

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09401

研究課題名(和文) コクサッキーアデノウイルス受容体膜外ドメインの自己免疫性心筋炎における治療的意義

研究課題名(英文) A therapeutic role of coxsackie adenovirus receptor extracellular domain in autoimmune myocarditis

研究代表者

西井 基継 (NISHII, Mototsugu)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：20383573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋炎は心筋を主座とした炎症性疾患であり、心原性ショックという生命危機を来す劇症型心筋炎に移行する。本研究では、治療標的分子として心筋炎を惹起する代表的なコクサッキーウイルスに対応する受容体(CXADR)に注目した。マウス自己免疫性心筋炎モデル(EAM)において、CXADR発現は心筋炎極期においては血管内皮細胞および心臓間質に強く、心筋炎後には間質の発現は低下していた。故に、CXADRは心筋炎の発症進展において重要である可能性が示唆された。現在、血管内皮あるいは間質特異的CXADR欠損マウスを構築しており、今後はEAMを誘発することでCXADRのEAMにおける機能的意義を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義に関して、CXADRは、心臓炎症および炎症後心筋細胞外マトリックス代謝における新たな制御分子として作用することが明らかとされる。さらに、ウイルス受容体の心不全治療標的としての新たな意義が明らかとされる。

社会的意義として、最近心不全患者患者急増しており、今後パンデミックを引き起こすことが厚生労働省の調査により試算されている。このような背景から、本研究によりCXADRの治療的意義が明らかとされれば、心不全パンデミックの軽減および抑止に繋がり、この結果医療経済学的にも有効な影響を及ぼすことができる。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiology of myocarditis is represented by fatal cardiogenic shock. We focused on coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) as a therapeutic molecular target. We established animal model for myocarditis, experimental autoimmune myocarditis (EAM). We found unique expression pattern of CXADR in the hearts isolated from EAM, dependent of disease phase from active inflammation to post-inflammation. CXADR protein expression was strongly increased in endothelial cell and interstitial cell during phase of myocardial inflammation, while its expression was extremely diminished in interstitial cell post-inflammation. These expression patterns suggest that CXADR plays a crucial role in the development of not only myocarditis but also post-inflammatory cardiomyopathy. To evaluate this hypothesis, we are making knock-out mice of CXADR specific for vascular endothelium or interstitium. Ultimately, we will define therapeutic and pathological role of CXADR in EAM.

研究分野：心不全 炎症免疫機構

キーワード：自己免疫応答 心筋炎 ウイルス受容体 血管内皮 心臓間質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋炎は心筋を主座とした炎症性疾患である。感冒症状に引き続く胸部症状を主訴にしばしば救急外来で経験される。そのうち、ショックを来す劇症型心筋炎に移行する頻度は不明であるが、申請者らの研究では約 20% である(Nishii, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:1292-1297.)。さらに、本邦における全国調査では、劇症型心筋炎の救命率は心原性ショックに対する体外循環導入にも関わらず 50% 程度と高くない(Aoyama, et al. *Circ J.* 2002; 66:133-144.)。この要因として、心筋組織炎症に対する治療戦略が確立していないことが挙げられる。この問題は、心筋炎の複雑な免疫機序を反映している(Rose, et al. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 80:92-99.)。したがって、ウイルス感染のみならず引き続き自己免疫応答を網羅的に制御する分子ターゲットが求められてきた。

近年、心筋炎を惹起する代表的なコクサッキーウイルスに対応する受容体、即ちコクサッキーアデノウイルス受容体(CXADR)の存在が内皮細胞や心筋細胞等で同定された(Bergelson, et al. *Science.* 1997; 275:1320-1323.)。CXADR の制御は、心筋組織へのコクサッキーウイルスの感染を抑制し、結果的に心筋炎を減弱することが示された(Shi, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53:1219-1226.)。さらに、CXADR は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、膜外、膜貫通および膜内ドメインから成る。特に、血管内皮細胞の CXADR 膜外ドメインは、抗原提示細胞や memory T 細胞および好中球を含む免疫細胞上の他の接着タンパク、例えば JAML (Junctional Adhesion Molecule-Like) と異種間分子結合を形成することで、循環免疫細胞の血管内皮への遊走・接着を誘導し、内皮細胞間ジャンクションの通過を可能とする結果、その組織浸潤を促進することが報告されている(Zen, et al. *Mol Biol Cell.* 2005; 16:2694-2703.) (図 1)。矛盾せず、CXADR 過剰発現マウスでは、コクサッキーウイルスが感染していなくても心筋組織への炎症細胞浸潤が認められた(Yuen, et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50:826-840.)。これらの所見に基づいて、CXADR シグナルの制御によりウイルス感染および引き続き自己免疫応答を網羅的に抑制できるかもしれない。

2. 研究の目的

“CXADR が自己免疫性心筋炎の治療標的となり得る”ことを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 実験的自己免疫性心筋炎モデル(Experimental autoimmune myocarditis: EAM)の作製
完全フロントアジュバンドと共に心筋ミオシンペプチドを 6 週齢雄 Balb/c マウスに免疫した。

(2) EAM における CXADR 発現

経時的に心臓を摘出し、タンパクおよび RNA を抽出した後、ウエスタンブロットおよび real-time quantitative PCR にて CXADR 発現を解析した。CXADR 局在を、心臓組織免疫染色にて解析した。

(3) 血管内皮特異的 CXADR 欠損マウス作製と EAM 誘発

C57/B6j 背景 CXADR^{flox} マウスおよび C57/B6j 背景 Tec Cre マウスをそれぞれ Balb/c 背景へバッククロスし、交配することで Balb/c 背景血管内皮特異的 CXADR 欠損マウスを作製し、ミオシン免疫を行う。

(4) 心臓線維芽細胞特異的 CXADR 欠損マウス作製と EAM 誘発

C57/B6j 背景 CXADR^{flox} マウスおよび C57/B6j 背景コラーゲン 1 型 2 Cre マウスをそれぞれ Balb/c 背景へバッククロスし、交配することで Balb/c 背景心臓線維芽細胞特異的 CXADR 欠損マウスを作製し、ミオシン免疫を行う。

(5) CXADR 遺伝的欠損の表現型に対する影響

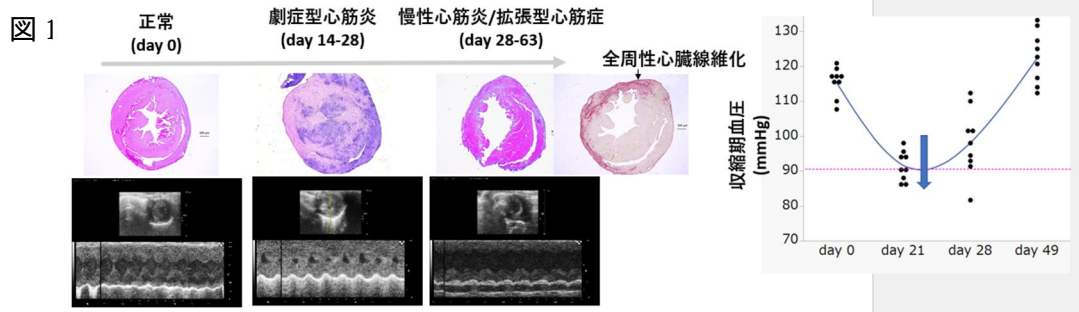
心エコーによる心機能および心拡大を評価する。病理組織学的解析として、ホルマリンに浸漬した心臓の組織をパラフィン包埋後、ヘマトキシリン-エオジン染色とシリウスレッド染色を行い、心臓への炎症細胞浸潤および繊維化を評価する。

(6) 分子機序解析

摘出した心臓より抽出したタンパクおよび RNA を用いて、western blot、gelatin zymography および RNA sequence を行い、CXADR の DCM に関わる分子シグナルへの影響を解析する。

4. 研究成果

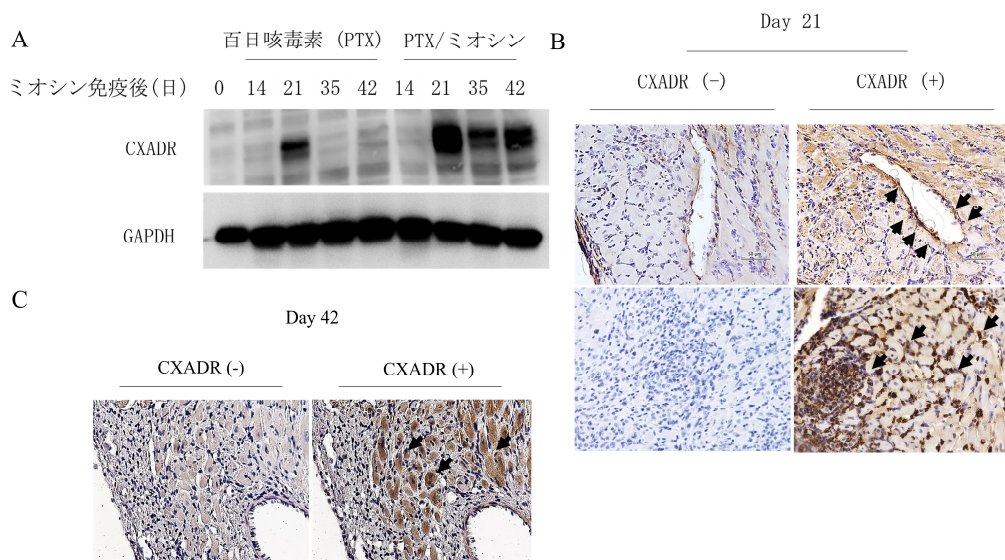
(1) 実験的自己免疫性心筋炎モデル(Experimental autoimmune myocarditis: EAM)の確立



ヒト心筋炎心筋症患者の臨床経過と酷似して、ミオシン免疫後、経時的に 21 日目に心機能低下及び血圧低下を伴う心筋炎を発症し、60 日目には心機能障害および心拡大を特徴とした拡張型心筋症が発症した(図 1)。

(2) EAM における CXADR 発現を明らかにした。

図 2



心臓における CXADR は EAM の心筋炎期より発現し、拡張型心筋症期まで持続した(図 2A)。さらに、興味深いことにその局在は、病期により変化した。即ち、心筋炎期では血管内皮および間質に強く発現していた(図 2B)。一方で、心筋症期においては、間質の発現は認められず、心筋細胞における発現が亢進していた(図 2C)。

(3) 遺伝子改変マウスの作製と表現型に対する解析

CXADR の病期に準じた発現に基づいて、血管内皮特異的 CXADR 欠損の心筋炎に対する効果および間質特異的 CXADR 欠損の心筋症に対する効果を検討することとした。EAM 発症は、マウスの遺伝的背景により大きく影響を受けることが知られている。C57/b6 背景に比較し Balb/c 背景では、心筋炎から心筋症発症に対する感受性が高く、本研究では、Balb/c 背景遺伝子改変マウスを使用する必要がある。従って、C57/b6 背景の *lop* および *cre* マウスの *balb/c* へのバッククロスが必須であり、この過程において多くの年月を必要とした。本研究期間内において、*balb/c* へのバッククロスは完了できなかったが、現在 80%以上の遺伝子類似性は得られており、数か月で完成する見込みである。完成後、EAM を誘発し、上記記載の研究アプローチにより表現型への影響および分子シグナルを解析する予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takakuma Akira, Nishii Mototsugu, Valaperti Alan, Hiraga Haruto, Saji Ryo, Sakai Kazuya, Matsumura Reo, Miyata Yasuo, Oba Nozomu, Nunose Fumiya, Ogawa Fumihiro, Tamura Kouichi, Takeuchi Ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Prostaglandin-E2 receptor-4 stimulant rescues cardiac malfunction during myocarditis and protects the heart from adverse ventricular remodeling after myocarditis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99930-5	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山 雅裕
2. 発表標題 コクサッキ・アデノウイルス受容体（CXADR）の実験的自己免疫性心筋炎モデルにおける発現
3. 学会等名 日本心筋症研究会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------