

平成22年5月31日現在

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2007～2009

課題番号： 19590830

研究課題名(和文) 心臓樹状細胞を賦活化するメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Cardiac Dendritic Cell and Its Activation Mechanism

研究代表者

和泉 徹 (IZUMI TORU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：80143775

研究成果の概要(和文)：

心筋特異的タンパクである心筋ミオシンに着目し、この抗原感作によるラット自己免疫性心筋炎・心筋症モデル(EAM)を検索した。本モデルはTリンパ球による細胞性免疫が主病態である。研究の結果、T細胞エピトープの同定、ミオシン特異反応性Tリンパ球株の樹立、さらにこの細胞株を移注する心筋炎トランスファーモデルの作成に成功した。EAMの病態のさらなる解明には心筋免疫を特異的に賦活する免疫担当細胞、特に心臓樹状細胞の動態検索が欠かせない。本研究を遂行したところ、心臓樹状細胞を含めた免疫担当細胞の探索には対象細胞の標識化が必須であることが明らかとなった。そこで、今回、GFPトランスジェニックラットの開発に成功し、免疫担当細胞の局所動態の観察がはじめて可視化された。現在、①GFP発現心筋炎惹起性Tリンパ球株の樹立と細胞移注によるEAMの惹起実験、②移注した免疫担当細胞の体内動態観察および心臓局所での組織学的同定、などの研究を次々と展開している。

研究成果の概要(英文)：

Cardiac autoimmunity is an attractive scenario among cardio-immunologists. It well explains a pathomechanisms of dilated cardiomyopathy. Thus, employing a cardiac specific protein, cardiac myosin, a unique rat model of experimental autoimmune myocarditis/cardiomyopathy (EAM) has been established. Cell-mediated immunity by the T lymphocyte is essentially working in this model. To our best knowledge, identification of the T cell epitope, establishing myosin autoreactive T cell line and provoking myocarditis by transfer of this cell line into healthy rat have been already achieved. At the present time, to investigate further mechanism of the cell-mediated immunity, it requires cellular labeling of the target cell including the cardiac dendritic cell. By applied bioengineering of GFP expression transgenic rat, presently the following studies are developing, ① dynamical observation on immune cells which provoke myocarditis/cardiomyopathy, ② EAM transferred by GFP expression myocarditogenic T lymphocyte and histological identification of the immune cells in situ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：反応性T細胞、心臓樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

心臓樹状細胞は心筋における免疫応答において極めて重要な役割を担っている。にも拘らず、その実像はほとんど解明されていない。未解決な点が多いことから、自己免疫性心筋症の本体ばかりでなく、慢性心不全患者における免疫応答の解明をも遅らせる要因になっている。我々が開発した自己免疫性心筋炎/心筋症のラットモデルは心臓樹状細胞の大量動員が実験的に容易であるばかりでなく、形態的にもグローブ状の樹状突起を持つ特徴的なマトリックス細胞として判別・検出することが出来る。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、①心臓樹状細胞を賦活化させるリガンド刺激の同定とそのメカニズムの解明、②賦活化刺激毎の心臓樹状細胞内のシグナル伝達に関する検索、③自己免疫応答の様式と効果に与える影響解明、といった自己免疫性心筋症発症にまつわる心臓樹状細胞の役割と全貌を明らかにしようとして企画された。

3. 研究の方法

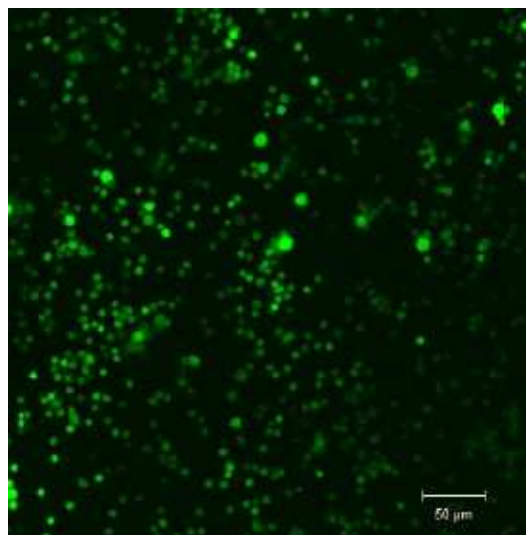
提出した計画に従い、実験的自己免疫性心筋炎/心筋症のラットモデルを対象に、①心臓組織を用いた樹状細胞の形態・サブセット解析、②心臓樹状細胞の抗原提示能の解析、③心臓樹状細胞の起源と動態の観察、④心臓樹状細胞を用いた免疫応答制御の解析、⑤心臓樹状細胞を用いた各種心疾患の治療法の確立、の順に行われた。

4. 研究成果

三年間の取り組みの結果、心臓樹状細胞を含めた病変形成を担当する免疫細胞の挙動を探索するためには標的細胞のラベル化が

必須であることが徐々に明らかとなった。

今までの研究成果として心筋ミオシン内のT細胞エピトープ同定に成功し、さらにはミオシン内ペプチドCM2 (aa. 1539-1555) に対する特異的Tリンパ球株(MTL)を確立した。そしてMTLを健常ラットへの移注により重症心筋炎(tEAM)を惹起することが再現された。tEAMの病態解明は結果としての現象の検証にはなるが、MTL細胞や心筋樹状細胞がどのような体内循環動態を示すのか、これらの免疫担当細胞が心筋組織内でどのような作用をしているのか、さらには心筋炎症の慢性化メカニズムの解明は極めて困難であった。その理由として、病変惹起を担う免疫細胞の挙動を探索するためには標的細胞のラベル化が必要不可欠であることが挙げられる。生体から取り出すマトリックス細胞であるため技術的に極めて困難なためである。そこで、新たに開発されたGFPトランスジェニックLEW-Tg(CAG-EGFP)1Ysラットの応用に

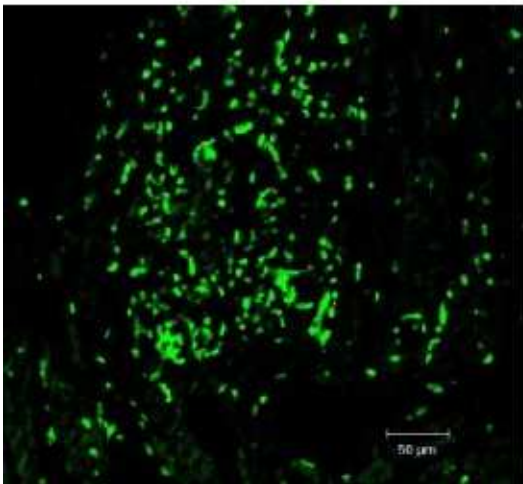


より、GFP の MTL へのラベル化に成功した。以後、次々に免疫担当細胞の体内動態や心臓局所での病態形成が可視化された（上の図参照： 確立された GFP で可視化された心筋炎惹起性 T 細胞株や心筋樹状細胞、Yanagisawa T, Inomata T, Takehana H, Izumi T et al: Novel Experimental Model of Autoimmune Myocarditis Induced by Green-Fluorescent-Protein-Expressing T Cell Transfer. 第 74 回 日本循環器学会総会・学術集会、2010 年 3 月 7 日、京都にて発表）。

これにより、免疫担当細胞の体内動態や心臓局所での病態形成の詳細な検索がはじめて可能となってきた。現在、次の二つの結果を得ている。

① GFP 発現心筋炎惹起性 T リンパ球株の樹立と細胞移注による EAM の惹起実験

我々が樹立した GFP 発現心筋炎惹起性 T リンパ球株 (GFP-Tg MTL) は 99% の GFP 発現および 99% の CD4 陽性を呈しており、CM2 に特異的な抗原特異性を有していた。また、この細胞株は GFP ラベル化されていない従来の心筋炎惹起性 T リンパ球株と同等の CD4 陽性率を呈しており、3H サイミジン取り込み能も同等であった (40788 ± 4495 vs 27992 ± 2488 cpm, NS)。同細胞株を naive ラットの尾静脈から細胞移注した t EAM (GFP-Tg tEAM) において、control MTL を移注し惹起させた従来の tEAM (Control tEAM) と比して、臨床像の差異はなかった (心筋炎マクロスコア: 2.5 ± 0.6 vs 2.4 ± 0.5 , NS)。



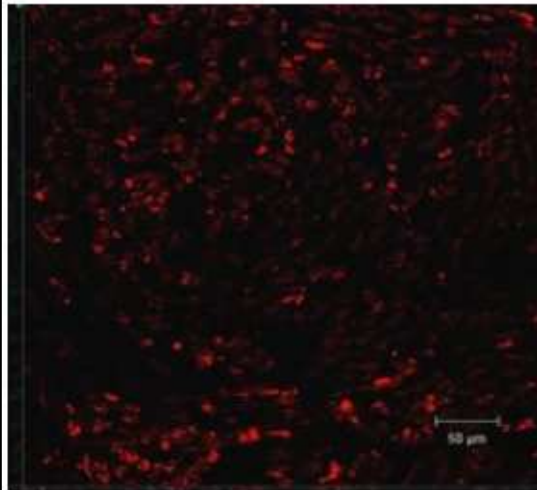
(心筋炎をトランスファーされた心筋組織内にみられた心筋炎惹起性 T 細胞)

(Yanagisawa T, Inomata T, Izumi T et al: Role of Experimental Autoimmune Myocarditis on Green-Fluorescent-

Protein-Expressing T Cells. XXth World Congress of International Society for Heart Research. 2010 年 5 月 14 日、京都にて発表予定)

② 移注した免疫担当細胞の体内動態観察および心臓局所での組織学的同定、

GFP-Tg MTL を細胞移注により心臓組織内に第 5 病日より GFP-Tg MTL の出現を認めた。すなわち、GFP-Tg MTL は細胞移注後一定のタイムラグをおいて心臓への浸潤をきたした。しかし、GFP-Tg MTL の心臓内への浸潤は第 7 病日をピークに減少に転ずるものの心筋組織そのものの炎症細胞浸潤は増悪を続け、その構成の主体は GFP 陰性の CD4 陽性 T リンパ球 (ホストの naive ルイスラット由来細胞) に移行する。それらの T 細胞は CD4 陽性であった (下図参照)。



(Mizutani T, Inomata T, Izumi T et al: Immunomodulatory Effects of Amiodarone to Ameliorate Rat Autoimmune Myocarditis. XXth World Congress of International Society for Heart Research. 2010 年 5 月 14 日、京都にて発表予定)

これら成果に続くプロジェクトが次々と展開している。

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 2 件)

- ① Inuzuka Y, Okuda J, Izumi T (他 13 名). Suppression of Phosphoinositide 3-Kinase Prevents Cardiac Aging in Mice. *Circulation*. 2009;120:1695-703 (査読あり).

- ② Yoshida Y, Shioi T, Izumi T.
Resveratrol Ameliorates Experimental
Autoimmune Myocarditis. Circulation J
2007;71: 397-404 (査読あり).

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yanagisawa T, Inomata T, Takehana H,
Izumi T (他 10 名) : Novel Experimental
Model of Autoimmune Myocarditis
Induced by Green-Fluorescent-Protein-
Expressing T Cell Transfer. 第 74 回
日本循環器学会総会・学術集会、2010 年 3
月 7 日、京都.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：蛍光ラベル化した心筋炎惹起性細胞株
の樹立および自己免疫性心筋炎の病態解明
への応用

発明者：柳澤智義、猪又孝元、和泉 徹

権利者：柳澤智義、猪又孝元、和泉 徹

種類：特許

番号：2010-022369

出願年月日：2010 年 2 月 3 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 徹 (IZUMI TORU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：80143775

(2) 研究分担者

猪又孝元 (INOMATA TAKAYUKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20311954

竹端 均 (TAKEHANA HITOSHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30296446