

令和元年6月21日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08668

研究課題名(和文) 急性心筋梗塞における内皮Toll様受容体を介した冠微小循環傷害の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of coronary microcirculation injury via endothelial Toll-like receptor in acute myocardial infarction

研究代表者

倉田 美恵 (Kurata, Mie)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：80423440

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)：急性心筋梗塞において、冠動脈形成術後に心筋に十分な血液灌流が得られない、微小循環障害(no-reflow現象)が生じることがある。申請者らはこの現象に好中球の自らの核酸と細胞内蛋白の複合体を放出することで外来病原体を捕獲する機序：neutrophil extracellular traps (NETs)が関与していると仮定し研究を行った。急性心筋梗塞剖検心において病変部におけるNETsを証明した。また、核酸複合体であるNETsの内皮受容体を明らかにするため無細胞コムギ胚芽系でTLRを合成しそれが既知のリガンドと結合することを明らかにした。今後剖検心においてTLRの発現を確認していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

No-reflow現象の主たる病理像である内皮傷害は形態的検討はなされているもののその詳細な細胞伝達機構は未だ明らかではない。しかしこれらの結果は依然no-reflow現象を抑制する治療薬開発には結びついておらず、現在唯一のエビデンスを持った薬剤は血管拡張薬という対症療法のみである。いま、あらたな治療戦略が求められており、本研究がその一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In acute myocardial infarction, there may occur a so-called microcirculatory disorder (no-reflow phenomenon) in which sufficient blood perfusion can not be obtained in the myocardium although the occlusion site is released. Applicants hypothesized that this phenomenon involves a mechanism by which neutrophils capture foreign pathogens by releasing a complex of their own nucleic acid and intracellular protein: neutrophil extracellular traps (NETs). We demonstrated NETs at the lesion site in acute myocardial infarction at autopsy. In addition, in order to clarify the endothelial receptor of nucleic acid complex NETs, we synthesized TLR in cell-free wheat germ system and revealed that it binds to known ligands.

研究分野：人体病理学

キーワード：急性心筋梗塞 NETs 内皮障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 冠動脈血行再建術後に生じる微小循環傷害、no-reflow 現象

急性心筋梗塞は我が国の主要な死因の一つである。その主な病態は冠動脈の血栓性閉塞であり、閉塞血管の血行再建術が行われる。しかし閉塞部位が解除されたにもかかわらず心筋に十分な血液灌流が得られない、微小循環傷害（no-reflow 現象）が生じることがある。これによる慢性期心機能の低下や生命予後の悪化が報告されており、閉塞血管の再疎通のみならず心筋還流も改善させる治療が望まれる。No-reflow 現象の病理像は毛細血管閉塞であるが、引き金となる分子機序は不明である。

(2) 内皮傷害をきたす neutrophil extracellular traps (NETs)

好中球は自らの核酸と細胞内タンパクの複合体を放出することで外来病原体を捕獲する機序：neutrophil extracellular traps (NETs) を持つ。NETs は強い細胞毒性を有しており敗血症時の血管内皮細胞傷害の一因とされている。急性心筋梗塞においても NETs が放出され、内皮傷害に関与している可能性がある（図 1）。

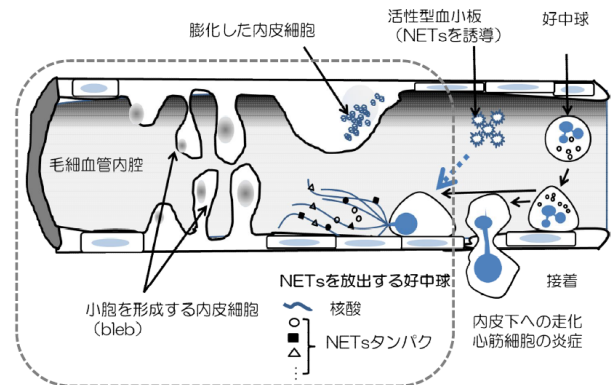


図1 No-reflow 現象における内皮障と好中球
No-reflow 現象では内皮の膨化により毛細血管が閉塞する。それに NETs が関与している可能性がある(破線内)。

(3) Toll 様受容体を介す内皮細胞傷害

内皮細胞は体循環中に存在する細胞傷害性物質を認識する複数の Toll 様受容体 (TLR) を持ち、これらを介した内皮細胞傷害の機序が報告された。NETs は核酸、細胞質タンパクを含み、複数の TLR が受容体となることが予想される。

2. 研究の目的

急性心筋梗塞は冠動脈の血栓性閉塞によって生じる。閉塞血管の血行再建術後も心筋の微小循環傷害が遷延した場合、心機能・生命予後の悪化につながる。微小循環傷害は内皮細胞の膨化に伴う毛細血管の閉塞によるが、その分子生物学的機序は不明である。急性心筋梗塞の組織傷害の主因は活性化好中球である。好中球の活性化形態の一つとして、自らの核酸や細胞質タンパクを放出する (neutrophil extra cellular traps: NETs) が知られている。NETs は内皮傷害を惹起するが、急性心筋梗塞における NETs の意義は不明である。本研究の目的は NETs による内皮細胞傷害の分子機序を、Toll 様受容体に着目し、無細胞タンパク合成系とアルファ法を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) コムギ胚芽無細胞タンパク合成系での TLR 構築

NETs は核酸とタンパクの複合体である。主な構成タンパクはすでに報告されているが、各々のタンパク、核酸あるいはそれらの複合物と TLR の結合について明らかにした報告は未だない。明らかにする内容：コムギ胚芽無細胞タンパク合成系で TLR とその結合タンパクを作成し、さらに DNA あるいは同系で作成した NETs 構成タンパクを個別にあるいは混合物を負荷することで直接的な TLR のシグナル伝達機構を明らかにする。

(2) No-reflow に陥った心筋組織における NETs の証明

不幸にして急性心筋梗塞のためお亡くなりになった患者様の剖検心において no-reflow 領域に NETs の存在を明らかにし、その程度が内皮傷害・心筋傷害に相関することを証明する。これら NETs 形成時に細胞死、特に apoptosis や pyroptosis の際に形成されるインフラマソームの構成成分である ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) が関与していないか、ASC の免疫染色を行い、その分布と NETs、心筋傷害の関係について検討した。

4. 研究成果

(1) コムギ胚芽無細胞タンパク合成系での TLR 構築

申請者らはコムギ胚芽無細胞タンパク合成系を用いてヒト TLR を構築し、それらが既知のリガンドと結合することを明らかにした。具体的には TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 の全長、LRR ドメイン、細胞質内ドメイン、膜貫通部位ドメインの複数のフラグメント、複数の Tag において検索した。

具体的には
TLR1, TLR2 のヘテロダイマーにおいて Biotin 加
Pam3CSK4 存在下でアルファシグナルが上昇する
こと、TLR4 において LPS 存在下でアルファシグ
ナルが上昇することである (図1~3)。

図1
ヒトTLR
コムギ胚芽無細胞タンパク合成結果

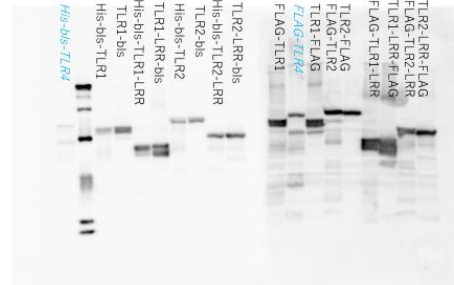


図2

TLR1LRR, TLR2-LRR x Biotin-Pam3CSK4は濃
度依存的にアルファシグナルが上昇する

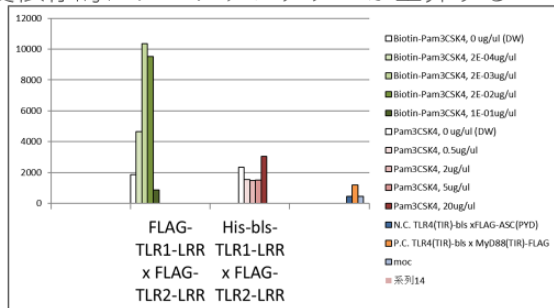
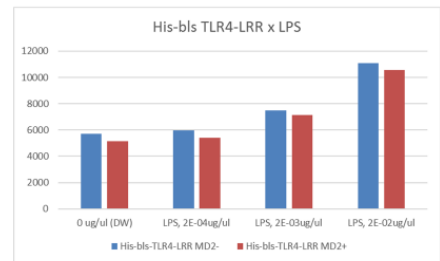


図3

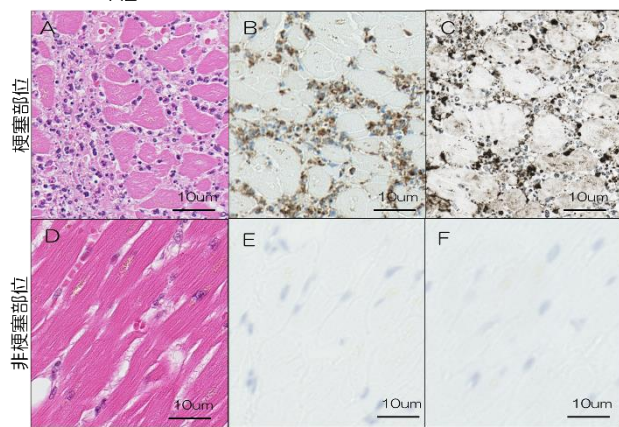
TLR4-LRR x LPS x anti-LPSAbは濃度依存的
にアルファシグナルが上昇する



(2) No-reflow に陥った心筋組織における NETs の証明

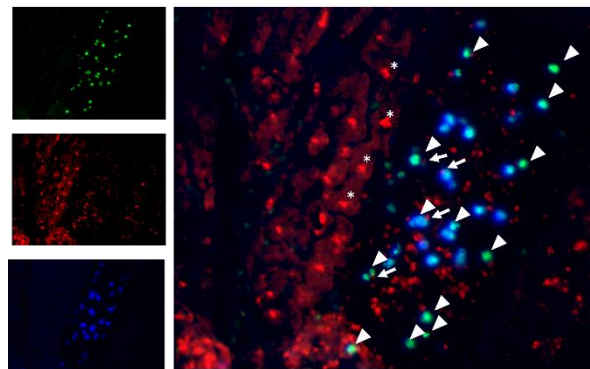
私たちはこれら NETs 形成 時に細胞死、特
に apoptosis や pyroptosis の際に形成さ
れるインフラマソームの構成 成分である
ASC (apoptosis-associated speck-like
protein containing a CARD) が 関与して
いないか、ASC の免疫染色を行い、その分
布と NETs、心筋傷害の関係について検討
した。急性心筋梗塞にて死亡し病理解剖を
行った剖検心を用い、NETs 染色を行った。
対照として非心臓死剖検心を使用した。好
中球マーカーとして抗ミエロペルオキシ
ダーゼ (MPO) 抗体を、核酸マーカーとして
核酸染色に加えて抗シトル リン化ヒスト
ン抗体を用いた。さらに ASC 抗体、抗シト
ルリン化ヒストン抗体との二重染色を行
ったところ、梗塞部位では好中球が多数観
察され、非梗塞部位ではその数は著しく少
なかった。また、シトルリン化ヒストンの
陽性像が MPO 陽性細胞の細胞 質内ある
いは細胞外に認められた。また、炎症細胞
の細胞質に ASC が観察された。NETs 形
成時に ASC が関与している可能性が示唆
された (図4、5)。

図4 HE MPO



左上 Green: Citrullinated histone
左中 Red: ASC
左下 Blue: DAPI
右 マージ

図5



5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto.
The role of interleukin-1 in general pathology
Inflamm Regen. 2019 Jun 6;39:12. (査読あり)
doi: 10.1186/s41232-019-0101-5. eCollection 2019.

(2) Tanino A, Irital J, Nagao T, Kurata M, et al.,
Neutralization of N-half Osteopontin Prevents Atherosclerotic Plaque Rupture in ApoE-
-Mice.
Journal of Cardiology and Vascular Medicine. 2018;4:1 -10. (査読あり)

(3) Nakanishi A, Kaneko N, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Zhou W, Kurata M,
Yamamoto T, Akbar SMF, Zako T and Masumoto JA-O.
Amyloid beta directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation:
identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system.
Inflamm Regen. 2018; 38: 27. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) Mie Kurata,
The Pathological Distribution of Neutrophil Extracellular Traps Correlate with Impaired
Myocardial Reperfusion in Patients with ST Elevated Myocardial Infarction
The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop,、2017年
- (2) 南淵杜萌, 倉田美恵, ほか
急性心筋梗塞心における Neutrophil Extracellular Traps と ASC の分布
第106回日本病理学会総会、2017年
- (3) 倉田美恵
Lupus nephritis and vasculitis: ISN/RPS classification and nephritis associated
autoantibodies
第107回日本病理学会総会、2018年

〔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〕

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/section/09.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：増本純也, 金子直恵

ローマ字氏名：Junya Masumoto, Naoe Kaneko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施
や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解
や責任は、研究者個人に帰属されます。