

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861535

研究課題名(和文)急性心筋梗塞の病態における制御性T細胞の役割

研究課題名(英文)The role of regulatory T cells in the pathogenesis of acute myocardial infarction

研究代表者

高橋 甚彌(TAKAHASHI, Jinya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30647813

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)：制御性T細胞(Treg)は免疫抑制の中心であるが、心筋梗塞におけるTregの役割は不明な点が多い。本研究の目的は、急性心筋梗塞における過剰な免疫反応を抑制する事で、その障害を抑制する事である。マウスを用い、心筋梗塞後の梗塞範囲、リモデリングの程度の評価を行った結果、Treg欠損マウスとコントロール群間に有意差は認めなかった。そこで、同様に免疫細胞を抑制するサイトカインであるIL-10に注目し、そのファミリーサイトカインであるIL-22に注目した。マウスにIL-22を投与した結果、心筋梗塞範囲が減少する傾向を認めた。現在nを重ね、そのメカニズム解明を試みているところである。

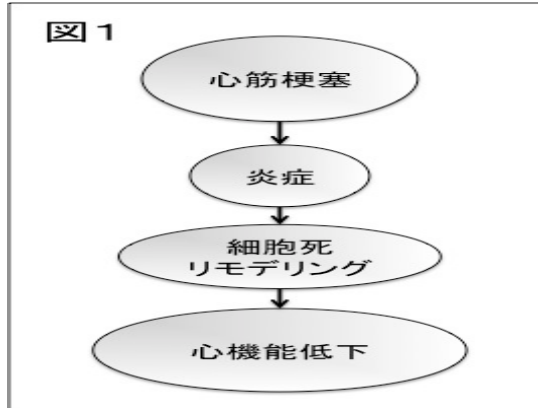
研究成果の概要(英文)：Although regulatory T cells (Treg) is one of the major part of the immune suppression, the role of Treg in myocardial infarction(MI) are largely unknown. The aim of this study was to investigate whether inhibiting the excessive immune response enable to suppress myocardial damage in MI. First, we assessed the MI size and remodeling after MI, however, there was no significant differences between Treg-deficient mice and Wild type group. In contrast, Interleukin (IL)-22, a member of the IL-10 cytokine family, plays important role of immune response same as Treg. Now, we found IL-22 administration may reduce the MI size in mice study. The role of IL-22 in MI should be further studied.

研究分野：循環器

キーワード：急性心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞の罹患率は、我が国での急速な糖尿病、高血圧、脂質異常症の罹患率増加とともに増え続けている。緊急 PCI による再灌流療法が一般的になった現在においても、傷害を受けた心臓はリモデリングを起し、慢性期に左心機能低下を来たした結果、心不全を発症する (図 1)。



現在治療を受けている多くの慢性心不全患者の原因疾患として、虚血性心筋症はその半数を占めている(Packer M, Am J Cardiol 1999)。虚血性心筋症の予後は5年生存率40%前後と拡張型心筋症と同様に不良である(Ito A, Internal Med 1992)。したがって心筋梗塞後の細胞死、その後のリモデリングを抑制する事は生命予後を改善するのに非常に重要な課題である。

近年、心筋梗塞後の炎症が梗塞後細胞死、及びリモデリングに重要である事が示唆されている。動物実験では梗塞後の炎症を抑制する事で亜急性期で誘導される細胞死が抑制され、また炎症細胞の浸潤を抑制する事で慢性期のリモデリングが抑制されることが示された(Nikolaos G, Cardiovasc Res 2002)。しかしそのメカニズムは不明な点も多く、心筋梗塞の病態において効果的に炎症を抑制する方法は依然確立されていない。

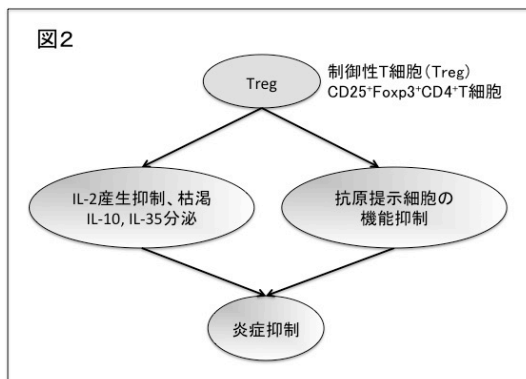
また、免疫寛容の働きをもつ制御性 T 細胞 (Treg) の存在が同定され、その様々な炎症性疾患における役割の重要性が示されている。本来免疫系は、さまざまな種類の病原微生物の感染から自らを守るために発達した防御システムである。その一方で、あまりに過剰な免疫応答は炎症の助長を来し、慢性炎症性疾患、アレルギー疾患等を引き起こす。そのため、過剰な免疫反応 (炎症) を惹起させない免疫寛容と呼ばれる特別な制御機構を備える必要がある。この機構の一部を T 細胞が担っている事が 1995 年に初めて明らかにされ、CD25 陽性、Foxp3(forkhead box p3)陽性、及び CD4 陽性 T 細胞集団である Treg である事が明らかにされた。

Treg の免疫寛容のメカニズムは主に 2 つ知られており、ひとつはリンパ球増殖を制

御する IL-2 の産生を抑制、枯渇させ、また自ら IL-10、IL-35 といった抗炎症性サイトカインを分泌する事で炎症を抑制する。もうひとつの機序として Treg は CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4)を恒常的に高発現し樹状細胞等の抗原提示細胞の刺激を抑制する事で、免疫寛容の中心的機序を担う事が判っている (図 2)。

この様に、心筋梗塞における炎症制御の重要性が示され、また炎症制御、免疫寛容における Treg の重要性が示される一方で、心筋梗塞における Treg の役割は不明なままである。我々は心筋梗塞の病態において、Treg が重要な役割を果たしており、Treg を誘導する事で過剰な炎症を抑制し、結果、梗塞後細胞死、およびリモデリングを抑制し心不全への移行を予防しようと考えた。

しかし、急性心筋梗塞の病態における Treg の関与を示すことができなかった (後述)。そこで、同様に免疫抑制、炎症抑制の中心的サイトカインである IL-10 に注目することとし、そのファミリーサイトカインである IL-22 に注目した。近年、IL-10 ファミリーサイトカインの一つである IL-22 は JAK/STAT3 経路を活性化し、肺、腸管、肝臓、腎臓等の組織保護や線維化抑制作用を有することが報告された (Mühl H, British



Journal of Pharmacology 2013)。特に肝臓、腎臓においては、虚血再灌流障害に対する組織保護効果が示された (Ming-Jiang Xu, J Am Soc Nephrol 2014)。いずれの報告も IL-22 による JAK/STAT3 経路の活性化が組織保護のメカニズムの一つとして挙げられている。自施設は心筋細胞における JAK/STAT3 経路の活性化がマウス心筋梗塞後の心筋障害や、虚血再灌流障害を抑制し、結果梗塞範囲を縮小し、リモデリングを抑制することを報告している (Nagata T, PLoS One 2015)。そこで IL-22 が前述の肝臓、腎臓において JAK/STAT3 経路活性化を介し抗虚血作用を発揮したことと同様に、心筋細胞の JAK/STAT3 経路を活性化し、心筋梗塞後再灌流障害、その後のリモデリングを抑制する可能性があるとして着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋梗塞の病態における Treg の役割を明らかにする事である。また Treg 誘導による梗塞後細胞死、リモデリングを抑制することである。

また、急性心筋梗塞による心筋障害、虚血再灌流障害に対する IL-22 の作用を明らかにし、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス、及び Treg を欠損させる事ができる DEREK マウスにて心筋梗塞モデルを作成し、その障害の比較、評価を行い、メカニズムの解析を行う。

(2) 野生型マウスに IL-22 を投与する群とコントロール群で心筋梗塞モデルを作成し、その障害の比較、評価を行い、メカニズムの解析を行う。

MI モデルの解析

(1) Treg の検討

①Treg 誘導の評価 (RT-PCR)

8~12 週齢の C57BL/6J マウスで MI モデル作成後 3 日で心臓を摘出し RT-PCR を施行する。

②DEREK マウスによる心筋梗塞障害の評価
DEREK マウスを用いて MI モデル作成後、野生型マウスと比較し、28 日後に心エコーを評価するとともに心臓を摘出し HE 染色、Azan 染色を行い梗塞範囲、リモデリングの比較、評価を行う。検討、及びメカニズムの解析を行う。

(2) IL-22 の検討

①IL-22 投与による STAT3 活性化 (P-STAT3) を確認する

8~12 週齢の C57BL/6J マウスに recombinant murine IL-22 を投与し、投与群と非投与群で心臓でのリン酸化による P-STAT3 をウェスタンブロットで比較評価する。

②梗塞巣の評価 (心エコー、EB 染色、TTC 染色)

8~12 週齢の C57BL/6J マウスで MI モデル作成。IL-22 投与群と非投与群で 24 時間後の心臓を摘出し、EB、TTC 染色を行い梗塞範囲、の評価を行う。

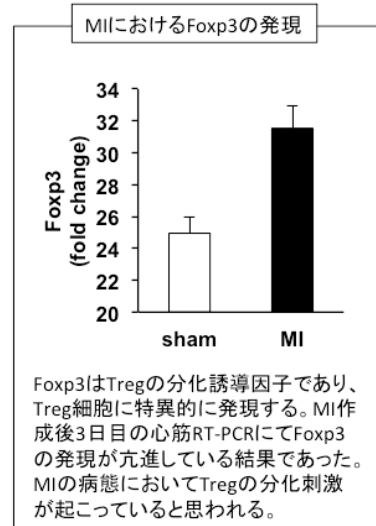
4. 研究成果

(1) Treg の検討

①Treg 誘導の評価 (RT-PCR)

Sham と比較して Treg の分化誘導因子である Foxp3 の発現亢進が見られた。心筋梗塞後の炎症の病態に Treg が深く関係していると考えられた (図 3)。

図 3



②梗塞巣の評価 (心エコー、HE 染色、Azan 染色)

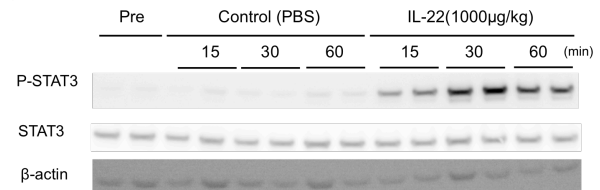
DEREK マウスと野生マウスを比較した結果、MI 後 28 日における心エコーで左室拡張末期径、収縮末期径、FS とともに有意差は認めなかった。心重量も差を認めず、HE 染色、Azan 染色によるリモデリング評価においても両群間に有意差は認めなかった。Treg が急性心筋梗塞の病態において関与していることは予想されるが、表現型で差が出るほどの影響力は現時点では見いだせなかった。

(2) IL-22 の検討

①IL-22 投与による STAT3 活性化 (P-STAT3) を確認

IL-22 投与群は非投与群と比較し、著明に STAT3 が活性化されることが示された (図 4)

図 4



心臓において、IL-22 投与群は非投与群 (Control) と比較し、有意に STAT3 が活性化している。さらに免疫染色においても投与群は非投与群と比較し、心筋細胞における STAT3 は有意に活性化していた。このことは IL-22 が心筋細胞の JAK/STAT3 経路を活性化することを示し、先に述べたように心筋細胞における JAK/STAT3 経路の活性化は心筋障害や再灌流障害を抑制することから、IL-22 が他臓器と同様、心臓においても組織保護作用を持つ可能性を強く示唆する。

②梗塞巣の評価(心エコー、EB 染色、TTC 染色)

IL-22 投与群は非投与群と比較し、MI 後 2 4 時間後の梗塞範囲がせまい傾向にある。N が少なく有意差はでていないが、今後 N を重ねていく予定である。

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 3 件)

①Nagata T, Yasukawa H, Kyogoku S, Oba T, Takahashi J, Nohara S, Minami T, Mawatari K, Sugi Y, Shimozono K, Pradervand S, Hoshijima M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T. Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents in vivo myocardial ischemia reperfusion injury through sustained activation of cardioprotective signaling Molecules. PLOS ONE 10: e0127942:1-25, 2015 査読有

②Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Minami T, Nishihara M, Ohshima H, Mawatari K, Nohara S, Takahashi J, Sugi S, Igata S, Iwamoto Y, Kai H, Matsuoka H, Takano M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi I. Renal nerve-mediated erythropoietin release confers cardioprotection during remote ischemic preconditioning. Circ J 79: 1557-1567, 2015 査読有

③安川 秀雄、高橋 甚彌、野原 正一郎、福本 義弘、科学評論社、サイトカインシグナルの制御と心不全の病態 『特集 心不全の最近の話題』。循環器内科 77(1), 68-74, 2015 査読無

[学会発表] (計 2 件)

①発表者：高橋 甚彌
発表演題：新規 STAT3 活性化サイトカインによる心筋虚血再灌流障害の抑制効果
学会等名：Meet The Cardiologist in Hakata
発表年月日：2015年12月18日
発表場所：ホテルオークラ福岡 福岡県久留米市

②発表者：高橋 甚彌
発表演題：心筋虚血再灌流障害に対する新しいサイトカイン療法の開発
学会等名：篠山セミナー
発表年月日：2015年12月1日
発表場所：翠香園、福岡県久留米市

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者
高橋 甚彌 (TAKAHASHI, Jinya)
久留米大学 医学部 助教
研究者番号：30647813

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：