

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590927

研究課題名（和文）心筋リモデリング時の間質細胞の動態を制御する分子機構に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Molecular mechanism regulating mesenchymal cell dynamics during myocardial remodeling.

研究代表者

吉田 恭子（今中恭子）（KYOKO IMANAKA-YOSHIDA）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00242967

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞後、傷害を受けた部位に、骨髄由来間葉系幹細胞が動員され、もともと組織に存在する線維芽細胞とともに、組織修復に関わる。その際、骨髄由来間葉系幹細胞、および新筋線維芽細胞両方から産生される細胞外マトリックス分子 tenascin-C は、サイトカイン、ケモカインの産生をあげ、骨髄由来細胞の動員を促進することにより、組織修復を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： After myocardial infarction, bone marrow derived mesenchymal stem cells are recruited to the damaged lesion and could be involved in myocardial tissue repair as well as residential fibroblasts. An extracellular matrix molecule, tenascin-C synthesized by both mesenchymal stem cells and residential fibroblasts may accelerate tissue repair at least partly, by up-regulation of cytokine and chemokine production and facilitating recruitment of bone marrow derived cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学，リモデリング，心筋梗塞，テネイシン，細胞外マトリックス，組織修復，間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

一般に、組織リモデリングとは、病変組織をより正常に近く修復・再生させるための一連の生体反応であるが、循環器病領域では、心筋梗塞などの組織傷害後に心機能が低下して心室が拡張した状態を心室リモデリングとよぶことが多く、そ

の診断、治療、そのための病態メカニズムの解明は臨床上最も重要な課題の一つである。

実質細胞の再性能に乏しい心臓では、組織の修復再生の主役を演じるのは間質細胞である。その動態は心室リモデリングに大きく影響する。最近、心臓の組織修復時に心臓外

から細胞が動員されて間質細胞として重要な働きをする可能性が注目されている。我々は、これまで心臓組織リモデリングを制御する因子の一つとして細胞外マトリックステネイシン C (TN-C) に注目し、その発現レベルが、心室リモデリングの病態マーカーになり、特に、BNP とテネイシン C を組み合わせると非常によい予後マーカーになることを明らかにした。これは、心筋細胞の産生する BNP と間質細胞の産生する TN-C の両方を指標にすることで心臓全体のリモデリング活性を全体的に評価できるため、逆に言えば心室リモデリングに対する間質細胞の貢献がいかに大きいかを示すと考えた。さらに、心筋組織傷害時に間質細胞によって産生される TN-C が、病体マーカーになるだけでなく、線維芽細胞の遊走、筋線維芽細胞への分化をうながすことにより心筋組織傷害部位へ筋線維芽細胞動員するという間質動態に関わる組織修復制御因子のひとつである可能性を明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、心室リモデリング時に重要な役割を演じる間質細胞のうち心臓外から動員される骨髄由来間質細胞の動態解析および TN-C による制御機構の分子メカニズムを明らかにし、それを応用した心室リモデリングの新規治療法の開発をすることである。

## 3. 研究の方法

### 1 心筋梗塞後の組織修復時動員されるに骨髄間質幹細胞の動態制御に TN-C が関与するかに関する検討

- (1) C57BL6 バックグラウンド野生型およびテネイシン C ノックアウトマウスを用いて、冠動脈永続結紮モデルを作製し、組織修復を比較した。
- (2) 野生型マウスを用いて電気メス焼灼によ

る心筋傷害モデルを作成し、GFP マウスから採取した骨髄間質幹細胞を眼静脈から注射して移植し、経時的にテネイシン C の分子局在を抗体染色で対比した。

### (3) 骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) に対する TN-C の作用

#### (3-1) オートクリンファクターの可能性の検討

野生型マウスから骨髄間葉系幹細胞を培養し、TN-C の産生能 Western Blot および蛍光抗体法で検討した。

#### (3-2) 心筋細胞および心臓の residential cells に対する TN-C の作用

内因性 TN-C の影響を除外するために TN-C ノックアウト新生児マウスの心臓から心筋細胞を培養し、10%血清存在下に精製 TN-C 10 $\mu$ g/ml を添加して16時間培養し、遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより解析した。

## 4. 研究成果

(1) C57BL6 バックグラウンド野生型およびテネイシン C ノックアウトマウスを用いて、冠動脈永続結紮モデルを作製した。BALB/c バックグラウンドのマウスを用いて得られた以前の結果と異なり、テネイシン C ノックアウトでは梗塞後1週間の生存率が野生型より有意に低く、生き残ったマウスでは急性期の炎症が強く、膠原線維形成が抑制されていた。

(2) CAG-GFP マウスから骨髄細胞を分離し、間葉系幹細胞を培養増殖させた。syngenic な8週令マウスの心筋の一部に電気メスによる凝固壊死をおこした心筋傷害モデルを作成して、傷害1日後に眼静脈から 1x10<sup>6</sup>/マウスの細胞を注射して移植し、1,2,3,7 日後に心臓を摘出し、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色により骨髄由来細胞を追跡した。移植した骨髄由来幹細胞は、傷害3

日後には TN-C が沈着している傷害心筋境界付近に分布し、

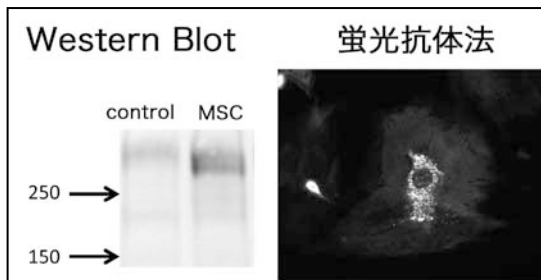


(図, 矢印)、組織修

復に residential な

間質細胞の他に骨髄由来の間質細胞も関与していること、TN-C がその動員を制御する可能性が示唆された。さらに、TN-C ノックアウトの心筋傷害モデルにおける骨髄由来間葉系細胞動態の比較を試みたが、移植した細胞が集塊を作る傾向が強く、移植直後にマウスが肺塞栓で死亡し、それ以上の詳細な解析は不可能であった。野生型マウスでも同様であったため、急性期死亡に関する TN-C の関与はないと考えられる。

(3-1)骨髄間葉系幹細胞による TN-C の産生  
骨髄間葉系幹細胞の培養上清中に Western Blot で、約 280kDa の TN-C のバンドを認めた。また、モノクローナル抗体により細胞内輸送を阻害すると、細胞内に TN-C が貯留することが蛍光抗体法により確認された。(図)



次に、野生型およびテネイシン C 欠損 C57BL6 系マウスから骨髄間葉系幹細胞を分離培養したが、単純な培養条件では、明らかな増殖能の差はみられなかった。そこで、骨髄間葉系幹細胞自身が産生する TN-C によるオートクリン作用を除外し、生体内で骨髄間葉系幹細胞に対する心臓内微小環境因子の一つとしての TN-C の機能を解析するために、TN-C ノックアウト/GFP マウスを作製し、骨髄間質幹細胞を得た。その際、野生型 GFP 由来の細胞と増殖能に差がみられるという予備的結果が得られたため、TN-C ノックアウトおよび野生型マウスから骨髄間質幹細胞を培養して比較したが、単純な培養条件では、

明らかな増殖能の差はみられなかった。

(3-2) TN-C ノックアウト新生児マウスの心臓から心筋細胞を培養し、精製テネイシン C を添加して遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより解析したところ、心筋細胞で  $1-1\beta$ ,  $Cxcl2,3$  などサイトカイン、ケモカインの発現が上昇することが明らかになった。従って、炎症細胞など細胞などの動員を促進すると考えられた。

#### 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 11 件)

1. Okamoto H, Imanaka-Yoshida K. Matricellular proteins: New molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc Ther.* 2011(査読あり)
2. Nagaharu K, Zhang X, Yoshida T, Katoh D, Hanamura N, Kozuka Y, Ogawa T, Shiraishi T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin c induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by src activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2011;178:754-763(査読あり)
3. Kobayashi N, Odaka K, Uehara T, Imanaka-Yoshida K, Kato Y, Oyama H, Tadokoro H, Akizawa H, Tanada S, Hiroe M, Fukumura T, Komuro I, Arano Y, Yoshida T, Irie T. Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain fv fragment targeting tenascin-c. *Anal Chem.* 2011;83:9123-9130(査読あり)
4. Ishigaki T, Imanaka-Yoshida K, Shimojo N, Matsushima S, Taki W, Yoshida T. Tenascin-c enhances crosstalk signaling of integrin  $\alpha v\beta 3$ /pdgfr- $\beta$  complex by src recruitment promoting pdgf-induced

- proliferation and migration in smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2011;226:2617-2624(査読あり)
5. 今中恭子. 細胞外マトリックス調節因子. *Annual Review 循環器2011*: 29: 1725-1728(査読なし)
6. Ando K, Takahashi M, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin c may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. *Differentiation.* 2011;81:299-306(査読あり)
7. Taki J, Inaki A, Wakabayashi H, Imanaka-Yoshida K, Ogawa K, Hiroe M, Shiba K, Yoshida T, Kinuya S. Dynamic expression of tenascin-c after myocardial ischemia and reperfusion: Assessment by 125i-anti-tenascin-c antibody imaging. *J Nucl Med.* 2010;51:1116-1122(査読あり)
8. Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Tsutsui H, Hiroe M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-c may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H1072-1078(査読あり)
9. Kurita T, Onishi K, Dohi K, Takamura T, Fujimoto N, Tanigawa T, Imanaka-Yoshida K, Wada H, Nobori T, Ito M. Conventional therapy with an ace inhibitor diminishes left ventricular dyssynchrony during the progression of heart failure. *Int J Cardiol.* 2010;140:48-54(査読あり)
10. Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Kitaura Y. High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: Expression of tenascin c as a possible marker for inflammation. *Hum Pathol.* 2009;40:1015-1022(査読あり)
11. Fujimoto N, Onishi K, Sato A, Terasaki F, Tsukada B, Nozato T, Yamada T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ito M, Hiroe M. Incremental prognostic values of serum tenascin-c levels with blood b-type natriuretic peptide testing at discharge in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. *J Card Fail.* 2009;15:898-905. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. 今中恭子. 心筋の組織リモデリング. 第 57 回日本病理学会周期特別総会, 2011 年 11 月 17-18 日, 東京
2. 山根利之、鷺野亜矢、山崎英俊. Characterization of the earliest hematolymphoid progenitors in mouse ontogeny 第 73 回日本血液学会学術集会, 2011 年 10 月 14-16 日, 名古屋
3. 山崎英俊. 様々な器官における間葉細胞の由来と神経堤細胞の間葉系幹細胞と

しての可能性. 第 53 回歯科基礎医学  
会学術大会 サテライトシンポジウム  
8 「神経堤細胞の未知なる可能性：個  
体発生から再生医療へ」, 2011 年 9 月  
30 日, 岐阜

4. Imanaka-Yoshida K, Ando K, Takahashi  
M, Yamagishi T, Yoshida T, Nakajima  
Y, Miyagawa-Tomita S. Matricellular  
protein tenascin-C, may regulate  
proepi, epicardial cell function  
during coronary vessel development.,  
2011 Weinstein Cardiovascular  
Development Conference, 2011 年 5 月  
5-7 日, Cincinnati, OH, アメリカ合  
衆国
5. Suzuki Y., Hamamoto Y., Hayashi T,  
Hiramoto M, Yasuda K, Yoshida T, .  
Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C may  
stimulate macrophage activity. The  
American Society for Cell Biology  
50<sup>th</sup> Annual Meeting, 2010 年 12 月  
11-15 日, Philadelphia, アメリカ合  
衆国
6. 今中恭子. 心筋炎から拡張型心筋症へ.  
日本心臓病学会・心筋生検研究会ジョ  
イントシンポジウム. 2010 年 9 月 19  
日, 東京
7. 今中恭子. 心臓形態形成・改変におけ  
る細胞外マトリックスの役割-心臓を創  
り直す手がかり. 心臓血管発生研究会,  
2010 年 7 月 10 日, 東京
8. Imanaka-Yoshida, K. *Tenascin C as a  
Target for Regulation of Cardiac  
Remodeling*. Keystone Symposia:  
Cardiovascular Development and  
Repair. 2010 年 2 月 28 日-3 月 5 日,  
Keystone, Colorado, アメリカ合衆国

9. 今中恭子、廣江道昭. 細胞外マトリクス  
テネイシン C による線維化・炎症・免疫反応  
の制御. 第 13 回日本心不全学会学術集会,  
2009 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 福岡

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉田 恭子 (今中恭子) (IMANAKA-YOSHIDA  
KYOKO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00242967

##### (2) 研究分担者

山崎 英俊 (YAMAZAKI HIDETOSHI)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00283987

原 万里 (HARA MARI)

三重大学・医学部・教務職員  
研究者番号：30176383