

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659145

研究課題名（和文） 拡張型心筋症の病態における自然免疫の役割

研究課題名（英文） The role of innate immunity in Dilated Cardiomyopathy

研究代表者

三宅 健介 (MIYAKE KENSUKE)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

研究成果の概要（和文）：我々は、Epithelial Membrane Protein 3 のトランスジェニックマウス（Emp3 Tg）の作製および解析を行い、同マウスが自然発症性に拡張型心筋症様の病態を呈することを見出した。全身性に Emp3 および Cre 遺伝子を発現する Emp3 Tg/CAG-Cre(n=11) は 23 週齢までに 100% が死亡し、その多くが拡張型心筋症様の症状を呈した。しかし、Emp3 Tg マウスから CAG-Cre 遺伝子を除くことで拡張型心筋症は発症しなくなるという予想外の結果となった。CAG-Cre マウス自体には DCM 様症状は全く認められないことから、Cre 遺伝子の強制発現により誘導される何らかの異常を Emp3 が増長すると考えられる。今後、CAG-Cre マウスで誘導されると予測される ER ストレスなどにおける Emp3 の役割の解明が求められる。

研究成果の概要（英文）：We constructed Epithelial Membrane Protein 3 Transgenic mice (Emp3 Tg) which spontaneously suffered from DCM like heart symptoms. Emp3 Tg mice with CAG-Cre gene died within 6 months and most of them showed dilated heart atria and ventricles. However, deleting CAG-Cre gene from Emp3 Tg mice relieved them from DCM like symptoms. Considering that CAG-Cre did not show DCM like symptoms at all, Emp3 gene may exacerbate unknown abnormality in heart induced by Cre protein overexpression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：拡張型心筋症、TLR

1. 研究開始当初の背景

特発性心筋症の一種である拡張型心筋症 (Dilated Cardiomyopathy, DCM) は、心筋の収縮不全と心腔の拡張を特徴とする難治性疾

患の総称である。同疾患には発症要因に不明な点が多いことから治療は対症療法が中心であり、心臓移植以外には有効な治療法が存在しないのが現状である。日本国では心臓移

植の80%以上が同疾患を原因とする。こうした現状から、根治的治療の礎となる発症原因の解明が求められる。

2. 研究の目的

我々は、病原体センサーToll Like Receptor (TLR) に会合する分子である Epithelial Membrane Protein 3 (Emp3) 分子のトランスジェニックマウスが拡張型心筋症様の病態を自然発症することを見出した。同マウスの解析を通じて拡張型心筋症の発症に関与する分子メカニズムを解明すると共に、同症における自然免疫機構の役割を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、DCM様症状を発症するEmp3 Tgマウスの解析を通じてDCM発症の新規メカニズムの解明を目指した。研究内容は以下の3点を中心に行った。

1. Emp3TgマウスのDCM様症状における特徴の明確化。：最初にEmp3Tgマウスのモデル動物としての特徴を検討する。体重および死亡率を経時的に解析し、身体的異常を統計的に示す。また、Emp3 Tg の心臓を経時的に病理組織学的手法を用いて解析し、心臓における異常を解析する。

2. DCM 様症状の発症に関わる責任細胞の同定。：心臓には心筋細胞以外にも様々な細胞が存在するが、どの細胞集団がDCM様疾患の発症に関与するのかわからない。Emp3 Tg は loxP siteを利用することでConditionallyに発現を制御することが可能であることから、Emp3 Tgマウスを様々なCreマウス(Tie2-Cre、LyzM-Cre、Pn-Cre)と交配し、DCM様症状の発症に関与する細胞群の同定を目指す。

3. Emp3 が制御する分子メカニズムの解明。：Emp3がTLR2との会合分子として発見された経緯より、DCM様症状の発症にTLRが関連する可

能性が強く示唆される。TLRのシグナルがDCM様症状の発症に影響するかどうかに関して、TLRシグナル伝達に必須のMyD88を欠損させたEmp3 Tgマウスを作製することで検討を行う。またEmp3がTLR以外の分子を制御する可能性を想定し、樹立した抗Emp3モノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験を行う。それより新規の共沈分子が得られた場合、同分子の解析も行う。

4. 研究成果

1. Emp3Tg マウスの DCM 様症状における特徴の明確化。：

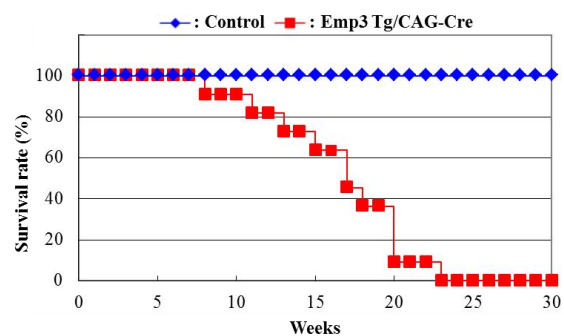


図1. Emp3 Tg マウスの生存率。

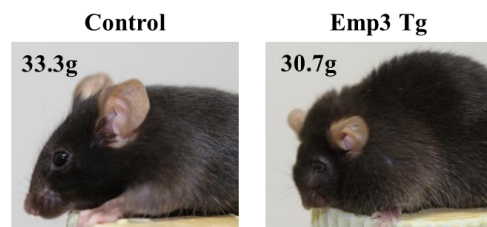


図2. Emp3 Tg マウスにおける高度の皮下浮腫。

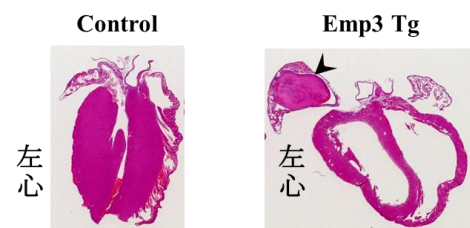


図3. 心臓のHE染色像。

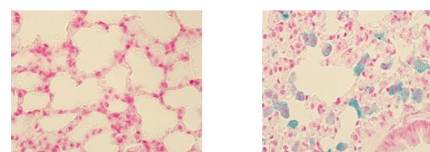


図4. Emp3 Tgの肺における鉄染色(ペルリンブルー染色)の結果。

Emp3 Tg/CAG-Cre マウス(n=11)は、6ヶ月齢までに体重減少または急激な体重増加を呈して全個体が死亡した(図1)。Emp3 Tg/CAG-Cre マウスでは全身皮下における浮腫および胸水や腹水の貯留が認められ(図2)、心筋の菲薄化に伴って心腔が高度に拡張していた(図3)。また、慢性的なうっ血を示唆する左心房内の血栓(鉄染色陽性)や肺重量の増加が認められた。病理組織学的所見では、肺のうっ血を示唆するヘモジデリンを貪食したマクロファージ(心臓病細胞)が肺胞内に多数浸潤する像が認められた(図4)。また、心筋では高度の錯綜配列や線維化が認められ、一部マウスでは心筋内に広範な炎症巣が認められた。また小腸炎を発症する個体が散見された。

しかしながら、CAG-Cre 遺伝子を除いた Emp3 Tg マウスでは Emp3 Tg/CAG-Cre で認められていた症状が全く発症しなくなるという予想外の結果となった。CAG-Cre マウス自体は拡張型心筋症や小腸炎を発症することは全くないが、無症候性に突然死する個体が散見される。この事実を考慮すると、Cre 遺伝子の強制発現により誘導された何らかの異常を Emp3 が増長した結果として拡張型心筋症や小腸炎が発症したと考えられる。

2. DCM 様症状の発症に関わる責任細胞の同定。:

LyzM-Cre や Tie2-Cre マウスと交配することによりマクロファージ特異的または血球系細胞全般的に Cre を発現する Conditional Emp3 Tg マウスを作製し、1年間にわたり死亡率や疾患の発症を観察した。その結果、これらのマウス (Emp3 Tg/LyzM-Cre: n=9, Emp3/Tie2-Cre: n=7) は一匹も死亡することなく、Emp3Tg/CAG-Cre で認められたような症状を発症することもなかった。

以上の結果は、DCM 様症状の発症に血球系細

胞が関与しないことを示唆するが、拡張型心筋症や小腸炎の発症に Cre 遺伝子の強制発現が重要であったことから LyzM-Cre や Tie-Cre マウスにおける Cre 遺伝子の発現量が少ないという可能性も無視できない。今後、血球系細胞の関与を明確にする為にも Emp3 Tg/CAG-Cre マウスの骨髄を用いた骨髄キメラマウスを用いた検討が更に必要となると考えられる。

3. Emp3 が制御する分子メカニズムの解明。:

Emp3 が TLR2 との会合分子として発見された経緯より、Emp3 KO および Emp3 Tg における TLR の分布や応答性を網羅的に解析した。その結果、Emp3 KO および Emp3 Tg マウスより得られた骨髄マクロファージ/樹状細胞では TLR1/2/4/5/6 の細胞表面発現に変化は認められなかった。同様に、TLR リガンドに対する免疫応答(サイトカイン産生、CD40 や CD86 の細胞表面発現上昇など)にも有意な差は全く認められなかった。以上の結果より Emp3 は TLR 会合分子ではあるが、TLR の細胞内分布や TLR により誘導される炎症応答の制御を担う分子ではないことが判明した。

しかしながら、昨今の研究より TLR には炎症を誘起する機能に加えてサーカディアンリズムや代謝を制御する機能があることも判明してきた。その為、Emp3 が炎症応答の制御以外の TLR 応答を制御している可能性は否定できない。そこで我々は TLR のシグナル伝達を担うアダプタータンパク質である MyD88 を欠損する Emp3 Tg/CAG-Cre/MyD88KO の作製を試みている。現状では作製途中であるが、同マウスにおける DCM 様症状の発症の有無を解析することで Emp3 による TLR の制御が Emp3 Tg/CAG-Cre におけるフェノタイプに関与するか否かが判明すると考えられる。

最後にモノクローナル抗体の作製に関して

だが、Balb/c に 6 回バッククロスを行った Emp3 KO マウスを用いて作製を試みたが、現在のところハイブリドーマの取得には至っていない。

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 3 件)

1. Shibata I, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. **International Immunology**, 査読有, 24 巻, 10 号, 2012, 613-23.

DOI: doi: 10.1093/intimm/dxs068

2. Tanji H, Ohto U, Shibata I, Miyake K, Shimizu T. Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. **Science**. 査読有, 339 巻, 2013, 1426-1429

DOI: 10.1126/science.1229159

3. Kanno A, Yamamoto C, Onji M, Fukui R, Saitoh SI, Motoi Y, Shibata I, Matsumoto F, Muta T, Miyake K. Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing. **International Immunology**, 査読有, first published online, 2013.

DOI: 10.1093/intimm/dxt007

[学会発表] (計 2 件)

1. Takuma Shibata, Naoki Takemura, Yuji Motoi, Satoshi Uematsu, Kensuke Miyake. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, 2012 October 23, Tokyo, Japan

2. Shibata Takuma, Takemura Naoki, Motoi Yuji, Goto Yoshiyuki, Uematsu Satoshi, Miyake Kensuke. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. 第 41 回日本免疫学会総会・学術集会、2012 年 12 月 6 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県

[図書] (計 1 件)

柴田 琢磨、三宅 健介
医学書院、「medicina」、2013 年、50 巻、3 号

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/kanseniden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 健介 (MIYAKE KENSUKE)

東京大学医科学研究所・教授

研究者番号：60229812

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

柴田 琢磨 (SHIBATA TAKUMA)

東京大学医科学研究所・特任助教

研究者番号：30554505