

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25461108
研究課題名(和文) G蛋白共役受容体とToll様受容体の特異的分子共役による心不全難治性化機転の解明

研究課題名(英文) Exploration for Aggravating Process of Heart Failure Induced by Specific Interaction with G-protein-coupled Receptor and Toll-like Receptor

研究代表者
真田 昌爾 (Sanada, Shoji)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：70593797
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では従来の薬剤治療で予後が改善しない慢性心不全にて、自然免疫を担うIL-33/ST2が新しいストレス応答依存機序として重症化に関与するか検討した。心筋細胞にストレス刺激を加えると心筋肥大・アポトーシスが増加したが、IL-33はGPCR刺激で活性化されるNF- κ BとJNK/p38に選択性を持ち、ST2と共役してそれらを強く抑制した。IL-33遺伝子改変マウスの圧負荷心不全モデルでも、IL-33の修飾が心筋肥厚・肺水腫・心筋収縮低下・炎症細胞浸潤・Th1/Th2サイトカインの発現変化・心筋線維化・心筋肥大に相関していた。よってIL-33が慢性心不全の新たな治療標的となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We and others have reported that ablation of ST2 caused exaggerated cardiac remodeling in both ischemic and non-ischemic HF. We tested whether IL-33 protects myocardium against HF induced by mechanical overload. Following TAC, myocardial mRNA expressions of Th2 cytokines were diminished while those of Th1 were enhanced in IL-33KO mice than in WT mice. After 8-weeks, IL-33KO mice exhibited exacerbated LV hypertrophy, increased chamber dilation, reduced fractional shortening, aggravated fibrosis and impaired survival compared with WT littermates. Accordingly, myocardial mRNA expressions of fibrogenic (TGF- β 1/Collagen3a1) as well as hypertrophic (c-Myc/BNP) molecular markers were also significantly enhanced in IL-33KO mice than those in WT mice. In conclusion, the ablation of IL-33 directly and significantly lead to exacerbate cardiac remodeling with impaired cardiac function and survival upon mechanical stress. These data reveal a potential therapeutic role for IL-33 in non-ischemic HF.

研究分野：循環器内科学

キーワード：慢性心不全 自然免疫 心筋保護

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年本邦を含めた先進諸国にて、生活習慣病の蔓延に伴い急性心筋梗塞等の急性冠症候群の発症数は著増しており、それに対し本邦でも救急・蘇生医療体制の啓蒙・拡充、急性期再灌流療法の普及で急性期死亡(突然死)率は1割まで改善したが、急性期生存例の増加はその後慢性心不全の循環機能低下による著明な日常生活能低下症例の劇的増加を招き、心不全は本邦統計でも今や単一臓器疾患で死因第1位である。更に中等症以上の慢性心不全の5年生存率は急速進行性肺癌と同等に低く、心不全の克服は今や喫緊の医学的・社会的課題である。

(2) かかる現状の中、従来から様々な角度で心不全の成因と治療法に関わる研究がなされ続けているが、EBMの概念に基づき確立された内科治療が過去15年以上に渡り順次導入されたにも関わらず、心不全症例は不幸にもその間の予後改善率は極めて僅かである(Owan et al. N Engl J Med. 2006)。

また心臓移植も、本邦では法改正を経た現在も年間数十例前後と遥かに立ち遅れ、急増する症例数の救済には程遠い。一方iPS細胞を含む外来細胞による心筋再生療法も、マウス等の心筋細胞総数が少ない小動物の心臓で効果的でも、心筋細胞総数がその約100倍~1000倍あるヒト心臓では生着し得る筋肉細胞数は本来の心筋細胞総数の1/104にも満たず、心筋収縮機能や心筋環境の改善にも遠く及ばない現実がある。これらより慢性心不全克服にはやはり既存心筋に対する根本的な保護・改善治療が不可避と言わざるを得ない。

(3) しかし従来の慢性心不全治療のEBMに係る大きな懸案として、病態の多様性がある一方、慢性心不全の病態生理研究が内分泌体液因子・自律神経・サイトカイン・心筋収縮蛋白等の分野に集中し、確立された有効なカスケードがレニン=アンジオテンシン(RAS)系遮断、カテコラミン受容体遮断などほんの少数しかなく、更に普遍的な視点に基づく新しい病態生理機序を発掘していないという大問題があり、特に全身で普遍的に生体調節に関わる重要因子である自然免疫機構による心筋組織保護、心筋収縮能制御に関する研究は、今まで全くと言う程欠落していたのである。

(4) 生物種によって広く保存され、2011年ノーベル医学・生理学賞の受賞対象研究でもあるToll様受容体(TLR)を中心とした自然免疫応答機構は、免疫提示細胞と貪食細胞だけでなく、あらゆる臓器の組織支持細胞による組織構築維持の為に免疫選択・免疫調節制御に関してTLRが特に重要な役割を果たしている事が分かり、TLRの役割に対する研究対象は一気に全身に広がった。骨代謝に関わる造骨細胞・破骨細胞、また脳組織を維持するグリア細胞の一種マイクログリア等

は、マクロファージと類似の性質を発揮しながら骨代謝や脳内構造維持等、組織の恒常性保持に中心的役割を果たし、広く各方面から注目されている(Takayanagi H. Nature Rev Immunol. 2007)。よって心筋組織でも、最大の体積を占める心筋細胞と、支持細胞の役割を果たし心筋組織形態に重要な心筋線維芽細胞等との協調により包括的に形成される心不全の病態生理に関する研究や、それに基づく心臓保護機序の検討がもはや不可欠となってきたのである。

(5) 我々は早い段階から、自己免疫機序の包括的な心不全病態生理及び心筋保護機序への関与を予測し、心不全の動物実験モデルの心筋検体及び心不全症例の臨床検体を用いた発現遺伝子や蛋白連関解析からその関与の解明を進め、初期的結果として数万遺伝子の中から心筋伸展刺激時及び心筋組織圧負荷時における遺伝子発現プロファイルの網羅的検討を通じ、TLRの一種で当時

Orphan受容体とされたST2が心筋組織ストレス下で心筋内に著明な発現増強を示す事に着目した。本申請者のグループは、初期の研究成果から、in vitro心筋細胞伸展刺激やin vivo心筋圧負荷刺激でストレス負荷時に特異的な心筋組織・血液中の著明なST2発現増加(Weinberg et al. Circulation. 2002)を、また大規模臨床試験の解析から心筋梗塞後の血液ST2濃度上昇と短期予後悪化との高い相関性(Shinpo et al. Circulation. 2004)

(図2)を報告し、世界に先駆けST2が心不全の病態生理に重要な可能性を提示し、また本申請者はST2の心臓特異的リガンドが2007年に発見されたIL-33と初めて報告した。興味ある事にIL-33は心筋組織でTLRであるST2受容体シグナルを介し、機械的的刺激下だけでなくRAS系やカテコラミン等主要な心筋ストレス機序を担うG蛋白質共役受容体(GPCR)シグナルの刺激下で増強する心筋肥大、マーカー蛋白発現、心臓リモデリングも強力に抑制する事を初めて突出した(Sanada et al. J Clin Invest. 2007)。なお本発表はJCI Topic of the Issueに選出され、Nature Medicine 2007;13(6)にもResearch Highlight Newsとして掲載された。

2. 研究の目的

本研究では、IL-33/ST2の1)心不全での病態生理学的意義、2)GPCR経路とのストレス応答依存性共役とその分子機序、3)シグナル共役の心不全重症度への寄与の解明、以上を目指した。つまり、

1) この内因性免疫シグナルを担うIL-33/ST2が、心筋負荷や虚血等の心臓ストレスに呼応した心不全で真に病態生理学的な重要性を発揮しているかを検証する

2) GPCR経路が、TLRからNF-kBあるいはp38/JNK活性化に至る分子シグナルの如

何なる伝達因子と外的ストレスシグナル応答依存性にどの様に共役しているか、その分子機序を検討する

3) GPCR 機序と TLR のシグナル共役が真に心不全等の病態の重症度に寄与するかを検証する

以上により、TLR シグナル伝達因子の修飾による心不全の治療が真に成立し得るかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

全ての実験手法は大阪大学動物実験倫理委員会の承認を経て行われた。

(1) 新生仔ラット心筋細胞を既報の手法 (Yokoyama, T., et al. 1999. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 276:H1968-H1976.) で調製し、G 蛋白共役性受容体 (GPCR) 依存性負荷刺激 (AT-1I、フェニレフリン) および酸化ストレス刺激を加え、更に rIL-33 蛋白、既製の ST2 中和抗体及び可溶性 ST2 分画を付加することの有無により細胞保護効果の変化を検討した。

(2) GPCR 刺激で心筋細胞において細胞内刺激伝達シグナルとして活性化された NF- κ B および MAPK (ERK/JNK/p38MAPK) に、rIL-33 を更に付加することにより、係る活性化が抑制されるかを検討した。

(3) GPCR 刺激シグナル以外の刺激因子由来の変化に対する検討を加えるべく、同じく NF- κ B を修飾する TNF- α 刺激、PDGF 刺激による心筋肥大及び心筋アポトーシスの増加に対する IL-33 の効果を併せて検討した。

(4) 一方、8~12 週令の IL-33 遺伝子ノックアウトマウス (IL-33KO) 及び野生株リッターメイト (WT) を用い、広く用いられている方法にて大動脈弓部結紮 (TAC) に伴う圧負荷を惹起し、心筋肥大・心不全モデルを作成した (Rockman HA et al., 1991)。即ち、麻酔・挿管・呼吸器管理下に胸部正中切開を施し、大動脈を直視下にして腕頭動脈のすぐ遠位の大動脈弓部に 7.0 プロリン糸を掛け、27 ゲージ注射針と共に結紮したのち注射針を取り除き閉胸・自然覚醒させた。Sham として 7.0 プロリン糸を掛けて結紮だけしない群を別途設けた。術後 4 週・8 週時にまでの間に、VisualSonics® 超音波システムと 25-55 MHz 接触子を用いて心臓超音波検査を行い、同時に術後 8 週間の生命予後を追跡した。

(5) 8 週後、超音波検査の後に過剰麻酔で Sacrifice したマウス から素早く肺と心臓を採取して秤量し、心臓は心室レベルで 2 分割して各々常温の 10%ホルマリン液に浸し、あるいは液体窒素で急速冷却して -80 °C に保存し、試験に用いた。前者はパラフィン包埋後、心室レベルで水平断切片を作成し、マッソン=トリクローム染色を施し心筋の線維化率を測定する一方、ヘマトキシリン=エオ

ジン染色の $\times 10$ 倍視野で炎症細胞浸潤と線維化を、 $\times 40$ 倍視野で心筋細胞径を、各々測定した。測定には Image J® を補助ソフトとして用いた。

(6) 分離した心室筋組織から RNA Bee (Tel-Test Inc. Friendswood, Texas) を用いた標準プロトコールにて全 RNA を抽出し、cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems, Foster city, CA) にて cDNA 化したのち、ABI PRISM 7000 残基配列検出システム (Applied Biosystems) 及び Taqman® プライマー (Applied biosystems) を用いた標準的方法で TNF- α 、IL-5、c-Myc、BNP 及び TGF- β 1 を、また SYBR-green® プライマー を用いてコラーゲン 3a1 (Coll3a1) 遺伝子の発現量を測定した。Coll3a1 プライマー配列は forward (TGA GTC GAA TTG GGG AGA AT) 及び reverse (TCC CCT GGA ATC TGT GAA TC) を用いた。溶融曲線分析にて PCR 産物の純度を測定し、比較 CT 法にて GAPDH と濃度を比較したうえで、野生株の Sham 対照群と相対的に比較した。

全てのデータは (平均値 \pm 標準誤差) で表示し、群間比較は one-way ANOVA 及び、Tukey の事後検定または two-tailed *t*-test のいずれか適切な方法を用い、P 値 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

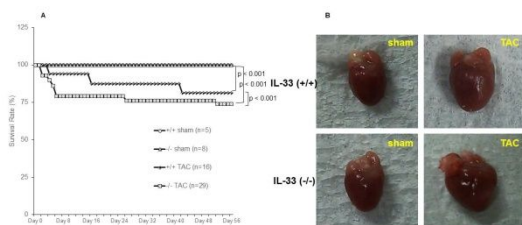
(1) 新生仔ラット心筋細胞に G 蛋白共役性受容体 (GPCR) 依存性負荷刺激 (AT-1I (100nM)、フェニレフリン (50 μ M)) 及び酸化ストレス刺激 (100 μ M) を加え 24 時間培養したところ、各群で心筋細胞面積が増加 (61 \pm 3.4%、64 \pm 5.2%、48 \pm 3.2%) し、TUNEL 陽性の心筋アポトーシス細胞数が対照の約 2 倍~6 倍まで増加したが、これらに rIL-33 蛋白 (100ng/ml) を付加することにより、心筋細胞面積はおしなべて有意に減少 (23 \pm 2.5%、29 \pm 3.1%、19 \pm 3.5%、 $P < 0.05$) し、アポトーシスの程度もほぼ対照レベルまで減少した。更に、既製の ST2 中和抗体及び可溶性 ST2 分画を付加することで、IL-33 による細胞保護効果が消去される (52 \pm 3.8%、73 \pm 4.5%、40 \pm 3.1%、対照群と有意差なし) ことを確認した。これは心筋への物理的伸展刺激に準ずるストレスによる心筋細胞への障害性変化を保護する IL-33 の作用は ST2 との結合による直接的作用であることを示す。

(2) 次に、GPCR 刺激で活性化された心筋細胞における細胞内刺激伝達シグナルとして NF- κ B と MAPK (ERK/JNK/p38MAPK) が活性化されることを確認したが、rIL-33 を更に付加することによってそのうち NF- κ B と JNK/p38 のみが特異的に活性抑制を受けた一方、ERK 及び Akt の活性化は IL-33 による修飾を受けないことを見出した。即ち IL-33/ST2 による心筋細胞保護はシグナルによって選択されている可能性がある。

(3) さらに詳細に検討する為、GPCR 刺激シ

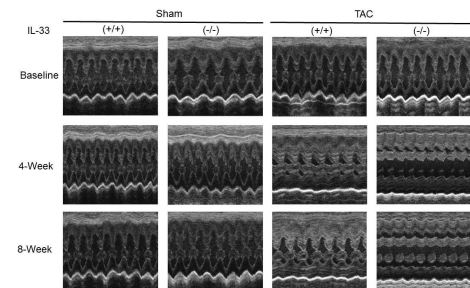
グナル以外の刺激因子由来の変化に対する検討を加えるべく、GPCR 刺激に加え、同じく NF- κ B を修飾する TNF- 刺激・成長因子刺激による心筋肥大及び心筋アポトーシスの増加に対する IL-33 の効果を検討したところ、興味あることに、GPCR 刺激の場合と異なり、IL-33 によって修飾されないことが判明した。つまり、IL-33/ST2 による惹起される細胞内シグナル系は GPCR 受容体刺激特異的に NF- κ B と JNK/p38 を修飾することにより、その保護作用を發揮していることが示唆された。

(4) 生存曲線の検討: カプラン=マイヤー法で予後評価を行った結果、TAC を行った IL-33KO マウス (n=29) は同じ操作を行った WT 株 (n=16) より有意に予後が短縮していた (図 1 A)。シャム操作を行ったマウスは遺伝子改変の有無にかかわらず、試験期間中に死亡例を生じなかった (WT 株, n=5; IL-33KO, n=8)。



(図 1) A: TAC マウスの生命予後。B: 各マウスの実体図。IL-33KO マウスでは心臓肥大の増悪と予後の悪化が見られた。

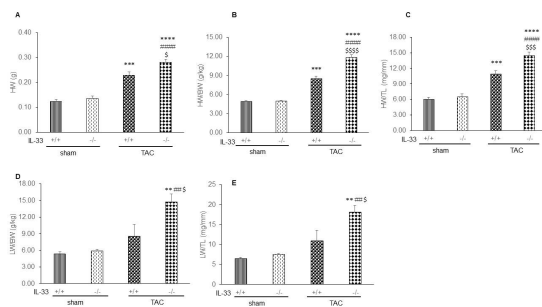
(5) 心筋収縮機能指標: 心臓超音波検査にて、拡張末期心室中隔厚 (IVSd)、拡張末期心筋後壁厚 (LVPWd)、収縮末期径 (LVDs)、収縮末期容量 (LV-Vols)、左室重量体重比 (LVmass/BW) は、WT 群・IL-33KO 群共に、TAC 施行後においてベースライン時、シャム群、いずれに比しても増加しており、左室短縮率 (LVFS) 及び左室駆出率 (LVEF) はいずれに比しても低下していた。しかし左室拡張末期径 (LVDd) と左室拡張末期容量 (LV-Vold) は有意な増加は見られなかった。一方、TAC により IL-33KO マウスにおいて WT 株マウスに比べて IVSd 以外の値が有意に増加しており、LVFS・LVEF はさらに低下していた (図 2)。



(図 2) 心臓超音波検査 M モードにみる各群の左室動態。IL-33KO マウスでは TAC にて誘発される心筋肥大と収縮低下が共に増悪している。

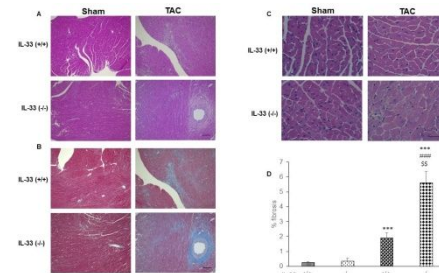
いずれも心拍数 (HR) には変化が見られなかったため、結果として IL-33 の欠損は WT 株に比べて心筋圧負荷による心不全の悪化を惹起したといえる。

形態学的パラメーター: WT 株に比べ、IL-33KO マウスでは TAC により心重量の増加もみられたが、シャム対照群では全く認められなかった。心重量増加は IL-33KO 群のほうが WT 株に比べ著明であった。これらは心重量を体重で補正 (HW/BW) しても、脛骨長で補正 (HW/TL) しても同様であった。湿潤肺重量 (LW) も IL-33KO 群のほうが WT 株に比べ著明に増加し、これらもやはり、体重で補正 (LW/BW) しても、脛骨長で補正 (LW/TL) しても同様であった (図 3)。



(図 3) 心臓の形態学的パラメーターの変化。IL-33KO マウスでは TAC にて誘発される心筋肥大と、湿潤肺重量に反映される肺水腫が共に増悪している。

(6) 炎症及び炎症マーカー分子: TAC により、シャム群に比べて WT 株も IL-33KO マウスも炎症細胞浸潤が有意に増加していたが、IL-33KO マウスで WT 株よりもさらに増加していた (図 4 A)。

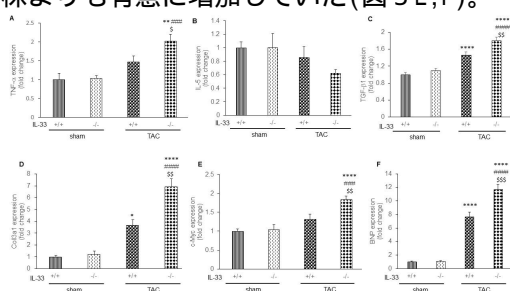


(図 4) 左心室病理切片に見る炎症細胞浸潤と心筋組織線維化の変化。IL-33KO マウスでは TAC にて誘発される炎症細胞浸潤及び心筋組織線維化が増悪している。

また、TAC 下で IL-33KO マウスでは Th1 サイトカイン (TNF- α) は有意に発現増加し、Th2 サイトカイン (IL-5) は逆に発現減少の傾向を示していたが、興味あることにそれらの変化は WT 株の TAC 後では見られなかった (図 5 A, B)。結果として IL-33 の欠損は心筋内で Th1/Th2 の発現アンバランスを惹起したといえる。

心筋線維化とそのマーカー分子: TAC により、WT 株も IL-33KO マウスも心筋切片にて評価した心筋線維化が、ほとんど線維化が見られないシャム対照群に比べて有意に増加しており、さらに IL-33KO マウスで WT 株よりも 2.9

倍増加していた(図4B,D)。
 また、線維化マーカー分子(TGF- β 1 及び Col13a1)も TAC 下で IL-33KO 群、シャム対照群共に、シャム対照群に比べて有意に増加しており、さらに IL-33KO マウスで WT 株よりも有意に増加していた(図5C,D)。
 心筋肥大とそのマーカー分子: TAC により、心筋細胞断面積はシャム群に比べて WT 株も IL-33KO マウスも有意に増加していたが、IL-33KO マウスで WT 株よりもさらに増加していた(図4C)。また、心筋肥大マーカー分子(c-Myc 及び BNP)も TAC 下で IL-33KO 群、シャム対照群共に、シャム対照群に比べて有意に増加しており、さらに IL-33KO マウスで WT 株よりも有意に増加していた(図5E,F)。



(図5) 左室心筋組織における炎症・線維化・心筋肥大マーカーの発現変化。いずれも TAC 後、WT 群に比べて IL-33KO 群で増悪している。

結論として、IL-1R ファミリーST2 の内因性リガンド IL-33 の欠損により、機械的心筋刺激に伴う心筋リモデリングが悪化し、心不全の悪化と生命予後の悪化を惹起した。これらのデータは非虚血性心不全における IL-33 の新たな治療手段としての可能性を示唆するものである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Punniyakoti T Veeravvedu, Shoji Sanada, Tetsuo Minamino.

Ablation IL-33 gene Exacerbate Myocardial Remodeling in Mice with Heart Failure Induced by Mechanical Stress

【第 80 回日本循環器学会学術集会(2016 年 3 月 18 日~20 日、仙台市)】

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:

出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学
<http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真田 昌爾(SANADA, Shoji)
 大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員
 研究者番号: 70593797

(2) 研究分担者

南野 哲男(MINAMINO, Tetsuo)
 大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号: 30379234

肥後 修一郎(HIGO, Shuichiro)
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 00604034

朝野 仁裕(ASANO, Yoshihiro)
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 60527570

塚本 蔵(TSUKAMOTO, Osamu)
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号: 80589151

(3) 連携研究者 なし