

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09453

研究課題名(和文) 心臓リモデリング抑制のための最適な抗炎症療法の検討

研究課題名(英文) Proper timing of anti-inflammation therapy for attenuating cardiac remodeling

研究代表者

天野 篤 (Amano, Atsushi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70338440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性心疾患において、炎症と組織修復に関する因子がどのように関連しているのかを解明し、組織損傷および修復の最適な条件を示すことを目的とした。心筋梗塞モデルマウスにて心筋梗塞後の1-14日で心臓のどの部位にいつにそれぞれの因子が発現するかを観察したところ、炎症は主に1-2日に高く、幹細胞マーカーは7-14日でピークを示した。また梗塞周囲巣で最も発現が高かった。このマーカーの陽性細胞を心筋梗塞モデルに投与したところ、陽性群で心機能の回復と血管新生の増強効果が見られた。その他の血管新生因子や心筋転写因子は差異が大きいものの、多くは5日目以降であり、炎症の過剰発現が収束する時期と一致していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における心不全患者は100万人以上とされ心不全への対応は社会の大きな課題となっている。心不全に対して細胞治療を中心とした再生医療が注目されているが、治療介入の最適な時期やその適応についての詳細はまだまだよくわかっていない。本研究では心不全の原因疾患として最多である虚血性心疾患における急性期の炎症因子と、それに伴う心臓の自己修復因子との発現時期などの関連性を示すとともに、これらの1因子を用いた細胞治療の有効性を示した。心筋梗塞後の治療介入の最適な時期と炎症コントロールの機序を理解することにより、重症心不全治療の新たな治療戦略となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to determine the relationship between inflammation and self-regeneration mechanism following ischemic heart disease. We measured the expression change over time and location in inflammation-related cytokines and cardiac transcription genes in the mice heart following myocardial infarction (MI). Most of inflammation-related cytokines were increased in 1-2 day after MI. In contrast, the marker for angiogenesis or cardiac transcripts were increased in day 5 when the inflammation was converged. In addition, the expression of a stem cell marker was peaked at 14 days after MI. The administration of the positive cells in the MI heart improved cardiac function and increased angiogenesis. These results suggested that attenuation of the acute inflammation may be important for enhancement for self-regeneration.

研究分野：虚血性心疾患

キーワード：炎症 重症心不全 虚血性心疾患 組織修復

1．研究開始当初の背景

本邦における心不全患者は100万人以上、心不全による入院患者は年間20万人以上とされ、心不全への対応は社会の大きな課題となっている。心不全の原因疾患は様々であるが、なかでも虚血性心疾患が最多である。心筋梗塞後の心機能は発症直後に最も大きく傷害されるものの、さらに亜急性期から慢性期にかけて低下するいわゆるリモデリングが起こることが知られている。リモデリングが進行すると心筋細胞の線維化が広がり、心筋壁の菲薄化や内腔拡張がおこったり(組織学的リモデリング)、ブロックなどの伝導障害が生じ致死性不整脈の原因となったり(電気的リモデリング)、心筋の収縮力が低下するなどの機能障害(機械的リモデリング)が起こり結果的に心不全に陥る。一度リモデリングが進行すると、元の状態に戻るのには難しく、いかに初期の段階でリモデリングを抑制するかが治療の大きなカギとなる。しかしながら急性期には同程度の虚血であっても、その後のリモデリングの進行度が大きく異なることがあり、それらの詳細な機序は未だよくわかっていない。

心筋や血管内皮が虚血となると、炎症性サイトカインが放出され、これが心筋梗塞後のリモデリングに大きな影響を及ぼしている。しかしながら同時に虚血や炎症により血管新生を促進させるサイトカインなどの発現が増加をし、同時に臓器内や血中の幹細胞が誘導され組織修復機序が活性化されることも知られている。現在試みられている組織再生療法には、細胞などを投与することによりサイトカインや成長因子などを導入、炎症を抑制するとともに血管や心筋組織の再生を促して心機能を改善させる試みが多くなされており、次世代の治療法として注目を浴びている。しかしながら薬剤や細胞の種類の違いにおける検討は数多くなされているものの、どのくらいの期間使用するのが最適なのか、どのタイミングで投与されるべきなのか、結果を及ぼすのかなどについての詳細な検討はあまりなされていない。

2．研究の目的

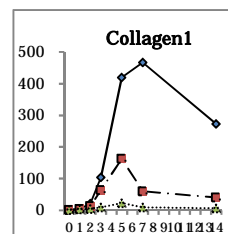
今回我々は各種炎症マーカーと組織修復に関する因子をそれぞれ部位別に経時的に測定、炎症と組織修復がどのように関連しているのかを解明し、組織損傷および修復の最適な条件を示すこと、さらに心臓のリモデリング抑制、修復に関係する因子として幹細胞に着目、虚血心疾患における幹細胞マーカーの発現を経時的、解剖学的に検討するとともにこれらの細胞の役割を、実際の心筋梗塞モデルを用いて解明することを目的とする。

3．研究の方法

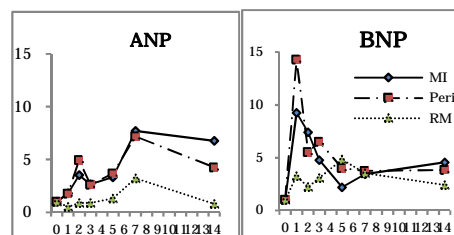
8-12週齢の雄性マウス(C57/BL6)を麻酔後に挿管。左開胸にて左冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作成した。虚血後急性期から慢性期(1~5, 7, 14日後)のそれぞれのタイムポイントで心臓を摘出。左室を切り出し、梗塞中心部、周囲巣および遠隔部位の3か所に分類した。それぞれの部位にて、線維化因子(Collagen-1)、心臓ホルモン(ANP, BNP)、炎症性サイトカイン(TNF α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10)、マクロファージ(CD11c、CD68、CD206)、細胞増殖関連因子(c-Kit、Ki67)、血管新生関連因子(VEGF、VEGF-R2、vWF、PECAM、ANGPTL1、ANGPTL2、ANG1、ANG2)および心筋転写因子(TBX-5、-18、-20、GATA4、NKx-2.5、HAND1、HAND2、ISL1)のmRNAをRT-PCR法にて測定した。

4．研究成果

線維化マーカーである Collagen-1 の発現は day3 に上昇をはじめ day7 がピークであった。Collagen-1 は梗塞中心で最も高く、周囲巣、遠隔と離れるにつれてその発現は低下していた。心臓由来ホルモンである BNP は day1 でピークであったのに対して、ANP は day7 でピークとなっていた。また ANP、BNP は周囲部での発現が多く見られた。さらに ANP は心房で心室の 40 倍の発現が見られた。



炎症性サイトカインの発現はすべて梗塞中心で最も高く、周囲巣、遠隔と離れるにつれてその発現は低下していた。ピークポイントは TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 は day1 の急性期であり、その後は大きく低下したのに対し、IL-2 は day1 および day5 の二峰性のピークであった。IL-10 は day5 から上昇しその後 day 14 も上昇が続いた。マクロファージは day1 と day5 に二峰性のピークがあった。このうち CD68 は day5 に大きく上昇してその後は急速に低下したのに対し、CD206 は低下が緩徐であり、かつ梗塞周囲巣にも多くの発現が見られた。



組織修復に関する因子として、幹細胞マーカーでもある c-Kit の発現は梗塞部位において day1 から day7 まで約 10-15 倍の高い発現が見られ、さらにその後 day14 にかけて約 50 倍まで上昇した。興味深いことに、c-Kit は梗塞部位のみならず周囲巣や遠隔部でも大きな上昇を示し、その発現量は梗塞部位とほぼ同等かより高い値を示しており day14 にかけてその傾向は続いた。c-Kit の幹細胞としての働きを調べるため、cardiac explant 法を用いて outgrowth 細胞を培養し FACS を用いてソート、陽性 (c-Kit+) および陰性 (c-Kit-) にて細胞の機能を比較したところ、c-Kit+ 群でトロポニン T、複数の血管新生マーカーの発現が有意に高かった。次いでラットの心筋梗塞モデルを作成し、急性期に梗塞周囲巣にこれらの細胞を心筋内投与して、心機能の変化を経時的に比較検討した。すると c-Kit 陽性群で LVEF の有意な改善と左室拡大の抑制が認められた。組織では梗塞範囲は有意に小さく、anti-apoptosis の効果も見られた。その他心臓の転写因子である ISL1 は day3 以降から上昇を始め、day14 にかけて上昇傾向であった。MEF2c も動揺の傾向を示し、これらのピークは 2-3 倍と緩徐であった。一方で TBX ファミリーはすべて day5 にピークがありその後は急減した。GATA-4 も同様の発現傾向を示したが TBX ファミリーに比べ、その低下は緩徐であった。NKx-2.5 の発現は全期間を通してほとんど変化が見られなかった。

血管マーカーである vWF は d5 から大きく上昇し、day14 にも増加傾向であった。PECAM-1 も同様に d5 でピークであった。VEGF はこの観察期間では有意な上昇を示さなかったが VEGFR2 は d5 で軽度上昇がみられた。Collagen-1 はとその大きな違いが見られた。これらのことから、心筋梗塞後の組織炎症は 1-2 日目ピークでありその後は収束する一方、継続して炎症を引き起こす機序がみられた。一方で一部の血管新生マーカーは 1 日目から上昇してたが多くの血管新生関連因子の発現は 5 日目からであり、同時期に抗炎症性サイトカインの発現増加も見られた。このタイムラグが心臓のリモデリングにつながっているのであれば、炎症極期には抗炎症作用を持つ細胞を投与するとともに、血管新生に關与する因子の投与が有効であることが示唆され

血管マーカーである vWF は d5 から大きく上昇し、day14 にも増加傾向であった。PECAM-1 も同様に d5 でピークであった。VEGF はこの観察期間では有意な上昇を示さなかったが VEGFR2 は d5 で軽度上昇がみられた。Collagen-1 はとその大きな違いが見られた。これらのことから、心筋梗塞後の組織炎症は 1-2 日目ピークでありその後は収束する一方、継続して炎症を引き起こす機序がみられた。一方で一部の血管新生マーカーは 1 日目から上昇してたが多くの血管新生関連因子の発現は 5 日目からであり、同時期に抗炎症性サイトカインの発現増加も見られた。このタイムラグが心臓のリモデリングにつながっているのであれば、炎症極期には抗炎症作用を持つ細胞を投与するとともに、血管新生に關与する因子の投与が有効であることが示唆され

た。さらには胎生期の心臓特異的転写因子の発現変化が見られており、このことは心臓にも自己再生機序があること、一方でその発現のタイミングや発現量には大きな差があり、今後さらにこれらの因子の発現変化と炎症性サイトカインとの発現の関連性をみるとともに、これらの因子を組織に強制発現させることにより、傷害後リモデリングの抑制につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li C, Matsushita S, Li Z, Guan J, Amano A.	4. 巻 7
2. 論文標題 c-kit positive cardiac outgrowth cells demonstrate better ability for cardiac recovery against ischemic myopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2157-7633.1000402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsushita S, Minematsu K, Yamamoto T, Inaba H, Kuwaki K, Shimada A, Yokoyama Y, Amano A	4. 巻 58
2. 論文標題 Factors for c-kit expression in cardiac outgrowth cells and human heart tissue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 962-968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.16-559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mukaida H, Matsushita S, Inotani T, Nakamura A, Amano A	4. 巻 -
2. 論文標題 Continuous renal replacement therapy with a polymethyl methacrylate membrane hemofilter suppresses inflammation in patients after open-heart surgery with cardiopulmonary bypass	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Artif Organs	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-018-1025-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li C, Matsushita S, Sato M, Amano A	4. 巻 62
2. 論文標題 The role of the c-kit positive cardiac stem cells in heart	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita S	4. 巻 62
2. 論文標題 Is aging related to capability of cardiac regeneration of the heart?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松下 訓 (SATOSHI MATSUSHTIA SATOSHI) (20407315)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	