

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03442

研究課題名(和文) 拡張型心筋症における慢性炎症の病態メカニズムの解明と層別化

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiological mechanism of chronic inflammation and risk stratification of dilated cardiomyopathy.

研究代表者

吉田 恭子(今中恭子)(Imanaka-Yoshida, Kyoko)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00242967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋炎は、ウイルス感染に起因する自己免疫反応による疾患であるが、一部の症例は慢性化し拡張型心筋症に移行する。本研究では、ヒト心筋生検標本261例を解析して予後と対比し、CD3陽性細胞 $24/\text{mm}^2$ 以上を慢性心筋炎の組織診断基準とした。また、急性心筋炎生検30例生検検体を網羅的病原体検索システムにより解析し、Parvovirus B19、HHV-6Aが1例ずつ検出された。さらに、炎症慢性化の分子メカニズムを解析するために、組換えBCG(rBCG-MyHC)投与によるマウス慢性心筋炎モデルを確立し、細胞外タンパクテネイシンCがリンパ管新生を抑制することにより炎症を持続させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)はいろいろな病因・病態の入り混じった疾患群の総称であり、慢性心筋炎は主要な原因の一つと考えられてきた。慢性心筋炎は遺伝子変異による他の型のDCMと異なり、免疫抑制剤によって進行を止めることができると考えられるが診断は難しい。本研究では心内膜心筋生検によって、理病原体感染の実態を明らかにするとともに組織診断基準を策定した。さらに、慢性心筋炎の動物モデルを確立して病態を解析することにより、炎症慢性化の分子メカニズムの一端が明らかになり、最適化治療法の選択や、新しい治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy (DCM) is a heterogeneous group of myocardial diseases. Chronic myocarditis has been hypothesized to be one of the causes of DCM. Chronic myocarditis needs to be distinguished from other types of DCM because immunosuppressive agents may control disease progression. At present, endomyocardial biopsy is the only way for diagnosis, however, it needs a clear immunohistological criteria. We have performed a nationwide multicenter study of biopsy prove chronic myocarditis. Our data have suggested CD3+ T-lymphocytes count in the biopsied samples may be a risk-stratifying marker for poor long-term outcome and CD3+  $> 24/\text{mm}^2$  could be a threshold for chronic myocarditis. Furthermore, to identify pathophysiological mechanism involved in progression of chronic myocarditis, we have developed a novel mouse model of chronic myocarditis induced by recombinant bacille Calmette-Guerin (rBCG) expressing a CD4+ T-cell epitope of cardiac myosin heavy chain- $\alpha$ .

研究分野：人体病理学

キーワード：心筋炎 拡張型心筋症 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)はいろいろな病因・病態の入り混じった疾患群の総称であり、慢性心筋炎は主要な原因の一つと考えられてきた。心筋炎は一般にウイルス感染に起因する自己免疫反応、特に細胞性免疫によると理解されている。一般には一過性経過をとるが、一部の症例はウイルスの持続感染あるいは免疫制御機構の異常により、炎症が持続し、最終的にDCMに移行する。このような慢性心筋炎は、遺伝子異常を原因とする他のDCMと異なり、ステロイドや免疫抑制療法によって重症心不全への移行を予防できることが期待される。現在、慢性心筋炎の唯一の診断法は心内膜心筋生検であるが、確立された客観的診断基準、治療指針はない。さらに、最近、種々の病態で慢性炎症が注目されるに伴って、炎症細胞浸潤を伴う炎症性拡張型心筋症(inflammatory DCM: iDCM)という疾患群が新たに提唱されるようになったが、慢性心筋炎と概念・用語が混乱している。

### 2. 研究の目的

本研究では、心筋生検によって「慢性心筋炎」と診断された症例のレジストリーを構築し、心筋生検標本を解析して「慢性心筋炎」の実態を把握し、疾患概念を整理し、組織診断基準を策定する。さらに、慢性心筋炎の動物モデルを確立して病態を解析することにより、炎症慢性化の分子メカニズムを明らかにし、それを応用した新しい治療法の開発と、最適な治療法選択のための診断法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性心筋炎レジストリーの臨床観察研究による実態調査

慢性心筋炎は、急性心筋炎として発症し炎症が持続する遷延性慢性心筋炎と、気づかないうちに心筋炎を発症し拡張型心筋症に移行する不顕性慢性心筋炎の2つに分けられ、医療機関受診時の臨床像が大きく異なる。そこで以下の2つに分けてレジストリーを構築し、心筋生検組織の解析を行なった。

不顕性心筋炎：拡張型心筋症として受診し、心筋生検を施行した症例:

Multicenter Registry to Investigate Inflammatory Cell Infiltration in Dilated Cardiomyopathy in Tissues of Endomyocardial Biopsy-2: INDICATE-2)

遷延性心筋炎：急性心筋炎として受診し、心筋生検で確定診断した症例:

Multicenter observational prospective study of biopsy-proven acute myocarditis: MERCURY)

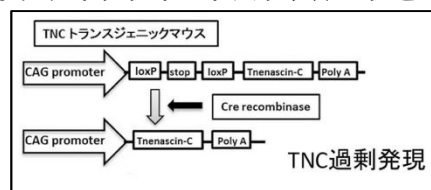
#### (2) マウス慢性心筋炎モデルの樹立

心筋ミオシン自己抗原エピトープ遺伝子を組み込んだ組換え BCG (rBCG-MyHCα)

投与によるマウス慢性心筋炎の誘導

テネascin C 過剰発現マウスを用いた心筋炎モデル: Matricellular protein の一つ

テネascin C(TNC)は、炎症とともに発現が上昇し、ポジティブフィードバックループを作って炎症を増強する。我々の作製したマウスでは Cre recombinase が作用すると stop コドンはずれ、TNC が過剰発現する(右図)。そこで MHC プロモーター Cre マウスとの F1 により心臓特異的 TNC 過剰発現マウスを作成する。さらに、このマウスに心筋ミオシンペプチド (MyHCα) と Complete Freund's adjuvant (CFA) を投与して自己免疫性心筋炎モデルを作成する。



### 4. 研究成果

#### (1) 日本における慢性心筋炎の実態

炎症性拡張型心筋症の診断

INDICATE2 の先行研究である後ろ向き研究 INDICATE 261 例の心筋生検組織について、ヨーロッパ心臓病学会から提唱されている炎症性拡張型心筋症の診断基準 CD3 ( $\geq 7 /\text{mm}^2$ ) + CD68 ( $4 /\text{mm}^2$  まで数えてよい)  $\geq 14 /\text{mm}^2$

を適用すると 48% (124/261) の症例が炎症性拡張型心筋症に分類され、12 年間の follow up 期間の予後は、炎症のない症例より悪かった (図 1)。心筋生検組織中の数を調べると、CD3 と CD68 にはごく弱い相関がみられた。しかし、炎症性拡張型心筋症に分類された症例の組織炎症像は多彩で、日本の組織診断基準「炎症細胞浸潤とそれによる心筋細胞傷害」では心筋炎と診断し難い症例も見られた。

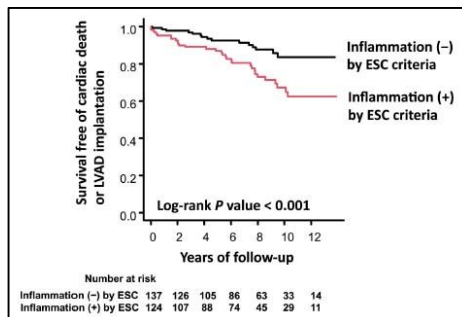


図 1. 引用文献 より

### 慢性心筋炎の（仮）組織診断基準の策定

ヨーロッパでは炎症性拡張型心筋症例に対して、ウイルス感染がないことを確認した上で、免疫抑制剤による治療が推奨されているが、これに従うと日本の DCM 患者の 50% を免疫抑制剤投与の対象となる。そこで、炎症のある患者をさらにリスク層別化する必要があると考えた。

また、心筋炎の炎症の主体が、理論的にはリンパ球による獲得免疫であることから CD3 つまり T 細胞だけで分けられるのではないかと予想し、心血管死、心移植、補助人工心臓埋め込みなしの生存率をアウトカムとして CD3 との相関を Akaike Information Criterion and log-rank test を使って解析するとカットオフ値 13, 24 / mm<sup>2</sup> で 3 群に分けられ、CD3 が 24 / mm<sup>2</sup> 以上のものは著しく予後が悪かった（図 2）。この結果に基づいて CD3 陽性 T 細胞  $\geq 24/\text{mm}^2$  を慢性心筋炎の組織診断基準とした。

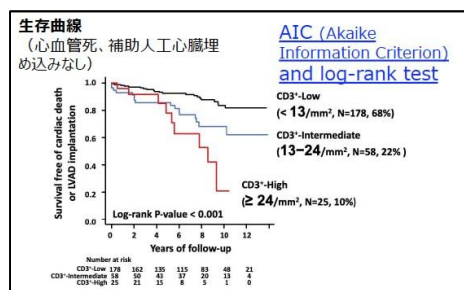


図 2. 引用文献 より改変

### 心筋炎症例の心筋組織の病原体感染の検索

MERCURY に登録された急性心筋炎 33 例について、凍結心筋組織を網羅的 PCR スクリーニングによって既知の病原体解析を行なったところ Parvovirus B19, Human polyomavirus 2, Human herpesvirus 6, Staphylococcus aureus 各 1 例が検出されたが、現在のところ病原性に関しては不明である。

## (2) マウス慢性心筋炎モデル

心筋ミオシン自己抗原エピトープ遺伝子を組み込んだ組換え BCG (rBCG-MyHC) 投与によるマウス慢性心筋炎

CD4<sup>+</sup>T-cell の心筋ミオシンエピトープと ヘルパー T 細胞の Th1, Th17 反応を強く誘導することが知られている Mycobacterium kansasii 由来抗原 Ag85B の fusion protein による組換え BCG (rBCG-MyHC) を単独投与すると、35% のマウスの心臓に単核球浸潤クラスター形成を誘導できた。この反応を強化するために rBCG-MyHC 投与前に、単独では心筋炎を起こさない量の MyHC と Complete Freund's adjuvant (CFA) を投与しておく（図 3）、rBCG-MyHC 投与後 12 週まで心筋内に活動性の炎症病巣が見られ、急性心筋炎から移行した慢性心筋炎モデルを作成することができた。

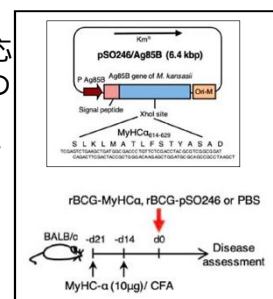


図 3. 引用文献 より改変

### TNC 過剰発現マウスの心筋の炎症

C57BL/6 バックグラウンドのマウスでは、MyHCα プロモーターにより胎児期から心臓特異的に TNC の過剰発現が誘導できた。8-12 週令の成体マウスでは、心臓形体、心機能には特に変化を認めず、組織学的には炎症細胞浸潤は認められなかった、IL-1β, IL-6, CCL1, CCL2, CCL10 など炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が有意に高かった。線維化、心筋細胞肥大も認めなかった。このマウスを用いて心筋梗塞モデルを作成すると、急性期の炎症が増強して心破裂を起こし、生存率が有意に低かった。さらに、マウスの尾リンパ浮腫モデルによって、炎症の消褪に重要と考えられているリンパ管の新生を抑制するという結果が得られ、TNC の持続過剰発現により、心筋炎の炎症持続、慢性化状態が誘導できることが期待された。しかしながら、心 MyHCα と CFA による心筋炎モデルを作成するために、バッククロスにより作成した BALB/C バックグラウンドのトランスジェニックマウスでは、TNC の過剰発現レベルの個体差が大きく、さらに心筋炎を誘発すると TNC が下がってしまう傾向が見られ、心筋炎での テネascin C 持続過剰発現状態を安定させることが困難であり、結果を得るに至らなかった。

### < 引用文献 >

- Ohta-Ogo K, Sugano Y, Ogata S, Nakayama T, Komori T, Eguchi K, Dohi K, Yokokawa T, Kanamori H, Nishimura S, Nakamura K, Ikeda Y, Nishimura K, Takemura G, Anzai T, Hiroe M, Hatakeyama K, Ishibashi-Ueda H, Imanaka-Yoshida K. Myocardial T-Lymphocytes as a Prognostic Risk-Stratifying Marker of Dilated Cardiomyopathy - Results of the Multicenter Registry to Investigate Inflammatory Cell Infiltration in Dilated Cardiomyopathy in Tissues of Endomyocardial Biopsy (INDICATE Study). *Circ J* 2022, 10:21-0529.
- Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Tsujimura Y, Matsuo K, Hiroe M, Aonuma K, Ieda M, Yasutomi Y. A New Mouse Model of Chronic Myocarditis Induced by Recombinant Bacille Calmette-Guérin Expressing a T-Cell Epitope of Cardiac Myosin Heavy Chain- $\alpha$ . *Int J Mol Sci*. 2021, 22:794-794.
- Yonebayashi S, Tajiri K, Hara M, Saito H, Suzuki N, Sakai S, Kimura T, Sato A, Sekimoto A, Fujita S, Okamoto R, Schwartz RJ, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Generation of Transgenic Mice that Conditionally Overexpress Tenascin-C. *Front Immunol*. 2021, 12:620541.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohta-Ogo, K. Sugano, Y. Ogata, S. Nakayama, T. Komori, T. Eguchi, K. Dohi, K. Yokokawa, T. Kanamori, H. Nishimura, S. Nakamura, K. Ikeda, Y. Nishimura, K. Takemura, G. Anzai, T. Hiroe, M. Hatakeyama, K. Ishibashi-Ueda, H. Imanaka-Yoshida, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Myocardial T-Lymphocytes as a Prognostic Risk-Stratifying Marker of Dilated Cardiomyopathy - Results of the Multicenter Registry to Investigate Inflammatory Cell Infiltration in Dilated Cardiomyopathy in Tissues of Endomyocardial Biopsy (INDICATE Study)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 529-529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-21-0529	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 Maruyama K, Imanaka-Yoshida K	4. 巻 23
2. 論文標題 The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2617-2617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052617	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 Hirono K, Takarada S, Okabe M, Miyao N, Nakaoka H, Ibuki K, Ozawa S, Origasa H, Ichida F, Imanaka-Yoshida K	4. 巻 37
2. 論文標題 Clinical significance of chronic myocarditis: systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 300-314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-021-01914-y.	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 Imanaka-Yoshida K	4. 巻 22
2. 論文標題 Tenascin-C in Heart Diseases-The Role of Inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 5828-5828
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22115828.	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 Yonebayashi S, Tajiri K, Hara M, Saito H, Suzuki N, Sakai S, Kimura T, Sato A, Sekimoto A, Fujita S, Okamoto R, Schwartz RJ, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of Transgenic Mice that Conditionally Overexpress Tenascin-C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 620541-624501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.620541. eCollection 2021.	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 Tajiri, K. Imanaka-Yoshida, K. Tsujimura, Y. Matsuo, K. Hiroe, M. Aonuma, K. Ieda, M. Yasutomi, Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 A New Mouse Model of Chronic Myocarditis Induced by Recombinant Bacille Calmette-Gerin Expressing a T-Cell Epitope of Cardiac Myosin Heavy Chain-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 794-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020794.	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 Kawada JI, Takeuchi S, Imai H, Okumura T, Horiba K, Suzuki T, Torii Y, Yasuda K, Imanaka-Yoshida K, Ito Y	4. 巻 77
2. 論文標題 Immune cell infiltration landscapes in pediatric acute myocarditis analyzed by CIBERSORT.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cardiol	6. 最初と最後の頁 174-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2020.08.004.	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 Kyoko Imanaka-Yoshida	4. 巻 70
2. 論文標題 Inflammation in myocardial disease: From myocarditis to dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12868	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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今中 恭子
2. 発表標題 Chronic myocarditis and inflammatory DCM
3. 学会等名 第85回日本循環器学会総会 特別セッション慢性心筋炎とinflammatory DCM
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今中恭子
2. 発表標題 心筋炎から拡張型心筋炎へ
3. 学会等名 第25回日本心不全学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今中恭子
2. 発表標題 Tenascin-Cによる心血管の炎症と線維化の制御
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会シンポジウム 心血管と結合織（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今中恭子
2. 発表標題 心血管における細胞外マトリックス分子Tenascin-Cの役割
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会シンポジウム「細胞外マトリックス研究の現状と最新知見」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今中恭子
2. 発表標題 慢性心筋炎と炎症性拡張型心筋症
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今中恭子
2. 発表標題 心筋症の最近の話題：inflammatory DCMと慢性心筋炎
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kyoko Imanaka-Yoshida
2. 発表標題 Diverse roles of tenascin-C in myocardial tissue repair.
3. 学会等名 FASEB science research conference: The Matricellular Proteins in Tissue Remodeling and Inflammation Conference. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	植田 初江  (Ishibashi-Ueda Hatsue)  (40522983)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員   (84404)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	田尻 和子 (Tajiri Kazuko)  (60633914)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	
研究分担者	奥村 貴裕 (Okumura Takahiro)  (60635598)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  (13901)	
研究分担者	廣江 道昭 (Hiroe Michiaki)  (80101872)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医師  (82610)	
研究分担者	宇都 健太 (Uto Kenta)  (80318071)	東京女子医科大学・医学部・助教  (32653)	
研究分担者	俵 功 (Tawara Isao)  (80378380)	三重大学・医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	鈴木 忠樹 (Suzuki Tadaki)  (30527180)	国立感染症研究所・感染病理部・部長  (82603)	
研究分担者	長谷川 秀樹 (Hasegawa Hideki)  (30301790)	国立感染症研究所・インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター・センター長  (82603)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------