

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19364

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップに焦点をあてた新視点からの心筋梗塞に伴う炎症の制御

研究課題名(英文)Role of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of myocardial infarction

研究代表者

田尻 和子(TAJIRI, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60633914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：好中球は、自身の細胞死による核酸と抗菌タンパクを構成内容とする網目状の捕捉構造を形成し(好中球細胞外トラップneutrophil extracellular traps:NETs)、細菌を捕捉・除去することが知られている。本研究では、急性心筋梗塞におけるNETsの役割を検討した。NETs形成障害を呈する好中球エラスターゼ欠損マウスに心筋梗塞を作製したところ死亡が有意に減少し、抗炎症性サイトカインが増加することが明らかとなった。また野生型マウスへのエラスターゼ阻害薬の投与により心筋梗塞の予後が改善した。以上より、NETsの存在はAMI急性期では炎症促進性に働き病態悪化に関与することが示唆された。

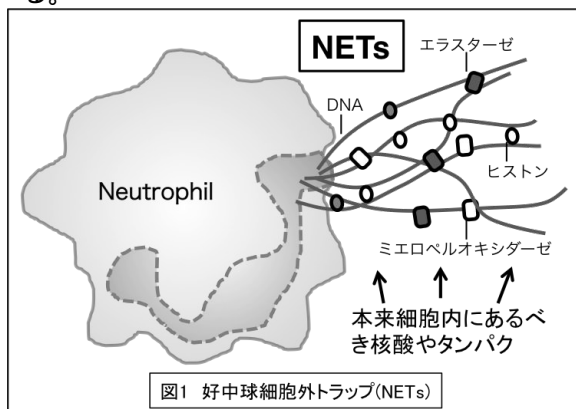
研究成果の概要(英文)：Neutrophil forms neutrophil extracellular traps (NETs), in which bacteria is effectively trapped and eliminated. The role of NETs in the pathogenesis of acute myocardial infarction (AMI), a representative of non-infectious inflammation, is unclear. We analyzed the inflammatory responses induced by AMI in neutrophil elastase gene knockout mice, in which NETs formation is impaired. The knockout mice showed the reduced death due to cardiac rupture and higher survival. The profile of cytokine alteration showed the anti-inflammatory responses. Therefore, the presence of NETs is suggested to be pro-inflammatory and to promote the pathogenesis of AMI.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋梗塞 リモデリング 好中球 好中球細胞外トラップ

1. 研究開始当初の背景

好中球は、生体が細菌などに感染した際、感染局所にいち早く集積して感染源を除去する、感染防御の最前線で機能する免疫細胞である。これまで好中球は、貪食と活性酸素の放出により細菌を不活化すると考えられてきた。しかし最近これらの他に、好中球は、自ら細胞死を引き起こし自身の核酸と抗菌タンパクを構成内容とする好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs、図1) とよばれる網目状の捕捉構造を形成し、細菌を効率よく捕捉・除去するということが明らかにされてきている (Science 2004)。また、NETs を用いて細菌等の異物を捕獲しながら能動的に細胞死を引き起こす現象は NETosis と呼ばれ、apoptosis や necrosis と異なる細胞死として注目されている。



急性心筋梗塞では、梗塞に伴う炎症反応が過度である場合、その後に病的な心室リモデリングを引き起こし、生命予後の悪化をもたらす。好中球は、急性心筋梗塞の最も初期に梗塞部位に出現する細胞であり、心筋梗塞の病態形成に重要な役割を果たしていると推測されるが、この時に NETs が生じ死滅細胞除去に働いているかは明らかにされていない。

一方、NETs では本来細胞内にあるべき成分 (好中球細胞内の核酸・タンパク・プロテアーゼ等) を細胞外に放出するため、それ自身が自然免疫系に対するリガンドおよび組織破壊酵素として作用し、炎症反応を増強させている可能性が考えられる。しかしながら、心筋梗塞を含む好中球が集積する非感染性炎症における NETs の役割については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

NETs の形成が心筋梗塞後の炎症やリモデリングに及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

野生型マウスに心筋梗塞を作成し、NETs が心筋梗塞部位に生じているかどうかを検討した。

好中球エラスターゼは好中球内でヒストンを分解し、クロマチン凝集を促進することで NETs 産生に重要な働きを示し、好中球エラスターゼ欠損マウス (Elane 遺伝子欠損マウス) は NETs を産生しないことが報告されている (J Cell Biol 2010)。この NETs 形成不全マウスと野生型マウスに人工呼吸管理下に左冠動脈の結紮による心筋梗塞モデルを作製し、NETs の形成が心筋梗塞後の炎症やリモデリングに及ぼす影響について明らかにすることを試みた。また、好中球エラスターゼ阻害剤を心筋梗塞マウスに投与し、心筋梗塞への治療応用を検討した。

4. 研究成果

- (1) C57BL/6 マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞モデルを作製し、各病日ごとに心臓組織標本を作製した。細胞外に放出された DNA を SYTO13 により染色し、抗ヒストン抗体・抗好中球エラスターゼ抗体・DAPI 染色を組み合わせ、蛍光顕微鏡により観察したところ、第 1~4 病日の心臓組織に好中球の浸潤部位に一致して NETs の産生を認めた。具体的には、核の破壊を伴う独特の細胞死 (NETosis) が惹起された好中球と、自己の DNA と抗菌タンパク質を主成分とする網目状の構造物 (NETs) の形成を確認した。
- (2) NETs の主要構成成分である好中球エラスターゼは、炎症の終息を促す Annexin A1 を切断することで好中球がアポトーシスせず、結果として炎症が持続することを明らかにした。
- (3) Elane 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに左冠動脈結紮による心筋梗塞を作製した。Elane 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ心臓破裂による死亡が有意に少なく、生存率が有意に高かった。
- (4) エラスターゼ阻害剤による心筋梗塞への治療効果を検討したところ、エラスターゼ阻害剤投与群は生食投与群と比較して高い生存率を示した。
- (5) 心機能を心エコー図検査と心臓カテテル検査にて評価した。Elane 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比べて心筋梗塞作製 2 週間後の心収縮力が有意に保たれており、心臓の拡大も抑制されており、リモデリングが抑制されていることが示唆された。
- (6) 心筋梗塞部位のサイトカインやケモカインの産生量を測定したところ、心筋梗塞 4 日後において、Elane 遺伝子欠損マウスではインターロイキン 6 の産生が減少し、KC、RANTES といったケモカインの発現が有意に減少していた。一方、

抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10 の産生が増加していることがわかった。

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)

Kazuko Tajiri, Kazutaka Aonuma, Ikuo Sekine. Cardiovascular toxic effects of targeted cancer therapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2017 May 20:1-7. doi: 10.1093/jjco/hyx071. [Epub ahead of print], 査読あり

Kazuko Tajiri, Kazutaka Aonuma, Ikuo Sekine. Cardio-oncology: a multidisciplinary approach for detection, prevention and management of cardiac dysfunction in cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2017 May 15:1-5. doi: 10.1093/jjco/hyx068. [Epub ahead of print], 査読あり

Satoshi Sakai, Hidekazu Maruyama, Taizo Kimura, Kazuko Tajiri, Junya Honda, Satoshi Homma, Kazutaka Aonuma, Takashi Miyauchi. Antagonists to endothelin receptor type B promote apoptosis in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Life Sci*. 2016;159:116-20. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.044. 査読あり

Kazuko Tajiri, Yasutomi Yasutomi, Kazutaka Aonuma. Recent advances in the management of autoimmune myocarditis: insights from animal studies. *Curr Pharm Des*. 2016;22(4):427-39. doi: 10.2174/1381612822666151222160702. 査読あり

Kazuko Tajiri, Akira Sato, Tomohiko Harunari, Nobutake Shimojo, Iwao Yamaguchi, Kazutaka Aonuma. Impact of rivaroxaban compared with warfarin on the coagulation status in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation: a preliminary analysis of the prothrombin fragment 1+2 levels. *J Cardiol*. 2015;65(3):191-6. doi: 10.1016/j.jjcc.2014.08.006. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

田尻和子, 今中恭子. 炎症を制御する心血管組織の微小環境. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017.3.17-19, 石川県立音楽堂 他, 石川県, 金沢市

Saori Yonebayashi, Kazuko Tajiri, Yukino Ogura, Taizo Kimura, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Shibuya, Kazutaka Aonuma. MAIR-II deficiency induces anti-inflammatory M2 macrophage infiltration and protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017.3.17-19, 石川県立音楽堂 他, 石川県, 金沢市

Saori Yonebayashi, Kazuko Tajiri, Yukino Ogura, Taizo Kimura, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Shibuya, Kazutaka Aonuma. MAIR-II deficiency induces anti-inflammatory M2 macrophage polarization and protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction. 第 33 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016), 2016.12.17, 東京コンベンションホール, 東京都, 中央区

Saori Yonebayashi, Kazuko Tajiri, Yukino Ogura, Endin Nokik Stujanna, Duo Feng, Rujie Qin, Junya Honda, Sayaka Inoue, Yumi Isaka, Taizo Kimura, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akira Shibuya, Kazutaka Aonuma. MAIR-II deficiency abrogates macrophage infiltration and protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction. Tsukuba Global Science Week 2016, 2016.9.18, 筑波国際会議場, 茨城県, つくば市

Kazuko Tajiri, Yoshihiro Sobue, Patrice Naud, Kazutaka Aonuma, Stanley Nattel. N-Type Ca²⁺ Channel Blockers Attenuate Atrial Fibrillation-Promoting Remodeling by Suppressing Autonomic Neural Outflow. *Heart Rhythm* 2016, 2016.5.5, San Francisco, CA, USA

Kazuko Tajiri, Yasutomi Yasutomi, Kyoko Imanaka-Yoshida, Kazuhiro Matsuo, Yusuke Tsujimura, Michiaki Hiroe, Kazutaka Aonuma. Role of Effector Memory CD4⁺ T cells in Inflammatory Dilated Cardiomyopathy. *Insights from Animal Studies*. 第 80 回日本循環器学会学術集会,

2016.3.18-20, 仙台国際センター, 宮城県, 仙台市

Kazuko Tajiri. Expression and Immune Function of Tenascin-C in the Inflammatory Heart Diseases. BIT's 7th Annual International Congress of Cardiology-2015, 2015.12.4-12.6, Shanghai, China

田尻和子, 松尾和浩, 廣江道昭, 保富康宏, 青沼和隆, 今中恭子. 遺伝子組み換え BCG システムを用いた新たな慢性心筋炎マウスモデルの確立. 第 1 回日本心筋症研究会, 2015.7.4, 一橋大学 一橋講堂, 東京都, 千代田区

田尻和子. 慢性炎症性疾患としての拡張型心筋症. 遺伝子組み換え BCG システムを用いた新たなマウスモデルの確立. 第 104 回日本病理学会総会, 2015.5.1, 名古屋国際会議場, 愛知県, 名古屋市

Kazuko Tajiri, Satoshi Sakai, Taizo Kimura, Tomoko Machino-Ohtsuka, Nobuyuki Murakoshi, DongZhu Xu, Akira Sato, Takashi Miyauchi, Kazutaka Aonuma. Protective role of endothelin in myocardial inflammation. experimental studies using an endothelin antagonist SB209670. 第 79 回日本循環器学会学術集会, 2015.4.24-26, 大阪国際会議場 他, 大阪府, 大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田尻 和子 (TAJIRI, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 60633914