慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	心臓腱索に特異的発現の見られる血管新生抑制因子テノモジュリンの機能解析
Sub Title	Analysis of the function of the anti-angiogenic factor, tenomodulin, specifically expressed in chordae tendineae cordis
Author	木村, 成卓(Kimura, Naritake)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	テノモジュリンという膜貫通蛋白質に注目し、腱索断裂との関連について解析した。心臓では、テノモジュリンは腱索の内皮下のエラスチンが豊富な層に同心円状に発現しており、特異的であった。ヒト腱索断裂症例において、テノモジュリンの発現は断裂部に一致し減少しており、成犬による腱索損傷モデルでも類似した所見が得られた。また、腱索間質細胞培養上清には血管管腔形成能、内皮細胞遊走能を抑制する作用が認められ、以上の結果よりテノモジュリンの欠失による血管新生と組織変性が腱索断裂を引き起こす原因となることが示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20790997 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20790997seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790997
研究課題名（和文）心臓腱索に特異的発現の見られる血管新生抑制因子テノモジュリンの機能解析
研究課題名（英文）Analysis of the function of the anti-angiogenic factor, Tenomodulin, specifically expressed in chordae tendineae cordis

研究代表者
木村　成卓（KIMURA NARITAKA）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90348657

研究成果の概要（和文）：テノモジュリンという膜貫通蛋白質に注目し、腱索断裂との関連について解析した。心臓では、テノモジュリンは腱索の内皮下のエラスチンが豊富な層に同心円状に発現しており、特異的であった。ヒト腱索断裂症例において、テノモジュリンの発現は断裂部に一致し減少しており、成犬による腱索損傷モデルでも類似した所見が得られた。また、腱索間質細胞培養上清には血管管腔形成能、内皮細胞遊走能を抑制する作用が認められ、以上の結果よりテノモジュリンの欠失による血管新生と組織変性が腱索断裂を引き起こす原因となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that tenomodulin, which is a recently isolated anti-angiogenic factor, was expressed abundantly in the elastin-rich subendothelial outer layer of normal chordae. The immunohistochemical analysis was performed and tenomodulin was locally absent in the ruptured areas of chordae, the same as chordaes of dog after surgically filed. Conditioned medium from cultured chordae interstitial cells strongly inhibited tube formation and mobilization of endothelial cells. These findings provide evidence that tenomodulin is expressed universally in normal chordae in a concentric pattern, and that local absence of tenomodulin is associated with chordae rupture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学
キーワード：心臓弁膜症、血管新生、結合組織

１．研究開始当初の背景

心臓弁膜症は、症状が悪化すると心不全に至ることもある疾患であるが、診断技術の進歩、人類の高齢化等に伴いその発症頻度も増大している。しかし治療に関しては外科手術（弁置換術・弁形成術）の術式やそのタイミングのみが主に議論されており、発症にいたる分子機序の解析や内科的治療、さらには予防策に対する研究はなされてこなかった。

生体内において、軟骨・眼球・心臓弁及び筋肉の腱組織は代表的な無血管組織であり、軟骨・眼球では血管新生を抑制するための特殊な防御機構が備わっていることが知られている。この防御機構が破綻し無血管性が保てなくなり、血管浸潤が生じることにより、様々な疾患（関節炎、網膜症等）が発症することが知られている。我々は無血管組織として知られている心臓弁にも同様の防御機構が存在すると考え、心臓弁が発現する血管新生抑制因子をスクリーニングした。その結果軟骨に発現する血管新生抑制因子コンドロモジュリン－Ｉがヒト、ラット、マウス生体の心臓弁に発現すること、マウスにおいて胎生 9.5 日から成獣にいたる心臓弁に発現すること、コンドロモジュリン－Ｉ遺伝子ノックアウトマウスの心臓弁では VEGF の発現増加と新生血管の増加、炎症細胞の浸潤、弁の肥厚・石灰化・脂肪沈着が観察されること、ノックアウトマウスの心エコー図では弁膜症様の弁肥厚と乱流が生じること、さらにヒト弁膜症症例の病理組織を解析し、感染性心内膜炎、リウマチ性弁膜症、動脈硬化性弁膜症症例の心臓弁ではコンドロモジュリン－Ｉの発現低下とそれに一致して VEGF の発現増加、新生血管の増加、MMP1,2,9,13 の活性化を観察した(Yoshioka et al. Nat Med, 2006)。

次に我々は同じく心臓弁膜症に関与する心臓内のもうひとつの無血管構造物、腱索に注目した。腱索は弁尖と乳頭筋を結ぶ線維性組織であり、弁と同様無血管であることが知られている。腱索が断裂することにより弁膜症（特に僧帽弁閉鎖不全症）をきたすが、その成因には詳細な検討がなされておらず、特発性の場合も多い。弁と腱索の発生過程は軟骨・腱の発生過程と類似点が多く、胎生期において弁には軟骨に、腱索には腱に特異的なマーカーが発現していること、弁には軟骨から抽出されたコンドロモジュリン－Ｉが防御因子として作用していること、コンドロモジュリン－Ｉと相同性をもつテノモジュリンという蛋白質が筋肉の腱組織に発現し防御因子として作用している可能性があることから考え、このテノモジュリンが腱索においても無血管性維持に関与する防御因子として重要なのではないかと仮定した。実際、腱索において同心円上にテノモジュリンが発現していることが mRNA レベル、蛋白レベル、免疫染色にて確認されており、テノモジュリンが腱索断裂の成因になり得ることが推測され、弁膜症に対する新たな治療方法が開発される可能性があり、非常に意義深い。

２．研究の目的

血管新生抑制因子テノモジュリンの心臓腱索における発現部位、発現時期、腱索断裂の際における発現様式の変化、ノックアウトマウスの作成とその解析（組織学的解析、腱索断裂発症の有無）、vitro において腱索培養細胞の分泌の有無、またテノモジュリンがヒト冠動脈内皮細胞へ及ぼす作用を解析する機能解析、犬を用いた腱索損傷モデル作成と

その解析を施行し、これらの結果をふまえ、最終的にはまだその機序に不明な点が多い腱索断裂発症のメカニズムについて言及することを目標とする。

３．研究の方法

(1) テノモジュリンの発現時期・部位を明らかにするため、マウス胎児（胎生10.5日、12.5日、14.5日、16.5日、18.5日）・新生児（出生直後、生後6週）・成獣（52週、75週）およびブタより心臓を摘出し、遺伝子レベル(RT-PCR法)、たん白レベル(Western blot法、免疫染色)にて発現の有無を解析する。

(2) ヒト正常および心臓弁膜症症例に対し腱索の病理標本を作成し、各種染色(HE, Azan, EVG, von Kossa, SudanⅢ)、各種抗体(テノモジュリン、VEGF、vWF、MAC1、コラーゲンtype１、エラスチン、MMP1,2,3,9,13)を用いた免疫染色を行い、ヒトにおける正常・病的状態における腱索の解析を行う。

(3) 腱索細胞の培養というのはこれまで報告がなく、今回ウサギ心臓腱索からのexplant cultureにて腱索細胞の初代培養を確立し、さらに腱索細胞がテノモジュリンを発現しているかをRT-PCR法、Western blot法にて確認する。次にテノモジュリンの、ヒト冠動脈内皮細胞のtube形成能、遊走能に対する作用、及びアポトーシス誘導の有無を観察し、冠動脈の血管新生を阻害するかを確認する。

(4) テノモジュリンノックアウトマウスを作成し、腱索の変化（血管新生、炎症細胞浸潤、VEGF 発現上昇）を各種染色（HE, Azan, EVG)、免疫染色（テノモジュリン、VEGF、vWF、MAC1、MMP1,2,3,9,13）にて解析する。

(5) 大動物（ビーグル犬）に対し腱索損傷モデルを作成し、腱索の状態及びテノモジュリンの発現様式の変化を評価する。具体的にはビーグル犬を全身麻酔下に右開胸し、心膜切除、心臓露出させ、上行大動脈送血、上下大静脈脱血にて人工心肺を確立させる。心拍動下に右房切開したのち三尖弁を心房側へ反転させ、弁に付着している腱索の表面（のみ）をヤスリにて摩耗させ右房閉鎖、人工心肺離脱、創閉鎖し麻酔から覚醒させた後、1,3,6ヶ月後に犠牲死させ、腱索を摘出し、各種染色（HE, Azan, EVG)、免疫染色（テノモジュリン、VEGF、vWF、MAC1、MMP1,2,3,9,13）にて解析する。

４．研究成果

(1) マウス胎生期、成獣およびブタの心臓を用いて、RT-PCR 法、Western blotting 法により、胎生 14.5 日からテノモジュリンの発現は確認された。発現は腱索に特異的であった。

(2) ヒト剖検例及び手術例における腱索組織標本を作製し、HE・EVG 染色、免疫組織化学染色を施行した。正常ヒト腱索において、テノモジュリンは内皮下のエラスチンが豊富な層に同心円状に発現していた。ヒト腱索断裂症例において、テノモジュリンの発現は断裂部に一致し減少しており、同部位にはVEGF-A、MMP-1, 2, 13 の強い発現、炎症性細胞浸潤、異常な新生血管が認められた。

(3) ウサギ腱索を用いて腱索間質細胞の初代培養を行い、その培養上清を用いてヒト冠動脈内皮細胞の血管管腔形成能、遊走能に対する作用を解析した。免疫組織化学染色・RT-PCR 法により、腱索間質細胞の細胞質中にはテノモジュリン蛋白の存在が確認された。培養上清を用いて血管内皮細胞の管腔形成能及び遊走能に対する作用を解析したところ、これらを抑制する作用が認められ、また、テノモジュリンの siRNA を用いることにより効果を減弱させることができた。

(4)　成犬を用いた腱索損傷モデルを作成し

た。1,3カ月後にそれぞれ犬を犠牲死させ、腱索の組織学的変化を経時的に評価した。肉眼的所見にて、明らかな腱索断裂は認めなかった。採取した腱索を用いて各種染色検査、免疫化学組織検査を施行したところ、腱索の中心部に向かい経時的に新生血管、VEGF-A、MMPの発現が進行性に認められ、ヒト腱索断裂組織における所見と類似していると考えられた。以上より、テノモジュリンの欠失・血管新生促進・MMP 活性化が腱索断裂に関与することが示された。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　１件）

① Naritaka Kimura, Chisa Shukunami, Daihiko Hakuno, Masatoyo Yoshioka, Shigenori Miura, Denitsa Docheva, Tokuhiro Kimura, Yasunori Okada, Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka, Ryohei Yozu, Junjiro Kobayashi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yuji Hiraki, Keiichi Fukuda.
Local Tenomodulin Absence, Angiogenesis, and Matrix Metalloproteinase Activation Are Associated With the Rupture of the Chordae Tendineae Cordis.
Circulation 査読有 2008 118(17) 1737-1747.

〔学会発表〕（計　５件）

①木村成卓、伯野大彦、四津良平、福田恵一。心臓腱索に特異的に発現している血管新生抑制因子 Tenomodulin と腱索断裂発症との関連について。第 19 回日本循環薬理学会（京都）。2009/11/27。

② Naritaka Kimura, Chisa Shukunami, Daihiko Hakuno, Masatoyo Yoshioka, Shigenori Miura, Denitsa Docheva, Tokuhiro Kimura, Yasunori Okada, Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka, Ryohei Yozu, Junjiro Kobayashi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yuji Hiraki, Keiichi Fukuda. Local Tenomodulin Absence, Angiogenesis, and Matrix Metalloproteinase Activation Are Associated With the Rupture of the Chordae Tendineae Cordis. 第 73 回日本循環器学会・学術集会（大阪）。2009/3/20。

③Naritaka Kimura, Daihiko Hakuno, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Ryohei Yozu, Keiichi Fukuda. Chordae tendineae cordis are covered and protected by the anti-angiogenic factor, Tenomodulin. 第 25 回国際心臓研究学会（ISHR）日本部会(横浜)。2008/12/6。

④Naritaka Kimura, Daihiko Hakuno, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Ryohei Yozu, Keiichi Fukuda. The anti-angiogenic factor, Tenomodulin, has a pivotal role in chordae tendineae cordis. 第 12 回日本心不全学会（東京）。2008/10/17。

⑤Naritaka Kimura, Daihiko Hakuno, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Ryohei Yozu, Keiichi Fukuda. Pathological angiogenesis concomitant with the downregulation of tenomodulin and upregulation of VEGF-A causes degeneration and rupture in chordae tendineae cordis. American heart association Basic cardiovascular sciences conference 2008 (Keystone). 2008/7/29.

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕特になし

６．研究組織
(1)研究代表者
木村　成卓　(KIMURA NARITAKA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90348657

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし