

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09692

研究課題名(和文) Nod1リガンド誘発冠動脈炎の発症機序に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism in Nod1 ligand induced coronary arteritis

研究代表者

田中 珠美 (Tanaka, Tamami)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：60423547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：FK565投与冠動脈炎発症前マウスでCD11c陽性MHC class II陽性細胞が集簇していた。形態学的、遺伝子発現の特徴からマクロファージと考えられ、CD11c陽性マクロファージと名付けた。さらに、非血球系細胞でのNod1がそのCD11c陽性マクロファージの増加や冠動脈炎形成に必要であった。また、血管内皮細胞がFK565に反応して多量のサイトカインを産生し、Nod1経路を特異的に抑制した内皮細胞ではそのサイトカイン産生やCD11c陽性マクロファージ集簇、冠動脈炎発症を抑制されていた。以上から、CD11c陽性マクロファージが冠動脈炎発症に重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We found that CD11c(+)MHC class II(+) cells accumulated in the heart of FK565-treated mice before arteritis development. Morphological features and gene expression signatures of the cardiac CD11c(+)MHC class II(+) cells suggested that this population is closely related to macrophages, and thus, we designated them cardiac CD11c(+) macrophages. Nod1 in nonhematopoietic cells was required for the increase of cardiac CD11c(+) macrophages and arteritis development. Among them, cardiac endothelial cells produced a large amount of chemokines in response to FK565. Endothelial cell-specific blockade of Nod1 signaling suppressed FK565-induced expression of these chemokines, accumulation of cardiac CD11c(+) macrophages, and subsequent coronary arteritis development. These results suggest that cardiac CD11c(+) macrophages play a pivotal role in the pathogenesis of acute coronary arteritis.

研究分野：小児感染免疫

キーワード：川崎病 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

川崎病は全身性血管炎症候群であるが、その大きな特徴の一つとして冠動脈炎があるが、その発症メカニズムは全くわかっていない。

2. 研究の目的

当教室から報告した自然免疫リガンドである Nod1 リガンドによる川崎病類似冠動脈炎マウスモデルを用いて、冠動脈炎発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

・モデルマウス作成

FK565(Nod1 リガンド) 500 μ g を 0 日、3 日を皮下投与し、6 日に心臓を灌流した後に摘出し、各実験で使用した。

・心臓細胞の評価

心臓をコラゲナーゼ 入りの RPMI-1640 で灌流し、ホモジナイズした。細胞懸濁液を遠心し、上清はフィルターを通した後に、フローサイトでその非心筋細胞(血球)を評価した。

・マウス心臓内皮細胞

上記細胞懸濁液から抗 CD31 マウス抗体 MACS を用いて CD31 陽性細胞を分離した。分離された細胞は 7 日間培養され、解析に用いた。

・生体内細胞除去

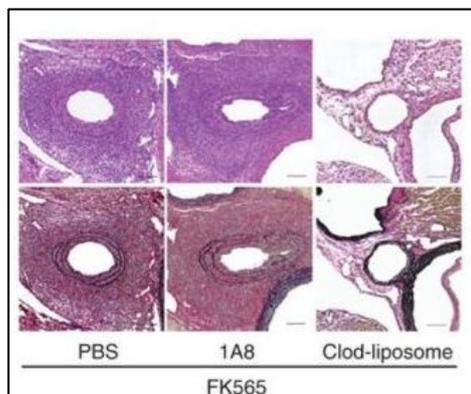
好中球除去のため抗 Ly6G 抗体を、貪食細胞除去のためクロドロン酸リポソームを投与した。また、CD11c 細胞の特異的除去のため、CD11c-DTR (CD11c-ジフテリア毒素受容体トランスジェニック) マウス骨髄を移植し、ジフテリア毒素を使用した。

・マイクロアレイ解析

cRNA は GeneChip WT Terminal Labeling and Control kit を用いて増幅、標識され、その後ハイブリダイズしたあと Affymetrix スキャナーでスキャンした。データの GEO 悪セクション番号は GSE60506。

4. 研究成果

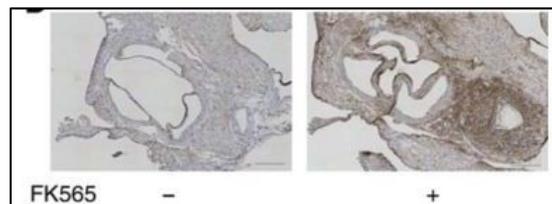
1) Nod1 誘導性冠動脈炎は単球食細胞が必須本モデルでは Rag1 欠損マウスでも血管炎を発症したため T 細胞、B 細胞、NK 細胞は必要ではないことが示された。また、好中球除



去マウスでも冠動脈炎を発症した。一方で、クロドロン酸リポソーム投与マウスでは冠動脈炎は劇的に改善していた(左図)。これらの結果より、好中球やリンパ球ではなく単球食細胞が FK565 による血管炎の病態に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2) CD11c 陽性 MHC クラス II 陽性細胞の集簇

血管炎に関与している細胞をさらに特徴付けるため、FK565 投与マウスの心臓に浸潤している細胞を解析した。すると CD45 陽性細胞が有意に心臓に集積しており、Nod1 欠損マウスではみられなかった。さらに、フローサイトによる検討では CD11c 陽性 MHC クラス II 陽性細胞が著増し、免疫組織学的でも冠動脈周囲に CD11c 陽性細胞が集簇していた。(下図)

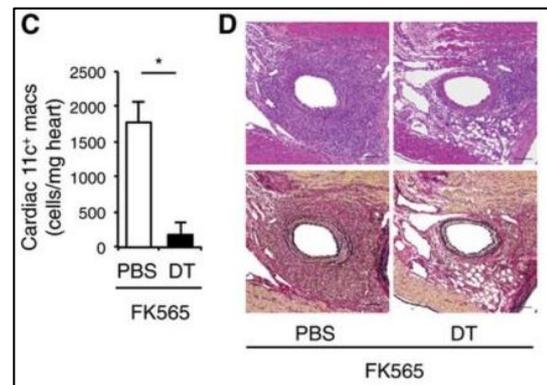


この CD11c 陽性 MHC II 陽性細胞のマイクロアレイ解析したところ、マクロファージと同じ群に入ることがわかった。そこでこの細胞群を CD11c 陽性マクロファージと名付けた。

この CD11c 陽性細胞は FK565 投与 1 日後より出現し、冠動脈炎回復に先行して、9 日目には消失した。この動態より、心臓の CD11c 陽性マクロファージが冠動脈炎の発症に深く関わっている可能性が示唆された。

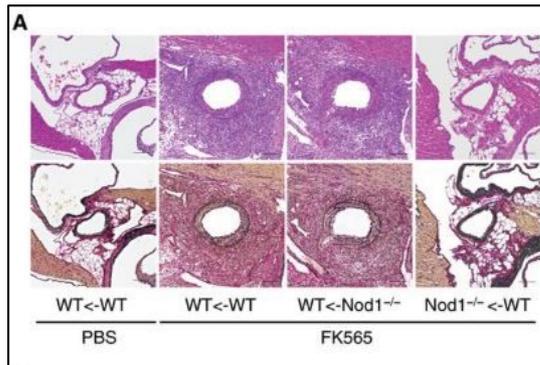
3) CD11c 陽性細胞除去により冠動脈炎改善

クロドロン酸リポソーム投与マウスでは心臓 CD11c 陽性マクロファージが劇的に減少していた。そこで、CD11c-DTR マウスを用いて、CD11c 陽性細胞を特異的に消去した。具体的には WT マウスの骨髄に CD11c-DTR 骨髄を移植した。そのマウスでは冠動脈炎の重症度も有意に低下していた。(下図)これらの結果より、CD11c 陽性マクロファージが FK565 による冠動脈炎を引き起こしていることが示唆された。



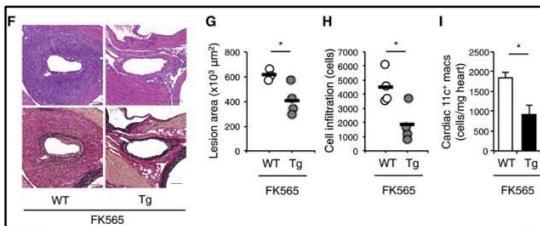
4) 非血球系細胞の Nod1 発現の必要性

Nod1 は様々な細胞に発現しているため、どの細胞の Nod1 発現が、CD11c 陽性マクロファージの集積、冠動脈炎の発症に重要なかを調べた。WT マウスと Nod1 欠損マウスを用いてキメラマウスを作成し、FK565 を投与した。すると、Nod1 欠損マウス由来骨髓・WT マウスでは冠動脈炎を発症し、CD11c 陽性マクロファージが集積し、その逆は発症せず、集積がなかった。(下図) これらの結果から FK565 による冠動脈炎は血球系細胞ではなく、非血球系細胞の Nod1 発現が必要であることが示唆された。

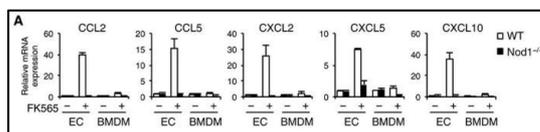


5) 内皮細胞の NF- κ B シグナル阻害で改善

内皮細胞特異的に Nod1 シグナル伝達を阻害するため、我々は内皮細胞にドミナントネガティブ I κ B を発現するトランスジェニックマウス (E-DNI I κ B Tg) を用いた。すると、FK565 投与による冠動脈炎および心臓の CD11c 陽性マクロファージ数は有意に減少していた。(下図) 以上から、内皮細胞の Nod1 を含む NF- κ B を活性化受容体が CD11c 陽性マクロファージの集積や冠動脈炎の病態に重要な役割を果たすことが示唆された。



6) 内皮細胞は Nod1 を介してケモカイン産生 CD31 陽性内皮細胞をマウス心臓から単離し、FK565 で刺激した。FK565 は内皮細胞において CCL2, CCL5, CXCL2, CXCL5 および CXCL10 の発現を Nod1 依存的に誘導した。



以上の結果から、Nod1 誘導性冠動脈炎は FK565 の刺激により冠動脈内皮細胞が活性化し、サイトカイン・ケモカインが放出され、それにより CD11c 陽性マクロファージが誘導され、さらに炎症反応の増悪を来し、結果

的に冠動脈炎を来すことが明らかとなった。

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 5 件)

1. 西尾壽乗、名西悦郎、大賀正一、川崎病の動物モデル。臨床免疫・アレルギー科 2017; 68: 629-35.

2. Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Shimoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-Hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T. Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signalling pathway in a murine model of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol. 2017; 190: 54-67.

3. Hara T, Nakashima Y, Sakai Y, Nishio H, Motomura Y, Yamasaki S. Kawasaki disease: a matter of innate immunity. Clin Exp Immunol. 2016; 186: 134-143.

4. 本村良知、原寿郎、山崎晶：川崎病の新しいマウスモデルにおける CD11c+マクロファージの意義。臨床免疫・アレルギー科 65; 370-377, 2016

5. Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T, Yamasaki S. Identification of Pathogenic Cardiac CD11c+ Macrophages in Nod1-Mediated Acute Coronary Arteritis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015; 35:1423-33.

[学会発表](計 3 件)

1. 西尾壽乗、川崎病類似 Nod1 リガンド誘発冠動脈炎モデルからわかってきたこと。三重大学医学学生物学セミナー 2017.7.10 三重

2. 神野俊介、川崎病と自然免疫。第 16 回九州川崎病研究会 2017.5.20 北九州

3. 本村良知、神野俊介、西尾壽乗、山崎晶、原寿郎、大賀正一。Nod1 誘導性川崎病モデルマウスにおける CD11c 陽性マクロファージの役割 第 36 回日本川崎病学会・学術集会 2016.9.30-10.1 横浜

[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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 珠美 (TANAKA Tamami)
九州大学・大学院医学研究院・学術研究員
研究者番号：60423547

(2)研究分担者

西尾 壽乗 (NISHIO Hisanori)
九州大学病院・小児科・助教
研究者番号：00507783

神野 俊介 (KANNO Shunsuke)
九州大学病院・グローバル感染症センター・助教
研究者番号：60725919

本村 良知 (MOTOMURA Yoshitomo)
九州大学病院・医療機材サプライセンター・助教
研究者番号：10737175

(3)連携研究者

(4)研究協力者

なし