

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870584

研究課題名(和文) 梗塞後リモデリングにおけるpentraxin 3とインフラマソームとの関連

研究課題名(英文) The association between pentraxin 3 and inflammasome in left ventricular remodeling after myocardial infarction

研究代表者

鈴木 聡 (Suzuki, Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60536944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄細胞にPTX3がない状態では、虚血状態の心臓組織において血管新生が促進されず、心機能の低下、炎症反応の亢進、酸化ストレスが増強されていることが判明した。虚血状態の心筋組織においてPTX3は骨髄由来の免疫担当細胞から放出されることで血管新生を促し、虚血後の心機能回復に寄与していると考えられた。これらの結論から、PTX3は虚血性心疾患における新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The lack of pentraxin 3 (PTX3) produced from bone marrow-derived cells, but not from cardiac resident cells, contributes to inflammation after myocardial ischemia/reperfusion resulting in the increment of infarct size. PTX3 produced from bone marrow-derived cells has a crucial role for cardiac protection against myocardial ischemia/reperfusion injury via attenuating neutrophil infiltration and reactive oxygen species generation.

研究分野：Cardiology

キーワード：ischemia reperfusion neutrophils cardiac remodeling pentraxin 3

1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化と高齢化社会に伴い、糖尿病、高脂血症、高血圧などを基礎とした動脈硬化性疾患の発症率・死亡率が上昇していることが、日本人における大規模かつ長期的な追跡調査において明らかにされている (Circ J. 2006;70:1249-1255)。心筋梗塞は冠動脈インターベンション技術の発達に伴い急性期死亡率は低下してきているが、その後に進行する心リモデリングから心不全を発症することが大きな問題となっている。心リモデリングの進行の増悪因子として、炎症反応や炎症性サイトカインの関連が報告されており、インターロイキン-6 (IL-6) や腫瘍壊死因子 (TNF) は、間質の線維化を促進し心リモデリングを惹起する (Circulation 2007;115:1398-1407)。

近年、細菌感染のない心臓組織における心筋傷害後の無菌性炎症反応として、インフラマソームという概念が報告されている (Circulation 2011;123:594-604)。インフラマソームとはさまざまな炎症刺激で形成される細胞内の分子複合体とされる。心筋虚血マウスモデルにおける心筋傷害の初期段階において、間質組織での線維芽細胞がインフラマソームに重要であり、局所での小さな炎症反応が白血球系の炎症性細胞を集簇させて大きな炎症反応、インフラマソームを形成して組織障害を増悪させる。

Pentraxin3 (PTX3) は最も一般的な炎症反応性物質である C-reactive protein (CRP) と同じく pentraxin スーパーファミリーに属するが、PTX3 固有ドメインを有して分子構造が長いという点で CRP とは異なっており、新しい炎症マーカーとして近年注目されている (J Clin Immunol 2008;28:1-13)。CRP は IL-6 の刺激により主に肝臓で産生されるのに対し、PTX3 は血管平滑筋や血管内皮細胞、好中球、マクロファージなど様々な細胞から産生され、より局所での炎症を反映すると考えられている (Annu Rev Immunol 2005;23:337-366)。PTX3 は CRP より鋭敏に急性心筋梗塞患者の予後を反映し (Circulation 2004;110:2349-2354) さらに我々は PTX3 が慢性心不全患者において CRP よりも優れた慢性心不全患者の予後予測因子であることを報告した (Suzuki S, et al. Am Heart J 2008;155:75-81)。

CRP は圧負荷心肥大後の心リモデリングを増悪させることが報告されており (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299:

H1795-804) 我々が行った基礎研究においても同様の圧負荷モデルで PTX3 は心リモデリングを増悪させるという結果を導き出し、報告した (PLoS One 2013;8:e53133)。しかし Salio らはマウスの心筋梗塞モデルにおいては、PTX3 は心筋傷害を軽減させると報告した (Circulation 2008;117:1055-1164)。これらの実験結果から PTX3 は心筋保護的に作用するのか、心筋傷害的に作用するのかは明確ではない。その理由の一つとして、これらの研究は PTX3 の systemic knockout マウスを用いて行われたことが挙げられる。

Salio らの心筋梗塞マウスモデルおよび我々の圧負荷心肥大モデルにおいて、傷害発生後の初期段階に組織修復のために浸潤してきた炎症性細胞や間質の線維芽細胞から、PTX3 が主に産生されていることが明らかになっている。しかし心筋間質に存在する線維芽細胞と、浸潤してきた炎症性細胞のどちらが PTX3 産生を介して組織修復に作用しているのかは明確でない。

2. 研究の目的

本研究では骨髄細胞移植を用いて PTX3 の心筋虚血に対する詳細なメカニズムを明らかにし、心不全に対する新しい治療戦略を探る。

3. 研究の方法

心筋虚血領域へ骨髄由来の細胞が誘導され発現しているかを検討するため、PTX3-KO マウスおよび WT マウスにそれぞれのマウスから採取した骨髄細胞を、それぞれのマウスに移植 (bone marrow transfection: BMT) する。つまり

WT-骨髄由来(BMT) WT マウス

WT-BMT PTX3-KO マウス

PTX3-KO-BMT WT マウス

PTX3-KO-BMT PTX3-KO マウス

の4群に分けて解析する。方法としては Recipient であるマウスに 9 Gy の放射線照射を行い、骨髄細胞を死滅させる。Donor であるマウスを屠殺し両側大腿骨と脛骨を摘出し、その骨髄内を PBS でフラッシュし骨髄細胞を採取する。採取した骨髄細胞 2×10^6 個を 29 G のシリンジに入れ recipient となるマウスの尾静脈より注入する。骨髄移植後、recipient マウスの冠動脈を 45 分間結紮した後に再灌流をさせることで心筋虚血再灌流モデルを作製する。骨髄移植の成功の確認については、それぞれ移植後のマウスの白血球を抽出し PCR

によって確認する。

虚血再灌流モデル作成14日後の心筋組織を採取し、組織解析によりヘマトキシリン・エオジン染色やマッソン・トリクローム染色をすることで心筋細胞の状態、また線維化の程度、梗塞巣の範囲を評価する。さらに、虚血危険領域と梗塞巣の範囲を判定するために、Evans blue染色やTTC染色を用いる。炎症反応の進行については浸潤した好中球やマクロファージを免疫染色して観察し、さらにPTX3がどのように虚血領域への血管新生に作用するのかを検討するために、血管内皮細胞の免疫染色も行う。また虚血再灌流後にPTX3が主にどの細胞（線維芽細胞などの固有心筋組織か、あるいは組織傷害後に浸潤してきた炎症性細胞か）から産生されているのかを検討するためにPTX3による免疫染色を行う。

PTX3による心筋組織の再生作用と炎症反応の増悪との関連を調べるため、虚血再灌流後の心筋組織における炎症性サイトカインの産生を蛋白あるいはRNAレベルでELISA法やリアルタイムRT-PCR法で検討し、さらに血中濃度も測定する。

虚血領域における心筋組織への活性酸素の程度を測定するため、dehydroethidium(DHE)染色を行う。

4. 研究成果

骨髄移植の成否については、移植後マウスの血中から採取した白血球から抽出したDNAをPCRすることによって確認できた。

組織学的検討では、左室全体に占める梗塞危険領域(are at risk)は各群において変化はなかったが、左室全体に占める梗塞領域(infarct area)はで最も大きく、

に比べてが、またに比べてが大きかった。このことから、recipientマウスに関係なく、梗塞領域の決定には骨髄由来細胞が大きく影響していることが分かった。免疫染色による解析では、虚血再灌流後48時間後の心筋組織内において、好中球、マクロファージとともに移植した骨髄細胞に由来することがわかり、また血管内皮細胞についてはrecipientに由来することが分かった。

また虚血再灌流後24時間後の血中および心臓組織内のII-6の発現量をELISA方にて調べたところ、において最も高値であった。さらに、酸化ストレスの程度をdehydroethidium染色で調べたところ、

よりもが、またよりもが高く、が最も高度に酸化ストレスを受けていることが分かった。

これらのことから、虚血再灌流後の心筋組織においてPTX3は骨髄由来の免疫担当細胞から放出されることで血管新生を促し、虚血後の心機能回復に寄与していると考えられた。したがって骨髄細胞にPTX3がない状態では虚血心において血管新生が促進されず、心機能の低下、炎症反応の亢進、酸化ストレスが増強されていることが判明した。これらの結論から、PTX3は虚血性心疾患における新たな治療ターゲットとなり得る可能性が示唆された。

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 4件)

1. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Ishino M, Kitahara T, Sasaki T, Katoh S, Otaki Y, Watanabe T, Shibata Y, Mantovani A, Takeishi Y, Kubota I: Long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload induced left ventricular dysfunction. PLoS One 8 (1), e53133, 2013
2. Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Shishido T, Ishigami A, Saitoh S, Hirose M, Kubota I, Takeishi Y: Deficiency of senescence marker protein 30 exacerbates angiotensin II-induced cardiac remodelling. Cardiovasc Res 99 (3), 461-470, 2013
3. Nakamura Y, Suzuki S, Saitoh S, Takeishi Y: New angiotensin II type 1 receptor blocker, azilsartan, attenuates cardiac remodeling after myocardial infarction. Biol Pharm Bull 36 (8), 1326-1331, 2013
4. Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Ishigami A, Shishido T, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. Biochem Biophys Res Comm 439 (1), 142-147, 2013

[学会発表](計 3件)

1. Miyata M, Suzuki S, Misaka T,

研究者番号：

Takeishi Y: Senescence marker protein 30 has a cardio-protective role in doxorubicin-induced cardiac dysfunction. Scientific Sessions of American Heart Association 2013 (2013.11.16-11.20, Dallas, Texas, USA)

2. Suzuki S, Misaka T, Saitoh S, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 has protective effects on angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction (拡張性心不全：拡張性心不全に対する新たな治療ターゲット：加齢指標蛋白 SMP30 の効果) シンポジウム)。第17回 日本心不全学会学術集会 (2013.11.28-11.30, さいたま)
3. Nakamura Y, Suzuki S, Shimizu T, Saitoh S, Takeishi Y: High mobility group box 1 promotes angiogenesis from bone marrow-derived endothelial progenitor cells after myocardial infarction. The 31st Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section (2014.12.28-12.29, Nagoya, Japan)

〔図書〕(計 1 件)

1. Suzuki S, Takeishi Y: SMP30 and aging-related cardiac remodeling and heart failure. Aging and Heart Failure, 457-463, 2014

〔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

鈴木 聡 (SUZUKI Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60536944

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()