

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15052

研究課題名(和文)炎症関連分子LRGを介したマクロファージによる心病態制御機構

研究課題名(英文)The role of leucine-rich alpha2 glycoprotein in cardiac remodeling

研究代表者

中山 博之(Nakayama, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40581062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症関連タンパク質であるleucine-rich alpha2 glycoprotein(以下LRG)が心筋梗塞後にマクロファージ等の骨髄由来細胞において発現している事を見出した。LRG遺伝子欠失マウスを用いた解析より、LRGが梗塞後リモデリングを抑制し心保護的に働いている事を明らかにした。その機序として、梗塞の境界領域において血管新生を誘導しアポトーシスを抑制する事が明らかとなった。血管新生を誘導する機構は、TGF-betaのシグナル経路を介するものである事が示唆された。これらの結果は、マクロファージの血管新生における役割とその分子機構を解明した重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Leucine-rich alpha2-glycoprotein (LRG) is considered as a biomarker of chronic inflammatory diseases. In this study, we addressed functional roles of LRG in cardiac remodeling after myocardial infarction (MI). The expressions of LRG were upregulated in post-infarct myocardium and observed in heart-infiltrated myeloid cells. To elucidate functional roles of LRG in cardiac remodeling, we generated MI in wild-type (WT) and LRG null (LRG^{-/-}) mice and found that LRG gene ablation aggravated myocardial fibrosis with cardiac dysfunction after MI with decreased capillary density at border zone. Consistently, the expression of apelin receptor was reduced in LRG^{-/-} mice, implying that the impaired angiogenic activity is associated with adverse cardiac remodeling in LRG^{-/-} mice. Moreover, LRG gene ablation suppressed the activation of smad1/5/8, a pro-angiogenic signaling pathway. Thus, our data indicate significant roles of myeloid cells in angiogenesis as well as its molecular mechanism.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心筋梗塞 リモデリング 血管新生 マクロファージ 炎症

1. 研究開始当初の背景

心疾患は、先進国における死亡原因の第一位を占め、心不全はあらゆる心疾患の終末像である。その中でも、心筋梗塞後の臓器リモデリングに伴う虚血性心不全は、高齢化と食生活の欧米化に伴う発症数の増加に加え、再灌流療法の劇的な進歩による急性期の救命率の向上により、今後症例数の大幅な増加が予想されている。その治療は、主として・遮断薬を初めとする心筋保護薬が用いられるが、発症してからの5年生存率は50%と不良であり(N Engl J Med. 347, 1397)、新規の治療薬の開発のための、有望な治療標的の同定が急務である。

血管新生は、癌や網膜症では病態を悪化させるが、心不全においては病態の抑制に重要な役割を果たす事が示唆されている。例えば、圧負荷による心肥大では、心筋細胞の容積の増加と比較して、血管数は増加せず、相対的な虚血が、適応の破綻の原因の大きな要因と考えられている(Nature. 446, 444)。心筋梗塞においては、血管内皮の細胞死により微小循環障害が生じ、梗塞後の心筋リモデリングを伸展させ、心不全が生じると考えられる(Eur J Heart Fail. 8, 373)。一方、梗塞後リモデリングにおいて、血管内皮増殖因子(VEGF)に代表される血管新生因子が、残存心筋や血管内皮細胞で産生され、微小血管の新生を促す事が知られている(Nat Rev Cardiol. 6, 515)。しかしながら、これらの内因性血管誘導のみでは、微小循環障害を代償するには不十分であり、相対的虚血を起点に、心機能不全が惹起される。この事は虚血性心不全の加療を目的に、VEGFを用いて血管新生を誘導する臨床研究が、有用性を認めなかった事より示唆される(Nat Rev Cardiol. 10:519)。即ち、未だ心筋梗塞後リモデリングにおける、血管新生と減少の機序の全容が、解明されていない事を示している。2013年に、網膜の血管内皮より産生されるleucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein (LRG)が、TGF- β のシグナルを増強し、網膜の血管新生を惹起する事が報告され、他の臓器や病態においても、血管新生との関連が注目されている(Nature. 499, 306)。

慢性関節リウマチ患者における病勢バイオマーカーとして同定されている炎症関連蛋白質LRGは、C-reactive protein (CRP)と異なり、interleukin-6 (IL-6)に依存しない炎症マーカーとして、臨床における有用性が期待されている(Ann Rheum Dis. 69, 770)。申請者らは、心筋梗塞においてマクロファージにおけるLRGの発現を示唆する結果を得ていたが、その病態的意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は心筋梗塞後リモデリングにおけるLRGの意義を、遺伝子工学的手法を用いて作製した遺伝子欠失マウスを用いて、心臓ストレス応答解析により明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの心筋梗塞モデルにおけるLRGの発現解析:

マウスにおいて心筋梗塞モデルを作製し、以下の方法により、発現上昇及び発現細胞の同定を試みた。心筋梗塞モデルの作製は既報に従い施行した。①Reverse-transcription PCRによる遺伝子発現解析した。②ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析を施行した。③蛍光免疫組織染色による発現細胞の解析を行った。④フローサイトメトリーを用いてCD11b陽性細胞を分離し、発現細胞の解析を施行した。

(2) LRG遺伝子欠失マウスを用いた解析:

雄性の8-10週齢の野生型マウス及びLRG欠失マウス(LRGKO)を用いて、心筋梗塞後リモデリングにおけるLRG発現の意義を検討した。心筋梗塞後3日後、7日後、14日後に心臓超音波法を用いた心機能解析を施行した。また、14日後に心臓を採取し、重量測定による形態解析を施行した。また肺重量解析により心不全による肺水腫の有無を評価した。さらに、マッソントリクローム染色により、染色した梗塞心より線維化領域を算出し、梗塞後のリモデリングの指標とした。また非梗塞領域よりmRNAを抽出し、RT-PCRによりコラゲナーゼの遺伝子発現を評価しリモデリングにおける非梗塞領域の線維化の評価を施行した。さらに、梗塞境界領域における心筋細胞、血管内皮細胞、及びその他の細胞のアポトーシスを、TUNEL染色陽性細胞数の評価により検討した。

(3) 梗塞境界領域における血管新生の解析:

梗塞境界領域において、微小血管の減少の程度を、免疫染色による単位心筋あたりの、微小血管数を計測する事により解析した。さらに、Apelinを初めとする、血管新生マーカー蛋白質の発現を、LRGKO及び野生型マウスの梗塞心において、免疫染色による組織学的解析、及びRT-PCRにより検討した。

(4) 骨髄移植による表現型の変化の解析:

マクロファージにおけるLRGの発現が、表現型の原因である事を検証すべく、放射線照射後のLRGKOに、野生型マウスの骨髄を移植する事により、マクロファージ等の骨髄由来の細胞のみに、LRGを発現させる事を試みた。かかる実験条件でLRGKOの梗塞後リモデリングの悪化が抑制できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスの心筋梗塞モデルにおけるLRGの発現解析:

雄性の野生型マウス(C57BL/6J)を用いて、心筋梗塞後のLRGの発現を解析した。その結果梗塞後1日目をピークとして14日後まで持続するLRGの発現の上昇を認めた(図1A)。

さらに、ウェスタンブロットを用いて梗塞後のLRGのタンパク質の発現を解析したところ、同様に梗塞後1日目より14日後まで持続するLRGの発現の上昇を認めた(図1B)。以上の結果より、心筋梗塞後にLRGの発現上昇が惹起される事が明らかになった。次にLRGの発現細胞を同定すべく、蛍光免疫染色を施行した。その結果、心筋梗塞後に発現するLRG陽性細胞の大部分は、骨髄球由来のCD11b陽性細胞と一致する事が示唆された。また、一部CD31陽性細胞とも一致する事より、血管内皮細胞にも一部が発現する事が示唆された。(図C, D) さらに、MHCには全く一致共染色されず、心筋細胞には発現しないことが明らかとなった。次にフローサイトメトリーによりCD11b陽性細胞をマクロファージ特異的な抗原であるF4/80により分離しウェスタンブロットにより発現細胞の解析を施行したところ、いずれの細胞においても発現が確認された(図1E)。以上の結果より、心筋梗塞後にLRGはマクロファージを含む骨髄球由来細胞において発現が上昇する事が明らかとなった。

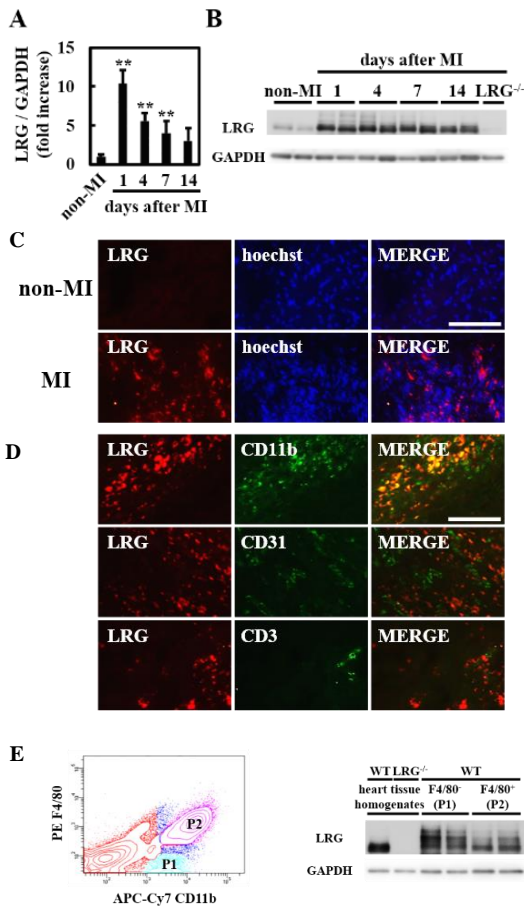


図1 A. 心筋梗塞作成後14日目までのLRGの遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。B. 心筋梗塞後14日目までのLRGのタンパク質の発現を解析した。C-D. 蛍光免疫染色によりLRG発現細胞を解析した。E. 心筋梗塞後に単離した細胞を抗CD11b抗体及びF4/80抗体を用いてFACSにより展開しウェスタンブロットによりLRG発現を解析した。

(2) LRG 遺伝子欠失マウスを用いた解析：発現上昇しているLRGの病態的意義を明らかにする事を目的に、LRG 遺伝子欠失マウス(LRGKO)を用いて心筋梗塞後リモデリングに関する検討を行った。心臓超音波法による心機能解析において、収縮力の指標である左室内径短縮率(Fractional shortening)は梗塞後14日において有意に低下し、心機能の低下が示唆された(図2A)。また、心重量は有意に上昇し、代償性の心肥大が生じている可能性が示唆された(図2B)。肺重量もLRGKOにおいて梗塞後14日後には、有意に上昇し心不全に伴う肺水腫が生じている可能性が示唆された(図2D)。さらに、マッソントリクローム染色により線維化領域を評価したところ、LRGKOにおいて有意に線維化領域の増大を認めた(図2F-H)。この結果と合致して、非梗塞領域におけるcollagenの発現を検討したところ、I型とIII型の双方のcollagenの発現の上昇を認めた(図2I-J)。以上の結果より、LRGKOマウスにおいて、心筋梗塞後リモデリングが悪化する事が明らかとなり、梗塞後のLRGの発現が心保護的に作用している事が明らかとなった。梗塞後リモデリングの悪化の原因を検討すべく、梗塞と非梗塞の境界領域においてアポトーシスの評価をTUNEL染色により施行した。その結果、梗塞後7日目において有意にTUNEL

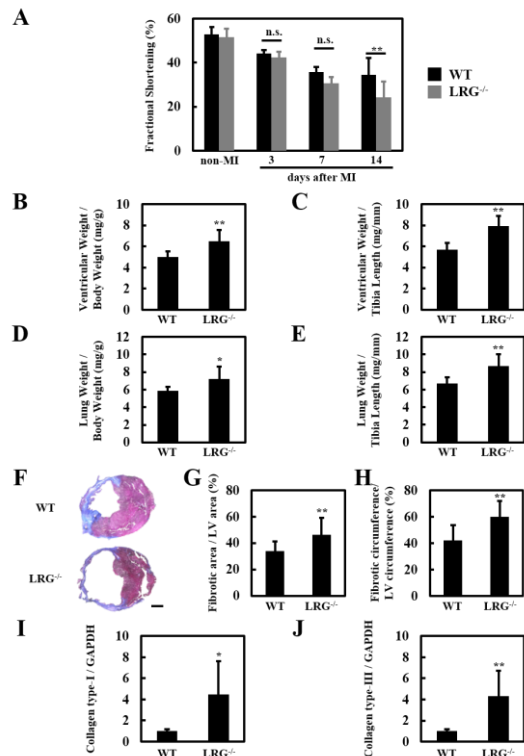


図2. 野生型マウス(WT)とLRG欠失マウス(LRG-/-)に心筋梗塞を作製し解析した。A. 心エコーによる収縮性を評価した。B-E. 梗塞後2週間の心重量・肺重量を解析した。F-H. 梗塞後2週間のマッソントリクローム染色による線維化の面積を評価した。I-J. RT-PCRによりcollagen a1の遺伝子発現を評価した。

陽性の心筋細胞の増加がLRGKOにおいて観察された。また、梗塞後2日後においてはTUNEL陽性細胞数に野生型マウスとLRGKOで差を認めなかった。以上の結果より、LRGKOマウスにおいて、梗塞リモデリング期における心筋細胞のアポトーシスによりリモデリングが亢進する事が示唆された。

(3) 梗塞境界領域における血管新生の解析：LRGが血管新生において重要である事が報告されている(Nature. 499, 306)。また、心筋細胞のアポトーシスは低酸素により誘導される事が一般的に知られている。以上の知見に基づいてLRGKOの心筋細胞のアポトーシスに、血管新生が関与している可能性を想起した。かかる仮説を検証すべく、野生型マウス及びLRGKOマウスにおいて微小血管数を抗CD31抗体による血管内皮細胞の染色により検討した。その結果、LRGKOにおいて有意に微小血管数の減少を認めた(図3A-B)。そこで、血管新生マーカーであるAPJの蛍光免疫染色を施行した。その結果、野生型マウスにおいてLRG発現細胞の周囲においてAPJ発現細胞が観察された(図3C)。さらに、LRGKOにおいてAPJの発現は有意に低かった。(図3D-E)以上の結果より、LRGが梗塞後の微小血管新生に関与している事が示唆された。既報において、LRGの血管新生の機序にTGF- β /smadシグナルの関与が示唆されている。そこで、我々はこちらの細胞内情報伝達経路のLRGKOマウスの心筋梗塞後リモデリングに及ぼす影響を検討した。まず、初めに野生型マウスにおいて心筋梗塞後のTGF- β の遺伝子発現をRT-PCRにより評価した。その結果、梗塞後4日目をピークに14日目まで持続す

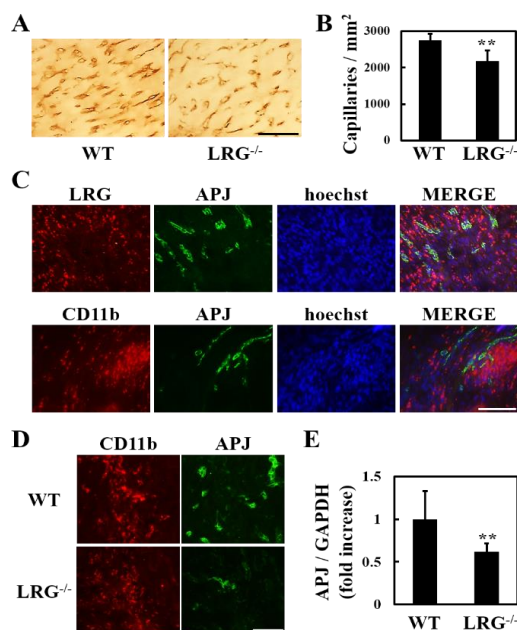


図3. 心筋梗塞作製2週間後のWT及びLRG^{-/-}に境界領域における微小血管を解析した。A-B. CD31染色による微小血管数を評価した。C. WTマウスにおける抗APJ抗体を用いて免疫染色を施行した。D. WT及びLRG^{-/-}の梗塞境界領域におけるAPJの免疫染色を施行した。E. 心筋梗塞後の両マウスにおけるAPJの遺伝子発現をRT-PCRにより評価した。

るTGF- β とその受容体であるendoglinの発現上昇を認めた(図4A-B)。この結果は、既報と同様にTGF- β シグナリングが、LRGKOの表現型に重要な役割を果たしている可能性がある事を示唆している。さらに、TGF- β の細胞内情報伝達経路であるsmadのリン酸化をリン酸化抗体を用いてウェスタンブロットにより検討した。その結果、野生型マウスにおいてsmad1/5/8のリン酸化は、梗塞後7日目から14日目において有意に亢進していた(図4C)。また、smad1の遺伝子発現が梗塞後4日目より有意に上昇する事も観察された。一方、LRGKOにおいて4日目のTGF- β の遺伝子発現は、野生型と比較して有意に抑制されており、さらにsmadのリン酸化も野生型と比較して有意に抑制されている事より(図4D-H)、LRGKOマウスにおいて心筋梗塞後のTGF- β /smadシグナルが減弱している事が示唆された。

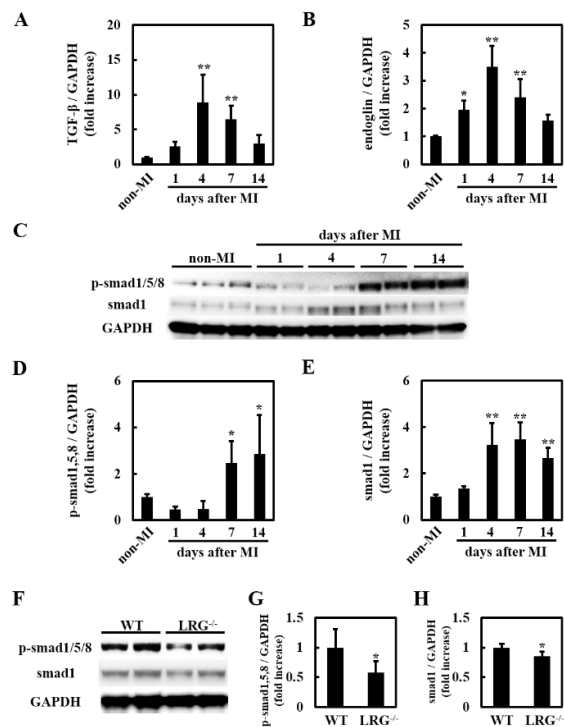


図4. LRG^{-/-}における心筋梗塞後のTGF- β シグナリングの解析。A-B. WTにおけるTGF- β と受容体endoglinの発現をRT-PCRにより解析した。C-E. WTにおけるsmadの活性化をウェスタンブロットにより評価した。F-H. WT及びLRG^{-/-}マウスにおいてsmadの活性化をウェスタンブロットにより比較した。

(4) 骨髄移植によるLRGKOマウスの梗塞後リモデリングの変化に関する検討：LRGKOにおいて観察されるリモデリングの悪化は、LRG発現骨髄由来細胞の血管新生による心筋保護効果の減弱により生じると考えられる。この仮説を、さらに検討すべく骨髄移植の系を用いた実験を施行した。7Gyの放射線照射により骨髄不全としたLRGKOマウ

すに、野生型マウスもしくはLRGKOマウスより採取した骨髄を移植し、7週間後に心筋梗塞を作成し、梗塞後リモデリングについて解析を施行した。その結果、野生型マウスの骨髄を移植されたLRGKOマウス (WT→LRG^{-/-}) の梗塞後の心臓においてLRGの発現を認めた (図5 A)。さらに、LRGKOの骨髄を移植されたLRGKOマウス (LRG^{-/-}→LRG^{-/-}) と比較して、WT→LRG^{-/-}マウスは心筋梗塞14日において有意な心機能の改善を認めた (図5 B)。また、心筋梗塞後の線維化領域はWT→LRG^{-/-}マウスにおいてLRG^{-/-}→LRG^{-/-}と比較して有意に減少し、(図5 C-E) 心重量体重比も有意に低値であった (図5 F-G)。最後に梗塞の境界領域における微小血管数もWT→LRG^{-/-}マウスにおいてLRG^{-/-}→LRG^{-/-}と比較して有意に高値であり、骨髄由来細胞のLRG発現の回復が、LRGKOの心筋梗塞後の表現型を有意に改善する事が明らかとなった (図5 H-I)。

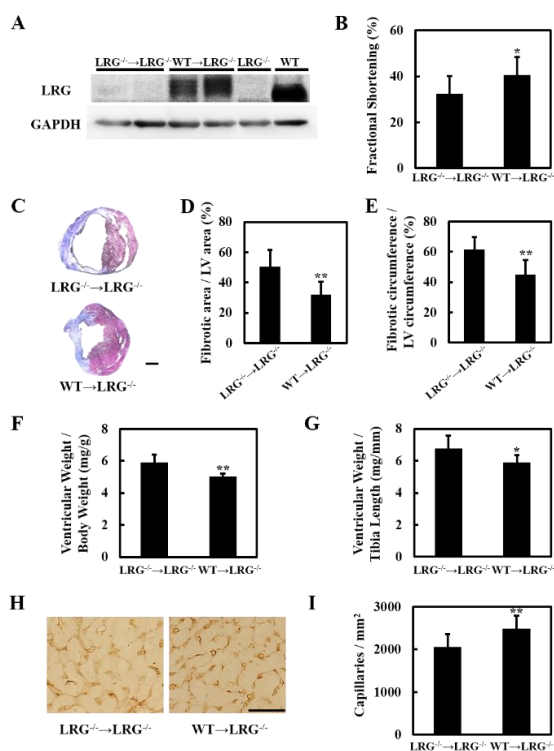


図5. LRG^{-/-}にWTもしくはLRG^{-/-}の骨髄を移植し、心筋梗塞を作製し表現型を解析した。A. 骨髄移植後施行した梗塞心におけるLRGの発現をウェスタンブロットにより評価した。B.心エコーによる収縮性を評価したC-E. 梗塞後2週間のマッソントリクローム染色によるより線維化の面積を評価した。F-G.梗塞後2週間の心重量・肺重量を解析した。H-I. 高速境界領域における微小血管を抗CD31抗体による免疫染色により評価した。

総括：以上の実験の結果より、心筋梗塞後に骨髄由来細胞におけるLRGの発現がTGF-β/smadのシグナリングを介する血管新生を惹起する事により、梗塞後リモデリングを抑制する事が明らかとなった。

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 10 件)

1. Tonegawa K, Otsuka W, Kumagai S, Matsunami S, Hayamizu N, Tanaka S, Moriwaki K, Obana M, Maeda M, Asahi M, Kiyonari H, Fujio Y, Nakayama H. (2017) Caveolae-specific activation loop between CaMKII and L-type Ca²⁺ channel aggravates cardiac hypertrophy in α1 adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 312(3):H501-H514. 査読あり
2. Miyawaki A, Obana M, Mitsuhashi Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, Fukada SI, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y. (2017) Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci Rep.* 7(1):1407. 査読あり
3. Morihara H, Yamamoto T, Oiwa H, Tonegawa K, Tsuchiyama D, Kawakatsu I, Obana M, Maeda M, Mohri T, Obika S, Fujio Y, Nakayama H. (2016) Phospholamban inhibition by a single dose of locked nucleic acid antisense oligonucleotide improves cardiac contractility in pressure overload-induced systolic dysfunction in mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 22(3):273-282. 査読あり
4. Zhang X, Ai X, Nakayama H, Chen B, Harris DM, Tang M, Xie Y, Szeto C, Li Y, Li Y, Zhang H, Eckhart AD, Koch WJ, Molkentin JD, Chen X. (2016) Persistent increases in Ca²⁺ influx through Cav1.2 shortens action potential and causes Ca²⁺ overload-induced afterdepolarizations and arrhythmias. *Basic Res Cardiol.* ;111(1):4. 査読あり
5. Miyawaki A, Mitsuhashi Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Tsunoda S, Obana M, Maeda M, Nakayama H, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Fujio Y. (2016) Moesin is activated in cardiomyocytes in experimental autoimmune myocarditis and mediates cytoskeletal reorganization with protrusion formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* ;311(2):H476-86. 査読あり
6. Bodi I, Nakayama H, Schwartz A. (2016) Tetrodotoxin-sensitive Ca²⁺ currents, but no T-type currents in normal, hypertrophied and failing mouse cardiomyocytes. *J Cardiovasc*

- Pharmacol. 2016 Dec;68(6):452-464 査読あり
7. Nakayama H, Nishida K, Otsu K. (2016) Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circ Res.* 118(10): 1577-92. 査読あり
 8. Kumagai S, Nakayama H, Fujimoto M, Honda H, Serada S, Ishibashi-Ueda H, Kasai A, Obana M, Sakata Y, Sawa Y, Fujio Y, Naka T. (2016) Myeloid cell-derived LRG attenuates adverse cardiac remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* ;109(2):272-82. 査読あり
 9. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, Taneike M, Misaka T, Omiya S, Shah AM, Yamamoto A, Nishida K, Ohsumi Y, Okamoto K, Sakata Y, Otsu K. (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun.* ;6:7527. 査読あり
 10. Enomoto D, Obana M, Miyawaki A, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y. (2015) Cardiac-specific ablation of the STAT3 gene in the subacute phase of myocardial infarction exacerbated cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* ;309(3):H471-80. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① 芦塚萌、中山博之他、Myeloid cell-specific Runx2 deficiency exacerbates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Session 2016 米国ニューオーリンズ 2016 年 11 月 15 日
- ② 宮脇昭光、中山博之他、Adult mammalian hearts restore intrinsic regenerative capacity through signal transducer and activator of transcription 3 in the resolution phase of myocarditis. American Heart Association Scientific Session 2016 米国ニューオーリンズ 2016 年 11 月 13 日
- ③ 榎本大智、中山博之他、Heterozygous Ablatin of RORgt gene deteriorates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Session 2016 米国ニューオーリンズ 2016 年 11 月 15 日
- ④ 舎川洗太、中山博之他、Fibroblast-specific beta2 adrenergic receptor signaling regulates cardiac hypertrophy in mice. American Heart

- Association Scientific Session 2016 米国ニューオーリンズ 2016 年 11 月 15 日
- ⑤ 熊谷渉平、中山博之他、Myeloid Cell Derived Leucine Rich a2Glycoprotein Attenuates Adverse Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Session 2015 米国オーランド 2015 年 11 月 10 日
 - ⑥ 舎川洗太、中山博之他、Adrenergic Receptors b2 and b3 Transduce Differential Signals in Cardiac Fibroblasts. American Heart Association Scientific Session 2015 米国オーランド 2015 年 11 月 10 日
 - ⑦ 榎本大智、中山博之他、Cardiac STAT3 Activation in Subacute Phase of Myocardial Infarction was Required for the Suppression of Adverse Cardiac Remodeling. American Heart Association Scientific Session 2015 米国オーランド 2015 年 11 月 10 日
 - ⑧ 松本浩太郎、中山博之他、Blockade of NKG2D/NKG2D Ligands Interaction Attenuated Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Session 2015 米国オーランド 2015 年 11 月 10 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)
なし

○取得状況 (計 件)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA HIROYUKI)
大阪大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：40581062

(2) 研究分担者

仲 哲治 (Naka Tetsuji)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト 招へいプロジェクトリーダー
研究者番号：30303936

(3) 研究分担者

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：20359839