

令和元年5月29日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17047

研究課題名(和文)敗血症性心筋障害におけるインテグリン受容体の機能の解析

研究課題名(英文) Integrin Overexpression Improves sepsis-induced myocardial injury through attenuation of ER Stress

研究代表者

川口 智則 (Kawaguchi, Tomonori)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40456504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症下の心臓ではサイトカイン過剰産生による血管内皮細胞傷害が生じ、筋小胞体Ca²⁺放出チャネルの構造不安定化による細胞質Ca²⁺過負荷が心筋障害を生じると考えられている。インテグリンの強発現が小胞体上のCa²⁺放出チャネルのリアノジン受容体の構造を安定化させ心筋細胞内のCa²⁺過負荷を抑制することが報告されている。リポ多糖を20mg/kgのDoseで10週齢のオスのインテグリン 7 1D 強発現マウスと同腹仔コントロールマウスに投与して敗血症モデルを作製したところ、インテグリン強発現マウスにおいて生存率が改善し、心筋障害が抑制されていた。その機序として小胞体ストレスの減弱が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症による心機能の低下は40%-50%の患者に見られ、死亡率の悪化が示唆されている一方でその心筋障害は可逆的であり、7-10日で回復するとされており、明確な原因は解明されておらず、治療法も確立していない。本研究において心機能障害を改善することが敗血症自体の予後を大きく変わることが確認できたため、敗血症時に心保護をすることの重要性が注目されるようになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alterations in calcium homeostasis in the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER) can cause stress that ultimately may affect ventricular function. Previous report showed that 7 1D integrin modified Ca²⁺ regulatory pathways in the cardiomyocyte via ryanodine receptor 2 (RyR2) stabilization. In the present study, we hypothesized that integrin overexpression (OE) would have beneficial effects against sepsis-induced myocardial injury via the inhibition of ER stress. LPS injected to 9-12 week old 7 1D integrin overexpressing male mice and age/gender-matched littermate controls. These mice were sacrificed 48 hours after LPS injection. Integrin 7 1D OE did not alter expression of Ca²⁺ transport proteins (SERCA2a, NCX-1 or RyR2) but did reduce RyR2 phosphorylation at serine 2808. eIF2a-P and CRT were significantly decreased in 7 1D integrin OE mice. These results suggest that 7 1D integrin OE decreases ER stress in sepsis-induced myocardial injury.

研究分野：救急集中治療

キーワード：敗血症性心筋障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症における心機能障害は敗血症の診断基準にもあげられており、予後を左右する因子のひとつである。現時点では、敗血症早期より心筋を保護しながら細胞レベルでの酸素供給量を維持する治療法は明確ではなく、対症療法に限られている。インテグリンは細胞 - ECM 蛋白質間および細胞 - 細胞間接着を仲介する細胞接着受容体で接着を介して組織構築の維持に関与し、細胞内シグナル伝達の機能も担っている。インテグリンの構造は α および β 鎖からなるヘテロ 2 量体受容体で、成体の心筋細胞ではラミニン受容体である $\alpha 7\beta 1D$ の組み合わせが優位に発現している。インテグリン $\beta 1$ と心機能の間には密接な関係が示唆されている。心筋特異的インテグリン $\beta 1$ ノックアウトマウスでは線維化と石灰化を生じ心不全状態に陥る(Shai SY et al. Circ Res 2002)。疾患モデルでは、大動脈 Banding による圧負荷心不全モデルにおいて心筋特異的にインテグリン $\beta 1$ をノックアウトすると、代償機構が破綻し心不全が増悪する(Li R et al. Am J Pathol 2012) ことが知られている。また、さまざまな細胞でインテグリンが Ca^{2+} ハンドリングに関与しているという報告もなされている。

2. 研究の目的

敗血症下の心臓ではサイトカイン過剰産生による血管内皮細胞傷害、微小循環不全が生じ、心筋細胞内の筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルの構造不安定化による細胞質 Ca^{2+} 過負荷が心筋障害を生じると考えられている。この状態は心筋細胞死を誘発し心不全を増悪させる。近年、心筋インテグリンの強発現が虚血再灌流障害を抑制することが報告され、その機序は **インテグリンと細胞外基質の結合により小胞体上の Ca^{2+} 放出チャネルのリアノジン受容体 (RyR2) の構造を安定化させ心筋細胞内の Ca^{2+} 過負荷を抑制することによるもの**と証明されている。本研究の目的は敗血症性心機能障害に対してインテグリン受容体がどのように作用するのかを心筋細胞特異的インテグリン強発現マウス並びにノックアウトマウスを用いて検討することである。

3. 研究の方法

α MHC プロモーターの下流にインテグリンの cDNA を組み込んだプラスミドを用いて **心筋細胞特異的にインテグリン $\alpha 7$ 、 $\beta 1D$ をそれぞれ強発現するマウス** を掛け合わせてインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ を強発現するマウスを作成した。これらの 9-12 週齢の雄性マウスに対しリポ多糖 (LPS) 20mg/kg の濃度で腹腔内投与し敗血症性血管炎モデルを作成した。

4. 研究成果

インテグリン $\alpha 7\beta 1D$ を強発現するマウスにおいてインテグリン $\alpha 7$ 、 $\beta 1D$ の強発現が確認できた(図 1)。一方

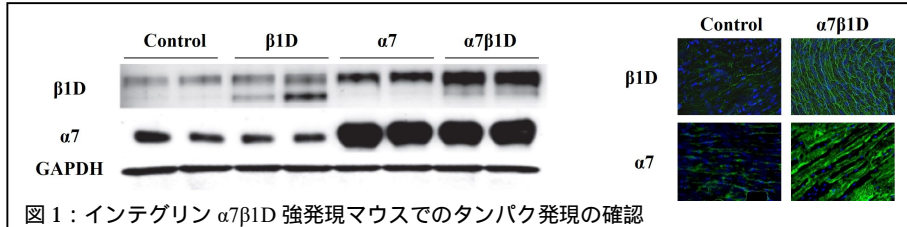


図 1: インテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスでのタンパク発現の確認

でインテグリン関連タンパク質の発現については両群間に有意な差は認めなかった(図 2)。ワイルドタイプマウスにおいては LPS 投与 48 時間で 18%であったのに対し、インテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスでは 64%と有意な改善が認められた。また、心筋細胞障害を示すマーカーである血清トロポニン I (TnI) 値は LPS 投与 48 時間後のコントロールマウスにおいて 8.5 ± 1.8 mg/dL (LPS 投与前: 感度以下)であったのに対し、インテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスにおいては 2.3 ± 0.9 mg/dL と有意に心筋障害が抑制されていた ($p < 0.05$)。

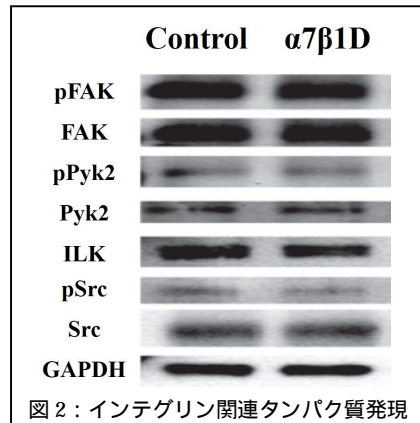


図 2: インテグリン関連タンパク質発現

LPS 投与後のインテグリン関連タンパク質の発現について調べたところ、ワイルドタイプマウスとインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスの間で有意な差は認めなかった。

カルシウムハンドリングに関わるタンパク質については L 型カルシウムチャネル、NCX1、SERCA、ホスホランパン、リアノジン受容体の発現は両群間に差を認めなかったが、リアノジン受容体のリン酸化は $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスにおいて有意に抑制されていた(図 3)。

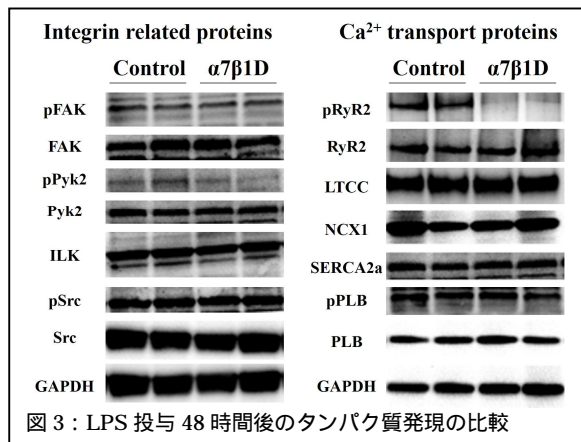


図 3: LPS 投与 48 時間後のタンパク質発現の比較

心筋細胞内のカルシウムについての検討を行うために、心筋細胞内カルシウムの 70% 以上は小胞体内に存在するため、小胞体ストレスのマーカーである eIF2a-P、小胞体内 Ca^{2+} 量を表すカルレチキュリンの発現についての検討を行った。eIF2a の発現自体はワイルドタイプマウスとイン

テグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスに差は認めなかったが、リン酸化 eIF2a とカルレチキュリンの発現についてはインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウスにおいて有意に抑制されており、小胞体ストレスがインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現により有意に抑制されていることが示唆された (図 4)。

以上の結果からインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現により、LPS 投与により生じる心筋細胞の小胞体ストレスが抑制されることで敗血症性心筋障害が抑制されることが示唆された。

次に心臓毛細血管の傷害について電子顕微鏡を用いた考察を行ったところ、LPS 投与により心臓の毛細血管壁は浮腫により肥厚しフィブリンの析出像が認められたが、インテグリン強発現マウスでは壁の肥厚は減

弱し、フィブリンの析出も認められなかった (図 5)。現在は血管内皮表面を覆うグリコカリックスについても検討中で、これらの結果については現在論文を作成中である。

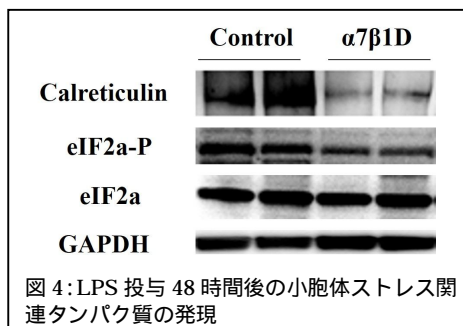


図 4: LPS 投与 48 時間後の小胞体ストレス関連タンパク質の発現

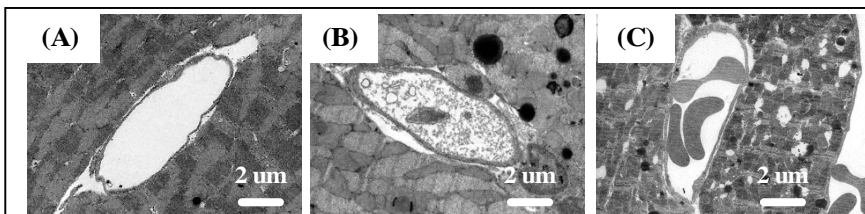


図 5: 敗血症時の心血管内皮の超微形態

心臓毛細血管内皮の TEM 像 (A) LPS 投与前、(B) LPS 投与 48 時間後のコントロールマウス、(C) LPS 投与 48 時間後のインテグリン $\alpha 7\beta 1D$ 強発現マウス。LPS 投与により観察される毛細血管壁の浮腫とフィブリンの析出がインテグリンの強発現により消失しているのがわかる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Suzuki K, Okada H, Takemura G, Takada C, Kuroda A, Yano H, Zaikokuji R, Morishita K, Tomita H, Oda K, Matsuo S, Uchida A, Fukuta T, Sampei S, Miyazaki N, Kawaguchi T, Watanabe T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Maekawa Y, Ogura S. Neutrophil Elastase Damages the Pulmonary Endothelial Glycocalyx in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Endotoxemia. *Am J Pathol.* 2019 in Press doi: 10.1016/j.ajpath.2019.05.002. 査読有

Kanamori H, Naruse G, Yoshida A, Minatoguchi S, Watanabe T, Kawaguchi T, Yamada Y, Mikami A, Kawasaki M, Takemura G, Minatoguchi S. Metformin Enhances Autophagy and Provides Cardioprotection in δ -Sarcoglycan Deficiency-Induced Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2019 Apr;12(4):e005418. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005418. 査読有

Naruse G, Kanamori H, Yoshida A, Minatoguchi S, Kawaguchi T, Iwasa M, Yamada Y, Mikami A, Kawasaki M, Nishigaki K, Minatoguchi S. The Intestine Responds to Heart Failure by Enhanced Mitochondrial Fusion through Glucagon-like Peptide-1 Signaling. *Cardiovasc Res.* 2019 Jan 10. doi: 10.1093/cvr/cvz002. 査読有

Ando Y, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, Zaikokuji R, Hotta Y, Miyazaki N, Yano H, Muraki I, Kuroda A, Fukuda H, Kawasaki Y, Okamoto H, Kawaguchi T, Watanabe T, Doi T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Ogura S. Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. *Sci Rep.* 2018 Nov 30;8(1):17523. doi: 10.1038/s41598-018-35976-2. 査読有

Suzuki K, Okada H, Yoshida S, Okamoto H, Suzuki A, Suzuki K, Yamada Y, Hayashi H, Yasuda R, Fukuta T, Kitagawa Y, Miyake T, Kawaguchi T, Watanabe T, Doi T, Kumada K, Ushikoshi H, Sugiyama T, Itoh Y, Ogura S. Effect of high-flow high-volume-intermittent hemodiafiltration on metformin-associated lactic acidosis with circulatory failure: a case report. *J Med Case Rep.* 2018 Sep 29;12(1):280. doi: 10.1186/s13256-018-1809-6. 査読有

Watanabe T, Okada H, Shibuya K, Kobayashi M, Suzuki K, Naruse G, Kawaguchi T, Ushikoshi H, Yoshida S, Ito H, Kawasaki M, Ogura S. "To and Fro" Paradoxical Thrombus in the Left Heart. *Circ J.* 2019 Jan 25;83(2):491. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0564. 査読有

Inagawa R, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Yano H, Ando Y, Usui T, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Zaikokuji R, Matsumoto A, Kawaguchi T, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Kumada K, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Ultrastructural Alteration of Pulmonary Capillary Endothelial Glycocalyx During Endotoxemia. *Chest.* 2018 Aug;154(2):317-325. doi: 10.1016/j.chest.2018.03.003 査読有

[学会発表] (計 3 件)

福田洋丞、岡田英志、鈴木浩大、三瓶想、福田哲也、岡本遥、川口智則、吉田隆浩、牛越博昭、吉田省造、小倉真治 糖尿病と血管内皮グリコカリックスの超微形態 第 46 回日本救急医学会学術集会 横浜、2018

稲川莉紗、岡田英志、鈴木浩大、渡邊崇量、館正仁、岡本遥、川口智則、吉田隆浩、牛越

博昭、吉田省造、小倉真治 血管内皮グリカコリックスの超微形態からみた心不全と臓器
連関 第46回日本救急医学会学術集会 横浜、2018

川崎雄輝、岡田英志、鈴木浩大、渡邊崇量、柿野圭紀、福田哲也、川口智則、吉田隆浩、
牛越博昭、吉田省造、小倉真治 体液貯留が血管内皮グリカコリックスに与える影響の基
礎的考察 第46回日本救急医学会学術集会 横浜、2018

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹村 元三

ローマ字氏名：TAKEMURA Genzou

所属研究機関名：朝日大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：40283311

研究分担者氏名：鈴木 浩大

ローマ字氏名：SUZUKI kodai

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：80724583

研究分担者氏名：岡田 英志

ローマ字氏名：OKADA Hideshi

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：30402176

(2)研究協力者

ローマ字氏名：Robert S. Ross

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。