

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21590923

研究課題名（和文） HMGB1の心筋梗塞縮小効果の検討：新しい血管新生治療の開発

研究課題名（英文） Impact of HMGB1 on left ventricular remodeling after myocardial infarction: Novel therapeutic target for neovascularization

研究代表者

久保田 功 (KUBOTA ISAO)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30161673

研究成果の概要（和文）：核内転写調節因子 HMGB1 を心筋特異的に過剰発現するマウスを作製した。圧負荷心不全モデルを作成し HMGB1 の働きを検討した。野生型マウスに比べ HMGB1 マウスでは有意に心肥大が抑制された。圧負荷により野生型マウスでは心筋の核内 HMGB1 が減少し、細胞質内に移動していた。HMGB1 マウスでは、圧負荷後も核内 HMGB1 は保たれ、DNA 障害や histone deacetylase (HDAC) 活性化および HDAC2 発現が抑制された。核内 HMGB1 は HDAC の活性化と DNA 障害を抑制し、心肥大を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：High Mobility Group Box 1 (HMGB1) is an abundant and ubiquitous nuclear DNA-binding protein that has multiple functions dependent on its cellular location. In the nucleus, HMGB1 binds to DNA, facilitating numerous nuclear functions including maintenance of genome stability, transcription and repair. However, little is known about the effects of nuclear HMGB1 on cardiac hypertrophy and heart failure. The aim of this study was to examine whether nuclear HMGB1 modifies the development of cardiac hypertrophy induced by pressure overload. Thoracic transverse aortic constriction (TAC) was created in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of HMGB1 (HMGB1-TG) and wild type (WT) mice. Cardiac hypertrophy after TAC was attenuated in HMGB1-TG mice and survival rate after TAC was higher in HMGB1-TG mice than in WT mice. Induction of fetal cardiac genes was decreased in HMGB1-TG mice than in WT mice. Nuclear HMGB1 expression was preserved in HMGB1-TG mice compared with WT mice after TAC. Preserved nuclear HMGB1 expression significantly attenuated histone deacetylase (HDAC) activity and DNA damage after TAC. In conclusion, these results suggest that preserved nuclear HMGB1 prevents hypertrophy and heart failure via repressing HDAC activity and DNA damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：HMGB-1, 心筋虚血, 心肥大

1. 研究開始当初の背景

HMGB1 は非ヒストン核蛋白の主要成分で、核内でヒストン H1 と置換してヌクレオソーム構造を弛緩させ、転写反応に最適な構造を構築させる。HMGB1 は転写因子などの宿主因子 (p53 など) と結合することにより、それら因子の DNA への結合を促進する。また、DNA に直接働いて DNA の高次構造を転写反応の最適構造に変化させる働きも持っている。HMGB1 は p53 と結合し、Cyclin G1 や p21waf1 の転写活性調節を行うことが報告されており、心筋細胞を含む多くの全身の臓器に発現している。一方、HMGB1 は核内だけでなく細胞外においても重要な機能を果たしている。核蛋白 HMGB1 が実際に細胞外に分泌されて、種々の機能を営むサイトカインとしての働きを有している。細胞外へ分泌された HMGB1 はマクロファージ、内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞などに存在する RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products)、Toll-like receptor (TLR) といった受容体に結合し、炎症性サイトカインの産生、細胞の遊走と増殖、損傷組織の修復、細胞のストレスに対する生存維持やシナプス形成等多彩な作用を発揮する。近年、心血管系における HMGB1 の機能が明らかになりつつある。我々は心筋にのみ HMGB1 遺伝子を選択的に発現したトランスジェニックマウス (HMGB1-TG) を作成した。マウスの冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成したところ、HMGB1-TG マウスでは野生型 (WT) マウスよりも梗塞サイズが有意に小さかった。HMGB1-TG マウスでは梗塞周囲での CD31 陽性の内皮細胞、 α -smooth muscle actin 陽性の血管平滑筋細胞が多く認められ、capillary density が高く、血管新生ないし再生の結果、梗塞サイズが縮小したことが示唆された。

2. 研究の目的

HMGB1-TG マウスのフェノタイプを詳細に解析し、HMGB1 の心筋細胞での機能を解明することを目的とする。梗塞サイズが縮小した結果、慢性期の心機能と生命予後が改善するのかを検討する。HMGB1 により心筋幹細胞の心筋細胞への分化が促進されるのか、骨髄由来の幹細胞が虚血部位へ誘導され心筋細胞へ分化するのか、血管新生・再生が促進されるのかを *in vivo* で明らかにする。また圧負荷心不全モデルを作成し、心肥大における HMGB1 の役割を検討する。

3. 研究の方法

HMGB1-TG マウスにおいて、梗塞後慢性期の

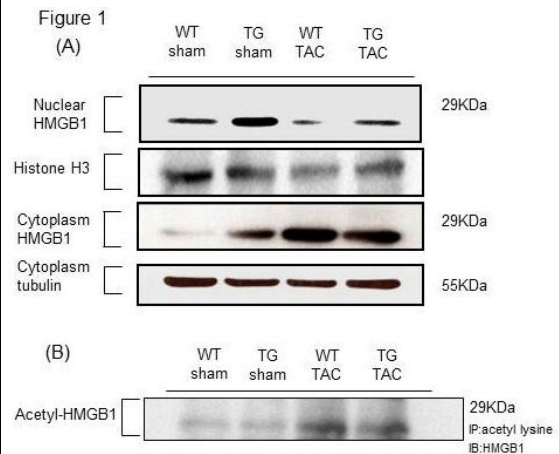
心機能と生命予後について検討する。免疫染色を行い、マウス心筋内に Sca-1 陽性細胞、C-kit 陽性細胞の有無を評価する。HMGB1-TG マウスへ GFP マウスの骨髄移植を行い、梗塞周囲に GFP 陽性の骨髄由来の細胞が認められるかを観察する。

心筋梗塞と並んで臨床的に重要な心臓に対する機械的ストレスである、圧負荷に対する影響を検討する。HMGB1-TG マウスと WT マウスに大動脈狭窄手術 (TAC) を行い、左室に圧負荷をかける。この圧負荷モデルでは術後4週で代償性の心肥大、8週で心不全に陥るが、最近、代償が破綻し心不全に陥る機序として血管新生が重要な役割を果たしていることが報告された (Nature 2007; 446: 444)。術後4週目と8週目に心機能を心エコーとカテーテルによる圧測定で検討する。その後屠殺し心臓を摘出、重量を測定後、病理標本作製し、血管新生、心筋細胞肥大、線維化等の評価を行う。

4. 研究成果

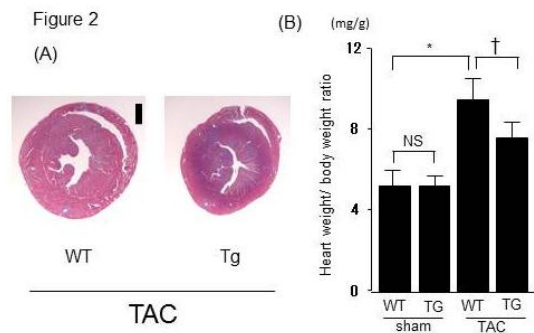
心不全患者の心筋生検標本では核内 HMGB1 が細胞質内に移動していたことより、TAC 手術後に心筋 HMGB1 の局在を検討した。

WT マウスでは HMGB1 は核内から細胞質に移動していたが、TG マウスでは核内 HMGB1 が保たれていた。HMGB1 の格外放出に関与する



アセチル化は差を認めなかった。

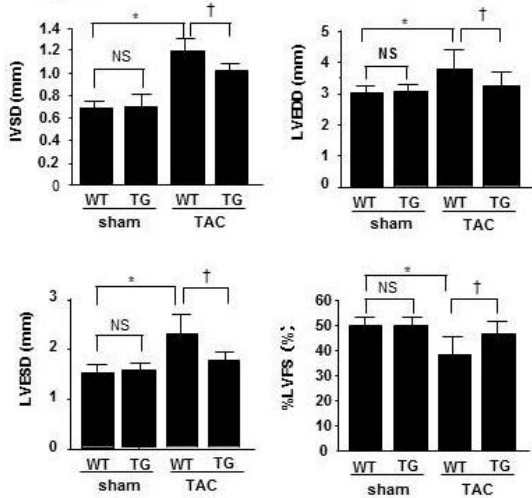
心肥大および心重量体重比は WT に比べ、TG



マウスで有意に抑制されていた。

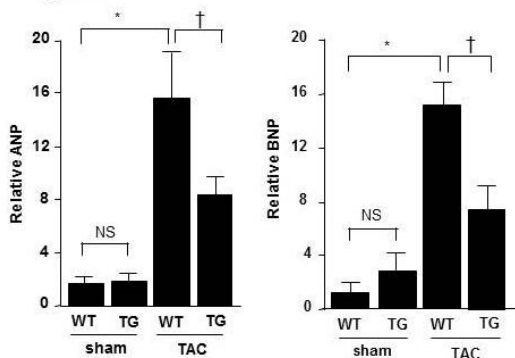
心エコー上も TAC 後の左室中隔壁肥厚、心室拡大、収縮率低下は、TG において有意に抑制されていた。

Figure 3



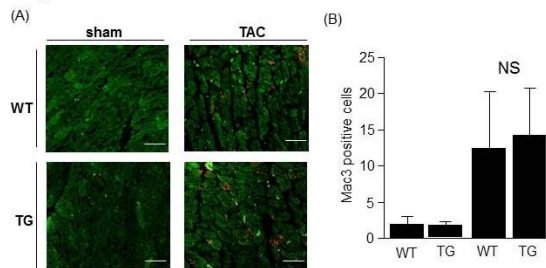
また胎児型遺伝子 ANP、BNP の発現も TG マウスで有意に抑制されていた。

Figure 4



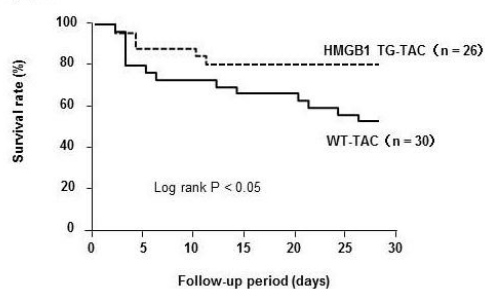
しかしマクロファージなどの炎症性細胞の浸潤は、WT と TG で有意差は認めなかった。

Figure 5



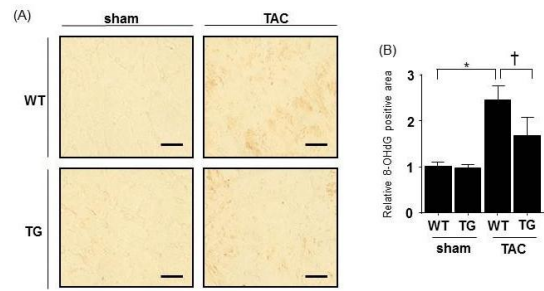
Kaplan-Meier 解析では TAC 後の生存率は WT に比べ TG マウスで有意に良好であった。

Figure 6



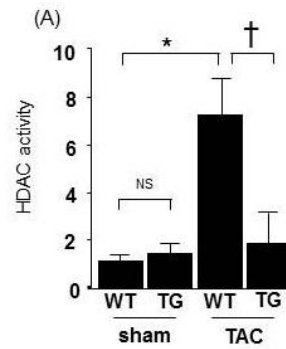
TAC による心筋細胞の DNA 障害を 8oHDG の免疫染色で評価したところ、TG マウスでは有意に DNA 障害が抑制されていた。

Figure 7



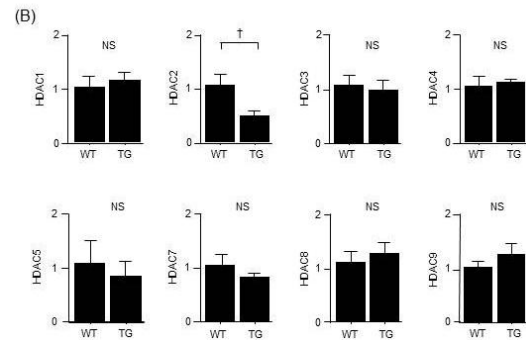
ヒストン脱アセチル化酵素活性 (HDAC 活性) は心肥大に関与することが知られているが、TAC 後の心筋核内の HDAC 活性は WT に比べて、有意に TG マウスで抑制されていた。

Figure 8



更に、HDAC のクラス I 及びクラス IIa のアイソザイムをリアルタイム PC で評価したところ、クラス I の HDAC2 の発現のみが TG マウスで有意に抑制されていた。

Figure 8



HDAC2 により心臓胎児型遺伝子が調節されていることが報告されており、HDAC2 を心臓特異的に過剰発現させると、心臓胎児型遺伝子の発現は増加すると言われている (Nat Med 2007; 13: 324-331, Circulation 2006; 113: 2579-2588)。

心肥大刺激により心筋細胞では核内の HMGB1 が減少し、アセチル化を受ける。核内 HMGB1 が減少するため、DNA 障害が修復されず、心肥大及び心不全が進行し、心機能低下が生じ

ると考えられる。一方、TG マウスでは核内に十分な HMGB1 が保たれるために DNA 障害の修復がなされ、心機能低下を防ぐ可能性がある。さらに核内 HMGB1 が保たれることにより、HDAC 活性が減少し、心肥大及び心不全の進行が抑制される可能性がある。

心筋における核内 HMGB1 は DNA 障害の修復と HDAC 活性の抑制により心肥大及び心不全の進行を防ぐことが示唆され、新たな心不全治療ターゲットとなることが示唆された。

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 31 件)

- ① Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Wanezaki M, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Kubota I. Prognostic value of low left atrial appendage wall velocity in patients with ischemic stroke and atrial fibrillation. *J Am Soc Echocardiogr*. 2012; 25: 576-583. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2012.01.012>
- ② Funayama A, Watanabe T, Tamabuchi T, Otaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyamoto T, Nitobe J, Kubota I. Elevated cystatin C levels predict the incidence of vasospastic angina. *Circ J*. 2011; 75: 2439-2444. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0008>
- ③ Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Hirono O, Kubota I. Increased left atrial volume index predicts a poor prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail*. 2011; 17: 210-216. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.10.006>
- ④ Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41: 759-766. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02465.x>
- ⑤ Nishiyama S, Watanabe T, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Shibata Y, Konta T, Kawata S, Kato T, Fukao A, Kubota I. Trends in coronary risk factors among

patients with acute myocardial infarction over the last decade: the Yamagata AMI registry. *J Atheroscler Thromb*. 2010; 17: 989-998. 査読有 <http://dx.doi.org/10.5551/jat.4671>

[学会発表] (計 7 件)

- ① Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Netsu S, Funayama A, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Pentraxin 3 is essential for neointima formation after vascular injury. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ② Funayama A, Shishido T, Ishino M, Ohtaki Y, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) prevents cardiac dysfunction induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ③ Netsu S, Shishido T, Ishino M, Funayama A, Kadowaki S, Narumi T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Overexpression of midkine aggravates cardiac dysfunction and adverse myocardial remodeling induced by pressure overload. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center; March 16-18 2012
- ④ Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Netsu S, Funayama A, Arimoto T, Nishiyama S, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: Deficiency of the long pentraxin PTX3 deteriorates neointimal hyperplasia after vascular injury. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011
- ⑤ Netsu S, Shishido T, Ishino M, Kadowaki S, Narumi T, Otaki Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Nishiyama S, Takahashi H,

Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Kubota I: Midkine exacerbates cardiac hypertrophy and remodeling in response to pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011

- ⑥ Funayama A, Shishido T, Netsu S, Ishino M, Otaki Y, Honda S, Hasegawa H, Kadowaki S, Narumi T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Kuwahara K, Nakao K, Takeishi Y, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of high mobility group box 1 (HMGB1) attenuates cardiac dysfunction induced by pressure overload. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orlando, America; November 12-16 2011
- ⑦ Kato S, Watanabe T, Suzuki S, Ishino M, Sasaki T, Shishido T, Sadahiro M, Kubota I: Atrial endothelial impairment through toll-like receptor-4 signaling may cause atrial thrombogenesis. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010, Kyoto; Kyoto International Conference Center, May 13-16 2010

[図書] (計 1 件)

- ① 渡邊哲、久保田功. **Brugada** 症候群. 循環器疾患最新の治療 2012-2013. pp349-351. 南江堂、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 功 (KUBOTA ISAO)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：30161673

(2) 研究分担者

渡邊 哲 (WATANABE TETSU)
山形大学・医学部・講師
研究者番号：40359568