

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2021年2月18日

学位論文題目

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

氏名 杉山 彰 所属 獣医学専攻 獣医薬理学

審査委員 主査 北里大学 教授 久留主志朗



副査 北里大学 教授 佐々木宣哉



副査 北里大学 准教授 鎌田 亮



副査 広島大学大学院  
教授 今村 拓也



審査の結果

合格

最終試験の成績

優

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2021年2月18日

学位論文題目

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

---



氏名 杉山 彰 所属 獣医学専攻 獣医薬理学

---

審査委員 主査 北里大学 教授 久留主志朗 印

副査 北里大学 教授 佐々木宣哉 印

副査 北里大学 准教授 鎌田 亮 印





副査 広島大学大学院  
教授 今村 拓也  

---

審査の結果 \_\_\_\_\_ 最終試験の成績 \_\_\_\_\_

---

## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	杉山 彰 (DV17003 獣医薬理学)		
学位論文題目	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		
担当者	主査 北里大学教授	久留主 志朗	
	副査 北里大学教授	佐々木 宜哉	
	副査 北里大学准教授	鎌田 亮	
	副査 広島大学教授	今村 拓也	

## 論文審査の要旨

本学位論文は、matricryptinsの1種である、IV型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖(COL4A2)分解産物 canstatinの心臓保護作用についてラットを用いて実証したものである。同氏が在籍する獣医薬理学研究室がそれまでin vitro実験系で明らかにしてきたラット心臓構成細胞に対するcanstatinの有益作用に関する成果を受けて、実際にin vivoでの心臓保護効果につながるか否かを4種類の心不全モデルを用いて検討している。本論文は5章から成り、第1章において健常と人為的誘発心筋梗塞ラットにおけるcanstatinの発現比較とcanstatin分解へのcathepsin Sの関与を示し、続く第2章～5章では自家作製の組換えcanstatinを用いて心筋梗塞、Isoproterenol(Iso)誘発心肥大、ischemia/reperfusion(I/R)誘発心室性不整脈、monocrotaline(MCT)

誘発肺高血圧症の心不全ラットへの投与実験を行い、いずれも有意な心保護作用を示す実験データを呈示している。

第1章で、1) canstatin蛋白質は健常ラットの全身臓器に広く発現し、特に腎臓と心臓に高発現する、2) 心筋梗塞ラットの梗塞領域において canstatin発現が低下する一方、COL4A2と cathepsin S発現が増加する、3) siRNA投与による cathepsin S抑制は canstatin発現低下を解除したことを見出し、canstatinは心筋梗塞領域において cathepsin Sによる分解亢進により発現が低下することを示唆した。

第2章では、心筋梗塞モデルラットへの canstatinの長期投与の効果を検討し、まず心筋梗塞後の生存率低下と左室拡張および心機能低下の改善効果を示した。続いてその心保護作用を説明する機序となる、梗塞領域の瘢痕菲薄化や非梗塞領域の心筋細胞肥大と間質性線維化の抑制、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 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などの実験的証拠を *in vitro*系を交えて示している。

第3章では、Iso誘発心肥大ラットに canstatinを投与すると 1) *in vivo*では左心室壁肥厚と心筋細胞肥大、calcineurin活性化、NFATc4核内移行および3つの心肥大関連遺伝子 mRNA発現増加を抑制し、2) *in vitro*では新生仔ラット心筋細胞における Iso誘導性  $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。すなわち canstatinの抗心肥大作用は心筋細胞の  $[Ca^{2+}]_i$ 上昇

/calcineurin/NFATc4 経路の抑制を介することを示唆した。

第4章では、急性心筋梗塞治療の第一選択肢である再灌流療法で問題となる I/R 障害に着目しこれに対する canstatin の効果を検討している。In vivo 投与実験では I/R 誘発心室性不整脈の発生時間を減少させることを明らかにし、in vitro での I/R 再現モデルである酸素グルコース欠乏/再酸素化刺激においては NADPH oxidase (NOX) 活性化と活性酸素種 (ROS) 産生増加、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇のいずれも canstatin で抑制されることを示した。このことから canstatin は NOX を介する ROS 産生や [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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というメカニズムを明らかにしている。

最後の第5章では MCT 誘発肺高血圧症モデルにおける右心リモデリングに及ぼす影響を検討している。まず in vivo 実験では肺動脈圧上昇と同内腔狭窄には無効であったが、右心肥大、間質性線維化、筋線維芽細胞の増殖、肥大化・線維化関連遺伝子 (BNP, TGFβ, Type1 collagen) mRNA 発現量に対して canstatin は有意な抑制効果を示した。さらに canstatin の酵素免疫測定法を確立し、MCT 誘発肺高血圧症での血漿濃度と各臓器の発現量を解析すると、血漿濃度や右心室、肺、腎臓における発現量は低下し、肺動脈血流加速時間/右心室駆出時間比や右心室重量/体重比などの肺高血圧症病態の重症度を示すパラメーターと血漿濃度との間に強い相関を見出した。

以上のように本研究は組換え canstatin 投与が様々な心疾患モデルにおいていずれも心保護的に働くことを in vivo 系で

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。同時に各心疾患モデルラットにおける組織中および血漿中 canstatin の動態から、バイオマーカーとしての応用の可能性も示した。本研究の展開は、様々な心不全モデルを用い、循環器研究において必須な個体レベルでの検討を踏まえた後、多様な実験手法を適切に駆使して組織・細胞・分子レベルでその作用機構を部分的にはあるが明らかにしている。ラットを用いた本基礎研究での多くの新知見は matricryptin の病態生理を考える上で非常に学術的価値が高く、引用文献から判断する限り競合グループも少なく、かなり独創的な成果であると思われる。さらに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・診断法の開発への応用性も強く期待させるものである。なお本博士論文内の個々のデータは、筆頭著者として6報の原著論文 (J Vet Med Sci 2019;81(4):522-531, Eur J Pharmacol 2017;807:32-43, 同 2020;871:172849, Sci Rep 2020;10(1):12881, Int J Mol Sci 2020;21(18):6797, 同 2021;22(3):1004) として既に発表されている。これらの業績は、同氏が論文作成能力、並びに研究プレゼンテーション能力も十分に有していると判断される。

以上の総合的観点から、基礎獣医学における十分な研究業績と研究遂行能力、並びに学力を有していると判断され、博士（獣医学）を授与するに相当すると審査員一同で判断した。