

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861714

研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流障害における炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of ischemic re-perfusion injury after myocardial infarction

研究代表者

木村 泰三 (KIMURA, Taizo)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：00636508

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)：心筋梗塞後の心筋障害と心室リモデリングによる心機能低下、生命予後の悪化が問題となっており、その機序の解明と治療法の開発が期待される。

本研究で、細胞外マトリクス分子テネイシンC欠損マウスでは心筋梗塞後慢性期の心機能低下が野生型と比較し抑制されることを示した。その機序として、テネイシンC欠損マウスでは野生型と比較して心筋梗塞後急性期の心筋梗塞部位で炎症促進性マクロファージの割合が少なく、炎症抑制性マクロファージの割合が多いことから、テネイシンCが心筋梗塞後炎症を促進し心室リモデリングを悪化させることが示唆された。

以上からテネイシンCが心筋梗塞における新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Left ventricular remodeling following myocardial infarction (MI) is a major cause of heart failure and have high concordance with long-term clinical outcomes. Thus, to investigate the mechanism of left ventricular remodeling after MI and prevent it is one of the important clinical issues. In this study, we showed that an extracellular matrix glycoprotein, Tenascin-C (TN-C) Knock-out mice had the better cardiac function than Wild type (WT) mice at chronic phase after myocardial infarction. And at acute phase after myocardial infarction, we showed that ratio of pro-inflammatory macrophage was significantly decreased and anti-inflammatory macrophage was significantly decreased in myocardial tissue of TN-C knock-out mice compared with WT mice.

These findings suggest, TN-C aggravates the deterioration of LV function due to Myocardial infarction in chronic phase partly through the promotion of inflammation at acute phase.

研究分野：循環器内科

キーワード：テネイシンC 心筋梗塞 心室リモデリング

1. 研究開始当初の背景

(1)心筋梗塞の急性期治療では、できるだけ短時間で冠動脈を再灌流させることが最も重要である。ところが急性期に経皮的冠動脈形成術を施行して冠動脈血流が回復しているにもかかわらず、約30%の症例で慢性期に心室拡大と心収縮の低下(心室リモデリング)を起こすことが経験され、虚血/再灌流障害が主な原因のひとつであると考えられている。心室リモデリング進行は患者の生命予後を大きく低下させるため、心筋梗塞による心筋虚血/再灌流障害の病態メカニズムを解明し、初期治療の段階でこれを抑制する治療法を開発することは、急性期診療において最も重要な課題の一つである。

(2)細胞外マトリクス分子の1つであるテネイシンC(TNC)は正常な成人心臓組織では発現しないが、心筋炎や心筋梗塞などの病的状態で一過性に発現し、急性期の血清TNC値が高い心筋梗塞患者は、慢性期に心室リモデリングをおこしやすく予後が悪い(Sato A. et al. JACC 2006)。TNCノックアウトマウスの冠動脈永久結紮による心筋梗塞モデルでは、野生型に比べ、慢性期の線維化が抑制され、心機能回復がよい(Nishioka T. et al, AJP 2009)ことから、梗塞後急性期のTNC発現増強が慢性期の心室リモデリングを促進させる可能性が示唆される。また、TNCは細胞増殖・遊走促進など多くの機能を持つが、最近、TLR4の内因性リガンドとして炎症反応を制御することが注目されている(Midwood K et al. Nature Med 2009)。

2. 研究の目的

以上の治験に基づき、TNCが心筋梗塞後虚血/再灌流後早期に発現し、炎症反応の制御に関わり、虚血/再灌流障害の発症・進展に重要な役割をはたすとの作業仮説をたてた。遺伝子改変マウスを用いて心筋虚血再灌流モデルを作製し、障害の鍵となる炎症の制御機構におけるTNCの役割を明らかにし、新たな治療ターゲットとしての可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

心筋虚血虚血/再灌流モデル作成において、心機能や心筋梗塞領域がマウス個体による差異が大きく、モデルの安定性が確信できなかったため、冠動脈結紮による、マウス心筋梗塞モデルを作成することとし解析した。

(1)野生型(Wild type: WT)マウスで心筋梗塞モデルを作製し、急性期のTNC発現および、その他サイトカインの経時的変化を確認する。
8-10週齢のオスC57BL6系WTマウスの左冠動脈を結紮、急性期に経時的(3, 5, 7日)に犠牲剖検して、心臓のパラフィン標本作製、蛋白およびRNAサンプルを抽出し、抗TN-C

抗体を用いた免疫組織染色、定量的RT-PCR法によるTN-C mRNA量の測定を行い、TNCの経時的発現と浸潤炎症細胞の発現パターンを比較する。

(2)TNC欠損(KO)マウスを用いた心筋梗塞モデルによるテネイシンCの役割の解明
TNC-KOマウスとWTマウス8-10週齢のオスで(1)と同様、心筋梗塞モデルを作製し、12週間の経過観察を行い以下の項目についてTN-CKOと野生型を比較する。

①慢性期における心室リモデリングの評価

- ・生存率(Kaplan-Meier生存曲線)
- ・心機能: Vevo2100を使用した心エコー法による左室径、駆出率の評価
- ・梗塞サイズ: 1, 2週間後に犠牲剖検してパラフィン標本作製し、心臓横断面のマツソントリクローム染色により評価

②急性期における細胞・分子生物学的解析: 心筋梗塞後の急性期(3, 5, 7日)で経時的に犠牲剖検し、以下の項目について、野生型と対比する。

- ・心筋へ浸潤した炎症性細胞の種類、程度をFACSで解析: 好中球(Ly6G)、M1マクロファージ(F4/80+CD206-), M2マクロファージ(F4/80+CD206+)
- ・心臓のパラフィン標本作製、蛋白およびRNAサンプルを抽出し、次の項目について検討する。①サイトカイン、ケモカイン: ICAM-1, VCAM-1, CCL2, P-セレクチン, IL-1B, IL-8, IL-10②プロテアーゼ: MMP-9, MMP-2 ③心不全マーカー(ANP, BNP) ④線維化関連遺伝子(コラーゲンI, コラーゲンIII, TGFβ)

(3)単離・培養細胞を用いたテネイシンCによる心筋梗塞後炎症病態における炎症細胞制御メカニズムの解明

a. マクロファージに対する外因性TNCの作用

: 骨髄から単離した単球に対して、マクロファージコロニー刺激因子(MSCF)で刺激を行いマクロファージに分化させ、精製全長TNCを添加して炎症性サイトカインについてTNC添加無し群と比較する。

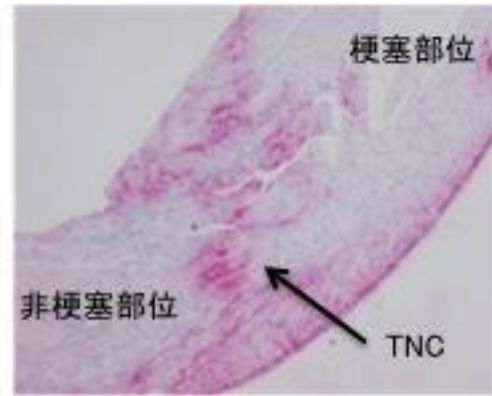
b. 受容体: TLR4がTNCの受容体であることを予想し、培養液中にTLR4中和抗体を加えTNCの作用が抑制されるか検討する。

4. 研究成果

(1)WTマウスにおける急性期のTNC発現とサイトカイン発現

①心筋梗塞後急性期にTN-Cは梗塞後5日をピークに発現が増強し、心筋梗塞部位と非梗塞部位のボーダーゾーンにその発現が局在していた(図1)。また、RT-PCR解析ではCCL2、MMP9発現は3日にピークがあり、col1発現は5日をピークに心臓に発現が増強していた。

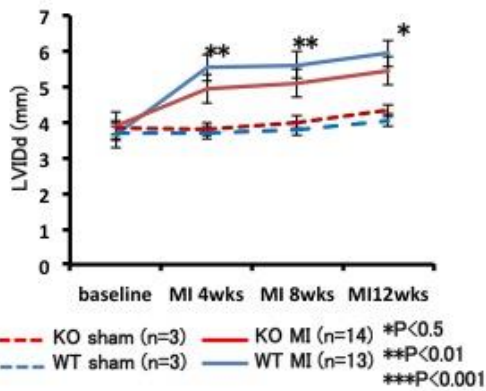
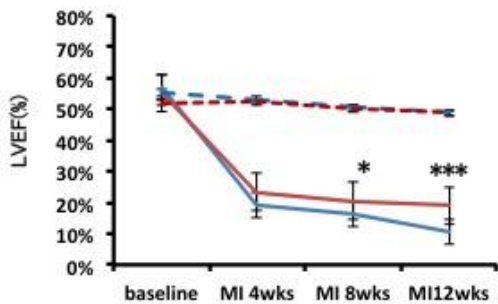
(図1)



(2) TN-C 欠損(KO)マウスを用いた心筋梗塞モデルによるテネイシンCの役割の解明

① 心筋梗塞3ヶ月後の慢性期においてTN-C KOマウスとWTマウスで生存率に有意な差は認めなかった(TN-C KO: 55.6%, WT: 48.3%)。また、心筋梗塞サイズも両群で有意差は認めなかった。一方で、心エコー測定では、TN-C KOマウスではWTマウスと比較して、3ヶ月にわたって有意に左室収縮率(Left ventricular ejection fraction: LVEF)が良く(TN-C KO: $19.02 \pm 6.31\%$, WT: $10.63 \pm 4.43\%$ $P < 0.001$)、左室拡張末期径(LV diastolic diameter: LVIDd)拡大も抑制されていた(図2)。

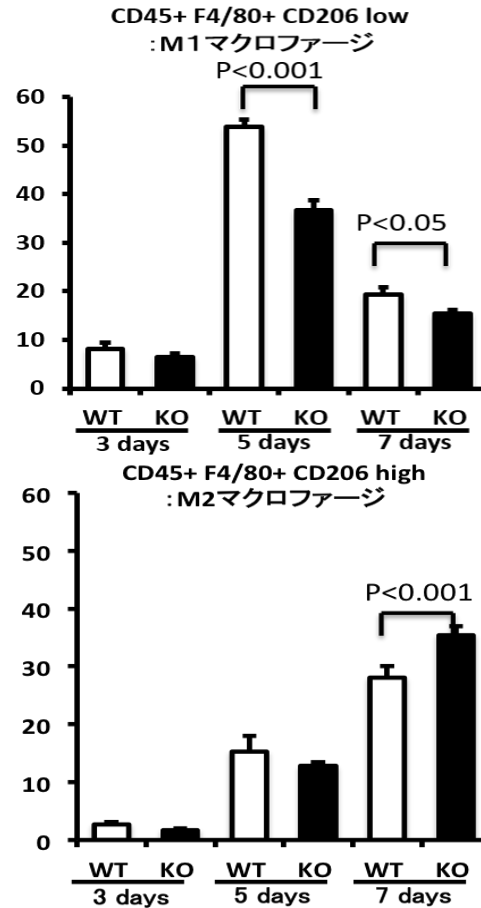
(図2)



②急性期における細胞・分子生物学的解析
FACS解析では、心筋梗塞後急性期にTN-C KOマウスでは、WTマウスと比較して、有意に炎

症促進性 M1マクロファージ (CD45+ F4/80+ CD206-) の割合が減少し、炎症抑制性 M2マクロファージ (CD45+ F4/80+ CD206+) の割合が増加していた(図3)。また、RT-PCR解析では、炎症抑制性サイトカインであるIL-10発現が、TN-C KOマウスで、野生型マウスと比較して増強していた。

(図3)



(3) 単離・培養細胞を用いたテネイシンCによる心筋梗塞後炎症病態における炎症細胞制御メカニズムの解明

野生型マウスより単球を単離し、MCSF刺激によりマクロファージに分化させTN-Cで刺激すると炎症促進性サイトカインであるIL-6の発現が、コントロールと比較して有意に亢進していた。

(4) 得られた成果の位置づけと今後の展望

TN-Cは心筋梗塞後急性期に発現し、TN-C欠損により、慢性期の心室リモデリングが抑制されていた。このメカニズムとして、TN-Cの欠損により、心筋梗塞後急性期の炎症促進性M1マクロファージが抑制され、炎症抑制性M2マクロファージが増強されることから、TN-Cは急性期のマクロファージフェノタイプの制御を介して梗塞後炎症を増強することで慢性期の心室リモデリングを増悪させ

ると考えられた。このような TN-C のマクロファージに対する作用は今まで報告されておらず、新しい知見であると考えられる。また、今後は心筋梗塞後急性期に TN-C をターゲットとして慢性期の心筋梗塞後リモデリングを改善させる治療の開発が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Taizo Kimura, A. Sato, Z. Wang, S. Sakai, K. Tajiri, M. Hiroe, K. Imanaka, T. Yoshida, K. Aonuma, Tenascin-C aggravates left ventricular remodeling in the remote myocardium after infarction in mice, 第30回国際心臓病学会日本部会, 2013年6月29日, San Diego (USA)
- ② Taizo Kimura, A. Sato, Z. Wang, S. Sakai, K. Tajiri, M. Hiroe, K. Imanaka, T. Yoshida, K. Aonuma, Tenascin-C promotes inflammatory response and aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice, A European Society of Cardiology Congress 2014, 2014年8月30日-9月3日, Barcelona (Spain)
- ③ Taizo Kimura, A. Sato, Z. Wang, S. Sakai, K. Tajiri, M. Hiroe, K. Imanaka, T. Yoshida, K. Aonuma, Tenascin-C modulates inflammatory response and aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice model, American Heart Associations Scientific Sessions 2014, 2014年11月15日-19日, Chicago (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 泰三 (KIMURA, Taizo)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：00636508

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：