

## 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25年5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成23年4月1日～平成25年3月31日

課題番号：23790866

研究課題名（和文）心筋細胞傷害に対する新治療戦略：HMGB1 マウスを用いた検討

研究課題名（英文）The new strategy for protection of cardiomyocyte injury using HMGB1 knock out mouse.

研究代表者：鈴木 聡（SUZUKI SATOSHI）

福島県立医科大学医学部 循環器・血液内科学講座 助教

研究者番号：60536944

## 研究成果の概要（和文）：

当初のプロトコールでは仮設通りの結果が得られなかったため、研究方法にいくつかの改良を要した。心筋梗塞作成後の HMGB1 の血中濃度が数日間のうちに急激に上昇することがわかったため、心筋梗塞作成後の心筋組織の採取時期を早めることとした。また生存率を上げるために移植する細胞数を増やすようにプロトコールを変更し、現在、実験を継続している。今後、仮設通りのデータが得られれば、各種学会などで発表する予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

Because we could not get the results which we hypothesized previously, we have improved some points of research methods. We clarified that the blood concentration of high mobility group box protein 1 (HMGB1) increased rapidly in a few days after myocardial infarction (MI), therefore we have decided to hasten the harvest point of heart after MI creation. Moreover, mortality was high in the first protocol, and we increased the number of transfection cells in order to increase the survival rate. We are currently in progress experiments.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：心筋梗塞後リモデリング、心筋細胞再生、HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

High mobility group box protein 1 (HMGB1) は非ヒストン性の核内蛋白であり、心筋細胞を含む多くの臓器に発現している。ヒストンH1 と置換してヌクレオソーム構造を弛緩させることで、転写反応に最適な構造を構築させる作

用を有する。HMGB1 は p53 と結合し Cyclin G1 や p21<sup>waf1</sup> の転写活性調節を行うことなどが報告されており、転写因子などと結合することで、それら因子のDNAへの結合を促進させ、またDNAに直接働いてその高次構造を転写反応の最適構造に変化させる働きも持って

いる。

HMGB1 はアポトーシス細胞からはほとんど発現せず、傷害を受けた細胞（ネクロトーシス細胞）から放出されるという特徴を持っている。放出されたHMGB1 は細胞外に分泌されると様々な機能を営むサイトカインとしての働きを発揮する。細胞外へ分泌されたHMGB1 はマクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞などに作用し、炎症性サイトカインの産生、細胞の遊走と増殖、損傷組織の修復、細胞のストレスに対する生存維持など多彩な作用を発揮する。

## 2. 研究の目的

我々は以前、心筋にのみ HMGB1 遺伝子を選択的に発現したトランスジェニック(HMGB1-TG)マウスを作成した。マウスの冠動脈を結紮した心筋梗塞モデルにおいては、HMGB1-TG マウスでは野生型 (WT) マウスよりも梗塞サイズが有意に小さく、また梗塞周囲でのCD31 陽性の内皮細胞、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)陽性の血管平滑筋細胞が多く認められた。このことからHMGB1 は血管新生ないし再生を促進した結果、梗塞サイズが縮小したことが示唆された。本研究ではその HMGB1 による心保護効果の詳細なメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

心筋梗塞巣へ骨髄由来の細胞が誘導され発現しているかを検討するため、HMGB1-TG マウスに green fluorescence protein (GFP) マウスの骨髄を移植する。我々の施設には既に放射線照射装置は完備されており、Recipientである HMGB1-TGマウスに9 Gy の放射線照射を行い、骨髄細胞を死滅させる。DonorであるGFPマウスを屠殺し両側大腿骨と脛骨を摘出する。大腿骨と脛骨の骨髄内をPBSでフラッシュし、骨髄細胞を採取する。採取した骨髄細胞  $2 \times 10^6$  個を 29 G のシリンジに入れ HMGB1-TGマウスの尾静脈より注入する。骨髄移植後、HMGB1-TGマウスの冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成する。そして梗塞周囲にGFP陽性の骨髄由来の細胞が認められるかを観察する。また心筋梗塞作成後の HMGB1-TGマウスの血液を採取し、FACSにて血管内皮前駆細胞 (EPC) の虚血部位への誘導について検討する。

## 4. 研究成果

予定していたプロトコールの方法では心筋梗塞作成から数日で死亡するマウスが多く、また、生存したとしても2週間後に組織学的検討を行ったところ、GFP 陽性の骨髄細胞浸潤はほとんど検出されなかった。そこで心筋梗塞作成後のHMGB1 の血中濃度を測定したところ数日間のうちに急激に上昇することがわかったため、心筋組織の採取時期を早めることとし、また生存率を上げるために移植する細胞数を増やすようにプロトコールを変更し、現在、実験を継続している。今後、仮設通りのデータが得られれば、各種学会などで発表する予定である。

## 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 10 件)

1. Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest* 41 (7), 759-766, 2011
2. Yoshihisa A, Shimizu T, Owada T, Nakamura Y, Iwaya S, Yamauchi H, Miyata M, Hoshino Y, Sato T, Suzuki S, Sugimoto K, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servo ventilation improves cardiac dysfunction and prognosis in chronic heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. *Int Heart J* 52 (4), 218-223, 2011
3. Bilim O, Shishido T, Toyama S, Suzuki S, Sasaki T, Kitahara T, Sadahiro M, Takeishi Y, Kubota I: Differential regulation of diacylglycerol kinase isoform in human failing hearts. *J Cardiothorac Surg* 6, 65, 2011
4. Yoshihisa A, Suzuki S, Miyata M, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: 'A single night' beneficial effects of adaptive servo-ventilation on cardiac overload, sympathetic nervous activity, and myocardial damage in patients with chronic heart failure and sleep-disordered breathing. *Circ J* 76 (9), 2153-2158, 2012
5. Miyata M, Yoshihisa A, Suzuki S, Yamada S, Kamioka M, Kamiyama Y, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servo ventilation improves Cheyne-Stokes respiration, cardiac function, and prognosis

- in chronic heart failure patients with cardiac resynchronization therapy. *J Cardiol* 60 (3), 222-227, 2012
6. Hirose M, Takeishi Y, Nakada T, Shimojo H, Kashihara T, Nishio A, Suzuki S, Mende U, Matsumoto K, Matsushita N, Taira E, Sato F, Yamada M: Nicorandil prevents G  $\alpha$  q-induced progressive heart failure and ventricular arrhythmias in transgenic mice. *PLoS One* 7 (12), e52667, 2012
  7. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Ishino M, Kitahara T, Sasaki T, Katoh S, Otaki Y, Watanabe T, Shibata Y, Mantovani A, Takeishi Y, Kubota I: Long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload - induced left ventricular dysfunction. *PLoS ONE* 8 (1), e53133, 2013
  8. Owada T, Yoshihisa A, Yamauchi H, Iwaya S, Suzuki S, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servoventilation improves cardiorenal function and prognosis in heart failure patients with chronic kidney disease and sleep-disordered breathing. *J Card Fail* 19 (4), 225-232, 2013
  9. Miyata M, Nakazato K, Sakamoto N, Suzuki S, Kamiyama Y, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Left ventricular plasty improved cardiac function in a case of takotsubo cardiomyopathy with persistent aneurysm. *J Cardiol Case* 7 (5), e133-e136, 2013
  10. Yoshihisa A, Suzuki S, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Impact of adaptive servo-ventilation on cardiovascular function and prognosis in heart failure patients with preserved left ventricular ejection fraction and sleep-disordered breathing. *Eur J Heart Fail* 15 (5), 543-550, 2013
- [学会発表] (計 8 件)
1. Suzuki S, Yoshihisa A, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servo ventilation has acute anti-oxidative and anti-inflammatory effects in heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. 第 76 回日本循環器学会学術集会 (The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society), 福岡, March 2012
  2. Suzuki S, Yoshihisa A, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Anemia has significant impacts for adaptive servo ventilation therapy on heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. 第 76 回日本循環器学会学術集会 (The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society), 福岡, March 2012
  3. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Takeishi Y: Effect of pentraxin 3 on pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific Sessions (BCVS 2012): Frontiers in Cardiovascular Science and Novel Therapy, New Orleans, LA, USA, July 2012
  4. Suzuki S, Yoshihisa A, Sugimoto K, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: A single night use of adaptive servo ventilation improves renal function in heart failure patients with sleep disordered breathing. Congress of the European Society of Cardiology 2012, Munich, Germany, August 2012
  5. Suzuki S, Yoshihisa A, Miyata M, Sugimoto K, Yamaki T, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Anemia has significant impacts for adaptive servo ventilation therapy on heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. Congress of the European Society of Cardiology 2012, Munich, Germany, August 2012
  6. Suzuki S, Yoshihisa A, Miyata M, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servo ventilation improves long-term prognosis in heart failure patients with preserved left ventricular ejection fraction and sleep disordered breathing. Congress of the European Society of Cardiology 2012, Munich, Germany, August 2012
  7. Suzuki S, Yoshihisa A, Miyata M, Sugimoto K, Kunii H, Yamaki T, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Overnight beneficial impacts of adaptive servo ventilation on cardiac overload, sympathetic nervous activity, and myocardial damage in chronic heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. Congress of the European Society of Cardiology 2012, Munich, Germany, August 2012
  8. Suzuki S, Takeishi Y: Selective vasopressin V2 receptor antagonist, tolvaptan, for treatment of acute decompensated heart failure: comparison with intravenous carperitide infusion. 第 77 回日本循環器学会学術集会 (The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society), 横浜, March 2013
- [図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

研究者番号 :

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :