

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590872

研究課題名(和文)

骨髄由来樹状細胞の心筋梗塞後左室リモデリングに及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of bone marrow derived dendritic cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction

研究代表者

安齊 俊久 (ANZAI TOSHIHISA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60232089

研究成果の概要(和文): 心筋梗塞後の過剰な炎症反応は、その後の心機能の低下や不良な生命予後と関連することが知られている。しかしながら炎症反応を制御する機構の詳細は明らかにされていない。本研究では、骨髄由来の樹状細胞が梗塞後のマクロファージや炎症性単球による過剰な炎症反応を抑制し、細胞外マトリックスの分解を抑制するとともにアポトーシスを軽減し、梗塞後の左室機能を保持する役割を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): An excessive inflammatory response after myocardial infarction (MI) is reported to be associated with cardiac dysfunction and poor clinical outcomes after MI. However, the precise regulatory mechanism to control the inflammatory response has been unclear. The present study demonstrated that bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) have a protective effect against cardiac dysfunction after MI through decreased macrophages and inflammatory monocytes-mediated inflammatory response, extracellular matrix degradation, and cardiac apoptosis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心筋梗塞、炎症、左室リモデリング、樹状細胞、免疫応答

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞に対する再灌流療法の発達は、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慢性心不全の有病率をむしろ増加させるといったパラドックスを生んだ。心筋梗塞後心不全の発生過程には、神経体液性因子とならんで免疫応答系の賦活化が関与していると言われている。我々は、ラット心筋梗塞モデルの梗塞部ならびに境界領域において樹状細胞の浸潤を認め、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)の投与によってその浸潤が増加するとともに左室

リモデリングの増悪を認めることをこれまでに明らかにした。しかしながら骨髄樹状細胞の役割の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

樹状細胞のマーカーであるCD11cのプロモーター下流にサルのジフテリア毒素受容体(DTR)とGFPを組み込んだ遺伝子改変マウス(CD11c-DTRマウス)を用いて、心筋梗塞後左室リモデリングにおける骨髄由来樹状細胞の役割について明らかにし、樹状細胞をターゲットとした梗塞後左室リモデリングに対

する新たな治療法開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD11c-DTR マウス骨髄細胞の移植と心筋梗塞モデルの作成

CD11c-DTR マウス(8週齢)の大腿骨より骨髄細胞を採取し、トリパンプルーを用いて回収した細胞数をカウントする。放射線照射(5Gy × 2)した C57BL/6 マウス(8週齢)に対して1匹あたり 1×10^7 cells/200 μ l の CD11c-DTR マウス骨髄細胞を経静脈的に投与する(DC ablation 群)。一方、健常マウス骨髄細胞を移植したものをコントロール(CON 群)とする。

骨髄移植より8週間後に DC ablation 群および CON 群のマウスに対してケタミン・キシラジン麻酔下に気管内挿管後、左前下行枝の近位部を結紮する(MI 群)。結紮以外の全処置を行う群を Sham 群とする。梗塞作成日よりジフテリア毒素(DT)を 4ng/g(100ng)投与し、心臓摘出まで 48~72 時間毎に DT を同量投与する。この際、実際に樹状細胞が除去されているかどうかを脾臓より抽出した細胞の FACS により CD11c と GFP で展開して確認する。また梗塞心筋の二重蛍光染色(CD11c と GFP に対する抗体)を行う。

(2) 左室機能、血行動態の評価、梗塞サイズ、梗塞部伸展の定量化

各時相ごとに(day 3, 7, 14, 28)、心エコーによる左室機能(左室拡張末期径、収縮末期径及びドプラー上の左室駆出時間)、1.7Fr カテ先マノメーターによる血行動態(大動脈圧、左室拡張末期圧、左室 dP/dt、大動脈駆出時間)の評価を行う。心臓を摘出後、連続横断面の TTC 染色により梗塞サイズならびに壁の菲薄化を計測する。Masson-Trichrome 染色により線維化の程度を評価する。

(3) 免疫組織化学、mRNA 発現、MMP 活性の測定

CD11c, Mac3, Myeloperoxidase (MPO), CD3, CD45R に対するモノクローナル抗体を用いて、心筋梗塞後の壊死部心筋への樹状細胞と関連する細胞群の浸潤を各時相(day 1, 3, 7, 14)ごとに検討する。また、TRIzol を用いて RNA を抽出し、IL-1, IL-18, IL-10, TNF-, CCL2, CX3CL1 などの発現に関して、real time PCR 法を用いて定量化する(ABI Prism[™] 7700)。さらに心筋における MMP 活性を zymography により測定する。

(4) FACS による末梢血ならびに心筋における炎症性単球の変化に関する検討

末梢血ならびに梗塞部心筋より単球を抽出し、FACS にて Ly6c と CD11b により展開する。

炎症性単球である Ly6c^{high} の単球数と Ly6c^{low} の単球数の変化について経時的に測定する。

(5) 心筋におけるアポトーシスの検討

心筋の Caspase3 ならびに cleaved caspase3 の蛋白レベルでの発現、さらに TUNEL 染色を行う。

(6) 正常マウス骨髄由来樹状細胞の移植の効果の検討

Wild type マウス骨髄より樹状細胞を抽出し、DC ablation マウスに投与し、その後心筋梗塞を作成した場合の左室機能ならびに梗塞部心筋の MMP 活性、末梢血における単球の変化について検討する。

4. 研究成果

(1) DT を投与し、骨髄由来樹状細胞を除去したマウスでは、脾細胞の FACS において GFP と CD11c 共陽性細胞がほとんど認められず(図 1)、また心筋梗塞作成後の心筋においても、コントロールの骨髄移植マウス(CON 群)では、CD11c と GFP 共陽性細胞の梗塞部への浸潤を認めるものの、DC ablation 群では、その消失を認め(図 2)、本システムにおける骨髄由来樹状細胞の除去が確認された。

図 1

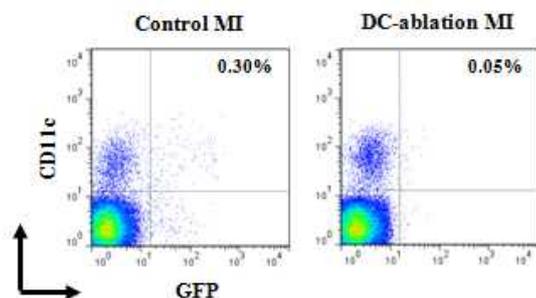
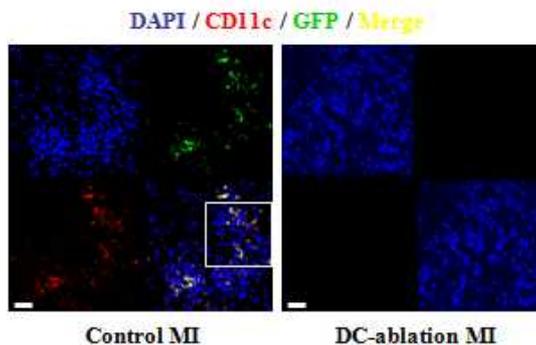


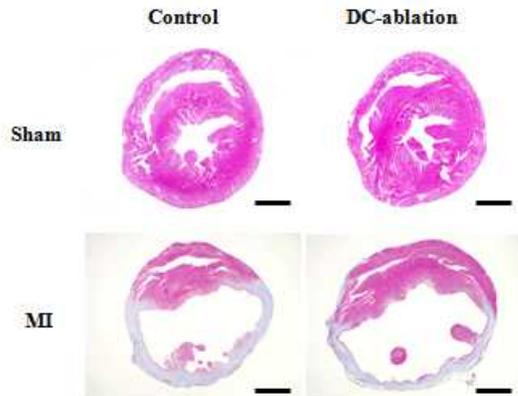
図 2



(2) 梗塞作成 28 日後の心エコー所見では、DC ablation 群において CON 群に比べ、左室の拡大と収縮能の低下を認め、カテ先マノメーターによる血行動態の計測でも、左室機能

の低下が明らかとなった。病理標本による検討では、梗塞サイズに差はないものの、DC ablation 群では、CON 群に比べ、左室梗塞部の壁厚が低下し、梗塞部伸展が顕著であった(図3)。

図3



(3) 免疫組織化学では、DC ablation 群で、CD11c の発現は認められなかったが、Mac3 陽性マクロファージ(図4)、MPO 陽性好中球の浸潤は、CON 群よりも増加していた。ただし、CD3 陽性T細胞に関しては、有意差を認めなかった(図5)。CD45R に関する蛍光染色では、梗塞部に浸潤する全白血球数の増加が明らかであった(図6)。

図4

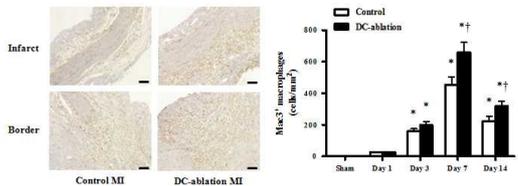


図5

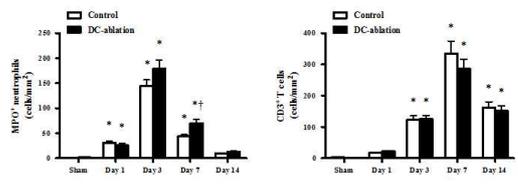
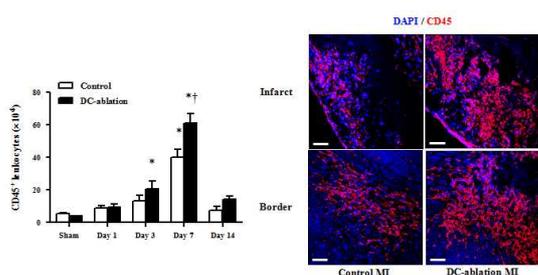
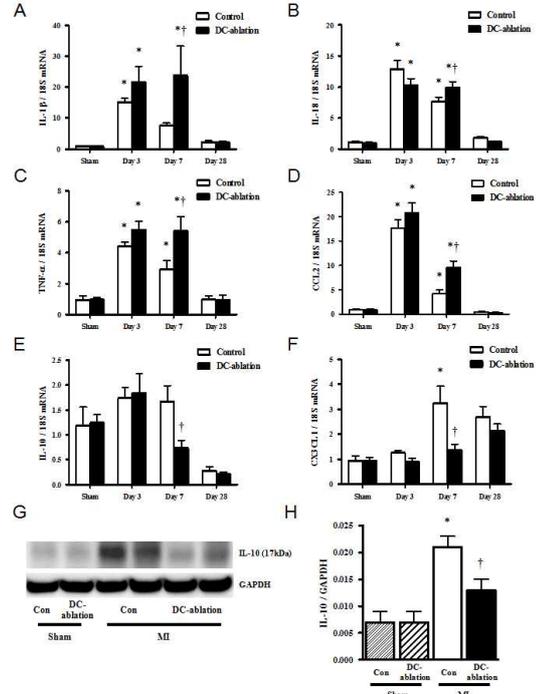


図6



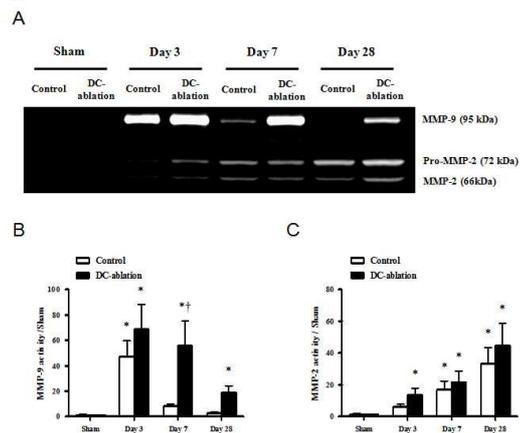
mRNA の発現では、DC ablation 群において、IL-1, IL-18, TNF-, CCL2 といった炎症性サイトカインの発現上昇を認めた。抗炎症作用を有する IL-10 の発現と CX3CL1 の発現は、むしろ低下していた(図7)。

図7



MMP の中でも MMP-9 の活性が DC ablation 群では、CON 群に比較して上昇しており、炎症惹起に伴う細胞外マトリックス分解の亢進が示唆された(図8)。

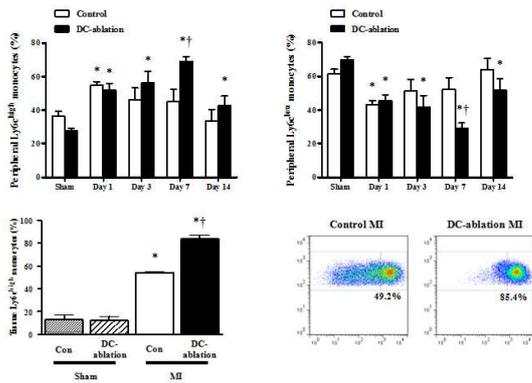
図8



(4) DC ablation 群では、末梢血ならびに梗塞部心筋において inflammatory Ly6c^{high} monocyte の増加を認め、一方、炎症をむしろ抑制し、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現などを介して、治癒過程に貢献する Ly6c^{low} monocyte は末梢血中での減少が

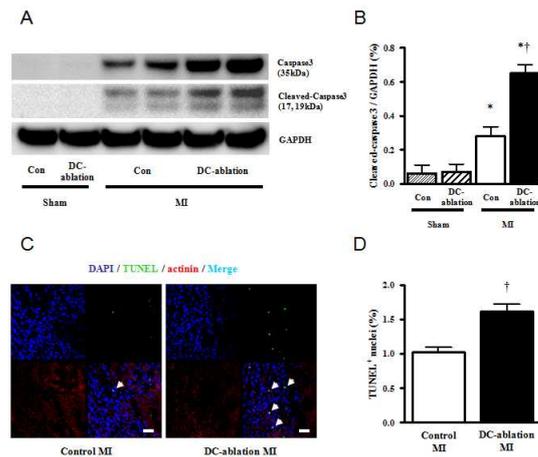
認められた(図9)。

図9



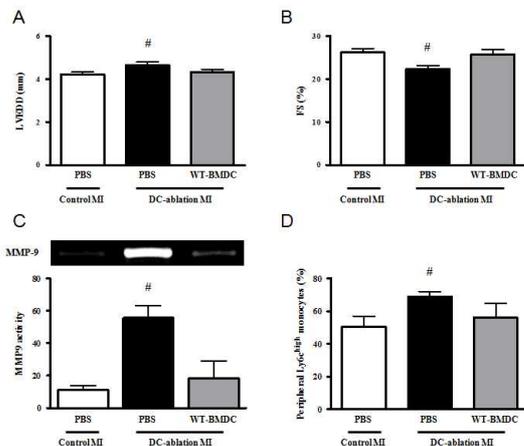
(5) 心筋における Caspase3 の発現は、DC ablation 群で CON 群に比べ上昇し(図 10A, B)、TUNEL 陽性細胞も増加していることが確認された(図 10C, D)。

図 10



(6) wild type マウス骨髄より抽出した樹状細胞を adoptive transfer したところ、左室機能は回復し、心筋 MMP-9 の活性低下、末梢血炎症性単球数の低下とともに、左室リモデリングも改善した(図 11)。

図 11



結論

上記の結果より、骨髄由来樹状細胞は、心筋梗塞後における炎症性単球、マクロファージの活性化をむしろ抑制する働きを有し、左室リモデリングに対して保護的な役割を有する可能性が示唆された。

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)

[学会発表](計1件)

Anzai A, Anzai T, Maekawa Y, Kaneko H, Nagai T, Sano M, Yoshikawa T, Ogawa S, Fukuda K. Selective depletion of dendritic cells resulted in deteriorated left ventricular remodeling after myocardial infarction. 第75回日本循環器学会総会. 2011年3月(学会中止のため抄録のみ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安斉 俊久 (ANZAI TOSHIHISA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 60232089

(2) 研究分担者

高橋 寿由樹 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号: 20286470

(3) 連携研究者

小安 重夫 (KOYASU SHIGEO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90153684