

テネイシンCを分子標的とした心筋梗塞後 リモデリング治療法開発のための基礎的研究

(課題番号：17590724)

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（C））

研究成果報告書

平成 19 年 3 月

研究代表者 吉田(今中)恭子

(三重大学大学院医学系研究科助教授)

本研究は、平成17年度～平成18年度科学研究費補助金（基盤研究(C)）
によったものである。

課題番号 17590724

研究課題 テネイシンCを分子標的とした心筋梗塞後リモデリング治療法開
発のための基礎的研究

研究組織

研究代表者： 吉田（今中）恭子 （三重大学大学院医学系研究科・助教授）

研究分担者： 大西勝也 （三重大学大学院医学系研究科・助手）

研究分担者： 原万里 （三重大学大学院医学系研究科・教務職員）

研究経費

平成17年度 2,200 千円

平成18年度 1,300 千円

計 3,500 千円

はじめに

細胞外基質蛋白の一つテネイン C は、正常の心臓には発現しないが、種々の病的な心臓で組織リモデリングにともなって一過性に発現する。心筋梗塞後には、急性期に梗塞巣と健常部の境界部位に限局するという特異的な発現様式を示し、多彩な生物活性によって、梗塞後の組織修復を制御し、梗塞後心室リモデリングに大きく関与すると考えられる。我々はこれまで、テネイン C が心筋組織傷害部位への筋線維芽細胞の動員、膠原線維形成を促進し、癒痕治癒を促し得ることを明らかにした。その一方で、テネイン C は心筋細胞と結合織の接着を緩め、matrix metalloproteinase の転写および活性をあげるという作用をもつことから、心筋組織の再構築を容易にする反面、組織の脆弱性をきたすことが想像される。したがって、理論的には、心筋梗塞後の心室拡張を増悪および抑制するという両面性をもつと考えられ、テネイン C 発現レベルあるいはその機能を適切に制御することにより、心筋梗塞後の心筋組織構築の改変を望ましい方向に誘導し、いわゆる心室リモデリングを予防することが可能ではないかと考えた。

そこで、本研究では、まず、急性心筋梗塞患者のテネイン C 発現の程度と心機能臨床経過を対比して、ヒト梗塞後心室リモデリング進行に対するテネイン C の実際の関与を評価し、次に、ノックアウトマウス、およびテネイン C 過剰発現トランスジェニックマウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、テネイン C 欠損、過剰発現の両方向から、梗塞後の生体反応におけるテネイン C の役割を解明することを目的とした。

[研究成果]

1. 急性心筋梗塞患者血中テネイン C 値と慢性期心室リモデリングおよび予後との相関

急性心筋梗塞患者 105 例の血清テネイン C 値を ELISA 法で経時的に測定すると、発症 24 時間以内に有意に上昇し始め(63.3 ± 30.1 ng/ml, コントロール: 27.4 ± 11.7 ng/ml)、5 日目にピーク (83.2 ± 43.0 ng/ml) となり、その後徐々に低下し、28 日以上かかって正常化した。血中テネイン C ピーク値は SPECT(single photon

emission tomography)の^{99m}Tc とりこみによる defect score や心筋逸脱酵素 CPK 値との相関は見られず、また異常高値は CPK 値のそれより持続するため血中テネイシン C の上昇は心筋細胞障害そのものではなく、それに対する間質の反応、すなわち組織リモデリングの活動性を反映していることが示唆された。また、ピークテネイシン C 値 (発症 5 日後) の高い群 (≥ 84.8 ng/ml) は、6 ヶ月後に心室リモデリング (拡張終期径が入院時の 20% 以上増加) する頻度が有意に高く、5.5 年間の経過観察期間中に Major adverse cardiac event (心臓死、心筋梗塞、心不全による入院) をおこすリスクも有意に高かった。従って、テネイシン C が過剰に発現すると心筋梗塞後の心室リモデリングを増悪させることが示唆された。

2. テネイシン C ノックアウトマウスにおける心筋梗塞後心室リモデリングの評価

BALB/C 系オス 10 週令の野性型およびテネイシンノックアウトマウスの冠動脈を永久結紮して心筋梗塞モデルを作成し、28 日後に心エコー、血行動態、生存率、組織学的変化を比較した。

野性型マウスで免疫組織化学的にテネイシン C の発現を検討すると、テネイシン C は心筋梗塞後急性期に梗塞巣と健常部の境界に沈着し、1 日後には明らかに認められ、5-7 日目にもっとも顕著となり 14 日には減少、28 日後にはほぼ消失し、ラットモデルおよびヒト心筋梗塞とよく似た発現様式を示した。テネイシン C ノックアウトマウスと野性型マウスでは 28 日後まで生存率に差は認められず、梗塞巣のサイズにも差を認めなかったが、野性型マウスのほうがテネイシン C ノックアウトマウスに比べて、左室拡張終期径、左室収縮終期径、左室拡張終期圧は有意に大きく、左室駆出率も有意に低かった。また、野性型マウスでは、境界部残存心筋細胞の肥大の程度、および残存心筋間質の線維化がノックアウトマウスより有意に強かった。すなわち、テネイシン C がいないほうが梗塞後 28 日の心室リモデリングがすくなく心機能回復がよいということになり、血中テネイシン C 値の高い患者の予後が悪いという臨床データを支持することが明らかになった。

3. テネイシン C ノックアウトマウスにおける線維化病変と炎症反応

残存心筋間質の線維化進行におけるテネイシン C の役割を明らかにするため、BALB/C 系メス 7 週令の野性型およびテネイシンノックアウトマウスの背部皮下に浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II を持続的に投与し、反応型線維化モデルを作製し、組織染色による画像解析、免疫組織化学、*in situ* hybridization, RT-PCR により解析した。

野性型マウスでは、コラーゲン I, III の mRNA レベルの 2 倍程度の有意な上昇、心筋内血管周囲に明らかな膠原線維の増加がみられた。テネイシン C の mRNA レベルはコントロールの 10 倍程度に著明に上昇し、免疫組織学的に、分子が血管周囲の線維化病巣部に沈着していることが明らかに認められた。*in situ* hybridization により、産生細胞は、血管の周囲に存在する線維芽細胞であることが明らかになった。また、血管周囲病変部には Mac3 陽性マクロファージの集簇、PDGF-A, -B の産生亢進が見られ、周囲間質細胞の PDGF 受容体 α の発現が亢進していた。心筋中の IL-1 β 遺伝子発現には変化が見られなかったが、TGF β の mRNA の明らかな上昇が認められた。テネイシン C ノックアウトマウスでは、アンジオテンシン II に対する血圧反応性、心筋肥大の程度には野性型と有意差は見られなかったが、線維化病巣の形成が有意に抑制され、プロテオグリカンの沈着、マクロファージの集簇がすくなく、PDGF-A, -B の産生も抑制されていた。

4. テネイシン C 心臓特異的過剰発現マウスの心臓組織修復反応

Cre-lox 制御下でマウス生体内でテネイシン C を心臓に過剰発現させた。CAG プロモーターとマウステネイシン C 遺伝子の間に loxP ではさんだ stop を挿入したトランスジェニックマウスを作成した。このマウス自体はテネイシン C の発現がおきないが、特異的プロモーターについで Cre 遺伝子をもつマウスと交配させた F1 で、TG と Cre の両方の遺伝子をもつ個体では、Cre 遺伝子の前のプロモーターが活性化すると組み換えがおきて stop が抜け落ちテネイシン C が発現する。まず、 α myosin heavy chain Cre マウスと交配すると、TG/Cre の両方をもっているマウスでは免疫染色でテネイシン C が心筋細胞および間質に発現し、設計通りに心筋細胞特異的にテネイシンの過剰発現が誘導

できること、さらに Western Blot で全長の分子ができていることが確認できた。しかし実際には、心筋梗塞などの組織傷害をおこした心臓では間質細胞、なかでも、 α -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞がテネイシン C を産生し、心筋細胞はテネイシン C を産生しない。そこで、より生体反応に近い状態、すなわち心筋細胞ではなく間質細胞で過剰発現させるために α -smooth muscle actin Cre を用いた。しかし、発生初期の心筋細胞は α -smooth muscle actin を発現するため、TG/Cre マウスの胎児心筋細胞で組み替えがおこりテネイシン C の異所性発現がみられ、成体でも TG/Cre マウスには軽度であるが心筋細胞にテネイシン C が発現した。このマウスを使って、電気メスによる組織傷害後の修復過程をみると、野生型でも凝固壊死域と正常組織の境界部分にテネイシン C が発現するが、TG/Cre ではより広い範囲にテネイシン C の発現がみられた。さらにテネイシン C 過剰発現マウスでは筋線維芽細胞が野性型より多く動員され、凝固壊死域周囲の間質線維化の程度も野性型より強く、ノックアウトマウスにみられた心筋組織修復の変化を裏付ける結果が得られた。

[研究発表]

学会誌等

1. Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, Hiroe M, Imanaka-Yoshida K. Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation. **J Cardiovasc Pharmacol** 2007 (in press).
2. Sawada Y, Onoda K, Imanaka-Yoshida K, Maruyama J, Yamamoto K, Yoshida T, Shimpo H. Tenascin-C synthesized in both donor grafts and recipients accelerates artery graft stenosis. **Cardiovasc Res** (in press).
3. Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Tsukada B, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T, Kitaura Y, Kitabatake A. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. **Circ J** 2007;71:327-30.
4. El-Karef A, Yoshida T, Gabazza EC, Nishioka T, Inada H, Sakakura T, Imanaka-Yoshida K. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. **J Pathol** 2007;211:86-94.
5. El-Karef A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. **J Hepatol** 2007; 46:664-73.
6. Watanabe N, Nakagawa M, Hanato T, Takeuchi Y, Hara M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. *In vitro* model for mouse coronary vasculogenesis. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol** 2006;288A:714-722.
7. Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 2006;47:2319-25.
8. Nakahara H, Gabazza EC, Fujimoto H, Nishii Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Bruno NE, Takagi T, Hayashi T, Maruyama J, Maruyama K, Imanaka-Yoshida K, Suzuki K, Yoshida T, Adachi Y, Taguchi O. Deficiency of tenascin C attenuates allergen-induced bronchial asthma in the mouse. **Eur J Immunol** 2006;36:3334-45.
9. Kajimoto M, Shimono T, Hirano K, Miyake Y, Sawada Y, Kato N, Hirata H, Imanaka-Yoshida K, Nishikawa M, Yoshida T, Shimpo H, Horiuchi T, Miyamoto K. Development of a new method for endovascular aortic repair: combination therapy of cell transplantation and stent grafts with a drug delivery system. **Circulation** 2006;114:I378-83.

10. Hayashi M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Wood M, Fearn C, Tatake RJ, Lee JD. A crucial role of mitochondrial Hsp40 in preventing dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2006;12:128-32.
11. Toma N, Imanaka-Yoshida K, Takeuchi T, Matsushima S, Iwata H, Yoshida T, Taki W. Tenascin-C coated on platinum coils for acceleration of organization of cavities and reduction of lumen size in a rat aneurysm model. *J Neurosurg* 2005;103:681-686.
12. Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol* 2005;167:71-80.
13. Hirano K, Shimono T, Imanaka-Yoshida K, Miyamoto K, Fujinaga K, Kajimoto M, Miyake Y, Nishikawa M, Yoshida T, Uchida A, Shimpo H, Yada I, Hirata H. Method of cell transplantation promoting the organization of intraarterial thrombus. *Circulation* 2005;112:1111-6.
14. 今中-吉田恭子. 心血管リモデリングとテネイシン C. *分子心血管病* 2006; 7:265-271
15. 今中恭子. 心筋炎,心筋症とテネイシン C 新目で見る循環器病シリーズ心筋症, 松森昭編、メディカルレビュー社, 東京.2006:293-298
16. 廣江道昭, 今中-吉田恭子、吉田利通. テネイシン C. *日本臨床 心不全* (上) -最近の基礎・臨床研究の進歩- 2007 (印刷中)

口頭発表

1. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M 'Tenascin-C promotes myocardial fibrosis by recruiting macrophages in mouse hypertensive heart.第 71 回日本循環器学会, 2007 年 3 月 15-17 日,神戸
2. Fujimoto N, Onishi K, Imanaka-Yoshida K, Dohi K, Takamura T, Kurit T, Tanigawa T, Isaka N, Ito M. Serum tenascin-C levels predict hospitalization for heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. 第 71 回日本循環器学会, 2007 年 3 月 15-17 日, 神戸
3. Sawada Y, Onoda K, Yamamoto K, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H. Tenascin-C producing cells originating from both donor grafts and recipients cause neointimal hyperplasia of transplant arteries.第 71 回日本循環器学会, 2007 年 3 月 15-17 日, 神戸
4. 飛田理世、長野由佳、西岡朋弘、吉田利通、今中恭子。テネイシン C 過剰

発現マウスの作製とそれを用いた組織傷害モデルでの解析 第 96 回日本病理学会総会、2007 年 3 月 13-15 日、大阪

5. 田中裕子、鈴木舞子、吉田利通、今中恭子 高血圧性心筋線維化病変は可逆性か？第96回日本病理学会総会、2007年3月13-15日、大阪
6. El-Karef A, Yoshida T, Gabazza EC, Nishioka T, Inada H, Sakakura T, Imanaka-Yoshida K. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice. 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. December 9-13, 2006, San Diego, CA,
7. Nakahara H, Gabazza EC, Fujimoto H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taguchi O. Deficiency of aatenascin C attenuates allergen-induced bronchial asthma in the mouse. 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. December 9-13, 2006, San Diego, CA,
8. Nishioka T, Suzuki M, Nagaharu K, Tanaka Y, Sekimoto A, Yoshida T, and Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C promotes myocardial fibrosis by recruiting macrophages in mouse hypertensive heart. 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. December 9-13, 2006, San Diego, CA,
9. Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Katashima T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Kitaura Y. Tenascin-C is a novel marker of ongoing inflammation in idiopathic dilated cardiomyopathy AHA Scientific Sessions, November 12-15, Chicago, IL
10. 今中恭子 Recent Advances in immunohistochemistry and in situ hybridization for cardiovascular disease. 第 70 回日本循環器学会, 2006 年 3 月 24-26 日 名古屋
11. 今中恭子. テネイシン C を標的とした心血管疾患の新しい治療戦略 第 14 回日本心臓核医学会・学術大会 シンポジウム: 新しい心疾患治療と核医学 2005 年 11 月 13 日、東京
12. Nishioka T, Suzuki M, Yoshida T and Imanaka-Yoshida K, Tenascin-C has a crucial role in progression of myocardial fibrosis. The American Society for Cell Biology 45th Annual Meeting, San Francisco, CA December 10-14, 2005