

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670757

研究課題名(和文) 心筋梗塞の病態形成における好中球細胞外捕捉(NETs)の役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of myocardial infarction

研究代表者

本間 覚(HOMMA, SATOSHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00302422

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)：好中球は貪食以外に、細胞死による核酸と抗菌タンパクを構成内容とする網目状の捕捉構造を形成し(好中球細胞外トラップneutrophil extracellular traps: NETs)、細菌を捕捉・除去する。一方、急性心筋梗塞(AMI)といった非感染性炎症におけるNETsの役割は不明である。NETs形成障害を呈する好中球エラスターゼ欠損マウス(KO)にAMIを作製し、炎症反応を検討した。KOでは心臓破裂による死亡が有意に減少し、生存率は有意に高かった。KOのサイトカイン発現は抗炎症性であった。以上より、NETsの存在はAMI急性期では炎症促進性に働き病態悪化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil forms neutrophil extracellular traps (NETs), in which bacteria is effectively trapped and eliminated. The role of NETs in the pathogenesis of acute myocardial infarction (AMI), a representative of non-infectious inflammation, is unclear. We analyzed the inflammatory responses induced by AMI in neutrophil elastase gene knockout mice (KO), in which NETs formation is impaired. KO showed the reduced death due to cardiac rupture and higher survival. The profile of cytokine alteration showed the anti-inflammatory responses. Therefore, the presence of NETs is suggested to be pro-inflammatory and to promote the pathogenesis of AMI.

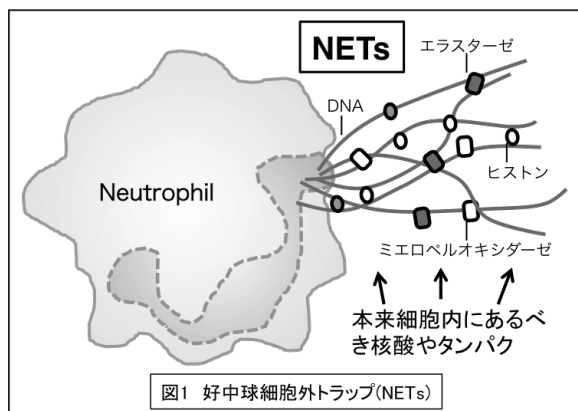
研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋梗塞 好中球細胞外トラップ 好中球エラスターゼ

1. 研究開始当初の背景

好中球は、生体が細菌などに感染した際、感染局所にいち早く集積して感染源を除去する、感染防御の最前線で機能する免疫細胞である。これまで好中球は、食食と活性酸素の放出により細菌を不活化すると考えられてきた。最近これらの他に、好中球は、自ら細胞死を引き起こし自身の核酸と抗菌タンパクを構成内容とする好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps : NETs、図1) とよばれる網目状の捕捉構造を形成し、細菌を効率よく捕捉・除去するということが明らかにされてきている (*Science* 2004)。急性心筋梗塞 (AMI) では、梗塞に伴う炎症反応が過度である場合、その後に病的な心室リモデリングを引き起こし、生命予後の悪化をもたらす。好中球は、AMI の最も初期に梗塞部位に出現する細胞であり、AMI の病態形成に重要な役割を果たしていると推測されるが、この時に NETs が生じ死滅細胞除去に働いているかは明らかにされていない。

一方、NETs では本来細胞内にあるべき成分 (好中球細胞内の核酸・タンパク・プロテアーゼ等) を細胞外に放出するため、それ自身が自然免疫系に対するリガンドおよび組織破壊酵素として作用し、炎症反応を増強させている可能性が考えられる。しかしながら、AMI も含め好中球が集積する非感染性炎症における NETs の役割については、不明な点が多い。



2. 研究の目的

NETs の形成が心筋梗塞後の炎症やリモデリングに及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

好中球エラスターゼは好中球内でヒストンを分解し、クロマチン凝集を促進することで NETs 産生に重要な働きを示し、好中球エラスターゼ欠損マウス (Elane 遺伝子欠損マウス) は NETs を産生しないことが報告されている (*J Cell Biol* 2010)。この NETs 形成不全マウスと野生型マウスに人工呼吸管理下に左冠動脈の結紮による心筋梗塞モデルを作製し、NETs の形成が心筋梗塞後の炎症やリモデリングに及ぼす影響について明らかにした。また、エラスターゼ阻害薬を用い、

薬理的にエラスターゼを阻害した場合の心筋梗塞後の炎症やリモデリングに及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

Elane 遺伝子欠損マウスと野生型マウスに左冠動脈結紮による心筋梗塞を作製した。Elane 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ心臓破裂による死亡が有意に少なく、生存率が有意に高かった。またエラスターゼ阻害剤による効果も検討したが、エラスターゼ阻害剤投与群は生食投与群と比較して高い生存率を示した。

心機能を心エコー図検査と心臓カテーテル検査にて評価した。Elane 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比べて心筋梗塞作製2週間後の心収縮力が有意に保たれており、心臓の拡大も抑制されていた。

心筋梗塞部位のサイトカインやケモカインの産生量を測定したところ、心筋梗塞4日後において、Elane 遺伝子欠損マウスではインターロイキン6の産生が減少し、KC、RANTESといったケモカインの発現が有意に減少していた。一方抗炎症性サイトカインであるインターロイキン10の産生が増加していることがわかった。

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 7件)

1. Kazuko Tajiri, Nobutake Shimojo, Satoshi Sakai, Tomoko Machino-Ohtsuka, Kyoko Imanaka-Yoshida, Michiaki Hiroe, Yusuke Tsujimura, Taizo Kimura, Akira Sato, Yasuhiro Yasutomi, Kazutaka Aonuma. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Oct 1; 27(5):413-424.
2. Wang Z, Sato A, Akiyama D, Kimura T, Tajiri K, Hoshi T, Sakai S, Koike A, Miyauchi T, Aonuma K. Clinical value of plasma pentraxin 3 levels for predicting cardiac troponin elevation after percutaneous coronary intervention. *Life Sci.* 2014 Jan 24;95(1):40-4.
3. Kazuko Tajiri, Satoshi Sakai, Taizo Kimura, Tomoko Machino-Ohtsuka, Nobuyuki Murakoshi, Dongzhu Xu, Zheng Wang, Akira Sato, Takashi Miyauchi, Kazutaka Aonuma. Endothelin receptor antagonist exacerbates autoimmune myocarditis in mice. *Life Sciences* 118 (2014), pp. 288-296. featured in *Global Medical Discovery* [ISSN

- 1929-8536 2014/06/07]
4. Sakai S, Shimojo N, Kimura T, Tajiri K, Maruyama H, Homma S, Kuga K, Mizutani T, Aonuma K, Miyauchi T. Involvement of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in the inhibitory effect of fluvastatin on endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Life Sci.* 2014 May 2;102(2):98-104
 5. Tomoko Machino-Ohtsuka, MD; Kazuko Tajiri, MD, PhD; Taizo Kimura, MD, PhD; Satoshi Sakai, MD, PhD; Akira Sato, MD, PhD; Toshimichi Yoshida, MD, PhD; Michiaki Hiroe, MD, PhD; Yasuhiro Yasutomi, DVM, PhD; Kazutaka Aonuma, MD, PhD; Kyoko Imanaka-Yoshida, MD, PhD, Tenascin-C Aggravates Autoimmune Myocarditis via Dendritic Cell Activation and Th17 Cell Differentiation. *J Am Heart Assoc.* 2014 Nov 5;3(6). pii: e001052. doi: 10.1161/JAHA.114.001052.
 6. Kazuko Tajiri, MD, PhD; Akira Sato, MD; Tomoya Hoshi, MD; Taizo Kimura, MD, PhD; Yoshitsugu Nakagawa, PhD; Satoshi Sakai, MD, PhD; Kazutaka Aonuma, MD, PhD; Shigeyuki Watanabe, MD, PhD. Mechanisms explaining the late "catch-up" phenomenon after sirolimus-eluting stent implantation. *Int J Cardiol* 2014; 177: 44-45
 7. Kazuko Tajiri, Akira Sato, Tomohiko Harunari, Nobutake Shimojo, Iwao Yamaguchi, Kazutaka Aonuma. Impact of rivaroxaban compared with warfarin on the coagulation status in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation: a preliminary analysis of the prothrombin fragment 1+2 levels. *J Cardiol* 2015;65:191-196

[学会発表] (計 15 件)

1. Kazuko Tajiri, Nobutake Shimojo, Satoshi Sakai, Tomoko Machino-Ohtsuka, Kazutaka Aonuma; Statins regulate Th1/Th17 differentiation and ameliorate autoimmune myocarditis. ISHR XXI World Congress, 2013.6.30-7.4, San Diego, California, USA
2. Kazuko Tajiri, Satoshi Sakai, Taizo Kimura, Tomoko Ohtsuka-Machino, Zheng Wang, Akira Sato, Takashi Miyauchi, Kazutaka Aonuma; Endothelin receptor antagonist exacerbates autoimmune myocarditis in mice. International Conference on Endothelin (ET-13), 2013.9.8-11, Tokyo

3. Tomoko Machino-Ohtsuka, Kazuko Tajiri, Yasuhiro Yasutomi, Michiaki Hiroe, Kazutaka Aonuma, Kyoko Imanaka-Yoshida. Tenascin-C is an endogenous immunoactivator of experimental autoimmune myocarditis in mice. 第30回国際心臓研究会 (ISHR) 日本部会. 2013.7.28 サンディエゴ (アメリカ)
4. 町野智子、田尻和子、木村泰三、廣江道昭、青沼和隆、今中恭子. 自己免疫性心筋炎におけるテネイシンCの機能解析. 第1回Matricellフォーラム 2013.9.7. 三重大学
5. Tomoko Machino-Ohtsuka, Kazuko Tajiri, Kyoko Imanaka-Yoshida, Michiaki Hiroe, Yasuhiro Yasutomi, Kazutaka Aonuma. Tenascin-C aggravates myocardial inflammation in experimental autoimmune myocarditis in mice. 第42回日本免疫学会学術集会. 2013.12.12. 幕張メッセ (千葉)
6. Kazuko Tajiri, Akira Sato, Tomoya Hoshi, Taizo Kimura, Yoshihiro Seo, Noriyuki Takeyasu, Satoshi Sakai, Shigeyuki Watanabe, Kazutaka Aonuma. Evaluation of the Neointima Following Bare-metal, Sirolimus- and Everolimus-eluting Stents Implantation by Optical Coherence Tomography and Histology in Rabbits. 第78回日本循環器学会学術集会、2014.3.21-23, 東京
7. K. Tajiri, S. Sakai, T. Kimura, T. Machino-Ohtsuka, N. Murakoshi, D. Xu, Z. Wang, A. Sato, T. Miyauchi, K. Aonuma. The role of endothelin in the myocardial inflammation: experimental studies using the endothelin antagonist SB209670. ESC congress 2014, 2014.8.30-9.3, Barcelona, Spain
8. Kazuko Tajiri, Akira Sato, Tomoya Hoshi, Taizo Kimura, Kyouichi Chijimi, Yoshihiro Seo, Satoshi Sakai, Kazutaka Aonuma, Shigeyuki Watanabe. Characteristics of vascular responses to drug eluting stents in rabbits: evaluated by optical coherence tomography and gene expression analyses. ESC congress 2014, 2014.8.30-9.3, Barcelona, Spain
9. K. Kuroki, N. Murakoshi, D. Xu, K. Tajiri, M. Igarashi, T. Machino, Y. Yui, Y. Sekiguchi, A. Nogami, K. Aonuma. Inhibitory effects of prednisolone on the recurrence after atrial fibrillation ablation in a rat

- model. ESC congress 2014, 2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain
10. T. 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. ESC congress 2014, 2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain
 11. 田尻和子、町野智子、木村泰三、酒井俊、佐藤明、吉田利通、廣江道昭、保富康宏、青沼和隆、今中（吉田）恭子。テネイシン C による抗原提示細胞の活性化と自己免疫性心筋炎への関与。第二回 MatriCell フォーラム、2014. 9. 6-7（東京）
 12. Kazuko Tajiri, Nobutake Shimojo, Satoshi Sakai, Tomoko Machino-Ohtsuka, Kyoko Imanaka-Yoshida, Michiaki Hiroe, Taizo Kimura, Akira Sato, Kazutaka Aonuma. Pitavastatin Regulates mTOR Complex 1 Signaling Through Inhibition of Rheb in T Cells. American Heart Association Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, IL, USA
 13. Kazuko Tajiri, Akira Sato, Tomoya Hoshi, Taizo Kimura, Kyouichi Chijimi, Yoshihiro Seo, Satoshi Sakai, Michiaki Hiroe, Kazutaka Aonuma, Shigeyuki Watanabe. Vascular Healing in Drug-Eluting Stents: Differential Response of Limus-Eluting Stents in a Preclinical Model of Stent Implantation. American Heart Association Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, IL, USA
 14. K. Tajiri, S. Sakai, T. Kimura, T. Machino-Ohtsuka, N. Murakoshi, D. Xu, A. Sato, T. Miyauchi, K. Aonuma. Protective role of endothelin in myocardial inflammation: experimental studies using an endothelin antagonist SB209670. 第79回日本循環器学会学術集会、2015. 4. 24-26、大阪
 15. 田尻和子。慢性炎症性疾患としての拡張型心筋症。遺伝子組み換え BCG システムを用いた新たなマウスモデルの確立。第104回日本病理学会総会、2015. 5. 1、名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔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：
出願年月日：
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

本間 覚 (HOMMA, Satoshi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00302422

(2) 研究分担者

酒井 俊 (SAKAI, Satoshi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30282362
田尻 和子 (TAJIRI, Kazuko)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：60633914
木村 泰三 (KIMURA, Taizo)
筑波大学附属病院・病院講師
研究者番号：00636508

(3) 連携研究者

()

研究者番号：