

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17956

研究課題名(和文)急性心筋梗塞におけるコルヒチンの急性期抗炎症作用と予後及び長期的効果の検討

研究課題名(英文) Acute anti-inflammatory effects and long-term prognostic benefit of colchicine in acute myocardial infarction

研究代表者

藤末 昂一郎 (Fujisue, Koichiro)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：10779151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性心筋梗塞マウスモデルにコルヒチンを投与することで心筋梗塞後の心機能低下が抑制され、慢性期の心不全および死亡率の改善がみられた。病理組織学的検討において、コルヒチンは心筋梗塞急性期の梗塞心筋局所における過剰な炎症細胞の集簇および炎症性サイトカインの産生を抑制した。炎症性サイトカイン抑制は全身性というよりは梗塞心筋局所で認められ、コルヒチンは梗塞心筋局所に作用するものと考えられた。その抗炎症メカニズムとしてNLRP3インフラマソームを介したカスケードが関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コルヒチンが梗塞心筋局所の過剰な炎症反応を抑制し、それにはNLRP3インフラマソームを介した炎症抑制メカニズムが関与する可能性を初めて示した。本研究結果は今後の心血管疾患の新たな治療開発に影響を与えるものと考えられる。しかし、NLRP3インフラマソーム阻害モデルを用いた検証が不十分であること、また血管の炎症抑制効果の検討は不十分であることから引き続き心血管領域におけるコルヒチンの抗炎症作用のメカニズムについて検証を続けていく。

研究成果の概要(英文)：Administration of colchicine to mouse model of acute myocardial infarction attenuated the decrease of cardiac function after myocardial infarction, and improved heart failure and mortality during the chronic phase. Histopathological examination revealed that colchicine suppressed excessive accumulation of inflammatory cells and the production of pro-inflammatory cytokines in the infarcted myocardium. Inhibition of pro-inflammatory cytokines was observed in the infarcted myocardium, rather than systemically, suggesting colchicine inhibited local inflammation after myocardial infarction. It was suggested that the anti-inflammatory mechanism of colchicine might be mediated via the NLRP3 inflammasome cascade.

研究分野：循環器病学

キーワード：コルヒチン 心筋梗塞 炎症 インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞(MI)の救命率は冠血行再建法の進歩により著明に改善したが、慢性期の心不全発症は世界的に増加傾向にあり依然として大きな問題である。心筋梗塞後の過度で遷延する炎症反応は障害部位の組織修復を障害し、慢性期にわたり左室リモデリング、心機能障害をひきおこす。急性心筋梗塞発症後の炎症制御が心機能、心不全、生存率を改善させる可能性が期待されるが、これまでのところステロイド、非ステロイド性抗炎症薬、シクロスポリンを用いた研究では有効性が示されなかった¹⁻³。

近年、コルヒチンがNLRP3インフラマソームの関連するリウマチや痛風などの無菌性炎症を抑制することが報告されている。NLRP3は細胞障害によるシグナルに応答しインフラマソームと呼ばれる複合体を形成し、Caspase-1活性化を介して、pro-IL-1 β 、pro-IL-18を切断、活性化する。急性心筋梗塞においても梗塞後心筋虚血や壊死による無菌性炎症の惹起や、虚血再灌流障害、左心室リモデリングにNLRP3インフラマソーム活性化が関与していることが報告されている⁴。近年、臨床試験において心血管疾患におけるコルヒチンの有用性が報告され、その効果が期待されている。しかしながらその作用機序や心筋梗塞急性期および慢性期の心機能低下抑制効果、心血管イベント改善効果に関する詳細研究は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究はコルヒチンが心筋梗塞急性期の炎症反応やNLRP3インフラマソーム活性化を抑制することで、心筋障害を軽減し、慢性期にわたって心筋リモデリング、心機能障害、予後を改善するか検証する。

3. 研究の方法

a) 使用マウスとコルヒチン投与量

本研究では野生型のC57BL6Jマウス[CLEA Japan, Inc]を使用した。心筋梗塞作成1時間後にコルヒチン0.1mg/kg(コルヒチン群)またはPBS(対照群)を、ゾンデを用いて経口投与を行う。以後24時間ごとに術後6日までコルヒチン0.1mg/kg/日投与を行った。

b) マウス心筋梗塞モデルの作成

15週齢のオスのマウスに吸入麻酔(イソフルレン)を施し心電図を装着する。人工呼吸器管理下に右側臥位にて第3-4肋間を左側開胸、心臓を露出し、8-0プローリンで冠動脈左前下行枝を左房の下縁より1-2mm遠位部の高さで結紮した。心電図でST上昇を確認し、閉胸、皮膚縫合した(MI群)。対照群は開胸した後、冠動脈を結紮せずに閉胸した(sham群)。

c) マウス心エコー、組織検体採取

手術直前と術後1,7,14,21,28日目に心エコーを行い、左室サイズ、左室内径短絡率を計測した。各時点においてペントバルビタールによる腹腔内麻酔下に解剖し、血液検体の採取および心臓摘出をした。摘出した臓器は重量を測定し、一部は4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し病理標本を作成した。一部は、RNA抽出またはタンパク質回収のため細断、秤量した後液体窒素中で粉碎しlysis bufferを添化して保存した。

d) 心筋梗塞領域の炎症細胞集簇と好中球ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

心筋梗塞1,3,7日後の心筋の病理切片をGr-1、Iba-1で免疫染色し、心筋梗塞部位の好中球、

マクロファージを定量評価した。同時に心筋梗塞部位の好中球ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の塩素化活性を評価した。

e) 心筋梗塞領域の炎症性サイトカイン、NLRP3 インフラマソーム活性化の評価

コルヒチンの梗塞領域局所のTNF- α 、MCP-1、CXCL2、IL-1 β 、IL-18などの炎症性サイトカインはリアルタイム-PCRにより定量評価した。また、NLRP3インフラマソーム活性化に与える影響を評価するために梗塞心筋領域のNLRP3、APC、Caspase1遺伝子発現をRT-PCRにより定量評価した。コルヒチン群と対照群とで心筋梗塞領域のCaspase-1活性化を比較するために梗塞心筋中のCaspase-1の基質YVADを7-amino-4-trifluoromethyl coumarinで蛍光色素標識し、蛍光強度を測定した。ELISA法により血清サイトカイン濃度の測定も行い、全身での炎症・インフラマソーム活性化の評価も併せて行った。

d) 急性期心筋梗塞領域における組織修復の評価

心筋梗塞7日後の心筋組織を Masson-Trichrome 染色し癒痕部と非梗塞部位の線維化を組織学的に定量評価した。

4. 研究成果

1) コルヒチン群は対照群と比較して、心筋梗塞4週間の生存率が有意に改善した。また、コルヒチン群では心筋梗塞後の左室収縮能が保持され左室径拡大も抑制されることが確認された。

2)心筋梗塞1週間後心筋の Masson-Trichrome 染色による梗塞領域の評価において、コルヒチン群では対照群と比較し、有意に癒痕領域が抑制されていた。

3)梗塞領域の免疫染色による病理学的評価において、コルヒチン群では対照群と比較し、梗塞領域のGr-1陽性顆粒球、Iba1陽性マクロファージの集簇が有意に抑制されており、コルヒチンは梗塞領域局所の炎症細胞集簇を抑制することが示された(図1)。同時に心筋梗塞部位の好中球ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の塩素化活性を測定した結果、コルヒチン群ではMPO活性が抑制されており、局所の好中球活性化も抑制されていることが示された。

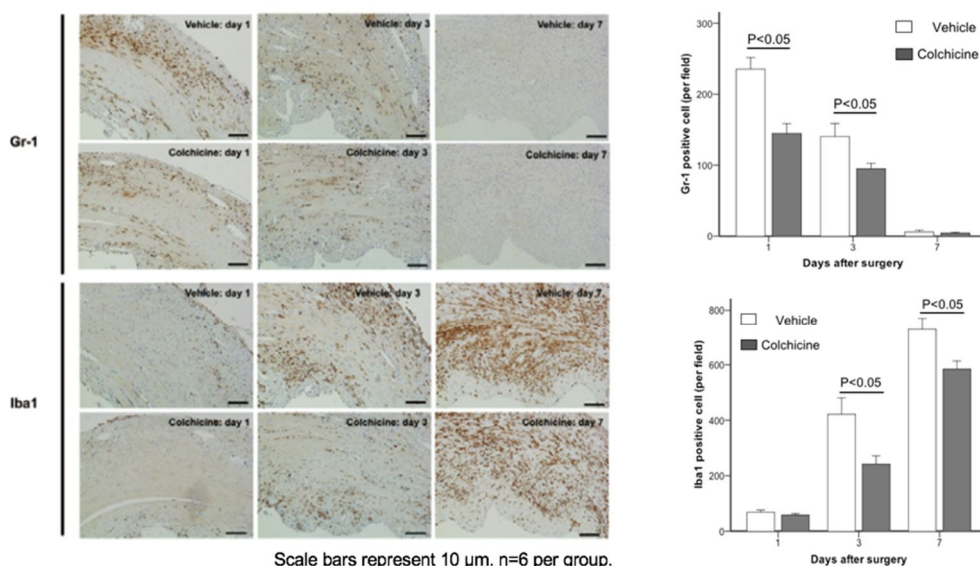


図1. コルヒチンは心筋梗塞領域のGr-1陽性顆粒球、Iba1陽性マクロファージの集簇を抑制した

4) 梗塞心筋のリアルタイム-PCRの結果、コルヒチンは心筋梗塞24時間後の梗塞領域における炎症性サイトカイン mRNA 発現を有意に抑制し、コルヒチンは局所の炎症反応を抑制することが示された(図2)。

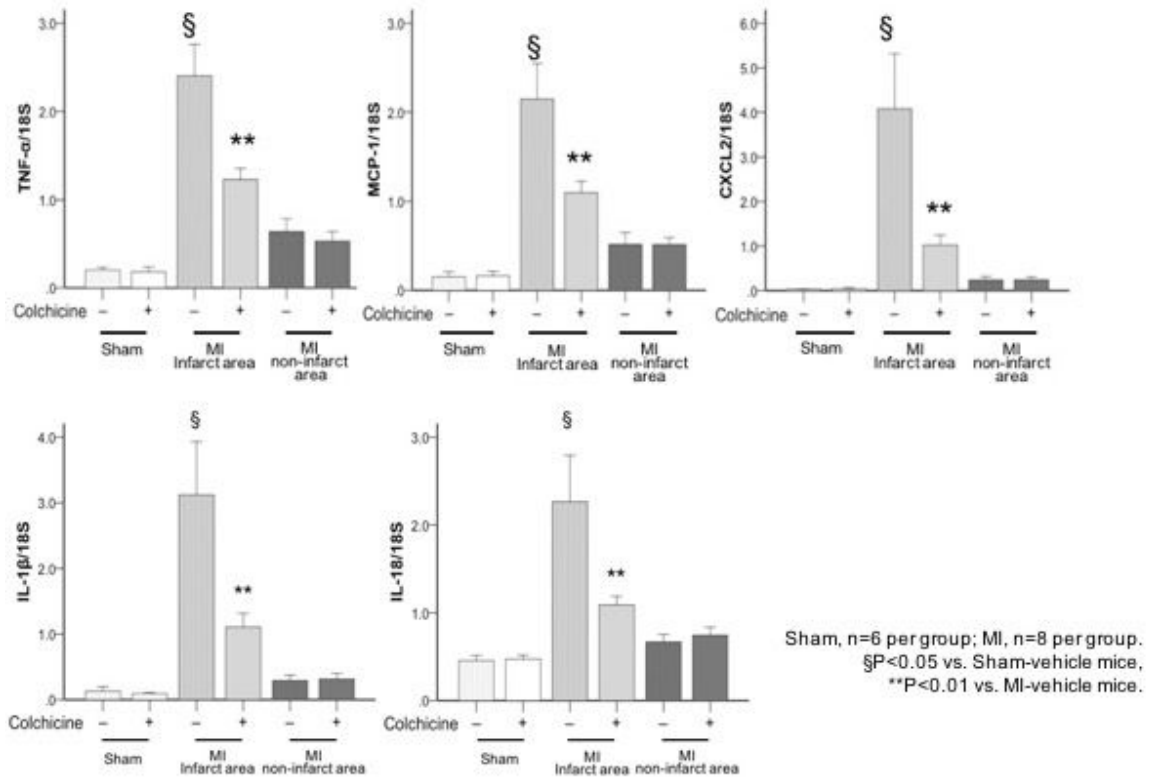


図2. コルヒチンは心筋梗塞24時間後の梗塞領域における炎症性サイトカインmRNA発現を抑制した

一方、血清中の IL-1 を測定したところ、コルヒチン群と対照群とでは血清中 IL-1 値に有意差は認められなかったことから、心筋梗塞においてコルヒチンは全身性炎症よりは局所の炎症を抑制することが示唆された。また、コルヒチンは心筋梗塞24時間後の梗塞領域における NLRP3 インフラマソーム mRNA 発現を有意に抑制した。また、心筋梗塞24時間後の梗塞領域における Caspase-1 活性を評価したところ、コルヒチン群では Caspase-1 活性が有意に抑制されていた。これらの結果から、コルヒチンの局所の炎症反応抑制には NLRP3 インフラマソームを介した経路が関与していることが示された(図3)。

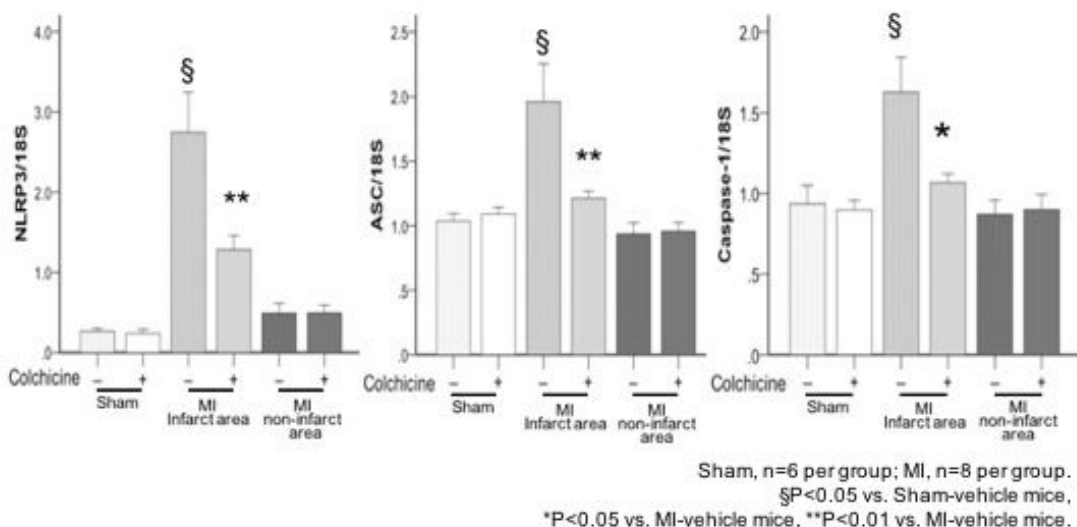


図3. コルヒチンは心筋梗塞24時間後の梗塞領域におけるNLRP3インフラマソームmRNA発現を抑制した

5) これまでの検討では冠動脈結紮モデルを用いてきたが、ヒトにおいては冠動脈硬化とその進行にともなう血栓閉塞を考慮する必要があり、それに関与する血管の炎症を考える必要もある。本研究と並行して、マウスの大動脈瘤モデルを用いたコルヒチンの血管炎症抑制効果も検討した。大動脈瘤は ApoE ノックアウトマウスにインフュージョンポンプを用いて angiotensinII を持続投与して誘発した。同時に 0.1 mg/kg/day のコルヒチンまたは PBS をゾンデを用いて経口投与した。その後、解剖し下行大動脈瘤のサイズ測定および組織中の IL-1、TNF- α の mRNA 発現を RT-PCR で評価した。結果、コルヒチン群で動脈瘤の形成が抑制され、IL-1、TNF- α の mRNA 発現はコルヒチン群で抑制される傾向がみられた(図 4)。

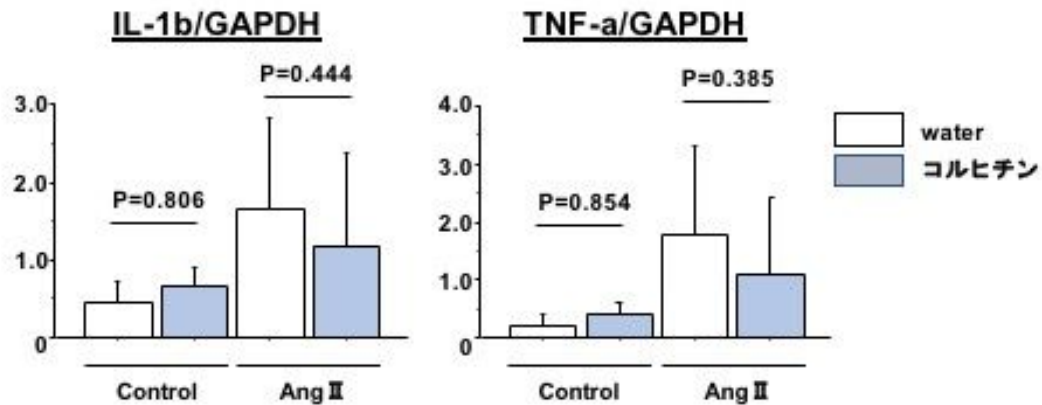


図4. コルヒチン群では大動脈瘤における炎症性サイトカインを抑制する傾向がみられた

まとめ

本研究は、コルヒチンが梗塞心筋局所の過剰な炎症反応を抑制し、それには NLRP3 インフラマソームを介した炎症抑制メカニズムが関与する可能性を初めて示した。本研究結果は今後の心血管疾患の新たな治療開発に影響を与えるものと考えられる。しかし、NLRP3 インフラマソーム阻害モデルを用いた検証が不十分であること、また血管の炎症抑制効果の検討は不十分であることから引き続き心血管領域におけるコルヒチンの抗炎症作用のメカニズムについて検証を続けていく。

<引用文献>

- Schjerning Olsen AM, Fosbol EL, Lindhardsen J, Folke F, Charlot M, Selmer C, et al. Duration of treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and impact on risk of death and recurrent myocardial infarction in patients with prior myocardial infarction: A nationwide cohort study. *Circulation* 2011; **123**: 2226 - 2235.
- Giugliano GR, Giugliano RP, Gibson CM, Kuntz RE. Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; **91**: 1055 - 1059.
- Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1021 - 1031.
- Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; **123**: 594 - 604.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koichiro Fujisue, Koichi Sugamura, Hirofumi Kurokawa, Junichi Matsubara, Masanobu Ishii, Yasuhiro Izumiya, Koichi Kaikita, Seigo Sugiyama.	4. 巻 81
2. 論文標題 Colchicine Improves Survival, Left Ventricular Remodeling, and Chronic Cardiac Function After Acute Myocardial Infarction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1174 1182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-16-0949.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤末 昂一郎、泉家 康宏、海北 幸一、辻田 賢一
2. 発表標題 心血管領域におけるコルヒチンの動向
3. 学会等名 第14回Cardiovascular Translational Research Conference（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----