様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号： ３２６１２
研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2013～2014
課題番号： ２５８６０６２０

研究課題名（和文）心筋梗塞後左室リモデリングにおけるInterleukin-33の役割解明

研究課題名（英文）Role of Interleukin-33 in Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction

研究代表者
安西　淳（Anzai, Atsushi）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：５０５２８１６４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス心筋梗塞モデルを用いて、interleukin-33の発現が梗塞後に上昇し、その発現細胞が線維芽細胞であることを見出した。Interleukin-33　ノックアウトマウスでは心筋梗塞後の心機能が改善傾向にあり、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテイナーゼの発現が抑制されていた。ノックアウトマウスの梗塞部に浸潤するマクロファージの極性が抗炎症性有意であり、interleukin-33の受容体であるST2の発現がCD11b陽性細胞で上昇していたことから、梗塞部で発現したinterleukin-33が主にマクロファージに作用して、梗塞後左室リモデリングを増悪させることが予想された。

研究成果の概要（英文）：The expression of interleukin-33 was increased after permanent coronary ligation in mice. We identified that the main source of interleukin-33 was cardiac fibroblasts in the murine infarcts. Interleukin-33 knockout mice exhibited improved cardiac function and better survival rate 28 days after myocardial infarction. The expression of inflammatory cytokines and matrix metalloprotainase was reduced in the knockout mice and anti-inflammatory M2 macrophages are dominant infiltrating-cells in the infarcts 7 days after myocardial infarction. As Interleukin-33 receptor, ST2, strongly expressed on the CD11b+ cells, interleukin-33 might have detrimental role in the tissue healing after myocardial infarction, partly through controlling inflammatory and anti-inflammatory macrophage function.

研究分野： 循環器内科学

キーワード： 炎症反応　心筋梗塞

１．研究開始当初の背景

心筋梗塞(Myocardial infarction: MI) に対する再灌流療法の発達は、MI を発症した患者の急性期死亡率を劇的に低下させたが、重症例の救命によって梗塞後左室リモデリングによる慢性心不全の有病率をむしろ増加させるというパラドックスを生んだ。MI 後の組織修復の過程には免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、これらが一度過剰になるとかえって組織障害を進展させ、梗塞後心不全を増悪させてしまう。これまでに MI 後創傷治癒過程に関わる細胞、分子に関する数多くの報告がなされているにも関わらず、MI 後に免疫応答や炎症反応が過剰となる機序は未だ不明であり、これらが明らかとなれば、梗塞後心不全に対する新たな治療のターゲットとなり得ると考えられる。

Interleukin (IL)-33 は 11 番目の IL-1 ファミリーサイトカインとして 2005 年に Schmitz らによりクローニングされた (*Immunity*. 2005;23:479-90)。IL-33 受容体はこれまでリガンドが不明であった IL-1 受容体ファミリーである ST2 である。IL-33 は当初、Th2 サイトカインを誘導し、Th2 型の免疫応答や疾患の発症に関わる因子として注目されていたが、他方、IL-33 の生理作用は Th2 型免疫応答に留まらず、IL-1 や IL-18 などと同様に、強力な炎症性サイトカインとして、様々な炎症性疾患の発症に関与することが最近報告されている。特に IL-33 は、High Mobility Group Box 1 などと同様に、免疫応答・炎症反応における、「細胞障害関連因子 (damage-associated molecular patterns: DAMPs)」と呼ばれる内在性因子の一つとしても知られ、様々な病態の炎症の誘導・増幅に関与することが明らかとなっている。これまでに、感染症、関節リウマチなどの自己免疫疾患において、IL-33 が病態の炎症を誘導・増幅する key molecule であること、IL-33 を介したシグナル応答を制御すれば、病態を改善し得ることが報告されてきたが (*Arthritis Rheum.* 2009;60:738-49、*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10913-8)、循環器疾患、特に心筋梗塞後左室リモデリングにおける IL-33 の役割については明らかではない。最近、ST 上昇型心筋梗塞患者の発症後、3-5 日目の末梢血中の IL-33 濃度の上昇が、30 日後、及び 1 年後の死亡と関連するという臨床研究結果が報告された(*Int J Cardiol.* 2012 Epub ahead of print)。これらの事実、過去の報告をふまえ、IL-33 が心筋梗塞後の過剰な炎症を誘導し、梗塞後心不全を促進するのではないかという仮説をもとに、IL-33 が梗塞後左室リモデリングにどのような役割を果たすのかを解明し、新たな治療法の開発へつなげることを目的に、本研究を行った。

２．研究の目的

近年同定された新規の炎症性サイトカインであり、細胞障害関連因子 (damage-associated molecular patterns: DAMPs)の一つとして知られる IL-33 に着目し、梗塞後左室リモデリングにおけるその役割を明らかにするとともに、IL-33 により誘導・増幅される炎症反応を標的とした新たな治療法を開発する。

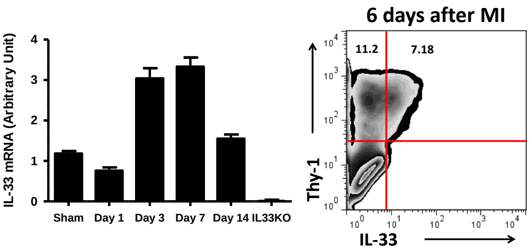
３．研究の方法

MI 後の IL-33 の役割を明らかにするために IL-33 ノックアウト (IL-33KO) マウスを使用した。対照群としてその同腹子 (WT) を用いた。1-1.5%イソフルランによる吸入麻酔を行い、開胸後にマウスの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞(MI)を作製、2 群間の生存率を発症 28 日の時点で Kaplan-Meier 分析により比較した。また、心エコーによる左室機能(左室拡張末期径、収縮末期径、左室短縮率)の評価、flow cytometry や免疫組織染色による主に好中球、単球、マクロファージなどの炎症性細胞浸潤の評価を行った。また、梗塞部より mRNA、タンパクを抽出し、qPCR、Western blotting を用いた炎症性マーカー (IL-1β、TNF-α、MMP-9、-2) の評価を行い、比較検討した。また、recombinant IL-33 (rIL-33)を WT マウスに投与し、同様に MI 後の創傷治癒過程を評価した。

４．研究成果

まず、MI 後梗塞部における IL-33 の遺伝子発現を qPCR で測定したところ、図１に示すように、MI 後 3-7 日をピークに有意な上昇が認められた（図１）。また、MI 後、心臓のどの細胞が IL-33 を発現しているか、梗塞部より細胞を単離し、細胞内サイトカイン染色後に flow cytometry で確認すると、タンパク質レベルにおいて IL-33 発現の上昇を認め、その主な発現細胞が Thy1+ 線維芽細胞であることが明らかとなった（図１）。I L-33 の受容体として知られる ST2 の発現を MI 後時

図1　IL-33の発現は心筋梗塞後に組織中、特にThy-1+ fibroblastで上昇する



系列で解析すると、心筋細胞とともに、CD11b+ マクロファージが ST2 の主な発現細胞 であり、主に 3-7 日目に増加していた。IL-33KO マウスを用いて MI 後の生存率と心筋梗塞後創傷治癒過程を対照群である WT マウスと比較した。その結果、IL-33KO マウスにおいて 28 日目における生存率は改善傾向にあり（図２）、心破裂の発症頻度も WT マウス

と比較して少ない傾向にあった。また MI 後28 日目の心機能を心エコーを用いて解析したところ、IL-33KO マウスにおいて左室拡張末期径（LVEDD)、左室収縮末期径（LVESD)、及び左室収縮率(FS)が改善傾向であった(図２)。連続切片を用いた組織学的な検討にお

図２　心筋梗塞後生存率、及び心機能評価

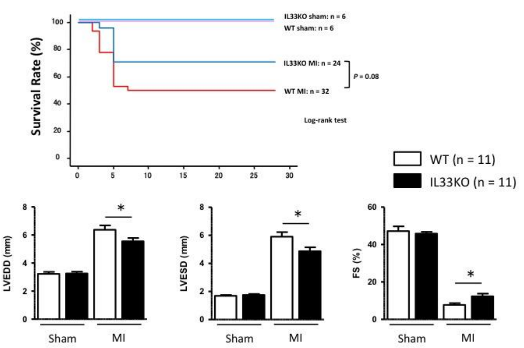
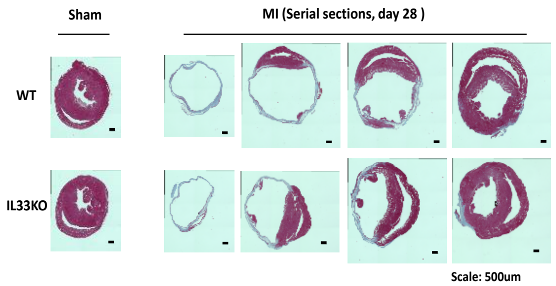


図3　IL-33$^{-/-}$マウスで梗塞後左室リモデリングが改善



いても、梗塞サイズは両群で有意差が無いにも関わらず、左室リモデリングの改善を認めた(図 3)。また、MI 後 6 日目の梗塞部の線維化を Azan 染色で確認したところ、IL-33KO マウスでは、対照群と比較して、梗塞部と非梗塞部の境界領域では密な線維が構成され、梗塞部では生存心筋が多く、心筋梗塞後の創傷治癒過程が促進している可能性が示唆された(図 4)。一方、WT マウスに recombinant IL-33 (rIL-33)を投与すると、MI 後の生存率が低下傾向にあり、上記と同様の組織学的検討においても、rIL-33 にて MI 後左室リモデリングが高度となることが示された(図５)。MI 後 6 日目で、梗塞部位より mRNA を抽出し、IL-1β、TNF-αの発現を測定すると、いずれも IL-33KO マウスでその発現が低下していた。さらに、梗塞部位よりタンパクを抽出し同じ

図4　IL-33$^{-/-}$マウスでは心筋梗塞後創傷治癒が促進している。

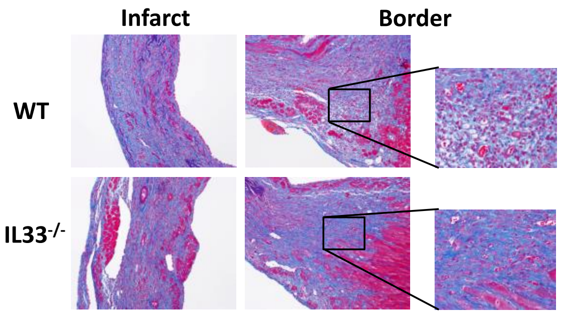
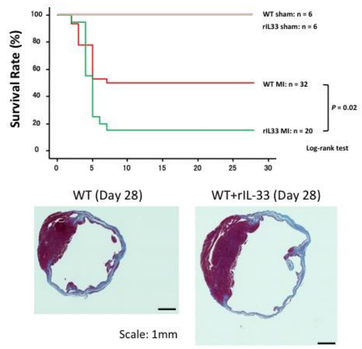
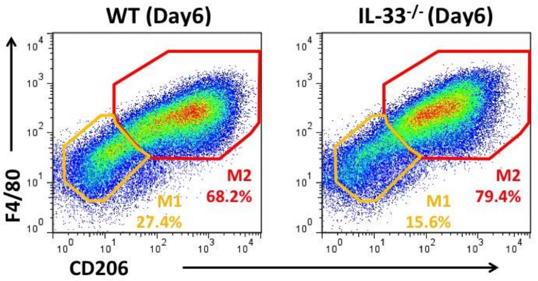


図5　recombinant IL-33投与



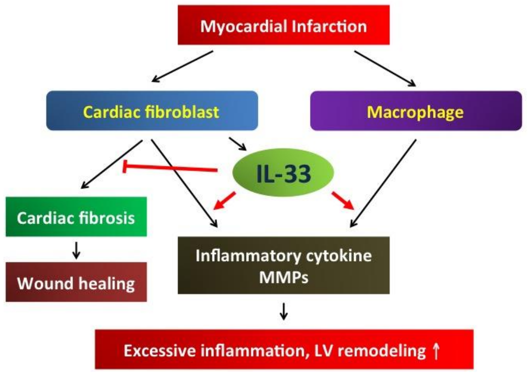
く MI 後 6 日目での組織中の MMP-9, -2 の活性を zymography 法で測定すると、IL-33KO マウスでその発現が有意に低下していた。梗塞部より細胞を単離し、flow cytometry において、MI 後 6 日目の梗塞部における浸潤細胞を検討すると、IL-33KO マウスに おいて CD45+ CD11b+ F4/80+ CD206- M1 マクロファージの割合が少なく、一方で CD45+ CD11b+ F4/80+ CD206+ M2 マクロファージの割合 が増加していた（図６）。過去の検討より、M1 マクロフ

図６　IL-33$^{-/-}$マウスではマクロファージの極性が変化している



ァージは炎症性、M2 マクロファージは非炎症性に働くことが知られている。以上より、IL-33 は MI 後梗塞領域の線維芽細胞より IL-33 の発現が誘導され、心筋細胞、あるいは骨髄由来細胞に作用 することで心筋梗塞後創傷治癒過程に関与している可能性が示唆された（図７）。

図7　心筋梗塞後のIL-33の役割 （仮説）



５．主な発表論文等
該当なし。

６．研究組織
(1)研究代表者
　安西　淳（ANZAI ATSUSHI）
　慶應義塾大学・医学部・助教
　　研究者番号：50528164