

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860541

研究課題名(和文) 心筋梗塞後リモデリングにおけるマクロファージ転写因子MafBの機能解析

研究課題名(英文) Impact of macrophage transcription factor MafB on cardiac remodeling after myocardial infarction.

研究代表者

長谷川 寛真 (Hasegawa, Hiromasa)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20715396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞発症後の梗塞サイズの減少とリモデリング抑制に、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が関与している。転写因子MafBは単球・マクロファージの分化に重要な役割を果たす転写因子である。我々はマクロファージ特異的優性阻害DN-MafB遺伝子改変マウスを作成し、MafBの抑制がマクロファージのアポトーシス・貪食能に影響を与えることを明らかにした。DN-MafBマウスより採取したマクロファージと、shRNAを用いたMafB恒常的発現抑制マクロファージRAW264.7細胞を用いて、マクロファージの極性・アポトーシス・貪食能・サイトカイン発現に関して検討した。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor MafB is expressed only in monocytes and macrophages among hematopoietic cells, which plays a role in the terminal differentiation of macrophages. MafB knockout mice die immediately after birth due to developmental anomalies of neurons in the respiratory center. We generated transgenic mice that express dominant negative (DN) MafB capable of suppressing endogenous MafB transcription activity only in macrophages. MafB inhibition promotes macrophage apoptosis. Macrophage apoptosis plays a role in cardiac remodeling after myocardial infarction. We investigated macrophage apoptosis, efferocytosis, cytokine production and macrophage polarization using peritoneal macrophages of DN-MafB mice and MafB knockdown RAW264.7 cells. MafB inhibition promotes macrophage polarization to M1 and secretion of various inflammatory cytokines which cause inflammation and tissue disruptive reaction. There was no difference in efferocytosis between DN-MafB and wild type macrophages.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マクロファージ 心筋梗塞 リモデリング 転写因子MafB

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因において心疾患が占める割合は年々増加しており、平成 23 年の人口動態統計によれば全死因の第 2 位に位置する。心疾患全体の内、22%を急性心筋梗塞が占め、日本人の死因における急性心筋梗塞の重要性は明らかである。

心筋梗塞後のリモデリングは、梗塞後 72 時間以内に生じる early remodeling と、それ以降の late remodeling に大別される (Circulation 2000;101:2981-2988)。early remodeling では、時間単位で生じる壊死組織の拡大により、壁の菲薄化と左室拡大が生じる。これは wall stress の増大と mechanical stretch を来し、やがて残存心筋の肥大へと影響する。late remodeling においては、TGF- (transforming growth factor) を中心としたサイトカインや renin-angiotensin-aldosterone system の影響により fibrosis が生じ、壊死組織の修復が行われる。この remodeling は、destending force が collagen scar による tensile strength と拮抗するまで数週から数カ月持続する。remodeling は本来 mechanical stretch に対する防衛反応であるが、過度な remodeling は左室の拡大・収縮能低下を招き、心不全発症の原因となる。急性心筋梗塞を発症すると、閉塞した責任冠動脈の灌流域に存在する心筋組織は、酸素・エネルギー源の枯渇によりやがて壊死を来す。心筋細胞のネクローシスは炎症反応を惹起し、MCP-1 (monocyte chemotacting protein-1) などの走化性因子が放出される。これに反応した単球が障害組織へ侵入し、M-CSF (macrophage colony stimulating factor) などの刺激によりマクロファージへと形質転換される。マクロファージは、各種サイトカインや MMP (matrix metalloprotease) の放出、壊死細胞の貪食除去、血管新生、線維芽細胞の活性化を通

じて、心筋梗塞後リモデリングに大きな影響を及ぼしていることが知られている (Int J Cardiol 2008;130:147-158)。梗塞組織において、マクロファージはアポトーシス・ネクローシスを来した細胞の貪食を行うが、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食が、梗塞サイズの減少とリモデリング抑制に関与していることを示唆する報告がある (Circ Res 2013;113:1004-1012)。また、薬剤によるマクロファージの depletion が、心筋梗塞後の治癒過程を障害し、梗塞後リモデリングを増加させたとの報告がある (Am J Pathol 2007;170:818-829)。

マクロファージは、その性質により classical (M1) と alternative (M2) に大別されるが、梗塞巣における初期の炎症反応と細胞外マトリックスの破壊に関与するのは、M1 マクロファージである。M1 マクロファージは、TNF- (tumor necrosis factor-) を中心とした炎症性サイトカインの産生により、梗塞部での炎症反応を増大させる。このマクロファージによる炎症反応は組織修復に重要な役割を果たしていると考えられている。梗塞後心筋に活性化マクロファージを注入したところ、リモデリングが抑制されたとの報告がある (Circulation 2006;114:194-100)。また、主として M1 マクロファージにより分泌される MMP は、血管基底膜と細胞外マトリックスの分解により、梗塞巣での血管新生を促進する。マクロファージが分泌する各種 MMP の内、特に MMP-9 が梗塞後リモデリングに関係すると言われている。MMP-9 を欠損させたマウスでは、梗塞後の左室拡大とコラーゲン集積が抑制されたとの報告がある (J Clin Invest 2000;106:55-62)。

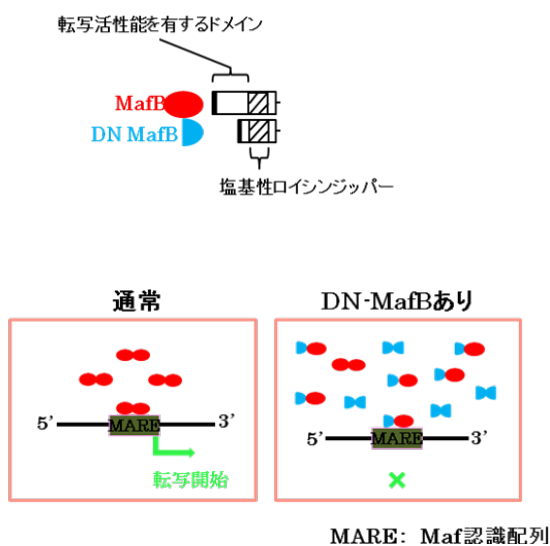
一方、M2 マクロファージも、細胞外マトリックスの再構築・細胞増殖及び血管新生に関与し、梗塞後リモデリングへの影響が示

唆されている。マクロファージから分泌される TGF- β は、線維芽細胞を活性化し、collagen 分泌から scar formation に関与する。

転写因子 MafB は、大 Maf タンパクに属する転写因子の一つである。塩基性ロイシンジッパー構造を C 末端に有し、Maf 群認識配列を介して DNA に結合する。MafB は造血システムにおいて、マクロファージとその前駆体細胞に特異的に発現し、マクロファージへの分化に関与している (EMBO J 2000;9:1987-1997)。

当教室では、マクロファージ特異的に MafB の機能を抑制したマウスモデルを作成した (PLoS One 2013;8:e73963)。MafB 欠損マウスは後脳の発達障害により、生後間もなく無呼吸で死亡することが知られており (Nat Neurosci 2003;6:1091-1100)、全身の遺伝子改変を行った場合は致死的となると考えられる。当教室にて作成したマウスモデルでは、マクロファージスカベンジャーレセプターエンハンサープロモーターの制御下に、マクロファージ特異的に dominant negative (DN) -MafB を発現している。DN-MafB は、転写活性を有するドメインを欠如しており、通常の MafB と DN-MafB が転写活性を持たないヘテロダイマーを形成することによって、MafB の転写活性を抑制している。同マウスの解析において、DN-MafB マウスのマクロファージでは形態学的かつ表面マーカーの発現においても、littermate の WT (wild type) マウスと異なることが示されている。また、マクロファージのアポトーシスが增加し、貪食能が低下していることが示されている。さらに当教室では、MafB 過剰発現マクロファージでは細胞生存性が増加し、タバコ抽出物による酸化ストレス刺激に対してアポトーシスが抑制されることも報告している (Am J Respir Cell Mol Biol

2007;36:418-426)。MafB は、酸化ストレスによるマクロファージのアポトーシスに対して抑制的に働いていると考えられる。酸化ストレスの豊富な環境である梗塞後心筋において、MafB はマクロファージのアポトーシスを通じて梗塞後リモデリングの過程に影響を与えている可能性が考えられる。また、MafB の抑制が、貪食能やマクロファージの極性、各種サイトカインや MMP の発現に影響し、梗塞後リモデリングに変化を来す可能性も想定される。



MARE: Maf認識配列

2. 研究の目的

当研究の目的は、心筋梗塞後のリモデリングにおける、マクロファージ転写因子 MafB の機能を明らかにすることである。DN-MafB マウスと littermate WT マウスに対し、冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成し、梗塞サイズとその後のリモデリングの程度を比較検討する。また、それに伴う慢性期の心機能と生命予後が変化するのかを検討する。in vitro では、MafB を抑制したマクロファージにおいて、その極性やアポトーシス、貪食能や各種サイトカイン・MMP 発現に違いがないか検討する。

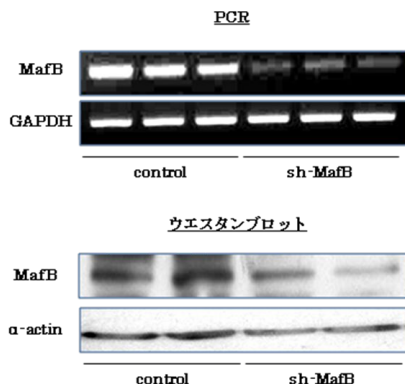
3. 研究の方法

MafB が心筋梗塞後リモデリングに関与するかを、in vivo において検討する。また、MafB を抑制したマクロファージを用いた

in vitro 研究により、梗塞後リモデリングに
関与する MafB の機能を明らかにする。

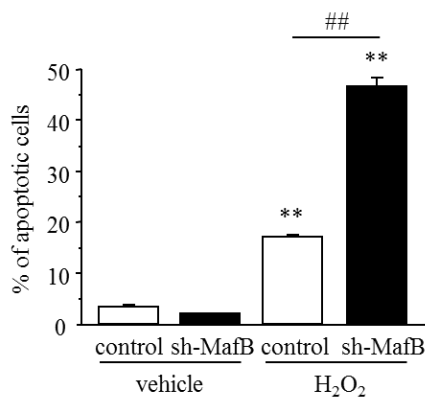
DN-MafB マウスに心筋梗塞を作成し、梗
塞サイズとその後のリモデリングの程度を
心エコー・組織学的評価により比較検討す
る。また、それに伴う慢性期の心機能と生
命予後が変化するかを検討する。さらに、
心筋細胞と梗塞巣に浸潤したマクロファ
ージのアポトーシスを解析する。

DN-MafB マウスより採取したマクロフ
ァージと、shRNA を用いた MafB 恒常的発現
抑制 RAW264.7 細胞を用いて、マクロファ
ージの極性・アポトーシス・貪食能・サイ
トカイン発現に関して検討する。

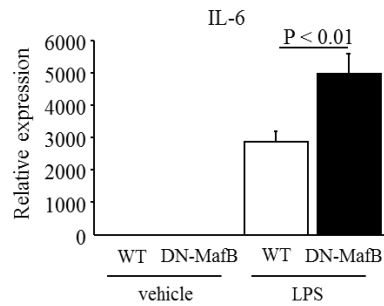
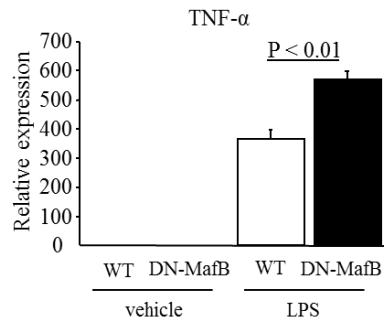


4. 研究成果

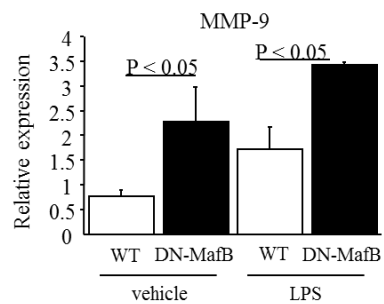
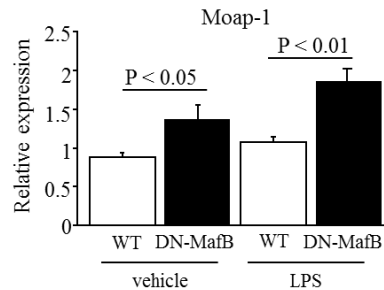
MafB を発現抑制させた sh-MafB マクロフ
ァージで、コントロールに比べて、過酸化水
素 (H₂O₂) 投与により有意にアポトーシス
が多かった。心筋梗塞巣では、酸化スト
レスが過剰であり、マクロファージのアポ
トーシスが増加している可能性がある。



M1 マクロファージ誘導刺激として LPS 投与を
行うと、DN-MafB 由来腹腔マクロファージで
は、TNF と IL-6 の発現が有意に高かった。



modulator of apoptosis 1 (Moap-1) と
MMP-9 の発現は、無刺激で既に DN-MafB で
WT より高く、LPS 投与でさらに有意に増加
が見られた。



DN-MafB マウスでは、心筋梗塞後の左室リ
モデリングが増悪する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Hasegawa H, Watanabe T, Kato S, Toshima T, Yokoyama M, Aida Y, Nishiwaki M, Kadowaki S, Narumi T, Honda Y, Otaki Y, Honda S, Shunsuke N, Funayama A, Nishiyama S,

- Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Abe S, Shibata Y, Kubota I. The role of macrophage transcription factor MafB in atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis* 2016; 250: 133-143. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.021. 査読・有
2. Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Funayama A, Netsu S, Honda Y, Narumi T, Kadowaki S, Hasegawa H, Honda S, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kamata H, Nakajima O, Kubota I. HECT-Type Ubiquitin E3 Ligase ITCH Interacts With Thioredoxin-Interacting Protein and Ameliorates Reactive Oxygen Species-Induced Cardiotoxicity. *J Am Heart Assoc.* 2016; Jan 21;5(1). pii: e002485. 査読・有 doi:10.1161/JAHA.115.002485.
 3. Narumi T, Shishido T, Otaki Y, Kadowaki S, Honda Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Kinoshita D, Yokoyama M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Tanaka A, Woo CH, Abe J, Takeishi Y, Kubota I. High-mobility group box 1-mediated heat shock protein beta 1 expression attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 82: 1-12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.018. 査読・有
 4. Ishino M, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Funayama A, Netsu S, Hasegawa H, Honda S, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. Deficiency of Long Pentraxin PTX3 Promoted Neointimal Hyperplasia after Vascular Injury. *J Atheroscler Thromb.* 2015; 22(4) :372-8. doi:10.5551/jat.26740. 査読・有
 5. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyashita T, Kubota I. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(2): 270-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302610. 査読・有
 6. Otaki Y, Takahashi H, Watanabe T, Kadowaki S, Narumi T, Honda Y, Hasegawa H, Honda S, Funayama A, Nishiyama S, Arimoto T, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Kubota I. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy Cornell product is a feasible predictor of cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2014 Apr;103(4):275-84. doi: 10.1007/s00392-013-0646-2. 査読・有
- 〔学会発表〕(計 1件)
 石垣大輔，西山悟史，宍戸哲郎，橋本直明，安藤薫，山浦玄斎，長谷川寛真，舟山哲，本田晋太郎，佐々木真太郎，岩山忠輝，有本貴範，高橋大，宮本卓也，渡邊哲，久保田功：二枝同時閉塞による急性心筋梗塞の一例．第 158 回日本循環器学会東北地方会．2014.06.07 岩手医科大学附属循環器医療センター（岩手県盛岡市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 寛真 (HASEGAWA, Hiromasa)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20715396