

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09567

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップを標的とした新たな心筋梗塞治療戦略の構築

研究課題名(英文)A new treatment strategy for myocardial infarction targeting neutrophil extracellular traps

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では好中球細胞外トラップ(NETs)が心筋梗塞に及ぼす影響について心筋梗塞モデルマウスを用いて検討した。好中球エラスターゼ(NE)遺伝子欠損あるいはNE阻害剤を投与することで、NETsの形成を阻害すると、心筋梗塞後の炎症が抑制され生存率が改善した。NETsの一部として存在している好中球エラスターゼ(NE)はフリーの状態のNEと比べて炎症収束物質であるAnnexin A1を強く切断し、心筋梗塞後の炎症の収束を遅らせることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、嚢胞性線維症に対して遺伝子組換えヒトDNA分解酵素製剤が使用され、有効性を示している。嚢胞性線維症も、その病態にNETsが関与していることが明らかになっているが(Nat Med 2010)、DNA分解酵素はNETsの主成分であるDNAを分解し、NETs形成を阻害するため嚢胞性線維症に対して有効である可能性が示唆されている。本研究で、心筋梗塞におけるNETs形成阻害による抗炎症効果、ならびにその後のリモデリング抑制効果を示したため、DNA分解酵素製剤を含むNETs抑制薬が新たな治療法になる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neutrophils form extracellular traps (NETs) by releasing decondensed chromatin decorated with granule proteins including neutrophil elastase (NE). However, the pathological role of NETs in myocardial infarction (MI) remains unknown. Here we show that the neutrophils form NETs in the myocardium after MI, which reveal significant NE proteolytic activity. When subjected to permanent coronary artery ligation, wild-type (WT) mice produced large quantities of NETs. In MI mice, gene expression of Annexin A1 (AnxA1), an anti-inflammatory and proresolving mediator, was upregulated, however, most AnxA1 protein was degraded accompanied with high elastase activity in the myocardium. Both NE deficiency and NE inhibitor sivelestat inhibited NETs formation and accelerated resolution of acute inflammation associated with increased amount of intact AnxA1 and improved survival and cardiac function after MI. Inhibiting NETosis may improve healing and reduce NET-driven excessive inflammation after MI.

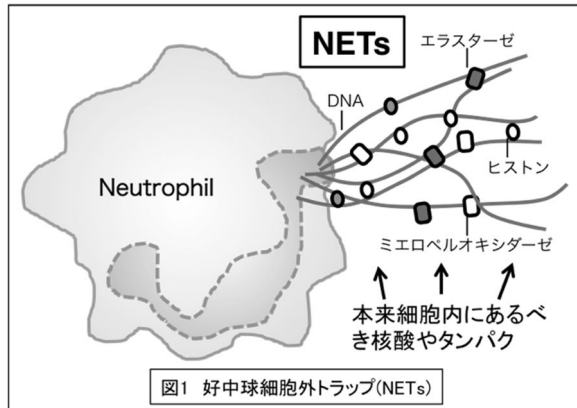
研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋梗塞 好中球エラスターゼ 好中球細胞外トラップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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に、感染局所にいち早く集積して病原体を除去する、感染防御の最前線で機能する免疫細胞である。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いた。しかし、近年これらの他に、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成分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、細菌を効率良く捕捉・除去する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捉しながら能動的に細胞死を起こす現象は 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。



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に、それ自身が自然免疫系に対する内因性リガンド及び組織破壊酵素として作用し、炎症反応を増強させる可能性が考えられている。これに関連して、全身性エリテマトーデス (*Proc Natl Acad Sci USA* 2010) や ANCA 関連腎炎 (*Nat Med* 2009) などの自己免疫性疾患の他、動脈硬化 (*Circulation* 2012) や深部静脈血栓症 (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012) の病態への関与が明らかになってきている。

急性心筋梗塞 (AMI) では、梗塞に伴う炎症反応が過度な場合、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 AMI の最も初期に梗塞部位に出現する炎症細胞であり、AMI の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細はまだ不明なところが多い。これまでに AMI と NETs の関連を示す研究報告は極めて少ないが、AMI 患者の冠動脈血栓中に NETs を認めたという報告がある (*J Thromb Haemost* 2014, *Thromb Haemost* 2013)。

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

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。

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。

好中球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。

心機能を心エコー図検査と心臓カテー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。

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。

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。

NETs の一部として存在している好中球エラスターゼ NE はフリーの状態と比べて炎症収束物質である Annexin A1 を強く切断し、心筋梗塞後の炎症の収束を遅らせた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Tajiri Kazuko, Ieda Masaki | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Cardiac Complications in Immune Checkpoint Inhibition Therapy | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine | 6. 最初と最後の頁 3 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2019.00003 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Tajiri Kazuko, Aonuma Kazutaka, Sekine Ikuo | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Immune checkpoint inhibitor-related myocarditis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology | 6. 最初と最後の頁 7~12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyx154 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukino Ogura, Kazuko Tajiri, Saori Yonebayashi, Duo Feng, Rujie Qin, Fumi Yamagami, Endin Nokik Stujanna, Junya Honda, Yumi Isaka, Dongzhu Xu, Taizo Kimura, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Kazutaka Aonuma |
| 2. 発表標題 The role of neutrophil elastase in acute myocardial infarction |
| 3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2017（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukino Ogura, Kazuko Tajiri, Saori Yonebayashi, Duo Feng, Rujie Qin, Fumi Yamagami, Endin Nokik Stujanna, Junya Honda, Yumi Isaka, Dongzhu Xu, Taizo Kimura, Nobuyuki Murakoshi, Satoshi Sakai, Akihiko Nogami, Kazutaka Aonuma |
| 2. 発表標題 Neutrophil Elastase Exacerbates Myocardial Injury after Myocardial Infarction in Mice |
| 3. 学会等名 The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuko Tajiri, Yukino Ogura, Saori Yonebayashi, Siqi Li, Zi Xun Yuan, Fumi Yamagami, Duo Feng, Rujie Qin, Yuta Okabe, Fumiya Tamura, Mari Isomi, Taketaro Sadahiro, Dongzhu Xu, Nobuyuki Murakoshi, Masaki Ieda |
| 2. 発表標題 Neutrophil extracellular trap (NET)-associated elastase delays resolution of acute inflammation via Annexin A1 cleavage in myocardial infarction |
| 3. 学会等名 2019 XXIII ISHR WORLD CONGRESS (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 酒井 俊 (Sakai Satoshi) (30282362) | 筑波大学・医学医療系・講師 (12102) | |
| 研究分担者 | 佐藤 明 (Sato Akira) (30528469) | 筑波大学・医学医療系・准教授 (12102) | |