9c2 心筋芽細胞に Fura-2 AM (5  $\mu\text{M}$ ) を取り込ませた後、HEPES-Tyrode 溶液中で KCl (30 mM) を処置することにより脱分極を誘導し、LTCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を測定した。

### 2-3. 統計解析

実験データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の比較には *Student-t* 検定を用いた。また多群比較には ANOVA で分散分析した後 *Bonferroni* の post-hoc test により全ての 2 群間の比較を行い評価した。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. MCT 投与ラットの右心室における POSTN タンパク質発現

MCT (3 週) 投与ラットの右心室では、Cont 群と比較して POSTN タンパク質発現が有意に増加した。一方、MCT (2 週) 投与ラットの右心室では POSTN 発現に差は見られなかった (図 27A, B, Cont:  $n=4$ ; MCT:  $n=6$ ,  $p < 0.05$ )。免疫組織化学染色により右心室組織における POSTN の局在を検討した結果、Cont 群の右心室では POSTN は主に間質細胞に発現していた。一方、MCT (3 週) 投与ラットの右心室では心筋細胞における POSTN 発現が有意に増加した (図 27C,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ )。



### 3-2. MCT 投与ラットの右心室における iNOS 発現

MCT (3 週)投与ラットの右心室において、Western blotting により iNOS タンパク質発現は検出できなかった(図 28A, Cont: n=4; MCT: n=6)。一方、免疫組織化学染色により右心室組織における iNOS タンパク質の発現と局在を検討した結果、Cont 群の右心室では iNOS はほとんど発現していなかったが、MCT 投与ラットの右心室では間質細胞において iNOS 発現の増加が認められた(図 28B, Cont: n=4; MCT: n=6)。

### 3-3. MCT-RVFb における iNOS 発現、VASP, ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化

MCT (3 週)投与ラットより単離した MCT-RVFb では、CONT-RVFb と比較して iNOS 発現及び NO/cyclic GMP (cGMP)依存性シグナル経路により活性化される VASP のリン酸化が有意に亢進した(図 29A, B, n=6,  $p<0.01$ ; 図 29C, D, n=6,  $p<0.05$ )。また、MCT-RVFb では CONT-RVFb と比較して ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化が有意に亢進した(図 29E-H, n=6,  $p<0.01$ ; 図 29I, J, n=6,  $p<0.05$ )。

### 3-4. POSTN 組換えタンパク質が RVFb の ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化に及ぼす影響

次に、MCT-RVFb における iNOS 発現と ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化の亢進に及ぼす POSTN の影響を検討した。無処置のラットより単離した RVFb を POSTN 組換えタンパク質(100-1000 ng/ml, 1 時間)で刺激したところ、最大濃度(1000 ng/ml)をピークとして、濃度依存的に ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化が亢進し

た(図 30A-F,  $n=3$ ,  $p<0.05$ )。このことから、以降の実験では POSTN を 1000 ng/ml の濃度で使用した。また、RVFb における POSTN 誘導性の NF- $\kappa$ B 活性化に、ERK1/2 及び JNK の活性が関与するかを検討した。MEK/ERK シグナル経路阻害薬(PD98059, 50  $\mu$ M)または JNK 阻害薬(SP600125, 10  $\mu$ M)の前処置(30 分間)は、RVFb における POSTN 誘導性 NF- $\kappa$ B のリン酸化亢進に影響を及ぼさなかった(図 30G, H,  $n=4$ )。

### 3-5. POSTN 組換えタンパク質が RVFb の iNOS 発現と NO 産生に及ぼす影響

POSTN 組換えタンパク質(1000 ng/ml, 24 時間)は、RVFb の iNOS タンパク質発現と NO 産生を有意に亢進した(図 31A, B,  $n=4$ ,  $p<0.01$ ; 図 31C,  $n=5$ ,  $p<0.01$ )。また、NOS 阻害薬(L-NAME, 600  $\mu$ M)の前処置(10 分間)により、POSTN 誘導性 NO 産生は有意に抑制された(図 31C,  $n=5$ ,  $p<0.01$ )。

### 3-6. POSTN 組換えタンパク質が RVFb の IL-1 $\beta$ 発現に及ぼす影響

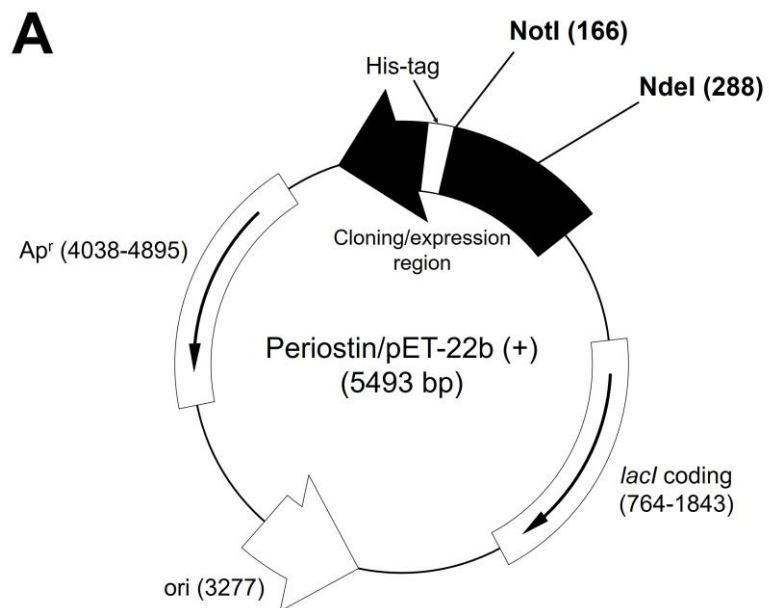
POSTN 組換えタンパク質(1000 ng/ml, 24 時間)は、RVFb の IL-1 $\beta$  発現を有意に亢進した(図 32,  $n=3$ ,  $p<0.01$ )。

### 3-7. RVFb における POSTN 誘導性 iNOS 発現と NO 産生に及ぼす NF- $\kappa$ B、ERK1/2 及び JNK 阻害薬の影響

NF- $\kappa$ B シグナル経路阻害薬(BAY11-7082, 10  $\mu$ M)、PD98059 (50  $\mu$ M)及び SP600125 (10  $\mu$ M)は POSTN 誘導性 iNOS 発現及び NO 産生の亢進を有意に抑制した(図 33A, B,  $n=3$ ,  $p<0.01$ ; 図 33C, Cont, POSTN:  $n=5$ ; +BAY, +PD, +SP:  $n=3$ ,  $p<0.05$ )。

### 3-8. POSTN で刺激した RVFb の培養上清が H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性に及ぼす影響

NO は心筋細胞の LTCC 活性を抑制する。KCl による脱分極で誘導される LTCC を介した細胞内への  $Ca^{2+}$  流入に、NO ドナー SNP が及ぼす影響を検討したところ、SNP (100  $\mu$ M) はこれを有意に抑制した (図 34A, B, Cont, SNP: n=6,  $p<0.01$ )。また、POSTN で刺激した RVFb の培養上清 (POSTN-CM) も KCl 誘導性  $Ca^{2+}$  流入を有意に抑制したが、溶媒で刺激した RVFb の培養上清 (CONT-CM) はこれに影響を及ぼさなかった (図 34A, B, Cont: n=6; CONT-CM, POSTN-CM: n=4,  $p<0.05$ )。POSTN-CM による LTCC の抑制は RVFb への L-NAME 前処置 (600  $\mu$ M, 10 分) により有意に阻害された (図 34C, D, CONT-CM, +L-NAME: n=4; POSTN-CM: n=6,  $p<0.01$ )。



Forward primer: 5'-gcgccatatgaacagttactatgacaaggt-3'  
Reverse primer: 5'-gcgcgcgccgctcactgagaacggccttctc-3'

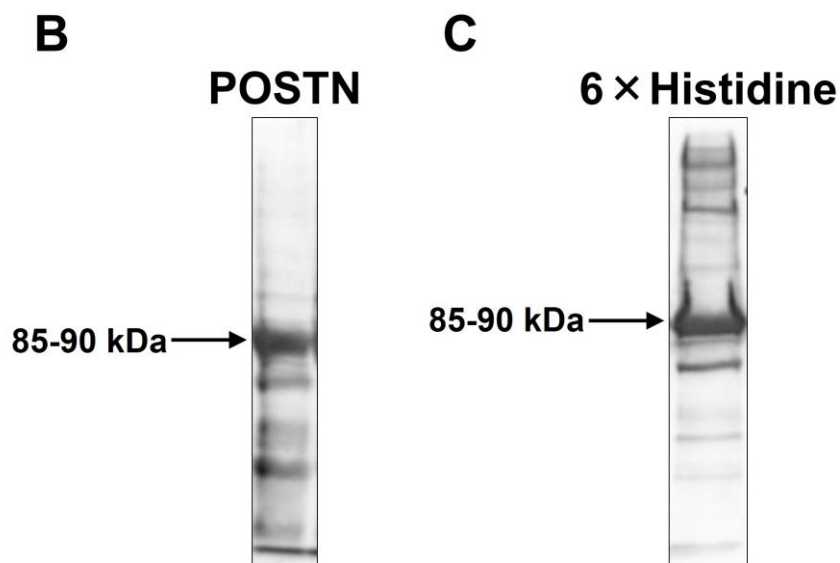


図 26 POSTN 組換えタンパク質の作製

(A)ラット POSTN 遺伝子全長を、図に示す配列のプライマー

[Forward primer (5'末端に NdeI 認識配列を持つ)、Reverse primer (5'末端に NotI 認識配列を持つ)]を用いて、PCR により増幅した。

増幅した PCR 産物を、図に示す pET-22b (+) plasmid vector 上の 6×Histidine (His-tag) 配列上流に制限酵素 NdeI 及び NotI を用いてライゲーションした。Apr: antimicrobial resistance, ori: replication origin, lacI: lac repressor. POSTN を挿入した plasmid を BL21 *E. coli* competent cell に形質転換し、His-tag が付いた POSTN 組換えタンパク質を産生させた。(B, C) BL21 *E. coli* competent cell により産生された POSTN 組換えタンパク質を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis で分離し、Western blotting によりニトロセルロース膜に転写した後、抗 POSTN 抗体及び抗 6×Histidine 抗体を用いて、予測される POSTN 分子量(85-90 kDa)付近にバンドが検出されることを確認した。POSTN (B)及び 6×Histidine (C)の典型的なブロット像。

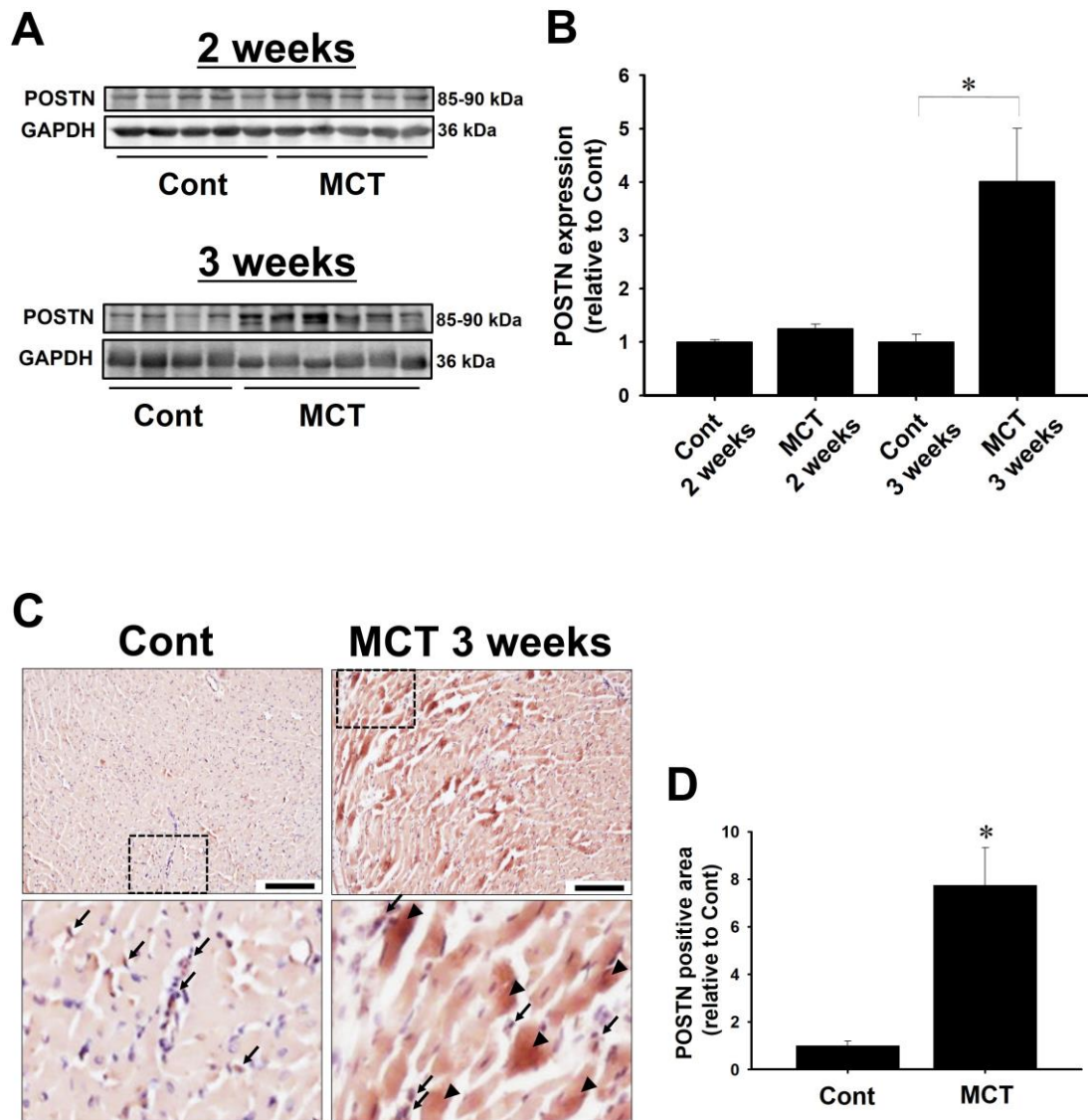


図 27 MCT (2 週及び 3 週)投与ラットの右心室における POSTN タンパク質発現

MCT (2 週及び 3 週)投与ラットと Cont 群の右心室より可溶化タンパク質を抽出し、Western blotting により POSTN タンパク質発現を検討した。(A) MCT (2 週、上図)及び(3 週、下図)投与ラットの POSTN 及び GAPDH の典型的なブロット像。(B) GAPDH に対する POSTN 発現量を Cont で標準化した。結果は平均値±標準誤差で示した(Cont:

n=4; MCT: n=6)。\* $p < 0.05$  vs. Cont. (C) MCT (3週)投与ラット及び Cont 群の右心室における POSTN の発現と分布を免疫組織化学染色により評価し、Cont (左図)と MCT (右図)の典型像を示した。(下図)それぞれ点線で囲った領域の拡大図を示した(3.8倍に拡大)。(矢印) POSTN 陽性間質細胞。(矢頭) POSTN 陽性心筋細胞。(D)右心室組織全領域に占める POSTN 陽性領域の比率を Cont で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した(n=3)。Scale, 100  $\mu\text{m}$ . \* $p < 0.05$  vs. Cont.

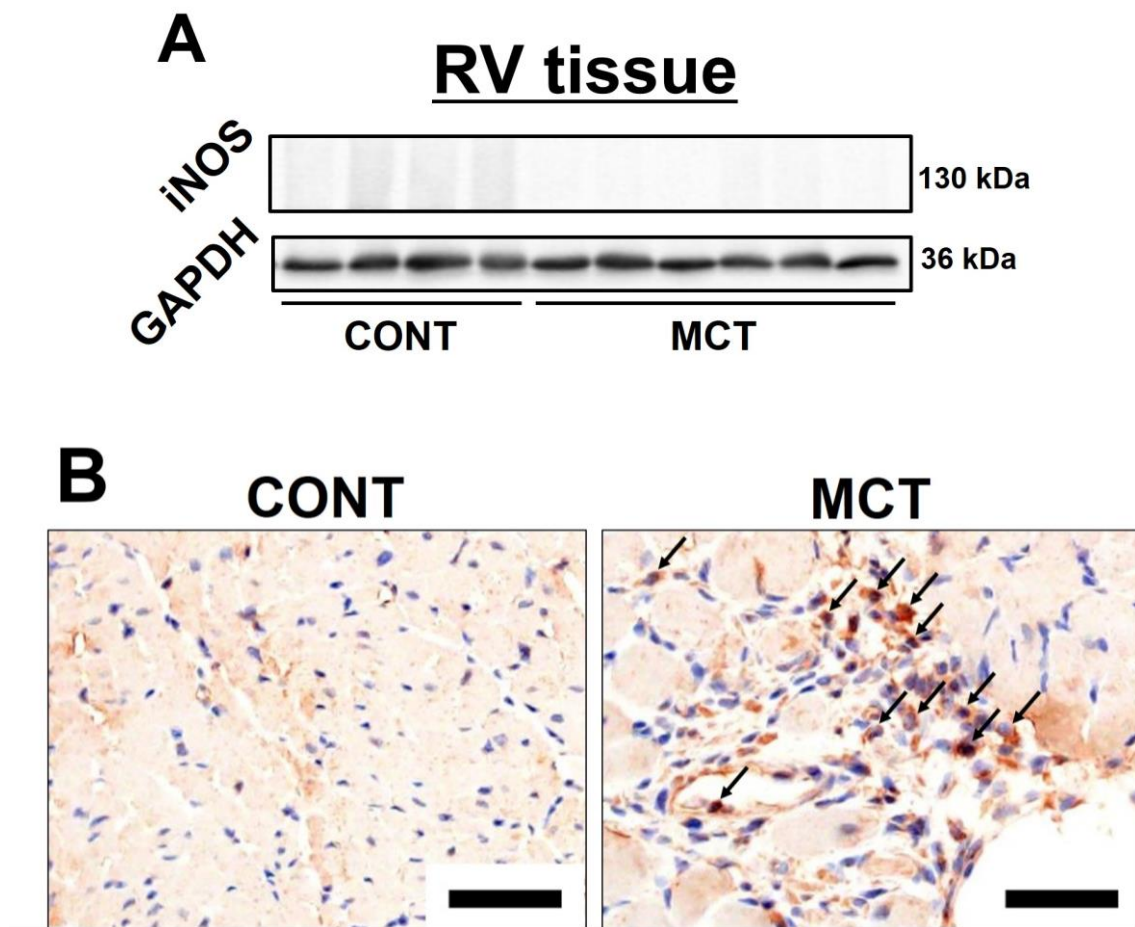


図 28 MCT (3 週)投与ラットの右心室における inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS)タンパク質発現

MCT (3 週)投与ラットと Cont 群の右心室より可溶化タンパク質を抽出し、Western blotting により iNOS タンパク質発現を検討した。(A) iNOS 及び GAPDH の典型的なプロット像 (Cont: n=4; MCT: n=6)。(B) MCT (3 週)投与ラット及び Cont 群の右心室における iNOS 発現と分布を免疫組織化学染色により評価し、Cont (左図)と MCT (右図)の典型像を示した (Cont: n=4; MCT: n=6)。(矢印) iNOS 強陽性間質細胞。Scale, 50  $\mu$ m.



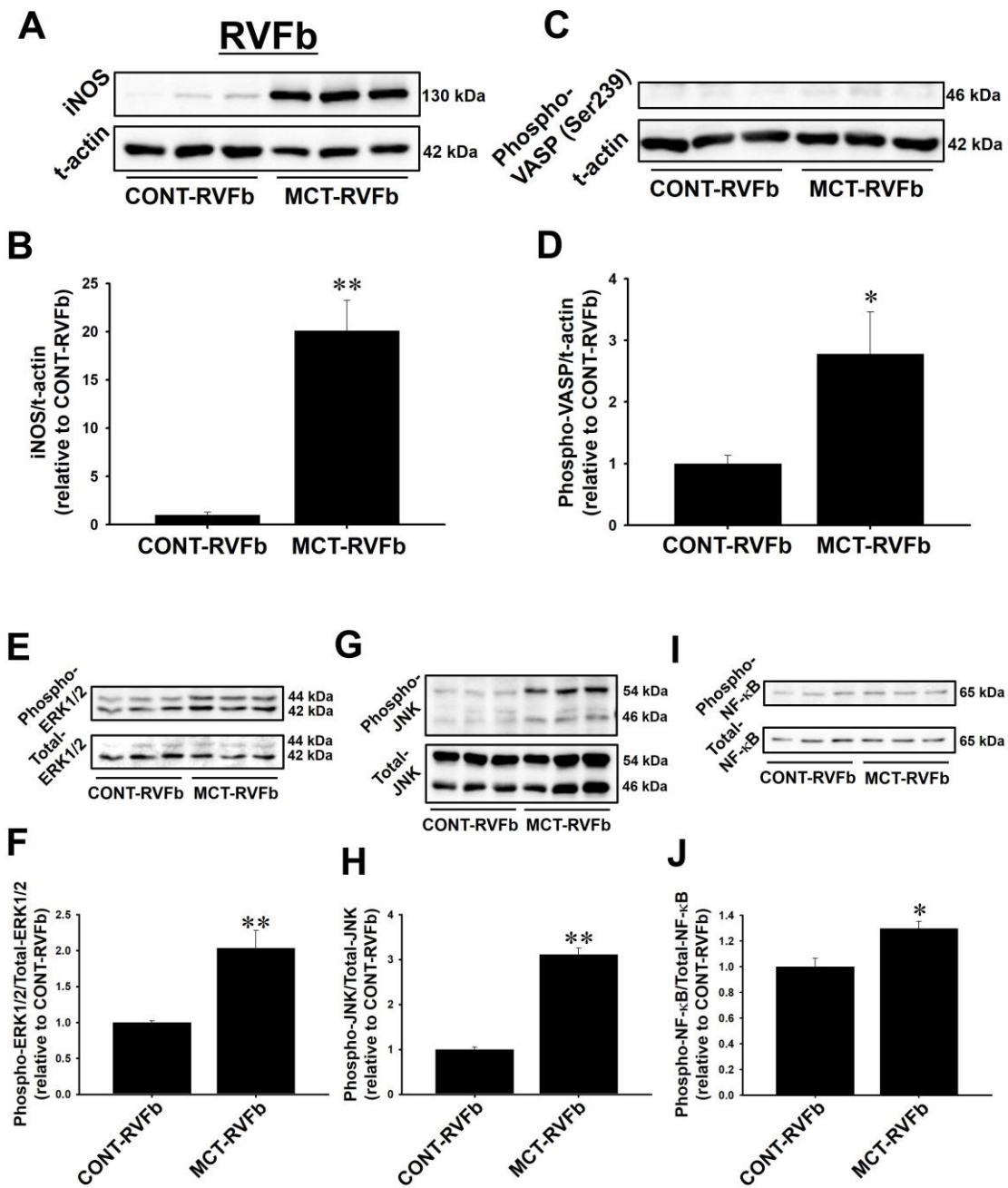


図 29 MCT (3 週)投与ラットの右心室由来線維芽細胞 (MCT-RVFb) における iNOS タンパク質発現と vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), ERK1/2, JNK 及び NF-κB の活性  
無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした MCT-RVFb と Cont

群由来右心室線維芽細胞(CONT-RVFb)を可溶化しタンパク質を抽出した後、Western blottingにより iNOS 発現と VASP, ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化を検討した。(A, C, E, G, I) iNOS (A), phospho-VASP (C), phospho-ERK1/2, total-ERK1/2 (E), phospho-JNK, total-JNK (G), phospho-NF- $\kappa$ B, total-NF- $\kappa$ B (I)及び t-actin の典型的なブロット像。(B, D, F, H, J) t-actin に対する総タンパク質発現量(B, D)または総タンパク質に対するリン酸化タンパク質発現量(F, H, J)を CONT-RVFb で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。\* $\cdot$  \*\* $p$ <0.05, 0.01 vs. CONT-RVFb.

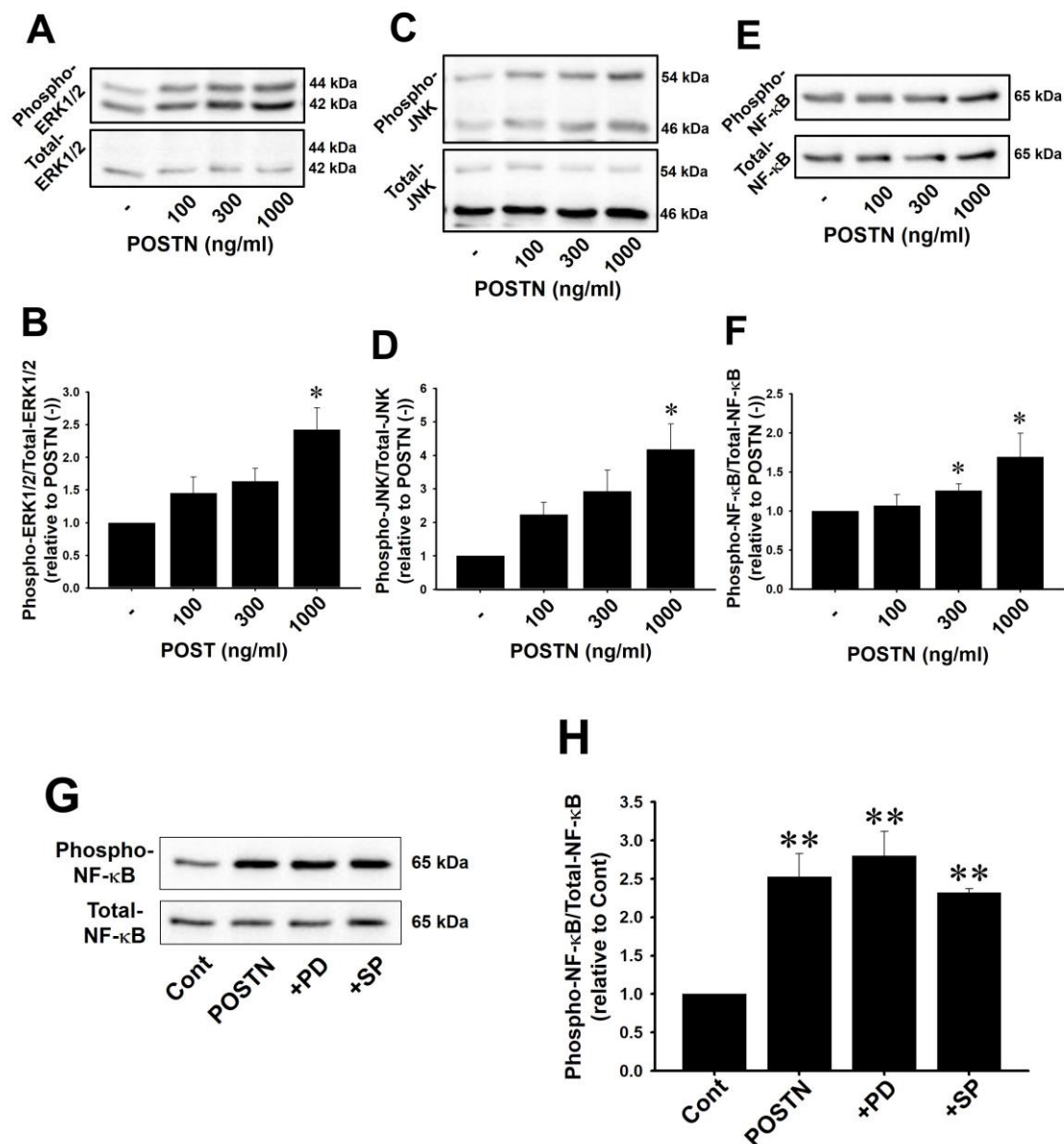


図 30 RVFb の ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B 活性に及ぼす POSTN の影響  
 無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタ  
 ベーションした後、POSTN (100-1000 ng/ml) 組換えタンパク質また  
 は溶媒 [POSTN (-)] で 1 時間刺激しタンパク質を抽出した。Western  
 blotting により ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B のリン酸化を検討した。  
 (A, C, E) Phospho-ERK1/2 及び total-ERK1/2 (A), phospho-JNK 及び

total-JNK (C), phospho-NF- $\kappa$ B 及び total-NF- $\kappa$ B (E)の典型的なプロット像。(B, D, F)総タンパク質に対するリン酸化タンパク質発現量を POSTN (-)で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n=3)。\* $p$ <0.05 vs. POSTN (-). (G, H) RVFb における POSTN 誘導性の NF- $\kappa$ B 活性化に、ERK1/2 及び JNK の活性が関与するか検討した。DMSO (Cont), PD (50  $\mu$ M)または SP (10  $\mu$ M)を 30 分間前処置した後に POSTN 組換えタンパク質で RVFb を 1 時間刺激した。(G)典型的なプロット像。(H)総タンパク質に対するリン酸化タンパク質発現量を Cont で標準化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n=4)。\*\* $p$ <0.01 vs. Cont.

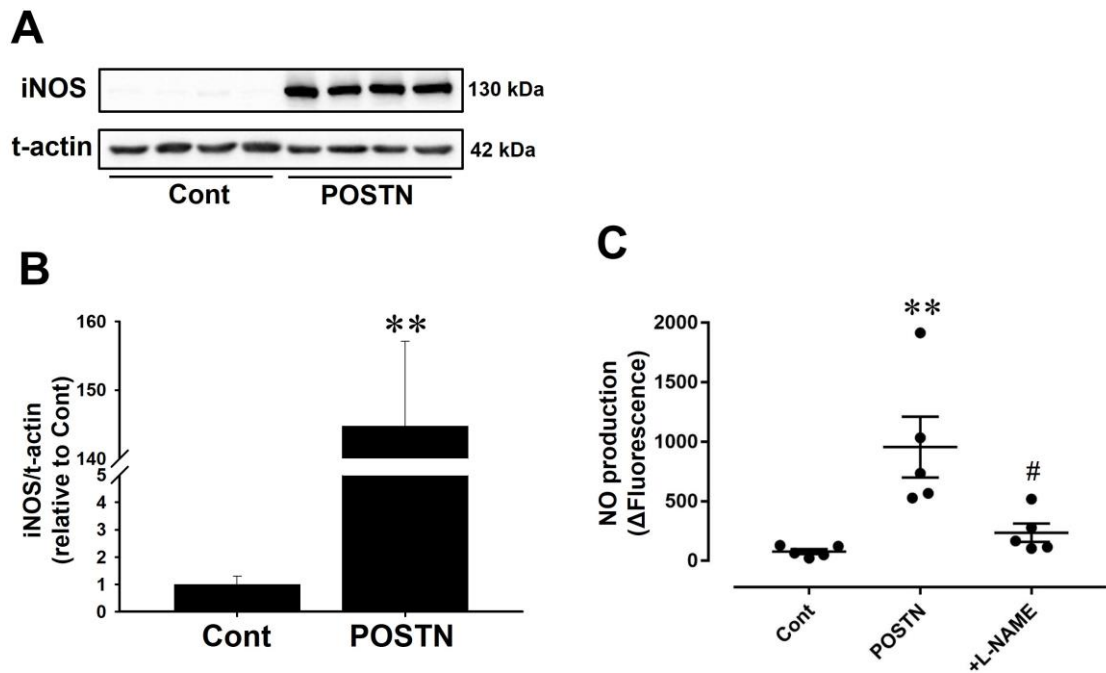


図 31 RVFb の iNOS 発現に及ぼす POSTN の影響

(A, B)無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした後、POSTN (1000 ng/ml)組換えタンパク質または溶媒(Cont)で 24 時間刺激しタンパク質を抽出した。Western blotting により iNOS タンパク質発現を検討した。(A) iNOS 及び t-actin の典型的なプロット像。(B) t-actin に対する iNOS 発現量を、Cont で標準化してグラフに示した。結果は平均値±標準誤差で示した(n=4)。(C) NO 産生を NO プローブ 4,5-diamino-fluorescein (DAF-2)を用いて測定した。無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした後、POSTN (1000 ng/ml)または溶媒(Cont)で 24 時間刺激し培地を PSS に交換した。N ( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)処置または無処置下で DAF-2 (100 nM)を 10 分間処置し、PSS の蛍光強度を測定した( $F_0$ )。その後基質の L-arginine を処置し、120 分後に PSS の蛍光強度を再度測定

した( $F_{120}$ )後、 $F_{120}$ と $F_0$ の差分( $\Delta$  Fluorescence)を計測しグラフ化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した( $n=4$ )。\*\* $p<0.01$  vs. Cont, # $p<0.05$  vs. POSTN.

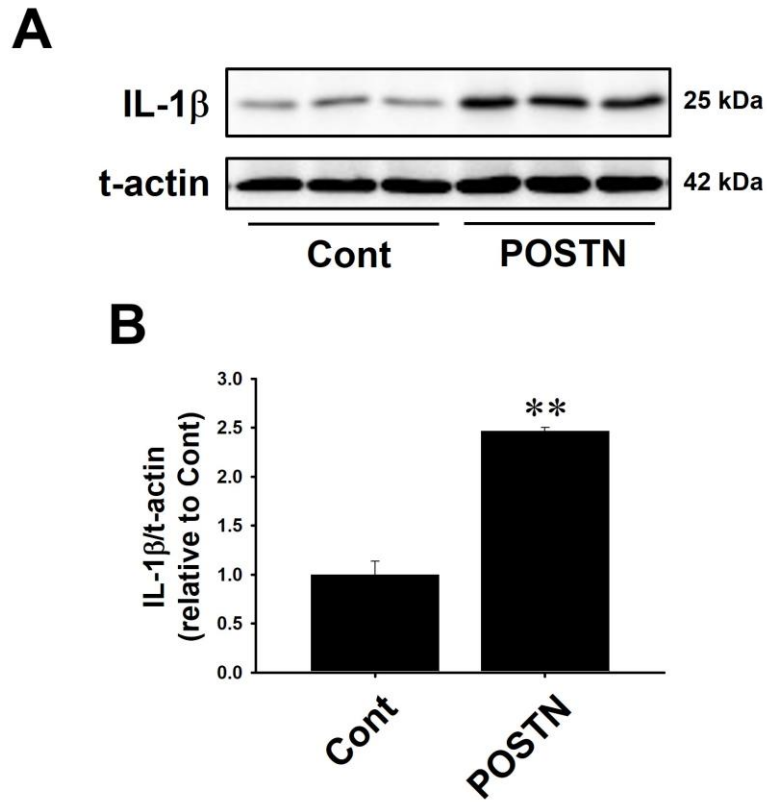


図 32 RVFb の interleukin (IL)-1 $\beta$  発現に及ぼす POSTN の影響  
 無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタ  
 ベーションした後、POSTN (1000 ng/ml) 組換えタンパク質または溶  
 媒 (Cont) で 24 時間刺激しタンパク質を抽出した。Western blotting  
 により IL-1 $\beta$  発現を検討した。(A) IL-1 $\beta$  及び t-actin の典型的なブ  
 ロット像。(B) t-actin に対する IL-1 $\beta$  発現量を Cont で標準化した。  
 結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n=3)。\*\* $p$ <0.01 vs. Cont.

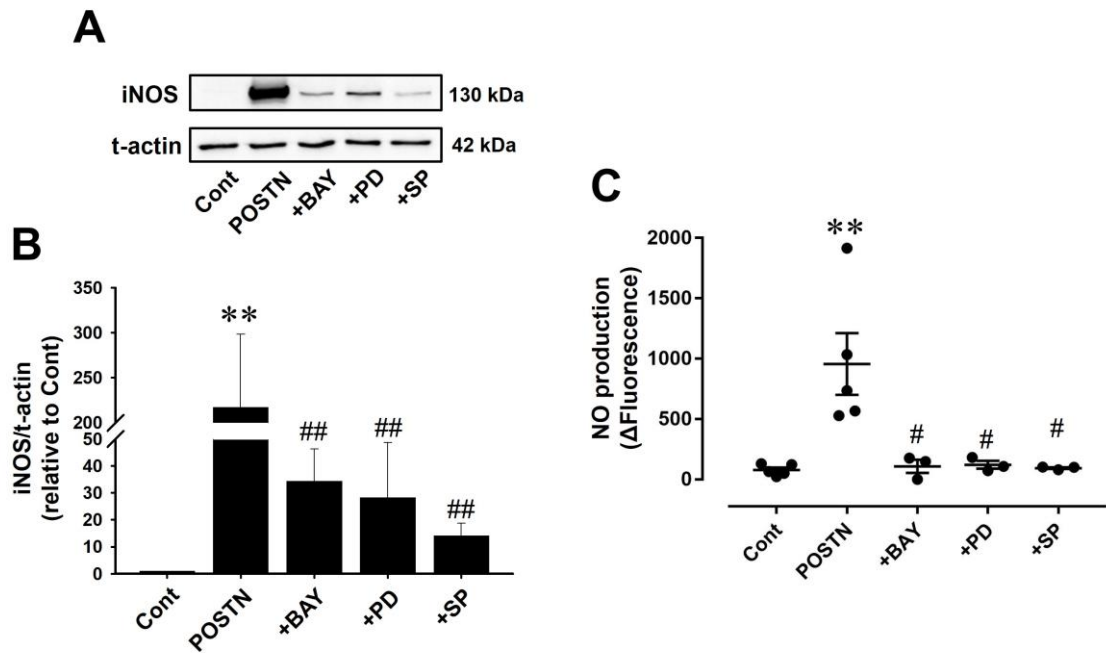


図 33 RVFb における POSTN 誘導性 iNOS 発現及び NO 産生に NF- $\kappa$ B、ERK1/2 及び JNK 阻害薬が及ぼす影響

無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした後、NF- $\kappa$ B シグナル経路阻害薬 BAY11-7082 (BAY, 10  $\mu$ M), PD (50  $\mu$ M) または SP (10  $\mu$ M) の処置または無処置下で POSTN (1000 ng/ml) 組換えタンパク質または溶媒 (Cont) で 24 時間刺激しタンパク質を抽出した。(A, B) Western blotting により iNOS 発現を検討した。(A) iNOS 及び t-actin の典型的なプロット像。(B) t-actin に対する iNOS 発現量を、Cont で標準化してグラフに示した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n=4)。(C) NO 産生を DAF-2 を用いて測定した。無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スタベーションした後、BAY (10  $\mu$ M), PD (50  $\mu$ M) または SP (10  $\mu$ M) の処置または無処置下で POSTN (1000 ng/ml) 組換えタンパク質または溶媒 (Cont) で 24 時間刺激し培地を PSS に



交換した。DAF-2 (100 nM)を 10 分間処置し、PSS の蛍光強度を測定した( $F_0$ )。L-arginine を処置し、120 分後に PSS の蛍光強度を測定した( $F_{120}$ )後、 $F_{120}$  と  $F_0$  の差分 ( $\Delta$  Fluorescence)を計測しグラフ化した。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (Cont, POSTN: n=5; +BAY, +PD, +SP: n=3)。\*\* $p < 0.01$  vs. Cont, # $p < 0.05$  vs. POSTN.

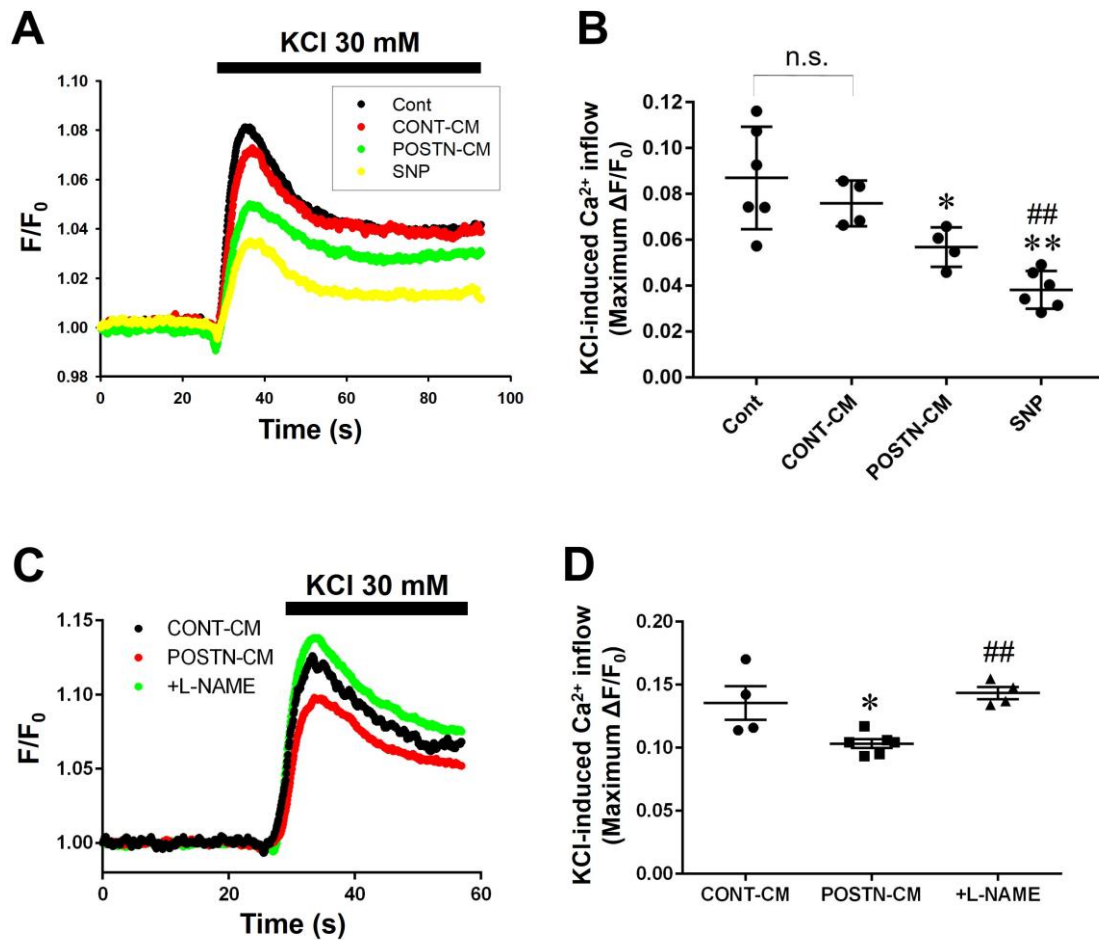


図 34 POSTN で刺激した RVFb の培養上清が H9c2 心筋芽細胞の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel: LTCC) 活性に及ぼす影響

無処置ラットから単離した RVFb を無血清 DMEM 中で 24 時間スターベーションした後、POSTN (1000 ng/ml) 組換えタンパク質または溶媒 (Cont) で 24 時間刺激した。培地を無血清 DMEM に交換し、L-NAME 処置 (+L-NAME, 10 分前処置) または無処置下で L-arginine を 24 時間処置した後、培地を回収した (CONT-CM 及び POSTN-CM)。カバーガラス上に播種しコンフルエントになった H9c2 心筋芽細胞に回収した培地、milliQ (Cont) または sodium nitroprusside (SNP, 100  $\mu\text{M}$ ) を 1 時間処置した。Fura-2 AM を取り込ませた後、2 波長

蛍光測定器を用いて波長 340 nm と 380 nm の励起光を交互に当て、波長 500 nm の蛍光を観測することで $[Ca^{2+}]_i$ の指標となるそれぞれの蛍光強度(F340ならびにF380)の比率(F340/F380: F)を測定した。Fは基底状態の値( $F_0$ )により標準化した( $F/F_0$ )。(A) KCl (30 mM)処置により脱分極を誘導し、活性化したLTCCを介した $Ca^{2+}$ 流入を測定した。黒: Cont, 赤: CONT-CM, 緑: POSTN-CM, 黄: SNP。(B) KCl処置による $F/F_0$ の最大変化( $\Delta F/F_0$ )をグラフに示した(Cont: n=6, CONT-CM: n=4, POSTN-CM: n=4, SNP: n=6)。n.s.: not significant, \* $p < 0.05$ , 0.01 vs. Cont, ## $p < 0.01$  vs. CONT-CM。(C) POSTN-CMによるKCl誘導性 $Ca^{2+}$ 流入に及ぼすL-NAMEの影響。黒: Cont, 赤: POSTN-CM, 緑: +L-NAME。(D) KCl処置による $F/F_0$ の最大変化( $\Delta F/F_0$ )を測定した(CONT-CM: n=4, POSTN-CM: n=6, +L-NAME: n=4)。結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。  
\* $p < 0.05$  vs. CONT-CM, ## $p < 0.01$  vs. POSTN-CM.

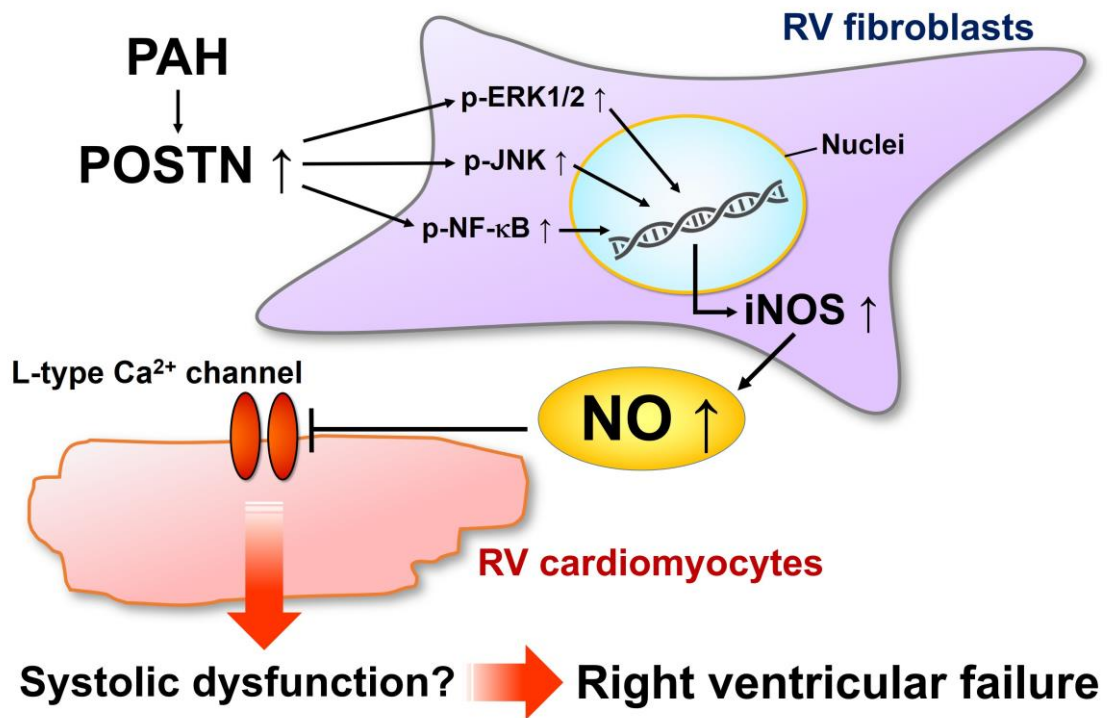


図 35 第四章のまとめ

POSTN は ERK1/2, JNK 及び NF-κB シグナル経路を介して RVFb において iNOS 発現と NO 産生を亢進した。POSTN 誘導性の RVFb 由来 NO は、H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性を抑制した。このことから、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室において発現亢進した POSTN は、RVFb の iNOS 発現と NO 産生の亢進を介して心筋細胞の LTCC 活性を抑制することで心収縮機能を障害する可能性が考えられた [45]。

#### 4. 考察

本章では、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室において発現が増加した POSTN が RVFb の ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B の活性化を介して iNOS 発現と NO 産生を亢進することを初めて明らかにした。さらに、POSTN で刺激した RVFb 由来 NO により、H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性が抑制されることを明らかにした。

第二章において、MCT (2 週及び 3 週)投与両方のラットの右心室において、POSTN mRNA 発現が顕著に増加することを明らかにした。本章では、MCT (3 週)投与ラットの右心室において、タンパク質レベルで POSTN 発現が増加することを確認した(図 27)。一方、MCT (2 週)投与ラットの右心室において POSTN タンパク質発現に変化は見られなかった(図 27)。ヒトとマウスにおいて、POSTN は cathepsin K により 7, 35 kDa の断片に分解されることが報告されている[7,8,27]。Cathepsin K は、圧負荷誘発左心肥大において心臓での発現が増加する[39]。このことから、MCT (2 週)投与ラットの右心室において発現が増加した POSTN は、cathepsin K 依存性の分解を受けたために、タンパク質レベルでの発現増加が確認できなかった可能性が考えられる。一方 MCT (3 週)投与ラットにおいては MCT (2 週)投与ラットの右心室と比較してより mRNA 発現が顕著に亢進したために POSTN タンパク質発現の増加が確認できたと推察される。POSTN は線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 及び I 型コラーゲン発現の亢進を介して筋線維芽細胞への分化を誘導することで線維化形成を促進する[18,48,87]。第三章において、MCT-RVFb では細胞増殖、遊走及び MMP-9 産生能が亢進する一方で、 $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現は減少したことから、MCT-RVFb は筋線維芽細

胞とは異なる形質であることが明らかになった。このことから、POSTNはRVFbの筋線維芽細胞への分化誘導とは異なる作用によりPAH誘発右心不全の発症・進展に関与する可能性が考えられる。本研究では、Western blottingによりMCT(3週)投与ラットの右心室組織においてiNOSのタンパク質を検出できなかった。しかしながら免疫組織化学染色により右心室におけるiNOSの発現と局在を検討した結果、MCT(3週)投与ラットの右心室では間質細胞におけるiNOSタンパク質発現が増加することを確認した(図28)。また、MCT-RVFbではCONT-RVFbと比較してiNOS発現が有意に増加しており(図29A, B)、NO/cGMP依存性シグナル経路により調節されるVASPのリン酸化が有意に亢進した。このことから、MCT(3週)投与ラットの右心室組織の間質に存在する線維芽細胞ではiNOSの発現誘導に伴い、NO産生が亢進していることが示唆された(図29C, D)。

iNOS遺伝子は、NF- $\kappa$ B及びMAPKシグナル経路の下流にあるactivator protein (AP)-1などの転写因子の活性化により発現が誘導される[56,76,79]。POSTNはヒト軟骨細胞においてNF- $\kappa$ Bを介してiNOS遺伝子の発現を誘導することが報告されている[15]。MCT-RVFbでは、CONT-RVFbと比較してERK1/2, JNK及びNF- $\kappa$ Bの活性が有意に亢進した(図29E-I)。また、POSTN組換えタンパク質による刺激は、RVFbにおいてERK1/2, JNK及びNF- $\kappa$ Bのリン酸化を濃度依存的に亢進し(図30A-F)、iNOS発現とNO産生を亢進した(図31)。さらに、POSTNによるiNOS発現とNO産生の亢進は、NF- $\kappa$ B, ERK1/2及びJNK阻害薬により有意に抑制された(図33)。このことから、MCT-RVFbにおけるPOSTNによるiNOS発現とNO産生の亢進は、NF- $\kappa$ B, ERK1/2及びJNKの活性化を介して誘導さ

れることが明らかとなった。一方で ERK1/2 及び JNK の活性阻害は、RVFb における POSTN 誘導性の NF- $\kappa$ B リン酸化亢進に影響を及ぼさなかった(図 30G, H)。このことから、POSTN は NF- $\kappa$ B シグナル経路と ERK1/2 及び JNK シグナル経路が関連するそれぞれ独立したシグナル経路を介して iNOS 発現を誘導することが示唆された。さらに、本章では POSTN が RVFb において IL-1 $\beta$  タンパク質発現を誘導することを明らかにした(図 32)。IL-1 $\beta$  や tumor necrosis factor- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは、iNOS 発現と NO 産生を亢進する[70,84]。このことから、POSTN は RVFb において IL-1 $\beta$  の産生誘導を介して iNOS 発現を亢進する可能性が考えられる。POSTN は細胞膜表面の  $\alpha_v\beta_3$  や  $\alpha_v\beta_5$  インテグリンに結合する[52]。角化細胞において、POSTN は  $\alpha_v\beta_3$  インテグリン/NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して、胸腺間質性リンパ球新生因子の産生を誘導する[62]。真皮線維芽細胞において、POSTN はインテグリン/ERK1/2 シグナル経路を介して細胞増殖を促進する[75]。また、腎癌細胞において、POSTN はインテグリン/focal adhesion kinase/JNK シグナル経路を介して細胞遊走、浸潤を促進する[16]。これらのことから、RVFb において POSTN は細胞膜表面のインテグリンへの結合を介して NF- $\kappa$ B, ERK1/2 及び JNK シグナル経路を活性化する可能性が考えられる。RVFb における POSTN の受容体を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

PAH 誘発右心不全の発症・進展には右心収縮機能障害が関与する[77,97]。 $\beta$  アドレナリン受容体脱感作による LTCC の不活性化は右心収縮機能障害の発症要因の 1 つと考えられている[77]。一方、LTCC の活性調節には NO が密接に関わる[12,37,95]。フェレットの右心室心筋細胞において、NO は cGMP 依存性シグナル経路を介し

て LTCC 活性を抑制することが報告されている [12]。また本章において、NO ドナー SNP の処置が H9c2 心筋芽細胞において LTCC を介した KCl 誘導性  $Ca^{2+}$  流入を抑制することを確認した (図 34A, B)。このことから、NO はラット右心室心筋細胞の LTCC 活性を抑制することが示唆される。さらに、POSTN で刺激した RVFb の培養上清 (POSTN-CM) の処置もまた、H9c2 心筋芽細胞における KCl 誘導性  $Ca^{2+}$  流入を抑制した。また、H9c2 心筋芽細胞における POSTN-CM による KCl 誘導性  $Ca^{2+}$  流入の抑制は、NOS 阻害薬 L-NAME の前処置により解除された (図 34C, D)。これらの結果から、POSTN 誘導性の RVFb 由来 NO が H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性の抑制することが示唆される。

NO は cGMP 依存性シグナル経路を介した機構以外に、S-ニトロシル化による翻訳後修飾によっても LTCC 活性を抑制することが報告されている [12,37]。このことから、RVFb 由来 NO は、NO/cGMP 依存性シグナル経路または S-ニトロシル化あるいはこの両方の機構を介して LTCC 活性を抑制する可能性が考えられる。NO による LTCC 活性抑制機構の解明にはさらなる検討が必要である。

結論として本章では、POSTN が ERK1/2, JNK 及び NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して RVFb における iNOS 発現と NO 産生を亢進することを初めて明らかにした (図 35)。また、POSTN 誘導性の RVFb 由来 NO は、H9c2 心筋芽細胞の LTCC 活性を抑制することを明らかにした (図 35)。このことから、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室において発現亢進する POSTN は、RVFb における iNOS 発現と NO 産生の亢進を介して心筋細胞の LTCC 活性を抑制することで心収縮機能の障害に関わる可能性が考えられた (図 35)。本章の知見は、PAH 誘発右心不全発症・進展の新たな機序を提示するもので



あり、POSTNがPAH誘発右心不全における新規治療標的となることが期待される。

## VI.総括

### [背景]

PAHは、肺動脈圧の亢進を臨床所見とする難治性呼吸器疾患である[35]。PAH患者の多くは肺動脈圧亢進による右心後負荷の増大から右心肥大を併発し、右心不全の発症により死に至る[98]。右心不全の制御がPAH患者の予後改善に繋がると予想されるが、PAH誘発右心不全の発症・進展機構には未だ不明な点が多く残されている。

細胞外組織構造の保持を担うECMは、細胞-細胞間あるいは細胞-ECM間の情報伝達を媒介することで細胞増殖、遊走や分化など様々な細胞機能を調節する[2,93,96]。近年、心不全患者や心疾患モデル動物において、ECM分解断片群 *matricryptins* や分泌型ECM成分 *matricellular proteins* などのECM関連タンパク質の血中濃度や心臓組織中の発現が変化することが報告されている[23,73]。また、様々な *matricellular proteins* が心肥大や心線維化の病態に関与することが明らかになっている[23]。しかしながら、PAH誘発右心不全におけるこれらECM関連タンパク質の役割は現在ほとんど明らかにされていない。本研究は、ECM関連タンパク質を介した右心不全の発症・進展機構を解明し、新規PAH誘発右心不全治療薬の標的因子を探索することを目的とした。

### [方法及び結果]

#### (第一章)

胎児型遺伝子であるTTCCは、PAHや全身性高血圧症による圧負荷誘発心肥大や拡張型心筋症時の心筋細胞に再発現し、細胞内への持続するCa<sup>2+</sup>流入を起こすことでCa<sup>2+</sup>依存性シグナル経路の活性

化や電氣的リモデリングを誘導し心肥大や不整脈の発症要因の1つとなる[14,50,91]。このことから、PAH誘発右心不全発症・進展との関連が示唆される。

PAH患者においてXVIII型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖のC末端分解断片 *endostatin* の血中濃度が増加することが報告されている[19]。*Endostatin* は強力な抗血管新生作用を有する内因性生理活性物質である[88]。一方、*endostatin* は腫瘍細胞に発現するTTCC活性を抑制することが知られており、当研究室でもこれまでに、*endostatin* がモルモット心室筋細胞に発現するTTCCの活性を抑制することを明らかにした[103,108,109]。そこで第一章では、MCT誘導性PAHモデルラットの右心室心筋細胞に再発現したTTCCの活性に及ぼす*endostatin*の影響とsiRNAによる*endostatin*発現抑制がMCT誘導性PAHモデルラットの右心不全発症・進展に及ぼす影響を検討した。その結果、*endostatin* は右心室心筋細胞の $I_{CaT}$ を有意に抑制することを明らかにした。さらに*endostatin*発現を抑制したMCT投与ラットでは、生存率が低下し、右心室重量増加や右心機能低下の亢進、右心室組織構造の顕著なリモデリングが認められた。本章で初めて明らかにしたこれらの知見は、*endostatin* が右心室心筋細胞のTTCC活性抑制を介して心保護的に働く可能性を提示するものである。

## (第二章)

第一章では、ECM分解断片 *endostatin* がPAH誘発右心不全において心保護的に働くことを明らかにした。一方、*endostatin* などの *matricryptins* の他に、非構造的の分泌型ECM成分 *matricellular proteins* が様々な内因性生理活性作用を示すことが発見されており

近年、着目されている[93]。圧負荷誘発心肥大や心筋梗塞モデル動物において、様々な *matricellular proteins* の発現レベルが変化する[23]。一部の *matricellular proteins* は心肥大や心線維化に関与することが明らかになっている[23]。近年、PAHモデル動物の心臓組織において TnC や OPN などの *matricellular proteins* の発現が増加することが明らかになった[34,65]。しかしながら、PAH誘発右心不全における発現動態が不明な *matricellular proteins* は数多く残されている。そこで第二章では、PAH誘発右心不全発症・進展に関わる *matricellular proteins* を探索するため、右心肥大期の MCT (2週)投与ラット及び右心不全発症期の MCT (3週)投与ラットの右心室における各種 *matricellular proteins* mRNA 発現変化を Real-time PCRにより解析した。最初に心エコー検査により MCT (3週)投与ラットにおいて右心不全の発症を確認した。MCT (2週)投与ラットの右心室では、SPARCファミリー、TSPファミリー、CCNファミリー、TnC、POSTN及びOPNのmRNA発現が有意に亢進した。このことから、PAH誘発右心肥大から右心不全への移行に数多くの *matricellular proteins* が関与することが示唆された。一方、MCT (3週)投与ラットの右心室では、SPARCファミリー、TSP-1及び-2のmRNA発現は大きく変化しなかったが、TSP-4、CCN5及びPOSTNのmRNAは持続して発現が有意に亢進した。TSP-4、CCN5とPOSTNは右心不全発症期(MCT-3 weeks)にmRNA発現がより顕著に亢進することから、PAH誘発右心不全の進展に関与する可能性が考えられた。これらの *matricellular proteins* 発現変化に関する新たな知見は、今後PAH誘発右心不全の発症・進展機構の解明に役立つことが期待される。

### (第三章)

第二章において、PAH誘発右心不全の発症・進展に伴い、様々な *matricellular proteins* mRNA 発現が変化することを明らかにした。このことから、*matricellular proteins* による右心室構成細胞の機能調節が、PAH誘発右心不全の発症・進展に関与することが示唆された。圧負荷誘発心肥大の末期像として見られる心臓間質の線維化には心線維芽細胞の形質転換が密接に関連する[5,51]。また、心線維芽細胞の機能調節には  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性シグナルが関与することが示唆されている[31,33,82]。しかしながら、PAH誘発右心不全発症・進展におけるRVFbの形質変化や、その調節機構は全く明らかにされていない。そこで第三章では、MCT-RVFbの形質と、その調節に関連する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入機構ならびに  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性シグナル経路の解明を試みた。その結果、MCT-RVFbでは筋線維芽細胞マーカーである  $\alpha$ -SMA 及び collagen type I 発現が減少することを明らかにした。その一方で、MCT-RVFbにおける細胞増殖、遊走及び MMP-9 産生能が亢進した。また、MCT-RVFbにおいて Orai1 及び STIM1 mRNA 発現の亢進と SOCE の増加が認められ、これにより CaMKII 活性が亢進した。各種阻害薬を用いた検討により、MCT-RVFb の細胞増殖能亢進は  $\text{Ca}^{2+}$ 非依性の ERK1/2 の活性化が関わること、細胞遊走能亢進には SOCE/CaMKII シグナル経路と ERK1/2 の活性化を介して産生誘導される MMP-9 と、SOCE/CaMKII/JNK シグナル経路の活性化が関わるということが明らかになった。本章では、MCT-RVFb が筋線維芽細胞とは異なった形質であり、細胞増殖、遊走能が亢進した炎症性形質であることを初めて明らかにした。これらの知見は、RVFb が炎症反応の促進を介して PAH 誘発右心不全の発症・進展に関与することを示唆するものであり、RVFb を標的とした新規 PAH

誘発右心不全の治療法開発に貢献する可能性がある。

#### (第四章)

本研究の第二章において MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室では POSTN mRNA 発現が顕著に増加することを明らかにした。また、第三章において MCT-RVFB は増殖、遊走能が亢進した炎症性形質に転換することを明らかにした。IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインは心線維芽細胞において iNOS 発現を誘導する[72]。心臓における iNOS 発現と NO 産生の亢進は、心収縮機能障害の要因となることが示唆されている[84]。ヒト軟骨細胞において、POSTN は NF- $\kappa$ B を介して iNOS 遺伝子発現を誘導することが報告されている[15]。そこで第四章では、MCT 誘導性 PAH モデルラットにおいて、POSTN は RVFB の iNOS 発現と NO 産生を亢進するという仮説を検証した。さらに、RVFB において POSTN 誘導性の RVFB 由来 NO が心筋細胞の LTCC 活性を抑制することで心収縮機能の障害に関わるとの仮説も併せて検証した。MCT (3 週)投与ラットの右心室では心筋細胞における POSTN タンパク質発現と間質の線維芽細胞における iNOS タンパク質発現が亢進した。また MCT-RVFB では iNOS 発現が亢進した。POSTN 組換えタンパク質による刺激は、無処置ラット由来 RVFB の iNOS 発現と NO 産生を亢進した。また、POSTN で刺激した RVFB の培養上清は、H9c2 心筋芽細胞において LTCC を介した Ca<sup>2+</sup>流入を抑制した。本章の結果から、MCT 誘導性 PAH モデルラットの右心室において発現が亢進した POSTN は、RVFB の iNOS 発現と NO 産生の亢進を介して心筋細胞の LTCC 活性を抑制することで心収縮機能の障害に関わることが考えられた。これは、POSTN が右心収縮機能を障害することで、PAH 誘発右心不全の発症・進展に關与する可能

性を示唆する知見である。したがって POSTN が PAH 誘発右心不全の新規治療標的となる可能性が期待される。

#### [結論]

PAH 誘発右心不全において、endostatin は心筋細胞に再発現した TTCC の活性抑制を介して心保護的に働くことが示唆された[42]。また、PAH モデルラットの右心室では様々な **matricellular proteins** の発現変化や RVFb の炎症性形質への転換が認められることが明らかになった[43,44]。とりわけ TSP-4、CCN5 と POSTN は右心不全発症期に mRNA 発現がより顕著に亢進することから、右心不全の病態に関与することが考えられた。POSTN は、RVFb の iNOS 発現と NO 産生の亢進を介して右心室心筋細胞の LTCC 活性を抑制することが示唆された[45]。これによる右心収縮機能の障害は、右心不全の発症・進展の新たな要因となる可能性が考えられた。本研究で明らかにした新たな知見は、ECM 関連タンパク質と心線維芽細胞を標的とした PAH 誘発右心不全の新規治療法の開発に大いに貢献することが期待される(図 36)。

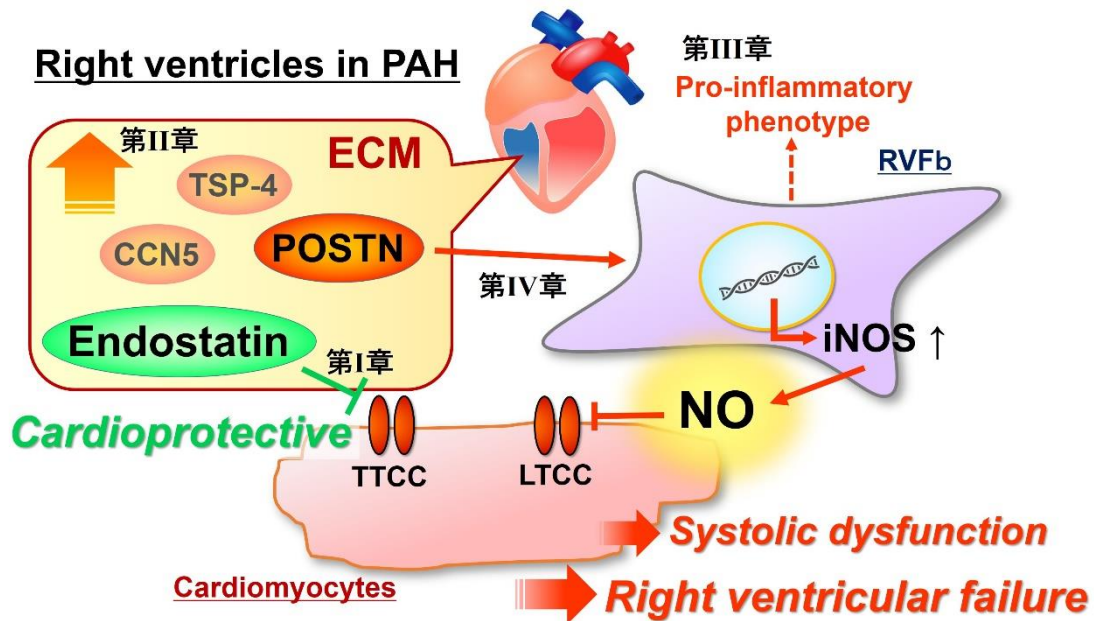


図 36 本研究の総括

PAH 誘発右心不全において、endostatin は心筋細胞に再発現した TTCC の活性抑制を介して心保護的に働くことが示唆された[42]。また、PAH モデルラットの右心室では様々な matricellular proteins の発現変化や RVFb の炎症性形質への転換が認められることが明らかになった[43,44]。とりわけ TSP-4、CCN5 と POSTN は右心不全発症期に mRNA 発現がより顕著に亢進することから、病態に関与することが考えられた。POSTN は、RVFb の iNOS 発現と NO 産生の亢進を介して右心室心筋細胞の LTCC 活性を抑制することが示唆された[45]。これによる右心収縮機能の障害は、右心不全の発症・進展の新たな要因となる可能性が考えられた。



## 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王禅寺ペットクリニック・熊谷さやか氏および獣医薬理学研究室内の皆様に心から感謝を申し上げます。

## VIII. 引用文献

1. Akagi, S., Matsubara, H., Nakamura, K., and Ito, H. 2018. Modern treatment to reduce pulmonary arterial pressure in pulmonary arterial hypertension. *J. Cardiol.* **72**: 466-472.
2. Banerjee, I., Yekkala, K., Borg, T. K., and Baudino, T. A. 2006. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1080**: 76-84.
3. Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., Shao, R., Anderson, R. M., Rich, J. N., and Wang, X. F. 2004. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* **5**: 329-339.
4. Barroso, M. C., Boehme, P., Kramer, F., Mondritzki, T., Koehler, T., Gulker, J. E., Karoff, M., and Dinh, W. 2017. Endostatin a Potential Biomarker for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Arq. Bras. Cardiol.* **109**: 448-456.
5. Berk, B. C., Fujiwara, K., and Lehoux, S. 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J. Clin. Invest.* **117**: 568-575.
6. Berridge, M. J. 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**: 933-940.
7. Bonnet, N., Brun, J., Rousseau, J. C., Duong, L. T., and Ferrari, S. L. 2017. Cathepsin K Controls Cortical Bone Formation by Degrading Periostin. *J. Bone Miner. Res.* **32**: 1432-1441.
8. Bonnet, N., Biver, E., Chevalley, T., Rizzoli, R., Garnero, P., and

- Ferrari, S. L. 2017. Serum Levels of a Cathepsin-K Generated Periostin Fragment Predict Incident Low-Trauma Fractures in Postmenopausal Women Independently of BMD and FRAX. *J. Bone Miner. Res.* **32**: 2232-2238.
9. Bootman, M. D., Lipp, P., and Berridge, M. J. 2001. The organisation and functions of local Ca<sup>2+</sup> signals. *J. Cell. Sci.* **114**: 2213-2222.
10. Cai, J., Du, S., Wang, H., Xin, B., Wang, J., Shen, W., Wei, W., Guo, Z., and Shen, X. 2017. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer. *Oncotarget.* **8**: 74406-74422.
11. Camelliti, P., Borg, T. K., and Kohl, P. 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **65**: 40-51.
12. Campbell, D. L., Stamler, J. S., and Strauss, H. C. 1996. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J. Gen. Physiol.* **108**: 277-293.
13. Chen, J. C., Lin, B. B., Hu, H. W., Lin, C., Jin, W. Y., Zhang, F. B., Zhu, Y. A., Lu, C. J., Wei, X. J., and Chen, R. J. 2014. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. *Biomed. Res. Int.* **2014**: 547187.
14. 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 Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res.* **104**: 522-530.
15. Chijimatsu, R., Kunugiza, Y., Taniyama, Y., Nakamura, N., Tomita, T., and Yoshikawa, H. 2015. Expression and pathological effects of periostin in human osteoarthritis cartilage. *BMC Musculoskelet. Disord.* **16**: 215.
16. Chuanyu, S., Yuqing, Z., Chong, X., Guowei, X., and Xiaojun, Z. 2017. Periostin promotes migration and invasion of renal cell carcinoma through the integrin/focal adhesion kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway. *Tumor Biol.* **39**: 1010428317694549.
17. Cingolani, O. H., Kirk, J. A., Seo, K., Koitabashi, N., Lee, D. I., Ramirez-Correa, G., Bedja, D., Barth, A. S., Moens, A. L., and Kass, D. A. 2011. Thrombospondin-4 is required for stretch-mediated contractility augmentation in cardiac muscle. *Circ. Res.* **109**: 1410-1414.
18. Crawford, J., Nygard, K., Gan, B. S., and O'Gorman, D. B. 2015. Periostin induces fibroblast proliferation and myofibroblast persistence in hypertrophic scarring. *Exp. Dermatol.* **24**: 120-126.
19. 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.
20. Deleon-Pennell, K. Y., Altara, R., Yabluchanskiy, A., Modesti, A., and Lindsey, M. L. 2015. The circular relationship between matrix metalloproteinase-9 and inflammation following myocardial infarction. *IUBMB Life.* **67**: 611-618.
21. Dias, F. A., Urboniene, D., Yuzhakova, M. A., Biesiadecki, B. J., Pena, J. R., Goldspink, P. H., Geenen, D. L., and Wolska, B. M. 2010. Ablation of iNOS delays cardiac contractile dysfunction in chronic hypertension. *Front. Biosci (Elite Ed).* **2**: 312-324.
22. Ferreiro, C. R., Chagas, A. C., Carvalho, M. H., Dantas, A. P., Scavone, C., Souza, L. C., Buffolo, E., and da Luz, P. L. 2004. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 1313-1320.
23. Frangogiannis, N. G. 2012. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol. Rev.* **92**: 635-688.
24. Frangogiannis, N. G. 2015. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discoveries (Craiova).* **3**.
25. Friedberg, M. K., Cho, M. Y., Li, J., Assad, R. S., Sun, M., Rohailla, S., Honjo, O., Apitz, C., and Redington, A. N. 2013. Adverse biventricular remodeling in isolated right ventricular hypertension is mediated by increased transforming growth factor-beta1 signaling and is abrogated by angiotensin receptor blockade. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **49**: 1019-1028.

26. Frolova, E. G., Sopko, N., Blech, L., Popovic, Z. B., Li, J., Vasanji, A., Drumm, C., Krukovets, I., Jain, M. K., Penn, M. S., Plow, E. F., and Stenina, O. I. 2012. Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J.* **26**: 2363-2373.
27. Garnero, P., Bonnet, N., and Ferrari, S. L. 2017. Development of a New Immunoassay for Human Cathepsin K-Generated Periostin Fragments as a Serum Biomarker for Cortical Bone. *Calcif. Tissue Int.* **101**: 501-509.
28. Gomez-Arroyo, J., Sakagami, M., Syed, A. A., Farkas, L., Van Tassell, B., Kraskauskas, D., Mizuno, S., Abbate, A., Bogaard, H. J., Byron, P. R., and Voelkel, N. F. 2015. Iloprost reverses established fibrosis in experimental right ventricular failure. *Eur. Respir. J.* **45**: 449-462.
29. Gorlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., and Krizanova, O. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* **6**: 260-271.
30. 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.
31. Guo, J. L., Yu, Y., Jia, Y. Y., Ma, Y. Z., Zhang, B. Y., Liu, P. Q., Chen, S. R., and Jiang, J. M. 2014. Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) contributes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cardiac fibrosis via mediating Ca<sup>2+</sup> influx and extracellular signal-

- regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activation in cardiac fibroblasts. *J. Pharmacol. Sci.* **125**: 184-192.
32. Hagiwara, N., Irisawa, H., and Kameyama, M. 1988. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* **395**: 233-253.
33. Harada, M., Luo, X., Qi, X. Y., Tadevosyan, A., Maguy, A., Ordog, B., Ledoux, J., Kato, T., Naud, P., Voigt, N., Shi, Y., Kamiya, K., Murohara, T., Kodama, I., Tardif, J. C., Schotten, U., Van Wagoner, D. R., Dobrev, D., and Nattel, S. 2012. Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation. *Circulation.* **126**: 2051-2064.
34. Hessel, M., Steendijk, P., den Adel, B., Schutte, C., and van der Laarse, A. 2009. Pressure overload-induced right ventricular failure is associated with re-expression of myocardial tenascin-C and elevated plasma tenascin-C levels. *Cell. Physiol. Biochem.* **24**: 201-210.
35. Hoepfer, M. M., Bogaard, H. J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., Langleben, D., Manes, A., Satoh, T., Torres, F., Wilkins, M. R., and Badesch, D. B. 2013. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**: D42-50.
36. Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L. F., and Kudo, A. 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament

- and increased expression by transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1239-1249.
37. Hu, H., Chiamvimonvat, N., Yamagishi, T., and Marban, E. 1997. Direct inhibition of expressed cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ. Res.* **81**: 742-752.
38. Hu, J., Wang, X., Wei, S. M., Tang, Y. H., Zhou, Q., and Huang, C. X. 2016. Activin A stimulates the proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts via the ERK1/2 and p38-MAPK pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **789**: 319-327.
39. Hua, Y., Xu, X., Shi, G. P., Chicco, A. J., Ren, J., and Nair, S. 2013. Cathepsin K knockout alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension.* **61**: 1184-1192.
40. Hwang, Y. P., Kim, H. G., Choi, J. H., Park, B. H., Jeong, M. H., Jeong, T. C., and Jeong, H. G. 2011. Acteoside inhibits PMA-induced matrix metalloproteinase-9 expression via CaMK/ERK- and JNK/NF-kappaB-dependent signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* **55 Suppl 1**: S103-116.
41. Ikeda, S., Satoh, K., Kikuchi, N., Miyata, S., Suzuki, K., Omura, J., Shimizu, T., Kobayashi, K., Fukumoto, Y., Sakata, Y., and Shimokawa, H. 2014. Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**: 1260-1271.
42. 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  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Pflugers*



- Arch.* **468**: 1259-1270.
43. Imoto, K., Okada, M., and Yamawaki, H. 2017. Expression profile of matricellular proteins in hypertrophied right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1096-1102.
  44. Imoto, K., Okada, M., and Yamawaki, H. 2018. Characterization of fibroblasts from hypertrophied right ventricle of pulmonary hypertensive rats. *Pflugers Arch.* **470**: 1405-1417.
  45. Imoto, K., Okada, M., and Yamawaki, H. 2019. Periostin Mediates Right Ventricular Failure through Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Right Ventricular Fibroblasts from Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertensive Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 62.
  46. Izuhara, K., Nunomura, S., Nanri, Y., Ogawa, M., Ono, J., Mitamura, Y., and Yoshihara, T. 2017. Periostin in inflammation and allergy. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**: 4293-4303.
  47. Jeong, D., Lee, M. A., Li, Y., Yang, D. K., Kho, C., Oh, J. G., Hong, G., Lee, A., Song, M. H., LaRocca, T. J., Chen, J., Liang, L., Mitsuyama, S., D'Escamard, V., Kovacic, J. C., Kwak, T. H., Hajjar, R. J., and Park, W. J. 2016. Matricellular Protein CCN5 Reverses Established Cardiac Fibrosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**: 1556-1568.
  48. Kanaoka, M., Yamaguchi, Y., Komitsu, N., Feghali-Bostwick, C. A., Ogawa, M., Arima, K., Izuhara, K., and Aihara, M. 2018. Pro-fibrotic phenotype of human skin fibroblasts induced by periostin

- via modulating TGF-beta signaling. *J. Dermatol. Sci.* **90**: 199-208.
49. Kimura, H., Okubo, N., Chosa, N., Kyakumoto, S., Kamo, M., Miura, H., and Ishisaki, A. 2013. EGF positively regulates the proliferation and migration, and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**: 899-914.
50. 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 Ca<sup>2+</sup> channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation.* **120**: 743-752.
51. Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N. G. 2014. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 549-574.
52. Kudo, A. 2017. Introductory review: periostin-gene and protein structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**: 4259-4268.
53. Kumari, N., Gaur, H., and Bhargava, A. 2018. Cardiac voltage gated calcium channels and their regulation by beta-adrenergic signaling. *Life Sci.* **194**: 139-149.
54. Ladage, D., Yaniz-Galende, E., Rapti, K., Ishikawa, K., Tilemann, L., Shapiro, S., Takewa, Y., Muller-Ehmsen, J., Schwarz, M., Garcia, M. J., Sanz, J., Hajjar, R. J., and Kawase, Y. 2013. Stimulating myocardial regeneration with periostin Peptide in large mammals improves function post-myocardial infarction but increases myocardial fibrosis. *PLoS One.* **8**: e59656.

55. Lahm, T., McCaslin, C. A., Wozniak, T. C., Ghumman, W., Fadl, Y. Y., Obeidat, O. S., Schwab, K., and Meldrum, D. R. 2010. Medical and surgical treatment of acute right ventricular failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**: 1435-1446.
56. Lee, S. B., Lee, W. S., Shin, J. S., Jang, D. S., and Lee, K. T. 2017. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 via AP-1, NF-kappaB, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **49**: 21-29.
57. Lee, W. T., Lee, T. H., Cheng, C. H., Chen, K. C., Chen, Y. C., and Lin, C. W. 2015. Antroquinonol from *Antrodia Camphorata* suppresses breast tumor migration/invasion through inhibiting ERK-AP-1- and AKT-NF-kappaB-dependent MMP-9 and epithelial-mesenchymal transition expressions. *Food Chem. Toxicol.* **78**: 33-41.
58. Lee, Y. C., Chang, A. Y., Lin-Feng, M. H., Tsou, W. I., Chiang, I. H., and Lai, M. Z. 2012. Paxillin phosphorylation by JNK and p38 is required for NFAT activation. *Eur. J. Immunol.* **42**: 2165-2175.
59. 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.
60. Lindsley, A., Snider, P., Zhou, H., Rogers, R., Wang, J., Olaopa, M., Kruzynska-Frejtag, A., Koushik, S. V., Lilly, B., Burch, J. B.,

- Firulli, A. B., and Conway, S. J. 2007. Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. *Dev. Biol.* **307**: 340-355.
61. Martin, T. P., Lawan, A., Robinson, E., Grieve, D. J., Plevin, R., Paul, A., and Currie, S. 2014. Adult cardiac fibroblast proliferation is modulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in normal and hypertrophied hearts. *Pflugers Arch.* **466**: 319-330.
62. Masuoka, M., Shiraishi, H., Ohta, S., Suzuki, S., Arima, K., Aoki, S., Toda, S., Inagaki, N., Kurihara, Y., Hayashida, S., Takeuchi, S., Koike, K., Ono, J., Noshiro, H., Furue, M., Conway, S. J., Narisawa, Y., and Izuhara, K. 2012. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J. Clin. Invest.* **122**: 2590-2600.
63. Moore-Morris, T., Guimaraes-Camboa, N., Yutzey, K. E., Puceat, M., and Evans, S. M. 2015. Cardiac fibroblasts: from development to heart failure. *J. Mol. Med (Berl)*. **93**: 823-830.
64. Mukhopadhyay, S., Munshi, H. G., Kambhampati, S., Sassano, A., Plataniias, L. C., and Stack, M. S. 2004. Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* **279**: 33139-33146.
65. Nadadur, R. D., Umar, S., Wong, G., Eghbali, M., Iorga, A., Matori, H., and Partow-Navid, R. 2012. Reverse right ventricular

- structural and extracellular matrix remodeling by estrogen in severe pulmonary hypertension. *J. Appl. Physiol.* (1985). **113**: 149-158.
66. Neidhardt, J., Fehr, S., Kutsche, M., Lohler, J., and Schachner, M. 2003. Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol. Cell. Neurosci.* **23**: 193-209.
67. Ogawa, A., Ejiri, K., and Matsubara, H. 2014. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. *Life Sci.* **118**: 414-419.
68. Ohkubo, T., and Yamazaki, J. 2012. T-type voltage-activated calcium channel  $Ca_v3.1$ , but not  $Ca_v3.2$ , is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **41**: 267-275.
69. Oka, T., Xu, J., Kaiser, R. A., Melendez, J., Hambleton, M., Sargent, M. A., Lorts, A., Brunskill, E. W., Dorn, G. W., 2nd, Conway, S. J., Aronow, B. J., Robbins, J., and Molkenin, J. D. 2007. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling. *Circ. Res.* **101**: 313-321.
70. 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.
71. 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.
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., Imoto, K., Sugiyama, A., Yasuda, J., and Yamawaki, H. 2017. New Insights into the Role of Basement Membrane-Derived Matricryptins in the Heart. *Biol. Pharm. Bull.* **40**: 2050-2060.
74. Okamoto, H., and Imanaka-Yoshida, K. 2012. Matricellular proteins: new molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc. Ther.* **30**: e198-209.
75. Ontsuka, K., Kotobuki, Y., Shiraishi, H., Serada, S., Ohta, S., Tanemura, A., Yang, L., Fujimoto, M., Arima, K., Suzuki, S., Murota, H., Toda, S., Kudo, A., Conway, S. J., Narisawa, Y., Katayama, I., Izuhara, K., and Naka, T. 2012. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* **21**: 331-336.
76. Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* **23**: 75-93.
77. Rain, S., Handoko, M. L., Vonk Noordegraaf, A., Bogaard, H. J., van der Velden, J., and de Man, F. S. 2014. Pressure-overload-induced right heart failure. *Pflugers Arch.* **466**: 1055-1063.

78. Ranzato, E., Martinotti, S., Magnelli, V., Murer, B., Biffo, S., Mutti, L., and Burlando, B. 2012. Epigallocatechin-3-gallate induces mesothelioma cell death via H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> -dependent T-type Ca<sup>2+</sup> channel opening. *J. Cell. Mol. Med.* **16**: 2667-2678.
79. Ratajczak-Wrona, W., Jablonska, E., Garley, M., Jablonski, J., Radziwon, P., and Iwaniuk, A. 2013. Role of AP-1 family proteins in regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human neutrophils. *J. Immunotoxicol.* **10**: 32-39.
80. Riaz, S., Zeidan, A., and Mraiche, F. 2017. Myocardial proteases and cardiac remodeling. *J. Cell. Physiol.* **232**: 3244-3250.
81. Ricard-Blum, S., and Vallet, S. D. 2016. Matricryptins Network with Matricellular Receptors at the Surface of Endothelial and Tumor Cells. *Front. Pharmacol.* **7**: 11.
82. Ross, G. R., Bajwa, T., Jr., Edwards, S., Emelyanova, L., Rizvi, F., Holmuhamedov, E. L., Werner, P., Downey, F. X., Tajik, A. J., and Jahangir, A. 2017. Enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> influx and ORAI1 expression in ventricular fibroblasts from human failing heart. *Biol. Open.* **6**: 326-332.
83. Saxena, A., Chen, W., Su, Y., Rai, V., Uche, O. U., Li, N., and Frangogiannis, N. G. 2013. IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. *J. Immunol.* **191**: 4838-4848.
84. Schulz, R., Panas, D. L., Catena, R., Moncada, S., Olley, P. M., and Lopaschuk, G. D. 1995. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis

- factor-alpha. *Br. J. Pharmacol.* **114**: 27-34.
85. Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Saito, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., Saga, Y., Fukayama, M., Sata, M., and Kudo, A. 2008. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **205**: 295-303.
86. Siddesha, J. M., Valente, A. J., Sakamuri, S. S., Gardner, J. D., Delafontaine, P., Noda, M., and Chandrasekar, B. 2014. Acetylsalicylic acid inhibits IL-18-induced cardiac fibroblast migration through the induction of RECK. *J. Cell. Physiol.* **229**: 845-855.
87. Sidhu, S. S., Yuan, S., Innes, A. L., Kerr, S., Woodruff, P. G., Hou, L., Muller, S. J., and Fahy, J. V. 2010. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 14170-14175.
88. Sottile, J. 2004. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim. Biophys. Acta.* **1654**: 13-22.
89. Stansfield, W. E., Andersen, N. M., Tang, R. H., and Selzman, C. H. 2009. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart. *Ann. Thorac. Surg.* **88**: 1916-1921.
90. Tai, I. T., Dai, M., and Chen, L. B. 2005. Periostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies. *Carcinogenesis.* **26**: 908-915.



91. Takebayashi, S., Li, Y., Kaku, T., Inagaki, S., Hashimoto, Y., Kimura, K., Miyamoto, S., Hadama, T., and Ono, K. 2006. Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**: 766-773.
92. Takeshita, S., Kikuno, R., Tezuka, K., and Amann, E. 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem. J.* **294 ( Pt 1)**: 271-278.
93. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. 2016. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**: 4-27.
94. Tonelli, A. R., Alnuaimat, H., and Mubarak, K. 2010. Pulmonary vasodilator testing and use of calcium channel blockers in pulmonary arterial hypertension. *Respir. Med.* **104**: 481-496.
95. Umar, S., and van der Laarse, A. 2010. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol. Cell. Biochem.* **333**: 191-201.
96. Valiente-Alandi, I., Schafer, A. E., and Blaxall, B. C. 2016. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **91**: 228-237.
97. Voelkel, N. F., Quaife, R. A., Leinwand, L. A., Barst, R. J., McGoon, M. D., Meldrum, D. R., Dupuis, J., Long, C. S., Rubin, L. J., Smart, F. W., Suzuki, Y. J., Gladwin, M., Denholm, E. M., and Gail, D. B. 2006. Right ventricular function and failure:

- report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. **114**: 1883-1891.
98. Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K. M., Forfia, P. R., Kawut, S. M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R. J., Provencher, S., Torbicki, A., Voelkel, N. F., and Hassoun, P. M. 2013. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**: D22-33.
99. Wang, Y. G., Ji, X., Pabbidi, M., Samarel, A. M., and Lipsius, S. L. 2009. Laminin acts via focal adhesion kinase/phosphatidylinositol-3' kinase/protein kinase B to down-regulate beta1-adrenergic receptor signalling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **587**: 541-550.
100. Wu, C. Y., Hsieh, H. L., Sun, C. C., and Yang, C. M. 2009. IL-1beta induces MMP-9 expression via a Ca<sup>2+</sup>-dependent CaMKII/JNK/c-JUN cascade in rat brain astrocytes. *Glia*. **57**: 1775-1789.
101. Xie, Z., Singh, M., and Singh, K. 2004. Osteopontin modulates myocardial hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice. *Hypertension*. **44**: 826-831.
102. Xu, H., Liu, C., Sun, Z., Guo, X., Zhang, Y., Liu, M., and Li, P. 2015. CCN5 attenuates profibrotic phenotypes of fibroblasts through the Smad6-CCN2 pathway: Potential role in epidural fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* **36**: 123-129.
103. Yasuda, J., Okada, M., and Yamawaki, H. 2015. Endostatin

- inhibits T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current in guinea pig ventricular myocyte. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 1289-1291.
104. Yoshida, Y., Togi, K., Matsumae, H., Nakashima, Y., Kojima, Y., Yamamoto, H., Ono, K., Nakamura, T., Kita, T., and Tanaka, M. 2007. CCN1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin-Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **355**: 611-618.
105. Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A. C. 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* **67**: 821-870.
106. Zhang, L., Li, Y., Liang, C., and Yang, W. 2014. CCN5 overexpression inhibits profibrotic phenotypes via the PI3K/Akt signaling pathway in lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and in an in vivo model of lung fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* **33**: 478-486.
107. Zhang, P., Xu, X., Hu, X., van Deel, E. D., Zhu, G., and Chen, Y. 2007. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ. Res.* **100**: 1089-1098.
108. Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, D., Zhang, D., Qian, Z., Liu, C., and Tao, J. 2012. Inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br. J. Pharmacol.* **166**: 1247-1260.
109. Zhang, Y., Wang, H., Qian, Z., Feng, B., Zhao, X., Jiang, X., and

- Tao, J. 2014. Low-voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors as new tools in the treatment of glioblastoma: the role of endostatin. *Pflugers Arch.* **466**: 811-818.
110. Zhao, S., Wu, H., Xia, W., Chen, X., Zhu, S., Zhang, S., Shao, Y., Ma, W., Yang, D., and Zhang, J. 2014. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J. Cardiol.* **63**: 373-378.
111. Zhu, W. Z., Wang, S. Q., Chakir, K., Yang, D., Zhang, T., Brown, J. H., Devic, E., Kobilka, B. K., Cheng, H., and Xiao, R. P. 2003. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest.* **111**: 617-625.