

心疾患モデルラットを用いた IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖分解産物
canstatin の心保護作用に関する基礎的検討

杉山 彰

A fundamental study on the cardioprotective effects of canstatin,
a cleaved fragment of type IV collagen $\alpha 2$ chain,
using experimental models for cardiac diseases in rats

Akira Sugiyama

目次

I. 緒言	1
II. 第一章	6
1. 緒言	7
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	8
2-1-2. 一次抗体	8
2-1-3. 二次抗体	8
2-1-4. 使用動物	9
2-2. 実験方法	9
2-2-1. 正常ラットからの臓器摘出	9
2-2-2. 心筋梗塞モデルラットの作製	9
2-2-3. siRNA 投与実験	10
2-2-4. 心臓の摘出	10
2-2-5. Western blotting	11
2-2-6. 免疫組織化学染色	12
2-3. 統計解析	13
3. 結果	13
3-1. 健常ラット全身臓器における canstatin 発現	13
3-2. 心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において canstatin 発現は減少する	14
3-3. 心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において COL4A2 発現は増加する	14
3-4. 心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において cathepsin S 発現	

は増加する	15
3-5.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において siRNA による cathepsin S 発現抑制は canstatin 発現減少を抑制する	15
4.考察	24
III.第二章	27
1. 緒言	28
2.実験材料および実験方法	29
2-1.実験材料	29
2-1-1.試薬	29
2-1-2.一次抗体	29
2-1-3.二次抗体	30
2-1-4.使用動物	30
2-2.実験方法	31
2-2-1. Recombinant マウス canstatin の作製	31
2-2-2. Recombinant canstatin 投与実験	33
2-2-3.心エコー検査	34
2-2-4.ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色	34
2-2-5.ピクロシリウスレッド染色	35
2-2-6.免疫組織化学染色	35
2-2-7.筋線維芽細胞の単離・培養	36
2-2-8.免疫蛍光染色	37
2-2-9. Cell counting assay	37
2-2-10.コラーゲンゲル収縮アッセイ	38
2-2-11.心線維芽細胞の単離	39
2-2-12. Western blotting	40

2-3.統計解析	41
3.結果	41
3-1. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの生存率を改善する .	41
3-2. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの左室拡張および機能不全を抑制する	42
3-3. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの瘢痕菲薄化を抑制する	44
3-4. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における心筋細胞肥大を抑制する	44
3-5. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域におけるNFATc4 核内移行を抑制する	45
3-6. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における間質性線維化を抑制する	45
3-7. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における筋線維芽細胞数増加を抑制する	46
3-8. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖能を亢進する	46
3-9. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の MMPs 分泌能を亢進する	47
3-10. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の収縮能を抑制する	47
3-11. Canstatin は心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導を抑制する	48
4.考察	70
IV.第三章	75

1. 緒言	76
2. 実験材料および実験方法	77
2-1. 実験材料	77
2-1-1. 試薬	77
2-1-2. 一次抗体	77
2-1-3. 使用動物	77
2-2. 実験方法	78
2-2-1. Recombinant canstatin 投与実験	78
2-2-2. 心エコー検査	78
2-2-3. Azan 染色	79
2-2-4. Calcineurin 活性測定	79
2-2-5. 免疫組織化学染色	80
2-2-6. Real time RT-PCR	80
2-2-7. 新生仔ラット心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes: NRCMs) の単離	81
2-2-8. $[Ca^{2+}]_i$ 測定	82
2-3. 統計解析	83
3. 結果	83
3-1. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左室 壁厚増加を抑制する	83
3-2. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心筋 細胞肥大を抑制する	84
3-3. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの calcineurin 活性および NFATc4 核内移行を抑制する	85
3-4. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心肥	

大関連遺伝子発現亢進を抑制する	87
3-5. Canstatin は NRCMs における isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する	87
4. 考察	99
V. 第四章	101
1. 緒言	102
2. 実験材料および実験方法	103
2-1. 実験材料	103
2-1-1. 試薬	103
2-1-2. 使用動物	104
2-2. 実験方法	104
2-2-1. I/R 誘発心室性不整脈モデルの作製	104
2-2-2. NRCMs の単離	105
2-2-3. Oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) 刺激	105
2-2-4. Lucigenin assay	106
2-2-5. DCF-DA 染色	107
2-2-6. $[Ca^{2+}]_i$ 測定	107
2-3. 統計解析	107
3. 結果	108
3-1. Canstatin は I/R 誘発心室性不整脈を抑制する	108
3-2. Canstatin は NRCMs における OGD/R 誘導性 NOX 活性化を抑制する	108
3-3. Canstatin は NRCMs における OGD/R 誘導性 ROS 産生を抑制する	109

3-4. Canstatin は NRCMs における H_2O_2 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する	109
4. 考察	120
VI. 第五章	122
1. 緒言	123
2. 実験材料および実験方法	124
2-1. 実験材料	124
2-1-1. 試薬	124
2-1-2. 一次抗体	125
2-1-3. 二次抗体	125
2-1-4. 使用動物	125
2-2. 実験方法	125
2-2-1. 動物実験	125
2-2-2. 心エコー検査	127
2-2-3. 肺動脈圧測定	127
2-2-4. HE 染色	127
2-2-5. ピクロシリウスレッド染色	128
2-2-6. 免疫組織化学染色	128
2-2-7. Real time RT-PCR	128
2-2-8. マウス抗 canstatin モノクローナル抗体の作製および精製	129
2-2-9. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による血漿 canstatin 濃度測定	130
2-2-10. Western blotting	131
2-3. 統計解析	131

3. 結果	132
3-1. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈圧上昇には影響を及ぼさない	132
3-2. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈内腔狭窄には影響を及ぼさない	133
3-3. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心肥大を抑制する	133
3-4. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心線維化を抑制する	135
3-5. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度は減少する	136
3-6. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室、肺および腎臓における canstatin 発現は減少する	137
4. 考察	154
VII. 総括	159
VIII. 謝辞	170
IX. 参考文献	171

I. 緒言

我が国では急速な高齢化や心筋梗塞などの虚血性心疾患を原因とする心不全患者数の増加により心疾患患者数が年々増加している[99, 101]。心疾患を含む循環器疾患にかかる医療費は国民医療費のうち最も高い割合を占めることから、その増大が社会的な問題となっている[48]。したがって心疾患を標的とした治療および予防医学の発展は我が国における喫緊の課題である。現在のところ、心疾患の治療は弁置換・形成術、左室形成術、冠動脈バイパス術や心臓移植などの根治手術以外の大部分を内科的な薬物療法に頼っている[118]。心臓への負荷軽減や心機能増強を目的とした既存薬は quality of life (QOL)や予後の改善などで一定の治療効果を示しているが、既存薬とは異なる作用点を標的としたより効果的な新規治療薬の開発は今なお求められている[43]。

我が国の心疾患による死亡者数は悪性新生物(がん)に次いで2番目に多く、特に突然死の主な原因となる急性心筋梗塞をはじめとした虚血性心疾患はそのうちの約3割を占める[49]。急性心筋梗塞発症後早期における再灌流療法は死亡率を低下させ、予後を改善する最も有効な治療法である[115, 132]。しかしながら、再灌流時に発生する酸化ストレスを起因とした虚血/再灌流(ischemia/reperfusion: I/R)障害が心筋細胞死や不整脈を引き起こすことから問題となっており、その有効な予防法の開発が望まれている[28, 67, 132]。一方、心筋梗塞の急性期を脱した患者においては広範な心筋壊死による心機能低下を代償するために、心肥大や線維化などの構造的変化、すなわち心リモデリングが起こ

る。適度な心リモデリングは心機能の維持に必要であるが、心リモデリングが過度に進行した心臓は収縮・拡張不全を起こし、最終的には心不全へと至る[98, 116]。心不全は虚血性心疾患と同様に心疾患による主な死因の一つであり[49]、予後不良の進行性疾患である。前述の心筋梗塞以外にも弁膜症や心筋症など様々な心疾患を原因とする心不全は「あらゆる心疾患の終末像」と呼ばれる[99]。心不全への進行を防ぐためには、そこに至るまでの原因疾患の発症・進展を抑えることが肝要である。病的な心リモデリングは心疾患の発症・進展に深く関わることから重要な治療標的と捉えられているが[18, 98, 116]、それに対する特異的な治療薬は未だ開発されていない。

コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)は、細胞間隙に存在する高分子群であり、主に組織構造の維持に働く[89, 120]。また ECM は周辺細胞の増殖、遊走、接着および分化などの機能調節を介して組織の恒常性を維持している[89, 120]。心疾患の発症・進展においては ECM の産生と分解のバランスが乱れており、過剰な ECM の産生・蓄積は心線維化を引き起こす[120]。一方、matrix metalloproteinases (MMPs)や cathepsins をはじめとした ECM 分解酵素による ECM 構造の破壊とそれに伴う成長因子、サイトカインなどの遊離・活性化は心リモデリングにおいて重要な役割を担う[9, 11, 68, 116, 120]。近年、ECM 分解酵素により ECM から遊離・産生された分解産物が、産生源の ECM と異なる性質を持つことから ECM (matrix)の潜在的(cryptic)な活性断片すなわち”matricryptins”と名づけられ着目されている[14,

88]。基底膜を構成するコラーゲン由来の *matricryptins* の多くは抗血管新生作用や抗腫瘍作用を有しており、腫瘍研究分野において幅広く研究されている[63]。しかしながら、心臓におけるこれら基底膜由来 *matricryptins* の役割には不明な点が多く残されている。

IV型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖(COL4A2)は心筋細胞周囲の基底膜を構成する主要なECMである[125, 131]。CanstatinはCOL4A2のC末端非コラーゲン(non-collagenous domain 1; NC1)領域由来の*matricryptin*であり、他の基底膜由来*matricryptins*と同様に抗血管新生作用を有する[41]。Canstatinによる抗血管新生作用は $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介することが知られている[59]。当研究室ではこれまで、*in vitro*実験により心臓構成細胞におけるcanstatinの様々な生理活性を明らかにしてきた。まずcanstatinがラット心線維芽細胞の遊走能を亢進すること[74]を明らかにした。またcanstatinはH9c2ラット心筋芽細胞において低酸素およびisoproterenol誘導性アポトーシスを抑制すること[42, 73]、ラット心室筋細胞においてL型 Ca^{2+} チャネル(L-type Ca^{2+} channel: LTCC)活性を抑制すること[34]なども明らかにしてきた(図1)。しかしながら、心筋細胞保護作用をはじめとしたこれらcanstatinの生理活性が、実際の心疾患においても発揮されるかは不明であった。そこで本研究は心筋梗塞や心肥大などの各種*in vivo*心疾患モデル動物を用いてrecombinant canstatinの投与実験を行うことにより、その心保護作用を検証した。

基底膜の主要構成成分であるCOL4A2は全身に広く存在するが[33, 44]、その分解産物であるcanstatinの組織分布や心疾患に

おける発現変化は不明である。そこで第一章では、**canstatin** による心保護作用検討を行う前段階として、健常ラットの全身臓器および心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における **canstatin** 発現を検討した。第二章では、第一章と同様の方法で作製した心筋梗塞モデルラットに対する **recombinant canstatin** 投与を行いその心保護作用を検討した。第二章において **canstatin** が抗心肥大作用を示したため、第三章では、**isoproterenol** 誘発心肥大モデルラットに **recombinant canstatin** 投与を行い、**canstatin** の抗心肥大作用メカニズムの解明を行った。心筋梗塞治療における再灌流療法の問題点である I/R 障害による不整脈発生の原因の一つとして心筋細胞における過剰な細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が挙げられる。第三章において **canstatin** が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制することが明らかになったため、第四章では、I/R 誘発心室性不整脈に対する **canstatin** の保護作用を検討した。第五章では、**canstatin** の右心系への作用を検討するため、**monocrotaline** 誘発肺高血圧症モデルラットにおける圧負荷誘発右心肥大に対する **canstatin** の心保護作用を検討した。さらに **canstatin** の心疾患バイオマーカーとしての応用可能性を検討するため、血漿 **canstatin** 濃度と肺高血圧症の病態の関連を検討した。

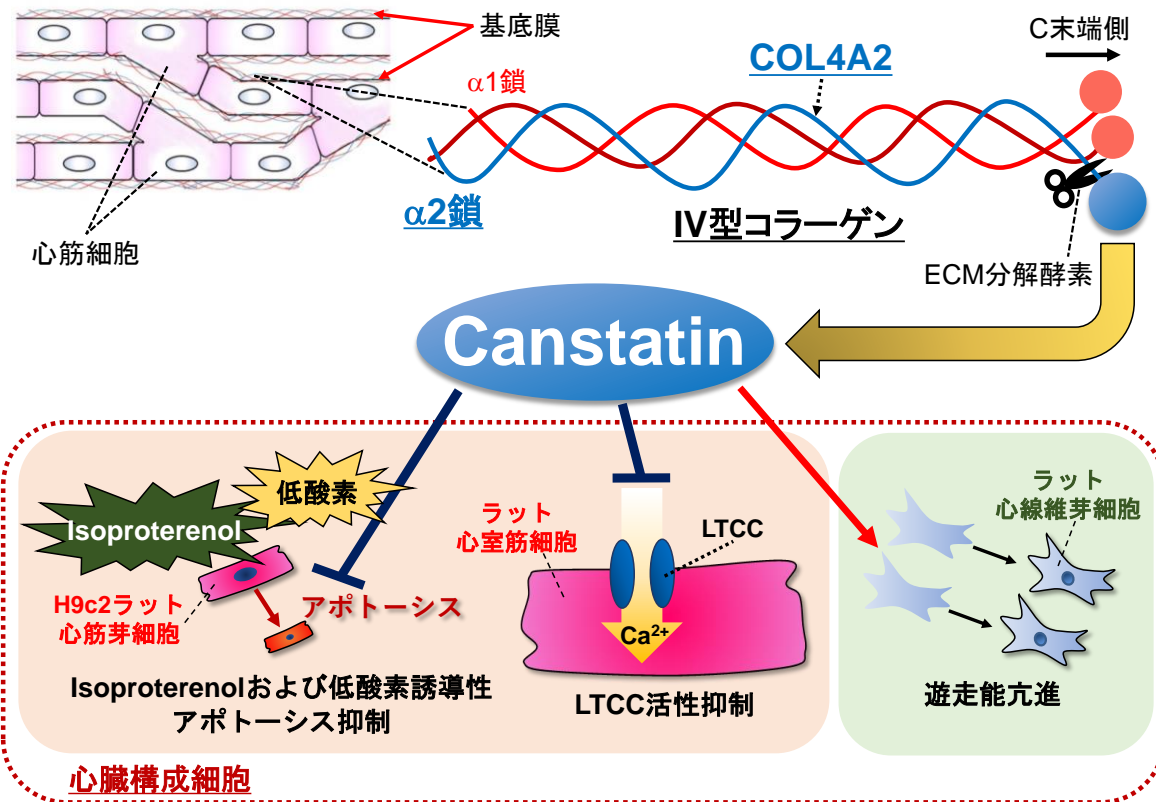


図 1. 当研究室において *in vitro* 実験でこれまでに明らかにした canstatin の心臓構成細胞における生理活性
 COL4A2: IV 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖, ECM: 細胞外マトリックス (extracellular matrix), LTCC: L 型 Ca^{2+} チャンネル (L-type Ca^{2+} channel).

II.第一章

健常ラット心臓組織に高発現する *canstatin* は心筋梗塞後の梗塞領域において発現が低下する

1. 緒言

IV型コラーゲンは基底膜の主要な構成成分であり、3本の α 鎖から成る三重らせん構造を形成する[33, 44]。2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖から成るIV型コラーゲンは全身臓器に発現しており[33, 44]、心臓においては心筋細胞周囲基底膜の主要な構成成分である[125, 131]。COL4A2から分解・遊離したC末端NC1領域由来のmatricryptinであるcanstatinは抗血管新生作用や抗腫瘍作用を持つ[41]。CanstatinはCOL4A2がmembrane type (MT)1-MMP1およびMT2-MMP2により分解・切断されることで産生され[86]、cathepsin Sにより分解されることが報告されている[123]。Canstatinの全身臓器における発現分布は不明だが、産生源となるCOL4A2が全身に幅広く発現することから[33, 44]、各臓器に発現することが予想される。一方、心筋梗塞後の梗塞領域においてCOL4A2発現が上昇すること[65, 131]やcathepsin S発現・活性が上昇すること[9]が報告されており、梗塞領域においてcanstatin発現が変化することも考えられる。そこで第一章では、健常ラットの全身臓器におけるcanstatin発現を明らかにするとともに、心筋梗塞モデルラットの梗塞領域におけるcanstatin発現変化ならびにその調節機構を検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 試薬

ユニバーサルネガティブ control small interfering RNA (siRNA)(Cont siRNA)および rat cathepsin S siRNA (Cathepsin S siRNA)(ニッポンジーン、富山)。Cathepsin S siRNA は *Rattus Norvegicus* cathepsin S (*Ctss*) mRNA (accession number: NM_017320)を基に設計・合成した。配列は以下の通りである。

Gene		Sequence
<i>Ctss</i>	Sense	5'-GAAGCUUCCUAUCCCUACAdTdT-3'
	Antisense	5'-UGUAGGGAUAGGAAGCUUCdTdT-3'

2-1-2. 一次抗体

Anti-canstatin (PA1521)(Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, U.S.A.)、anti-cathepsin S (sc-271619)、anti-vinculin (sc-73614)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)および anti-total actin (A3853)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.)。

2-1-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP) linked whole antibody (NA934; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK または 7074S; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.)および anti-mouse IgG HRP linked whole antibody (NA931; Amersham Biosciences または 7076S; Cell Signaling Technology)。

2-1-4.使用動物

すべての動物実験は北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 18-020、17-083 および 16-033)、同大学のガイドラインを遵守して行った。実験には 7-10 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア、東京)を使用し、学部内 5 号館 2 階の実験動物飼育室で固形飼料(CE2;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.正常ラットからの臓器摘出

ペントバルビタール(ナカライテスク、京都: 100 mg/kg)またはウレタン(Sigma-Aldrich: 1.5 g/kg)の腹腔内投与による深麻酔下で各臓器[腎臓、左心房、左心室、肺、皮下脂肪、血管(腹部大動脈)、骨格筋(後肢骨格筋)、脾臓、肝臓、胃、大腸、内臓脂肪(精巣周囲脂肪)、精巣および膀胱]を摘出した。摘出臓器は 2-2-5 の Western blotting に用いるために液体窒素で急速凍結し、使用まで -80 °C で保存した。

2-2-2.心筋梗塞モデルラットの作製

Wu らの方法に従い心筋梗塞モデルラットを作製した[128]。イソフルラン(和光純薬、大阪)麻酔下[流速: 2 L/分、濃度: 5% (導入)、2.5% (維持)]でラットに気管挿管を行い、ベンチレーター(MODEL SN-480-7;シナノ製作所、東京)を用いて人工換気下(呼吸数: 100 回/分、換気量: 5 cc/回)においた。術期鎮痛としてブプレノルフィン塩酸塩(レペタン;大塚製薬株式会社、東京: 0.05 mg/kg)を開胸前に皮下投与した。術野の剃毛・消毒後、左胸部第

3-4 肋間より開胸し、左肺および胸腺を避けて心臓を露出させた。心膜の一部を切開し、左冠動脈前下行枝を 6-0 ナイロン糸により結紮することにより血流を遮断し、心筋梗塞モデルラットを作製した。閉胸・覚醒後に 1 または 3 日間飼育し、2-2-4 の心臓の摘出を行った。

2-2-3. siRNA 投与実験

井本らの方法に従い siRNA を投与した [34]。2-2-2 と同様の方法で心筋梗塞モデルラットを作製した後にイソフルラン麻酔下 [流速: 2 L/分、濃度: 5% (導入)、2.5% (維持)] で頸部皮膚を切開し、右頸静脈を露出させた。N/P 比 (*in vivo*-jetPEI 窒素残基数と siRNA リン酸残基数の比) が 8 となるように 10 μ g の Cathepsin S siRNA (ニッポンジーン) または Cont siRNA (ニッポンジーン) と 1.6 μ l の *in vivo*-jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstanden, France) を混和した。総量 150 μ l となるよう 5% グルコース溶液で調整した siRNA 溶液を右頸静脈より投与した。圧迫止血後に皮膚縫合・覚醒させて 3 日間飼育し、2-2-4 の心臓の摘出を行った。

2-2-4. 心臓の摘出

ペントバルビタール (ナカライテスク: 100 mg/kg) の腹腔内投与による深麻酔下で心臓を摘出した。摘出した心臓は Krebs-Henseleit (119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 24.9 mM NaHCO₃, 10.0 mM Glucose) 溶液中で瀉血した。左心室組織のうち結紮部位の直下で退色している

部位を梗塞領域、退色していない部位を非梗塞領域として切り分けた後、2-2-5のWestern blottingに用いるため液体窒素で急速凍結し、使用まで-80 °Cで保存した。一方、2-2-6の免疫組織化学染色に用いるための梗塞領域と非梗塞領域を含む左心室組織は10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)中に4 °Cで一晩保存した。

2-2-5. Western blotting

岡田らの方法に従いWestern blottingを行った[74]。-80 °Cで保存した組織サンプルを卓上破砕機(セルデストロイヤー;バイオメディカルサイエンス、東京)で破砕し、プロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク)を添加した細胞溶解液(Cell Lysis Buffer; Cell Signaling Technology)を10分間処置し可溶化した後に、10分間遠心分離(13,000 rpm、4 °C)し、タンパク質抽出液を得た。タンパク質濃度の定量はbicinchoninic acid (BCA)法(BCA Protein Assay Kit; Pierce, Rocked, IL, U.S.A.)により行った。等量(10または20 µg)のタンパク質抽出液をsodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE: 7.5または14%)で分離した(80-120V、1.5-2時間)後、ニトロセルロースメンブレン(Pall Corporation, Ann Arbor, MI, U.S.A.)に転写した(400 mA、1.5時間)。転写メンブレンを0.5%スキムミルクでブロッキングした後、一次抗体[抗canstatin抗体(1:500希釈)、抗cathepsin S抗体(1:500希釈)、total actin(1:1,000希釈)または抗vinculin抗体(1:1,000希釈)]を4 °Cで一晩反応させた。抗canstatin抗体はcanstatin (24 kDa; 図2、図3、図6)およびCOL4A2 (185~195 kDa; 図4)タンパク質の検出に用いた。転写メンブレンに結合した一

次抗体は HRP 標識二次抗体(1:10,000 希釈、45 分間)と EZ-ECL system (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)を用いて可視化し、ATTO light capture system (AE-6972; ATTO、東京)により検出し、CS Analyzer software (Version 3.0; ATTO)を用いて定量・解析した。総タンパク質の発現量解析のため、ponceau S (AppliChem, Darmstadt, Germany)染色を行った。転写メンブレンを 0.1% ponceau S 溶液に 10 分間室温で浸漬し、1%酢酸溶液により洗浄した後に可視化したバンドを CS Analyzer software (ATTO)により定量した。

2-2-6.免疫組織化学染色

井本らの方法に従い免疫組織化学染色を行った[36]。2-2-4において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織をパラフィン包埋し[70%エタノール(30分、2回)→80%エタノール(60分)→90%エタノール(60分)→99%エタノール(60分)→100%エタノール(60分、2回)→キシレン(45分、3回)→60°Cに加熱したパラフィン(15分、2回)の順に浸漬]、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)により4µmの厚さで薄切した。42°Cに加熱した蒸留水に浮かべ伸展させた薄切切片をスライドガラスに載せ42°Cで一晩乾燥させた。薄切切片は脱パラフィン後[レモゾール(和光純薬:10分、3回)またはキシレン(5分、3回)→100%エタノール(2分、2回)→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]、10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)中でマイクロウェーブ処理によ

り抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害のために 3% H₂O₂ 溶液に 10 分間浸漬後、5% normal goat serum (NGS) でブロッキングを行い、一次抗体[抗 canstatin 抗体(1:200 希釈)または抗 cathepsin 抗体(1:50 希釈)]を 4 °C で一晩反応させた。洗浄後に二次抗体(BIOTINYLATED LINK; Dako, Glostrup, Denmark)および酵素試薬(STREPTAVIDIN-HRP; Dako)を各 10 分間室温で反応させた。洗浄後、各タンパク質発現を基質溶液(基質緩衝液; DAB SUBSTRATE BUFFER+発色基質; DAB CHROMOGEN; Dako)を反応させ、発色させた。CCD カメラ(DP74; OLYMPUS、東京)を接続した光学顕微鏡(BX-51; OLYMPUS)により画像を取得し、画像解析ソフト(Image J software version 1.52a; National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.)を用いて陽性領域を定量した。

2-3. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価は Student の *t* 検定を用い、危険率 5%以下 ($P < 0.05$) を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. 健常ラット全身臓器における canstatin 発現

初めに健常ラット全身臓器における canstatin 発現を Western blotting により検討した。Canstatin はラットの全身臓器[腎臓、左心房、左心室、肺、皮下脂肪、血管(腹部大動脈)、骨格筋(後肢骨格筋)、脾臓、肝臓、胃、大腸、内臓脂肪(精巣周囲脂肪)、

精巢および膀胱]に発現していた(図 2; n=5)。また心臓組織(左心室および左心房)における canstatin 発現レベルは腎臓と同等で、その他の臓器と比較して高かった(図 2; n=5)。

3-2.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において canstatin 発現は減少する

次に心筋梗塞後 1 日目および 3 日目の梗塞領域における canstatin 発現を Western blotting により検討した。梗塞領域における canstatin 発現は非梗塞領域と比較して有意に減少した(1 日目: $49.7 \pm 20.1\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域; 3 日目: $54.1 \pm 16.4\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域)(図 3A, B; n=5)。心筋梗塞後 3 日目の発現および分布を免疫組織化学染色により検討したところ、canstatin は非梗塞領域において心筋および間質に発現していた。梗塞領域の心筋において canstatin 発現が低下したが($51.2 \pm 16.1\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域)(図 3C; n=3)、間質では発現の低下は認められなかった(図 3C; n=3)。

3-3.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において COL4A2 発現は増加する

心筋梗塞後の梗塞領域において COL4A2 発現が増加することが報告されている[65, 131]。心筋梗塞後 3 日目の梗塞領域における COL4A2 発現を Western blotting により検討したところ、これまでの報告と同様に非梗塞領域と比較して有意に増加した($334.3 \pm 98.5\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域)(図 4; n=5)。

3-4.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において cathepsin S 発現は増加する

Wang らは cathepsin S が *in vitro* において canstatin を分解することを報告しており [123]、梗塞領域における canstatin 発現減少に cathepsin S が関与する可能性が考えられた。心筋梗塞後 1 日目および 3 日目の梗塞領域において cathepsin S 発現は有意に増加した (1 日目: $842.3 \pm 245.6\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域, 3 日目: $241.7 \pm 54.8\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域) (図 5A, B; n=5)。免疫組織化学染色により心筋梗塞後 1 日目の梗塞領域における cathepsin S 発現および分布を検討したところ、非梗塞領域と比べて心筋において発現が有意に増加した ($3,653.5 \pm 741.4\%$, $P < 0.01$ vs. 非梗塞領域) (図 5C; n=4)。

3-5.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において siRNA による cathepsin S 発現抑制は canstatin 発現減少を抑制する

梗塞領域における canstatin 発現減少が cathepsin S による分解を介するかを検討するため、Cathepsin S siRNA 投与による cathepsin S 発現抑制実験を行った。Cathepsin S siRNA 投与は心筋梗塞後 3 日目の梗塞領域における cathepsin S 発現増加を抑制した (Cont siRNA: $323.1 \pm 78.3\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域; Cathepsin S siRNA: $71.7 \pm 16.8\%$ vs. 非梗塞領域) (図 6A; Cont siRNA: n=4, Cathepsin S siRNA: n=3)。Cont siRNA 投与群の梗塞領域では canstatin 発現が有意に低下したが、Cathepsin S siRNA 投与群の梗塞領域では canstatin 発現は減少しなかった (Cont siRNA: $50.5 \pm 17.4\%$, $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域; Cathepsin S siRNA:

105.9±47.4% vs. 非梗塞領域)(図 6B; Cont siRNA: n=4, Cathepsin S siRNA: n=3)。

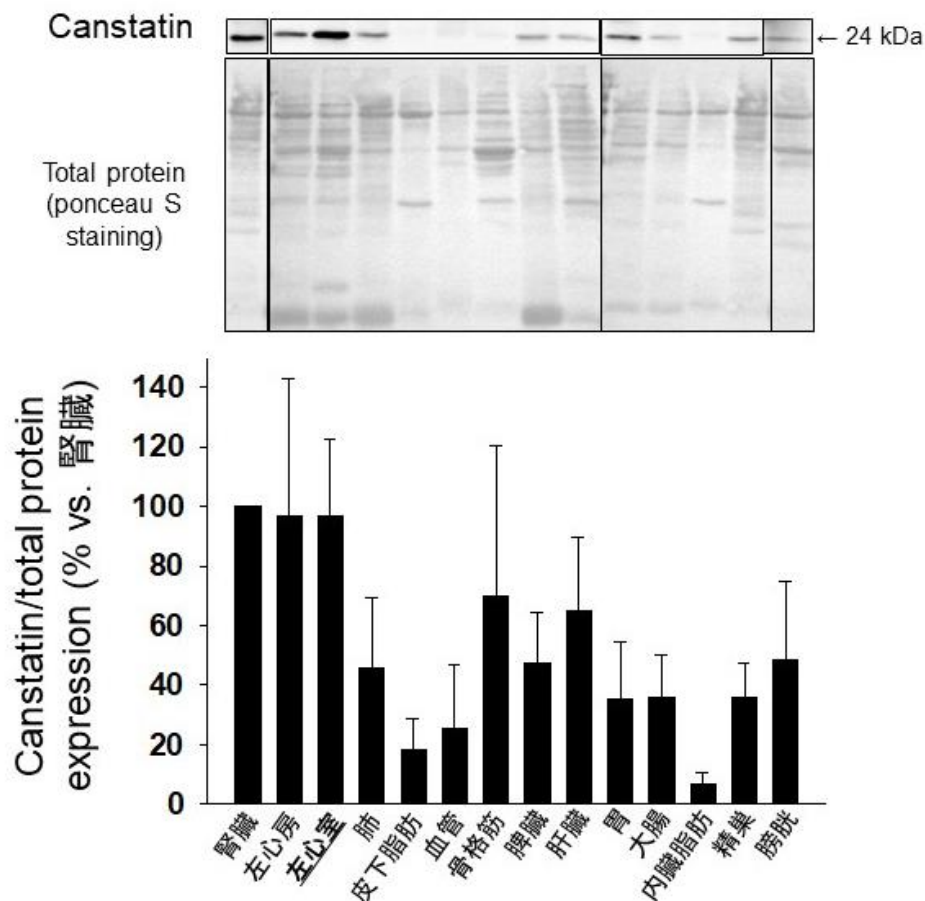


図 2. 健常ラットの全身臓器における canstatin 発現

健常ラット各臓器[腎臓、左心房、左心室、肺、皮下脂肪、血管(腹部大動脈)、骨格筋(後肢骨格筋)、脾臓、肝臓、胃、大腸、内臓脂肪(精巣周囲脂肪)、精巣、膀胱]からタンパク質を抽出し、Western blottingにより canstatin タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な canstatin (24 kDa)のブロット像および ponceau S 染色像を示した。(下図) Canstatin 発現を ponceau S 染色による総タンパク質発現で補正し、腎臓を 100%として平均値 ±標準誤差で示した (n=5)。

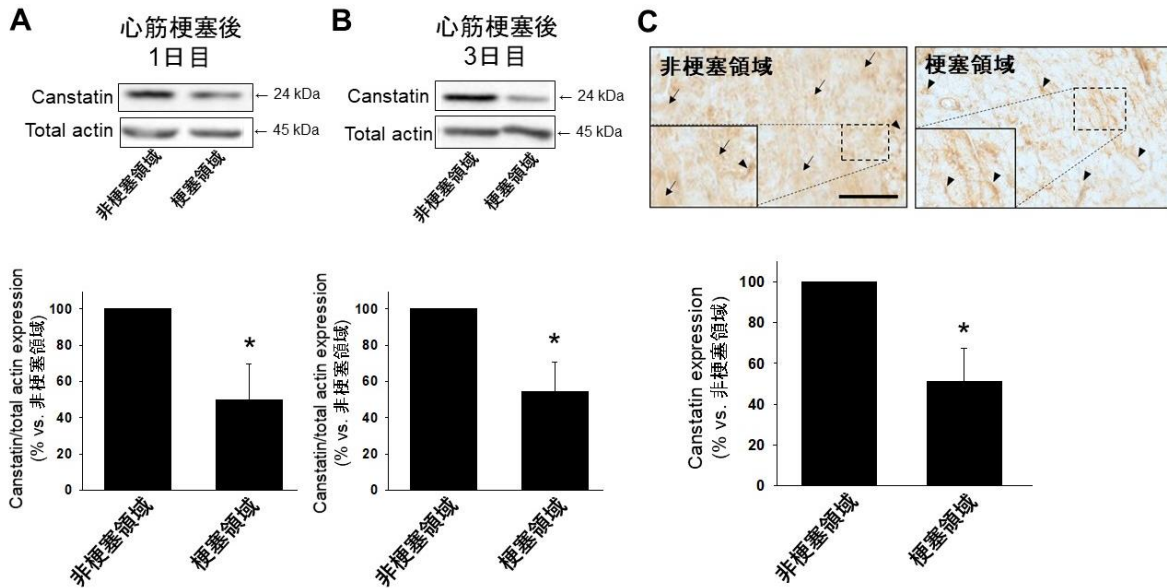


図 3.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における canstatin 発現および分布

ラットの左冠動脈前下行枝を結紮することにより心筋梗塞モデルを作製した。(A, B)心筋梗塞後 1 日目(A)および 3 日目(B)の左心室組織の非梗塞領域と梗塞領域からタンパク質を抽出し、Western blotting により canstatin タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な canstatin (24 kDa)および total actin (45 kDa)のプロット像を示した。(下図) Canstatin 発現を total actin 発現で補正し、非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した(n=5)。* $P < 0.05$ vs.非梗塞領域。(C)心筋梗塞後 3 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、抗 canstatin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(上図)典型的な抗 canstatin 抗体陽性像(茶褐色)を示した。矢印:心筋. 矢頭:間質. Scale bar: 100 μ m. (下図)抗 canstatin 抗体陽性領域を定量し、非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した(n=3)。* $P < 0.05$ vs.非梗塞領域.

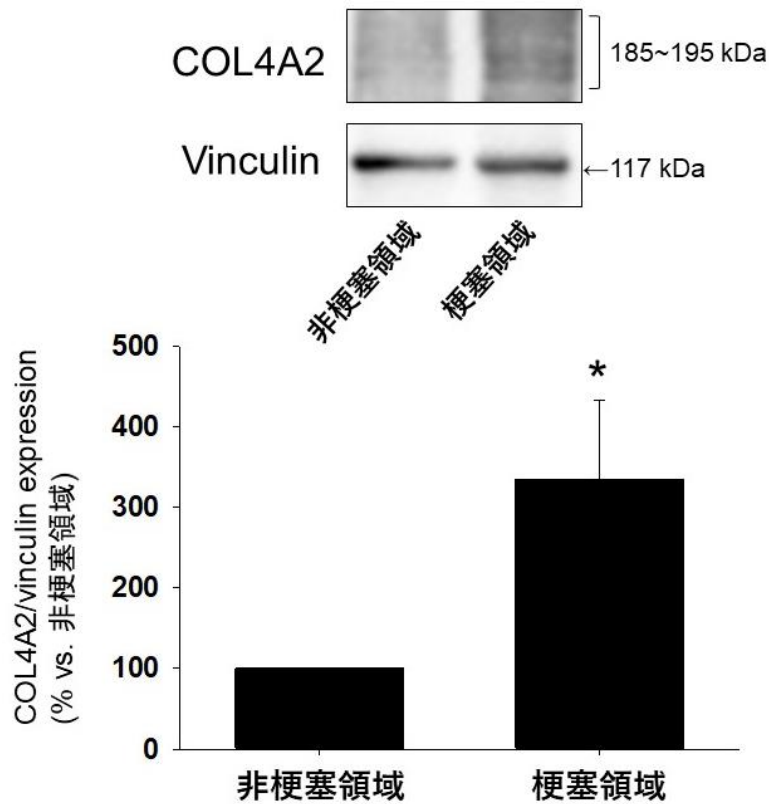


図 4.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における COL4A2 発現

ラットの左冠動脈前下行枝を結紮することにより心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞後 3 日目の左心室組織の非梗塞領域と梗塞領域からタンパク質を抽出し、Western blotting により COL4A2 タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な COL4A2 (185~195 kDa)および vinculin (117 kDa)のプロット像を示した。(下図) COL4A2 発現を vinculin 発現で補正し、非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した (n=5)。

* $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域.

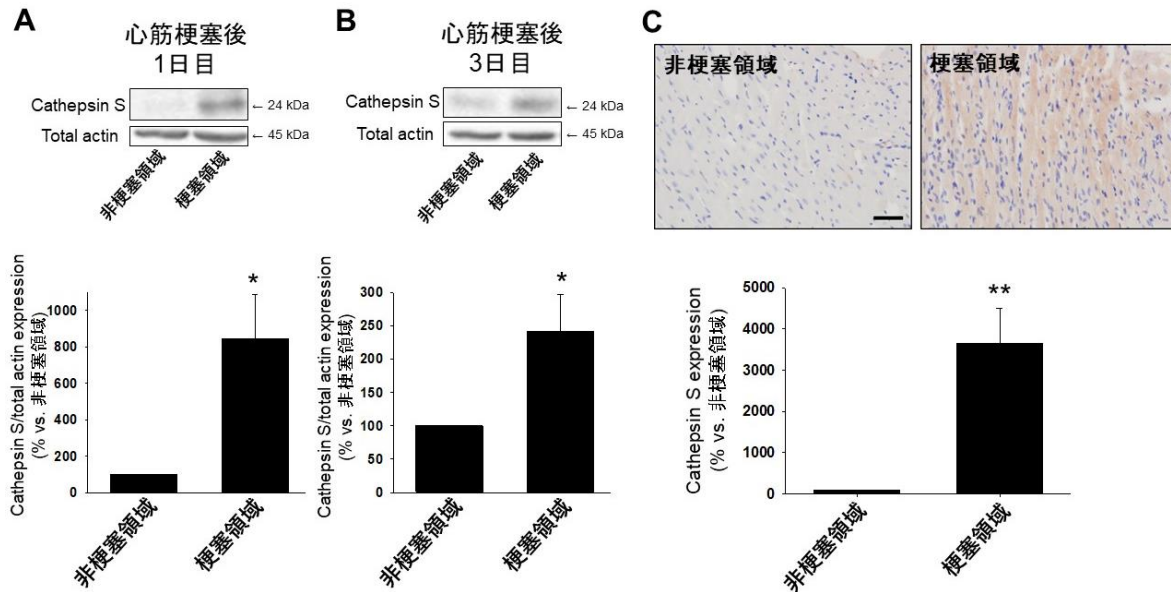


図 5.心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における cathepsin S 発現および分布

ラットの左冠動脈前下行枝を結紮することにより心筋梗塞モデルを作製した。(A, B)心筋梗塞後 1 日目(A)および 3 日目(B)の左心室組織の非梗塞領域と梗塞領域からタンパク質を抽出し、Western blotting により cathepsin S タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な cathepsin S (24 kDa)および total actin (45 kDa)のブロット像を示した。(下図) Cathepsin S 発現を total actin 発現で補正し、非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した (n=5)。* $P < 0.05$ vs.非梗塞領域。(C)心筋梗塞後 1 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、抗 cathepsin S 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(上図)典型的な抗 cathepsin S 抗体陽性像(茶褐色)を示した。Scale bar: 50 μm 。(下図)抗 cathepsin S 抗体陽性領域を定量し、非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した (n=3)。** $P < 0.01$ vs.非梗塞領域。

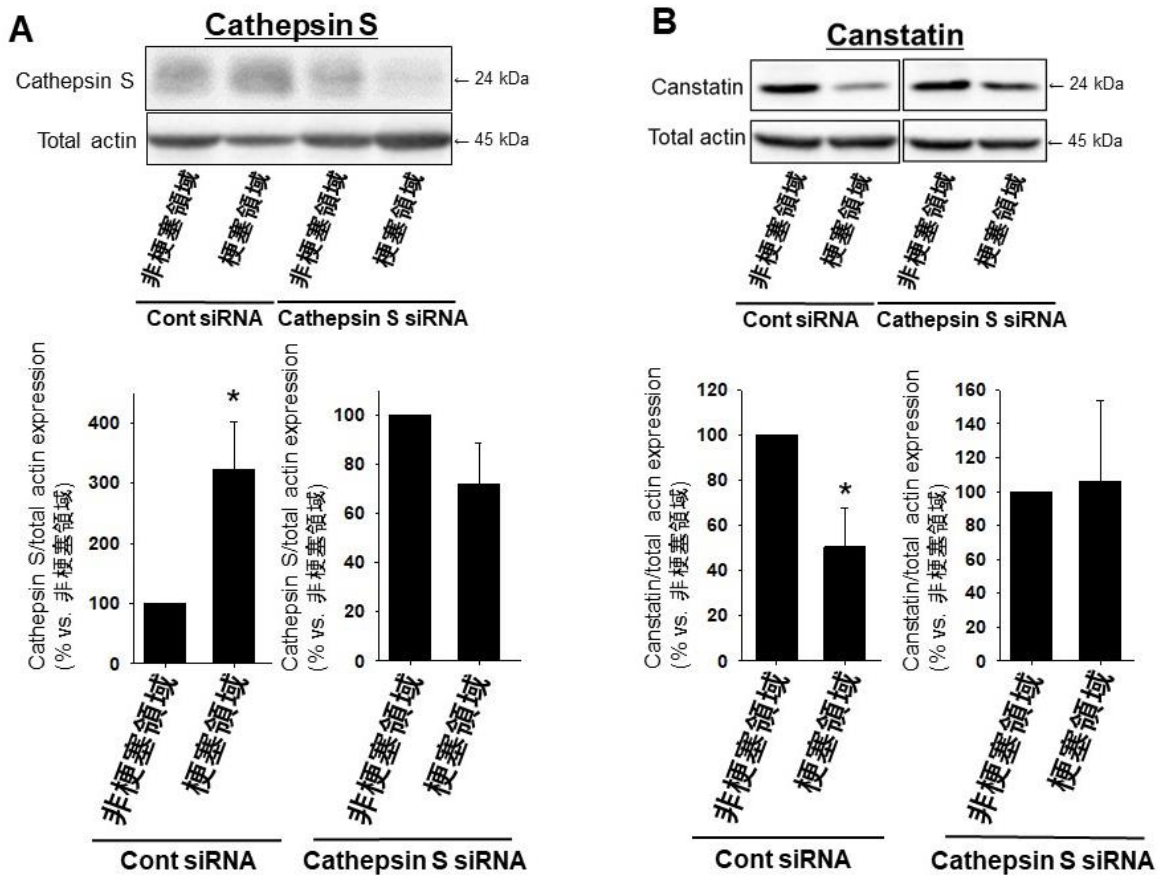


図 6. Rat cathepsin S small interfering (si)RNA (Cathepsin S siRNA)投与心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における cathepsin S および canstatin 発現

ラットの左冠動脈前下行枝を結紮した後に control (Cont) siRNA または Cathepsin S siRNA を頸静脈内に投与した。心筋梗塞後 3 日目の左心室組織の非梗塞領域と梗塞領域からタンパク質を抽出し、Western blotting により cathepsin S (A) および canstatin (B) タンパク質発現を検討した。(上図) 典型的な cathepsin S (24 kDa)、canstatin (24 kDa) および total actin (45 kDa) のプロット像を示した。(下図) Cathepsin S および canstatin

発現を total actin 発現で補正し、Cont siRNA 群および Cathepsin S siRNA 群それぞれの非梗塞領域を 100%として平均値±標準誤差で示した (Cont siRNA: n=3, Cathepsin S siRNA: n=4)。

* $P < 0.05$ vs. 非梗塞領域.

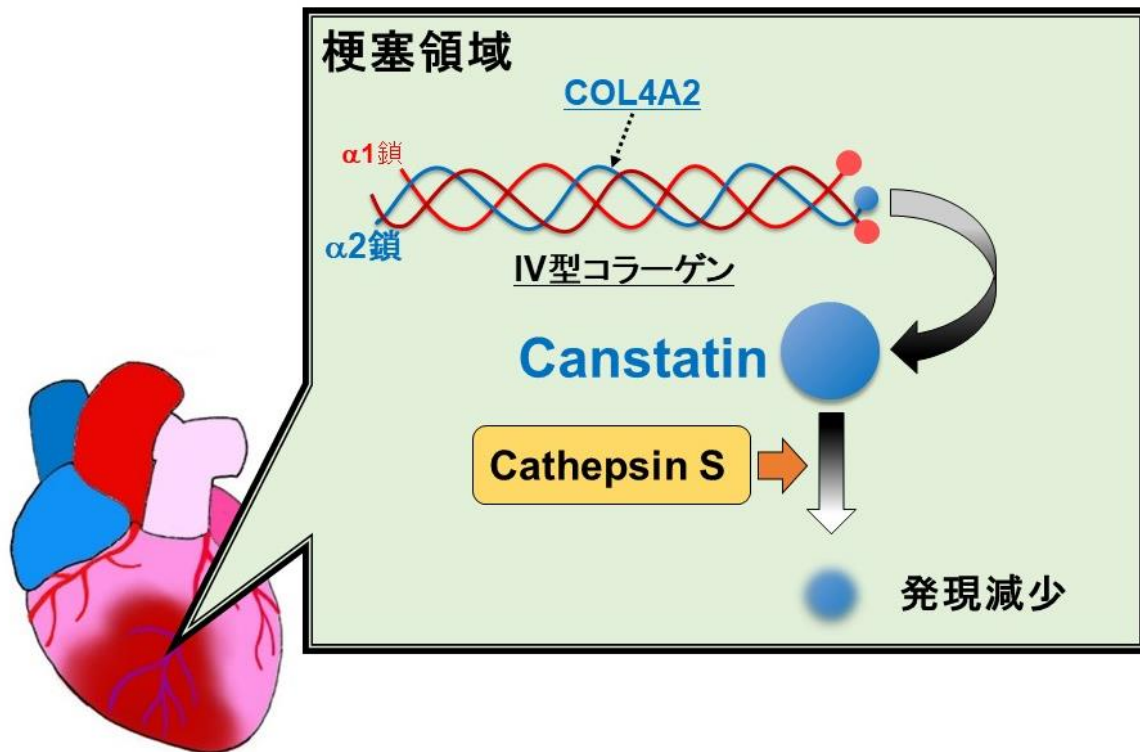


図 7.第一章のまとめ

COL4A2 分解産物である canstatin は全身臓器に発現しており、特に腎臓と心臓に高発現していた。心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において canstatin 発現は減少し、canstatin 分解酵素である cathepsin S 発現が増加した。Cathepsin S の発現抑制は梗塞領域における canstatin 発現減少を抑制した。以上のことから、心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において発現が増加した cathepsin S が canstatin を分解することが明らかになった [110]。

4. 考察

本章では、**canstatin** が健常ラットの全身臓器に広く発現しており、特に腎臓と心臓に高発現することを初めて明らかにした。また心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において **canstatin** 発現が減少し、**siRNA** 投与による **cathepsin S** 発現抑制はこれを抑制した。このことから **canstatin** が心筋梗塞後の梗塞領域において **cathepsin S** による分解により発現が減少することが示唆された (図 7)。

Canstatin は健常 Wistar ラットの全身臓器 [腎臓、左心房、左心室、肺、皮下脂肪、血管 (腹部大動脈)、骨格筋 (後肢骨格筋)、脾臓、肝臓、胃、大腸、内臓脂肪 (精巣周囲脂肪)、精巣、膀胱] に発現していた (図 2)。また他の臓器と比較して **canstatin** は心臓において高発現していた (図 2)。**COL4A2** は気管、血管、肺胞、腺組織や糸球体など様々な臓器の基底膜に発現することが知られている [27, 30, 33]。また **COL4A2** は心筋細胞周囲の基底膜の主要な構成成分であり [125, 131]、ECM の産生と分解は正常組織の恒常性維持に不可欠である [104, 120]。これらのことから、**canstatin** は健常ラット臓器の基底膜に豊富に発現する **COL4A2** が分解されることで恒常的に産生されている可能性が考えられた。

心筋梗塞モデルラットの心筋梗塞後 1 日目および 3 日目の梗塞領域において非梗塞領域と比較して **canstatin** 発現が減少した (図 3A, B)。**Canstatin** は非梗塞領域の間質と心筋の両方に発現しており、梗塞領域における発現減少は主に心筋において確認された

(図 3C)。我々はこれまでに初代培養ラット心筋細胞において *canstatin* が発現することを確認している [34]。また COL4A2 は主に間質組織に存在する [125, 131]。これらのことから、正常な状態では COL4A2 から産生された *canstatin* が心筋細胞に取り込まれ蓄積されている可能性が考えられた。COL4A2 は心筋梗塞後の梗塞領域で発現が増加することが報告されており、本章の結果はこれと一致した (図 4)。産生源となる COL4A2 発現が増加したにも関わらず *canstatin* 発現が減少したことから、梗塞領域においては *canstatin* の産生よりも分解が盛んに起こっていることが示唆された。

Cathepsin S は心線維芽細胞、心筋細胞、平滑筋細胞や内皮細胞などの様々な心血管細胞において発現するシステインプロテアーゼである [11]。 *in vitro* 実験において *cathepsin S* は *canstatin* を分解することが報告されている [123]。本章では心筋梗塞後 1 日目および 3 日目の梗塞領域において *cathepsin S* 発現が増加していることを明らかにした (図 5)。これは心筋梗塞モデルマウスの梗塞領域において *cathepsin S* 発現および活性が増加するという以前の報告 [9] と一致した。 *Cathepsin S* は梗塞領域の心筋に高発現していた (図 5C)。また siRNA 投与による *cathepsin S* 発現抑制は梗塞領域における *canstatin* 発現減少を抑制した (図 6)。以上のことから、梗塞領域の心筋細胞において発現が増加した *cathepsin S* が *canstatin* を分解することが示唆された。

結論として第一章では、 *canstatin* が心臓において高発現しており、さらに心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において *cathepsin S* による分解により *canstatin* 発現が減少することが示

唆された。このように健常ラット心臓に高発現する canstatin の発現が減少することで心筋梗塞後の病態進展に関与する可能性が考えられた。

III.第二章

心筋梗塞モデルラットにおける canstatin の保護作用

1. 緒言

冠動脈の急速な閉塞による心筋組織への血流遮断が心筋細胞死を引き起こす心筋梗塞は深刻な虚血性心疾患であり、我が国のみならず全世界において主要な死因の一つである[3, 17, 49, 58, 98]。虚血により広範囲の心筋細胞死が起こった領域、すなわち梗塞領域では急性期において炎症サイトカイン、成長因子や MMPs などが発現・活性化する[58, 102]。これらに反応した心線維芽細胞は梗塞領域へ遊走し、筋線維芽細胞へと分化する[58, 102]。筋線維芽細胞は α -smooth muscle actin (α -SMA)を高発現する活性型の線維芽細胞であり、コラーゲンをはじめとした ECM タンパク質の盛んな合成および分泌を介して梗塞領域における瘢痕形成およびその成熟に寄与する[58, 102]。この過程は心筋梗塞後の心臓の構造や機能を保持するために必須であり[4]、不十分な瘢痕形成は瘢痕菲薄化、心機能不全および心破裂の原因となる[58]。一方、非梗塞領域における心リモデリングもまた心筋梗塞後の予後を決定する因子である[98]。心筋梗塞後の慢性期において、左室拡張を伴った遠心性肥大や筋線維芽細胞の活性化による間質性線維化が非梗塞領域において認められる[98, 116]。非梗塞領域におけるこれら病的な心リモデリングは心筋細胞機能の低下や心筋組織の硬化により心機能不全を引き起こす[116]。以上のことから、梗塞領域における瘢痕の菲薄化や非梗塞領域における病的な心リモデリングの抑制は心筋梗塞後の予後改善のために重要である。しかしながら、これらを標的とした有効な治療法は未だ確立されていない。

第一章において心筋組織に高発現する **canstatin** が心筋梗塞後の梗塞領域において減少することを明らかにした。一方、これまでの *in vitro* 実験において **canstatin** が心線維芽細胞の遊走能を亢進すること [74] や H9c2 ラット心筋芽細胞において低酸素誘導性アポトーシスを抑制すること [42] が明らかとなっており、**canstatin** が心保護的に働くことが示唆されている。そこで第二章では、**recombinant canstatin** の長期投与が心筋梗塞モデルラットの梗塞領域の癒痕形成と非梗塞領域の心リモデリングに及ぼす影響を調べることにより、その心保護作用を検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 試薬

Recombinant マウス **canstatin** [(Cusabio Biotech, Wuhan, Hubei, China; 筋線維芽細胞を用いた実験で使用) または (2-2-1 において作製; **Recombinant canstatin** 投与実験および心線維芽細胞を用いた実験で使用)], **LY294002** (和光純薬)、**NS-398** (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, U.S.A.)、**prostaglandin E₂ (PGE₂)** (Sigma-Aldrich) および **transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)** (PeproTech, Rocky Hill, NJ, U.S.A.)。

2-1-2. 一次抗体

Anti-canstatin (PA1521)(Boster Biological Technology)、anti-nuclear factor of activated T-cells (NFAT)c4 (sc-13036)、anti-vinculin (sc-73614)、anti-cyclooxygenase (COX)-2 (sc-1745)(Santa Cruz Biotechnology)、anti-phospho-Akt (Ser473) (pAkt) (4060S)、anti-total Akt (tAkt) (4691S)(Cell Signaling Technology)、anti-MMP-2 (F-68)(協和ファーマケミカル、富山)、anti-MMP-9 (AB19016)(EMD Millipore, Billerica, MA, U.S.A.)、anti-total actin (A3853)、anti-vimentin (V6630)(Sigma-Aldrich)、anti-type I collagen (600-401-103-0.1)(Rockland Immunochemical, Gilbertsville, PA, U.S.A.)、anti- α -SMA (M0851)、anti-CD31 (M0823)(Dako)、anti-6 \times Histidine (6 \times His) (010-21861)および anti- β -tubulin (014-25041)(和光純薬)。

2-1-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG HRP linked whole antibody (NA934; Amersham Biosciences または 7074S; Cell Signaling Technology)、anti-mouse IgG HRP linked whole antibody (NA931; Amersham Biosciences または 7076S; Cell Signaling Technology)、anti-goat IgG HRP linked whole antibody (A5420)(Sigma-Aldrich)、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A-11029)および Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (A-11036)(Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)。

2-1-4. 使用動物

すべての動物実験は北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 19-126、18-019、17-082、16-032 および 15-158)、同大学

のガイドラインを遵守して行った。実験には 4-10 週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用し、学部内 9 号館 2 階または 5 号館 2 階の実験動物飼育室で固形飼料(CE2;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. Recombinant マウス canstatin の作製

井本らの方法に従い recombinant タンパク質の作製を行った [36]。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 3915)。マウス腎臓組織から抽出した RNA を用いて、COL4A2 遺伝子(*COL4A2*)の canstatin 領域の塩基配列を下記のプライマーを用いて reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)により増幅した。

Sequence	
Forward	5'-GCGCCATATGGTGAAGCACAGCCAAACGGA-3'
Reverse	5'-GCGCCTCGAGCAGATTCTTCATGCACACTT-3'

アガロースゲル電気泳動後、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands)を用いてアガロースゲルから抽出した cDNA 産物を *Nde I* および *Xho I* (New England Biolab, Ipswich, MA, U.S.A.)と反応させ(37 °C、1 時間)、pET-22b(+) (Novagen, Madison, WI, U.S.A.)に LigaFastTM Rapid DNA Ligation System (Promega, Madison, WI, U.S.A.)を用いてライゲーションした(室温、30 分間)(図 8A)。Canstatin 配列を挿入したプラスミドを

One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)に加え、氷上で 30 分間静置した後にヒートショック (42 °C、45 秒間)を与えることで形質転換を行った。回復用培地 (super optimal broth with catabolite repression 培地) で培養後、アンピシリン添加 Luria-Bertani (LB)寒天培地で選択培養し、選別されたコロニーから釣菌し、さらにアンピシリン添加 LB 液体培地で一晩培養した。培養した菌液から FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス、東京)を用いてプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドを DynaCompetent Cells BL21(DE3) (BioDynamics, 東京)に同様の方法で導入し、形質転換した BL21 (DE3)を選択培養した。選別された BL21 (DE3)を一晩培養した培養液を 50 倍量のアンピシリン添加 LB 液体培地に加え OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで振盪培養後、isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (Carbosynth, Compton, UK:最終濃度 1 mM)を添加し 4 時間振盪培養することで recombinant canstatin タンパク質発現を誘導した。遠心分離 (2,580×g、4 °C、20 分間)により回収した大腸菌ペレットを Tris-HCl 緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.9)に再懸濁し、超音波ホモジナイザー (UD-100; TOMY, 東京)により破碎した。遠心分離後 (16,000×g、4 °C、20 分間)、ペレットに平衡化バッファー (5 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.9)を加え、氷上で 1 時間静置することで可溶化した。可溶化したサンプルを遠心分離 (16,000×g、4 °C、30 分間)し、上清を 0.45 μm フィルターで濾過した後に His60 Ni Superflow Resin and Gravity Column (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, U.S.A.)を用いて精製した。His タグ付きの

recombinant canstatin タンパク質を His60 Ni resin に結合させるためにサンプル溶液をカラムに入れ、4 °C で 60 分間攪拌した。カラムを平衡化バッファーおよび洗浄バッファー(60 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 8 M urea, pH 7.9)で洗浄後、溶出バッファー(1 M imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris, 8 M urea, pH 7.9)で溶出した。カラムから溶出したサンプルを PlusOne Mini Dialysis Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, U.S.A.)を用いて透析バッファー(20 mM Tris, 6 M urea, pH 8.0→20 mM Tris, 4 M urea, pH 8.0→20 mM Tris, 500 mM L-arginine, 2 M urea, pH 8.0→20 mM Tris, 500 mM L-arginine, 0 M urea, pH 8.0)の順に各 2 時間、4 °C)に溶媒を置換した。最後に新しい透析バッファー(20 mM Tris, 500 mM L-arginine, pH 8.0)で一晩透析後、サンプルを遠心分離(5,800×g、30 分間)し、上清を回収した。SDS-PAGE を行い、Coomassie brilliant blue (CBB)染色および Western blotting により精製した recombinant canstatin タンパク質の純度を確認した(図 8B)。

2-2-2. Recombinant canstatin 投与実験

7-8 週齢の Wistar ラットを用いて第一章 2-2-2 の項に準じて作製した心筋梗塞モデルラットを心筋梗塞術(myocardial infarction: MI)群とした。偽手術(SHAM)群は心膜の切開までは MI 群と同様の手技で行ったが、冠動脈の結紮は行わなかった。2-2-1 で作製した recombinant canstatin (20 µg/kg)または溶媒(0.8 mM Tris, 20 mM L-arginine, 4% glycerol を含む生理食塩水)は手術実施日から 28 日間連日腹腔内投与した。最終投与の翌日に第一章 2-2-4 の項

に準じて心臓の摘出・瀉血を行った。摘出した心臓のうち梗塞領域と非梗塞領域を含む左心室組織は組織学的解析(2-2-4、2-2-5および2-2-6)に用いるために10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)中に4°Cで一晩保存した。一方、2-2-12のWestern blottingに用いるために左心室組織を瘢痕化した梗塞領域とそれ以外の非梗塞領域に切り分けた後に液体窒素で急速凍結し、使用まで-80°Cで保存した。

2-2-3.心エコー検査

井本らの方法に従い心エコー検査を行った[35]。心筋梗塞術後3、7、14、21および28日目にイソフルラン麻酔下[流速:2 L/分、濃度:5% (導入)、2.5% (維持)]でラットの胸部を剃毛し、SonoScape X5V (Sonoscape Medical Corp., Shenzhen, China)を用いて心エコー検査を行った。左心室の乳頭筋レベルの傍胸骨短軸像においてMモードで拡張期(diastolic phase)と収縮期(systolic phase)における左室内径(left ventricular internal diameter: LVID)、左室内径短縮率(fractional shortening: FS)および左室駆出率(ejection fraction: EF)を測定した。

2-2-4.ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

大谷らの方法に従いHE染色を行った[76]。2-2-2において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織から第一章2-2-6の項に準じてパラフィン包埋・薄切切片標本の作製を行った。薄切切片は脱パラフィン後、ヘマトキシリン溶液に5分間浸漬した。洗浄後、エオジン溶液に30分間浸漬した。CCDカメラ

(DP74; OLYMPUS)を接続した光学顕微鏡(BX-51; OLYMPUS)により画像を取得し、非梗塞領域における心筋細胞短径(各ラットあたり 50 細胞)を画像解析ソフト(cellSens Imaging Software version 1.17; OLYMPUS)を用いて定量した。

2-2-5.ピクロシリウスレッド染色

大谷らの方法に従いピクロシリウスレッド染色を行った[76]。2-2-2において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織から第一章2-2-6の項に準じてパラフィン包埋・薄切切片標本の作製を行った。薄切切片は脱パラフィン後、鉄ヘマトキシリン溶液に8分間浸漬した。洗浄後、ピクロシリウスレッド溶液に60分間浸漬した。CCDカメラ(DP74; OLYMPUS)を接続した光学顕微鏡(BX-51; OLYMPUS)により画像を取得した。梗塞領域における瘢痕組織厚は画像解析ソフト(cellSens Imaging Software version 1.17; OLYMPUS)を用いて定量した。間質性線維化は3視野中の非梗塞領域における線維化領域を画像解析ソフト(Image J software version 1.52a; National Institutes of Health)を用いて定量することで評価した。

2-2-6.免疫組織化学染色

2-2-2において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織から第一章2-2-6の項に準じてパラフィン包埋・薄切切片標本の作製および抗NFATc4抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。薄切切片は脱パラフィン後、Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (pH 9.0)中でマイク

ロウエーブ処理により抗原賦活化を行った。5% NGS によるブロッキング後に抗 NFATc4 抗体 (1:100 希釈) または抗 α -SMA 抗体 (1:100 希釈) を 4 °C で一晩反応させた。Tris buffered saline (TBS, pH 7.4) で洗浄後に二次抗体 (BIOTINYLATED LINK; Dako) を 60 分間室温で反応させ、さらに酵素試薬 (STREPTAVIDIN-HRP; Dako) を 30 分間室温で反応させた。洗浄後、基質溶液 (Dako) と反応させることで NFATc4 または α -SMA を検出した。CCD カメラ (DP74; OLYMPUS) を接続した光学顕微鏡 (BX-51; OLYMPUS) により画像を取得した。3 視野中の全細胞核数および NFATc4 陽性核数を計測し、NFATc4 陽性核数/全細胞核数比を算出した。筋線維芽細胞数は 3 視野中の血管を除く α -SMA 陽性細胞数を計測することで評価した。

2-2-7.筋線維芽細胞の単離・培養

7-10 週齢の Wistar ラットを用いて第一章 2-2-2 の項に準じて作製した心筋梗塞モデルラットを 14 日間飼育し、第一章 2-2-4 の項に準じて心臓の摘出・瀉血を行った。左心室組織のうち瘢痕化した部位を梗塞領域として分離した後に、クリーンベンチ内でさらに約 4-5 mm 四方の断片に切り分け、滅菌 TBS および 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco/Life technologies, Carlsbad, CA, U.S.A. または HyClone/GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 加低グルコース Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: 和光純薬) で洗浄した。梗塞領域の組織断片を 100 mm シャーレ上に静置し、10% FBS 加低グルコース DMEM を 10 ml 加えて CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37 °C) 内で 10 日間培養した。10 日後に組

織断片を除去し、組織断片周囲に遊走・増殖した細胞を 2-2-8 の免疫蛍光染色により筋線維芽細胞の形質 (α -SMA、vimentin および I 型コラーゲン発現:強陽性、CD31 発現:陰性)を示すことを確認した。継代数 2-8 までの細胞を実験に用いた。無血清の低グルコース DMEM 中で 24 時間血清飢餓状態にした細胞を recombinant canstatin (Cusabio Biotech: 10-250 ng/ml)で刺激した。

2-2-8.免疫蛍光染色

岡田らの方法に従い免疫蛍光染色を行った [74]。6 well 細胞プレートで培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液(和光純薬またはナカライテスク)中で固定した(4 °C、10 分間)。洗浄後、0.2% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)を常温で 1 分間処置し脱膜化した。洗浄後、5% NGS で 1 時間ブロッキングを行い、各一次抗体 [抗 vimentin 抗体(1:1,000 希釈)、抗 α -SMA 抗体(1:300 希釈)、抗 type I collagen 抗体(1:500 希釈)および抗 CD31 抗体(1:300 希釈)]を 4 °C で一晩反応させた。洗浄後に蛍光標識二次抗体(1:1,000 希釈)を室温・遮光下で 1 時間反応させた。洗浄後に 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (同仁化学研究所、熊本: 1:1,000 希釈)を室温・遮光下で 5 分間反応させ、CCD カメラ (DP74; OLYMPUS)を接続した蛍光顕微鏡 (BX-51; OLYMPUS)により観察し画像を取得した。

2-2-9. Cell counting assay

安田らの方法に従い cell counting assay を行った [134]。筋線維芽細胞の増殖能を cell counting kit-8 (CC8:同仁化学研究所)を用いて行った。6 well 細胞プレートに播種した筋線維芽細胞の細胞密度が 50-60%になったところで 24 時間血清飢餓状態にし、recombinant canstatin (Cusabio Biotech: 10-250 ng/ml)または溶媒で 24 時間刺激した。LY29002 (10 μ M)は canstatin 刺激の 30 分前に処置した。細胞を TBS で洗浄した後に CC8 試薬を加え、37 °C、5% CO₂ 下で 1 時間静置した。0.1 N HCl を添加し反応を停止させた後にマイクロプレートリーダー (Tristar; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)を用いて培地の吸光度 (485 nm)を測定した。

2-2-10. コラーゲンゲル収縮アッセイ

岩永らの方法に従いコラーゲンゲル収縮アッセイを行った [39]。24 well 細胞プレートに 0.3% I 型コラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-A)、10 倍濃度 MEM ハンクス培地 (新田ゼラチン株式会社、大阪)および再構成用緩衝液 (0.05 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に重炭酸ナトリウム 2.2 g、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) 4.77 g を溶かし濾過滅菌したもの)を 8:1:1 の割合で混合した後 (0.8 ml/well)、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37 °C)内で 30 分間静置し、コラーゲンゲルを作製した。無血清の低グルコース DMEM 中で 24 時間血清飢餓状態にした筋線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種し (2.0 \times 10⁵ 個/well)、CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞定着後、recombinant canstatin (Cusabio Biotech: 250 ng/ml)で 24 時間刺激

した。滅菌したスパーテルを用いてコラーゲンゲルを細胞プレートから遊離させ、さらに 24 時間培養した。コラーゲンゲルの写真をデジタルカメラ (PowerShot SX600HS; キヤノン、東京) で撮影し、画像解析ソフト (Image J software version 1.52a; National Institutes of Health) を用いてゲルの表面積を測定し、コラーゲンゲル収縮率を算出した: $100 \times (\text{well の底面積} - \text{ゲルの面積}) / \text{well の底面積} (\%)$ 。

2-2-11. 心線維芽細胞の単離

岡田らの方法に従い心線維芽細胞を単離した [74]。ペントバルビタール (ナカライテスク: 100 mg/kg) の腹腔内投与による深麻酔下で 4-5 週齢の Wistar ラットの心臓を摘出した。摘出した心臓はランゲンドルフ灌流装置を用いて 0.02% コラゲナーゼ (和光純薬) 溶液を灌流させた (37 °C、20 分間)。灌流後に心室を細切し、無血清の低グルコース DMEM 中で拡散させた。遠心分離後 (1,800 rpm、4 °C、5 分間)、回収した細胞を 10% FBS 加低グルコース DMEM 中で分散させ、2%ゼラチン溶液でコーティングした培養プレートに播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37 °C) で 90 分間培養後に浮遊した細胞を除去し、定着した細胞を 2-2-8 の免疫蛍光染色により心線維芽細胞の形質 (vimentin および I 型コラーゲン発現: 強陽性、 α -SMA 発現: 陰性~弱陽性、CD31 発現: 陰性) を示すことを確認した。継代数 1-2 までの細胞を実験に用いた。細胞は無血清の低グルコース DMEM 中で 24 時間血清飢餓状態にした後、TGF- β 1 (10 ng/ml) で 48 時間刺激することで筋線維

芽細胞へ分化誘導した。2-2-1 で作製した recombinant canstatin を TGF- β 1 刺激の 30 分前に処置した。

2-2-12. Western blotting

Western blotting は第一章 2-2-5 の項に準じて行った。2-2-2 で採材し、-80 °C で保存した組織サンプルはプロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク) を添加した細胞溶解液 (RIPA lysis buffer: 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% TritonX-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) を 10 分間処置し可溶化した。2-2-7 または 2-2-11 において刺激した筋線維芽細胞または心線維芽細胞を滅菌 TBS で洗浄した後、プロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク) を添加した細胞溶解液 (Cell Lysis Buffer; Cell Signaling Technology) を 10 分間処置し可溶化した。可溶化したサンプルを 10 分間遠心分離 (13,000 rpm、4 °C) し、タンパク質抽出液を得た。等量のタンパク質抽出液 (左心室組織: 20 μ g、細胞: 1 または 10 μ g) を SDS-PAGE (7.5 または 10%) で分離後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。転写メンブレンを 0.5% スキムミルクまたは 3% bovine serum albumin (BSA) でブロッキングした後に、各一次抗体 [抗 canstatin 抗体、抗 type I collagen 抗体、抗 pAkt 抗体、抗 tAkt 抗体、抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 COX-2 抗体 (各 1:500 希釈)、抗 6 \times His 抗体、抗 vinculin 抗体、抗 total actin 抗体、抗 α -SMA 抗体、抗 β -tubulin 抗体 (各 1:1,000 希釈)] を一晩反応させた。HRP 標識二次抗体 (1:10,000 希釈) と 45 分間反応させた後に EZ-ECL system (Biological Industries) を用いて可視化した。

2-3.統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価は2群間の比較には Student の *t* 検定を行った(図 11B、図 18A, B)。3群間の比較には一元配置分散分析後に Tukey の post-hoc 検定(図 16C、図 18D、図 19A, B)を行い、4群間の比較には二元配置分散分析(図 10B-E、図 12B、図 13B、図 14B, C、図 15B)後に Tukey の post-hoc 検定を行った。6群間の比較には一元配置分散分析後に Dunnett の post-hoc 検定を行った(図 16A, B、図 17A, B、図 18C)。生存曲線の比較は log-rank 検定(図 9)で行った。危険率 5%以下($P<0.05$)を有意差ありと判定した。

3.結果

3-1. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの生存率を改善する

全ての SHAM 群(SHAM+vehicle 群および SHAM+canstatin 群)ラットは 28 日間生存した [SHAM+vehicle: 100% (6/6, n=6), SHAM+canstatin: 100% (6/6, n=6)]。心筋梗塞モデルラットでは SHAM+vehicle 群と比較して生存率が有意に低下した [MI+vehicle: 47.1% (8/17, n=8-17) vs. SHAM+vehicle, $P<0.05$]。Canstatin は統計学的な有意差はないものの心筋梗塞後の生存率の低下を改善した [MI+canstatin: 72.7% (8/11, n=8-11)](図 9)。

3-2. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの左室拡張および機能不全を抑制する

心エコー検査により、心筋梗塞術後 3、7、14、21 および 28 日目における左室内径および心機能に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 10; SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle: n=8-17, MI+canstatin: n=8-11)。心筋梗塞モデルラットでは SHAM+vehicle 群と比較して左室内径の拡張や機能不全が認められ、canstatin がそれらを抑制する像が観察された(図 10A)。各心エコーパラメータを計測したところ、心筋梗塞モデルラットでは SHAM+vehicle 群と比較して LVIDd (MI+vehicle: 3 日目; 0.73 ± 0.03 cm, 7 日目; 0.79 ± 0.04 cm, 14 日目; 0.83 ± 0.02 cm, 21 日目; 0.85 ± 0.04 cm, 28 日目; 0.86 ± 0.03 cm vs. SHAM+vehicle: 3 日目; 0.59 ± 0.02 cm, 7 日目; 0.63 ± 0.01 cm, 14 日目; 0.58 ± 0.02 cm, 21 日目; 0.71 ± 0.03 cm, 28 日目; 0.73 ± 0.02 cm, $P < 0.01$)(図 10B)および LVIDs (MI+vehicle: 3 日目; 0.46 ± 0.04 cm, 7 日目; 0.51 ± 0.05 cm, 14 日目; 0.54 ± 0.02 cm, 21 日目; 0.56 ± 0.04 cm, 28 日目; 0.60 ± 0.03 cm vs. SHAM+vehicle: 3 日目; 0.26 ± 0.01 cm, 7 日目; 0.26 ± 0.01 cm, 14 日目; 0.25 ± 0.02 cm, 21 日目; 0.30 ± 0.02 cm, 28 日目; 0.28 ± 0.02 cm, $P < 0.01$)(図 10C)が有意に増加した。Canstatin は LVIDd の増加を抑制する傾向を示し(MI+canstatin: 3 日目; 0.66 ± 0.04 cm, 7 日目; 0.70 ± 0.04 cm, 14 日目; 0.78 ± 0.05 cm, 21 日目; 0.78 ± 0.04 cm, 28 日目; 0.80 ± 0.03 cm)(図 10B)、LVIDs の増加を有意に抑制した(MI+canstatin: 3 日目; 0.35 ± 0.04 cm, 7 日目; 0.37 ± 0.06 cm, 14 日目; 0.44 ± 0.06 cm, 21 日目; 0.46 ± 0.03 cm, 28 日目; 0.50 ± 0.04 cm, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle)(図 10C)。心筋梗塞モデ

ルラットでは SHAM+vehicle 群と比較して FS (MI+vehicle: 3 日目; $37.6 \pm 4.2\%$, 7 日目; $36.1 \pm 4.3\%$, 14 日目; $35.5 \pm 1.3\%$, 21 日目; $33.7 \pm 2.7\%$, 28 日目; $30.3 \pm 1.7\%$, vs. SHAM+vehicle: 3 日目; $56.3 \pm 1.8\%$, 7 日目; $59.2 \pm 1.8\%$, 14 日目; $57.0 \pm 4.0\%$, 21 日目; $58.0 \pm 2.2\%$, 28 日目; $62.2 \pm 2.8\%$, $P < 0.01$)(図 10D)および EF (MI+vehicle; 3 日目: $71.2 \pm 4.7\%$, 7 日目: $69.2 \pm 4.4\%$, 14 日目: $70.3 \pm 1.7\%$, 21 日目: $67.1 \pm 3.8\%$, 28 日目: $62.8 \pm 2.7\%$ vs. SHAM+vehicle; 3 日目: $90.4 \pm 1.1\%$, 7 日目: $92.1 \pm 0.9\%$, 14 日目: $90.0 \pm 3.1\%$, 21 日目: $91.2 \pm 1.1\%$, 28 日目: $93.2 \pm 1.4\%$, $P < 0.01$)(図 10E)が有意に低下した。Canstatin はこれらの低下を有意に抑制した (FS; MI+canstatin: 3 日目; $46.9 \pm 5.4\%$, 7 日目; $48.9 \pm 5.9\%$, 14 日目; $45.4 \pm 4.3\%$, 21 日目; $41.2 \pm 1.9\%$, 28 日目; $38.1 \pm 2.8\%$, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle, EF; MI+canstatin: 3 日目; $80.1 \pm 5.1\%$, 7 日目; $81.5 \pm 4.4\%$, 14 日目; $79.6 \pm 4.3\%$, 21 日目; $77.0 \pm 2.1\%$, 28 日目; $72.8 \pm 3.6\%$, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle)(図 10D, 10E)。SHAM 群への canstatin 単独投与は心エコーパラメータには影響を及ぼさなかった (SHAM+canstatin: LVIDd; 3 日目; 0.62 ± 0.03 cm, 7 日目; 0.66 ± 0.01 cm, 14 日目; 0.67 ± 0.03 cm, 21 日目; 0.69 ± 0.03 cm, 28 日目; 0.72 ± 0.03 cm, LVIDs; 3 日目; 0.26 ± 0.02 cm, 7 日目; 0.27 ± 0.02 cm, 14 日目; 0.27 ± 0.02 cm, 21 日目; 0.28 ± 0.02 cm 28 日目; 0.27 ± 0.02 cm, FS; 3 日目; $58.7 \pm 1.7\%$, 7 日目; $59.1 \pm 2.4\%$, 14 日目; $59.4 \pm 2.4\%$, 21 日目; $59.1 \pm 2.1\%$, 28 日目; $63.4 \pm 2.0\%$, EF; 3 日目; $91.8 \pm 1.0\%$, 7 日目; $91.8 \pm 1.4\%$, 14 日目; $92.0 \pm 1.3\%$, 21 日目; $91.8 \pm 1.2\%$, 28 日目; $94.0 \pm 0.9\%$)(図 10B-E)。

3-3. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの癒痕菲薄化を抑制する

癒痕組織の菲薄化は心筋梗塞後の心破裂のリスク因子である [58, 119]。そこで、心筋梗塞後の梗塞領域における癒痕形成に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 11; n=8)。MI+vehicle 群と MI+canstatin 群においてピクロシリウスレッド染色により赤染された癒痕形成が確認された(図 11A)。癒痕組織厚を測定したところ、canstatin は心筋梗塞後の癒痕菲薄化を有意に抑制した (MI+canstatin: $790.5 \pm 115.1 \mu\text{m}$, $P < 0.05$ vs. MI+vehicle: $469.1 \pm 27.2 \mu\text{m}$)(図 11B)。

3-4. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における心筋細胞肥大を抑制する

心筋梗塞後の慢性期では非梗塞領域の心筋細胞肥大が起こり左室拡張や収縮機能不全の原因となる [98]。そこで、心筋梗塞後の非梗塞領域における心筋細胞肥大に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 12; SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における心筋細胞短径は SHAM+vehicle 群と比較して有意に増加し (MI+vehicle: $23.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs. SHAM+vehicle: $18.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)(図 12A, B)、canstatin はこれを有意に抑制した (MI+canstatin: $17.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle)(図 12A, B)。Canstatin 単独投与は非梗塞領域の心筋細胞短径に影響を及ぼさなかった (SHAM+canstatin: $17.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$)(図 12A, B)。

3-5. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における NFATc4 核内移行を抑制する

NFATc4 は calcineurin によって脱リン酸化されて核内移行し、心肥大で誘導される胎児型遺伝子(心肥大関連遺伝子)の転写を活性化する転写因子である [18, 107]。そこで、心筋梗塞後の非梗塞領域における NFATc4 核内移行に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 13; SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域において SHAM+vehicle 群と比較して NFATc4 核内移行が有意に増加し(MI+vehicle: $371.8 \pm 51.1\%$ vs. SHAM+vehicle, $P < 0.01$)(図 13A, B)、canstatin はこれを有意に抑制した(MI+canstatin: $215.2 \pm 30.5\%$, $P < 0.05$ vs. MI+vehicle)(図 13A, B)。Canstatin 単独投与は非梗塞領域における NFATc4 核内移行に影響を及ぼさなかった(SHAM+canstatin: $104.3 \pm 4.2\%$)(図 13A, B)。

3-6. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における間質性線維化を抑制する

心筋梗塞後の慢性期における非梗塞領域の間質性線維化は心筋の硬さ(stiffness)を増加させることで心機能不全を引き起こす [116]。そこで、心筋梗塞後の非梗塞領域における間質性線維化に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 14; SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域において SHAM+vehicle 群と比較して間質性線維化領域は有意に増加し(MI+vehicle: $10.6 \pm 1.6\%$ vs. SHAM+vehicle: $2.9 \pm 0.3\%$, $P < 0.01$)(図 14A, B)、

canstatin はこれを有意に抑制した (MI+canstatin: $4.6 \pm 0.7\%$, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle)(図 14A, B)。さらに非梗塞領域における I 型コラーゲン発現増加も canstatin は有意に抑制した (MI+vehicle: $348.7 \pm 74.3\%$ vs. SHAM+vehicle, $P < 0.05$; MI+canstatin: $137.2 \pm 24.4\%$, $P < 0.05$ vs. MI+vehicle)(図 14C)。Canstatin 単独投与は非梗塞領域の間質性線維化領域 (SHAM+canstatin: $3.1 \pm 0.6\%$)(図 14A, B)および I 型コラーゲン発現 (SHAM+canstatin: $104.3 \pm 13.2\%$)(図 14C)に影響を及ぼさなかった。

3-7. Canstatin は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における筋線維芽細胞数増加を抑制する

心筋梗塞後の非梗塞領域において心線維芽細胞は α -SMA や I 型コラーゲンを高発現する筋線維芽細胞へ分化し、間質性線維化を促進する [116]。そこで、心筋梗塞後の非梗塞領域における筋線維芽細胞数増加に及ぼす canstatin の影響を検討した (図 15; SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: $n=6$, MI+vehicle および MI+canstatin: $n=8$)。心筋梗塞後の非梗塞領域において α -SMA 陽性細胞すなわち筋線維芽細胞数が有意に増加し (MI+vehicle: $312.4 \pm 52.9\%$ vs. SHAM+vehicle, $P < 0.01$)(図 15A, B)、canstatin はこれを有意に抑制した (MI+canstatin: $112.7 \pm 21.0\%$, $P < 0.01$ vs. MI+vehicle)(図 15A, B)。Canstatin 単独投与は非梗塞領域の筋線維芽細胞数に影響を及ぼさなかった (SHAM+canstatin: $115.4 \pm 28.9\%$)(図 15A, B)。

3-8. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖能を亢進する

梗塞領域における癒痕菲薄化を canstatin が抑制するメカニズムを解明するために心筋梗塞モデルラットの梗塞領域から単離・培養した筋線維芽細胞の機能に及ぼす canstatin の影響を検討した。まず筋線維芽細胞の増殖能に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 16)。Canstatin (50-250 ng/ml、24 時間)は筋線維芽細胞増殖を有意に亢進した(50 ng/ml: $130.7 \pm 5.4\%$, 100 ng/ml: $128.2 \pm 6.2\%$, 250 ng/ml: $129.4 \pm 4.6\%$ vs. Cont, $P < 0.01$) (図 16A; n=6)。Canstatin (50 ng/ml、30 分間)は Akt のリン酸化を有意に亢進した($226.9 \pm 45.8\%$ vs. Cont, $P < 0.01$)(図 16B; n=8)。Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt 経路阻害薬 LY294002 (10 μ M、30 分前処置)は canstatin 誘導性(50 ng/ml、24 時間)筋線維芽細胞増殖を有意に抑制した(canstatin: $115.1 \pm 4.1\%$ vs. Cont, $P < 0.05$; canstatin+LY29002: $93.7 \pm 5.8\%$, $P < 0.01$ vs. canstatin)(図 16C, n=7)。

3-9. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の MMPs 分泌能を亢進する

筋線維芽細胞が分泌する MMP-2 や MMP-9 は線維産生亢進に関わることが知られている[58, 85]。そこで筋線維芽細胞の MMPs 分泌能に及ぼす canstatin (10-250 ng/ml)の影響を検討した(図 17)。Canstatin (250 ng/ml、48 時間)は筋線維芽細胞の MMP-2 ($267.7 \pm 64.1\%$ vs. Cont, $P < 0.01$)(図 17A; n=4)および MMP-9 分泌 ($701.9 \pm 131.6\%$ vs. Cont, $P < 0.01$)(図 17B; n=4)を有意に亢進した

3-10. Canstatin は梗塞領域由来筋線維芽細胞の収縮能を抑制する

筋線維芽細胞の収縮は心筋梗塞後の癒痕組織の安定化に関わる [68]。そこで筋線維芽細胞の収縮能に及ぼす canstatin (250 ng/ml)の影響をコラーゲンゲル収縮法により検討した(図 18)。Canstatin (250 ng/ml、48 時間)は筋線維芽細胞の収縮を有意に抑制した (canstatin: $36.6 \pm 5.1\%$ vs. Cont: $53.8 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$)(図 18A; n=6)。PGE₂は筋線維芽細胞の収縮を抑制する [79]。PGE₂ (10 μM、48 時間)は筋線維芽細胞の収縮を有意に抑制した (PGE₂: $8.4 \pm 2.8\%$ vs. Cont: $26.4 \pm 5.5\%$, $P < 0.01$)(図 18B; n=7)。また、canstatinはPGE₂産生を誘導するCOX-2 [80]発現を有意に増加させた (605.8 ± 136.4 vs. Cont, $P < 0.01$)(図 18C; n=7)。さらにCOX-2阻害薬であるNS-398 (1 μM、30 分前処置)はcanstatin (250 ng/ml、48 時間)による筋線維芽細胞の収縮抑制作用を解除した (canstatin: $76.4 \pm 3.2\%$ vs. Cont, $P < 0.05$; canstatin+NS-398: $105.5 \pm 9.5\%$, $P < 0.05$ vs. canstatin)(図 18D; n=5)。

3-11. Canstatinは心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導を抑制する

非梗塞領域における間質性線維化や筋線維芽細胞数増加をcanstatinが抑制するメカニズムを明らかにするために、TGF-β1刺激による心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導に及ぼすcanstatinの影響を検討した(図 19)。TGF-β1 (10 ng/ml、48 時間)は心線維芽細胞のα-SMAおよびI型コラーゲン発現を有意に増加させ (α-SMA: $145.6 \pm 8.4\%$ vs. Cont, $P < 0.01$, I型コラーゲン: $194.0 \pm 29.1\%$, $P < 0.05$ vs. Cont)、canstatinはこれらを有意に抑制

した (α -SMA: $112.1 \pm 9.3\%$, $P < 0.01$ vs. TGF- β 1, I型コラーゲン:
 $104.5 \pm 26.7\%$, $P < 0.05$ vs. TGF- β 1)(図 19; A: $n=7$, B: $n=5$)。

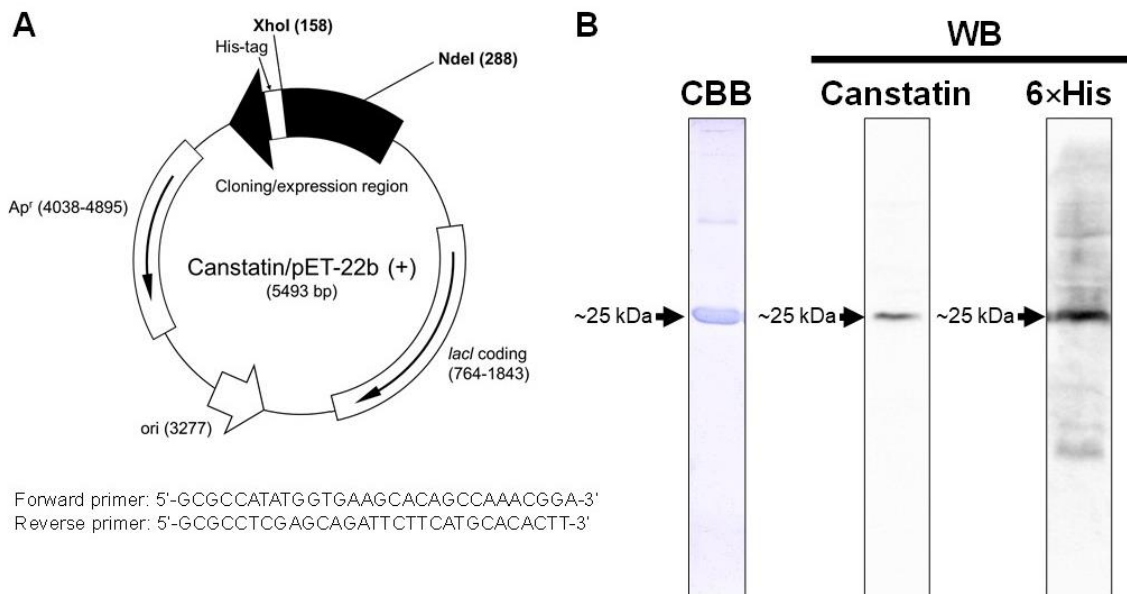


図 8. Recombinant マウス canstatin タンパク質の作製

(A) COL4A2 遺伝子 (*COL4A2*) の canstatin 領域の cDNA を (A) 下部に示すプライマーを用いて reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) により増幅した。Nde I および Xho I と反応させた cDNA を、図に示す pET-22b (+) プラスミドにライゲーションした。Canstatin cDNA を挿入したプラスミドを BL21 (DE3) に導入し形質転換することで recombinant canstatin タンパク質を過剰発現させた。Apr: antimicrobial resistance, ori: replication origin, lacI: lac repressor. His-tag: 6xHistidine (6×His). (B) Recombinant canstatin タンパク質を精製後、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis により分離し、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色または Western blotting (WB) を行った。(左) 典型的な CBB 染色像を示した。(中央および右) 典型的な canstatin および 6×His のプロット像を示した。予測され

る canstatin の分子量付近 (~25 kDa) に特異的なバンドが検出されることを確認した。

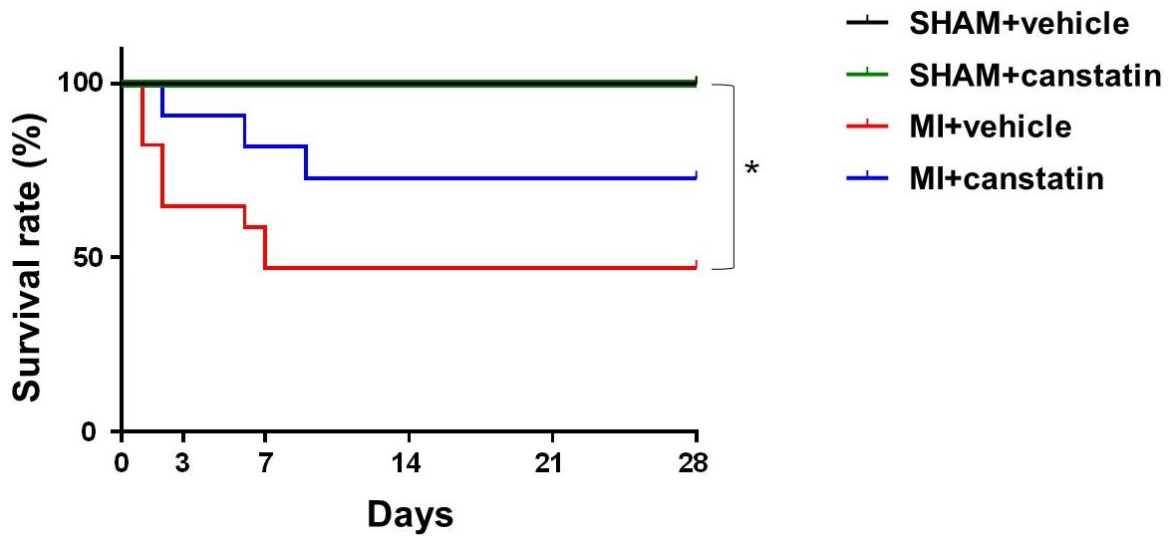


図 9. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後のラットの生存率に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (myocardial infarction: MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。SHAM+vehicle 群 (黒色; $n=6$)、SHAM+canstatin 群 (緑色; $n=6$)、MI+vehicle 群 (赤色; $n=8-17$) および MI+canstatin 群 (青色; $n=8-11$) の Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。* $P<0.05$ vs. SHAM+vehicle.

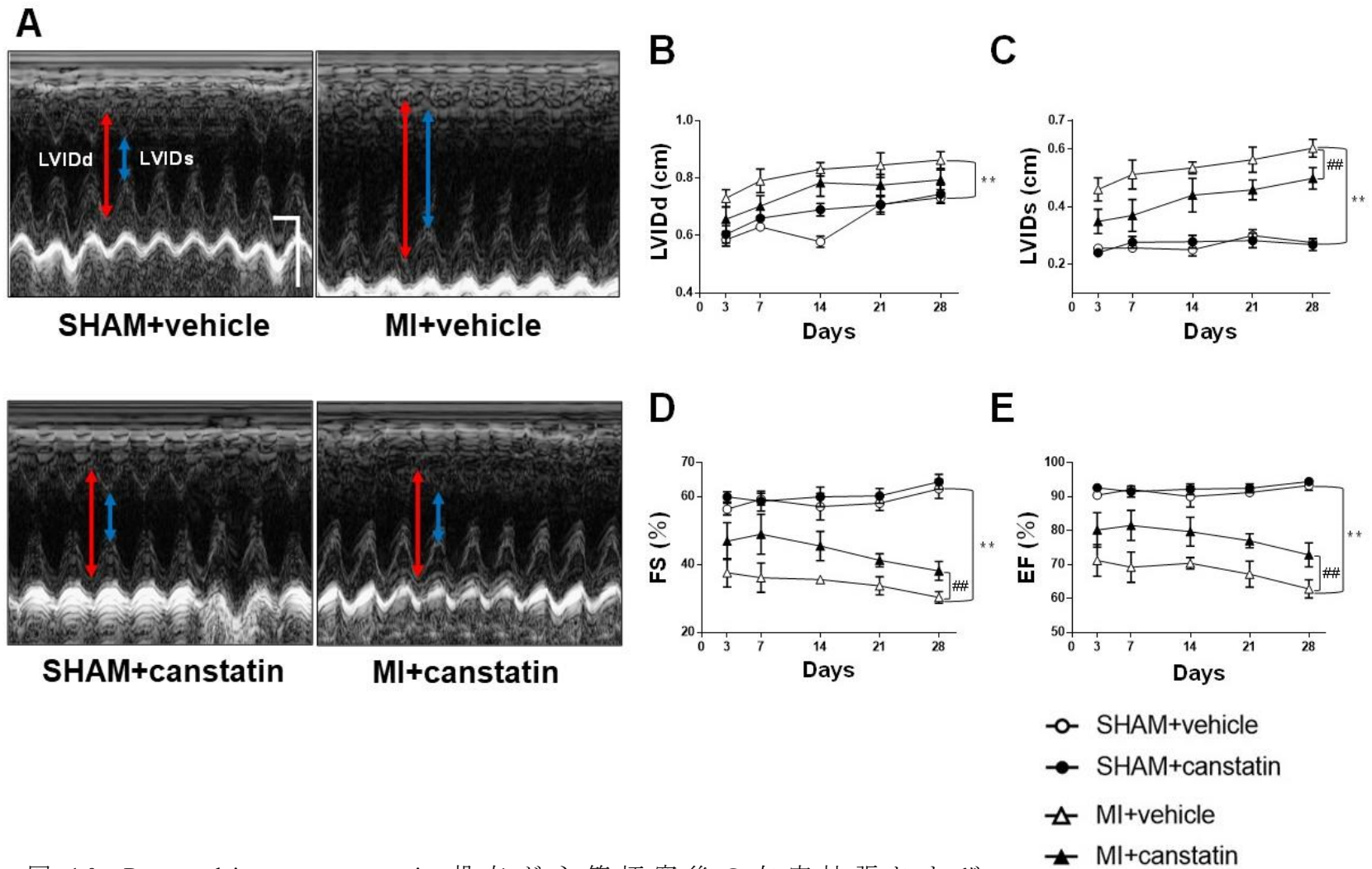


図 10. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の左室拡張および機能不全に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術(MI)または偽手術(SHAM)を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒(vehicle)を 28 日間連日腹腔内投与した。心エコー検査により心筋梗塞後の左室拡張および心機能を検討した。(A)典型的な左心室の乳頭筋レベルの傍胸骨短軸像における M モード画像を示した。Scale bar: 100 ms (横軸)、5 mm (縦軸)。(B, C, D, E)心筋梗塞術後 3、7、14、21 および 28 日目における左室拡張末期径(B; left ventricular internal dimension at end-diastole: LVIDd)、左室収縮末期径(C; left ventricular internal dimension at end-systole: LVIDs)、左室内径短縮率(D; fractional shortening: FS)および左室駆出率(E; ejection fraction: EF)を平均値 \pm 標準誤差で示した(SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle: n=8-17, MI+canstatin: n=8-11)。** P <0.01 vs. SHAM+vehicle, ## P <0.01 vs. MI+vehicle.

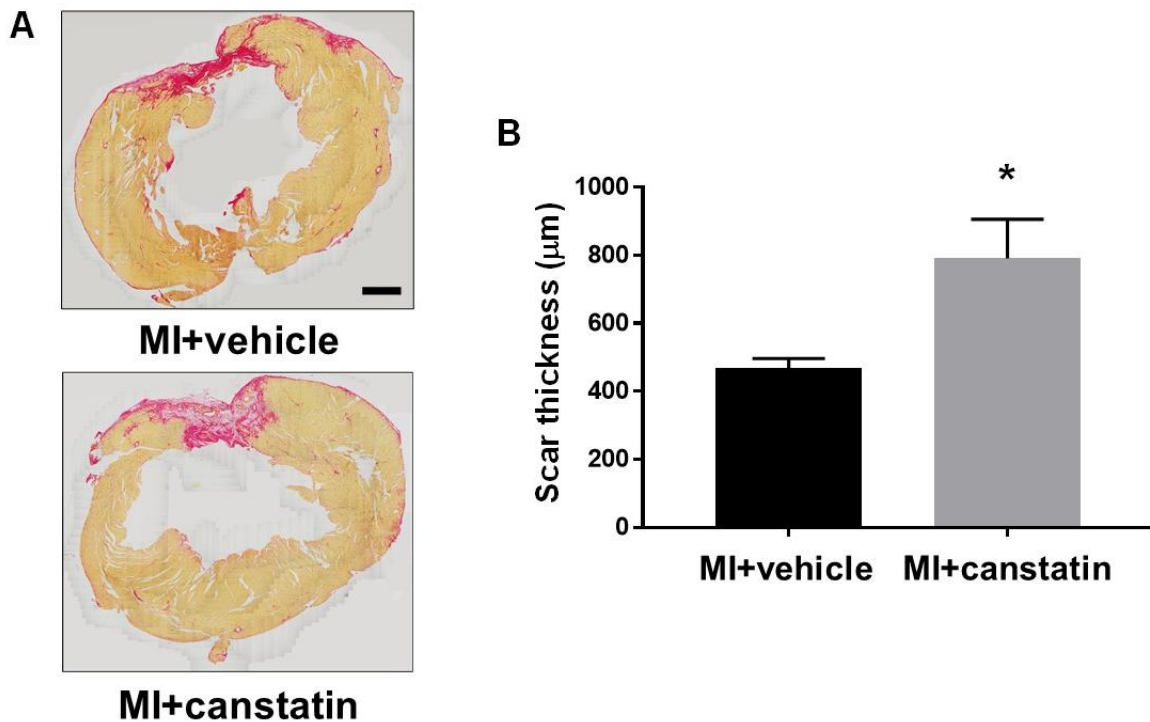


図 11. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の癒痕形成に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 µg/kg) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。心筋梗塞術後 28 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、ピクロシリウスレッド染色を行った。(A) MI+vehicle 群および MI+canstatin 群における典型的な左心室組織のピクロシリウスレッド染色像 (赤色: コラーゲン線維、黄色: 筋線維) を示した。Scale bar: 1 mm. (B) 癒痕組織厚を定量し、平均値 ± 標準誤差で示した (n=8)。* $P < 0.05$ vs. MI+vehicle.

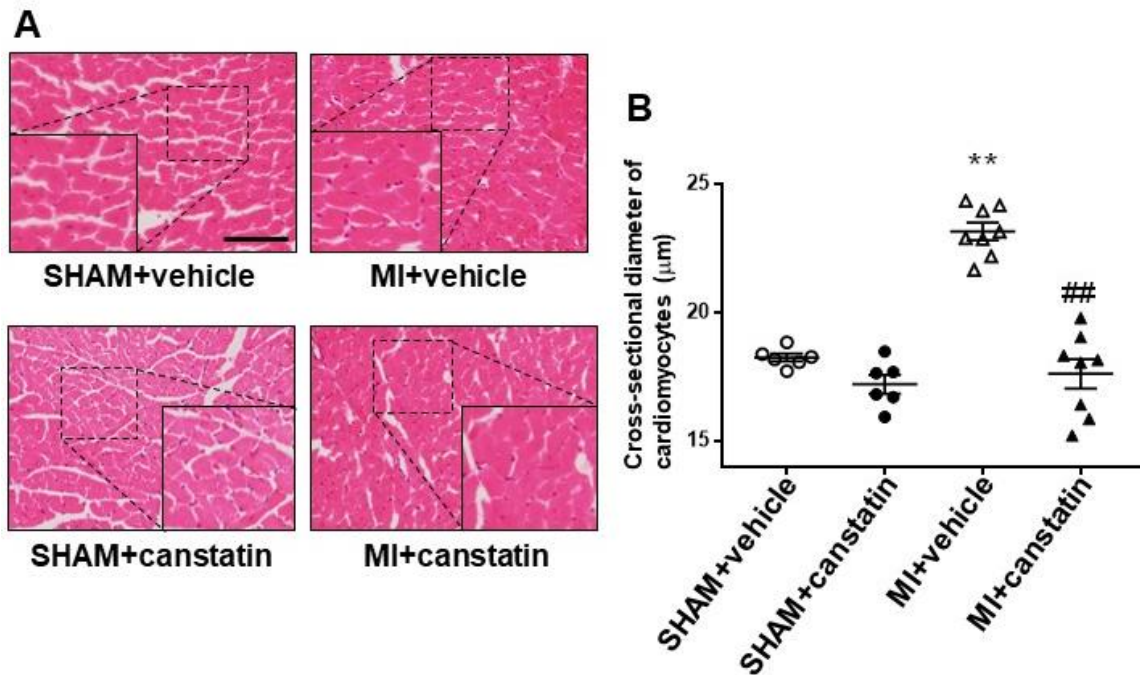


図 12. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の非梗塞領域における心筋細胞肥大に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μg/kg) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 28 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。(A) SHAM+vehicle 群、SHAM+canstatin 群、MI+vehicle 群および MI+canstatin 群における典型的な非梗塞領域の HE 染色像を示した。Scale bar: 100 μm. (B) 心筋細胞短径を計測し、平均値 ± 標準誤差で示した (SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6、MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。

** $P < 0.01$ vs. SHAM+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MI+vehicle.

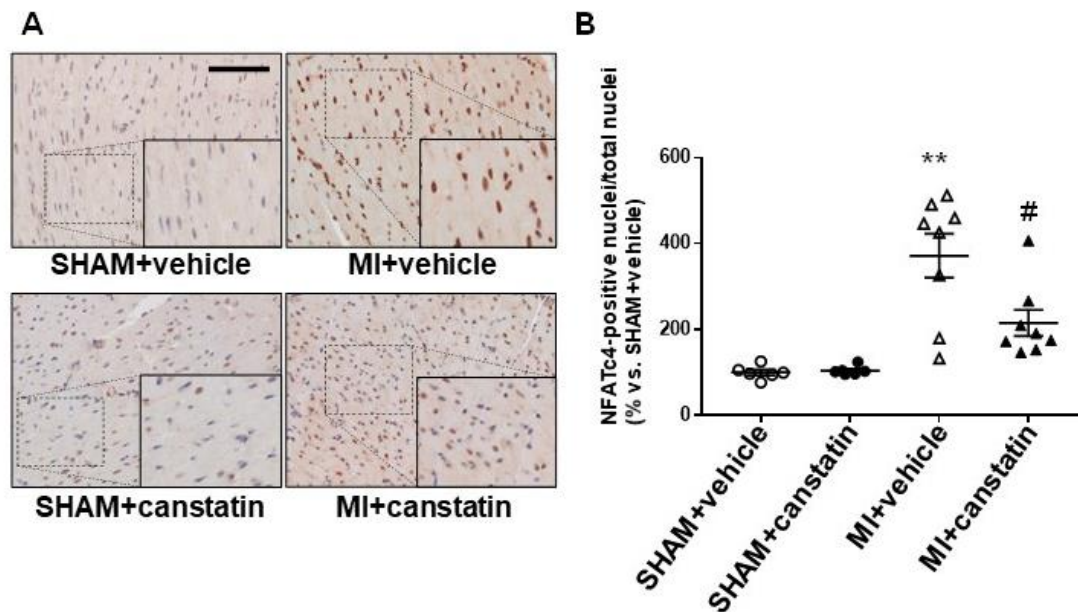


図 13. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の非梗塞領域における nuclear factor of activated T-cells (NFAT)c4 核内移行に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 28 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、抗 NFATc4 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) SHAM+vehicle 群、SHAM+canstatin 群、MI+vehicle 群および MI+canstatin 群における非梗塞領域の典型的な抗 NFATc4 抗体陽性像 (茶褐色) を示した。Scale bar: 100 μm 。(B) NFATc4 陽性核数 / 全細胞核数比を計測し、SHAM+vehicle 群を 100% として平均値 \pm 標準誤差で示した (SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: $n=6$ 、MI+vehicle および MI+canstatin: $n=8$)。

** $P < 0.01$ vs. SHAM+vehicle, # $P < 0.05$ vs. MI+vehicle.

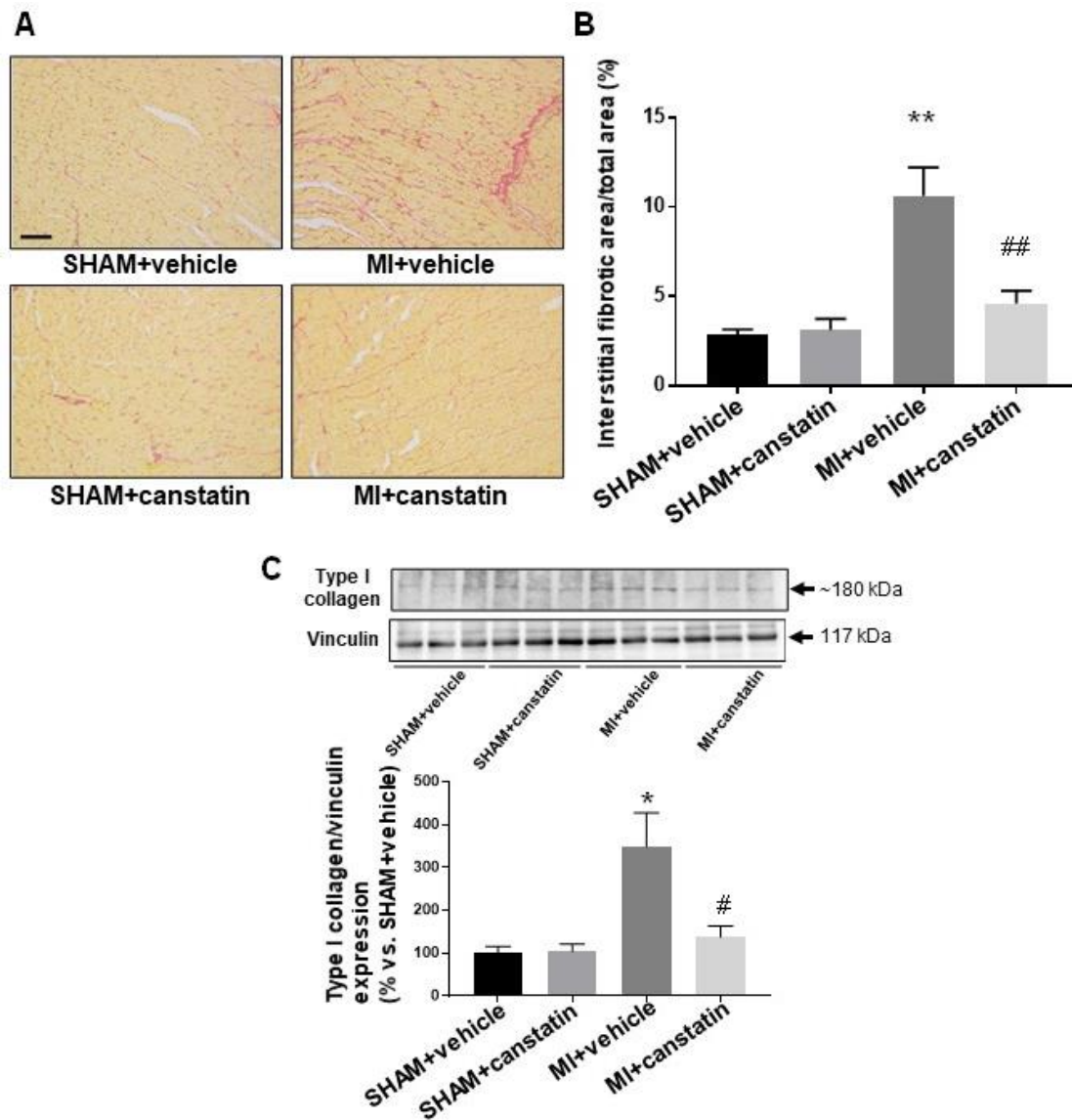


図 14. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の非梗塞領域における間質性線維化に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。(A, B) Canstatin 投与後 28 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製

し、ピクロシリウスレッド染色を行った。(A) SHAM+vehicle 群、SHAM+canstatin 群、MI+vehicle 群および MI+canstatin 群における典型的な非梗塞領域のピクロシリウスレッド染色像(赤色: コラーゲン線維、黄色:筋線維)を示した。Scale bar: 100 μ m. (B) 間質性線維化領域を定量し、全領域に対する割合を平均値 \pm 標準誤差で示した(SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。** $P<0.01$ vs. SHAM+vehicle, ## $P<0.01$ vs. MI+vehicle. (C) Canstatin 投与後 28 日目の非梗塞領域からタンパク質を抽出し、Western blotting により I 型コラーゲン(type I collagen)タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な I 型コラーゲン(~180 kDa)および vinculin (117 kDa)のプロット像を示した。(下図) I 型コラーゲン発現を vinculin 発現で補正し、SHAM+vehicle 群を 100%として平均値 \pm 標準誤差で示した(SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: n=6, MI+vehicle および MI+canstatin: n=8)。
* $P<0.05$ vs. SHAM+vehicle, # $P<0.05$ vs. MI+vehicle.

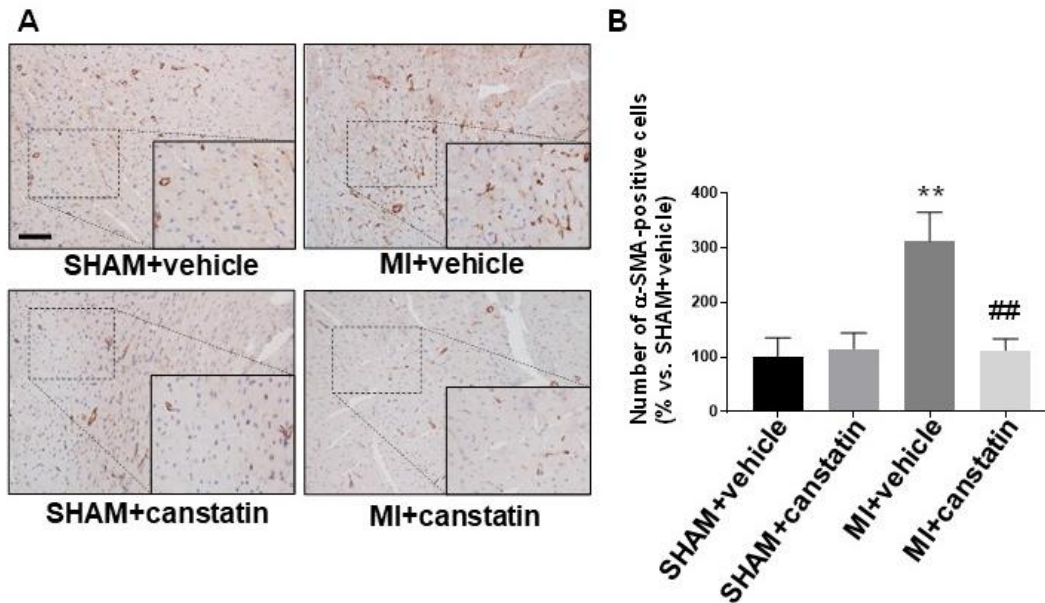


図 15. Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の非梗塞領域における筋線維芽細胞数に及ぼす影響

左冠動脈前下行枝の結紮による心筋梗塞術 (MI) または偽手術 (SHAM) を施したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または溶媒 (vehicle) を 28 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 28 日目の左心室横断面の組織切片標本を作製し、抗 α -smooth muscle actin (α -SMA) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) SHAM+vehicle 群、SHAM+canstatin 群、MI+vehicle 群および MI+canstatin 群における非梗塞領域の典型的な抗 α -SMA 抗体陽性像 (茶褐色) を示した。Scale bar: 100 μm 。(B) 抗 α -SMA 抗体陽性領域を定量し、SHAM+vehicle 群を 100% として平均値 \pm 標準誤差で示した (SHAM+vehicle および SHAM+canstatin: $n=6$, MI+vehicle および MI+canstatin: $n=8$)。 ** $P < 0.01$ vs. SHAM+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MI+vehicle.

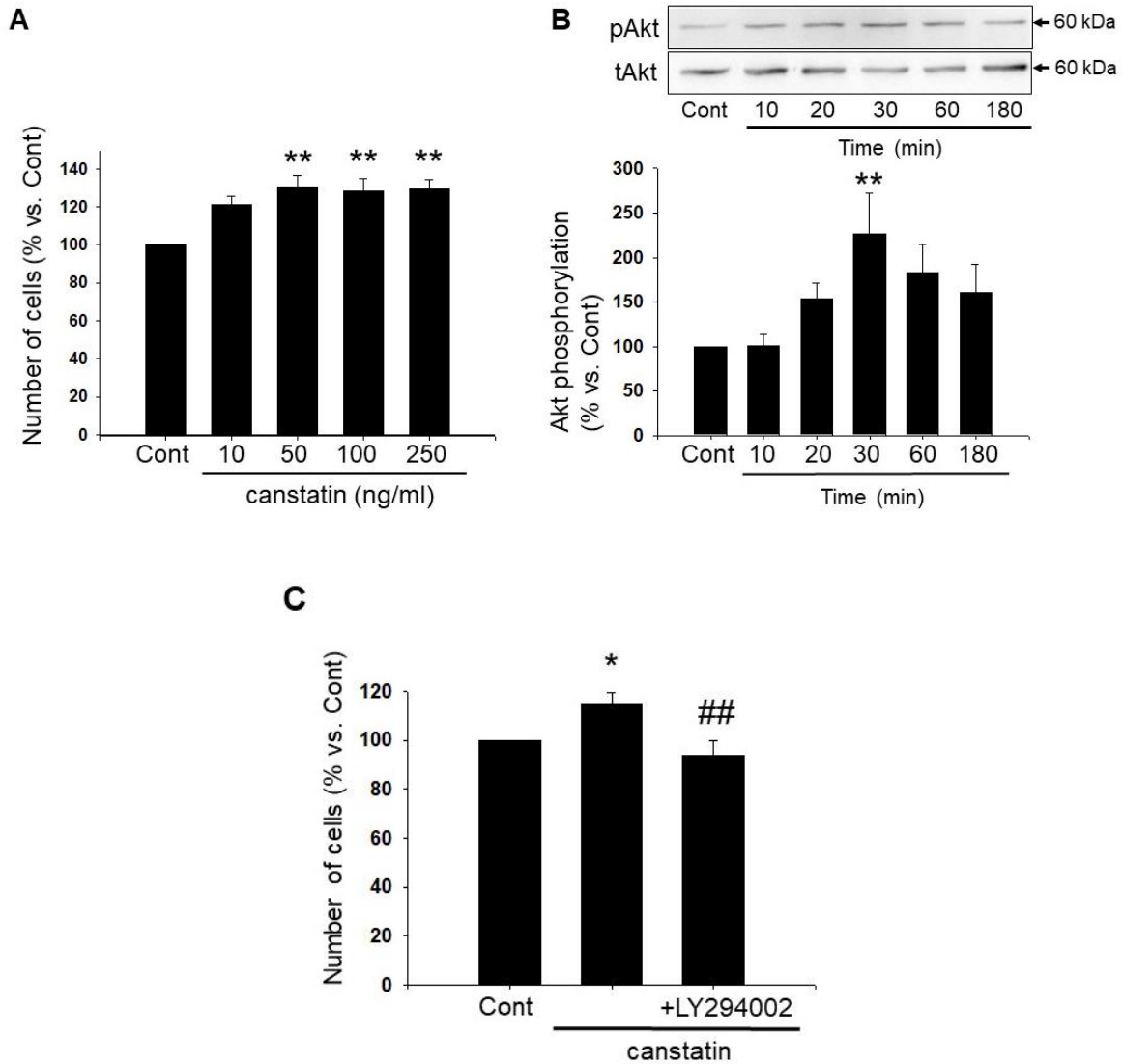


図 16. Recombinant canstatin が梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖能に及ぼす影響

(A)心筋梗塞モデルラットの梗塞領域から単離した筋線維芽細胞(細胞密度 50-60%)を recombinant canstatin (10-250 ng/ml)または溶媒(Cont)で刺激した(24 時間)。Cell counting assayにより生細胞数の測定を行い、Cont を 100%として平均値±標準誤差で示した(n=6)。** $P < 0.01$ vs. Cont. (B)筋線維芽細胞を recombinant

canstatin (50 ng/ml)で刺激した(10-180分)後、タンパク質を抽出し Western blotting により Akt のリン酸化(Ser473) (pAkt)を検討した。(上図)典型的な pAkt (60 kDa)および total Akt (tAkt: 60 kDa)のブロット像を示した。(下図) pAkt 発現を tAkt 発現で補正し、無刺激群(Cont)を 100%として平均値±標準誤差で示した(n=8)。** $P < 0.01$ vs. Cont. (C)筋線維芽細胞に LY294002 (10 μ M、30分前処置)を処置した後、recombinant canstatin (50 ng/ml)または溶媒(Cont)で刺激した(24時間)。Cell counting assayにより生細胞数の測定を行い、Contを 100%として平均値±標準誤差で示した(n=7)。* $P < 0.05$ vs. Cont, ## $P < 0.01$ vs. canstatin.

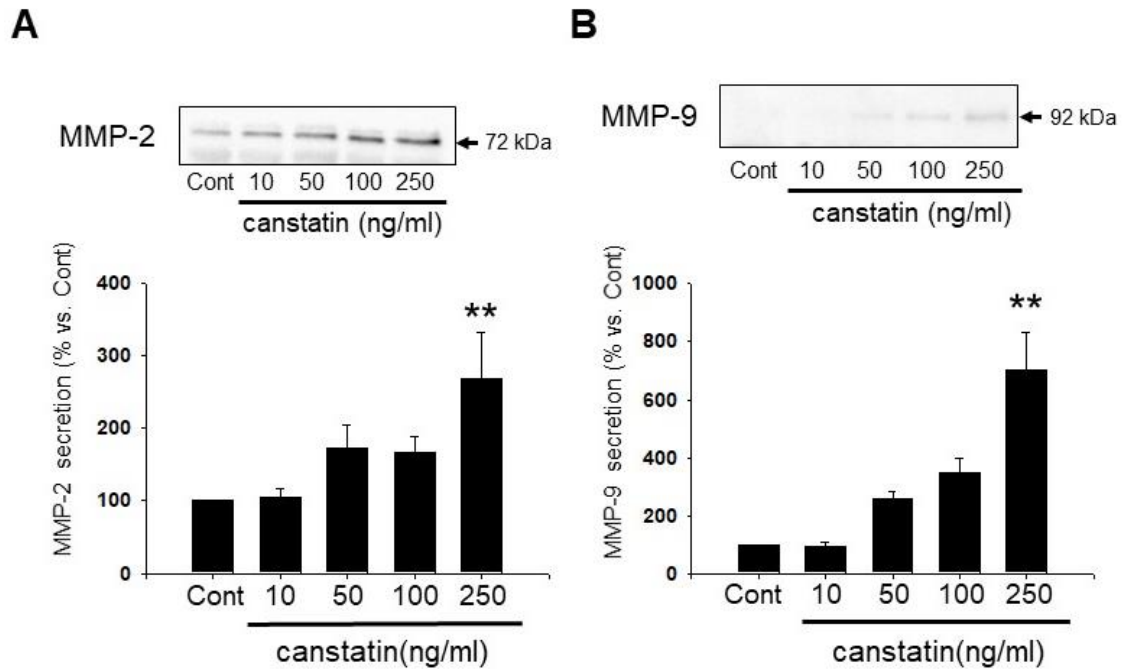


図 17. Recombinant canstatin が梗塞領域由来筋線維芽細胞の MMPs 分泌能に及ぼす影響

心筋梗塞モデルラットの梗塞領域から単離した筋線維芽細胞を recombinant canstatin (10-250 ng/ml) または溶媒 (Cont) で刺激した (48 時間) 後、培養上清を回収し Western blotting により MMP-2 (A) および MMP-9 (B) タンパク質発現を検討した。(上図) 典型的な MMP-2 (72 kDa) および MMP-9 (92 kDa) のブロット像を示した。(下図) MMP-2 および MMP-9 発現を総タンパク質濃度で補正し、Cont を 100% として平均値 ± 標準誤差で示した (n=4)。

** $P < 0.01$ vs. Cont.

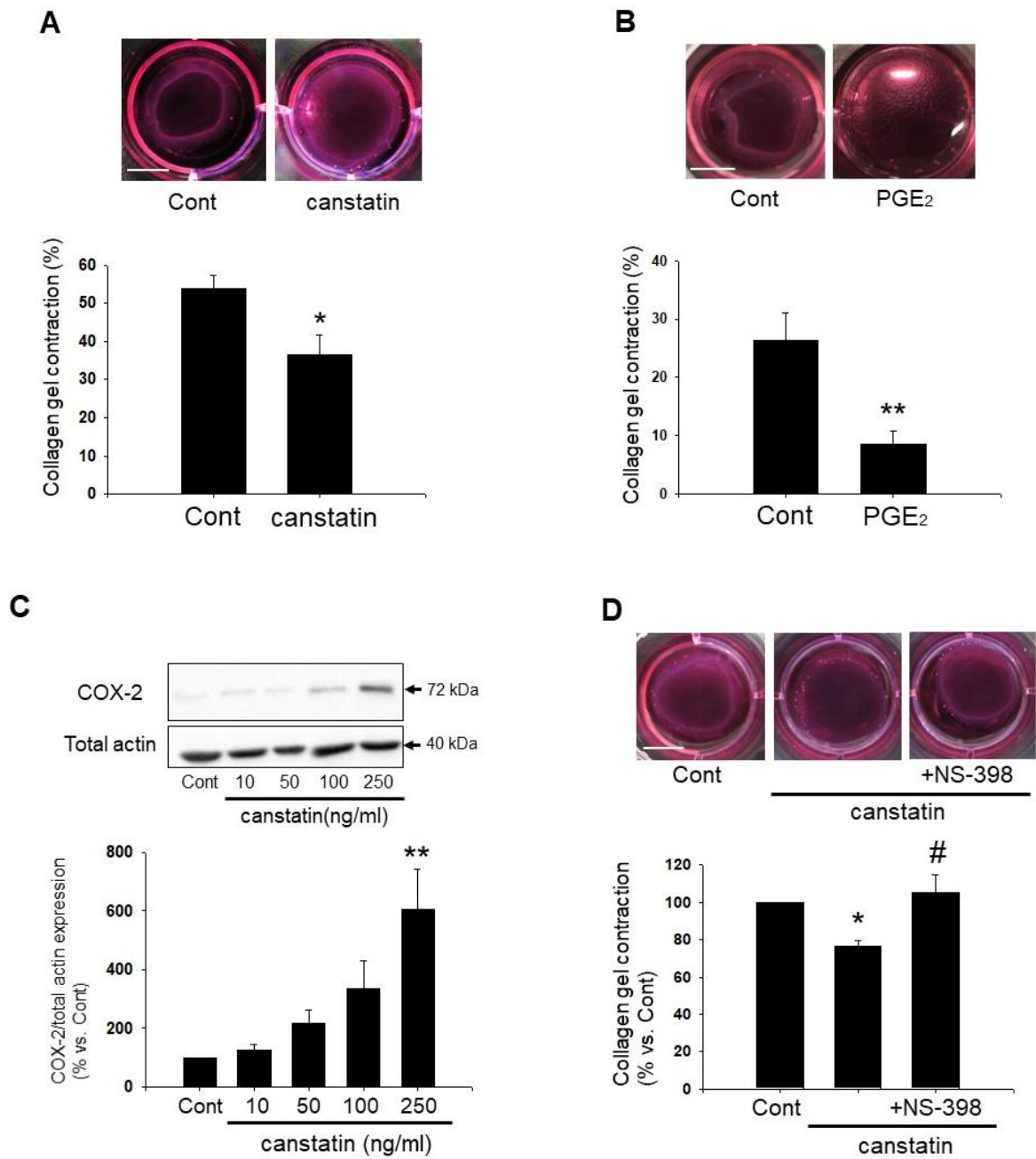


図 18. Recombinant canstatin が梗塞領域由来筋線維芽細胞の収縮能に及ぼす影響

(A)筋線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種し(2.0×10^5 個/well)、24 時間 CO_2 インキュベーター ($5\% \text{CO}_2$ 、 37°C) 内で培養

した。細胞定着後、筋線維芽細胞を recombinant canstatin (250 ng/ml) または溶媒 (Cont) で刺激した (24 時間)。ゲルを遊離させ、さらに 24 時間後にゲルの表面積の変化を評価した。(上図) 典型的なコラーゲンゲル収縮像を示した。Scale bar: 5 mm. (下図) コラーゲンゲル収縮率を算出し平均値±標準誤差で示した (n=6)。* $P < 0.05$ vs. Cont. (B) 筋線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種し (2.0×10^5 個/well)、24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞定着後、筋線維芽細胞を prostaglandin E₂ (PGE₂: 10 μM) または溶媒 (Cont) で刺激した (24 時間)。ゲルを遊離させ、さらに 24 時間後にゲルの表面積の変化を評価した。(上図) 典型的なコラーゲンゲル収縮像を示した。Scale bar: 5 mm. (下図) コラーゲンゲル収縮率を算出し平均値±標準誤差で示した (n=7)。** $P < 0.01$ vs. Cont. (C) 筋線維芽細胞を recombinant canstatin (10-250 ng/ml) または溶媒 (Cont) で刺激した (48 時間) 後、タンパク質を抽出し Western blotting により cyclooxygenase (COX)-2 タンパク質発現を検討した。(上図) 典型的な COX-2 (72 kDa) および total actin (40 kDa) のブロット像を示した。(下図) COX-2 発現を total actin 発現で補正し、Cont を 100% として平均値±標準誤差で示した (n=7)。** $P < 0.01$ vs. Cont. (D) 筋線維芽細胞をコラーゲンゲル上に播種し (2.0×10^5 個/well)、24 時間 CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞定着後、筋線維芽細胞を NS-398 (1 μM、30 分前処置) 存在下または非存在下において recombinant canstatin (250 ng/ml) で刺激した (24 時間)。ゲルを遊離させ、さらに 24 時間後にゲルの表面積の変化を評価した。(上図) 典型的なコラーゲンゲル収縮像を示した。Scale bar: 5 mm. (下図) コラーゲンゲル収縮

率を算出し、Cont を 100%として平均値±標準誤差で示した
(n=5)。* $P < 0.05$ vs. Cont, # $P < 0.05$ vs. canstatin.

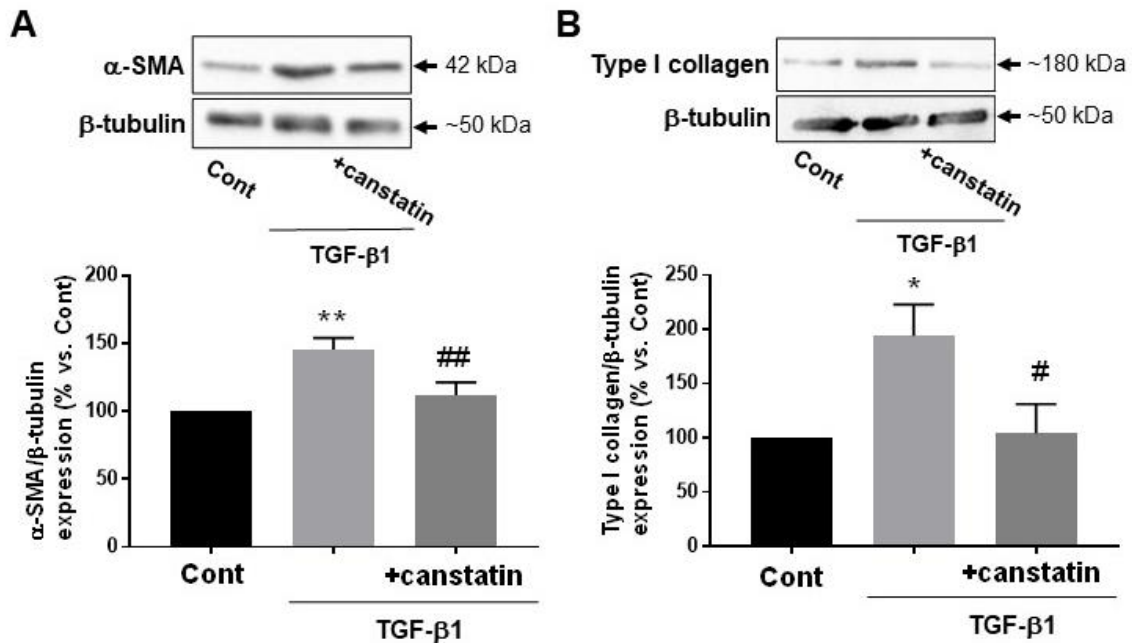


図 19. Recombinant canstatin が心線維芽細胞の transforming growth factor-β1 (TGF-β1) 刺激による筋線維芽細胞への分化に及ぼす影響

Wistar ラットの心室から単離した心線維芽細胞を recombinant canstatin (250 ng/ml、30 分前処置) 存在あるいは非存在下において TGF-β1 (10 ng/ml) または溶媒 (Cont) で刺激した (48 時間) 後、タンパク質を抽出し Western blotting により α-SMA (A) および I 型コラーゲン (type I collagen: B) タンパク質発現を検討した。(上図) 典型的な α-SMA (42 kDa)、I 型コラーゲン (~180 kDa) および β-tubulin (~50 kDa) のプロット像を示した。(下図) α-SMA および I 型コラーゲン発現を β-tubulin 発現で補正し、Cont を 100% として平均値 ± 標準誤差で示した (A: n=7, B: n=5)。

*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. Cont, #, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. TGF-β1.

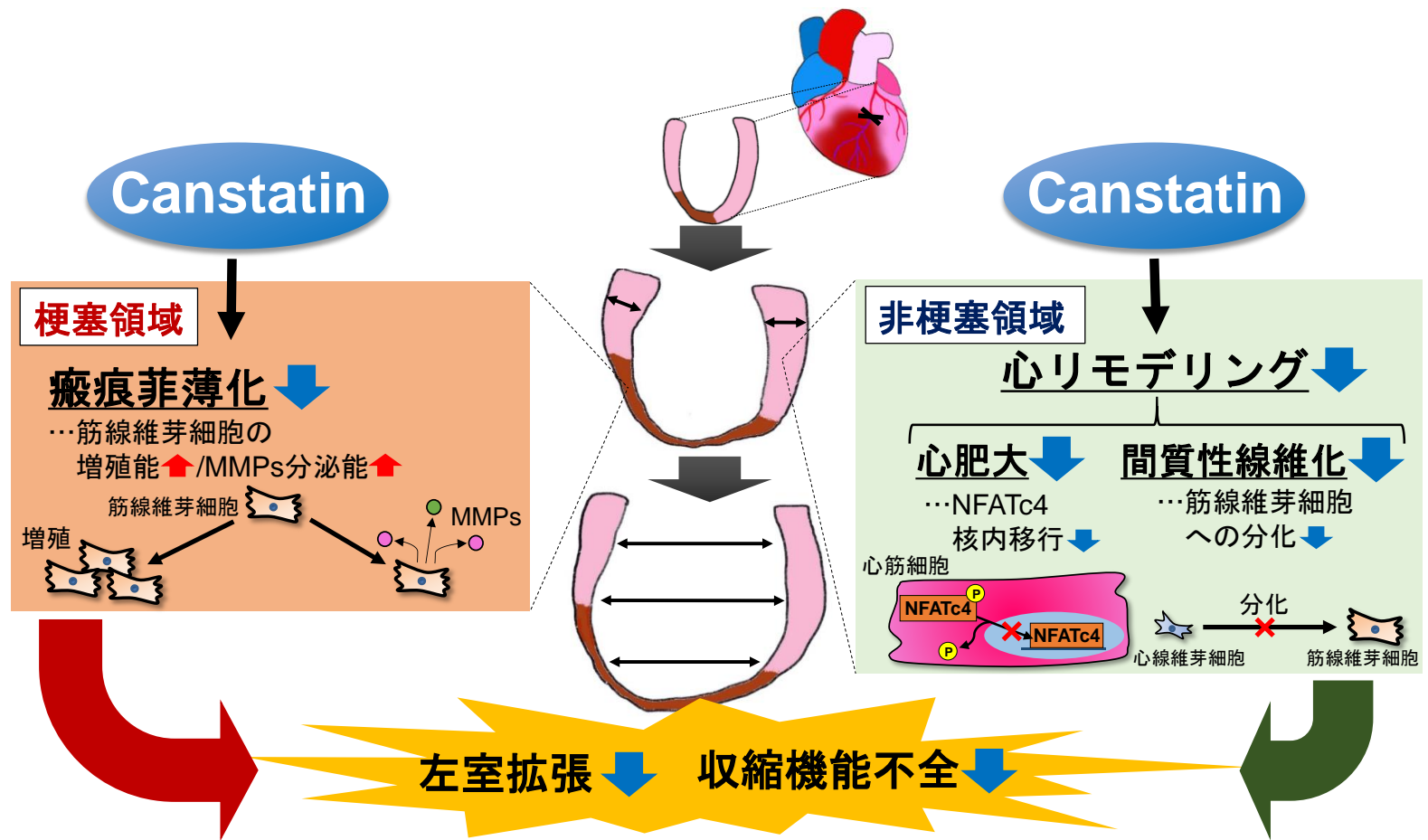


図 20. 第二章のまとめ

心筋梗塞モデルラットに対する recombinant canstatin 投与は梗塞領域の瘢痕菲薄化および非梗塞領域の心リモデリング(心肥大および間質性線維化)の抑制を介し、左室拡張

および収縮機能不全を抑制した。また **canstatin** の梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖能および **MMPs** 分泌能亢進作用や、非梗塞領域における心筋細胞の **NFATc4** 核内移行や心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導抑制作用が心保護作用機序の一部であることが示唆された [108, 111]。

4. 考察

本章では、心筋梗塞モデルラットに対する recombinant canstatin 投与が心筋梗塞後の生存率低下、左室拡張および心機能低下を改善することや、梗塞領域における癒痕菲薄化や非梗塞領域における心筋細胞肥大や間質性線維化などの病的な心リモデリングを抑制することを初めて明らかにした。さらに canstatin は筋線維芽細胞機能の亢進を介して梗塞領域において抗癒痕菲薄化作用を示すこと、TGF- β 1 刺激による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導抑制を介して非梗塞領域において抗線維化作用を示すことが示唆された(図 20)。

これまでの *in vitro* 実験において canstatin (250 ng/ml)が H9c2 ラット心筋芽細胞の isoproterenol および低酸素誘導性アポトーシスを抑制することが明らかになっている[42, 73]。ラットの全身血液量を約 64 ml/kg [15]として算出すると、recombinant canstatin (16 μ g/kg)投与により血中濃度が 250 ng/ml に達することが推測された。そこで、本章では投与した recombinant canstatin が十分な効力を発揮することを期待し、用量を 20 μ g/kg に設定した。なお同様の理由から後述の第三章から第五章の実験においても recombinant canstatin の用量も同様に設定した。

Vehicle 投与群では心筋梗塞後 9 日以内に約半数のラットが死亡(生存率 47.1%)したが、recombinant canstatin 投与はこの生存率低下を改善(72.7%)した(図 9)。また心筋梗塞後 7 日以内から認められる LVID の増加と FS および EF の低下も canstatin は抑制

した(図 10)。心筋梗塞後に虚血ストレスを受けた心筋細胞は低酸素状態となり、細胞死を起こす[98]。これまでの *in vitro* 実験において、canstatin が H9c2 ラット心筋芽細胞の低酸素誘導性アポトーシスを抑制することが明らかになっている[42]。また、本学位論文に未掲載のデータとして、COL4A2 siRNA 投与により canstatin 発現をロックダウンした心臓を摘出し、*ex vivo* で心筋梗塞術を行ったところ、Cont siRNA を投与と比べて心筋細胞のアポトーシスが亢進し(data not shown, Cont siRNA: n=3, COL4A2 siRNA: n=4)、梗塞領域が拡大した(data not shown, Cont siRNA: n=4, COL4A2 siRNA: n=4)という結果を得ている[108]。以上のことから、canstatin が心筋梗塞後初期の心筋細胞障害に対して保護的に働くことで生存率や心機能低下を抑制する可能性が考えられた。

次に梗塞領域における癒痕形成に着目したところ、recombinant canstatin 投与は癒痕の菲薄化を抑制した(図 11)。心筋梗塞後の梗塞領域において筋線維芽細胞は遊走・増殖し、線維産生を亢進することで癒痕形成に重要な役割を果たす[68, 119]。また、筋線維芽細胞の収縮は癒痕組織の安定化に関わる[68]。これら筋線維芽細胞による癒痕組織の形成および成熟は心筋梗塞後の心機能維持に関わっている[4, 119]。本章の *in vitro* 実験において、梗塞領域から単離培養した筋線維芽細胞に及ぼす canstatin の影響を検討したところ、増殖能を亢進した(図 16)。Canstatin が Akt リン酸化を亢進し、PI3K/Akt 阻害薬 LY294002 により canstatin 誘導性増殖が解除されたことから、canstatin は Akt リン酸化を介して筋線維芽細胞の増殖能を亢進することが示

唆された(図 16)。また **canstatin** は梗塞領域由来筋線維芽細胞において **MMP-2** および **MMP-9** 分泌を亢進した(図 17)。これらの **MMPs** は **ECM** 分解酵素であり **ECM** 成分を分解する作用を持つが、一方で梗塞領域への心線維芽細胞の遊走や **TGF- β** 活性化を介して筋線維芽細胞への分化誘導作用も有しており [58, 85]、癒痕形成において促進的に働く可能性が考えられる。以上のことから、**canstatin** は筋線維芽細胞の増殖および **MMPs** 分泌促進作用を介して *in vivo* 実験で確認された癒痕形成の促進に寄与することが示唆された。さらに筋線維芽細胞の収縮能に及ぼす **canstatin** の影響を検討したところ、**canstatin** はコラーゲンゲル収縮を抑制した(図 18)。**PGE₂** は筋線維芽細胞の収縮を抑制することが報告されており [79]、本章においても **PGE₂** が梗塞領域由来筋線維芽細胞の収縮を抑制することを確認した(図 18)。**Canstatin** が **PGE₂** を誘導する **COX-2** [80] 発現を亢進し、**COX-2** 阻害薬 **NS-398** が **canstatin** による筋線維芽細胞の収縮抑制作用を解除したことから、**canstatin** が **COX-2/PGE₂** 経路の亢進を介して筋線維芽細胞の収縮を減弱させることが示唆された(図 18)。この結果から **canstatin** が梗塞領域の癒痕組織の安定化を妨げることが考えられたが、本章の *in vivo* 実験では recombinant **canstatin** 投与はむしろ心筋梗塞後の癒痕の菲薄化を抑制しており、心機能も改善した。この理由として、**COX-2/PGE₂** 経路の活性化が心保護的に働く可能性が挙げられる。**COX** 阻害薬 **indometacin** が心筋梗塞術を施した犬の癒痕菲薄化を誘発すること [24] や、**PGE₂** が心筋梗塞後の病的な心リモデリングに対して保護的に働くことで心機能低下を抑制すること [114] などが報告されている。これら

のことから、**canstatin**による筋線維芽細胞の COX-2/PGE₂ 発現亢進作用は癒痕形成促進や心リモデリング抑制に働き、心機能改善に寄与する可能性が考えられた。

次に非梗塞領域におけるリモデリングに着目した。

Recombinant canstatin 投与は心筋梗塞後の非梗塞領域における心筋細胞肥大を抑制した(図 12)。心肥大に関わる代表的なシグナル経路として Ca²⁺/calcineurin/NFAT 経路が知られている[18, 107]。**Sanchez-Alonso**らは心筋梗塞術により作製した心不全モデルラットにおいて心筋細胞表面の LTCC の開口確率が増加することを報告している[95]。また、心筋梗塞モデルマウスまたはラットの心臓組織において、calcineurin 活性や NFAT の転写活性が上昇することが報告されている[69, 126]。これまでの *in vitro* 実験において **canstatin** がラット心室筋細胞における LTCC 活性や H9c2 ラット心筋芽細胞における isoproterenol 誘導性 NFATc4 脱リン酸化を抑制することが明らかになっている[73]。本章では **canstatin** が非梗塞領域の心筋細胞において NFATc4 の核内移行を抑制した(図 13)。よって **canstatin** は心筋梗塞後に Ca²⁺/calcineurin/NFAT 経路の活性化を抑制することで非梗塞領域における心筋細胞肥大を抑制することが示唆された。一方、**recombinant canstatin** 投与は心筋梗塞後の非梗塞領域における間質性線維化を抑制した(図 14)。**TGF-β**は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を誘導することから、様々な組織の線維化に深く関与する[129]。心筋梗塞後のリモデリングにおいても、**TGF-β**は非梗塞領域の間質性線維化の主な原因因子と考えられている[116]。**Canstatin** は非梗塞領域における α-SMA 陽性筋線維芽細胞数の増加を抑制した(図 15)。

さらにラット心線維芽細胞を用いた検討において、TGF- β 1 刺激による α -SMA 発現増加、すなわち筋線維芽細胞への分化および I 型コラーゲン産生増加を **canstatin** が抑制することが明らかとなった(図 19)。以上のことから、**canstatin** は心筋梗塞後の非梗塞領域において心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導の抑制を介して間質性線維化を抑制することが示唆された。本章において **canstatin** が梗塞領域由来筋線維芽細胞の機能を亢進した一方で、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導を抑制するという一見すると相反する結果が得られた。この理由としては、実験に使用した細胞の由来がそれぞれ梗塞領域と健常な心臓組織と異なること、筋線維芽細胞と線維芽細胞において **canstatin** の受容体と考えられるインテグリン発現や局在が変化していること[4]、梗塞領域の置換性線維化と非梗塞領域の間質性線維化では発症機序に違いがあること[116]などが考えられるが、今後更なる検討が必要である。

結論として第二章では、**recombinant canstatin** 投与が心筋梗塞後の梗塞領域における瘢痕形成促進作用や非梗塞領域における心肥大や間質性線維化といった心リモデリング抑制作用により収縮機能不全を抑制することが明らかとなった。このことから、*in vivo* 心疾患モデルにおいて **canstatin** が心保護的に働くことが初めて明らかとなった。

IV. 第三章

Isoproterenol 誘発心肥大モデルラットにおける canstatin の保護作用

1. 緒言

心肥大は圧負荷や容量負荷に対する心筋細胞肥大化を主とした適応反応であり、心筋への力学的ストレスの軽減や心拍出量維持に働く生理的な代償機構である[18, 107]。一方、高血圧症、虚血性心疾患や弁膜症などの循環器疾患において持続的な血行動態ストレスや過剰な神経液性因子、酸化ストレスなどに暴露された心臓は、心機能不全を伴った非代償性心肥大、すなわち病的な心肥大を起こす[18, 94]。病的な心肥大は心不全、不整脈や突然死のリスク要因となるため、多くの循環器疾患患者において重要な治療標的として捉えられている[18]。

心筋細胞の肥大化は mitogen-activated protein kinase (MAPK) や calcineurin シグナル経路などの多様な細胞内シグナルにより調節されている[94, 107]。またこれら肥大化シグナルにおいて $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が重要な役割を担うと考えられている[18, 107]。カテコラミン放出を伴う交感神経の活性化は心肥大を誘発する[75]。カテコラミンによる β -アドレナリン受容体刺激は心筋細胞の LTCC を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介して Ca^{2+} -calmodulin 依存性セリン-スレオニンホスファターゼである calcineurin を活性化させる[138]。活性化した calcineurin により脱リン酸化された転写因子の NFATc4 は核内に移行し、 β -myosin heavy chain (β -MHC) をはじめとする心肥大関連遺伝子の転写を活性化する[50, 62, 107]。そのため、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介した calcineurin/NFATc4 経路の活性化は β -アドレナリン受容体刺激による心肥大の進展に深く関わる。

第二章では、recombinant canstatin 投与が心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域において心筋細胞肥大および NFATc4 の核内移行を抑制することを明らかにした。またこれまでに canstatin が H9c2 ラット心筋芽細胞において β -アドレナリン受容体アゴニスト isoproterenol 刺激による NFATc4 脱リン酸化を抑制すること [73]やラット心室筋細胞において LTCC 活性を抑制すること [34] が *in vitro* 実験で明らかになっている。そこで第三章では、recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心筋細胞肥大を calcineurin/NFATc4 経路の調節を介して抑制するとの仮説を検証し、さらに canstatin の抗心肥大作用機序の詳細を検討した。

2.実験材料および実験方法

2-1.実験材料

2-2-1.試薬

Isoproterenol hydrochloride (東京化成工業株式会社、東京)および recombinant マウス canstatin (第二章 2-2-1 の項に準じて作製)。

2-1-2.一次抗体

Anti-NFATc4 (sc-13036)(Santa Cruz Biotechnology)。

2-1-3.使用動物

すべての動物実験は北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 18-060)、同大学のガイドラインを遵守して行った。実験には 5 週齢または 1-3 日齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用し、学部内 5 号館 2 階の実験動物飼育室で固形飼料(CE2;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. Recombinant canstatin 投与実験

Zhou らの方法に従い 5 週齢の Wistar ラットに isoproterenol (5 mg/kg)を 7 日間連日皮下投与することで isoproterenol 誘発心肥大モデルラット (ISO)を作製した [137]。対照群 (Cont)は生理食塩水を 7 日間連日皮下投与した。Recombinant canstatin (20 µg/kg)または溶媒(0.8 mM Tris, 20 mM L-arginine, 4% glycerol を含む生理食塩水)は isoproterenol または生理食塩水投与と同時に 7 日間連日腹腔内投与した。最終投与の翌日に第一章 2-2-4 の項に準じて心臓の摘出・瀉血を行った。摘出した心臓のうち左心室組織は組織学的解析(2-2-3 および 2-2-5)に用いるために 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)中に 4 °C で一晚保存した。残りの左心室組織は 2-2-4 の calcineurin 活性測定および 2-2-6 の real time RT-PCR に用いるために液体窒素で急速凍結し、使用まで -80 °C で保存した。

2-2-2. 心エコー検査

第二章 2-2-3 の項に準じて心エコー検査を行い、左心室の乳頭筋レベルの傍胸骨短軸像において M モードで拡張期(diastolic

phase)と収縮期(systolic phase)における左室自由壁厚(left ventricular posterior wall thickness: LVPW)、心室中隔厚(IVS: interventricular septum)、左室内径(LVID)、左室内径短縮率(FS)および左室駆出率(EF)を測定した。

2-2-3. Azan 染色

亀島らの方法に従い Azan 染色を行った[93]。2-2-1において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織を第一章 2-2-6の項に準じてパラフィン包埋し、薄切切片標本を作製した。薄切切片は脱パラフィン後、5%ニクロム酸カリウム溶液に60分間浸漬した。洗浄後、アゾカルミン G 染色液に一晩浸漬した。洗浄後、3% 12 タングスト(VI)リン酸塩 n 水和物溶液に15分間浸漬し、アニリンブルー-オレンジ G 染色液に60分間浸漬した。CCDカメラ(DP74; OLYMPUS)を接続した光学顕微鏡(BX-51; OLYMPUS)により画像を取得し、左心室における心筋細胞短径(各ラットあたり50細胞)を画像解析ソフト(cellSens Imaging Software version 1.17; OLYMPUS)を用いて定量した。

2-2-4. Calcineurin 活性測定

Calcineurin Cellular Activity Assay Kit (BML-AK816-0001; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, U.S.A.)を用いて、定法に従い calcineurin 活性測定を行った。-80 °Cで保存した左心室組織サンプルを卓上破砕機(セルデストロイヤー; バイオメディカルサイエンス)で破砕し、溶解バッファー(Enzo Life Sciences)を10分間処置し可溶化後に、60分間遠心分離(16,000×g、4 °C)し、タンパク

質抽出液を得た。サンプル中の遊離リン酸を除去するためにタンパク質抽出液を脱塩カラム(Enzo Life Sciences)に通過させた。BCA法(BCA Protein Assay Kit; Pierce)によりタンパク質濃度を定量し、等量のタンパク質抽出液(5 µg)を基質(RIIリン酸化ペプチド)と10分間、30 °Cで反応させた。遊離リン酸を定量するためにBIOMOL® Green Reagent (Enzo Life Sciences)を添加し、吸光度(620 nm)を測定した。

2-2-5. 免疫組織化学染色

2-2-1において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した左心室組織を用い、第二章2-2-6の項に準じて3視野中の全細胞核数およびNFATc4陽性核数を測定し、NFATc4陽性核数/全細胞核数比を算出した。

2-2-6. Real time RT-PCR

井本らの方法に従いreal time RT-PCRを行った[37]。-80 °Cで保存した左心室組織サンプルを卓上破砕機(セルDESTROYヤー; バイオメディカルサイエンス)で破砕し、TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, U.S.A.)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、エタノール沈殿を行って総RNAを抽出した。1 µgの総RNAからReverTra Ace qPCR master mix (東洋紡、大阪)を用いて逆転写反応によりcDNA合成を行った(65 °C、5分→37 °C、15分→98 °C、5分)。PCR増幅反応は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, U.S.A.)により行った[95 °C、1分→(95 °C、15秒→60 °C、30秒)、40 cycle→60 °C、30秒]。各被検遺伝子の増幅曲線が閾値に達した時のサイクル数(Cq)を、リファレンス遺伝子である *RNA polymerase II subunit A (Polr2a)* の Cq と比較する $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて mRNA 発現を定量・解析した。使用したプライマー配列および accession number は下記の通りである。

<i>Gene</i>			
(Accession number)		Sequence	
<i>β-MHC</i> (NM_017240)	Forward	5'-GCGGACATTGCCGAGTCCCAG-3'	
	Reverse	5'-GCTCCAGGTCTCAGGGCTTCACA-3'	
<i>α-skeletal actin</i> (NM_019212)	Forward	5'-CGCCAACAACGTCATGTCAG-3'	
	Reverse	5'-CCACACTGAGTACTTGCGCT-3'	
<i>ANP</i> (NM_012612)	Forward	5'-AGCCGAGACAGCAAACATCA-3'	
	Reverse	5'-CAGGTGGTCTAGCAGGTTCTTG-3'	
<i>Polr2a</i> (XM_343922)	Forward	5'-CGTATCCGCATCATGAACAGTGA-3'	
	Reverse	5'-TCATCCATCTTATCCACCACCTCTT-3'	

・ ANP: atrial natriuretic peptide

2-2-7. 新生仔ラット心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes: NRCMs) の単離

1-3日齢の新生仔 Wistar ラットの体表を 70%エタノールで消毒後、イソフルラン麻酔下(5%)で断頭し安楽殺を行った。摘出した心臓は 20 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM) 添加 phosphate

buffered saline (PBS)中で瀉血した。摘出した心臓から心室のみを分離し、クリーンベンチ内で細かく切り刻み、洗浄液[20 mM BDM, 0.08% trypsin 添加 Hanks' Balanced Salt Solution (Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含)]中で 2 時間攪拌した(4 °C)。洗浄後に組織片を 20 mM BDM 添加 0.15% コラゲナーゼ 添加 Leibovitz's L15 培地中で 37 °C、30 分間反応させた後に、組織懸濁液を濾過することで組織片を除去した。遠心分離後(100×g、4 °C)、ペレットを 10% FBS 加高グルコース DMEM 中で分散させ、培養プレートに播種した。CO₂ インキュベーター(5% CO₂、37 °C) 内で 90 分間培養後にプレートに定着していない細胞を回収した(×2 回)。回収した細胞を NRCMs とし、ラミネンコーティングしたカバーガラス上に播種した。

2-2-8. [Ca^{2+}]_i 測定

井本らの方法に従い Ca^{2+} プローブである Fura2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM:ナカライテスク)を用いて NRCMs の [Ca^{2+}]_i 測定を行った[36]。2-2-7 でカバーガラス上に播種した NRCMs に Fura2-AM (5 μM)を添加した HEPES-Tyrode 溶液(1.8 mM CaCl_2 , 143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH_2PO_4 , 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.5 mM Glucose, 5 mM HEPES)を加えて CO₂ インキュベーター(5% CO₂、37 °C)内で 30 分間反応させた後に、Fura2-AM を含まない HEPES-Tyrode 溶液中で 30 分間静置した。カバーガラスを測定チャンバーに設置し、HEPES-Tyrode 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 の励起光を交互にあて、波長 500 nm の蛍光を

測定することで $[Ca^{2+}]_i$ の指標となるそれぞれの蛍光強度(F340 および F380)の比率(F340/F380: F)を算出した。NRCMs は recombinant canstatin (250 ng/ml)または溶媒を 5 分間前処置した後に isoproterenol (10 μ M、60 秒間)で刺激した。Isoproterenol 刺激後の F を isoproterenol 刺激 30 秒前の基底状態の値(F_0)で標準化した(F/F_0)。

2-3.統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計評価は 2 群間の比較には Student の t 検定を行った(図 26B)。3 群間以上の比較には一元配置分散分析後に Tukey の post-hoc 検定(図 21B, C、図 22B、図 23、図 24B、図 25B, C、表 1、表 2)または Bonferroni の post-hoc 検定(図 25A)を行った。危険率 5%以下($P<0.05$)を有意差ありと判定した。

3.結果

3-1. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左室壁厚増加を抑制する

心エコー検査により、isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左室自由壁厚および心機能に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 21 および表 1; $n=8$)。Isoproterenol により左心室自由壁が肥厚し、canstatin がそれを抑制する像が観察された(図 21A)。各心エコーパラメータを計測したところ、isoproterenol は心機能(FS

および EF)には影響を及ぼさなかった(表 1)。一方、isoproterenol は LVPWd (ISO+vehicle: 0.25 ± 0.01 cm vs. Cont+vehicle: 0.19 ± 0.01 cm, $P < 0.01$)、LVPWs (ISO+vehicle: 0.34 ± 0.02 cm vs. Cont+vehicle: 0.27 ± 0.01 cm, $P < 0.05$)および IVSd (ISO+vehicle: 0.19 ± 0.02 cm vs. Cont+vehicle: 0.14 ± 0.01 cm, $P < 0.05$)を有意に増加させた(図 21、表 1)。Canstatin は LVPWd の増加を有意に抑制し (ISO+canstatin: 0.18 ± 0.01 cm, $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)、LVPWs および IVSd の増加を抑制する傾向を示した (ISO+canstatin; LVPWs: 0.30 ± 0.01 cm, IVSd: 0.17 ± 0.01) (図 21、表 1)。Canstatin 単独投与はこれら心エコーパラメータに影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin; LVPWd: 0.18 ± 0.01 cm, LVPWs: 0.28 ± 0.01 cm, IVSd: 0.15 ± 0.01 cm) (図 21、表 1)。

3-2. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心筋細胞肥大を抑制する

まず isoproterenol による各重量パラメータ [体重 (body weight: BW)、心重量 (heart weight: HW)、心重量/尾長 (tail length: TL) 比 (HW/TL)、心重量/体重比 (HW/BW)、左心室重量 (left ventricular weight: LVW)、左心室重量/尾長比 (LVW/TL)、左心室重量/体重比 (LVW/BW)] の変化に及ぼす canstatin の影響を検討した (表 2; $n=8$)。Isoproterenol は HW (ISO+vehicle: 842.6 ± 24.0 mg vs. Cont+vehicle: 612.4 ± 23.3 mg, $P < 0.01$)、HW/TL (ISO+vehicle: 63.6 ± 1.7 vs. Cont+vehicle: 46.9 ± 1.7 , $P < 0.01$)、HW/BW (ISO+vehicle: 4.6 ± 0.1 vs. Cont+vehicle: 3.4 ± 0.1 , $P < 0.01$)、LVW (ISO+vehicle: 604.6 ± 19.0 mg vs. Cont+vehicle: 428.8 ± 16.8 mg,

$P < 0.01$)、LVW/TL (ISO+vehicle: 45.6 ± 1.4 vs. Cont+vehicle: 32.8 ± 1.3 , $P < 0.01$)および LVW/BW (ISO+vehicle: 3.3 ± 0.1 vs. Cont+vehicle: 2.4 ± 0.1 , $P < 0.01$)を有意に増加させた(表 2)。Canstatin は HW (ISO+canstatin: 741.7 ± 21.5 mg, $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)、HW/TL (ISO+canstatin: 55.5 ± 1.4 , $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)、LVW (ISO+canstatin: 517.0 ± 15.4 mg, $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)、LVW/TL (ISO+canstatin: 39.3 ± 1.0 , $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)および LVW/BW (ISO+canstatin: 3.1 ± 0.0 , $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle)の増加を有意に抑制し、HW/BW (ISO+canstatin: 4.4 ± 0.1)の増加を抑制する傾向を示した(表 2)。Canstatin 単独投与はこれら重量パラメータに影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin: HW; 583.8 ± 10.1 mg, HW/TL; 44.2 ± 0.7 , HW/BW; 3.3 ± 0.1 , LVW; 409.0 ± 6.6 mg, LVW/TL; 31.0 ± 0.5 , LVW/BW; 2.3 ± 0.0)(表 2)。

次に Azan 染色を行い isoproterenol による左心室の心筋細胞短径の増加に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 22; $n=8$)。Isoproterenol は左心室の心筋細胞短径を有意に増加させ (ISO+vehicle: 22.6 ± 0.7 μm vs. Cont+vehicle: 15.6 ± 0.4 μm , $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した (ISO+canstatin: 16.8 ± 0.4 μm , $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle)(図 22)。Canstatin 単独投与は心筋細胞短径に影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin: 15.2 ± 0.3 μm)(図 22)。

3-3. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの calcineurin 活性および NFATc4 核内移行を抑制する

これまでの *in vitro* 実験において、canstatin が isoproterenol 刺激による H9c2 ラット心筋芽細胞の NFATc4 脱リン酸化を抑制することが明らかになっている [73]。また第二章において recombinant canstatin 投与は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域における NFATc4 核内移行を抑制した。そこで canstatin が calcineurin/NFAT 経路の遮断を介して isoproterenol 誘発心肥大を抑制するか検討した。まず isoproterenol 誘発 calcineurin 活性化に及ぼす canstatin の影響を検討したところ (図 23; n=8)、isoproterenol は calcineurin 活性を有意に増加させ (ISO+vehicle: $243.4 \pm 20.4\%$ vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$)、canstatin はこの増加を有意に抑制した (ISO+canstatin: $143.9 \pm 30.3\%$, $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle) (図 23)。Canstatin 単独投与は calcineurin 活性には影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin: $136.4 \pm 16.6\%$) (図 23)。

Calcineurin により脱リン酸化された NFATc4 は核内に移行し、 β -MHC、 α -skeletal actin や ANP などの心肥大関連遺伝子の転写活性化に働く [10, 50, 54, 62]。そこで isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左心室における NFATc4 核内移行に及ぼす canstatin の影響を検討した (図 24; n=8)。Isoproterenol は NFATc4 核内移行を有意に増加させ (ISO+vehicle: $244.2 \pm 15.2\%$ vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した (ISO+canstatin: $123.4 \pm 17.7\%$, $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle) (図 24)。Canstatin 単独投与は NFATc4 核内移行に影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin: $108.1 \pm 17.4\%$) (図 24)。

3-4. Canstatin は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心肥大関連遺伝子発現亢進を抑制する

さらに isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左心室における心肥大関連遺伝子発現に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 25; n=8)。Isoproterenol は β -MHC (ISO+vehicle: 5.8 ± 0.5 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$), α -skeletal actin (ISO+vehicle: 2.9 ± 0.3 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$) および ANP (ISO+vehicle: 5.6 ± 0.4 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$) mRNA 発現を有意に増加させた(図 25)。Canstatin は β -MHC (ISO+canstatin: 1.6 ± 0.6 , $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle) および α -skeletal actin (ISO+canstatin: 0.7 ± 0.2 , $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle) mRNA 発現増加を有意に抑制し、ANP mRNA 発現を抑制する傾向を示した(ISO+canstatin: 2.7 ± 0.5)(図 25)。Canstatin 単独投与は心肥大関連遺伝子発現に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: β -MHC; 0.5 ± 0.5 , α -skeletal actin; 1.0 ± 0.3 , ANP: 0.8 ± 0.3)(図 25)。

3-5. Canstatin は NRCMs における isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する

NRCMs における isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 26; n=7)。Canstatin (250 ng/ml、5 分間前処置)は isoproterenol (10 μ M)誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を有意に抑制した($\Delta F/F_0$; Canstatin: 0.032 ± 0.006 vs. Vehicle: 0.048 ± 0.003 , $P < 0.05$)(図 26)。

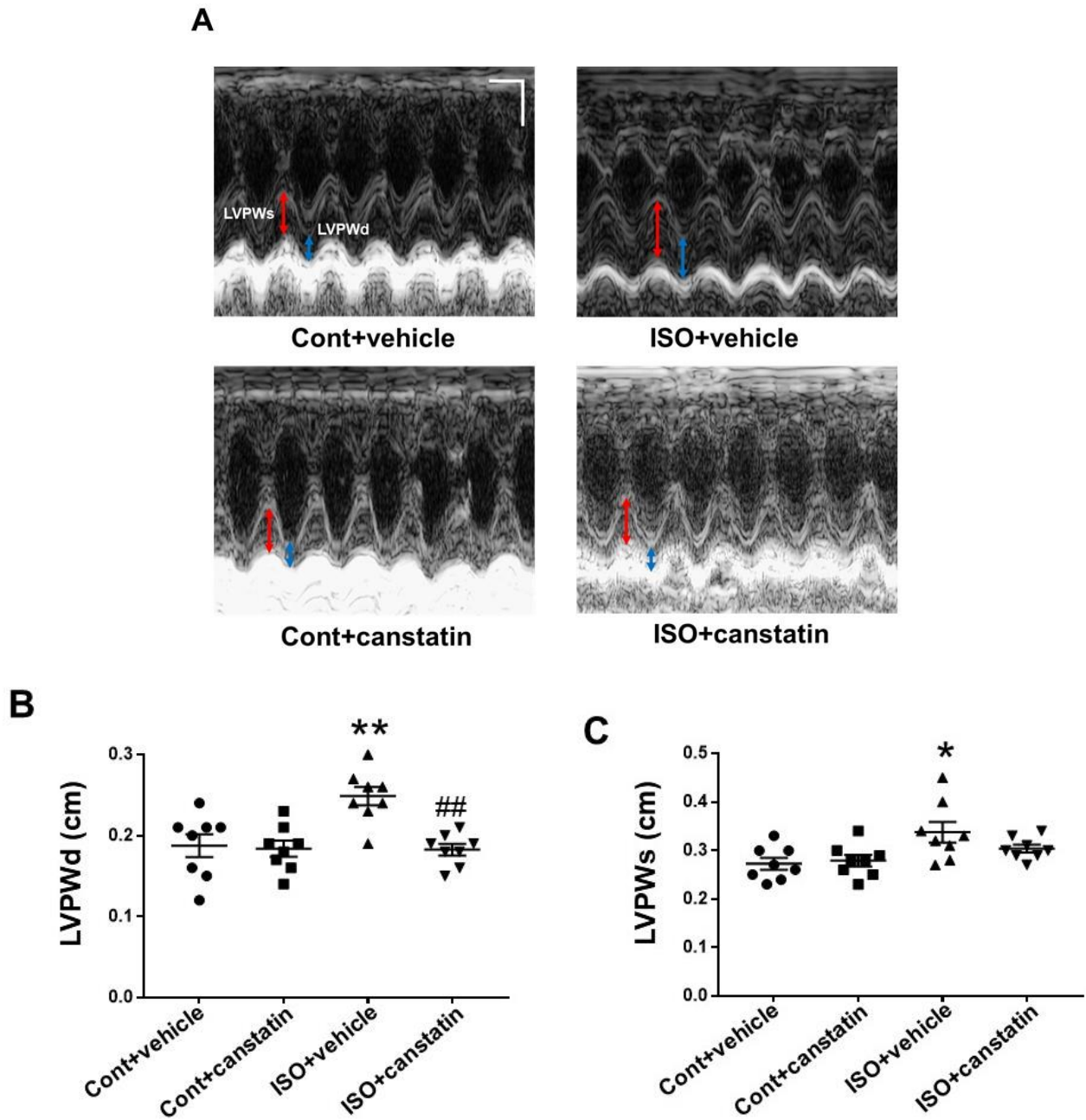


図 21. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左室壁肥厚に及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin

(canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)または溶媒(vehicle)を7日間連日腹腔内投与した。心エコー検査により左室壁厚を検討した。(A)典型的な左心室の乳頭筋レベルの傍胸骨短軸像におけるMモード画像を示した。Scale bar: 100 ms (横軸)、2.5 mm (縦軸)。LVPWd:左室拡張末期自由壁厚(left ventricular posterior wall dimension at end-diastole)(青矢印)。LVPWs:左室収縮末期自由壁厚(left ventricular posterior wall dimension at end-systole)(赤矢印)。(B, C) Canstatin投与後7日目のLVPWd (B)およびLVPWs (C)を定量し平均値 \pm 標準誤差で示した(n=8)。*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. Cont+vehicle, #, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. ISO+vehicle.

	unit	Cont+vehicle	Cont+canstatin	ISO+vehicle	ISO+canstatin
IVSd	cm	0.14±0.01	0.15±0.01	0.19±0.02*	0.17±0.01
LVIDd	cm	0.55±0.02	0.54±0.02	0.51±0.02	0.57±0.02
LVPWd	cm	0.19±0.01	0.18±0.01	0.25±0.01**	0.18±0.01##
IVSs	cm	0.29±0.01	0.28±0.01	0.32±0.03	0.32±0.01
LVIDs	cm	0.21±0.01	0.23±0.01	0.19±0.02	0.20±0.01
LVPWs	cm	0.27±0.01	0.28±0.01	0.34±0.02*	0.30±0.01
FS	%	60.7±1.8	58.0±1.7	64.2±3.2	65.4±2.1
EF	%	92.9±1.0	92.9±1.0	94.0±1.4	94.9±0.9

表 1. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心エコーパラメータに及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin (canstatin: 20 µg/kg) または溶媒 (vehicle) を 7 日間連日腹腔内投与した。IVSd: 心室中隔拡張末期厚 (Interventricular septum at end-diastole), LVIDd: 左室拡張末期径 (Left ventricular internal dimension at end-diastole), LVPWd: 左室拡張末期自由壁厚 (Left ventricular posterior wall dimension at end-diastole), IVSs: 心室中隔収縮末期厚 (Interventricular septum at end-systole), LVIDs: 左室収縮末期径 (Left

ventricular internal dimension at end-systole), LVPWs:左室収縮末期自由壁(Left ventricular posterior wall at end-systole), FS:左室内径短縮率(Fractional shortening), EF:左室駆出率(Ejection fraction).データは平均値±標準誤差で示した(n=8)。

*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. Cont+vehicle; ## $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle.

	unit	Cont+vehicle	Cont+canstatin	ISO+vehicle	ISO+canstatin
TL	cm	13.1±0.3	13.2±0.1	13.3±0.2	13.1±0.3
BW	g	181.5±3.2	174.8±1.7	181.4±2.7	168.3±5.8
HW	mg	612.4±23.3	583.8±10.1	842.6±24.0**	741.7±21.5##
HW/TL	mg/cm	46.9±1.7	44.2±0.7	63.6±1.7**	55.5±1.4##
HW/BW	mg/g	3.4±0.1	3.3±0.1	4.6±0.1**	4.4±0.1
LVW	mg	428.8±16.8	409.0±6.6	604.6±19.0**	517.0±15.4##
LVW/TL	mg/cm	32.8±1.3	31.0±0.5	45.6±1.4**	39.3±1.0##
LVW/BW	mg/g	2.4±0.1	2.3±0.0	3.3±0.1**	3.1±0.0#

表 2. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心重量に及ぼす影響

TL, tail length; BW, body weight; HW, heart weight; HW/TL, HW/TL ratio; HW/BW, HW/BW ratio; LVW, left ventricular weight; LVW/TL, LVW/TL ratio; LVW/BW, LVW/BW ratio. データは平均値±標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle; #, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. ISO+vehicle.

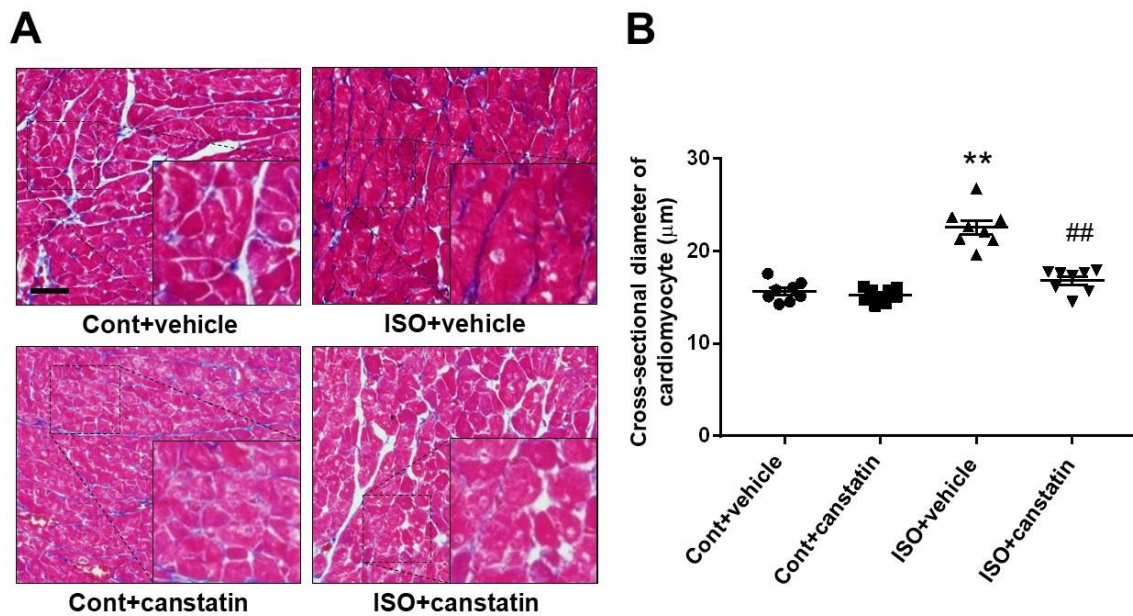


図 22. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルの心筋細胞肥大に及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin (canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または溶媒 (vehicle) を 7 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 7 日目の左心室組織の薄切切片標本を作製し、Azan 染色を行った。(A) Cont+vehicle 群、Cont+canstatin 群、ISO+vehicle 群および ISO+canstatin 群における典型的な左心室の Azan 染色像を示した。Scale bar: 50 μm 。(B) 心筋細胞短径を計測し、平均値 \pm 標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle.

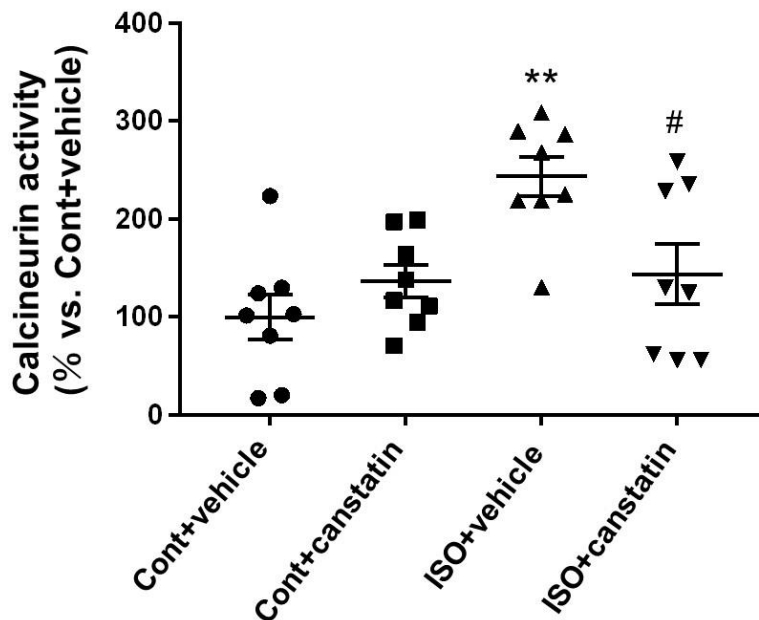


図 23. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの calcineurin 活性に及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg) または溶媒 (vehicle) を 7 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 7 日目の左心室からタンパク質を抽出し、calcineurin 活性測定キットを用いて calcineurin 活性を測定した。Calcineurin 活性の指標である遊離リン酸基レベルを総タンパク質量で補正し、Cont+vehicle 群を 100% として平均値 \pm 標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, # $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle.

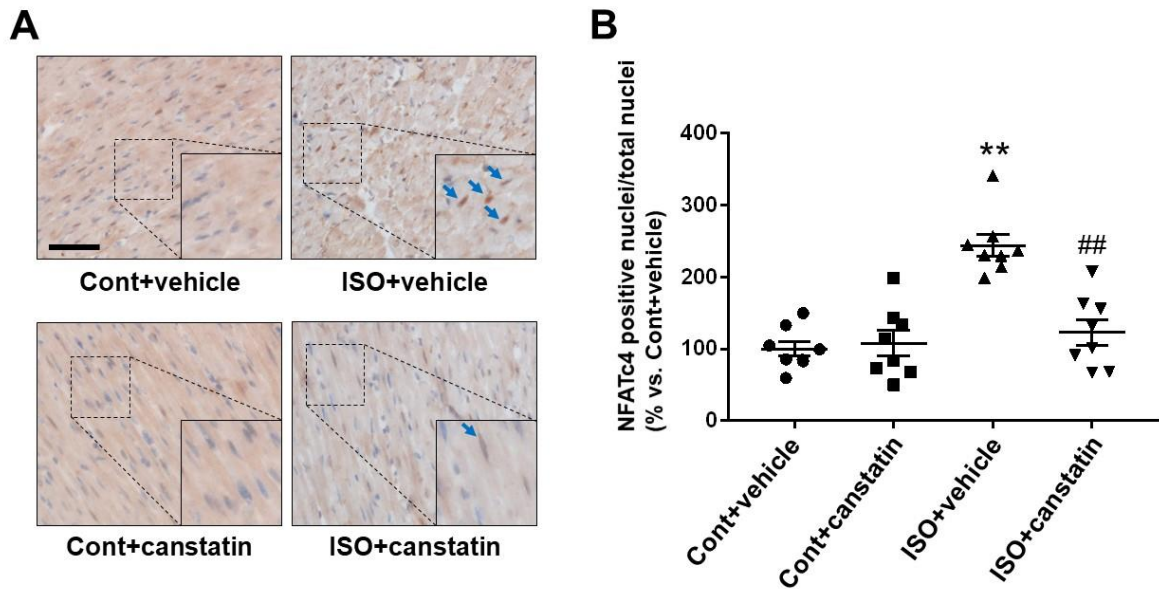


図 24. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの NFATc4 核内移行に及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg) または溶媒 (vehicle) を 7 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 7 日目の左心室組織の薄切切片標本を作製し、抗 NFATc4 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) Cont+vehicle 群、Cont+canstatin 群、ISO+vehicle 群および ISO+canstatin 群における典型的な左心室の抗 NFATc4 抗体陽性像 (茶褐色: 矢印) を示した。Scale bar: 50 μ m. (B) NFATc4 陽性核数 / 全細胞核数比を計測し、Cont+vehicle 群を 100% として平均値 \pm 標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. ISO+vehicle.

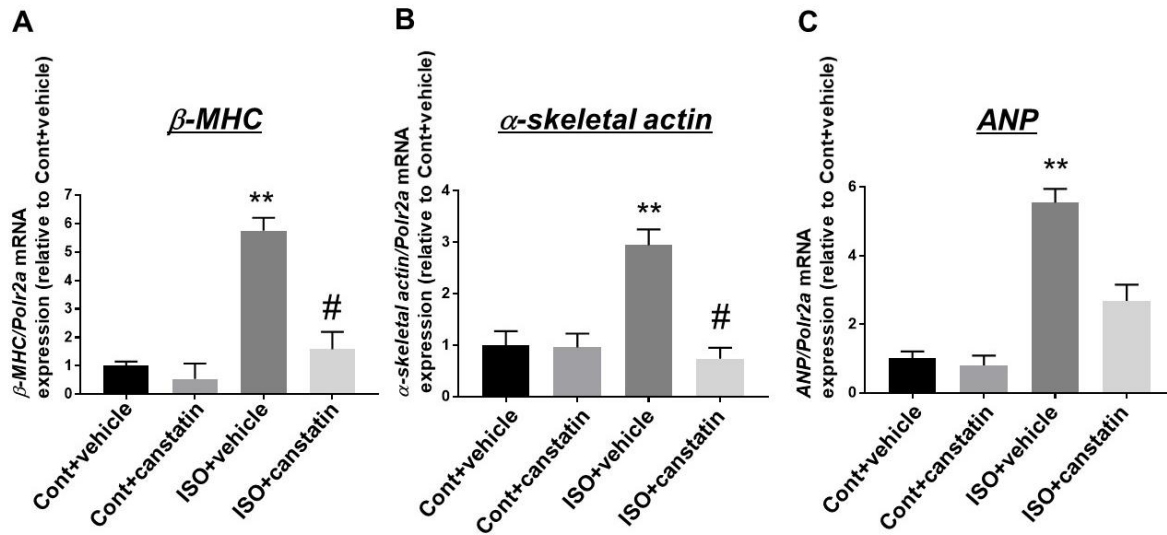


図 25. Recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの心肥大関連遺伝子発現に及ぼす影響

ラットに isoproterenol (ISO: 5 mg/kg) または生理食塩水 (Cont) を 7 日間連日皮下投与し、同時に recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg) または溶媒 (vehicle) を 7 日間連日腹腔内投与した。Canstatin 投与後 7 日目の左心室から RNA を抽出し、real time RT-PCR により β -myosin heavy chain (β -MHC)(A), α -skeletal actin (B) および atrial natriuretic peptide (ANP)(C) の mRNA 発現を検討した。 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて *RNA polymerase II subunit A (Polr2a)* mRNA 発現で補正し、Cont+vehicle 群に対する割合を平均値 \pm 標準誤差で示した (n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, # $P < 0.05$ vs. ISO+vehicle.

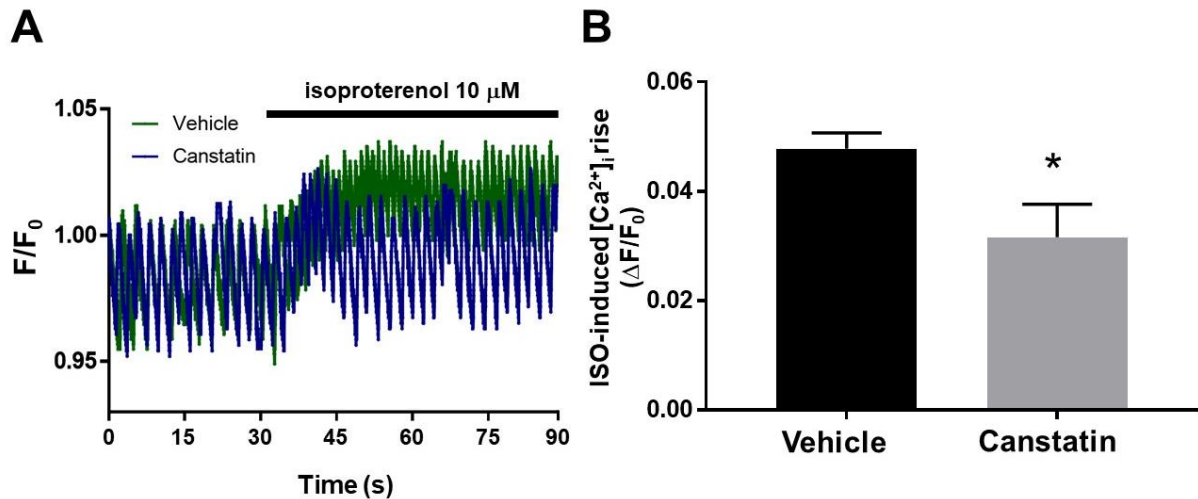


図 26. Recombinant canstatin が新生仔ラット心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes: NRCMs) の isoproterenol 誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇に及ぼす影響

カバーガラスに播種した NRCMs に recombinant canstatin (Canstatin: 250 ng/ml) または溶媒 (Vehicle) を 5 分前処置した後に isoproterenol (10 μM 、60 秒間) で刺激した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は Fura2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM) を用いて測定した。F340/F380 (F) を算出し、isoproterenol 刺激 30 秒前の基底状態 (F_0) で標準化した (F/F_0)。(A) 典型的な F/F_0 の時間経過を示した。(B) Isoproterenol 誘導性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇による F/F_0 変化率 ($\Delta F/F_0$) の最大値を平均値 \pm 標準誤差で示した ($n=7$)。* $P < 0.05$ vs. Vehicle.

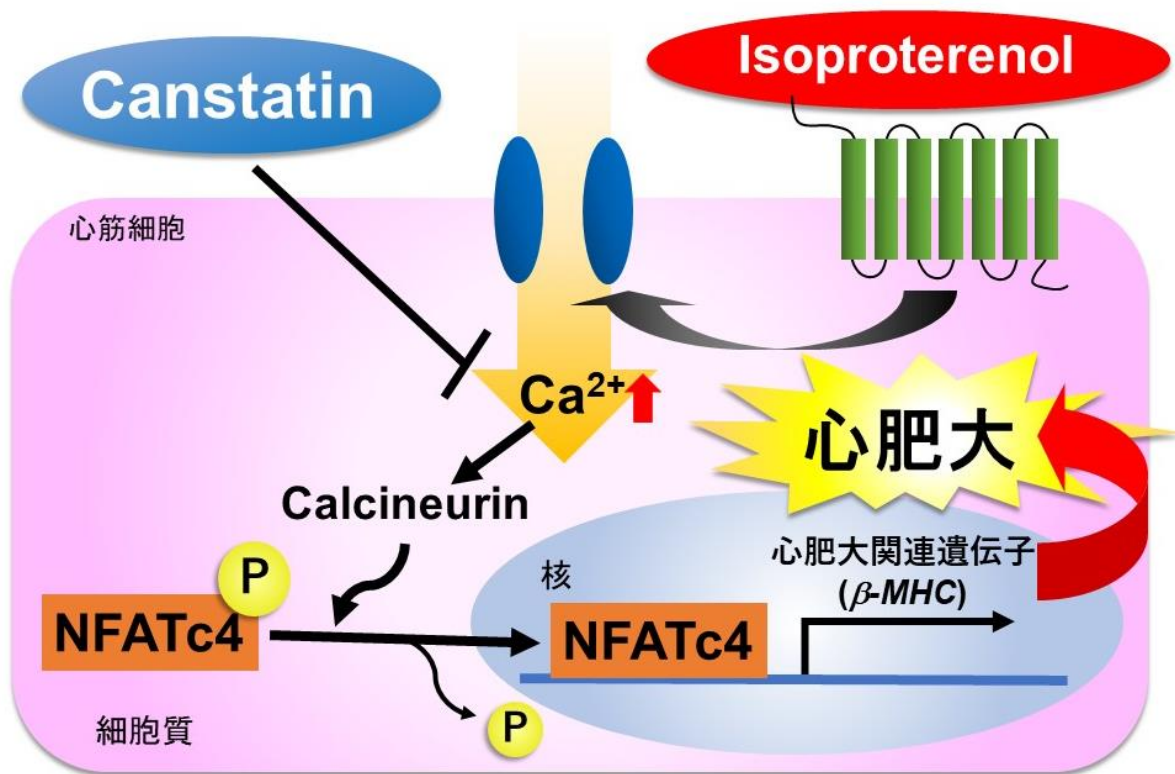


図 27. 第三章のまとめ

Recombinant canstatin 投与は isoproterenol 誘発心肥大モデルラットにおける心重量増加、心筋細胞肥大、calcineurin 活性化、NFATc4 の核内移行および心肥大関連遺伝子 mRNA 発現増加を抑制した。また canstatin は心筋細胞における isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制したことから、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇/calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介して抗心肥大作用を示すことが示唆された [112]。

4. 考察

本章では、isoproterenol 誘発心肥大モデルラットに対する recombinant canstatin 投与が心重量増加、心筋細胞肥大、calcineurin 活性化、NFATc4 の核内移行および心肥大関連遺伝子 mRNA 発現増加を抑制することを初めて明らかにした。また NRCMs において canstatin が isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制したことから、canstatin の抗心肥大作用が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇/calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介することが示唆された(図 27)。

Recombinant canstatin 投与は isoproterenol による左室壁肥厚や心重量の増加および心筋細胞肥大を抑制した(図 21、表 1、表 2、図 22)。心筋細胞肥大は力学的ストレスやホルモン刺激、酸化的ストレスなどの様々な病的ストレスにより誘発される[94]。Ca²⁺シグナルは様々な細胞内シグナル経路に深く関与しており、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇による calcineurin 活性化が心筋細胞の肥大化において重要な役割を果たす[18, 107]。特に活性化した calcineurin により脱リン酸化された NFATc4 は核内移行し、β-MHC をはじめとした心肥大関連遺伝子の転写を促進する[50, 62]。第二章では、recombinant canstatin 投与が心筋梗塞モデルラット非梗塞領域の心筋細胞における NFATc4 核内移行を抑制することを明らかにした。またこれまでに canstatin が H9c2 ラット心筋芽細胞において isoproterenol 誘導性 NFATc4 脱リン酸化を抑制することを明らかにしている[73]。本章では recombinant canstatin 投与は isoproterenol による左心室の calcineurin 活性化

(図 23)や NFATc4 の核内移行(図 24)を抑制し、さらに β -MHC、 α -skeletal actin および ANP mRNA といった心肥大関連遺伝子の発現量増加を抑制した(図 25)。Zou らは isoproterenol による β -アドレナリン受容体刺激が心筋細胞の LTCC 活性を増強することを報告している[138]。一方、これまでに canstatin がラット心室筋細胞の LTCC 活性を抑制することが明らかとなっている[34]。また本章の NRCMs を用いた *in vitro* 実験において、canstatin は isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した(図 26)。以上のことから、canstatin の抗心肥大作用機序の一部は、LTCC 活性制御による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇抑制を介した calcineurin/NFATc4 経路の遮断であることが示唆された。

結論として第三章では、recombinant canstatin 投与が isoproterenol 誘発心肥大モデルラットにおいて calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介して抗心肥大作用を示すことを明らかにした。第二章において recombinant canstatin を投与した心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域で同様の保護作用が認められており、本研究によって canstatin の抗心肥大作用機序の一部が解明された。

V. 第四章

I/R 誘発心室性不整脈に対する **canstatin** の保護作用

1. 緒言

冠動脈インターベンションや血栓溶解療法などの再灌流療法は、急性心筋梗塞発症後に閉塞した冠動脈を速やかに再開通させることで梗塞領域を縮小させる治療法である。これら再灌流療法は急性心筋梗塞治療の第一選択肢であるが[28, 67, 115]、重篤な合併症としてさらなる心筋細胞死や不整脈を誘発し予後を悪化させる I/R 障害が問題となっている[67, 132]。急性心筋梗塞患者の 80%以上で再灌流療法後 48 時間以内に心室頻拍(ventricular tachycardia: VT)や心室細動(ventricular fibrillation: VF)などを含む不整脈が発生することが報告されている[132]。再灌流療法に伴い発生する不整脈の予防は急性心筋梗塞治療において非常に重要であると考えられるが、未だその手法は確立されていない[28]。

I/R 障害により発生した活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は、心筋細胞において LTCC、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: NCX)、リアノジン受容体(ryanodine receptor: RyR)および筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: SERCA)などの Ca^{2+} 制御タンパク質の調節を介して過剰な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす[1, 23, 40, 105]。心筋細胞の過剰な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は不整脈発生の引き金となる早期後脱分極(early afterdepolarization: EAD)や遅延後脱分極(delayed afterdepolarization: DAD)を惹起する[40, 46, 52, 105]。LTCC 阻害薬 verapamil は Vaughan Williams 分類の IV 群に分類される抗不整脈薬であるが[47, 84]、心不全の悪化などの有害作用がいくつ

か報告されており、急性心筋梗塞の早期治療における有用性については未だに議論されている[47, 84]。

これまでに *COL4A2* siRNA 投与により *canstatin* 発現を抑制したラットの心電図(electrocardiogram: ECG)において QT 間隔が短縮し、T 波が増高することを明らかにしている[34]。同ラット由来心室筋細胞では LTCC 活性が亢進しており、*canstatin* はこれを抑制する[34]。また第三章において *canstatin* が NRCMs の *isoproterenol* 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することを明らかにした。以上のことから、*canstatin* が心筋細胞において Ca^{2+} 制御機構を調節することが考えられる。そこで第四章では、*recombinant canstatin* の急性投与が I/R 誘発心室性不整脈を Ca^{2+} 制御機構の調節を介して抑制するとの仮説を立て、モデルラットを用いて検証した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 試薬

Recombinant マウス *canstatin* [第二章 2-2-1 の項に準じて作製し、透析により溶媒を PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) に置換した], *verapamil*, *tempol* (Sigma-Aldrich), *gp91 ds-tat* (Eurogentec, Seraing, Belgium) および H_2O_2 (関東化学工業株式会社、東京)。

2-1-2. 使用動物

すべての動物実験は北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 18-019 および 19-126)、同大学のガイドラインを遵守して行った。実験には 10 週齢または 1-3 日齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用し、学部内 5 号館 2 階の実験動物飼育室または 9 号館 3 階のラット飼育室で固形飼料(CE2;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. I/R 誘発心室性不整脈モデルの作製

Ozer らの方法に従い I/R 誘発心室性不整脈モデルラットを作製した [77]。ウレタン (Sigma-Aldrich: 1.4 g/kg) の腹腔内投与による麻酔下で 10 週齢の Wistar ラットに気管挿管を行い、ベンチレーター (MODEL SN-480-7; シナノ製作所) を用いて人工換気下 (呼吸数: 80 回/分、換気量: 5 cc/回) においた。静脈内投与経路の確保のため鼠径部皮膚を切開し、伏在静脈に 1% ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを挿入した。左胸部第 3-4 肋間より開胸し、左肺および胸腺を避けて心臓を露出させ心膜の一部を切開した後、3-Lead Shielded Bio Amp Cable (MLA2340; AD Instruments, Colorado Springs, CO, U.S.A.) に接続した Spring Clip Electrodes (MLA1210; AD Instruments) を右腋下部 (陰極)、左胸部 (陽極) と右鼠径部 (アース) の皮膚に設置した。ECG 記録は Bio Amp (FE132; AD Instruments) と PowerLab システム (ML825; AD Instruments) を用いて II 誘導で行い、専用ソフトウェア (LabChart Pro version 8.1.16; AD Instruments) を用いてデータを解析した。6-0 ナイロン

糸を左冠動脈前下行枝の下をくぐらせ、糸の両端をポリエチレンチューブの中に通した。Recombinant canstatin (20 µg/kg)、等容量の溶媒(PBS)または陽性対照用の verapamil (0.63 mg/kg)を伏在静脈から前投与し、5分後にポリエチレンチューブ中の糸を絞り込み、モスキート鉗子で固定することにより冠動脈を結紮して虚血状態にした。結紮から10分後に糸を緩めることで再灌流し、その後10分間における心室性不整脈(VTおよびVF)の発生回数と発生時間を記録した。

2-2-2. NRCMs の単離

第三章 2-2-7 の項に準じて 1-3 日齢の Wistar ラットから NRCMs を単離した。NRCMs は 2-2-4 の lucigenin assay に用いる場合にはゼラチンコーティングした培養プレートに、2-2-5 の 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 染色または 2-2-6 の $[Ca^{2+}]_i$ 測定に用いる場合にはゼラチンコーティングしたカバーガラス上に播種した。線維芽細胞の増殖を抑制するため、NRCMs は実験に用いるまで 100 µM bromodeoxyuridine を添加した 10% FBS 加高グルコース DMEM 中で培養した。

2-2-3. Oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) 刺激

安田らの方法に従い NRCMs に OGD/R 刺激を行い *in vitro* 実験で I/R 障害を再現した [135]。2-2-2 で播種した NRCM を無血清の高グルコース DMEM 中で 24 時間血清飢餓状態にした後に、培地を無血清のグルコースフリー DMEM に交換し、低酸素条件下 (1% O₂、5% CO₂、37 °C) で 10 分間培養した (OGD)。その後無血清の

高グルコース DMEM に交換し、正常酸素条件下 (20% O₂、5% CO₂、37 °C) で 5 分間培養した (R)。対照群 (Cont) の細胞は実験を通して無血清の高グルコース DMEM 中で正常酸素条件下 (20% O₂、5% CO₂、37 °C) で培養したが、OGD/R 刺激における培地交換と同時に培地交換のみ実施した。Recombinant canstatin (250 ng/ml)、溶媒 (PBS)、gp91 ds-tat (2.5 μM) または tempol (1 mM) は実験を通して培地中に添加した。OGD/R 刺激後、NRCMs は 2-2-4 の lucigenin assay または 2-2-5 の DCF-DA 染色に用いた (図 28)。

2-2-4. Lucigenin assay

向田らの方法に従い lucigenin assay により nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) 活性を測定した [64]。第 2 章 2-2-12 の項に準じて 2-2-3 で OGD/R 刺激した NRCMs にプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) を添加した細胞溶解液 (Cell Lysis Buffer; Cell Signaling Technology) を 10 分間処置し可溶化した後に、10 分間遠心分離 (13,000 rpm、4 °C) し、タンパク質抽出液を得た。タンパク質濃度の定量は BCA 法 (BCA Protein Assay Kit; Pierce) により行った。10 μM lucigenin および 1 mM NADPH を添加したリン酸緩衝液 (50 mM NaH₂PO₄/NaHPO₄, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 150 mM sucrose, pH 7.0) に等量 (20 μg) のタンパク質抽出液を加え (総量 200 μl)、マイクロプレートリーダー (TriStar; Berthold Technologies) を用いて 37 °C で 30 分間化学発光を測定した。化

学発光量(relative light units per second: RLU/s)は 10 秒毎に取得し、時間曲線下面積(area under the curve)を算出した。

2-2-5. DCF-DA 染色

安田らの方法に従い DCF-DA 染色により ROS 産生能を評価した[135]。2-2-3 で OGD/R 刺激した NRCMs に 10 μ M DCF-DA (Invitrogen)を添加した HEPES-Tyrode 溶液を加えて CO₂ インキュベーター(5% CO₂、37 °C)内で 30 分間反応させた。CCD カメラ(DP74; OLYMPUS)を接続した蛍光顕微鏡(BX-51; OLYMPUS)により観察し、画像を取得した。蛍光強度を画像解析ソフト(Image J software version 1.52a; National Institutes of Health)を用いて定量した。

2-2-6. [Ca²⁺]_i 測定

第三章 2-2-8 の項に準じて 2-2-2 でカバーガラス上に播種した NRCMs を用いて [Ca²⁺]_i 測定を行った。NRCMs は canstatin (250 ng/ml)、溶媒の PBS または tempol (1 mM)を 10 分前処置した後に H₂O₂ (100 μ M、30 分間)で刺激した。H₂O₂ 刺激後の F を H₂O₂ 刺激 30 秒前の基底状態の値 (F₀)で標準化した (F/F₀)。

2-3. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。統計評価は 2 群間の比較には Student の *t* 検定を行った(図 29B)。3 群間以上の比較には一元配置分散分析後に Bonferroni の post-hoc 検定(図 30A, B、図

31、図 32B)を行った。危険率 5%以下 ($P<0.05$)を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. Canstatin は I/R 誘発心室性不整脈を抑制する

最初にラットの I/R 誘発心室性不整脈に及ぼす canstatin の影響を検討した(図 29)。全てのラットの ECG 波形において虚血前は洞調律であり、冠動脈結紮による虚血下では顕著な ST 上昇を示すことを確認した(図 29A)。全ての PBS 投与ラット(5/5)において再灌流後に VT または VF が発生した(図 29A; n=5)。

Recombinant canstatin 投与ラットの 80% (4/5)において VT が発生したが、VF は認められなかった(図 29A; n=5)。Verapamil 投与ラットでは心室性期外収縮は認められたが、VT および VF は発生しなかった(図 29A; n=3)。Canstatin は心室性不整脈(VT および VF)の発生頻度には影響を及ぼさなかったが、合計発生時間(Canstatin: 10.5 ± 3.4 秒 vs. PBS: 60.7 ± 16.9 秒, $P<0.05$)および平均発生時間(Canstatin: 4.2 ± 2.0 秒 vs. PBS: 18.2 ± 3.0 秒, $P<0.01$)を有意に減少させた(図 29B; n=5)。

3-2. Canstatin は NRCMs における OGD/R 誘導性 NOX 活性化を抑制する

I/R 誘発心室性不整脈に対する canstatin の保護作用の機序を解明するために、*in vitro* で NRCMs に OGD/R 刺激を行った(図

28)。I/R 障害は心筋組織において ROS の主要な産生源である NOX を活性化することが知られている [23]。そこで NRCM において OGD/R 誘導性 NOX 活性化に及ぼす canstatin の影響を lucigenin assay により検討した (図 30)。OGD/R 刺激は NOX を有意に活性化し (OGD/R: $144.2 \pm 4.0\%$ vs. Cont, $P < 0.05$)、canstatin はこれを有意に抑制した (+canstatin: $105.6 \pm 17.7\%$, $P < 0.05$ vs. OGD/R) (図 30A; n=6)。また NOX 阻害薬 gp91 ds-tat および抗酸化薬 tempol が OGD/R 誘導性 NOX 活性化を抑制することを確認した (+gp91 ds-tat: $96.4 \pm 5.8\%$, +tempol: $89.6 \pm 4.0\%$, $P < 0.01$ vs. OGD/R) (図 30B; n=4)。

3-3. Canstatin は NRCMs における OGD/R 誘導性 ROS 産生を抑制する

ROS 産生は I/R 誘発不整脈と密接に関わっている [1, 40]。そこで NRCMs における OGD/R 誘導性 ROS 産生に及ぼす canstatin の影響を DCF-DA 染色により検討した (図 31; n=6)。OGD/R 刺激は NRCMs の ROS 産生を有意に亢進し (OGD/R: $784.5 \pm 156.3\%$ vs. Cont, $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した (+canstatin: $155.4 \pm 30.1\%$, $P < 0.01$ vs. OGD/R) (図 31)。

3-4. Canstatin は NRCMs における H_2O_2 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制する

ROS による心筋細胞の過剰な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は心室性不整脈を誘発する原因となる [1, 40, 105]。そこで、NRCMs における H_2O_2 (100 μ M) 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に及ぼす canstatin の影響を検討した

(図 32; Cont および Canstatin: n=9, Tempol: n=7)。H₂O₂ は NRCMs の [Ca²⁺]_i 上昇を誘導し、canstatin はこれを有意に抑制した (Canstatin: 0.079±0.010 vs. Cont: 0.107±0.009, *P*<0.05)(図 32)。また、抗酸化薬 tempol が H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇を抑制することを確認した (Tempol: 0.061±0.008 vs. Cont, *P*<0.01)(図 32)。

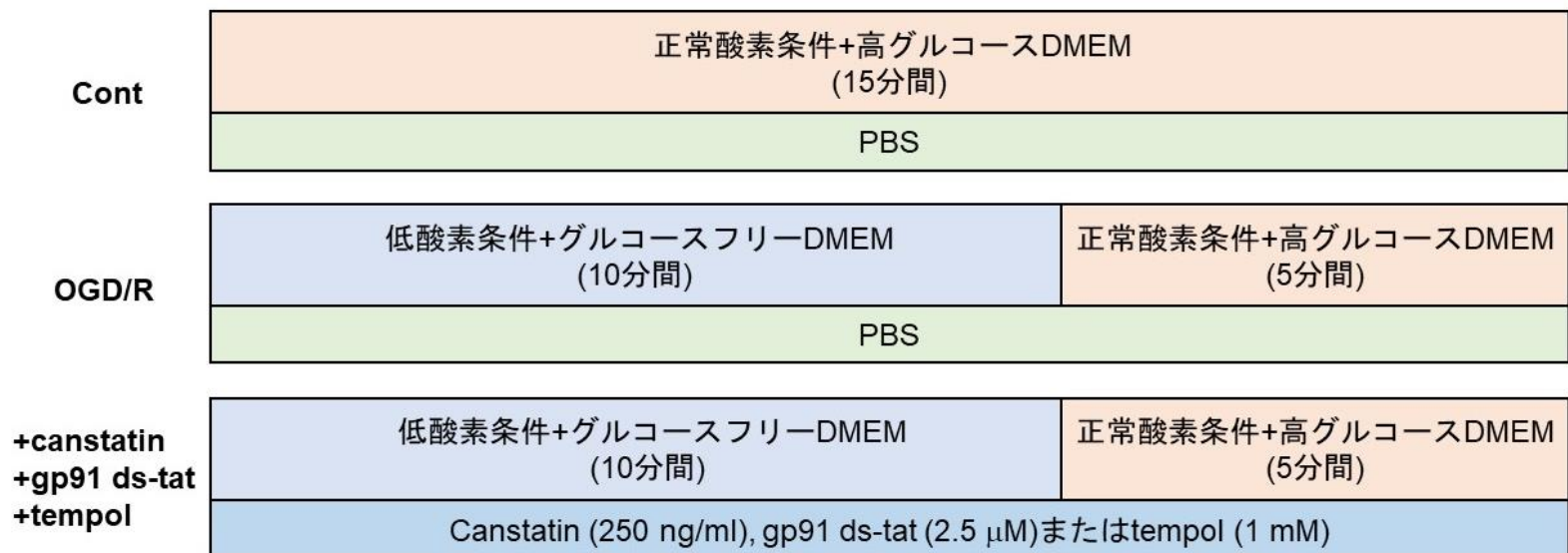
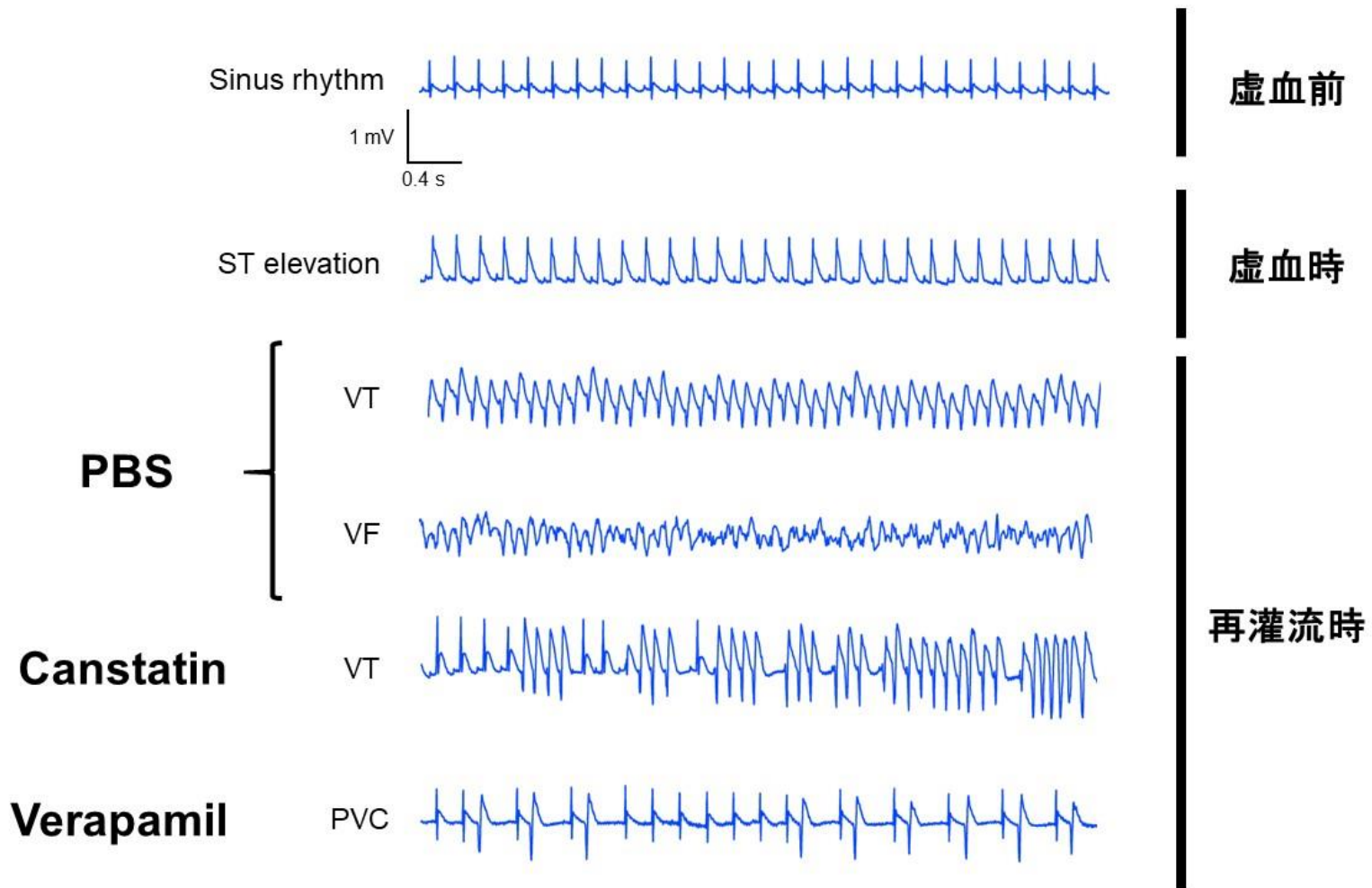


図 28. NRCMs における oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) 刺激プロトコール

OGD/R 刺激前に NRCMs を無血清の高グルコース Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で 24 時間血清飢餓状態にした。(上段: Cont) NRCMs は高グルコース DMEM 中、正常酸素条件下 (20% O₂、5% CO₂、37 °C) で 15 分間培養した (10 分間培養後に培地交換のみ実施)。溶媒の phosphate buffered saline (PBS) は実験を通して培地中に添加した。(中段: OGD/R) NRCMs はグルコースフリー DMEM 中、低酸素条件下 (1% O₂、5% CO₂、37 °C) で 10 分間培養後に (OGD)、高グルコース DMEM 中、正常酸素条件下 (20% O₂、5% CO₂、37 °C) で 5 分間培養した (R)。溶媒の PBS は実験を通して培地中

に添加した。(下段)(中断)と同様に NRCMs を OGD/R 刺激した。Recombinant canstatin (+canstatin: 250 ng/ml), gp91 ds-tat(+gp91 ds-tat: 2.5 μ M)または tempol (+tempol: 1 mM) は実験を通して培地中に添加した。

A



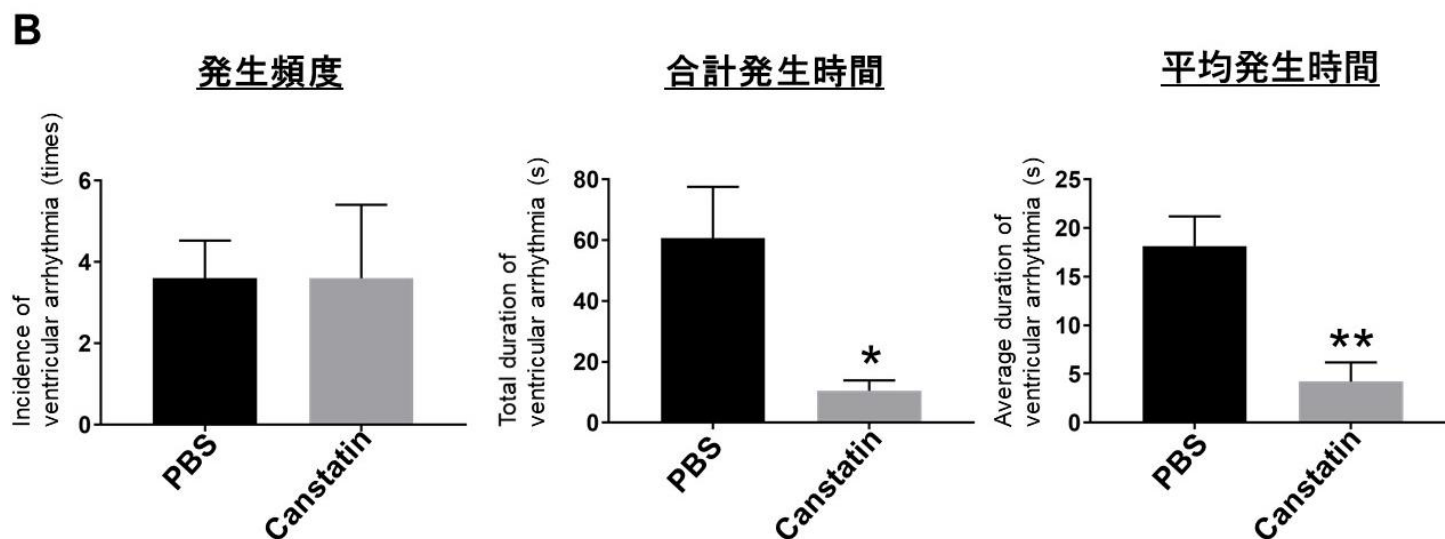


図 29. Recombinant canstatin 投与が虚血/再灌流 (ischemia/reperfusion: I/R) 誘発心室性不整脈に及ぼす影響

Recombinant canstatin (Canstatin: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、溶媒 (PBS)、陽性対照用の verapamil (Verapamil: 0.63 mg/kg) を冠動脈結紮の 5 分前に静脈内投与した。左冠動脈前下行枝を 10 分間結紮することにより虚血状態とし、結紮を解除することで I/R 障害を誘導した。心電図 (electrocardiogram: ECG) は II 誘導で実験を通して記録した。(A) 虚血前の洞調律 (Sinus rhythm)、虚血中の ST 上昇 (ST elevation)、再灌流時の PBS、canstatin および verapamil 投与ラットの典型的な ECG 波形を示した (PBS: $n=5$, Canstatin: $n=5$, Verapamil: $n=3$)。VT: 心室頻拍 (ventricular tachycardia), VF: 心室細動 (ventricular

fibrillation), PVC:心室性期外収縮 (premature ventricular contraction). (B) ECG 記録から再灌流後 10 分間の心室性不整脈 (VT および VF) の発生頻度 (左)、合計発生時間 (中央) および平均発生時間 (右) を定量し、平均値 \pm 標準誤差で示した (n=5)。

*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. PBS

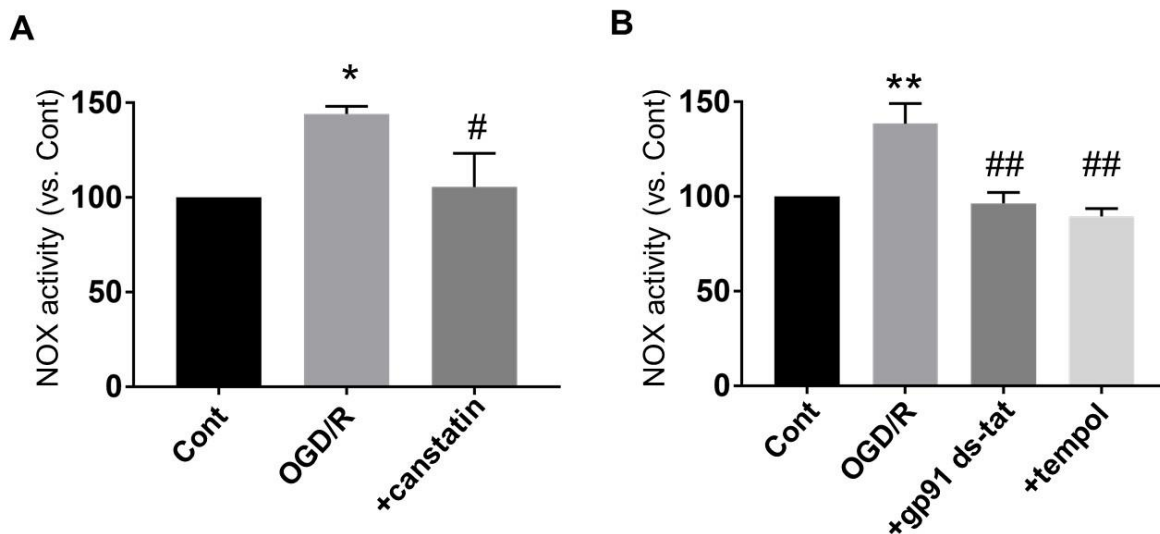


図 30. Recombinant canstatin が NRCMs において OGD/R 誘導性 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX)活性化に及ぼす影響

NRCMs を OGD/R で刺激した(図 28 のプロトコールを参照)。対照群の細胞は高グルコース DMEM 培地中、正常酸素条件下で培養した(Cont; A, B)。溶媒の PBS (Cont, OGD/R; A, B)、recombinant canstatin (+canstatin: 250 ng/ml; A)、gp91 ds-tat (+gp91 ds-tat: 2.5 μ M; B)または tempol (+tempol: 1 mM; B)は OGD/R 刺激の間、培地中に添加した。刺激後に細胞からタンパク質を抽出し、NOX 活性を lucigenin assay により測定した。化学発光量(relative light units per second: RLU/s)を 30 分間測定した後、時間曲線下面積(area under the curve)を算出し、Cont を 100%として平均値 \pm 標準誤差で示した(A: n=6, B: n=4)。

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

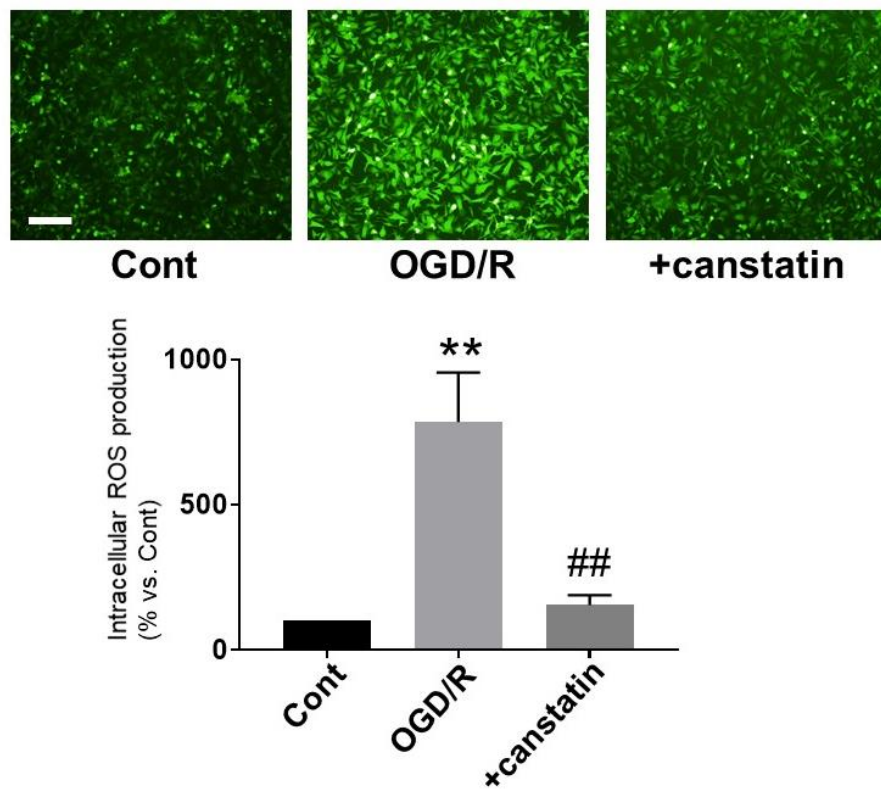


図 31. Recombinant canstatin が NRCMs において OGD/R 誘導性活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 産生に及ぼす影響

NRCMs を OGD/R 刺激した (図 28 のプロトコールを参照)。対照群の細胞は高グルコース DMEM 培地中、正常酸素条件下で培養した (Cont)。溶媒の PBS (Cont, OGD/R) または recombinant canstatin (+canstatin: 250 ng/ml) は OGD/R 刺激の間、培地中に添加した。刺激後、細胞に 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA: 10 μ M) を 30 分間処置し、ROS 産生を検出した。(上図) 典型的な DCF-DA 染色像を示した。Scale bar: 100 μ m. (下図) DCF-DA 染色の蛍光強度を定量し、Cont を 100% として平均値 \pm 標準誤差で示した (n=6)。** P <0.01 vs. Cont, ## P <0.01 vs. OGD/R.

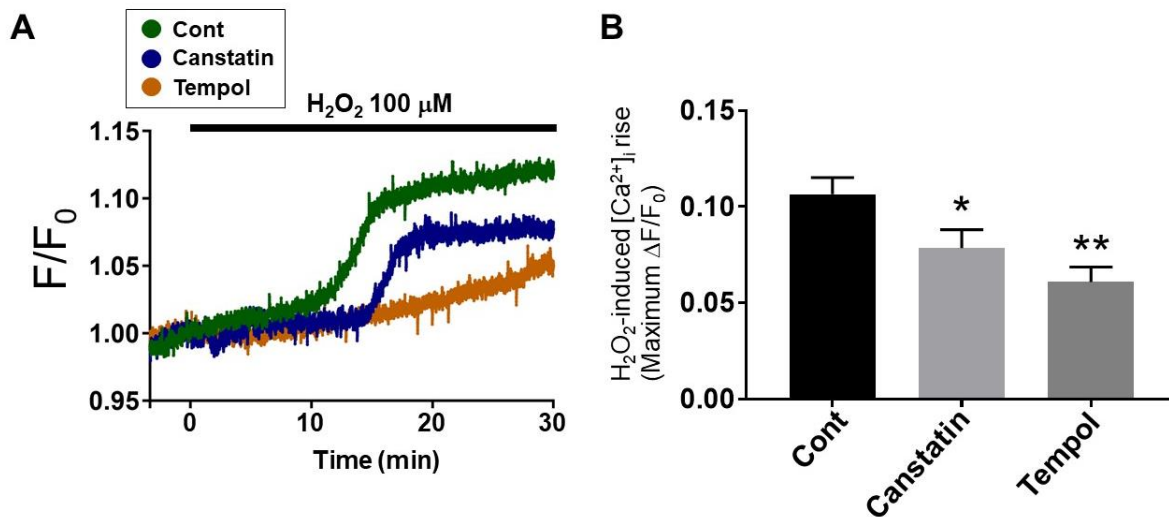


図 32. Recombinant canstatin が NRCMs において H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇に及ぼす影響

NRCMs に recombinant canstatin (Canstatin: 250 ng/ml)、溶媒の PBS (Cont) または tempol (Tempol: 1 mM) を 10 分間前処置した後、H₂O₂ (100 μM、30 分間) で刺激した。[Ca²⁺]_i は Fura2-AM を用いて測定した。F340/F380 (F) を算出し、H₂O₂ 刺激 30 秒前の基底状態 (F₀) で標準化して示した (F/F₀)。 (A) 典型的な F/F₀ の時間経過を示した。 (B) H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇による F/F₀ 変化率 (ΔF/F₀) の最大値を平均値 ± 標準誤差で示した (Cont および Canstatin: n=9, Tempol: n=7)。 *, **P<0.05, 0.01 vs. Cont.

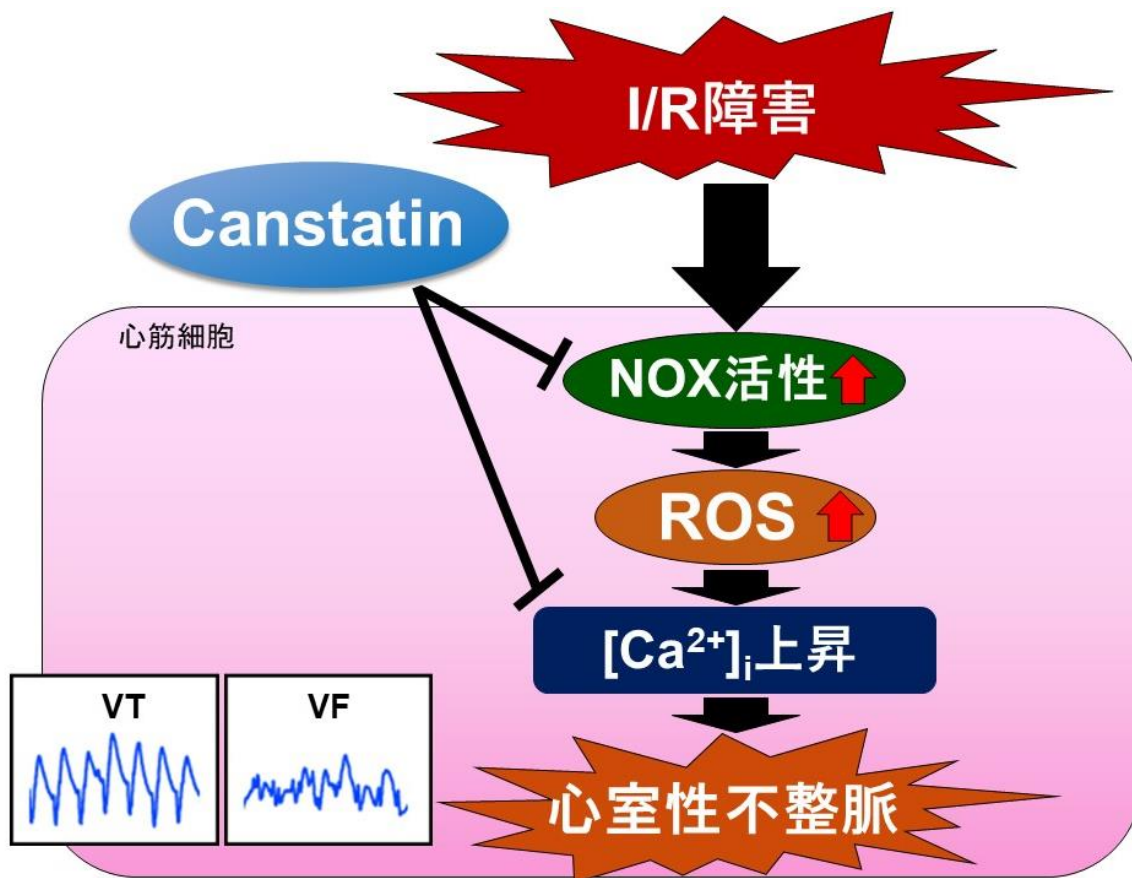


図 33. 第四章のまとめ

Recombinant canstatin 投与は I/R 誘発心室性不整脈モデルラットにおける心室性不整脈を抑制した。また canstatin が心筋細胞における OGD/R 誘導性 NOX 活性化および ROS 産生、そして H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇を抑制することを明らかにし、これらの作用により canstatin が抗不整脈作用を示すことが示唆された。

4. 考察

本章では、I/R 誘発心室性不整脈モデルラットに対する recombinant canstatin 投与が心室性不整脈を抑制することを初めて明らかにした。また NRCMs において canstatin が OGD/R 誘導性 NOX 活性化と ROS 産生、そして H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇を抑制することを明らかにし、これらが canstatin の抗不整脈作用機序の一部であることが示唆された(図 33)。

ST 上昇は I/R 誘発不整脈モデルラットの虚血時に認められる特徴的な ECG 波形である[97]。本章において冠動脈結紮による虚血時に ST 上昇が確認された(図 29A)。また、他の報告[16, 56, 77]と同様に、再灌流後に典型的な VT および VF の発生が PBS 投与ラットにおいて観察されたことから(図 29)、本章の I/R 誘発心室性不整脈モデルラットは適切に作製されたと考えられる。

Recombinant canstatin 投与は再灌流後の VF の発生を抑制し、心室性不整脈の発生時間を減少させた(図 29)。NOX は I/R 障害後の心臓における ROS の主要な産生源である[23]。ROS は I/R 障害に深く関与しており、心筋細胞の過剰な [Ca²⁺]_i 上昇を介して心室性不整脈を誘発する[1, 40, 105]。本章では NRCMs を用いた *in vitro* 実験において canstatin は OGD/R 誘導性 NOX 活性化および ROS 産生を抑制した(図 30、図 31)。産生された ROS は心筋細胞の LTCC、NCX および RyR などの Ca²⁺ 制御タンパク質を調節することで [Ca²⁺]_i 上昇を誘導する[1, 40, 105]。本章では、canstatin が NRCMs における H₂O₂ 誘導性 [Ca²⁺]_i 上昇を抑制することを明らかにした(図 32)。第三章において canstatin は NRCMs

の isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することを明らかにしている。また、これまでに canstatin がラット心室筋細胞の LTCC 活性を抑制することを報告している [34]。以上のことから、canstatin は I/R による NOX の活性化を抑制することで ROS 産生を抑制するだけでなく、ROS による心筋細胞の過剰な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することで抗不整脈作用を示す可能性が考えられた。

本章において陽性対照として投与した verapamil は I/R 誘発心室性不整脈の発生を完全に抑制した (図 29)。Verapamil などの Ca^{2+} 拮抗薬は上室性不整脈に対して臨床で用いられているが [47, 78]、心不全症状の悪化などの有害作用についても報告されており、急性心筋梗塞の早期治療における有用性は議論されている [47, 84]。第一章において canstatin は健常ラットの心臓に高発現しており、その他全身臓器にも広く発現することを明らかにした。また第二章において recombinant canstatin 長期投与は健常ラットの心機能には影響を及ぼさず、心筋梗塞モデルラットの生存率や心機能低下を改善した。以上のことから、recombinant canstatin の投与は副作用が少なく、心筋梗塞後の心機能不全を悪化させることなく抗不整脈作用を発揮する可能性が考えられた。

結論として第四章では、recombinant canstatin 投与が I/R 誘発心室性不整脈モデルラットに対して NOX 活性化による ROS 産生や $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することにより抗不整脈作用を示すことを明らかにした。このことから、I/R 誘発心室性不整脈モデルにおいて canstatin が保護的に働くことが初めて明らかとなった。

VI.第五章

Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける canstatin の
保護作用および血漿 canstatin 濃度と病態進展の関連

1. 緒言

肺動脈性肺高血圧症は肺動脈の肥厚・狭窄など血管リモデリングによる異常な肺動脈圧亢進を特徴とする予後不良の進行性疾患であり[5]、我が国では難病に指定されている[難病の患者に対する医療等に関する法律第5条第1項(平成27年施行)]。本疾患における肺動脈圧亢進による右心室への持続的な圧負荷は右心肥大や線維化といった病的な右心リモデリングを誘発し、最終的には致死的な右心不全へと至る[121, 122]。現在、肺動脈性肺高血圧症の治療には肺動脈圧低下を主目的として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、プロスタサイクリン製剤や可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬などの血管拡張薬が使用されており、一定の予後改善効果が得られている[61, 117]。しかしながら、肺動脈性肺高血圧症の重篤な合併症である右心不全を標的とした有効な治療法は未だ確立されておらず、その致死率は未だ高いまま推移している[7, 117]。一方、肺動脈性肺高血圧症の診断バイオマーカーとして現在BNPやN-terminal (NT)-proBNPが用いられているが[82]、より正確な病態のステージ分類やリスク層別化には複数のバイオマーカーによる診断が必要とされており[82]、新規バイオマーカーの探索が行われている。

Canstatinは血管内皮細胞の増殖抑制を介して抗血管新生作用を示すことが報告されている[41]。肺動脈性肺高血圧症の発症・進展における肺動脈内腔狭窄の原因の一つに肺動脈内皮細胞の異常増殖がある[5]。このことから、canstatinが肺動脈内皮細胞に作用し、肺高血圧症の発症・進展を防ぐ可能性が考えられた。一

方、第二章および第三章の結果から、recombinant canstatin の長期投与が左心室の心肥大や線維化などの心リモデリングを抑制することが明らかとなった。このことから、右心リモデリングに対しても canstatin が保護的に働く可能性が考えられた。そこで第五章では、recombinant canstatin の長期投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺高血圧や右心リモデリングに及ぼす影響を調べることにより、その心保護作用を検討した。

第一章において、canstatin が心臓や腎臓、肺などの全身臓器に広く発現していることを明らかにした。また心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において canstatin 発現は減少しており、他の心疾患においても canstatin 発現レベルが変動することが予想された。しかしながら現在のところヒトや動物における血中 canstatin 濃度やそれが心疾患の発症・進展に伴い変動するかは全く検討されていない。そこで第五章では monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度および各臓器の canstatin 発現を解析することにより、canstatin の肺動脈性肺高血圧症におけるバイオマーカーとしての可能性を検討した。

2. 実験材料および実験方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 試薬

Monocrotaline (和光純薬) および recombinant マウス canstatin (第二章 2-2-1 の項に準じて作製)。

2-1-2. 一次抗体

Anti- α -SMA (M0851)(Dako)、anti-canstatin (PA1521)(Boster Biological Technology)および anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (016-25523)(和光純薬)。

2-1-3. 二次抗体

Anti-rabbit IgG HRP linked whole antibody (7074S)および anti-mouse IgG HRP linked whole antibody (7076S)(Cell Signaling Technology)。

2-1-4. 使用動物

すべての動物実験は北里大学動物実験倫理委員会の承認後(承認番号 19-179、19-014 および 18-060)、同大学のガイドラインを遵守して行った。実験には4または8週齢の雄性 Wistar ラット(日本クレア)を使用し、学部内5号館2階の実験動物飼育室で固形飼料(CE2;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. 動物実験

井本らの方法に従い monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットを作製した[35]。Monocrotaline は 1N HCl に溶解し、1N NaOH で中和(pH 7-8)した後に生理食塩水で希釈した(24 mg/ml)。4または8週齢の Wistar ラットに monocrotaline 溶液(60 mg/kg)を単回腹腔内投与することで monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラ

ット(MCT)を作製した。対照群(Cont)は生理食塩を単回腹腔内投与した。4週齢のラットは recombinant canstatin 投与実験(表 3、図 34、図 35、図 36、図 37、図 38、図 39)に、8週齢のラットは血漿 canstatin 濃度および各臓器の canstatin 発現解析(表 4、図 40、図 41)に用いた。

4週齢のラットを用いて作製した MCT または Cont に recombinant canstatin (20 µg/kg) または溶媒(0.8 mM Tris, 20 mM L-arginine, 4% glycerol を含む生理食塩水)を monocrotaline または生理食塩水投与直後から 21 日間連日腹腔内投与した。最終投与の翌日に 2-2-2 の心エコー検査および 2-2-3 の肺動脈圧測定を行った後に第一章 2-2-1 および 2-2-4 の項に準じて心臓および肺の摘出を行った。右心室および肺組織は組織学的解析に用いるために 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬)中に 4 °C で一晩保存した。残りの右心室組織は 2-2-7 の real time RT-PCR に用いるために液体窒素で急速凍結し、使用まで -80 °C で保存した。

8週齢のラットを用いて作製した MCT または Cont を 21 日間飼育した。14 日目および 21 日目にイソフルラン麻酔下[流速: 2 L/分、濃度: 5% (導入)、2.5% (維持)]で伏在静脈から採血を行った。得られた血液サンプルに EDTA を添加し、1,200×g、4 °C で 15 分間遠心分離し血漿サンプルを得て、使用まで -80 °C で保存した。21 日目に採血および 2-2-2 の心エコー検査を行った後、第一章 2-2-1 および 2-2-4 の項に準じて心臓(右心室と左心室に分けた)、肺、腎臓および肝臓の摘出を行った。各臓器は 2-2-10 の Western blotting に用いるために液体窒素で急速凍結し、使用まで -80 °C で保存した。

2-2-2.心エコー検査

第2章 2-2-3の項および井本らの方法に従い心エコー検査を行い、肺高血圧症および右心収縮機能を評価した[35]。肺高血圧症の評価のために、短軸傍胸骨断面像においてパルス波ドップラーにより肺動脈血流加速時間(acceleration time: AT)および右心室駆出時間(ejection time: ET)を測定し、AT/ETを算出した。右心収縮機能の評価のために、長軸四腔断面像において三尖弁基部のMモード画像から三尖弁輪部収縮期移動距離(tricuspid annular plane systolic excursion: TAPSE)を測定した。

2-2-3.肺動脈圧測定

亀島らの方法に従い肺動脈圧測定を行った[93]。ウレタン(Sigma-Aldrich: 1.5 g/kg)の腹腔内投与による麻酔下でラットの頸部皮膚を切開し、右頸静脈に1%ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテルを挿入し、先端を肺動脈基部へと進めた。カテーテルはBPトランスデューサー(MLT0670; AD Instruments)に接続し、BP Amp (ML117; AD Instruments)およびPowerLabシステム(ML825; AD Instruments)を用いて肺動脈圧測定を行い、専用ソフトウェア(LabChart Pro version 8.1.16; AD Instruments)を用いてデータを解析した。

2-2-4. HE染色

第二章 2-2-4の項に準じて2-2-1において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した右心室および肺組織をパラフィン包埋して

薄切切片標本を作製後、HE染色を行った。右心室における心筋細胞短径(各ラットあたり50細胞)および肺における外径30-50 μm の肺動脈(各ラットあたり3本)の内径および外径を画像解析ソフト(`cellSens Imaging Software version 1.17; OLYMPUS`)を用いて計測し、それぞれ心筋細胞肥大および肺動脈内腔狭窄(肺動脈の内径/外径比)を評価した。

2-2-5.ピクロシリウスレッド染色

第二章 2-2-5の項に準じて2-2-1において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した右心室組織をパラフィン包埋して薄切切片標本を作製後、ピクロシリウスレッド染色を行った。間質性線維化は3視野中の右心室における線維化領域を画像解析ソフト(`Image J software version 1.52a; National Institutes of Health`)を用いて定量することで評価した。

2-2-6.免疫組織化学染色

第二章 2-2-6の項に準じて2-2-1において10%中性緩衝ホルマリン液により固定した右心室組織をパラフィン包埋して薄切切片標本を作製後、抗 α -SMA抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。3視野中の α -SMA陽性の筋線維芽細胞数を計測した。

2-2-7. Real time RT-PCR

2-2-1において -80°C で保存した右心室組織を用い、第三章 2-2-6の項に準じて各被検遺伝子のmRNA発現を定量・解析した。

使用したプライマー配列および accession number は下記の通りである。

<i>Gene</i>			
(Accession number)		Forward	Sequence
<i>BNP</i> (NM_031545)	Forward		5'-GAACAATCCACGATGCAGAAGC-3'
	Reverse		5'-GGGCCTTGGTCCTTTGAGAG-3'
<i>TGF-β</i> (NM_021578)	Forward		5'-GACCGCAACAACGCAATCTA-3'
	Reverse		5'-TTCCGTCTCCTTGGTTCAGC-3'
<i>Type I collagen</i> (NM_053304)	Forward		5'-GGATCGACCCTAACCAAGGC-3'
	Reverse		5'-GATCGGAACCTTCGCTTCCA-3'
<i>Polr2a</i> (XM_343922)	Forward		5'-CGTATCCGCATCATGAACAGTGA-3'
	Reverse		5'-TCATCCATCTTATCCACCACCTCTT-3'

• BNP: brain natriuretic peptide

2-2-8. マウス抗 canstatin モノクローナル抗体の作製および精製
株式会社アイティーエム(長野)に委託しマウス腸骨リンパ節法 [92]により、抗 canstatin モノクローナル抗体(mAb 9-10F、mAb 10-8D および mAb 23-4B)を産生する3種類のハイブリドーマを確立した。これらのハイブリドーマをハイブリドーマ用無血清培地(和光純薬)で培養し、培地中に分泌されたモノクローナル抗体を抗体精製キット[Spin column based Antibody Purification Kit (Protein G);コスモバイオ、東京]を用いて定法に従い精製した。

2-2-9. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による血漿 canstatin 濃度測定

2-2-8 で精製したモノクローナル抗体のうち mAb 9-10F および mAb 10-8D は捕捉抗体として用いた。mAb 23-4B は Biotin Labeling Kit-NH₂ (同仁化学研究所)を用いて定法に従いビオチン標識し、検出抗体として用いた。補足抗体を 100 mM 炭酸/炭酸水素緩衝液 (pH 9.6) で希釈した抗体希釈液 (各抗体 1.5 µg/ml; 計 3.0 µg/ml) を 100 µl ずつ 96 well プレートの各 well に加え、4 °C で一晩静置し抗体を固相化した。0.05% Tween-20 を添加した PBS で各 well を洗浄後、ブロッキング溶液 (0.5% BSA 加 PBS) を 200 µl ずつ加え室温で 2 時間静置した。洗浄後、サンプル希釈液 (Plasma Sample Diluent; ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN, U.S.A.) で希釈した血漿サンプル (2-2-1 で採取、1:100 希釈) または同じサンプル希釈液で recombinant canstatin を希釈し作製した検量線用標準液を 100 µl ずつ加え 37 °C で 2 時間反応させた。ブロッキング溶液で希釈した検出抗体希釈液 (0.5 µg/ml) を 100 µl ずつ加え、室温で 2 時間反応させた。洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (Proteintech, Rosemont, IL, U.S.A.) 溶液 (1:2,500 希釈) を 100 µl ずつ加え、室温で 30 分間反応させた。洗浄後、基質溶液 (ELISA POD 基質 TMB キット; ナカライテスク) を 100 µl ずつ加え、遮光下・室温で 30 分間反応させた。酵素反応は 2% 硫酸 (ナカライテスク) を 100 µl 加えることで停止させた。マイクロプレートリーダー (TriStar; Berthold Technologies) を用いて吸光度 (450

nm および 560 nm)を測定し、450 nm の測定値と 560 nm の測定値の差を求めることで補正した。検量線は 2 倍階段希釈した recombinant canstatin 濃度 (0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5 および 25 ng/ml)とその吸光度から作成した。血漿 canstatin 濃度は各血漿サンプルの吸光度から検量線を用いて算出した。

2-2-10. Western blotting

Western blotting は第一章 2-2-5 の項に準じて行った。2-2-1 において -80 °C で保存した心臓、肺、腎臓、肝臓組織サンプルをプロテアーゼ阻害剤(ナカライテスク)を添加した細胞溶解液(RIPA lysis buffer: 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% TritonX-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate)により可溶化しタンパク質抽出液を得た。等量(10 µg)のタンパク質抽出液を SDS-PAGE (14%)で分離後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。転写メンブレンに各一次抗体[抗 canstatin 抗体(1:500 希釈)および抗 GAPDH 抗体(1:2,000 希釈)]を一晩反応させた。HRP 標識二次抗体(1:10,000 希釈)と 45 分間反応させた後に EZ-ECL system (Biological Industries)を用いて可視化した。

2-3.統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計評価として 2 群間の比較には Student の *t* 検定を行った(表 4、図 40A, B、図 41A-E)。3 群間以上の比較には一元配置分散分析後に Bonferroni の post-hoc 検定を行った(表 3、図 34、図 35B、図 36A, C、図 37B、図 38B、図 39A-C)。血漿 canstatin 濃度と肺高血圧症病態

との相関関係の評価には Pearson の相関係数解析を行った(図 40C, D)。危険率 5%以下 ($P<0.05$) を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈圧上昇には影響を及ぼさない

最初に monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける肺動脈圧亢進に及ぼす canstatin の影響を検討した。カテーテルを用いて平均肺動脈圧測定を行ったところ(図 34; Cont+vehicle: n=7, Cont+canstatin: n=8, MCT+vehicle: n=6, MCT+canstatin: n=5)、MCT では平均肺動脈圧が有意に上昇したが(MCT+vehicle: 20.8 ± 2.3 mmHg vs. Cont+vehicle: 8.4 ± 2.0 mmHg, $P<0.01$)、canstatin はこれに影響を及ぼさなかった(図 34)。また心エコー検査により肺高血圧症の指標である AT/ET 低下に及ぼす canstatin の影響を検討したところ(表 3; Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、MCT では AT/ET が有意に減少したが(MCT+vehicle: 0.22 ± 0.01 vs. Cont+vehicle: 0.38 ± 0.01 , $P<0.01$)、canstatin はこれにも影響を及ぼさなかった(表 3)。Canstatin 単独投与は肺動脈圧に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 平均肺動脈圧; 7.9 ± 1.1 mmHg, AT/ET; 0.40 ± 0.01)(図 34、表 3)。Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおいて肺重量が増加する[113]。そこで肺重量を検討したところ(表 3; Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9,

MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、MCTでは肺重量が有意に増加したが(MCT+vehicle: 1424.3±58.0 mg vs. Cont+vehicle: 1033.2±18.0 mg, $P<0.01$)、canstatinはこれに影響を及ぼさなかった(表3)。Canstatin単独投与は肺重量に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 1013.0±19.4 mg)(表3)。

3-2. Canstatinは monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈内腔狭窄には影響を及ぼさない

Monocrotalineは肺動脈の内腔狭窄により肺高血圧症を誘発する[21]。そこで、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈内腔狭窄に及ぼすcanstatinの影響を検討した(図35; Cont+vehicle: n=6, Cont+canstatin: n=6, MCT+vehicle: n=7, MCT+canstatin: n=5)。MCTでは肺動脈内径/外径比が有意に低下し肺動脈内腔の狭窄が認められたが(MCT+vehicle: 0.34±0.02 vs. Cont+vehicle: 0.43±0.02, $P<0.05$)、canstatinはこれに影響を及ぼさなかった(図35)。Canstatin単独投与は肺動脈内径/外径比には影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 0.43±0.03)(図35)。

3-3. Canstatinは monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心肥大を抑制する

肺高血圧症は右心室への持続的な圧負荷により右心肥大や線維化などの右心リモデリングを引き起こす[113, 121, 122]。そこで monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心肥大に及ぼすcanstatinの影響を検討した(表3、図36)。右心室重量パラメータ[右心室重量(right ventricular weight: RVW)、右心室重量/体重比

(RVW/BW)、右心室重量/(左心室+心室中隔)重量(left ventricular plus interventricular septum weight: (LV+S)W)比(RVW/(LV+S)W)]を検討したところ(表 3、図 36A; Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、MCT では RVW (MCT+vehicle: 293.1±10.6 mg vs. Cont+vehicle: 164.0±3.6 mg, $P<0.01$)、RVW/BW (MCT+vehicle: 1.58±0.06 vs. Cont+vehicle: 0.68±0.02, $P<0.01$)、RVW/(LV+S)W (0.56±0.02 vs. 0.27±0.01, $P<0.01$)が有意に増加した(表 3、図 36A)。Canstatin はこの RVW/BW (MCT+canstatin: 1.36±0.07, $P<0.01$ vs. MCT+vehicle)および RVW/(LV+S)W (MCT+canstatin: 0.46±0.01, $P<0.01$ vs. MCT+vehicle)の増加を有意に抑制し、RVW (MCT+canstatin: 263.2±11.1 mg)の増加を抑制する傾向を示した(表 3、図 36A)。Canstatin 単独投与は右心室重量パラメータに影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin; RVW: 167.0±5.7 mg, RVW/BW: 0.69±0.02, RVW/(LV+S)W: 0.28±0.01)(表 3、図 36A)。次に右心室組織における心筋細胞短径を検討した(図 36B, C; Cont+vehicle: n=4, Cont+canstatin: n=5, MCT+vehicle: n=5, MCT+canstatin: n=5)。MCT では右心室の心筋細胞短径が有意に増加し(MCT+vehicle: 26±0.7 μm vs. Cont+vehicle: 15.2±0.1 μm , $P<0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した(MCT+canstatin: 22.1±1.3 μm , $P<0.01$ vs. MCT+vehicle)(図 36B, C)。Canstatin 単独投与は心筋細胞短径に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 14.6±0.3 μm)(図 36B, C)。さらに心肥大関連遺伝子である *BNP* mRNA 発現を検討したところ(図 39A; Cont+vehicle: n=8, Cont+canstatin: n=8, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、

MCTでは右心室の *BNP* mRNA 発現が有意に増加し(MCT+vehicle: 19.6 ± 0.3 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した(MCT+canstatin: 12.7 ± 0.3 , $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle)(図 39A)。Canstatin 単独投与は *BNP* mRNA 発現に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 0.7 ± 0.4)(図 39A)。

3-4. Canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心線維化を抑制する

次に monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心線維化に及ぼす canstatin の影響を検討した。右心室組織の間質性線維化領域を検討したところ(図 37; Cont+vehicle: $n=5$, Cont+canstatin: $n=6$, MCT+vehicle: $n=7$, MCT+canstatin: $n=5$)、MCTでは右心室の間質性線維化領域が有意に増加し(MCT+vehicle: $16.1 \pm 1.6\%$ vs. Cont+vehicle: $3.4 \pm 0.1\%$, $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した(MCT+canstatin: $5.4 \pm 0.7\%$, $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle)(図 37)。Canstatin 単独投与は間質性線維化領域に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: $3.4 \pm 0.2\%$)(図 37)。また、右心室組織中の α -SMA 陽性筋線維芽細胞数を検討したところ(図 38; Cont+vehicle: $n=5$, Cont+canstatin: $n=6$, MCT+vehicle: $n=5$, MCT+canstatin: $n=5$)、MCTの右心室において筋線維芽細胞数が有意に増加し(MCT+vehicle: 41.9 ± 4.3 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$)、canstatin はこれを有意に抑制した(MCT+canstatin: 22.4 ± 3.8 , $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle)(図 38)。Canstatin 単独投与は筋線維芽細胞数に影響を及ぼさなかった(Cont+canstatin: 0.8 ± 0.3)(図 38)。さらに右心室における線維化関

連遺伝子発現を検討したところ(図 39B, C; Cont+vehicle: n=8, Cont+canstatin: n=8, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、MCT の右心室において *TGF-β* および *type I collagen* mRNA 発現が有意に増加し (*TGF-β*; MCT+vehicle: 11.5 ± 0.4 vs. Cont+vehicle, *Type I collagen*; MCT+vehicle: 7.1 ± 0.2 vs. Cont+vehicle, $P < 0.01$)、canstatin はこれらを有意に抑制した (*TGF-β*; MCT+canstatin: 2.7 ± 1.0 , $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle, *Type I collagen*; MCT+canstatin: 4.6 ± 0.6 , $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle)(図 39B, C)。Canstatin 単独投与は線維化関連遺伝子発現に影響を及ぼさなかった (Cont+canstatin; *TGF-β*: 0.5 ± 0.8 , *Type I collagen*: 0.4 ± 0.8)(図 39B, C)。一方、心エコー検査により右心室収縮機能の指標 TAPSE を検討したところ(表 3; Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)、MCT では TAPSE が有意に減少し (MCT+vehicle: 0.12 ± 0.00 cm vs. Cont+vehicle: 0.37 ± 0.01 cm, $P < 0.01$)、canstatin はこれを改善する傾向を示した (MCT+canstatin: 0.15 ± 0.01 cm)(表 3)。

3-5. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度は減少する

次に monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度を ELISA 法により測定した(図 40A, B; Cont: n=5, MCT: n=6)。Monocrotaline 投与後 14 日目および 21 日目の MCT の血漿 canstatin 濃度は Cont と比較して有意に減少した(14 日目; MCT: 24.4 ± 4.5 ng/ml vs. Cont: 54.7 ± 8.2 ng/ml, 21 日目; MCT: 45.3 ± 1.7 ng/ml vs. Cont: 66.4 ± 4.9 ng/ml, $P < 0.01$)(図 40A, B)。

MCT では monocrotaline 投与後 21 日目において有意な AT/ET の減少 (MCT: 0.28 ± 0.02 vs. Cont: 0.34 ± 0.01 , $P < 0.01$) および RVW/BW の増加 (MCT: 0.90 ± 0.04 vs. Cont: 0.64 ± 0.03 , $P < 0.01$) が確認された (表 4; Cont: $n=5$, MCT: $n=6$)。そこで ELISA 法により測定した血漿 canstatin 濃度とこれら肺高血圧症病態の指標との相関関係を検討した (図 40C, D; Cont: $n=5$, MCT: $n=6$)。Monocrotaline 投与後 21 日目の血漿 canstatin 濃度は AT/ET と強い正の相関を示し ($R=0.63$, $P < 0.05$) (図 40C)、RVW/BW と強い負の相関を示した ($R=-0.88$, $P < 0.01$) (図 40D)。

3-6. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室、肺および腎臓における canstatin 発現は減少する

Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの各臓器における canstatin 発現を検討した (図 41; Cont: $n=5$, MCT: $n=6$)。MCT の canstatin 発現は肺において有意に減少し ($34.8 \pm 11.3\%$ vs. Cont, $P < 0.01$) (図 41B)、右心室および腎臓において減少する傾向が認められた (右心室: $68.0 \pm 9.5\%$ vs. Cont, $P=0.11$, 腎臓: $67.9 \pm 8.4\%$ vs. Cont, $P=0.13$) (図 41A, D)。一方で、MCT の左心室および肝臓において canstatin 発現は変化しなかった (図 41C, E)。

	unit	Cont+vehicle	Cont+canstatin	MCT+vehicle	MCT+canstatin
BW	g	240.6±4.5	240.4±4.9	186.1±4.1**	195.0±6.4
AT/ET		0.38±0.01	0.40±0.01	0.22±0.01**	0.23±0.01
TAPSE	cm	0.37±0.01	0.39±0.02	0.12±0.00**	0.15±0.01
(LV+S)W	mg	608.0±14.4	595.8±9.3	524.2±10.2**	577.4±18.2#
RVW	mg	164.0±3.6	167.0±5.7	293.1±10.6**	263.2±11.1
RVW/BW	mg/g	0.68±0.02	0.69±0.02	1.58±0.06**	1.36±0.07##
RVW/ (LV+S)W	mg/mg	0.27±0.01	0.28±0.01	0.56±0.02**	0.46±0.01##
LW	mg	1033.2±18.0	1013.0±19.4	1424.3±58.0**	1491.3±73.8

表 3. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの心エコーおよび重量パラメータに及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水 (Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 µg/kg)または溶媒 (vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。AT/ET: 肺動脈血流加速時間/右心室駆出時間比 (acceleration time/ejection time), TAPSE: 三尖弁輪収縮期移動距離 (Tricuspid annular plane systolic excursion), (LV+S)W: (左心室 + 心室中隔)重量 (left ventricular plus interventricular septum)

weight), RVW:右心室重量(right ventricular weight), RVW/BW: 右心室重量/体重比 (RVW/BW ratio), RVW/(LV+S)W:右心室重量/(左心室+心室中隔)重量比 [RVW/(LV+S)W ratio], LW:肺重量(lung weight).データは平均値±標準誤差で示した(Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle; #, ## $P < 0.05$, 0.01 vs. MCT+vehicle

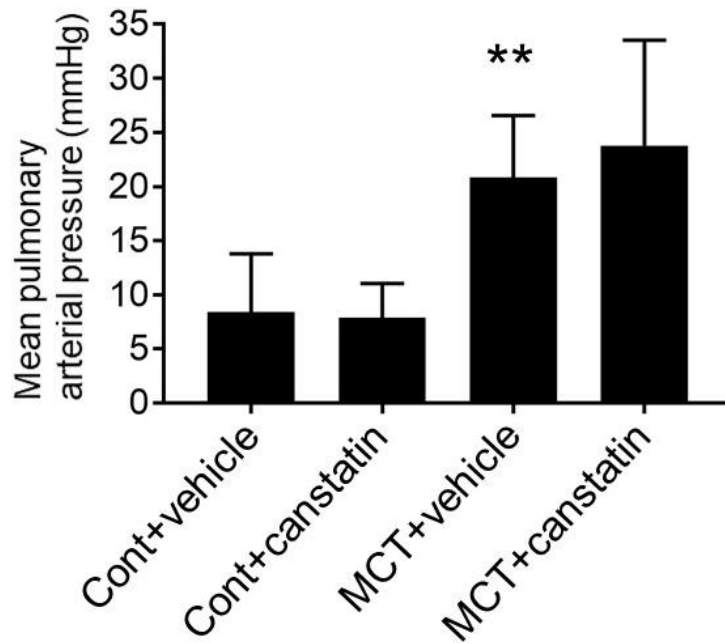


図 34. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈圧上昇に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒(vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。平均肺動脈圧をカテーテル法により測定し、平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle: n=7, Cont+canstatin: n=8, MCT+vehicle: n=6, MCT+canstatin: n=5)。** P <0.01 vs. Cont+vehicle.

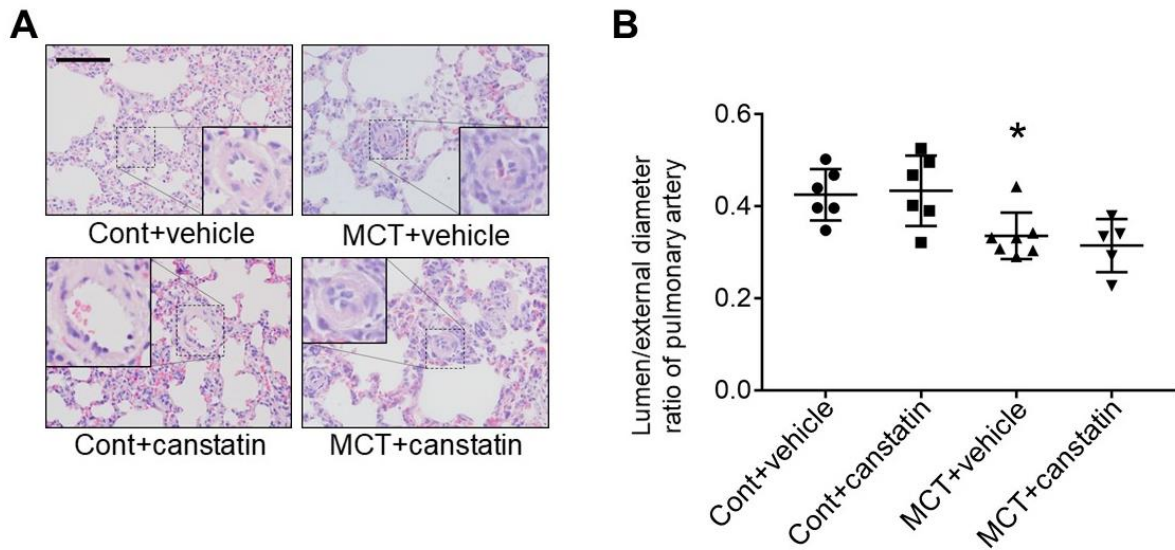


図 35. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの肺動脈内腔狭窄に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒(vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。肺の組織切片標本を作製し、HE 染色を行った。(A) Cont+vehicle 群、Cont+canstatin 群、MCT+vehicle 群および MCT+canstatin 群における典型的な肺動脈を含む肺組織の HE 染色像を示した。Scale bar: 100 μ m. (B) 外径 30-50 μ m の肺動脈の内径および外径を計測し、内径/外径比を算出し平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle および Cont+canstatin: n=6, MCT+vehicle: n=7, MCT+canstatin: n=5)。* P <0.05 vs. Cont+vehicle.

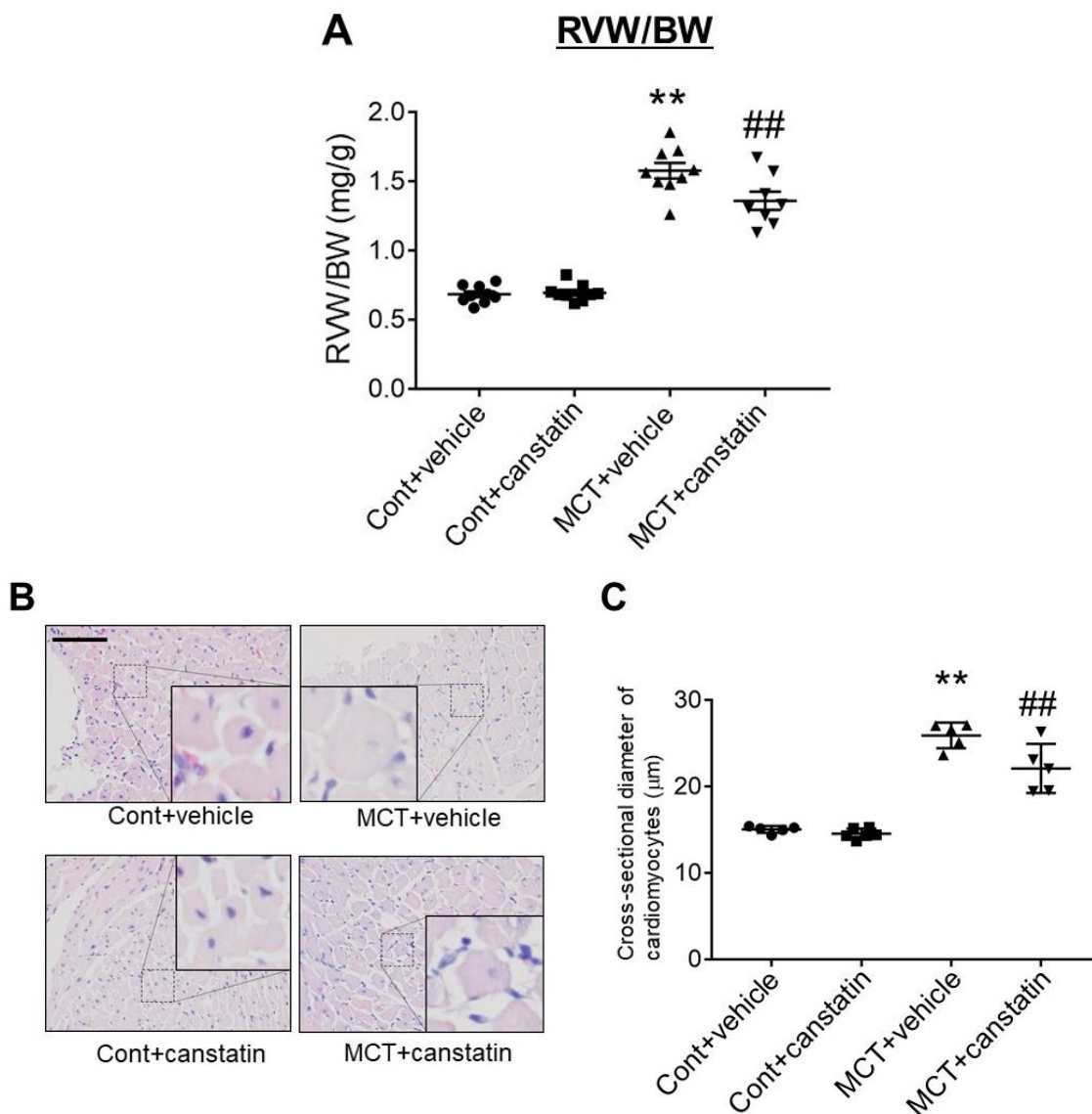


図 36. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心肥大に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水 (Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒 (vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。(A)右心室重量/体重比 (right ventricular weight: RVW/BW)を測定し、平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle: n=9, Cont+canstatin: n=9,

MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)。 ** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle. (B, C)右心室の組織切片標本を作製し、HE染色を行った。(B) Cont+vehicle群、Cont+canstatin群、MCT+vehicle群およびMCT+canstatin群における典型的な右心室のHE染色像を示した。Scale bar: 100 μm . (C)心筋細胞短径を計測し、平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle: n=4, Cont+canstatin: n=5, MCT+vehicle: n=5, MCT+canstatin: n=5)。
** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle.

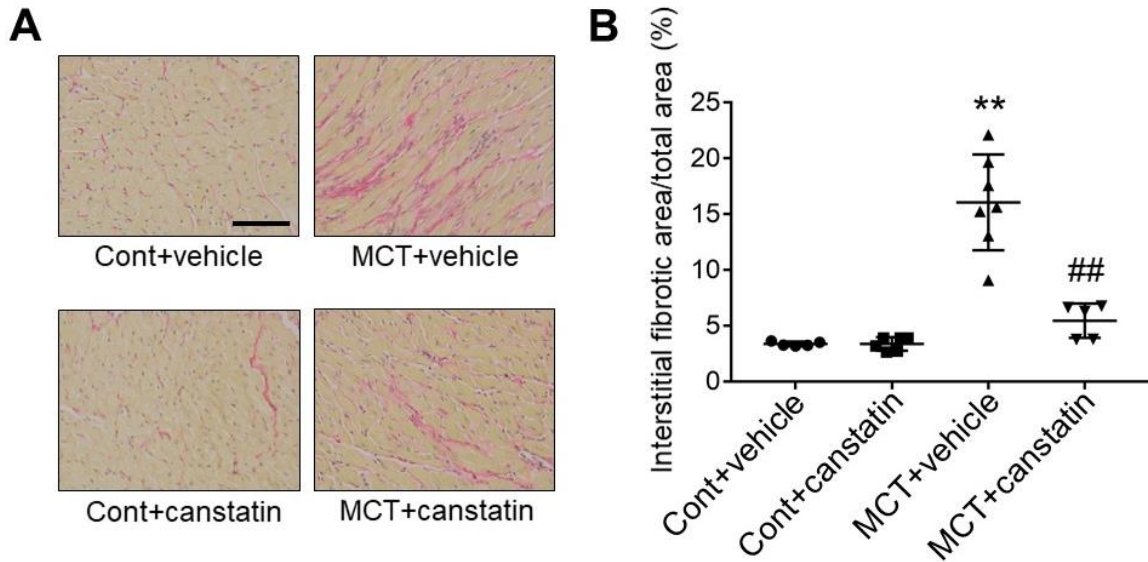


図 37. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心線維化に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水 (Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒 (vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。右心室の組織切片標本を作製し、ピクロシリウスレッド染色を行った。(A) Cont+vehicle 群、Cont+canstatin 群、MCT+vehicle 群および MCT+canstatin 群における典型的な右心室のピクロシリウスレッド染色像 (赤色:コラーゲン線維、黄色:筋線維)を示した。Scale bar: 100 μ m. (B)間質性線維化領域を定量し、全領域に対する割合を平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle: n=5, Cont+canstatin: n=6, MCT+vehicle: n=7, MCT+canstatin: n=5)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle.

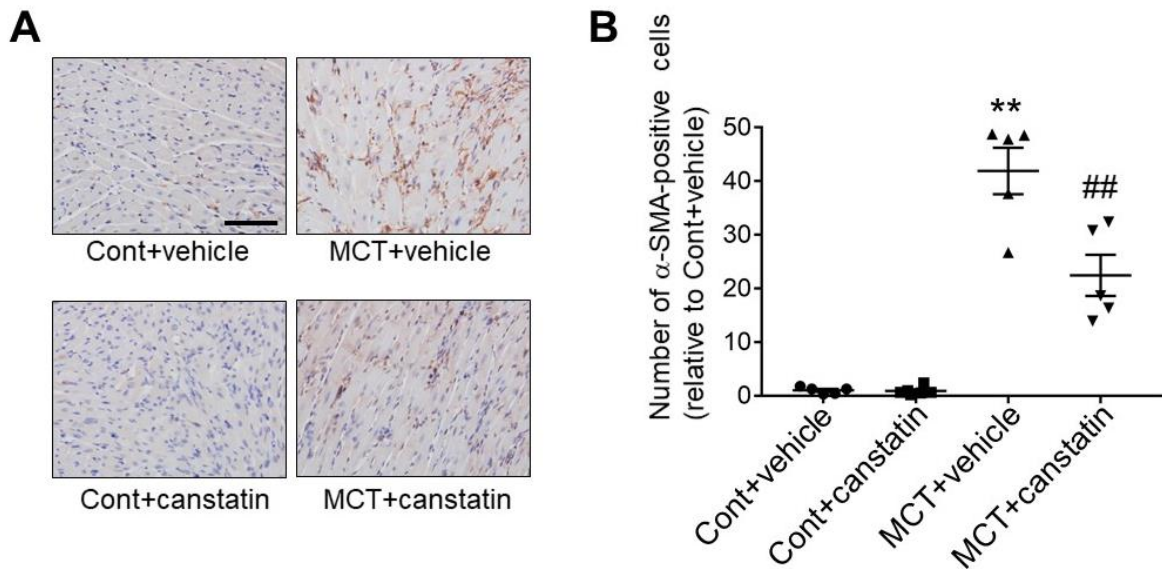


図 38. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室における筋線維芽細胞数に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μ g/kg)または溶媒(vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。右心室の組織切片標本を作製し、抗 α -SMA抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) Cont+vehicle 群、Cont+canstatin 群、MCT+vehicle 群および MCT+canstatin 群における右心室の典型的な抗 α -SMA抗体陽性像(茶褐色)を示した。Scale bar: 100 μ m。(B) 抗 α -SMA抗体陽性の筋線維芽細胞数を計測し、Cont+vehicle 群に対する割合を平均値 \pm 標準誤差で示した(Cont+vehicle: n=5, Cont+canstatin: n=6, MCT+vehicle: n=5, MCT+canstatin: n=5)。
** P <0.01 vs. Cont+vehicle, ## P <0.01 vs. MCT+vehicle.

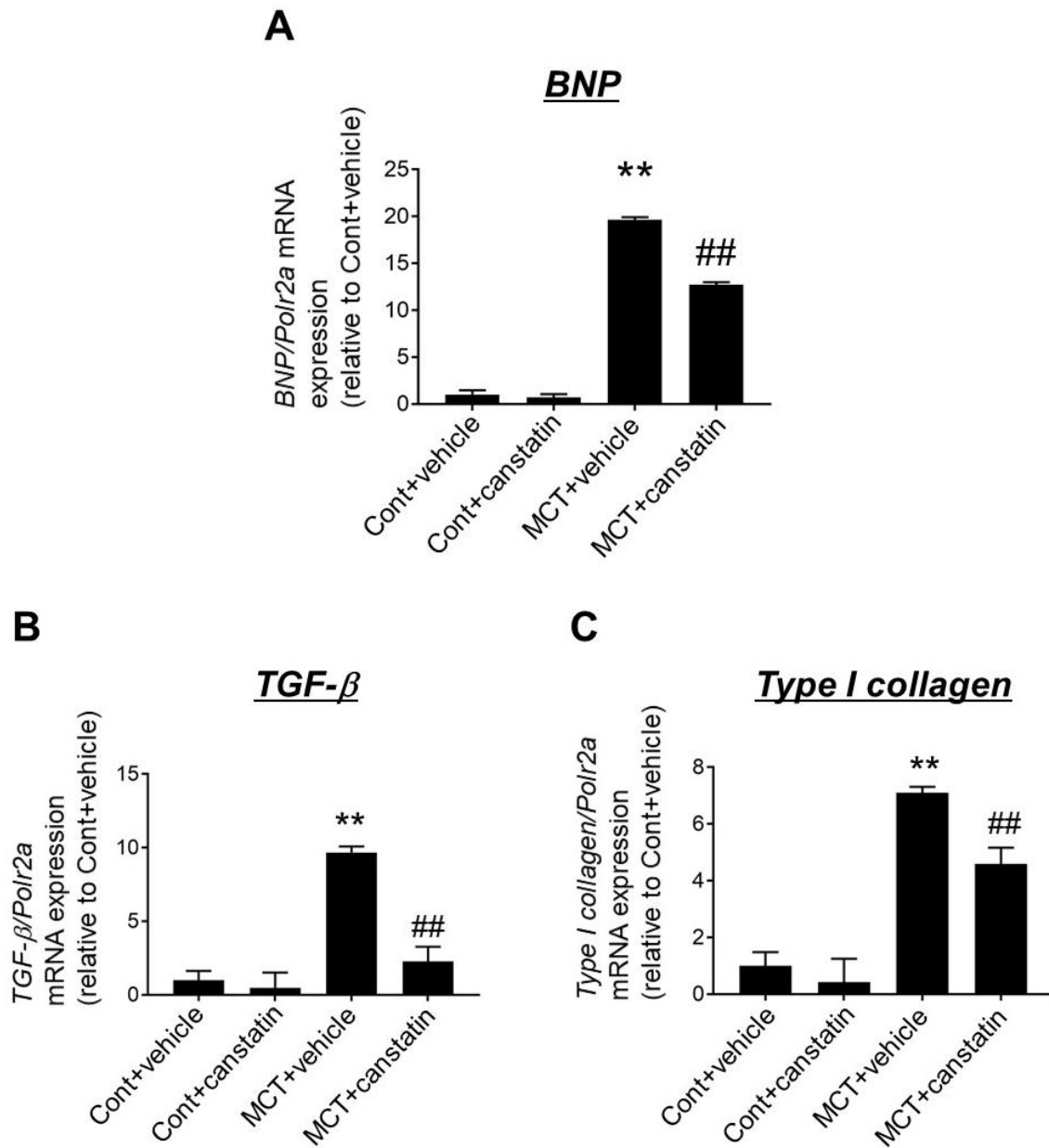


図 39. Recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの心肥大および線維化関連遺伝子発現に及ぼす影響

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水 (Cont)を単回腹腔内投与したラットに recombinant canstatin (canstatin: 20 μg/kg)または溶媒 (vehicle)を 21 日間連日腹腔内投与した。右心

室から RNA を抽出し、real time RT-PCR により心肥大関連遺伝子 [*brain natriuretic peptide (BNP)*] および線維化関連遺伝子 (*TGF- β* および *type I collagen*) の mRNA 発現を検討した。 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて *Polr2a* mRNA 発現で補正し、Cont+vehicle 群に対する割合を平均値 \pm 標準誤差で示した (Cont+vehicle: n=8, Cont+canstatin: n=8, MCT+vehicle: n=9, MCT+canstatin: n=8)。

** $P < 0.01$ vs. Cont+vehicle, ## $P < 0.01$ vs. MCT+vehicle.

	unit	Cont	MCT
BW	g	339.5±7.7	287.2±4.0**
AT/ET		0.34±0.01	0.28±0.02**
LW	mg	1,157.3±35.6	1,576.0±64.3**
RVW	mg	216.7±13.6	260.1±12.7**
RVW/BW	mg/g	0.64±0.03	0.90±0.04**

表 4. 血漿および組織中 canstatin 発現測定実験に用いた monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの心エコーおよび重量パラメータ

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットを21日間飼育した。データは平均値±標準誤差で示した(Cont: n=5, MCT: n=6)。** $P < 0.01$ vs. Cont.

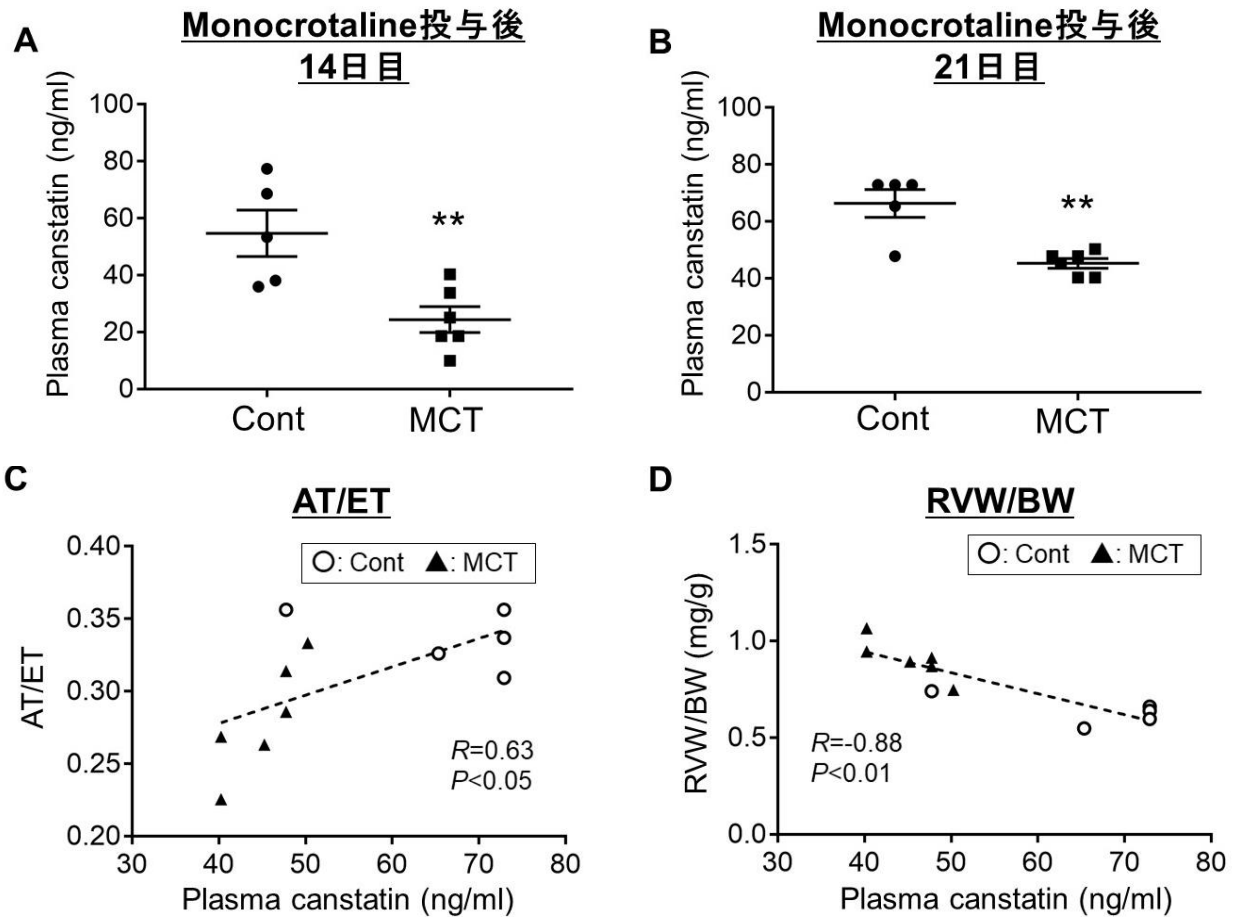
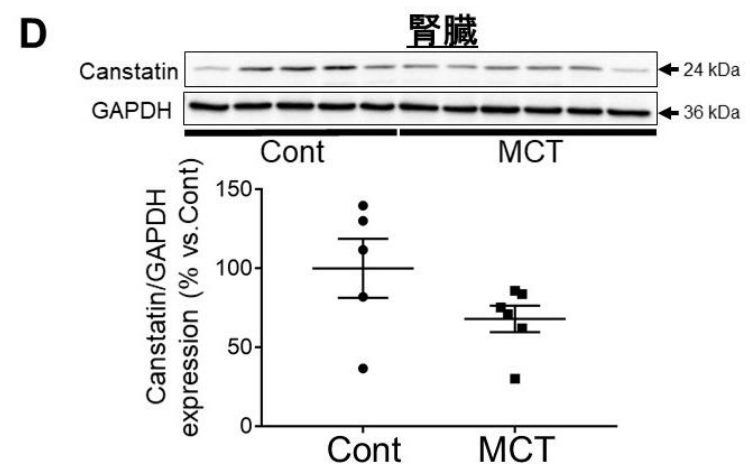
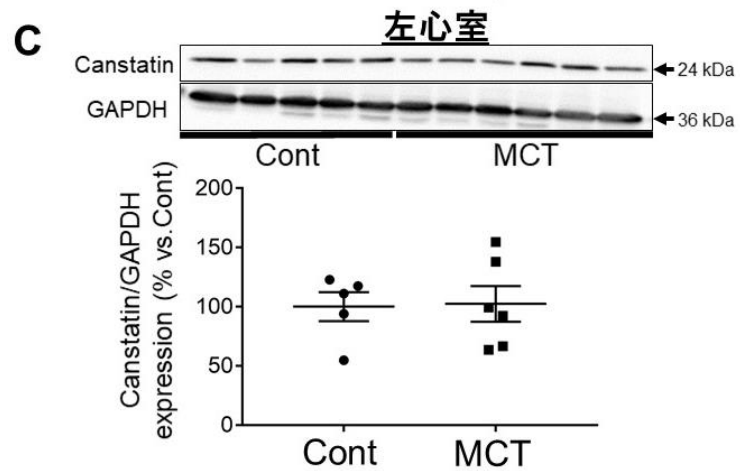
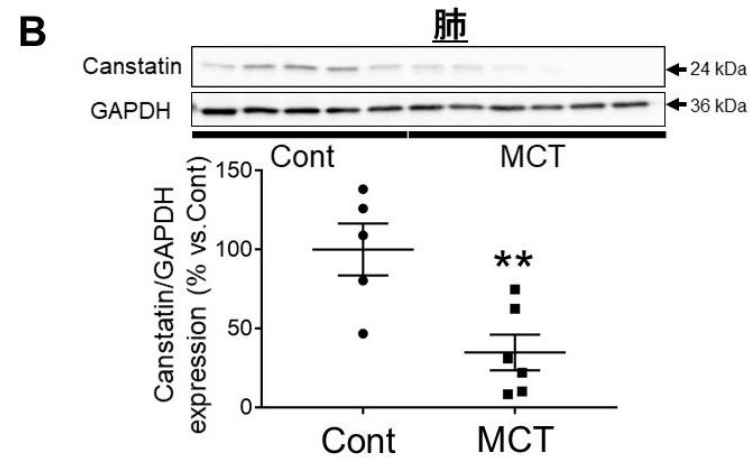
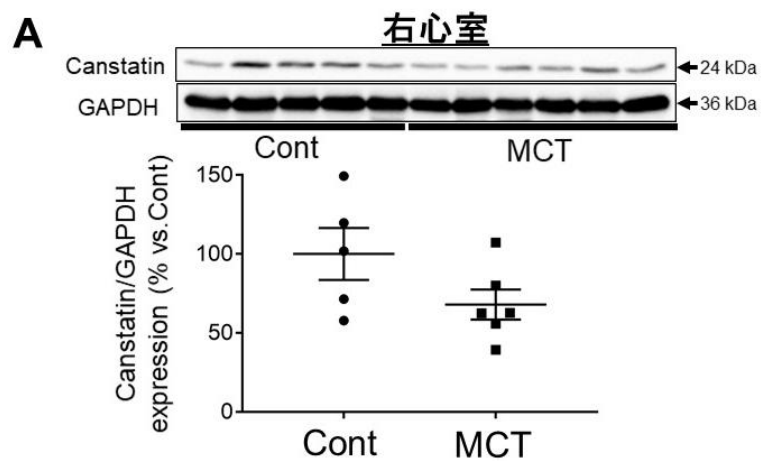


図 40. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける血漿 canstatin 濃度と病態パラメータとの相関

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットを 21 日間飼育した。(A, B) 14 日目(A)および 21 日目(B)に採血を行い、血漿サンプルを得た。血漿 canstatin 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)により測定した。血漿 canstatin 濃度は平均値±標準誤差で示した(Cont: n=5, MCT: n=6)。** $P<0.01$ vs. Cont. (C, D) Monocrotaline 投与後 21 日目における血漿 canstatin 濃度と肺動脈血流加速時間/右心室駆出時間比(acceleration time/ejection time: AT/ET)または右心室重量/

体重比 (RVW/BW) との相関関係を示した (Cont: n=5, MCT: n=6)。 *R*:
相関係数.



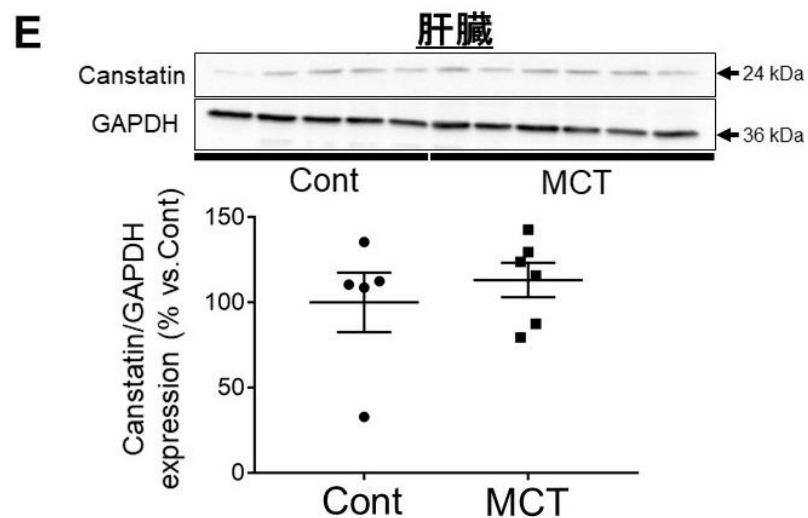


図 41. Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの臓器における canstatin 発現

Monocrotaline (MCT: 60 mg/kg)または生理食塩水(Cont)を単回腹腔内投与したラットを 21 日間飼育した。右心室(A)、肺(B)、左心室(C)、腎臓(D)および肝臓(E)からタンパク質を抽出し、Western blotting により canstatin タンパク質発現を検討した。(上図)典型的な canstatin (24 kDa)および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: 36 kDa)のブロット像を示した。(下図) Canstatin 発現を GAPDH 発現で補正し、Cont 群を 100%として平均値±標準誤差で示した(Cont: n=5, MCT: n=6)。** $P < 0.01$ vs. Cont.

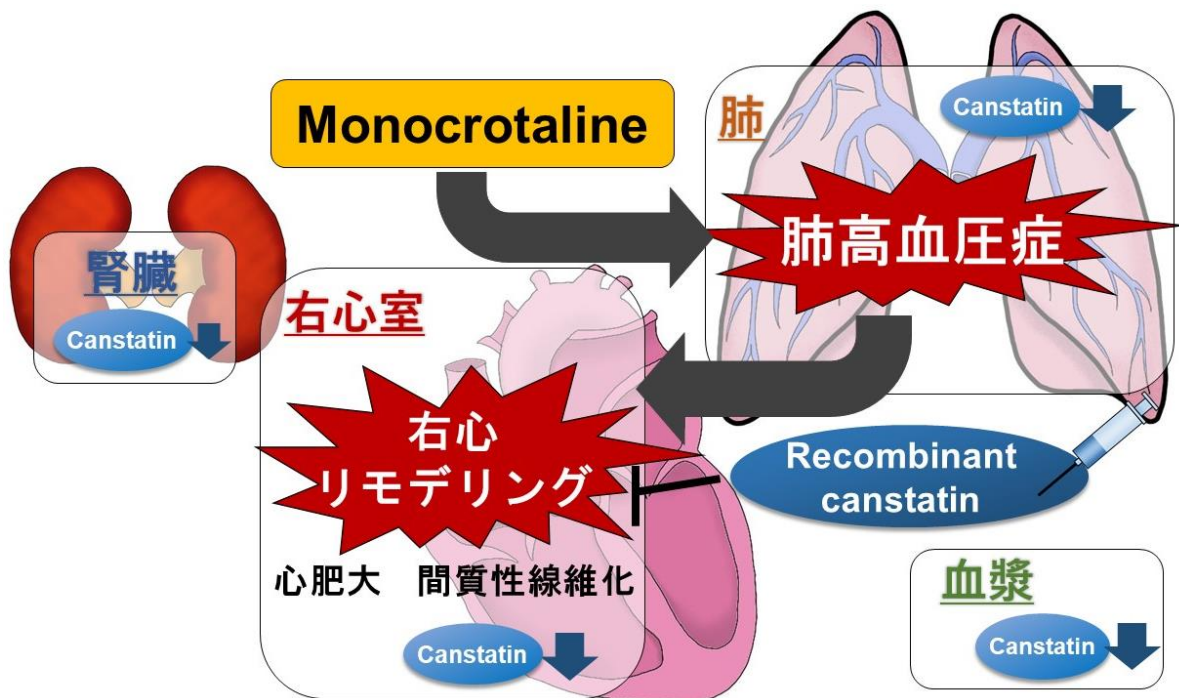


図 42. 第五章のまとめ

Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットに対する recombinant canstatin 投与は肺動脈圧上昇に影響を及ぼすことなく、右心室における心筋細胞肥大や間質性線維化などの病的な右心リモデリングを抑制することを初めて明らかにした。一方、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける血漿 canstatin 濃度や右心室、肺および腎臓における canstatin 発現は減少しており、血漿 canstatin 濃度は AT/ET や RVW/BW といった肺高血圧症病態の指標と強い相関を示した [109]。

4. 考察

本章では、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットに対する recombinant canstatin 投与が肺動脈圧上昇に影響を及ぼすことなく、右心室における心筋細胞肥大や間質性線維化などの病的な右心リモデリングを抑制することを初めて明らかにした。また monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室、肺および腎臓において canstatin 発現が減少しており、それに伴い血漿 canstatin 濃度が減少することも明らかにした。さらにこの血漿 canstatin 濃度低下は AT/ET の低下や RVW/BW の増加といった肺高血圧症病態の重症度と強い相関を示した(図 42)。

肺動脈性肺高血圧症における肺動脈内腔狭窄の原因の一つに肺動脈内皮細胞の異常増殖による内膜肥厚がある[5]。Canstatin は血管内皮細胞の増殖抑制作用やアポトーシス促進作用を持ち、抗血管新生作用および抗腫瘍作用を示すことが知られている[41, 59]。本章において recombinant canstatin 長期投与は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける肺動脈圧上昇や肺動脈内腔狭窄には影響を及ぼさなかった(表 3、図 34、図 35)。これまでの *in vivo* 腫瘍モデルマウスに対する canstatin 投与実験において報告された血管新生抑制や抗腫瘍作用を示す用量は 3-10 mg/kg であり[29, 41]、本章における投与量(20 µg/kg)と比較して非常に高用量である。血管内皮増殖因子受容体阻害薬 Sugen 5419 の投与と低酸素暴露により誘発した肺高血圧症モデルラットの肺動脈における血管リモデリングでは、内皮細胞の異

常増殖による重度の内膜肥厚が観察される[21]。一方、本章で用いた monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおける血管リモデリングの主体は中膜肥厚である[21]。これらの理由から、canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血管リモデリングや肺動脈圧上昇に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。

本章において、recombinant canstatin 長期投与は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心肥大を抑制した(表 3、図 36)。第二章および第三章の結果から、canstatin は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇/calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介して抗心肥大作用を示すことが示唆されている。肺高血圧症モデルラットにおける右心肥大も圧負荷による心筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に起因することが報告されている[83, 91]。さらに核内移行した NFATc4 により転写が活性化される心肥大関連遺伝子 *BNP* mRNA 発現増加を canstatin は抑制した(図 39A)。以上のことから、canstatin は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室においても同様の作用機序で抗心肥大作用を示すことが示唆された。さらに本章において、recombinant canstatin 長期投与は monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室における間質性線維化も抑制した(図 37)。第二章において canstatin は TGF- β 刺激による筋線維芽細胞への分化抑制を介して心筋梗塞後の非梗塞領域における間質性線維化を抑制することが示唆された。肺高血圧症病態の右心室において TGF- β や angiotensin II などの体液性因子により線維芽細胞の分化が促進される[2]。本章において canstatin は monocrotaline 誘

発肺高血圧症モデルラットの右心室における筋線維芽細胞数増加を抑制した(図 38)。また、*canstatin* は右心室における *TGF-β* mRNA 発現増加を抑制した(図 39B)。Martínez-Martínez らは心臓特異的 calcineurin 欠損マウスにおいて angiotensin II 誘発心線維化および *TGF-β*ファミリー mRNA 発現亢進が軽減することを報告している[60]。第三章において、*canstatin* は isoproterenol による NRCMs における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇や心室組織における calcineurin 活性化を抑制することを明らかにした。以上のことから、*canstatin* による抗線維化作用は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導抑制や、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇/calcineurin 経路制御を介した *TGF-β* mRNA 発現増加の抑制によることが示唆された。

ECM は肺高血圧症の新規バイオマーカー候補の一つである。Schumann は MMP-2、tissue inhibitor of matrix metalloprotease-4 および分泌型の非構造的 ECM である matricellular protein の 1 つ tenascin C の血漿中濃度が肺高血圧症患者で上昇することを報告している[96]。また matricryptins の 1 つ XVIII 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 C 末端断片である endostatin の血清中濃度が肺高血圧症患者で上昇することが報告されている[13]。第一章において *canstatin* が健常ラットの全身臓器において広く発現することを明らかにしたが、ヒトや動物における血中 *canstatin* 濃度はこれまでに全く検討されていなかった。また monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの全身臓器における *canstatin* 発現レベルの変動も不明であった。本章では ELISA キットを構築し、対照群の健常ラットにおける血漿 *canstatin* 濃度

を初めて明らかにした(14日目: 54.7 ± 8.2 ng/ml, 21日目: 66.4 ± 4.9 ng/ml)(図 40A, B)。また、血漿 canstatin 濃度は肺高血圧症モデルラットにおいて減少することも明らかにした(14日目: 24.4 ± 4.5 ng/ml, 21日目: 45.3 ± 1.7 ng/ml)(図 40A, B)。一方、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおいて顕著な症状が認められる右心室や肺組織において canstatin 発現が減少していた(図 41)。また血漿 canstatin 濃度は肺高血圧症の指標である AT/ET の低下 ($R=0.63$, $P<0.05$) および右心肥大の指標である RVW/BW の増加 ($R=-0.88$, $P<0.01$) と相関し、特に RVW/BW と強い負の相関を示した(図 40C, D)。以上のことから、canstatin が肺高血圧症の病態重症度を反映するバイオマーカーとして有用であることが示された。

Monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度や右心室、肺および腎臓の canstatin 発現は減少していた(図 40A, B、図 41A, B, D)。第一章において、canstatin の発現が心筋梗塞モデルラットの梗塞領域において cathepsin S による分解により減少することを明らかにしている。Chang らは monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットにおいて血清および肺の cathepsin S 活性が上昇することを明らかにしている[8]。急性および慢性腎不全は肺高血圧症で広く認められる合併症であり、右心不全による静脈圧亢進が腎障害を誘発する[66]。糸球体濾過量の減少したマウスにおいて血清 cathepsin S 発現レベルが上昇すること[106]や水腎症モデルマウスの腎臓における cathepsin S 発現が上昇すること[133]が報告されている。以上の

ことから、肺高血圧症モデルラットの血中あるいは組織中 cathepsin S 発現・活性上昇により canstatin が分解され、発現が低下した可能性が考えられた。

結論として第五章では、recombinant canstatin 投与が monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットに対して右心室の心肥大や間質性線維化といった右心リモデリングを抑制することを明らかにした。さらに monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿、右心室、肺および腎臓の canstatin 発現は減少しており、血漿 canstatin 濃度と肺高血圧症の病態パラメータとの相関が認められた。このことから、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルにおいて canstatin が保護的に働くことや、canstatin 発現低下が肺高血圧症病態の重症度を反映することが初めて明らかになった。

VII. 総括

心疾患を含む循環器疾患の医療費は国民医療費のうち最も高い割合を占めることから[48]、高齢化が進む我が国において心疾患患者数の増大は社会的な問題となっている[99, 101]。したがって心疾患を標的とした治療および予防医学の発展は喫緊の課題である。現在のところ、心疾患の治療は根治手術以外の大部分を内科的な薬物療法に頼っており、心臓への負荷軽減や心機能増強を目的とした既存薬が一定の治療効果を示している[118]。しかしながらこれらとは異なる作用点を標的としたより効果的な新規治療薬の開発は今なお求められている[43]。

心肥大や線維化などの心リモデリングは心疾患の発症・進展に深く関わることから重要な治療標的と捉えられているが、それに対する特異的な治療薬は未だ開発されていない。コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンやプロテオグリカンなどのECMは組織構造維持とともに周辺細胞の機能調節を介して組織の恒常性を維持している[89, 120]。近年、主に腫瘍研究分野において抗血管新生作用や抗腫瘍作用をもつECM分解産物 matricryptins が注目されている[14, 63, 88]。

Canstatin は心筋細胞周囲の基底膜を構成する主要なECMの1つであるCOL4A2のC末端NC1ドメイン由来の matricryptin で、抗血管新生作用や抗腫瘍作用をもつ[41]。当研究室ではこれまでに *in vitro* 実験において心筋細胞保護作用をはじめとする様々な canstatin の心臓構成細胞における生理活性を明らかにし

ている [34, 42, 73, 74]。しかしながら、これら **canstatin** の生理活性が、生体レベルにおいても発揮されるかは不明であった。そこで本研究では心筋梗塞や心肥大などの各種 *in vivo* 心疾患モデル動物を用いて **recombinant canstatin** 投与実験を行うことにより **canstatin** の心保護作用を検証した。

本研究において **recombinant canstatin** 投与は心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域(第二章)、**isoproterenol** 誘発心肥大モデルラットの左心室(第三章)および **monocrotaline** 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室(第五章)における心筋細胞肥大を抑制した。さらにこの作用は心筋細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とそれに続く **calcineurin/NFATc4** 経路の抑制を介することが示唆された。

また **recombinant canstatin** 投与は心筋梗塞後の瘢痕形成を促進し(第二章)、心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域(第二章)や **monocrotaline** 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室(第五章)における間質性線維化を抑制した。この **canstatin** による瘢痕形成の促進は Akt シグナルの活性化を介した筋線維芽細胞の増殖亢進作用および MMPs 分泌亢進が寄与していること、間質性線維化の抑制には TGF- β 1 による心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導抑制を介することが示唆された。

加えて第四章において **recombinant canstatin** 急性投与は I/R 誘発心室性不整脈に対して保護作用を示した。この作用は I/R により誘発される NOX 活性化および ROS 産生の抑制や ROS 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制を介することが示唆された。

心疾患病態における canstatin 発現変化を検討したところ、健康ラットの心臓組織に高発現する canstatin が心筋梗塞モデルラットの梗塞領域(第一章)や monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿、右心室、肺および腎臓(第五章)において減少しており、この減少が cathepsin S による分解を介することが示唆された。また、monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度の低下は肺高血圧症病態の重症度と強い相関を示した(第五章)。

以上の結果から、*in vivo* 心疾患モデルを用いた検討により、各種心疾患病態における canstatin の心保護作用および組織発現や血中濃度の変化が初めて明らかとなった(図 43)。

本研究は canstatin の心保護作用の詳細な機序を解明するには至らなかった。Canstatin は細胞接着分子であるインテグリン ($\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$) を介して抗血管新生作用や抗腫瘍作用を発揮することが報告されている [59]。また当研究室はこれまでに canstatin が H9c2 ラット心筋芽細胞において低酸素誘導性アポトーシスを $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリン/focal adhesion kinase (FAK)/Akt 経路の活性化を介して抑制することを明らかにしている [42]。これらのことから、canstatin による心保護作用がインテグリンを介する可能性が考えられる。

Canstatin は $[Ca^{2+}]_i$ /calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介して抗心肥大作用を示すことが示唆された。インテグリンは Ca^{2+} 制御タンパク質の調節を介して $[Ca^{2+}]_i$ を変化させるという報告があり

[72, 127]、Wuらは $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの可溶性リガンドがラット細動脈平滑筋細胞のLTCC活性を抑制することを報告している[127]。また β_1 インテグリンはマウス心筋細胞のT細管においてRyRと共局在しており、RyRの機能調節を介してマウス心筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を調節することが明らかになっている[72]。その他にもインテグリンが過剰な血行動態ストレスの受容による心肥大進展に関与することが示唆されていること[90]、心肥大モデル動物の心筋においてインテグリン発現が上昇すること[26]や、 β_3 インテグリン欠損マウスにおいて圧負荷誘発心肥大が増強されること[87]、など心肥大とインテグリンの関連を示唆する報告は多い。よって canstatin が $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介した $Ca^{2+}/calcineurin/NFATc4$ シグナルを含む心肥大関連シグナルの調節により抗心肥大作用を示す可能性が考えられた。

α_v インテグリンは潜在型TGF- β を活性化することが知られている[6]。自然発症高血圧ラットの心臓組織において $\alpha_v\beta_5$ インテグリン発現が亢進しており、 $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリン阻害薬 cilengitide はTGF- β 1刺激による心線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化誘導を抑制することが報告されている[81]。Canstatinは同様にTGF- β 1刺激による筋線維芽細胞への分化誘導を抑制したことから、canstatinが $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介して間質性線維化の抑制作用を示すことが推測された。また canstatin は筋線維芽細胞におけるAkt経路活性化による増殖亢進およびMMPs分泌亢進により梗塞領域の癒痕形成を促進することが示唆された。当研究室はこれまで canstatin が H9c2 ラット心筋芽細胞

において $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介して FAK/Akt を活性化すること [42] や IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の C 末端断片 tumstatin がラット心線維芽細胞の $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介して Akt シグナルを活性化することを明らかにしている [134]。また、インテグリンが MMPs mRNA 発現量の調節に関わるといういくつかの報告があり [136]、canstatin による筋線維芽細胞の増殖や MMPs 分泌促進作用においてもインテグリンの関与が推測された。以上のことより、canstatin の線維芽細胞機能調節においても $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ インテグリンが関与する可能性が考えられた。

Canstatin による抗不整脈作用は I/R による心筋細胞の NOX 活性化および ROS 産生や ROS 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制を介することが示唆された。IV 型コラーゲンがヒト腺がん細胞株において $\alpha_2\beta_1$ インテグリンを介して NOX1 を活性化すること [31] やヘパラン硫酸プロテオグリシン syndecan-4 の細胞外ドメインがマウス糸球体上皮細胞において $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを介して ROS 産生を増加させる [45] など、NOX 活性や ROS 産生へのインテグリンの関与が報告されている。また、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン阻害がラットの脳における I/R 障害を軽減すること [100]、 β_1 インテグリンがマウス心筋細胞の Ca^{2+} 制御機構の調節を介して I/R 障害を軽減すること [72]、虚血刺激により細胞表面のインテグリン発現が増加すること [12, 103]、など虚血や I/R 刺激とインテグリンとの関連も報告されている。さらに致死性の心室性不整脈が認められる不整脈原性右室心筋症患者の心筋細胞において β_1 インテグリン発現

が減少しており、それによる RyR の不安定化が VT を誘発することが報告されている [124]。以上のことから、I/R 誘発心室性不整脈に対する canstatin の保護作用がインテグリンを介した ROS 産生や Ca^{2+} 制御機構の調節を介することが考えられた。

このようにインテグリンは心肥大や線維化、不整脈などの様々な心疾患病態の進展に関与しており、心疾患の新たな治療標的として捉えられている [51]。特にインテグリンのアンタゴニストの心疾患治療への応用研究はいくつか行われており、 $\alpha_{11b}\beta_3$ インテグリン阻害薬 abciximab は冠動脈疾患治療を目的とした抗血栓薬としての臨床使用が多く、多くの国で認可されている [32, 51]。

Canstatin はインテグリンのアゴニストあるいはアンタゴニストとして働くことでインテグリン関連シグナルを調節し、心保護作用を示す可能性が考えられたことから、canstatin-インテグリン経路を介した心保護作用の詳細な機序解明により新たな創薬標的の発見に繋がることが期待されるため、今後更に検討を進める必要がある。

Matricryptins の一種である XVIII 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の C 末端断片 endostatin の血中半減期は 1-2 時間と非常に短く [53]、canstatin の血中半減期も同様に短く効果が長時間持続しないことが予想された。そこで本研究では各心疾患モデルラットに recombinant canstatin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を連日腹腔内投与した。

Recombinant human endostatin の N 末端に金属キレート配列 (MGGSHHHHH) を追加修飾した Endostar は修飾前の recombinant endostatin と比較して安定性が増し、より強力な抗腫瘍作用を示

すことが報告されている [19, 25, 55]。Recombinant canstatin においても化学修飾等で血中半減期を延長させることで心保護作用の増強や投与回数の減少が実現できる可能性が考えられる。

Endostatin の腹腔内投与は bleomycin 誘発肺線維症モデルマウスにおいて抗線維化作用を示すことが知られているが [130]、endostatin の経口投与においても同様に bleomycin 誘発肺線維症を抑制することが報告されている [71]。そのため、recombinant canstatin の経口投与が可能かどうかも今後検討する必要がある。

本研究の投与実験で用いた用量 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) により血中 recombinant canstatin 濃度が約 300 ng/ml に達すると推測されたが、ELISA による測定の結果明らかにした健常ラットの血漿 canstatin 濃度は 60 ng/ml 前後で約 1/5 倍の濃度である。しかしながらラットにおいて recombinant canstatin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、最大 28 日間) 投与による副作用は認められなかった。in vivo 腫瘍モデルマウスへの canstatin 投与実験における用量は本研究の約 150-500 倍の 3-10 mg/kg である [29, 41]。本学位論文に未掲載のデータであるが、isoproterenol 誘発心肥大モデルラットにおいて本研究で用いた用量の 2 倍の recombinant canstatin (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与はより強い抗心肥大作用を示した (data not shown, n=8) [112]。以上のことから、副作用が現れない高用量の recombinant canstatin を投与することでより強い心保護作用を発揮できる可能性が十分に考えられ、今後 canstatin の用量依存性についても詳細に検討する必要がある。

本研究では心疾患における **canstatin** 発現や病態の重症度との相関を明らかにし、心疾患に対するバイオマーカーとしての可能性を提示した。**Endostatin** は心筋梗塞モデルマウスの梗塞領域や圧負荷誘発心肥大モデルマウスの左心室において発現が上昇することが報告されている [20, 38]。実験モデルだけでなく、ヒト血清 **endostatin** 濃度が肺高血圧症や慢性心不全といった循環器疾患の患者で上昇し、死亡リスクと相関することも示されている [13, 22]。IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖 C 末端断片 **tumstatin** は、圧負荷誘発心肥大モデルウサギの左心室で発現が増加することが報告されている [70]。加えて **tumstatin** の血清中濃度がヒト肺がん患者において転移を有する場合は増加するが、転移の認められない場合は減少することが報告されており、がん患者の治療および予後の評価に役立つことが示唆されている [57]。このように患者の血清サンプルを用いた実験から、基底膜由来 **matricryptins** と疾患の病態との関連が示されているヒト臨床研究が存在する。本研究で得られた血中 **canstatin** 濃度と心疾患モデルラットの病態の重症度が相関するという知見は基礎的なものであり、実臨床における応用に向けて超えるべき壁はまだ多い。しかしながら、ELISA キットを構築し **canstatin** の血中濃度測定に初めて成功した点は大きな成果であると言える。今後はイヌ、ネコやヒトの心疾患患者由来の血漿中濃度測定を行うことにより、**canstatin** のバイオマーカーとしての応用可能性をさらに検討する必要がある。

本研究結果とこれまでの報告から、健常ラットの心臓において高発現する **canstatin** は心筋細胞の形態維持や $[Ca^{2+}]_i$ の安定化、線維芽細胞機能の調節などを介して心臓の構造的・機能的な恒常性維持に寄与する内因性因子であると考えられる。また、心疾患の病態においては、**cathepsin S** により **canstatin** が分解されると、心臓の恒常性が破綻して病的なリモデリングが起り、心肥大、線維化や不整脈などの病態進展に繋がることが示唆される。したがって本研究において心疾患モデルに対して効果を示した **recombinant canstatin** 投与は、補充療法としての側面が強いと考えられる。この補充療法は心臓の病的なリモデリング制御を主目的としたものであり、心機能亢進を目的とした強心薬や後負荷軽減を目的とした血管拡張薬や利尿薬とは異なる作用を標的としている。また内因性因子の補充を目的とした治療法であることから、現在の薬物療法と比較して患者に対し負担が少ない治療法に成り得る。本研究で得られた新たな知見がヒト医療または獣医療における **canstatin** を標的とした画期的な心疾患治療法・診断法の開発に貢献することが期待される。

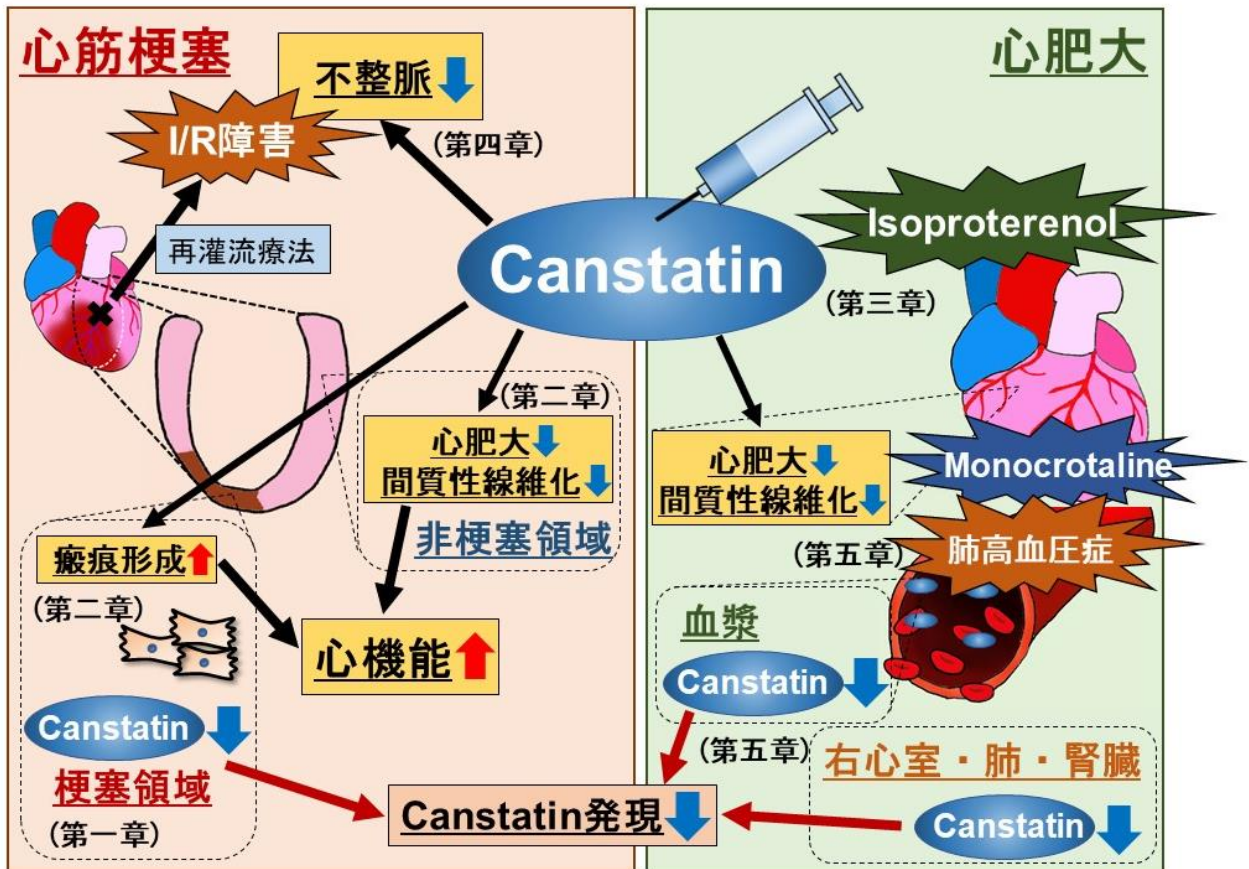


図 43.本研究の総括

Recombinant canstatin 投与が心筋梗塞モデルラットの非梗塞領域(第二章)および monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心室(第五章)における心肥大および間質性線維化や isoproterenol 誘発心肥大モデルラットの左心室における心肥大(第三章)を抑制した。また、心筋梗塞モデルラットの梗塞領域における癒痕形成を促進し(第二章)、これらは心機能改善に寄与することが示唆された。さらに canstatin は I/R 誘発心室性不整脈を抑制した(第四章)。また、心筋梗塞モデルラットの梗塞領域(第一章)や monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの血漿、

右心室、肺および腎臓(第五章)における canstatin 発現低下が認められた。以上の結果から、本研究は心疾患に対する新規治療薬およびバイオマーカーとしての canstatin の応用可能性を提示した。

VIII. 謝辞

本研究の計画、遂行および論文作成にあたり、北里大学獣医学部薬理学研究室の山脇英之教授、岡田宗善准教授および大谷紘資助教には多大なご指導・ご教授を賜りました。特に岡田宗善准教授には終始丁寧かつ熱心にご指導を賜りました。深く感謝の意を表します。

また研究遂行にあたりご助力いただきました薬理学研究室の皆様、特に三井彩加氏、伊藤瑠美氏、改正茉侑奈氏および清水友里恵氏に心から感謝を申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員DC1研究奨励費)(JSPS KAKENHI Grant Number 18J20623)により遂行されたものです。この場を借りて深く感謝の意を表します。

最後にこれまでの大学生活・研究生活を支えてくれた全ての方々、特に両親および友人に心から感謝を申し上げます。

IX. 参考文献

1. Adameova, A., Shah, A. K. and Dhalla, N. S. 2020. Role of oxidative stress in the genesis of ventricular arrhythmias. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 4200.
2. Andersen, S., Nielsen-Kudsk, J. E., Vonk Noordegraaf, A. and De Man, F. S. 2019. Right ventricular fibrosis: A pathophysiological factor in pulmonary hypertension? *Circulation.* **139**: 269–285.
3. Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Das, S. R., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Jordan, L. C., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Kwan, T. W., Lackland, D. T., Lewis, T. T., Lichtman, J. H., Longenecker, C. T., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Martin, S. S., Matsushita, K., Moran, A. E., Mussolino, M. E., O’Flaherty, M., Pandey, A., Perak, A. M., Rosamond, W. D., Roth, G. A., Sampson, U. K. A., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Spartano, N. L., Stokes, A., Tirschwell, D. L., Tsao, C. W., Turakhia, M. P., VanWagner, L. B., Wilkins, J. T., Wong, S. S. and Virani, S. S. 2019. Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* **139**: e56–e66.

4. van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L. and Narula, J. 2010. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**: 30–37.
5. Boucherat, O., Vitry, G., Trinh, I., Paulin, R., Provencher, S. and Bonnet, S. 2017. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **7**: 285–299.
6. Brown, N. F. and Marshall, J. F. 2019. Integrin-mediated TGF β activation modulates the tumour microenvironment. *Cancers (Basel)*. **11**: 1221.
7. Campo, A., Mathai, S. C., Le Pavec, J., Zaiman, A. L., Hummers, L. K., Boyce, D., Houston, T., Lechtzin, N., Chami, H., Girgis, R. E. and Hassoun, P. M. 2011. Outcomes of hospitalisation for right heart failure in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **38**: 359–367.
8. Chang, C. J., Hsu, H. C., Ho, W. J., Chang, G. J., Pang, J. H. S., Chen, W. J., Huang, C. C. and Lai, Y. J. 2019. Cathepsin S promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **317**: L1–L13.
9. Chen, H., Wang, J., Xiang, M. X., Lin, Y., He, A., Jin, C. N., Guan, J., Sukhova, G. K., Libby, P., Wang, J. A. and Shi, G. P. 2013. Cathepsin S-mediated fibroblast trans-differentiation contributes to left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **100**: 84–94.

10. Cheng, K. C., Li, Y., Chang, W. T., Chen, Z. C., Cheng, J. T. and Tsai, C. C. 2019. Ubiquitin-protein ligase E3a (UBE3A) as a new biomarker of cardiac hypertrophy in cell models. *J. Food Drug Anal.* **27**: 355–364.
11. Cheng, X. W., Shi, G. P., Kuzuya, M., Sasaki, T., Okumura, K. and Murohara, T. 2012. Role for cysteine protease cathepsins in heart disease: Focus on biology and mechanisms with clinical implication. *Circulation.* **125**: 1551–1562.
12. Cowden Dahl, K. D., Robertson, S. E., Weaver, V. M. and Simon, M. C. 2005. Hypoxia-inducible factor regulates $\alpha_v\beta_3$ integrin cell surface expression. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 1901–1912.
13. 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.
14. Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J. and Meininger, G. A. 2000. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* **156**: 1489–1498.

15. Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M. and Van De Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* **21**: 15–23.
16. Dodo, K., Shimizu, T., Sasamori, J., Aihara, K., Terayama, N., Nakao, S., Iuchi, K., Takahashi, M. and Sodeoka, M. 2018. Indolylmaleimide derivative IM-17 shows cardioprotective effects in ischemia-reperfusion injury. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**: 182–187.
17. Finegold, J. A., Asaria, P. and Francis, D. P. 2013. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int. J. Cardiol.* **168**: 934–945.
18. Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N. and Hill, J. A. 2004. Hypertrophy of the heart: A new therapeutic target? *Circulation.* **109**: 1580–1589.
19. Fu, Y., Tang, H., Huang, Y., Song, N. and Luo, Y. 2009. Unraveling the mysteries of endostatin. *IUBMB Life.* **61**: 613–626.
20. Givvimani, S., Kundu, S., Narayanan, N., Armaghan, F., Qipshidze, N., Pushpakumar, S., Vacek, T. P. and Tyagi, S. C. 2013. TIMP-2 mutant decreases MMP-2 activity and augments pressure overload induced LV dysfunction and heart failure.

Arch. Physiol. Biochem. **119**: 65–74.

21. Gomez-Arroyo, J. G., Farkas, L., Alhussaini, A. A., Farkas, D., Kraskauskas, D., Voelkel, N. F. and Bogaard, H. J. 2012. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**: L363–L369.
22. Gouya, G., Siller-Matula, J. M., Fritzer-Szekeres, M., Neuhold, S., Storka, A., Neuhofer, L. M., Clodi, M., Hülsmann, 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.
23. Granger, D. N. and Kvietys, P. R. 2015. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* **6**: 524–551.
24. Hammerman, H., Kloner, R. A., Schoen, F. J., Brown, E. J., Hale, S. and Braunwald, E. 1983. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation.* **67**: 1290–1295.
25. Han, Q., Fu, Y., Zhou, H., He, Y. and Luo, Y. 2007. Contributions of Zn(II)-binding to the structural stability of endostatin. *FEBS Lett.* **581**: 3027–3032.
26. Harston, R. K. and Kuppuswamy, D. 2011. Integrins are the necessary links to hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J. Signal Transduct.* **2011**: 521742.

27. Hasegawa, H., Naito, I., Nakano, K., Momota, R., Nishida, K., Taguchi, T., Sado, Y., Ninomiya, Y. and Ohtsuka, A. 2007. The distributions of type IV collagen α chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Arch. Histol. Cytol.* **70**: 255–265.
28. Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **123**: 92–100.
29. He, X. P., Li, Z. S., Zhu, R. M., Tu, Z. X., Gao, J., Pan, X., Gong, Y. F., Jin, J., Man, X. H., Wu, H. Y. and Xu, A. F. 2006. Effects of recombinant human canstatin protein in the treatment of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**: 6652–6657.
30. Hinenoya, N., Naito, I., Momota, R., Sado, Y., Kumagishi, K., Ninomiya, Y. and Ohtsuka, A. 2008. Type IV collagen alpha chains of the basement membrane in the rat bronchioalveolar transitional segment. *Arch. Histol. Cytol.* **71**: 185–194.
31. Honoré, S., Kovacic, H., Pichard, V., Briand, C. and Rognoni, J. B. 2003. $\alpha_2\beta_1$ -integrin signaling by itself controls G1/S transition in a human adenocarcinoma cell line (Caco-2): Implication of NADPH oxidase-dependent production of ROS. *Exp. Cell Res.* **285**: 59–71.
32. Huang, J., Li, X., Shi, X., Zhu, M., Wang, J., Huang, S., Huang, X., Wang, H., Li, L., Deng, H., Zhou, Y., Mao, J.,

- Long, Z., Ma, Z., Ye, W., Pan, J., Xi, X. and Jin, J. 2019. Platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: Signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J. Hematol. Oncol.* **12**: 26.
33. Hudson, B. G., Stephen, T. and Tryggvason, K. 1993. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.* **268**: 26033–26036.
34. Imoto, K., Hirakawa, M., Okada, M. and Yamawaki, H. 2018. Canstatin modulates L-type calcium channel activity in rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**: 954–959.
35. Imoto, K., Kumatani, S., Okada, M. and Yamawaki, H. 2016. Endostatin is protective against monocrotaline-induced right heart disease through the inhibition of T-type Ca^{2+} channel. *Pflügers Arch.* **468**: 1259–1270.
36. Imoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2018. 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.
37. Imoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Expression profile of extracellular matrix proteins in hypertrophied right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive

- rats. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1096–1102.
38. Isobe, K., Kuba, K., Maejima, Y., Suzuki, J., Kubota, S. and Isobe, M. 2010. Inhibition of endostatin/collagen XVIII deteriorates left ventricular remodeling and heart failure in rat myocardial infarction model. *Circ. J.* **74**: 109–119.
39. Iwanaga, K., Murata, T., Okada, M., Hori, M. and Ozaki, H. 2009. Carbachol induces Ca²⁺-dependent contraction via muscarinic M2 and M3 receptors in rat intestinal subepithelial myofibroblasts. *J. Pharmacol. Sci.* **110**: 306–314.
40. Jeong, E. M., Liu, M., Sturdy, M., Gao, G., Varghese, S. T., Sovari, A. A. and Dudley Jr., S. C. 2012. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**: 454–463.
41. Kamphaus, G. D., Colorado, P. C., Panka, D. J., Hopfer, H., Ramchandran, R., Torre, A., Maeshima, Y., Mier, J. W., Sukhatme, V. P. and Kalluri, R. 2000. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Biol. Chem.* **275**: 1209–1215.
42. Kanazawa, H., Imoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis through activation of integrin/focal adhesion kinase/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyoblasts. *PLoS One.* **12**: e0173051.
43. Khakoo, A. Y., Yurgin, N. R., Eisenberg, P. R. and Fonarow, G. C. 2019. Overcoming barriers to development of novel

- therapies for cardiovascular disease: Insights from the oncology drug development experience. *JACC Basic to Transl. Sci.* **4**: 269–274.
44. Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. and Hudson, B. G. 2008. Mammalian collagen IV. *Microsc. Res. Tech.* **71**: 357–370.
45. Kim, E. Y., Roshanravan, H. and Dryer, S. E. 2015. Syndecan-4 ectodomain evokes mobilization of podocyte TRPC6 channels and their associated pathways: An essential role for integrin signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**: 2610–2620.
46. Kistamás, K., Veress, R., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P. and Eisner, D. A. 2020. Calcium handling defects and cardiac arrhythmia syndromes. *Front. Pharmacol.* **11**: 72.
47. 児玉 逸雄 班長 [2008年度合同研究班(日本循環器学会、日本小児循環器学会、日本心臓病学会、日本心電学会、日本不整脈学会)報告] 2009. 不整脈薬物治療に関するガイドライン (2009年改訂版).
48. 厚生労働省. 2018. 平成30年度 国民医療費の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/18/dl/kekka.pdf>. 2020/12/24 閲覧
49. 厚生労働省. 2019. 令和元年(2019) 人口動態統計月報年計 (概数)の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai19/dl/kekka.pdf>. 2020/12/24 閲覧
50. Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A.,

- Bassel-Duby, R., Hill, J. A. and Olson, E. N. 2006. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J. Clin. Invest.* **116**: 3114–3126.
51. Lal, H., Guleria, R., Foster, D., Lu, G., Watson, L., Sanghi, S., Smith, M. and Dostal, D. 2007. Integrins: Novel therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **5**: 109–132.
52. Landstrom P, A., Dobrev, D. and Wehrens HT, X. 2017. Calcium signaling and cardiac arrhythmias. *Circ. Res.* **120**: 1969–1993.
53. Lee, T. Y., Tjin Tham Sjin, R. M., Movahedi, S., Ahmed, B., Pravda, E. A., Lo, K. M., Gillies, S. D., Folkman, J. and Javaherian, K. 2008. Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. *Clin. Cancer Res.* **14**: 1487–1493.
54. Li, Q., Lin, X., Yang, X. and Chang, J. 2010. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **298**: H1340–H1347.
55. Liang, R., Xie, H. Y., Lin, Y., Li, Q., Yuan, C. L., Liu, Z. H. and Li, Y. Q. 2016. Intraperitoneal perfusion therapy of endostar combined with platinum chemotherapy for malignant serous effusions: A meta-analysis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**: 8637–8644.

56. Lu, H. R., Yang, P., Remeysen, P., Saels, A., Dai, D. Z. and De Clerck, F. 1999. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats: A role of Na⁺ and Ca²⁺ influx. *Eur. J. Pharmacol.* **365**: 233–239.
57. Luo, Y. Q., Li-Juan Yao, Zhao, L., Sun, A. Y., Dong, H., Du, J. P., Wu, S. Z. and Hu, W. 2010. Development of an ELISA for quantification of tumstatin in serum samples and tissue extracts of patients with lung carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* **411**: 510–515.
58. Ma, Y., Brás, L. E. D. C., Toba, H., Iyer, R. P. and Lindsey, M. L. 2014. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflügers Arch.* **466**: 1113–1127.
59. Magnon, C., Galaup, A., Mullan, B., Rouffiac, V., Bidart, J. M., Griscelli, F., Opolon, P. and Perricaudet, M. 2005. Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins. *Cancer Res.* **65**: 4353–4361.
60. Martínez-Martínez, S., Lozano-Vidal, N., López-Maderuelo, M. D., Jiménez-Borreguero, L. J., Armesilla, Á. L. and Redondo, J. M. 2019. Cardiomyocyte calcineurin is required for the onset and progression of cardiac hypertrophy and fibrosis in adult mice. *FEBS J.* **286**: 46–65.
61. Matsubara, H. and Ogawa, A. 2014. Treatment of

- idiopathic/hereditary pulmonary arterial hypertension. *J. Cardiol.* **64**: 243–249.
62. Molkenstin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. and Olson, E. N. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* **93**: 215–228.
63. Monboisse, J. C., Oudart, J. B., Ramont, L., Brassart-Pasco, S. and Maquart, F. X. 2014. Matrikines from basement membrane collagens: A new anti-cancer strategy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**: 2589–2598.
64. Mukohda, M., Morita, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. Long-term methylglyoxal treatment impairs smooth muscle contractility in organ-cultured rat mesenteric artery. *Pharmacol. Res.* **65**: 91–99.
65. Murakami, M., Kusachi, S., Nakahama, M., Naito, I., Murakami, T., Doi, M., Kondo, J., Higashi, T., Ninomiya, Y. and Tsuji, T. 1998. Expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen in the infarct zone of rat myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: 1191–1202.
66. Naranjo, M., Lo, K. B., Mezue, K. and Rangaswami, J. 2019. Effects of pulmonary hypertension and right ventricular function in short and long-term kidney function. *Curr. Cardiol. Rev.* **15**: 3–11.
67. Neri, M., Riezzo, I., Pascale, N., Pomara, C. and Turillazzi, E.

2017. Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: A critical issue for clinicians and forensic pathologists. *Mediators Inflamm.* **2017**: 7018393.
68. van Nieuwenhoven, F. A. and Turner, N. A. 2013. The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. *Vascul. Pharmacol.* **58**: 182–188.
69. Nieves-Cintrón, M., Hirehallur-Shanthappa, D., Nygren, P. J., Hinke, S. A., Dell'Acqua, M. L., Langeberg, L. K., Navedo, M., Santana, L. F. and Scott, J. D. 2016. AKAP150 participates in calcineurin/NFAT activation during the down-regulation of voltage-gated K⁺ currents in ventricular myocytes following myocardial infarction. *Cell. Signal.* **28**: 733–740.
70. Nikolova, A., Ablasser, K., Ballmoos, M. C. W. Von, Poutias, D., Kaza, E., McGowan, F. X., Moses, M. A., Nido, P. J. and Friehs, I. 2012. Endogenous angiogenesis inhibitors prevent adaptive capillary growth in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Ann. Thorac. Surg.* **94**: 1509–1517.
71. Nishimoto, T., Mlakar, L., Takihara, T. and Feghali-bostwick, C. 2015. An endostatin-derived peptide orally exerts anti-fibrotic activity in a murine pulmonary fibrosis model. *Int. Immunopharmacol.* **28**: 1102–1105.
72. Okada, H., Lai, N. C., Kawaraguchi, Y., Liao, P., Copps, J.,

- Sugano, Y., Okada-Maeda, S., Banerjee, I., Schilling, J. M., Gingras, A. R., Asfaw, E. K., Suarez, J., Kang, S. M., Perkins, G. A., Au, C. G., Israeli-Rosenberg, S., Manso, A. M., Liu, Z., Milner, D. J., Kaufman, S. J., Patel, H. H., Roth, D. M., Hammond, H. K., Taylor, S. S., Dillmann, W. H., Goldhaber, J. I. and Ross, R. S. 2013. Integrins protect cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **123**: 4294–4308.
73. Okada, M., Morioka, S., Kanazawa, H. and Yamawaki, H. 2016. Canstatin inhibits isoproterenol-induced apoptosis through preserving mitochondrial morphology in differentiated H9c2 cardiomyoblasts. *Apoptosis*. **21**: 887–895.
74. Okada, M., Murata, N. and Yamawaki, H. 2017. Canstatin stimulates migration of rat cardiac fibroblasts via secretion of matrix metalloproteinase-2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **312**: C199–C208.
75. Östman-Smith, I. 1981. Cardiac sympathetic nerves as the final common pathway in the induction of adaptive cardiac hypertrophy. *Clin. Sci.* **61**: 265–272.
76. Otani, K., Yokoya, M., Kodama, T., Hori, K., Matsumoto, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2018. Plasma exosomes regulate systemic blood pressure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**: 776–783.
77. Ozer, M. K., Sahna, E., Birincioglu, M. and Acet, A. 2002. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-

reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats.

Pharmacol. Res. **45**: 257–263.

78. Page, R. L., Joglar, J. A., Caldwell, M. A., Calkins, H., Conti, J. B., Deal, B. J., Estes, N. A. M., Field, M. E., Goldberger, Z. D., Hammill, S. C., Indik, J. H., Lindsay, B. D., Olshansky, B., Russo, A. M., Shen, W. K., Tracy, C. M. and Al-Khatib, S. M. 2016. 2015 ACC/AHA/HRS guideline for the management of adult patients with supraventricular tachycardia: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. **133**: e506–e574.
79. Parekh, A., Sandulache, V. C., Singh, T., Cetin, S., Sacks, M. S., Dohar, J. E. and Hebda, P. A. 2009. Prostaglandin E₂ differentially regulates contraction and structural reorganization of anchored collagen gels by human adult and fetal dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen.* **17**: 88–98.
80. Park, J. Y., Pillinger, M. H. and Abramson, S. B. 2006. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthases. *Clin. Immunol.* **119**: 229–240.
81. Perrucci, G. L., Barbagallo, V. A., Corlianò, M., Tosi, D., Santoro, R., Nigro, P., Poggio, P., Bulfamante, G., Lombardi, F. and Pompilio, G. 2018. Integrin $\alpha_v\beta_5$ in vitro inhibition limits pro-fibrotic response in cardiac fibroblasts of spontaneously hypertensive rats. *J. Transl. Med.* **16**: 352.

82. Pezzuto, B., Badagliacca, R., Poscia, R., Ghio, S., D'Alto, M., Vitulo, P., Mulè, M., Albera, C., Volterrani, M., Fedele, F. and Vizza, C. D. 2015. Circulating biomarkers in pulmonary arterial hypertension: Update and future direction. *J. Hear. Lung Transplant.* **34**: 282–305.
83. Power, A. S., Hickey, A. J., Crossman, D. J., Loiselle, D. S. and Ward, M. L. 2018. Calcium mishandling impairs contraction in right ventricular hypertrophy prior to overt heart failure. *Pflügers Arch.* **470**: 1115–1126.
84. Priori, S. G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Bloma, N., Borggrefe, M., Camm, J., Elliott, P. M., Fitzsimons, D., Hatala, R., Hindricks, G., Kirchhof, P., Kjeldsen, K., Kuck, K. H., Hernandez-Madrid, A., Nikolaou, N., Norekvål, T. M., Spaulding, C., Van Veldhuisen, D. J., Kolh, P., Lip, G. Y. H., Agewall, S., Barón-Esquivias, G., Boriani, G., Budts, W., Bueno, H., Capodanno, D., Carerj, S., Crespo-Leiro, M. G., Czerny, M., Deaton, C., Dobrev, D., Erol, Ç., Galderisi, M., Gorenek, B., Kriebel, T., Lambiase, P., Lancellotti, P., Lane, D. A., Lang, I., Manolis, A. J., Morais, J., Moreno, J., Piepoli, M. F., Rutten, F. H., Sredniawa, B., Zamorano, J. L. and Zannad, F. 2015. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The task force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of

- sudden cardiac death of the Europe. *Europace*. **17**: 1601–1687.
85. Rai, V., Sharma, P., Agrawal, S. and Agrawal, D. K. 2017. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol. Cell. Biochem.* **424**: 123–145.
86. Rebutini, I. T., Myers, C., Lassiter, K. S., Surmak, A., Szabova, L., Holmbeck, K., Pedchenko, V., Hudson, B. G. and Hoffman, M. P. 2009. MT2-MMP-dependent release of collagen IV NC1 domains regulates submandibular gland branching morphogenesis. *Dev. Cell.* **17**: 482–493.
87. Ren, J., Avery, J., Zhao, H., Schneider, J. G., Ross, F. P. and Muslin, A. J. 2007. β_3 integrin deficiency promotes cardiac hypertrophy and inflammation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**: 367–377.
88. Ricard-blum, S. and Salza, R. 2014. Matricryptins and matrikines : biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* **23**: 457–463.
89. Rienks, M., Papageorgiou, A. P., Frangogiannis, N. G. and Heymans, S. 2014. Myocardial extracellular matrix: An ever-changing and diverse entity. *Circ. Res.* **114**: 872–888.
90. Ruwhof, C. and Van Der Laarse, A. 2000. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc. Res.* **47**: 23–37.
91. Sabourin, J., Boet, A., Rucker-Martin, C., Lambert, M.,

- Gomez, A. M., Benitah, J. P., Perros, F., Humbert, M. and Antigny, F. 2018. Ca²⁺ handling remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **118**: 208–224.
92. Sado, Y., Inoue, S., Tomono, Y. and Omori, H. 2006. Lymphocytes from enlarged iliac lymph nodes as fusion partners for the production of monoclonal antibodies after a single tail base immunization attempt. *Acta Histochem. Cytochem.* **39**: 89–94.
93. Sakamoto, Y., Kameshima, S., Kakuda, C., Okamura, Y., Kodama, T., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Pflügers Arch.* **469**: 1425–1432.
94. Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeridouh, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A. F., Dohmen, P. M., Choi, Y. H., Wahlers, T. and Weymann, A. 2016. Cardiac hypertrophy: An introduction to molecular and cellular basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **22**: 75–79.
95. Sanchez-Alonso, J. L., Bhargava, A., O'Hara, T., Glukhov, A. V, Schobesberger, S., Bhogal, N., Sikkell, M. B., Mansfield, C., Korchev, Y. E., Lyon, A. R., Punjabi, P. P., Nikolaev, V. O., Trayanova, N. A. and Gorelik, J. 2016. Microdomain-

- specific modulation of L-type calcium channels leads to triggered ventricular arrhythmia in heart failure. *Circ. Res.* **119**: 944–955.
96. Schumann, C., Lepper, P. M., Frank, H., Schneiderbauer, R., Wibmer, T., Kropf, C., Stoiber, K. M., Rdiger, S., Kruska, L., Krahn, T. and Kramer, F. 2010. Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers.* **15**: 523–532.
97. Sedighi, M., Nazari, A., Faghihi, M., Rafieian-Kopaei, M., Karimi, A., Moghimian, M., Mozaffarpur, S. A., Rashidipour, M., Namdari, M., Cheraghi, M. and Rasouljan, B. 2018. Protective effects of cinnamon bark extract against ischemia-reperfusion injury and arrhythmias in rat. *Phyther. Res.* **32**: 1983–1991.
98. Seropian, I. M., Toldo, S., Van Tassell, B. W. and Abbate, A. 2014. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**: 1593–1603.
99. Sezai, A. and Takayama, T. 2020. Role of the university hospital as a regional liaison center in preparation for the heart failure pandemic. *J. Nihon Univ. Med. Assoc.* **79**: 241–245.
100. Shimamura, N., Matchett, G., Yatsushige, H., Calvert, J. W., Ohkuma, H. and Zhang, J. 2006. Inhibition of integrin $\alpha_v\beta_3$

- ameliorates focal cerebral ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Stroke*. **37**: 1902–1909.
101. Shimokawa, H., Miura, M., Nochioka, K. and Sakata, Y. 2015. Heart failure as a general pandemic in Asia. *Eur. J. Heart Fail.* **17**: 884–892.
102. Shinde, A. V and Frangogiannis, N. G. 2014. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **70**: 74–82.
103. Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C. and Moyal, E. C. J. 2009. $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ integrins-FAK-RhoB: A novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* **69**: 3308–3316.
104. Sonbol, H. S. 2018. Extracellular matrix remodeling in human disease. *J. Microsc. Ultrastruct.* **6**: 123–128.
105. Sovari, A. A. 2016. Cellular and molecular mechanisms of arrhythmia by oxidative stress. *Cardiol. Res. Pract.* **2016**: 9656078.
106. Steubl, D., Kumar, S. V., Tato, M., Mulay, S. R., Larsson, A., Lind, L., Risérus, U., Renders, L., Heemann, U., Carlsson, A. C., Ärnlov, J. and Anders, H. J. 2017. Circulating cathepsin-S levels correlate with GFR decline and sTNFR1 and sTNFR2 levels in mice and humans. *Sci. Rep.* **7**: 43538.
107. Sugden, P. H. 1999. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ. Res.* **84**: 633–646.

108. Sugiyama, A., Ito, R., Okada, M. and Yamawaki, H. 2020. Long-term administration of recombinant canstatin prevents adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Sci. Rep.* **10**: 12881.
109. Sugiyama, A., Kaisho, M., Okada, M., Otani, K. and Yamawaki, H. 2020. Decreased expression of canstatin in rat model of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: Protective effect of canstatin on right ventricular remodeling. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 6797.
110. Sugiyama, A., Mitsui, A., Okada, M. and Yamawaki, H. 2019. Cathepsin S degrades arresten and canstatin in infarcted area after myocardial infarction in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 522–531.
111. Sugiyama, A., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. Pathophysiological roles of canstatin on myofibroblasts after myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **807**: 32–43.
112. Sugiyama, A., Okada, M. and Yamawaki, H. 2020. Canstatin suppresses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through inhibition of calcineurin/nuclear factor of activated T-cells pathway in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **871**: 172849.
113. Sun, F., Lu, Z., Zhang, Y., Geng, S., Xu, M., Xu, L., Huang, Y., Zhuang, P. and Zhang, Y. 2018. Stage-dependent changes of β 2-adrenergic receptor signaling in right ventricular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary arterial

- hypertension. *Int. J. Mol. Med.* **41**: 2493–2504.
114. Sun, H. and Wang, Y. 2012. Prostaglandin E₂ in remote control of myocardial remodeling. *Circulation.* **125**: 2818–2820.
115. Takii, T., Yasuda, S., Takahashi, J., Ito, K., Shiba, N., Shirato, K. and Shimokawa, H. 2010. Trends in acute myocardial infarction incidence and mortality over 30 years in Japan: Report from the MIYAGI-AMI registry study. *Circ. J.* **74**: 93–100.
116. Talman, V. and Ruskoaho, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res.* **365**: 568–581.
117. Tello, K., Seeger, W., Naeije, R., Vanderpool, R., Ghofrani, H. A., Richter, M., Tedford, R. J. and Bogaard, H. J. 2021. Right heart failure in pulmonary hypertension: Diagnosis and new perspectives on vascular and direct right ventricular treatment. *Br. J. Pharmacol.* **178**: 90–107.
118. 筒井 裕之 班長 [合同研究班参加学会・研究班 (日本循環器学会、日本心不全学会、日本胸部外科学会、日本高血圧学会、日本心エコー図学会、日本心臓血管外科学会、日本心臓病学会、日本心臓リハビリテーション学会、日本超音波医学会、日本糖尿病学会、日本不整脈心電学会、厚生労働省 難治性疾患政策研究事業「特発性心筋症に関する調査研究」研究班、日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業「拡張相肥大心筋症を対象とした多施設登録観察研

究」研究班)報告] 2018. 急性・慢性心不全診療ガイドライン
(2017年改訂版).

119. Turner, N. A. and Porter, K. E. 2013. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*. **6**: 5.
120. 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.
121. van de Veerdonk, M. C., Bogaard, H. J. and Voelkel, N. F. 2016. The right ventricle and pulmonary hypertension. *Heart Fail. Rev.* **21**: 259–271.
122. 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–D33.
123. Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H. A., Kalluri, R. and Shi, G. P. 2006. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J. Biol. Chem.* **281**: 6020–6029.
124. Wang, Y., Li, C., Shi, L., Chen, X., Cui, C., Huang, J., Chen, B., Hall, D. D., Pan, Z., Lu, M., Hong, J., Song, L. S. and Zhao, S. 2020. Integrin β_{1D} deficiency-mediated RyR2

- dysfunction contributes to catecholamine-sensitive ventricular tachycardia in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. **141**: 1477–1493.
125. Watanabe, T., Kusachi, S., Yamanishi, A., Kumashiro, H., Nunoyama, H., Sano, I., Nakahama, M., Murakami, T., Naito, I., Ninomiya, Y. and Tsuji, T. 1998. Localization of type IV collagen α chain in the myocardium of dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn. Heart J.* **39**: 753–762.
126. Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., Jones, F., Kimball, T. R. and Molkenin, J. D. 2004. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **94**: 110–118.
127. Wu, X., Mogford, J. E., Platts, S. H., Davis, G. E., Meininger, G. A. and Davis, M. J. 1998. Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin ligands. *J. Cell Biol.* **143**: 241–252.
128. Wu, Y., Yin, X., Wijaya, C., Huang, M. H. and McConnell, B. K. 2011. Acute myocardial infarction in rats. *J. Vis. Exp.* 2464.
129. Wynn, T. A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* **214**: 199–210.
130. Yamaguchi, Y., Takihara, T., Chambers, R. A., Veraldi, K. L., Larregina, A. T. and Feghali-Bostwick, C. A. 2012. A peptide

- derived from endostatin ameliorates organ fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **4**: 136ra7.
131. Yamanishi, A., Kusachi, S., Nakahama, M., Ninomiya, Y., Watanabe, T., Kumashiro, H., Nunoyama, H., Kondo, J., Naito, I. and Tsuji, T. 1998. Sequential changes in the localization of the type IV collagen α chain in the infarct zone: Immunohistochemical study of experimental myocardial infarction in the rat. *Pathol. Res. Pract.* **194**: 413–422.
132. Yang, C. F. 2018. Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Tzu Chi Med. J.* **30**: 209–215.
133. Yao, X., Cheng, F., Yu, W., Rao, T., Li, W., Zhao, S., Zhou, X. and Ning, J. 2019. Cathepsin S regulates renal fibrosis in mouse models of mild and severe hydronephrosis. *Mol. Med. Rep.* **20**: 141–150.
134. Yasuda, J., Fukui, K., Okada, M. and Yamawaki, H. 2017. T3 peptide, a fragment of tumstatin, stimulates proliferation and migration of cardiac fibroblasts through activation of Akt signaling pathway. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **390**: 1135–1144.
135. Yasuda, J., Okada, M. and Yamawaki, H. 2019. Protective effect of T3 peptide, an active fragment of tumstatin, against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *J. Pharmacol. Sci.* **139**: 193–200.

136. Yue, J., Zhang, K. and Chen, J. F. 2012. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer Microenviron.* **5**: 275–283.
137. Zhou, R., Ma, P., Xiong, A., Xu, Y., Wang, Y. and Xu, Q. 2017. Protective effects of low-dose rosuvastatin on isoproterenol-induced chronic heart failure in rats by regulation of DDAH-ADMA-NO pathway. *Cardiovasc. Ther.* **35**.
138. Zou, Y., Yao, A., Zhu, W., Kudoh, S., Yukio, H., Masaki, S. and Hiroki, U. 2001. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation.* **104**: 102–108.