

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 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：15K19365

研究課題名(和文) 心筋梗塞後炎症の制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the modulator of inflammatory response after myocardial infarction

研究代表者

木村 泰三 (KIMURA, Taizo)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00636508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後の心筋リモデリングに伴う心不全悪化が問題となっており、その機序の解明と治療法の開発が必要である。

本研究では細胞外マトリクス分子テネイシンCが心筋梗塞後に心筋への炎症促進性マクロファージ浸潤を増加させ、炎症抑制性マクロファージ浸潤を減少させることで炎症を増強し、心筋梗塞後の心室リモデリングを促進することをマウスモデルを使って示した。また、細胞培養実験でテネイシンCはマウス骨髄由来マクロファージを toll 様受容体 4 を介して炎症抑制性から炎症促進性の性質に変化させていた。

以上よりテネイシンCが、心筋梗塞後炎症とリモデリング抑制における新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Left ventricular remodeling after myocardial infarction (MI), which is major cause of heart failure, is one of the important clinical issues.

In this study, we showed that Tenascin-C (TNC), an extracellular matrix glycoprotein, increased the infiltration of pro-inflammatory macrophages and decreased the infiltration of anti-inflammatory macrophages in infarcted myocardium of mice and aggravated left ventricular remodeling after MI. In vitro analysis, induction of anti-inflammatory macrophages from mouse bone marrow derived cells was significantly suppressed by adding TNC and this effect was inhibited by toll like receptor 4 inhibitor. These findings suggest, TN-C aggravates the left ventricular remodeling after MI partly through the promotion of inflammatory response via the regulation of macrophage subsets. TNC might be a new biotarget to prevent adverse ventricular remodeling after MI.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋梗塞 テネイシンC マクロファージ 心室リモデリング toll like receptor 4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 経皮的冠動脈形成術などの急性心筋梗塞治療の進歩により、心臓破裂や不整脈による急性期死亡は減少した。一方で急性期を生存した患者で慢性期に心室拡大と心収縮の低下(梗塞後心室リモデリング)が起こり、その結果としてこれら患者の心不全死が増加していることが心筋梗塞治療の臨床的課題となっている。よって、心筋梗塞後心室リモデリング機序の解明と、それを抑制するための新たな治療の開発が望まれる。

(2) 心筋梗塞急性期に虚血により壊死を起こした心筋細胞は一部が DAMPs (damaged associated molecular patterns)として血管内皮細胞や間質線維芽細胞、組織単球などに認識され、ケモカイン放出により好中球や単球・マクロファージを梗塞部位に遊走させ、壊死細胞が除去される。引き続き、炎症の収束とともに線維化により心筋細胞が失われた梗塞部位が置換される。この急性期の炎症が過度に持続してしまうと、強度の弱いマトリクス沈着による不十分な線維化、アポトーシスの増強、非梗塞部位への炎症の波及などにより慢性期に心室リモデリングの悪化が引き起こされる。すなわち、梗塞後急性期炎症は適切なタイミングで収束することが、心室リモデリングの増悪を防ぐために重要である。この炎症制御に単球・マクロファージが重要な役割を果たすことが報告されているが、その制御機構は明らかになっていない。

(3) 心筋梗塞後の単球・マクロファージ浸潤とそれに続く心室リモデリングを制御する鍵分子として、細胞外マトリックス分子の一つであるテネニン C (TNC) に注目した。

(4) TNC は正常な成人心臓組織では発現しないが、心筋炎や心筋梗塞などの病的状態で一過性に発現し、急性期の血清 TNC 値が高い心筋梗塞患者は、慢性期に心室リモデリングをおこしやすく予後が悪い (Sato A. et al. JACC 2006)。冠動脈結紮によるマウス心筋梗塞モデルでは急性期に TNC が心筋に発現し、TNC 欠損マウスでは、野生型に比べ、慢性期の線維化が抑制され、心機能回復がよい (Nishioka T. et al. AJP 2009) ことから、梗塞後急性期の TNC 発現増強が慢性期の心室リモデリングを促進させる可能性が示唆される。さらに TNC は細胞増殖・遊走促進など多くの機能を持つが、最近、TLR4 の内因性リガンドとしてマクロファージのサイトカイン産生を誘導することが報告されている (Midwood K et al. Nature Med 2009)。

## 2. 研究の目的

以上の知見に基づき、TNC が心筋梗塞後急性期に梗塞部位に発現し、単球・マクロファージを中心とする炎症反応の制御に関わり、心室リモデリングの進行に重要な役割をはたすとの作業仮説をたてた。つまり、心筋梗塞モデルで TNC 欠損マウス心筋では野生型マウスと比較して、急性期に炎症促進性の

Ly6C high 単球、M1 マクロファージが抑制され、Ly6C low 単球、M2 マクロファージが増強され、炎症性サイトカイン産生や心筋アポトーシスが抑制されることが予想される。

## 3. 研究の方法

(1) マウス心筋梗塞モデルの心臓局所での TNC 発現分布および経時的発現パターンを、浸潤炎症細胞、炎症性サイトカイン、ケモカイン発現の経時的变化と比較する

8-10 週齢のオス C57BL/6 系野生型マウスの左冠状動脈を結紮し、急性期に経時的 (1,3,5,7 日) に犠牲剖検して、心臓のパラフィン標本作製、蛋白および RNA サンプルを抽出し、抗 TN-C 抗体を用いた免疫組織染色、定量的 RT-PCR 法による TN-C mRNA 量の測定を行い、TNC の経時的発現を解析する。

(2) TNC 欠損 (KO) マウスを用いた心筋梗塞モデルによる急性期炎症におけるテネニン C の役割の解明

TNC-KO, TG の 8-10 週齢のオスで計画 1) と同様、心筋梗塞モデルを作製し、2 週間の経過観察を行い以下の項目について野生型と対比する。

### 心室リモデリングの評価

- ・生存率 (Kaplan-Meier 生存曲線)
- ・心機能: Vevo2100 を使用した心エコー法による左室径、駆出率、拡張機能の評価
- ・梗塞サイズ: 2 週間後に犠牲剖検してパラフィン標本作製し、心臓横断面のマッソントリクローム染色により評価

細胞・分子生物学的解析: 心筋梗塞後の急性期 (1,3,5,7 日) で経時的に犠牲剖検し、以下の項目について、野生型と対比する。

- ・心筋へ浸潤した炎症性細胞の種類、程度を FACS で解析: 好中球 (CD16b、CD43)、M1 マクロファージ (F4/80+ CD206<sup>-</sup>)、M2 マクロファージ (F4/80+ CD206<sup>+</sup>)、Ly6C high 単球、Ly6C low 単球

- ・心臓のパラフィン標本作製、蛋白および RNA サンプルを抽出し、次の項目について検討する。 サイトカイン、ケモカイン: ICAM-1、VCAM-1、CCL2、P-セレクチン、IL-1B、IL-10 プロテアーゼ: MMP-9、MMP-2 心不全マーカー (ANP、BNP) 線維化関連遺伝子 (コラーゲン I、コラーゲン III、TGFb)

(3) 過剰発現 (TG) マウスを用いた心筋梗塞モデルによる急性期炎症におけるテネニン C の役割の解明

(4) 単離・培養細胞を用いたテネニン C による心筋梗塞後炎症における単球・マクロファージ制御メカニズムの解明

単球・マクロファージに対する外因性 TNC の作用

単球・マクロファージの活性化: 単離した単球・マクロファージに対して、M-CSF (10ng/ml) 刺激後、LPS (100ng/ml) 刺激 (M1 マクロファージ誘導) または IL-4 (20ng/ml) 刺激 (M2 マクロファージ誘導) を

して精製全長 TNC を添加し、培養細胞ライセートの TGF、IL10、Mrc1、Arg1 (M2 マーカー)、IL6、IL1、CCL2 (M1 マーカー)、NOS を、TNC 添加無し群と比較する。

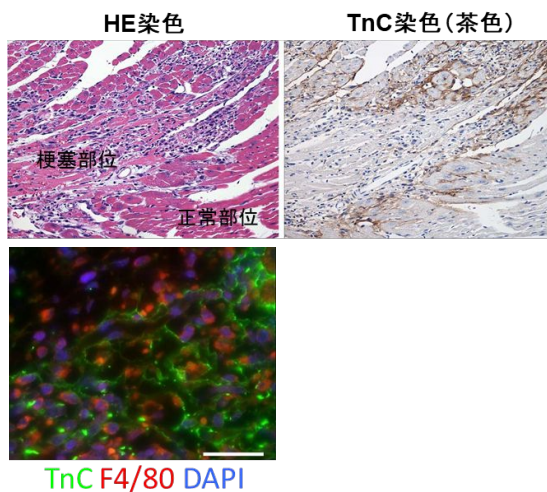
単球・マクロファージに対する外因性 TNC の受容体

TLR4 が単球・マクロファージの TNC に対する受容体であることを予想し、(1) の培養液中に TLR4 阻害薬を加え TNC の作用が抑制されるか検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウス心筋梗塞モデルの心臓局所での TNC 発現分布および経時的発現パターン  
TN-C は心筋梗塞後、5 日をピークに発現が増強し、心筋梗塞部位と正常部位の間のボーダーエリアに発現が局在していた。また、F4/80 との 2 重染色では、TNC 発現と F4/80 発現が重複しており、TNC とマクロファージの関連が示唆された (図 1)。IL-1b、CCL2 などの炎症性サイトカインは心筋梗塞後 5 日がピークだった。

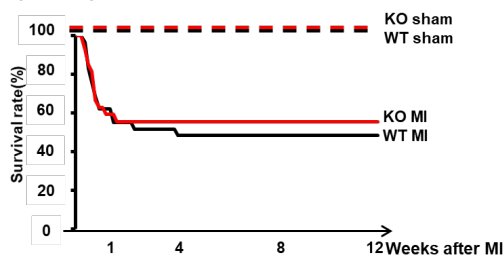
(図 1)



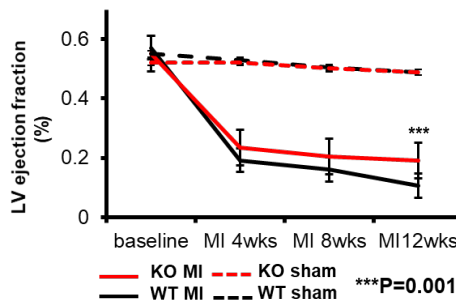
(2) TNC 欠損(KO)マウスを用いた心筋梗塞モデルによる急性期炎症におけるテネシン C の役割

心筋梗塞後 12 週までの生存率は、野生型と TNC-KO マウスで有意差を認めなかった (図 2)。心エコー測定では、TNC-KO マウスは野生型マウスと比較して有意に左室収縮が維持され (図 3)、左室拡張末期径拡大、収縮末期径拡大も抑制されていた。

(図 2)

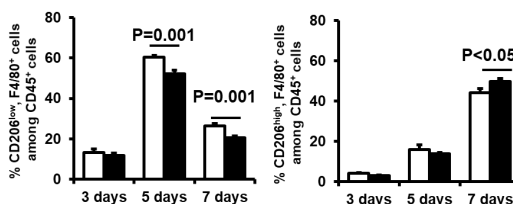


(図 3)



FACS 解析では心筋梗塞後急性期に TNC-KO マウスでは野生型マウスと比較して心筋における炎症促進性 M1 マクロファージ浸潤の割合が減少し、炎症抑制性 M2 マクロファージ浸潤の割合が増加していた (図 4)。また、TNC-KO マウスでは野生型マウスと比較して IL-6、CCL2、IL-1 などの炎症性サイトカイン発現は優位に減少し、IL-10、Arg1、Mrc1 などの炎症抑制性マクロファージのマーカーが有意に上昇していた。

(図 4)



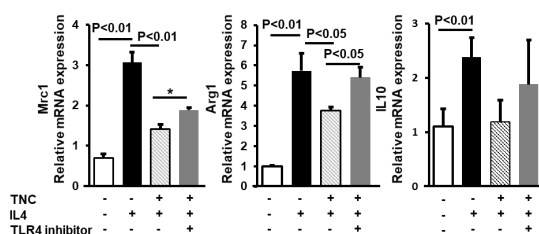
(3) 過剰発現 (TG) マウスを用いた心筋梗塞モデルによる急性期炎症におけるテネシン C の役割

TNC-TG マウスでは野生型マウスと比較して、心筋梗塞後 1 週間での生存率が有意に低下していた (TNC-TG:20% vs 野生型:58%)

(4) 単離・培養細胞を用いたテネシン C による心筋梗塞後炎症における単球・マクロファージ制御メカニズム

野生型マウスより単球を単離し、M-CSF 刺激によりマクロファージに分化させた。この細胞を IL-4 で刺激すると、炎症抑制性 M2 マクロファージマーカーである Mrc1、Arg1、IL-10 の発現が有意に増強したが、TNC 添加により抑制された。一方で、この TNC 添加による作用は TLR4 阻害薬により抑制された (図 5)。

(図 5)



(5)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

TNC は心筋梗塞後急性期に発現し、TNC 欠損により慢性期心室リモデリングが抑制されていた。TNC 欠損により炎症促進性 M1 マクロファージ浸潤が減少し、炎症抑制性 M2 マクロファージ浸潤が増加することから、TNC は心筋梗塞後急性期のマクロファージフェノタイプの制御を介して梗塞後炎症を増強することで慢性期心室リモデリングを増悪させると考えられた。また、心筋梗塞後の浸潤マクロファージにおける TNC の受容体は TLR4 であることが分かった。心筋梗塞における TNC のマクロファージに対する作用は今まで報告されておらず、新しい知見であると考えられる。また、心筋梗塞後急性期の TNC 発現抑制や TLR4 抑制による慢性期心室リモデリング改善といった新たな治療の開発が期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Taizo Kimura, A Sato, Z Wang, S Sakai, K Tajiri, M Hiroe, K Imanaka, T Yoshida, K Aonuma, Tenascin-C Regulates Inflammatory Response and Aggravate Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Mice Model, European Society of Cardiology Congress 2015, 2015 年 8 月 31 日, London (UK)

Taizo Kimura, A Sato, Z Wang, S Sakai, K Tajiri, M Hiroe, K Imanaka, T Yoshida, K Aonuma, Tenascin-C Modulates Inflammation and Aggravate Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Mice Model, 第 80 回日本循環器学会学術集会, せんだい青葉交流広場(宮城県仙台市), 2016 年 3 月 20 日

Taizo Kimura, A Sato, Z Wang, S Sakai, K Tajiri, M Hiroe, K Imanaka, T Yoshida, K Aonuma, Tenascin-C Modulates Macrophage Phenotypes via Toll Like Receptor 4 and Aggravate Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Mice Model, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 金沢教育プラザ(石川県金沢市), 2017 年 3 月 19 日

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

木村 泰三 (KIMURA TAIZO)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号: 00636508

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4)研究協力者

( )