

心筋虚血再灌流モデルにおける CC ケモカイン  
受容体欠損と再灌流障害抑制効果

(課題番号 17590752)

平成17年度～18年度科学研究補助金  
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成19年 5月

研究代表者 海北 幸一

(熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学講師)

## はしがき

近年、急性心筋梗塞に対して、血栓溶解療法や経皮的冠動脈形成術が行われ、早期再灌流することによって心筋傷害が軽減され、左心機能や予後が改善するようになった。しかしその一方、再灌流することにより心筋に新たな傷害が加わることが動物実験に加え、臨床例でも明らかになってきており、「虚血・再灌流傷害」という概念がクローズアップされるようになってきた。そのメカニズムの一つとして、心筋梗塞後に生じる心臓局所や全身性の炎症反応が重要な役割を果たしていると考えられる。心筋梗塞後の虚血再灌流傷害における炎症反応には、好中球に加え、最近では単球・マクロファージの関与も報告されており、これらの炎症細胞の重要性が注目されている。Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は単球走化性因子として見いだされたケモカインであり、CC chemokine receptor 2 (CCR2) を受容体として作用する。

本研究では、CCR2 欠損マウスを用いて虚血再灌流傷害における単球・マクロファージの浸潤や酸化ストレスとの関与について検討をおこなった。CCR2 欠損マウスおよび野生型 (wild-type) マウスに対して冠動脈の左前下行枝を結紮し、45 分虚血の後、再灌流し、6 時間および 1、3、7 日後に虚血心筋組織の検討を行った。wild-type マウスにおいて虚血心筋へのマクロファージ浸潤は、再灌流 6 時間後に上昇し、3 日後にピークとなったが、このマクロファージ浸潤は、CCR2 欠損マウスにおいて有意に抑制されていた。再灌流 3 日後における梗塞領域は、CCR2 欠損マウスでは wild-type マウスと比較して有意に減少していた。in situ zymography によるゼラチン分解活性は、wild-type マウスでは再灌流 3 日後に増強していたが、その活性は CCR2 欠損マウスでは有意に減少していた。NADPH oxidase 活性、免疫染色における nitrotyrosine の染色強度、inducible NOS の遺伝子発現は、CCR2 欠損マウスでは wild-type マウスと比較して有意に減少していた。

以上の結果より、CCR2 を直接的に遮断することにより虚血再灌流後の MMP 活性および酸化ストレスが軽減し、心筋虚血再灌流傷害を軽減できる可能性が示唆された。本研究は、心筋虚血再灌流後の組織リモデリングの病態を把握する上で重要な知見であり、今後の心筋梗塞後の治療の一端として寄与する可能性があるものと考えられる。

## 研究組織

研究代表者 海北 幸一 (熊本大学大学院医学薬学研究部講師)

## 交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,400 千円	0 円	2,400 千円
平成 18 年度	1,100 千円	0 円	1,100 千円
総 計	3,500 千円	0 円	3,500 千円

【目的】現在、急性心筋梗塞に対する冠動脈インターベンションによる血行再建術は、最近用いられるようになった、いわゆる new device の登場によって再灌流成功率が向上し、また術後の再狭窄に関しても、以前は6ヶ月後再狭窄40-50%であったものが20-30%に減少し、最近では薬剤溶出性ステントの登場により10%以下にまで減少している。しかし、血行再建させることによる梗塞巣の再灌流障害等も少なからず指摘されており、これらの障害過程を抑制する方法も検討すべき課題である。再灌流障害のメカニズムの一つとして、心筋梗塞後に生じる心臓局所や全身性の炎症反応が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。心筋梗塞後の虚血再灌流傷害における炎症反応には、好中球に加え、最近では単球・マクロファージの関与も報告されており、これらの炎症細胞の重要性が注目されている。今回我々は、急性心筋梗塞後の心筋虚血再灌流障害および梗塞組織リモデリングの過程に着目し、これらに影響を及ぼしていると思われる、単球、マクロファージを中心とした炎症細胞の果たす役割について検討すべく、当研究を立案した。

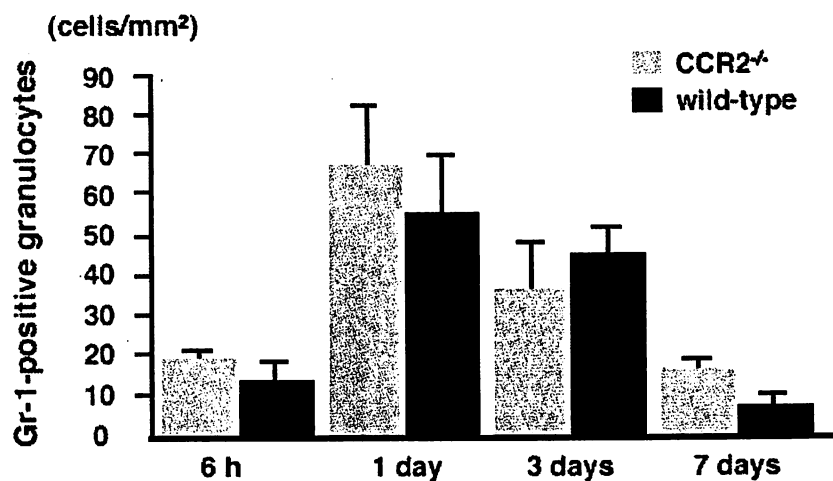
【方法】本研究では、単球、マクロファージの強力な遊走因子である、単球遊走因子(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)の受容体である、CCケモカイン受容体2(CC chemokine receptor 2, CCR2)の欠損マウス、およびWild type(WT)マウスを用い、心筋虚血再灌流モデルを作成し、梗塞巣における好中球、マクロファージ、リンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤を経時的(6時間、1、3、7日)に比較検討し、その推移を確認した。Triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色にて、心筋虚血に曝された領域における実際の梗塞領域の割合を算出し、CCR2欠損マウスとWTマウス両者における心筋虚血再灌流障害の差異を比較検討した。さらに、マクロファージが産生していると思われる、組織リモデリングや虚血再灌流障害に関与する種々のサイトカインや細胞外マトリックスの分解酵素であるMMPsおよびその阻害因子(TIMPs)の発現を、免疫組織化学的および分子生物学的手法を用いて検討した。

また、心筋虚血領域の酸化ストレスの程度の差異を検討するため、Real-time RT-PCRを施行し、iNOS、チオレドキシシン1の遺伝子発現と、NADPH oxidase 活性、免疫染色におけるnitrotyrosineの染色強度も検討した。

【結果】まず、好中球、マクロファージの各モノクローナル抗体を用いた免疫染色により、梗塞巣における炎症細胞数をカウントし、両群における心筋虚血領域の炎症細胞浸潤度を比較検討した。好中球浸潤度にはwild-type、CCR2欠損マウス両群に差はみられなかった(図1A)。一方、マクロファージの梗塞巣内浸潤度は両群とも3日目にピークとなり、wild-typeマウスに比し、CCR2欠損マウスでは1日目、3日目の梗塞内浸潤が有意に抑制されていた(図1B)。TTC染色により心筋虚血に曝された領域における心筋梗塞形成領域の割合(Infarct/AAR)を算出したところ、虚血再灌流3日後のInfarct/AARはwild-typeマウスでは $37.3 \pm 2.2\%$ であったのに対し、CCR2欠損マウスでは $22.4 \pm 2.4\%$ と梗塞領域が有意に軽減していた。また、再灌流7日目の線維化の程度をハイドロキシプロリン定量により検討すると、CCR2<sup>-/-</sup>マウス( $0.54 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ )ではwild-typeマウス( $0.92 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ )に対し有意に減少していた。さらに、細胞外マトリックスの分解酵素であるMMPsの活性を検討するため、組織中のゼラチン分解活性をin situ zymographyを用いて検討し、ゼラチン分解活性が生じた領域の面積を算出した。梗塞領域に対するゼラチン分解活性陽性面積は、CCR2欠損マウスにて有意に抑制されていた(図2A, B)。

虚血再灌流後の酸化ストレスの増加における CCR2 欠損の影響を検討したところ、NADPH oxidase 活性、免疫染色における nitrotyrosine の染色強度は、wild-type マウスに比べ、CCR2 欠損マウスでは有意に低下していた。また、real-time RT-PCR における iNOS、およびチオレドキシン 1 の遺伝子発現は wild-type マウスと比較して CCR2 欠損マウスにて有意に減少していた。

**A**



**B**

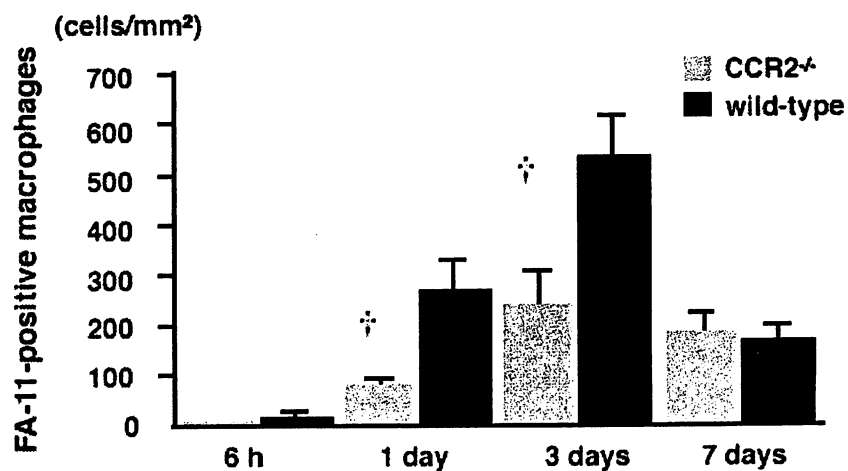


図1 虚血再灌流6 時間、1、3、7 日後におけるCCR2<sup>-/-</sup>、wild-type マウスの虚血領域へのGr-1陽性好中球(A) とFA11 陽性マクロファージ(B) の浸潤数 †P<0.01 vs wild-type

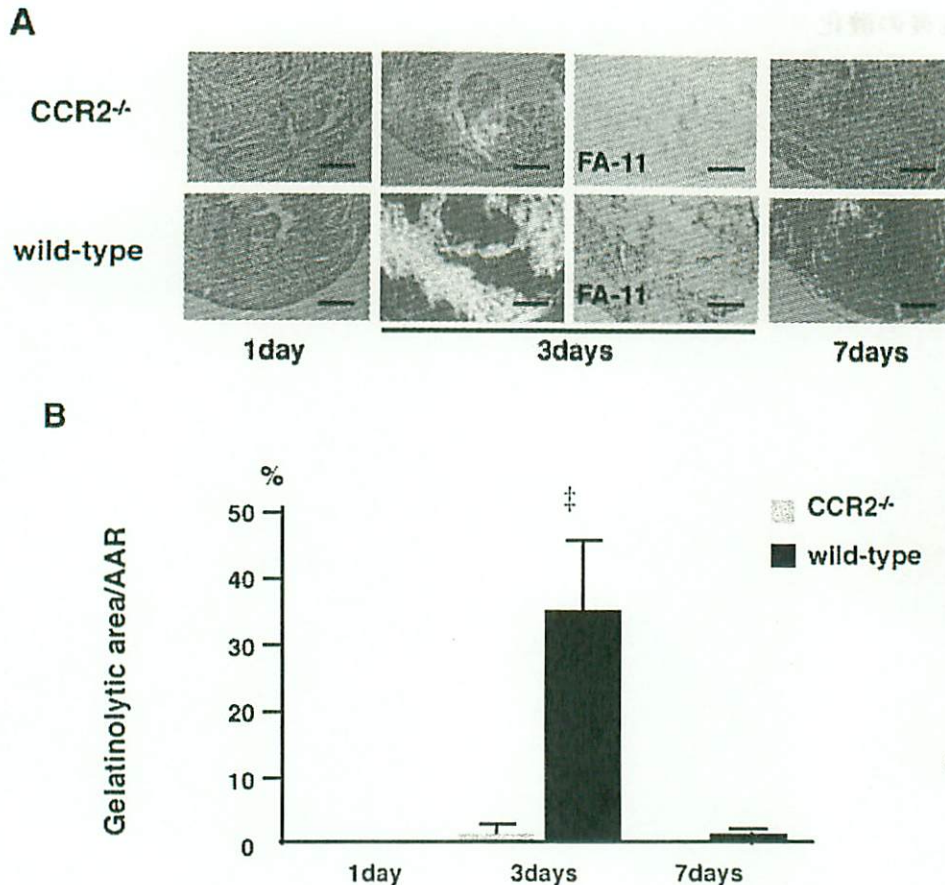


図2 in situ zymography によるゼラチン分解活性の評価 A; 虚血再灌流1、3、7 日後におけるCCR2<sup>-/-</sup>、wild-type マウスのin situ zymography の代表的な組織写真、および再灌流3 日後におけるFA11 を用いた免疫染色、B; 虚血再灌流1、3、7 日後におけるCCR2<sup>-/-</sup>、wild-type マウスのゼラチン分解領域 (対AAR) n=7. P<0.001

【考察および今後の展望】今回我々は、心筋虚血再灌流傷害のメカニズムとして CCR2 を介したマクロファージ浸潤に着目し検討した。最近の報告では、虚血再灌流直後の初期の段階において、CCR2 がマクロファージのみならず好中球に発現し、好中球の虚血心筋への遊走にかかわっていることが示されている。本研究では、CCR2 が再灌流直後の初期の好中球浸潤にあたえる影響についての検討はおこなっていないが、CCR2 欠損が再灌流初期の段階の好中球の遊走、活性化に抑制的な影響を与え、虚血再灌流傷害を軽減した可能性も考えられ、したがって本研究において、虚血再灌流傷害の軽減に好中球・マクロファージの両者が重要な役割を果たしている可能性も考えられる。虚血再灌流傷害において、どの炎症細胞を標的とすべきかについては今後の課題であろう。

今回の検討により、MCP-1/CCR2 のシグナルを遮断することにより虚血再灌流後の MMP 活性および酸化ストレスが軽減し、心筋虚血再灌流傷害を軽減できる可能性が示唆された。本研究により、今後の心筋梗塞後の治療の一端を見出すことができる可能性が有り、また、今後当手法を利用し、心筋虚血再灌流傷害を軽減するための基礎的検討を発展させることができるものとする。

## 平成 17 年度～平成 18 年度の研究者業績集

(英文雑誌)

1. Komohara Y, Terasaki Y, Kaikita K, Suzuki H, Kodama T, Takeya M. Clearance of apoptotic cells is not impaired in mouse embryos deficient in class A scavenger receptor types I and II (CD204). *Dev Dyn.* 232:67-74, 2005.
2. Maruyoshi H, Kojima S, Otsuka F, Funahashi T, Kaikita K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Shimomura I, Ogawa H. Hypoadiponectinemia is associated with coronary artery spasm in men. *Circ J.* 69:1154-1156, 2005.
3. Hayasaki T, Kaikita K, Okuma T, Yamamoto E, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. CC chemokine receptor-2 deficiency attenuates oxidative stress and infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in mice. *Circ J.* 70:342-351, 2006.
4. Maruyoshi H, Sugiyama S, Araki S, Kojima S, Hayasaki T, Kaikita K, Fukushima S, Kageshita T, Sakamoto T, Yoshimura M, Ono T, Ogawa H. Floating coronary artery thrombus prior to the onset of acute myocardial infarction. *Intern Med.* 45:173-174, 2006.
5. Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, Kawano H, Hokamaki J, Nagayoshi Y, Yamashita T, Fukuda M, Nakamura Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H. Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 70:832-7, 2006.
6. Kaikita K, Soejima K, Matsukawa M, Nakagaki T, Ogawa H. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 11:2490-2493, 2006.
7. Okuma T, Terasaki Y, Sakashita N, Kaikita K, Kobayashi H, Kuziel WA, Baba H, Takeya M. MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production. *Int J Exp Path.* 87: 475-484, 2006
8. Sugamura K, Sugiyama S, Kawano H, Horio E, Ono S, Kojima S, Kaikita K, Sagishima K, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H. Fulminant myocarditis survivor after 56 hours of non-responsive cardiac arrest successfully returned to normal life by cardiac resynchronization therapy: a case report. *J Cardiol.* 48:345-352, 2006
9. Tsujita K, Kaikita K, Hayasaki T, Honda T, Kobayashi H, Sakashita N, Suzuki H, Kodama T, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of class A macrophage scavenger receptor increases the risk of cardiac rupture after experimental myocardial infarction. *Circulation.* 115:1904-1911, 2007.
10. Suzuki S, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Yamamuro M, Nagayoshi Y, Kojima S, Kaikita K, Sugiyama S, Yasue H, Ogawa H. A Novel Genetic Marker for Coronary Spasm in Women from A Genome-Wide SNP Analysis. *Pharmacogenetics and Genomics* 2007(in press)
11. Fukunaga T, Soejima H, Irie A, Sugamura K, Oe Y, Tanaka T, Nagayoshi Y, Kaikita K, Sugiyama S, Yoshimura M, Nishimura Y, Ogawa H. Relation between CD4+ T-cell

Activation and Severity of Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Am J Cardiol. 2007(in press)

12. Matsukawa M, Kaikita K, Soejima K, Fuchigami S, Nakamura Y, Honda T, Tsujita K, Nagayoshi Y, Kojima S, Shimomura H, Sugiyama S, Fujimoto K, Yoshimura M, Nakagaki T, Ogawa H. Serial Changes in Von Willebrand Factor-cleaving Protease (ADAMTS13) and Prognosis after Acute Myocardial Infarction. Am J Cardiol. 2007(in press)

#### 邦文雑誌

1. 海北幸一, 小川久雄, 竹屋元裕. 心筋梗塞後左室リモデリングにおけるCCケモカイン受容体2 (CCR2) の役割. 循環器専門医 13:297-304, 2005.
2. 海北幸一, 小川久雄. 新心臓診療プラクティス 冠動脈疾患を診る I 冠動脈血栓形成と凝固線溶系. pp106-111, 2005. 文光堂.
3. 海北幸一, 小川久雄. エビデンスに基づいた急性冠症候群治療の進めかた. Medical Practice 22:14-21, 2005.
4. 海北幸一, 小川久雄. 冠動脈インターベンション後の抗血小板・抗凝固療法. 総合臨牀 55:1886-1892, 2006.
5. 海北幸一, 小川久雄. 新目で見える循環器病シリーズ⑩: 心筋梗塞症. I-4. 冠循環と心筋虚血障害・心筋梗塞の病理病態・心筋梗塞における冠攣縮の関与. pp26-34, 2007 メジカルレビュー社.
6. 海北幸一, 小川久雄. medicina 増刊号. Common Disease インストラクションマニュアル. 不安定狭心症. Medicina 増刊号 43(12):32-34, 2006.
7. 海北幸一, 小川久雄. 抗血小板療法-アテローム血栓症のハイリスク症例をいかに見出すか. リスクマーカー. Heart View 10:14-20, 2006.
8. 辻田賢一, 海北幸一, 小川久雄. DATA で読み解く内科疾患. 狭心症. 総合臨牀増刊 56:835-842, 2007.
9. 海北幸一, 辻田賢一, 松川将三, 小川久雄. 虚血性心臓病の病態. 臨床と研究 84(1):13-17;2007