

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 5 月 8 日現在

機関番号 : 1 2 1 0 2

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2013 ~ 2014

課題番号 : 2 5 8 6 0 5 8 1

研究課題名 (和文) 心筋炎発症機序におけるテネイシンCの分子機能の解析

研究課題名 (英文) The pathological role of Tenascin-C in the development of myocarditis

研究代表者

田尻 和子 (Tajiri, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 6 0 6 3 3 9 1 4

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) : テネイシンC (TNC) は典型的なmatricellular蛋白で、活動性炎症に伴って一過性に発現し、その発現レベルは心筋炎/心筋症の疾患活動性と相関する。TNC 欠損マウスは心筋炎が軽微であり、心筋に浸潤するTh17の減少、Tregの増加を認め、T細胞の分化にTNCが影響を及ぼしていると示唆された。樹状細胞にTNCを添加すると、Th17への分化に必要なIL-6産生の増加を認め、ナイーブT細胞からTh17への分化を促進しTregへの分化を阻害した。またこれらはTLR4シグナルの阻害によりキャンセルされたため、TLR4シグナルを介したTNC刺激が樹状細胞からのIL-6産生を促していると示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Tenascin-C (TNC), an extracellular matrix glycoprotein is sparse in the normal adult heart. TNC expresses under pathological conditions, and is closely associated with tissue injury and inflammation. However, the pathophysiological role of TNC in the development of myocarditis is not clear. We examined how TNC affects the initiation of experimental autoimmune myocarditis, immunologically. We found that TNC-KO mice were protected from severe myocarditis compared to WT mice. TNC induced synthesis of IL-6 in dendritic cells (DCs) via activation of a TLR4, which led to Th17 cell differentiation and exacerbated the myocardial inflammation. In the transfer experiment, DCs loaded with cardiac myosin peptide acquired the functional capacity to induce myocarditis when stimulated with TNC; however, TNC-stimulated DCs generated from TLR4-KO mice did not induce myocarditis in recipients. Thus, TNC aggravates autoimmune myocarditis by driving the DC activation and Th17 differentiation via TLR4.

研究分野 : 循環器内科学

キーワード : 心筋炎 Matricellular蛋白 テネイシンC 心筋症 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞-マトリックス相互作用のメディエーターとして機能する特別な細胞外マトリックス分子として、**matricellular** 蛋白の存在が注目されている。代表的な **matricellular** 蛋白であるテネイシン C (TN-C) は、正常な心臓には発現せず、活動性炎症に伴って一過性に発現するという性質を持つ。心筋炎マウスモデルでは、病変初期から障害心筋細胞の周囲に沈着し、活動性炎症が持続する限りテネイシン C の発現も持続する。線維化癒痕巣を形成する治癒期には消失し、その発現レベルは炎症の程度と強い相関を示す。ヒト急性心筋炎でも同様に、発症後 1 週間以内の急性期に生検や剖検で得られた心筋組織の間質には TN-C の強い沈着が見られるが、炎症治癒によって漸減することが報告されている (引用文献①)。このように、TN-C は心筋の炎症に伴って発現し、炎症が消退すると発現が消失するという特徴的な発現様式を示す **matricellular** 蛋白であるが、詳細な分子機能は未だ明らかになっていない。

申請者は予備的実験において、TN-C ノックアウトマウスに心筋ミオシン蛋白を投与して実験的自己免疫性心筋炎を誘導したところ、野生型マウスに比べて炎症の程度が軽いことを見いだした。この結果からも、TN-C が心筋炎の発症と進展に対して何らかの生理作用を有している事が推測される。

最近、関節炎の研究において、TN-C は Toll 様受容体 (TLR) 4 や $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンを介して、樹状細胞やマクロファージ等の自然免疫系細胞を活性化し、関節炎を悪化させるという興味深い報告がなされている (引用文献②③)。ヒトの心筋炎における自然免疫の役割は未だ不明な点が多いが、申請者はこれまでに、実験的自己免疫性心筋炎マウスモデルにおいて、樹状細胞の活性化が心筋炎の発症と進展に重要である事を報告している (引用文献④)。これらの研究結果より、TN-C は樹状細胞の活性化因子の一つとして、心筋炎の発症と進展に重要な役割を担っていると予想し、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

マウス自己免疫性心筋炎モデルを用いて TNC による炎症の制御メカニズムを明らかにすること。

3. 研究の方法

- ① 野生型マウスに心筋ミオシン分画を皮下注射し EAM マウスを作製した。3~39 日目まで約 3 日おきに犠牲剖検し、心臓パラフィン標本作製、蛋白及び RNA サンプルを抽出し心筋炎の重症度や炎症に伴う心筋内での TN-C 発現を評価した。
- ② TN-C 欠損マウスを用い上記と同様の方法で EAM を誘導後、最も炎症の強い 14 日目において圧センサーによる左室内血行指標を測定、その後に犠牲剖検し、野生

型マウスと心筋炎の罹患率、程度や心筋に含まれる炎症性サイトカインやケモカイン、浸潤炎症細胞の量を組織学的に、また ELISA 法及びフローサイトメトリー法で比較検討した。

- ③ 樹状細胞(dendritic cell; DC)は TN-C の標的細胞の一つであることが過去に報告されているため、次に骨髓細胞から誘導した DC に TN-C を作用させ、その効果について検討した。
- ④ DC における TN-C のレセプターの一つとして TLR4 が過去に報告されているため、TLR4 を介する経路を阻害することにより TN-C の作用が減弱するかを検討した。
- ⑤ 活性化した DC を移入することで心筋炎を起こす、別種の EAM モデルを用い、TLR4 を介して TN-C により活性化されたミオシン感作 DC が心筋炎を誘導し得るか、また TLR4 がない状態(TLR4 欠損マウス)では上記の TN-C の作用が消失するかについて検討した。

4. 研究成果

- ① 野生型マウスでは、誘導した EAM 誘導 12 日後から心筋 H&E 染色切片において炎症細胞浸潤を伴う心筋炎の所見が認められ、抗 TN-C 免疫組織染色では炎症細胞周囲に強く TN-C の発現を認めた。ELISA 法による心臓組織中の TN-C 濃度は感作 14 日後にピークを迎えた後は徐々に減少、感作後 30 日頃にはほとんど検出されなくなり、組織所見と合致した (図 1)。

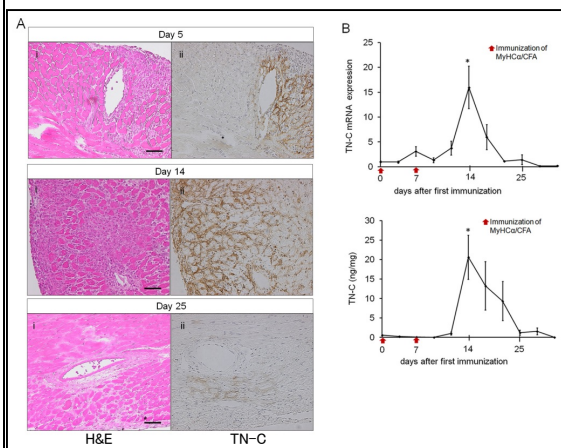


図 1 心筋炎と TN-C の発現

- ② 組織学的半定量評価では、TN-C 欠損マウスの方が野生型より心筋の炎症が軽微であった (図 2)。TN-C 欠損マウスの方が野生型より心体重比増加が抑制され、血清トロポニン I 濃度は低値であり、心臓局所の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-17, IL-1 α 等) 及びケモカイン産生が抑制されていた。また TN-C 欠損マウスでは野生型と比較して、全白血球、CD4 陽性細胞、Th17 細胞の心筋内への浸潤が減少していた。また心筋炎誘導後の野生型マウスでは左室機能の指標である、左室内圧最大及

び最少変化率 ($\pm dP/dt$) が減少していたのに対し、TN-C 欠損マウスでは、心筋炎誘導による有意な心機能の増悪は認められなかった。これらの所見を総合すると、TN-C 欠損により EAM モデルにおける心筋の炎症やそれに伴う機能障害は軽減することが明らかとなった。

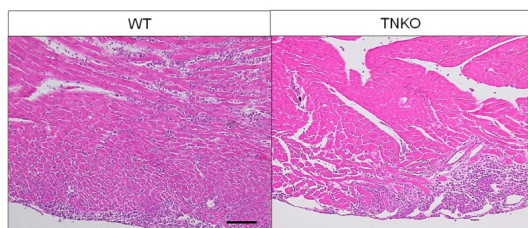


図 2 TN-C 欠損により心筋炎が軽減する

- ③ 濃度を変えた TN-C の存在下で DC を培養し、48 時間後の IL-6 の産生を ELISA 法で測定すると、TN-C 濃度依存性に IL-6 の産生が増加していた。IL-6 は naïve CD4 陽性細胞が Th17 へ分化するための鍵となるサイトカインであるが、DC と naïve CD4 陽性細胞を TN-C 刺激下で 72 時間共培養すると、培養上清中の IL-17 濃度は増加しており TN-C が naïve CD4 陽性細胞の Th17 への分化を促進していることが示唆された。また培養液中に抗 IL-6 抗体を加えると IL-17 濃度の増加は認められなくなり、TN-C は DC を活性化して IL-6 産生を促進することにより、naïve CD4 陽性細胞の Th17 への分化を誘導していると考えられた。
- ④ 野生型マウス骨髄から樹立した DC を TLR4 阻害剤で前処理した後に TN-C 刺激を加えると、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生増加は認められなくなった。また、TLR4 ノックアウトマウスの骨髄から樹立した DC に TN-C 刺激を加えても同様の結果であった。以上より、TN-C は TLR4 を介した経路により DC の活性化に関わっていることが確認された。
- ⑤ 野生型マウスから樹立したミオシン感作 DC を LPS で刺激し、他の naïve 野生型マウスに腹腔内投与すると全例(7/7)で心筋炎が誘導できることを確認した (PBS 刺激では心筋炎は起こらなかった)。次に TN-C 刺激により活性化した DC を同様に移入すると LPS 刺激時とほぼ同程度の頻度、重症度で心筋炎が誘導された。しかし、TLR4 欠損マウス由来の DC を TN-C 刺激を加えた後、他の野生型マウスに移入すると心筋炎は高度に抑制されており、TLR4 経路の消失により、TN-C 刺激が DC に心筋炎誘導能を獲得させる効果は著明に減弱することが明らかとなった。

<考察>

自己免疫性心筋炎はウイルス性心筋炎や心筋梗塞等で一過性の心筋障害が生じた後に、自己の心筋成分に対して炎症が持続する病態である。本研究は、この自己免疫性心筋炎における炎症遷延の機序に TN-C が強く関与している、すなわち、炎症とともに発現した TN-C が樹状細胞と直接作用して炎症性サイトカイン環境を作り出し、さらに催炎症性の Th17 細胞を分化誘導するという点を明らかにした (図 3)。また TLR4 が TN-C の催炎症効果を発現するために重要なレセプターであることが本研究で確認されたことから、自己免疫的機序を素地とするような心筋炎の症例に対し、今後 TLR4 を介した経路が治療の有効な標的となる可能性が考えられる。

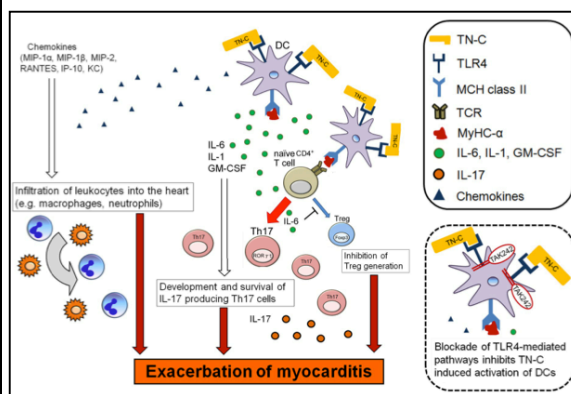


図 3 TN-C による心筋炎制御のメカニズム

<引用文献>

- ① Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M. Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol.* 2005;205(4):460-7.
- ② Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Treboul A, Chan E, Drexler S, Sofat N, Kashiwagi M, Orend G, Brennan F, Foxwell B. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med.* 2009;15(7):774-80.
- ③ Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T, Uede T. $\alpha 9\beta 1$ integrin-mediated signaling serves as an intrinsic regulator of pathogenic Th17 cell generation. *J Immunol.* 2011;187(11):5851-64.
- ④ Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, Naka T, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine

signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. J Immunol. 2012;189(4):2043-53.

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 1 件)

- ① Tomoko Machino-Ohtsuka, Kazuko Tajiri, Taizo Kimura, Satoshi Sakai, Akira Sato, Toshimichi Yoshida, Michiaki Hiroe, Yasuhiro Yasutomi, Kazutaka Aonuma, Kyoko Imanaka-Yoshida. Tenascin-C Aggravates Autoimmune Myocarditis via Dendritic Cell Activation and Th17 Cell Differentiation. J Am Heart Assoc. 2014;3(6).pii:e001052. doi: 10.1161/JAHA.114.001052.

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 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 年 5 月 1 日、名古屋
- ② 田尻和子、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 2 回 MatriCell フォーラム、2014 年 9 月 7 日、東京
- ③ Tomoko Machino-Ohtsuka. 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 年 12 月 12 日、千葉
- ④ 町野智子、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 年 9 月 7 日、津
- ⑤ Tomoko Machino-Ohtsuka. 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 年 7 月 28 日 サンディエゴ (アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田尻 和子 (TAJIRI, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60633914