

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670193

研究課題名(和文) 病的心筋細胞に対する免疫学的監視による細胞傷害に関する研究

研究課題名(英文) Immune surveillance is involved in cardiomyocyte death in diseased hearts

研究代表者

藤尾 慈 (Fujio, Yasushi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20359839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類では、心筋細胞は、生直後に増殖能を失うため、さまざまな心疾患によって心筋細胞が死ぬと、心筋細胞数が減少し、心不全を発症するにいたる。従って、心疾患において細胞死が惹起されるメカニズムを解明し、その制御技術を確立することは、心不全治療法を開発することにつながる。本研究では、新たな心筋細胞死メカニズムとして、マウスにおいて、心筋梗塞により病的な変化をおこした心筋細胞が、細胞傷害性免疫細胞に認識されて細胞死を惹起されることを示唆するデータを得た。細胞傷害性免疫細胞の機能制御による新規心不全治療法が開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Since cardiac myocytes cease to proliferate immediately after birth in mammalian hearts, cardiomyocyte death, induced by cardiovascular diseases, results in the reduction of cardiomyocytes in number, leading to cardiac dysfunction. In this context, the prevention of cardiomyocyte death is a promising therapeutic strategy against heart failure. In this study, we have revealed that immune surveillance system is involved in cardiac cell death in the process of cardiac remodeling after myocardial infarction. It could be proposed that immunosurveillance system is a novel therapeutic target against heart failure.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心筋細胞 心不全 免疫学的監視機構 心筋細胞死

1. 研究開始当初の背景

食生活の過栄養化と社会の高齢化に伴い、心不全が増加しており、心不全パンデミックと言われている。心不全はあらゆる心疾患の終末像であるが、心筋梗塞後に発症する心不全は、薬物治療に対して抵抗性であり、予後不良の病態である。心筋梗塞による組織傷害が心不全にいたる過程には、心筋細胞死が重要であることが知られている。従って、梗塞後心筋組織における新たな心筋細胞死機構を解明し、その制御を可能とする技術の確立は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

哺乳類の心筋細胞は個体誕生後増殖能を失う最終分化細胞であり、増殖・分化という観点からは、心筋細胞と癌細胞とは正反対の性質を持つ。しかし、視点を変えると、ストレスを課せられた心筋細胞で活性化される細胞保護シグナル、血管新生シグナルは、癌細胞においても病態生理学的に重要なシグナルである。このような癌細胞と心筋細胞との共通性は、心不全における病的な心筋細胞が、癌細胞と同様に、免疫学的監視機構の標的となりうる可能性を想起させる。すなわち、発癌においては、細胞傷害性免疫細胞は、NKG2D分子を介して、NKG2D ligand (NKG2DL)を発現した癌細胞を細胞死に導くことから、本研究では、梗塞後の心筋組織において、免疫学的監視機構が、心筋細胞死に関与している可能性を、NKG2D/NKG2DL相互作用に注目して追究することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス心筋梗塞モデルの作製：雄性マウスを人工呼吸器で呼吸管理下開胸し、左冠動脈を結紮して心筋梗塞モデルを作製した。

定量的 mRNA 発現量の検討：total RNA は、QIAzol reagent を用いて調整した。逆転写後 SYBR Green を用いて定量的 PCR を行った。

免疫組織学的検討：マウス心臓から凍結切片を作製し、固定後 ABC 法を用いて染色を行った。

心筋細胞死の検討：心筋細胞死は TUNEL 染色法にて検出した。同時に、抗 sarcomeric actinin 抗体で染色することにより、TUNEL 陽性細胞が心筋細胞であることを確認した。

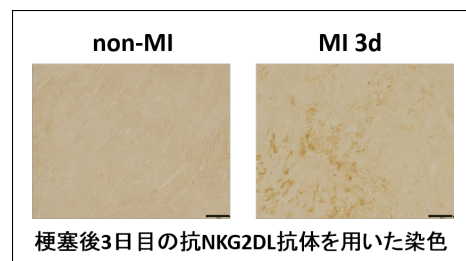
心筋組織への浸潤細胞の調整：マウスにヘパリン投与後心臓を回収し、コラゲナーゼ液を灌流後 70 μm のセルストレイナーを通して細胞を単離した。単離した細胞を抗 CD45 抗体を用いた MACS により調整後、表面抗原を蛍光ラベル抗体によって染色し、FACS Aria II を用いて細胞の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 梗塞後心筋組織における NKG2DL の発現の検討

まず、梗塞後心筋組織における NKG2DL の発現を検討した。NKG2DL は癌細胞やウイルス感染細胞など病的に変化をきたした細胞に発現する。マウス心臓の冠動脈を結紮後、心筋組織における NKG2DL mRNA の発現を real time RT-PCR を用いて定量した。その結果、冠動脈結紮 3 日目から組織内の NKG2DL mRNA の発現が増強していることを見出した。

次に心筋組織における NKG2DL タンパクの発現を免疫組織学的に観察した。NKG2DL が梗塞領域と非梗塞領域の境界に存する心筋細胞で発現していることを見出した(下図)。



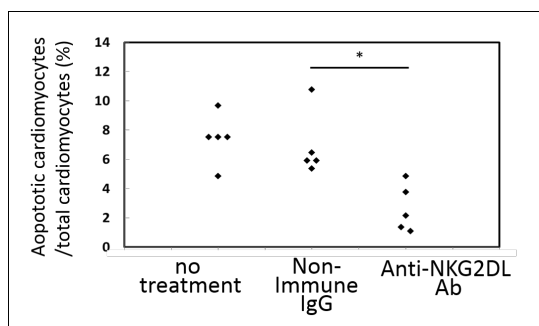
(2) 梗塞後心筋組織における NKG2D 発現細胞の同定

先述のように細胞傷害性免疫細胞は、NKG2D 分子を介して、NKG2DL を発現した病的細胞（癌細胞やウイルス感染細胞など）を認識し細胞死を誘導する。マウス梗塞後心筋組織においても、冠動脈結紮後 3 日目から mRNA レベルでの発現が増強した。

次に、NKG2D を発現する細胞を同定するために、梗塞後心筋組織から CD45 陽性細胞を調整後、FACS を行った。その結果、T 細胞が梗塞後心筋組織で NKG2D を発現する細胞傷害性免疫細胞であることが明らかになった。

(3) NKG2D/NKG2DL 相互作用阻害の心筋リモデリングに対する作用

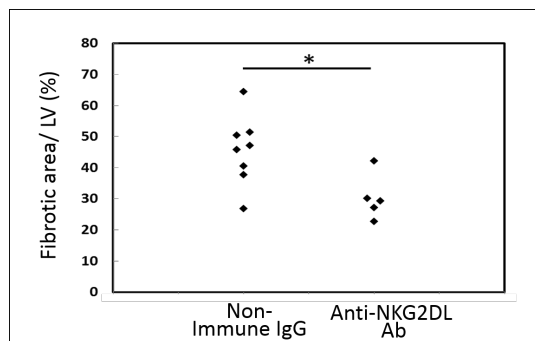
上述の結果から、梗塞後心筋組織において、NKG2D/NKG2DL 相互作用を介した免疫学的監視機構が機能している可能性が示唆された。そこで、梗塞作製後、抗 NKG2DL 抗体を投与して、同抗体が梗塞後心筋細胞死に与える効果を検討した（下図）。



その結果、梗塞後心筋組織における心筋細胞のアポトーシスが抑制されることが明らかになった。

梗塞後心筋組織が心不全に至る過程で、心筋細胞死が重要な役割を演じていることが知られている。そこで、次に、NKG2D/NKG2DL 相互作用阻害の心筋リモデリングに対する作用を検討した。すなわち、心筋梗塞作製後、抗 NKG2DL 抗体を投与し、2 週間後の心筋組織の線維化を、マッソン・トリクローム染色によって検討した（次頁図）。その結果、NKG2D/NKG2DL 相互作用の阻害は、心筋組織の

線維化を抑制した。



以上の結果から、梗塞後心筋組織のストレスを受けた病的な心筋細胞において、細胞死が、細胞傷害性免疫細胞によって惹起されること、そのことが心筋リモデリングを進展させ心不全発症に至らしめることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Matsuo, R., Morihara, H., Mohri, T., Murasawa, S., Takewaki, K., Nakayama, H., Maeda, M., Fujio, Y. The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9: e111097.
2. Yamada, T., Nakayama, M., Shimizu, T., Nonen, S., Nakai, Y., Nishimura, K., Fujio, Y., Okuyama, A., Azuma, J., Nonomura, N. Genetic polymorphisms of CYP17A1 in steroidogenesis pathway are associated with risk of progression to castration-resistant prostate cancer in Japanese men receiving androgen deprivation therapy. *Int. J. Clin. Oncol.* 2013; 18, 711-717
3. Azuma, J., Ohno, M., Kubota, R., Yokota, S., Nagai, T., Tsuyuguchi, K., Okuda, Y., Takashima, T., Kamimura, S., Fujio, Y., Kawase, I. and Pharmacogenetics-based tuberculosis research group. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: A randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2013; 69, 1091-1101.
4. Okamoto, H., Hori, M., Matsuzaki, M., Tsutsui, H., Yamazaki, T., Nagai, R., Yoshikawa, T., Fujio, Y., Nonen, S., Azuma, J., Izumi, T., Ohashi, Y., Kitabatake, A.

on behalf of J-CHF investigators. Minimal dose for effective clinical outcome and predictive factors for responsiveness to carvedilol: Japanese chronic heart failure (J-CHF) study. *Int. J. Cardiol.* 2013; 164, 238-244.

5. Takimoto, T., Kijima, T., Otani, Y., Nonen, S., Namba, Y., Mori, M., Yokota, S., Minami, S., Komuta, K., Uchida, J., Imamura, F., Furukawa, M., Tsuruta, N., Fujio, Y., Azuma, J., Tachibana, I., Kumanogoh, A. Polymorphisms of CYP2D6 gene and gefitinib-induced hepatotoxicity. *Clin. Lung Cancer.* 2013; 14:502-507.

6. Kumagai, S., Matsui, K., Kawaguchi, H., Yamashita, T., Mohri, T., Fujio, Y., Nakayama, H. Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 437, 609-614.

7. Mohri, T., Ueno, M., Nagahama, Y., Gong, Z.-Y., Asano, M., Oshima, H., Oshima, M., Fujio, Y., Takakura, N. Requirement of SLD5 for early embryogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e78961.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Kumagai, S., Nakayama, H., Hayamizu, N., Matsunami, S., Otsuka, W., Sakata, Y., Fujio, Y. Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel 2a subunit exacerbates cardiac hypertrophy. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, November 15-19, 2014

2. Nakayama, H., Kumagai, S., Matsunami, S., Hayamizu, N., Tonegawa, K., Otsuka, W., Fujio, Y. Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel b2a subunit exaggerates cardiac hypertrophic responses after an adrenergic stimulation in mice. International Society of Heart Research 日本部会総会 (名古屋), November 28-29, 2014.

3. 田中智大、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾 慈 Interleukin 27 induces endothelial differentiation in murine cardiac stem cells. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015 年 3 月 18 日~20 日

4. 土山 大介、中山博之、森原啓文、石田瑛子、尾花理徳、前田真貴子、藤尾 慈 Elucidation of molecular mechanism of cardiomyocyte necrosis induced by reactive oxygen species. 第 88 回日本薬

理学会年会 (名古屋) 2015 年 3 月 18 日~20 日

5. 古谷知佳、宮脇昭光、大谷勇太、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾 慈 IL-27 negatively regulates murine experimental autoimmune myocarditis (EAM). 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015 年 3 月 18 日~20 日

6. 五十嵐裕美、中山博之、松浪佐知、早水菜穂、舎川洗太、尾花理徳、前田真貴子、藤尾慈 Adrenergic receptors 2 and 3 transduce differential signals in cardiac fibroblasts. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015 年 3 月 18 日~20 日

7. 松原由実、宮脇昭光、榎原正貴、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾 慈 The properties of cardiac Sca-1+ resident stem cells are altered in response to myocardial inflammation. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015 年 3 月 18 日~20 日

8. 森原 啓文、中山 博之、大岩 晴矩、土山 大介、山本 剛史、小比賀 聡、藤尾 慈 Administration of phospholamban-antisense locked nucleic acid improves cardiac contractility in a murine heart failure model 第 18 回日本心不全学会学術集会 2014 年 10 月 10 日-12 日 (大阪)

9. 大谷 勇太、竹脇 佳那、宮本 香織、尾花理徳、中山 博之、藤尾 慈 The overexpression of CD93 in myeloid cells attenuated the cardiac fibrosis after myocardial infarction 第 18 回日本心不全学会学術集会 2014 年 10 月 10 日-12 日 (大阪)

10. 藤尾 慈、葭山 稔 心疾患における gp130 サイトカインの役割: 新たな治療法の開発を目指して 日本薬学会 134 会年会 2014 年 3 月 28 日-30 日 (熊本)

11. 藤尾 慈 心血管病におけるサイトカイン医科学---gp130 サイトカインと心筋保護 生体機能と創薬シンポジウム 2013, 2013 年 8 月 29 日・30 日 (福岡)

12. Kumagai, S., Nakayama, H., Miyawaki, A., Mohri, T., Fujio, Y. Inhibition of P2X7 Receptor Signaling Promotes Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction through Enhanced Cardiac Fibroblast Migration. The American Heart Association Scientific Sessions 2013, November 16-20, 2013 (Dallas, Texas, USA)

13. Maeda, M., Fujio, Y., Takemoto, Y., Azuma, J. A report From the Japanese pharmacogenomics clinical trial; CYP2A6 Gene Polymorphisms Influence Nicotine Dependence and Monoamine Oxidase Gene Polymorphism Does Smoking Cessation Behavior. The American Heart Association Scientific Sessions 2013, November 16-20, 2013 (Dallas, Texas, USA)

14. 大和田康子, 泉康雄, 朝倉正紀, 山本晴子, 前田真貴子, 葎山稔, 藤尾 慈 急性心筋梗塞に対するインターロイキン 11 (IL-11) 製剤を用いた心筋保護治療の臨床試験のためのプロトコル作成研究. 第 34 回日本臨床薬理学会年会, 2013 年 12 月 4 日 ~ 12 月 6 日 (東京)

15. 前田真貴子, 杉浦知佳, 志賀遼大, 松岡翔太, 竹ノ内拓也, 中西和親, 山川剛, 藤尾慈, 東純一. ニコチン代謝酵素 CYP2A6 遺伝子多型と呼気 CO 濃度の関係 第 34 回日本臨床薬理学会年会, 2013 年 12 月 4 日 ~ 12 月 6 日 (東京)

16. 早水菜穂, 熊谷渉平, 松浪佐知, 中山博之, 藤尾 慈. L 型カルシウムチャネル 2a サブユニットのリン酸化は心筋細胞肥大を惹起する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日 (仙台)

17. 舎川洸太, 松浪佐知, 土山大介, 中山博之, 藤尾 慈. BIN1 の過剰発現は心筋細胞死を介して心筋リモデリングを増悪する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日 (仙台)

18. 竹脇佳那, 山下朋美, 宮本香織, 毛利友美, 中山博之, 藤尾 慈 マクロファージ特異的な CD93 過剰発現による死細胞貪食の増強は心筋梗塞後の心筋線維化を抑制する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日 (仙台)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b014/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤尾 慈 (ふじお やすし)

研究者番号: 20359839