

学位論文要旨

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

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

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

杉山 彰

Akira Sugiyama

指導教授 山脇 英之

我が国において高齢化による心疾患患者数の増加とそれに伴う医療費増大は社会的な問題となっている。心疾患の治療は根治手術以外の大部分を薬物療法に頼っており、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。IV型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖の分解産物 **canstatin** は抗腫瘍作用を有する生理活性物質である。これまでに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が明らかになっているが、これら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る。そこで本研究では各種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。

1. 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

第一章では **canstatin** の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。**Canstatin** は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** 発現が低下し、**small interfering RNA** 投与による **cathepsin S** 発現抑制はこれを解除した。以上のことから **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低下することが示唆された (*J. Vet. Med. Sci.* 2019)。

2. 心筋梗塞モデルラットにおける **canstatin** の保護作用

第二章では心筋梗塞モデルラットに recombinant canstatin を投与し心保護作用を検討した。Canstatin は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し、梗塞領域の瘢痕菲薄化や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)を抑制した。また canstatin による梗塞領域由来筋線維芽細胞の増殖能および matrix metalloproteinases 分泌能亢進作用、非梗塞領域における心筋細胞の nuclear factor of activated T-cells (NFAT)c4 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 (*Sci. Rep.* 2020; *Eur. J. Pharmacol.* 2017)。

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

第二章において 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肥大と NFATc4 核内移行を抑制することを明らかにした。第三章では isoproterenol 誘発心肥大モデルラットを用いて canstatin の抗心肥大作用機序の詳細を検討した。Recombinant canstatin 投与は isoproterenol による心肥大、calcineurin 活性化、NFATc4 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 は新生仔ラット心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes: NRCMs) における isoproterenol 誘導性細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇を抑制したことから、canstatin の抗心肥大作用は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇/calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介することが示唆された (*Eur. J. Pharmacol.* 2020)。

4. 虚血/再灌流 (ischemia/reperfusion: I/R) 誘発心室性不整脈に対する canstatin の保護作用

再灌流療法は急性心筋梗塞治療の第一選択肢であるが、それに伴う I/R 障害が問題となっている。I/R 障害による reactive oxygen species (ROS) 産生とその後の過剰な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は不整脈の原因となる。第三章において canstatin が NRCMs において isoproterenol 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制したため、第四章では recombinant canstatin 投与が I/R 誘発心室性不整脈を $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構の調節を介して抑制するとの仮説を検証した。Canstatin はラットにおいて I/R 誘発心室性不整脈の発生時間を減少させた。次に NRCMs に oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) 刺激を行い *in vitro* で I/R 障害を再現した。Canstatin は OGD/R 刺激による nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) 活性化と ROS 産生、さらに H_2O_2 誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。以上のことから canstatin が NOX を介する ROS 産生や $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することにより I/R 誘発心室性不整脈に対して保護的に働くことが明らかとなった。

5. 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

肺動脈性肺高血圧症は異常な肺動脈圧亢進と右心リモデリングの進行による右心不全を特徴とする進行性疾患で、我が国で難病に指定されている。第二章および第三章において canstatin が心リモデリングに対して保護的に働いたことから、第五章では monocrotaline 誘発肺高血圧症モデルラットの右心リモデリン

グに及ぼす recombinant canstatin 投与の影響を検討した。さらに第一章において canstatin 発現が心筋梗塞モデルラットの梗塞領域で低下したことから、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 発現を解析した。Canstatin は肺高血圧症モデルラットの肺動脈圧上昇に影響を及ぼすことなく、右心リモデリング(心肥大および間質性線維化)を抑制した。また肺高血圧症モデルラットの血漿 canstatin 濃度や右心室、肺および腎臓における canstatin 発現は低下しており、血漿 canstatin 濃度は肺動脈血流加速時間/右心室駆出時間比の低下や右心室重量/体重比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(*Int. J. Mol. Sci.* 2020)。

結論として本研究は recombinant canstatin 投与が各種心疾患モデルラットにおいて心保護的に働くことを明らかにし、心リモデリング制御を主目的とした新たな心疾患治療法の可能性を提示した。また各心疾患モデルラットの組織中および血漿中において canstatin が減少することも明らかにし、バイオマーカーとしての応用可能性も示した。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。