

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670378

研究課題名(和文) NKT細胞による炎症制御を活用した梗塞後心破裂の画期的な新規予防法の開発

研究課題名(英文) Development of novel preventive strategy for post-infarct cardiac rupture via the regulation of inflammatory process by the activation of natural killer T cells

研究代表者

筒井 裕之 (Tsutsui, Hiroyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70264017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞急性期の重篤な致死性合併症である心破裂には、サイトカインを主体とする炎症が重要な役割をはたしていることが知られている。ナチュラルキラーT(NKT)細胞は、TNF- やIFN- などの炎症惹起性Th1サイトカインとIL-10やIL-4などの抗炎症性Th2サイトカインのTh1/Th2バランスを調節し、生体における炎症制御という役割を担っている。本研究により、 α -ガラクトシルセラミド(GalCer)によるNKT細胞の機能制御は心筋梗塞急性期における合併症の新たな治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Myocardial infarction (MI) leads to the development of cardiac rupture as well as heart failure, both of which are the major causes of death in post-MI patients. Chronic tissue inflammation plays an important role in the pathological process of post-MI left ventricular remodeling as well as cardiac rupture. Invariant natural killer T (iNKT) cells orchestrate tissue inflammation via regulating the production of various cytokines. The activation of iNKT cells by α -galactosylceramide (α -GC), which specifically activates iNKT cells, could be beneficial to protect the heart from acute ischemic injury.

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：急性心筋梗塞 心破裂 炎症性サイトカイン ナチュラルキラーT細胞 α -ガラクトシルセラミド

1. 研究開始当初の背景

冠動脈インターベンションの進歩・普及により急性心筋梗塞の急性期予後は飛躍的に向上してきた。しかしながら、急性期に生ずる心破裂は、ひとたび発症すると治療困難で致死的となる。心筋細胞壊死に引き続いて生ずるマクロファージなど炎症細胞浸潤、IL-6・TNF- α など炎症性サイトカインの発現、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化が、心破裂に密接に関与すると考えられている。しかしながら、梗塞後心破裂の発症機序に基づいた臨床応用可能な効果的予防法は開発・確立されていない。

最近、生体における炎症が、TNF- α など Th1 サイトカインと IL-10 などの Th2 サイトカインの「Th1/Th2 バランス」によって調節されていることがあきらかにされ、その制御機構の解明が急速に進展している。ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から刺激を受け種々のサイトカインを産生する炎症細胞のひとつであるが、Th1/Th2 バランスを調節し生体における炎症を制御する「炎症調節細胞」としての役割を担っている。さらに、NKT 細胞による Th1 / Th2 バランス制御の特徴は、相互に相手の産生するサイトカインによって負のフィードバック調節を介して Th1 / Th2 バランスを適性化する点である。すなわち、炎症部位が Th1 優位の場合は、NKT 細胞は刺激によって Th2 優位の応答を誘導する。このような成績は、心筋梗塞部で NKT 細胞の機能低下により負のフィードバック制御機構が破綻し炎症が高度に賦活化していること、さらに NKT 細胞の活性化により Th1 / Th2 バランスを適正化し、炎症さらには梗塞後心破裂の発症を抑制できる可能性を示唆するものである。しかしながら、梗塞後心破裂における NKT 細胞による炎症制御の役割はわかっていなかった。さらに、 α -ガラクトシルセラミド (GalCer) による NKT 細胞の活性化という新たなパラダイムに基づく梗塞後心破裂の予防法の有効性も検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、梗塞後心破裂における心筋炎症は、NKT 細胞の機能低下に起因する炎症制御機構の破綻が原因であるという仮説を検証するとともに、NKT 細胞による Th1/Th2 バランスの適正化を介した心筋炎症制御という全く新しいコンセプトに基づく新規の梗塞後心破裂の予防法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) α -GalCer による NKT 細胞活性化の梗塞後心破裂に対する抑制効果の検討：虚血

再灌流モデルにおける検討

C57BL/J マウスに虚血再灌流 (I/R ; 45 分虚血・24 時間再灌流) あるいは偽手術 (sham) を行った。それぞれの群をさらに 2 群に分け、再灌流前 30 分に vehicle あるいは α -GalCer を投与した。sham 群、sham+ α -GalCer 群、I/R 群および I/R+ α -GalCer 群の 4 群で実験を行った。

C57BL/J マウスおよび J 欠損 (KO) マウスに I/R あるいは sham を行った。sham 群、KO+sham 群、I/R 群および KO+I/R 群の 4 群で実験を行った。

それぞれの実験で、NKT 細胞の検出はフローサイトメトリーを用いた。TTC 染色および Evans blue 染色を行い、梗塞サイズを測定し、心破裂の有無を観察した。また、虚血部心筋を摘出し、定量的 RT-PCR 法によって各種遺伝子発現を検討した。

(2) α -GalCer による NKT 細胞活性化の梗塞後心破裂に対する抑制効果の検討：梗塞後心不全モデルにおける検討

左冠動脈結紮により心筋梗塞作成後、GalCer (0.1 μ g/g 体重) を腹腔内投与し、5 日後に下記 - を評価した。

梗塞後心破裂の評価：梗塞作成後 5 日間毎日ケージ内を観察し、死亡しているマウスの剖検を行い心破裂の有無を判定する。

病理組織学的検討：心筋梗塞サイズの測定、心筋壁厚の測定 (梗塞部壁厚/非梗塞部壁厚の算出)、心筋病理組織 (マクロファージ免疫染色および SiriusRed コラーゲン線維染色)

NKT 細胞機能解析：心筋における NKT 細胞を FACS を用いて定量化する。さらに、NKT 細胞の表面マーカーである T 細胞抗原受容体 (TCRV 14/J 18) の発現を定量的 RT-PCR 法により定量し、NKT 細胞の活性化の程度を評価する。

炎症細胞浸潤：単球 / マクロファージやリンパ球の免疫染色

炎症性サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、RANTES、MCP-1、TGF- β など) の遺伝子発現：定量的 RT-PCR 法による定量

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現・活性化：Gelatin zymography による心筋 MMP 活性の定量、RT-PCR、ウエスタンブロットによる MMP/TIMP 発現の解析

4. 研究成果

(1) α -GalCer による NKT 細胞活性化の梗塞後心破裂に対する抑制効果の検討：虚血再灌流モデルにおける検討

I/R+ α -GalCer 群は I/R 群と比較して、梗塞サイズが有意に低下した。心破裂の頻度も減少する傾向をみとめた。同時に、 α -GalCer 投与によって、虚血部心筋で NKT 細胞は 17 倍に増加した。I/R+ α -GalCer 群の虚血部心筋で I/R 群と比較して IL-10、IL-4、IFN- γ が有意に増加した。IL-10 抗体の前処置により α -GalCer に

よる梗塞サイズ抑制効果は、消失した。一方で、IL-4 や IFN- γ 抗体ではそのような効果はみとめなかった。

I/R 群の虚血部心筋で NKT 細胞は 2 倍に増加した。KO+I/R 群は I/R 群と比較して、梗塞サイズが有意に低下した。I/R 群と比較して KO+I/R 群の虚血部心筋で炎症細胞浸潤やアポトーシスが抑制され、IFN- γ が有意に減少した。WT マウスから分離した NKT 細胞を KO マウスへ養子移入し I/R 手術を行うと、KO マウスで観察された梗塞サイズ抑制効果が消失したが、IFN- γ KO マウスから分離した NKT 細胞を KO マウスへ養子移入しても梗塞サイズの抑制は不変であった。

(2) α -GalCer による NKT 細胞活性化の梗塞後心破裂に対する抑制効果の検討：梗塞後心不全モデルにおける検討

α -GC 投与により MI 後の生存率が有意に改善した。心破裂の発生頻度には差をみとめなかった。28 日後の心エコーで MI 群では左室内腔拡大および収縮能低下をみとめたが α -GC 投与によってこれらが抑制された。

MI 群では非梗塞部の心筋細胞肥大・間質線維化・心筋細胞アポトーシスをみとめたが、 α -GC 投与でこれらは抑制された。術後 7 日目の心筋組織で、MI 群でマクロファージやリンパ球の浸潤は有意に増加し、 α -GC 投与によっていずれの群でもさらに増加した。M1 マクロファージや M2 マクロファージのマーカーおよび MCP-1 や RANTES などのケモカインの遺伝子発現はいずれも MI 群で増加し、 α -GC 投与によっていずれの群でもさらに増加した。さらに心筋において Interferon- γ 、TNF- α 、Interleukin (IL)-6 や IL-10 などのサイトカイン遺伝子発現はいずれも α -GC 投与によって有意に増加したが、28 日では、MI 群の IL-10 のみが α -GC 投与によって増加した。

IL-10 の役割について明らかにするため、MI マウスに IL-10 受容体抗体を投与したところ α -GC で観察された MI 後リモデリング改善効果や心不全進展抑制効果は消失した。

以上より、虚血再灌流障害に NKT 細胞の活性化が重要な役割を果たしていることがあきらかとなった。一方、 α -GC 投与による NKT 細胞の更なる活性化は虚血再灌流障害を抑制した。さらに、この効果に IL-10 が密接に関連することが明らかとなった。本研究により α -GC による NKT 細胞の機能制御は心筋梗塞急性期における合併症の新たな治療法となる可能性が示された。

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 62 件)

1. Yokota T, Kinugawa S, Yamato M,

Hirabayashi K, Suga T, Takada S, Harada K, Morita N, Oyama-Manabe N, Kikuchi Y, Okita K, Tsutsui H: Systemic oxidative stress is associated with lower aerobic capacity and impaired skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 36(5): 1341-1346, 2013 DOI:10.2337 査読有

2. Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Masaki Y, Furihata T, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol* 62:179-188, 2013 DOI:10.1016 査読有
3. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Sobirin MA, Masaki Y, Mizushima W, Kadoguchi T, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J Appl Physiol* 114(7):844-857, 2013 DOI:10.1152 査読有
4. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Yokota T, Matsushima S, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Katsuyama R, Oba K, Okita K, Tsutsui H: Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 168(5): e142-4, 2013 DOI:10.1016 査読有
5. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Okita K, Matsushima S, Tsutsui H: Increased plasma soluble (pro)renin receptor levels are correlated with renal dysfunction in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 168(4):4313-4314, 2013 DOI:10.1016 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. Tsutsui H: Role of Innate Immunity in Cardiac Inflammation. American Heart Association 2013, 2013 年 11 月 20 日, Dallas Convention Center (Dallas, America)

[図書](計 15 件)

1. 筒井裕之、中外医学書、Annual Review 循環器、2014 年、313 ページ
2. 筒井裕之、中山書店、内科学書、2013 年、3,000 ページ
3. 筒井裕之、医学書院、今日の治療指針 わたしはこう治療している、2013 年、2,128 ページ

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

発明者：筒井裕之

権利者：筒井裕之

種類：特許

番号：2014-36070

出願年月日：2014 年 2 月 26 日

国内外の別： 国内

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

<http://cvhp.med.hokudai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井 裕之（Tsutsui Hiroyuki）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70264017

(2)研究分担者

絹川 真太郎（Kinugawa Shintaro）

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60399871

石森 直樹（Ishimori Naoki）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70399848

(3)連携研究者

特になし