

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15199

研究課題名(和文) プロスタグランジンD2系を介した心臓炎症性リモデリングの制御

研究課題名(英文) Regulation of cardiac remodeling by inhibiting the PGD2-mediated inflammatory response.

研究代表者

池田 祐一 (Ikeda, Yuichi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10744419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は心臓炎症性リモデリングの病態モデルとして自己免疫性心筋炎マウスを解析した。自己免疫性心筋炎マウス群ではPGD2産生量が対照群に比して増加しており、またH-PGDS阻害薬投与によってその量が有意に抑制され、かつ心筋組織の線維化が改善された。これらはPGD2の機能制御を通じて心筋リモデリングの進展を阻止出来る可能性を示唆している。尚、本プロジェクトを遂行する過程で、我々はより個体差が小さく安定した動物実験系の確立を目指し、mdxマウスを基盤とした新たな心臓炎症性リモデリングモデル系も樹立した。今後はこのモデル系を用いて更に研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory response to the cardiomyocyte injury accelerates cardiac remodeling, the pathological process which often determines the clinical course of heart failure. Utilizing the experimental autoimmune myocarditis in mice as a model system, we found that PGD2 produced by H-PGDS contributed to the pathogenesis of cardiac remodeling initiated by local inflammation. In this model, cardiac PGD2 levels were elevated, and the systemic administration of H-PGDS inhibitor decreased the levels of PGD2, resulting in less fibrotic changes in the heart. These findings suggest that inhibition of the local production of PGD2 in the heart is beneficial for suppressing cardiac remodeling. To test if we could generalize our present findings, we established another mouse model based on the mdx mice. Using our second model, we are currently planning to determine if other bioactive lipid mediators produced in the heart are also involved in the pathogenesis of cardiac remodeling.

研究分野：薬理学、炎症、免疫、プロスタグランジン

キーワード：自己免疫性心筋炎 心筋線維化 プロスタグランジンD2 H-PGDS阻害薬

1. 研究開始当初の背景

高血圧性心疾患、虚血性心疾患、心筋症、心筋炎などの様々な心疾患において心筋肥大、壊死、線維化といった心筋リモデリングが共通して進行することが知られている。これまでβ遮断薬やACE阻害薬の発見により一定の心筋リモデリングの進行予防効果を得ることができたが、我が国における心疾患による死亡者数は未だ約20万人に上り、死亡数全体の15%以上を占めている。現在の治療で、心疾患終末病態へとつながる心筋リモデリングを十分に制御できているとは言い難く、更なる治療法の開発が望まれている。最近の研究により心筋リモデリングのメカニズムの一つとして、炎症の関与が示唆されている(Nahrendorf M, et al. Circulation 2010, Shichita T, et al. Nat Med 2012)。

2. 研究の目的

炎症においてはプロスタグランジン類をはじめとする脂質メディエーターが重要な働きをしている。近年、デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)のモデル動物であるmdxマウスおよびDMD犬において、プロスタグランジン(PGD2)合成酵素の一つである造血器型PGD2合成酵素(H-PGDS)を阻害すると、大腿四頭筋の壊死・炎症の範囲が軽減し、筋力低下が抑制されることが報告された(Mohri I, Urade Y, et al. Am J Pathol 2009)。これは炎症を介して生じる2次的な骨格筋壊死がH-PGDS阻害によって抑制されたことを示しており、PGD2系が骨格筋組織における炎症制御のターゲットとなりうる可能性を示唆している。本申請研究においては、この骨格筋組織における知見を心筋組織にも外挿し、心臓におけるPGD2系を制御することで各種心疾患における炎症を介した心筋リモデリングの進行を抑制できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

自己免疫性心筋炎モデルにおけるPGD2系の役割を検討する。

1)PGD2合成酵素(H-PGDSとL-PGDS)およびPGD2受容体(DP1とDP2)の自己免疫性心筋炎モデル心臓における発現解析

2)H-PGDS阻害剤の自己免疫性心筋炎モデルにおける効果の検証

3)H-PGDSコンディショナルノックアウトマウス解析によりどの細胞に発現するH-PGDSが病態形成に関与しているかを検証

4)PGD2受容体(DP1とDP2)コンディショナルノックアウトマウスライン解析によりどの細胞に発現する受容体が病態形成に関与しているかを検証

4. 研究成果

我々は、自己免疫性心筋炎モデルマウス of 全心臓を用いたリビドミクス解析を施行し、自己免疫性心筋炎マウス心臓においてPGD2産生量がコントロール心臓に比して増加していることを見いだした。次にPGD2合成酵素、PGD2受容体の発現を解析したところ、自己免疫性心筋炎のピークであるday 18頃にPGD2合成酵素の一つであるHPGDSの発現亢進が認められた。そこで自己免疫性心筋炎マウスに、近年開発された強力で選択的なHPGDS阻害薬(Kamauchi et al. Brain Nerve 2011)を投与したところ、心臓におけるPGD2産生量が有意に抑制された。これは心臓におけるPGD2の産生は炎症によってリクルートされてくる血球細胞に発現するHPGDSにかなり依存しているという興味深い知見を示唆している。さらに我々はHPGDS阻害薬投与群において、心筋炎によって惹起される心筋の線維化が有意に抑制されることも見いだした。これらの結果は、少なくとも自己免疫性心筋炎モデルにおいてはPGD2系の制御を通じて心筋リモデリングがコントロールされる可能性を示唆している。このように我々は本研究を通じて、幾つかの興味深い知見を得ることができたが、それと同時に自己免疫性心筋炎モデルそのものに関して以下の課題を見いだした。

自己免疫性心筋炎を誘発するプロトコールは既に確立したものが存在するが、実際に施行してみると心筋炎の誘発のされ方において個体間のバラツキが大きく、信頼に足るデータを取得するためには相当数のマウス個体が必要となる。

自己免疫性心筋炎はBALB/cバックグラウンドでのみ誘発可能なため、遺伝学的実験を施行する際には、あらかじめ使用する遺伝子改変マウスラインをBALB/cへと十分にバッククロスしておく必要がある。近年の遺伝子改変マウスはC57BL/6Jバックグラウンドが標準であるため、実験をするために時間とコストがかかる。

上記の課題を克服すべく、再現性が高く(マウス個体間のバラツキの小さい)かつC57バックグラウンドで実験可能な新たな心臓炎症性リモデリングモデルマウスを樹立した。

mdxマウスは、ヒトDMD患者と同様に機能的ジストロフィン分子が欠損したisogenicなDMDモデルである。しかしヒトDMD患者と異なり、骨格筋障害は認められるものの、心筋障害の発生・進展には非常に時間がかかるため、そのままでは心病変の病態解析には不向きであると考えられてきた。1994年にAndersonらは、mdxマウスに甲状腺ホルモンであるT3を投与すると、骨格筋を主とする筋組織障害が陰性コントロール群と比較して有意に増加することを明らかにした(Anderson et al. Muscle Nerve 1994)。

我々はこの報告に着目し、mdxマウスに2週間T3を投与した後、心臓超音波検査を用いて心臓の生理学的パラメーターを詳細に検討した。驚くべきことに、T3投与mdxマウス全例において、心収縮能が著明に低下し、形態学的にも明らかな拡張型心筋症様の変化(左室拡張期末

期径 LVDd、左室収縮期末期径 LVDs の拡大)を認めた(野生型マウスに2週間 T3 を投与してもこのような変化は全く認められない)。また T3 投与 mdx マウス心臓の病理組織学的解析では心筋組織における炎症細胞の浸潤と線維化を認めた(未発表データ)。

そこで今後は、この新たな拡張型心筋症様マウス(mdx+T3 系)を“心臓炎症性リモデリングモデル”として解析し、心臓炎症性リモデリングを制御する炎症メディエーターの同定、同定された炎症メディエーターの作用機序の解明、

このモデルで得られた知見がどの程度他の心疾患においても適用されるか、に関して更に明らかにしていく予定である。

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14件)

1. Watanabe R, Suzuki J, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction. *Sci Rep*. 7:43920, 2017. doi: 10.1038/srep43920.
2. Takanashi M, Taira Y, Okazaki S, Takase S, Kimura T, Li CC, Xu PF, Noda A, Sakata I, Kumagai H, Ikeda Y, Iizuka Y, Yahagi N, Shimano H, Osuga J, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Role of hormone-sensitive lipase in leptin-promoted fat loss and glucose lowering. *J Atheroscler Thromb*. 24:1105-1116, 2017. doi: 10.5551/jat.39552.
3. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS* 12(3): e0174099, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0174099.
4. Nagata N, Iwanari H, Kumagai H, Kusano-Arai O, Ikeda Y, Aritake K, Hamakubo T, Urade Y. Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D2. *PLoS One* 12(4): e0175452, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0175452.
5. Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. Periodontitis deteriorates peripheral arterial disease in Japanese population via enhanced systemic inflammation. *Heart Vessels*. 32:1314-1319, 2017. doi: 10.1007/s00380-017-1003-6.
6. Aoyama N, Suzuki J, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Minabe M, Izumi Y, Isobe M. Specific periodontopathic bacterial infection affects hypertension in male cardiovascular disease patients. *Heart Vessels*. 33:198-204, 2017. doi: 10.1007/s00380-017-1042-z.
7. Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki A, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Minabe M, Izumi Y, Isobe M. Detrimental effects of specific periodontopathic bacterial infection on tachyarrhythmia compared to bradyarrhythmia. *BMC Cardiovasc Disord*. 17:267, 2017. doi: 10.1186/s12872-017-0703-2.
8. Izumi M, Ikeda Y, Yamashita H, Asaoka Y, Fujishiro M, Shin M, Abo Y: Safety and effectiveness of endovenous laser ablation combined with ligation for severe saphenous varicose veins in Japanese patients. *Int Heart J*. 57:87-90, 2016. doi: 10.1536/ihj.15-282.
9. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertens Res*. 39:203-209, 2016. doi: 10.1038/hr.2015.136.
10. Watanabe R, Suzuki J, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M: Angiotensin II receptor blocker irbesartan attenuates cardiac dysfunction induced by myocardial infarction in the presence of renal failure. *Hypertens Res*. 39:237-244, 2016. doi: 10.1038/hr.2015.141.

11. Kobayashi N, Suzuki J, Aoyama N, Sato H, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M: Toll-like receptor 4 signaling plays a critical role in Porphyromonas gingivalis accelerated neointimal formation after arterial injury in mice. Hypertens Res. 39:717-722, 2016. doi: 10.1038/hr.2016.58.
12. Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki JI, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M: Porphyromonas gingivalis, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. J Mol Cell Cardiol. 99:123-137, 2016. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.017.
13. Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, Wakayama K, Ikeda Y, Kumagai H, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Hirata Y: Periodontitis may deteriorate sinus of valsalva dilatation in marfan syndrome patients. Int Heart J. 57:456-460, 2016. doi: 10.1536/ihj.15-395.
14. Sato H, Suzuki J, Aoyama N, Watanabe R, Kaneko M, Shiheido Y, Yoshida Y, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Izumi Y: A periodontal pathogen porphyromonas gingivalis deteriorates isoproterenol-induced myocardial remodeling in mice. Hypertens Res. 40:35-40, 2017. doi: 10.1038/hr.2016.114.

〔学会発表〕(計1件)

Yamaguchi T, Motozawa Y, Kumagai H, Shinohara M, Ikeda Y, Manabe I, Aritake K, Urade Y, Komuro I. Therapeutic effect of prostaglandin D2 synthase inhibition in experimental autoimmune myocarditis. American Heart Association (New Orleans, USA: 2016/11/12-16)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 祐一 (IKEDA, Yuichi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：10744419

(2) 研究分担者

熊谷 英敏 (KUMAGAI, Hidetoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20281008

森田 啓行 (MORITA, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60323573

篠原 正和 (SHINOHARA, Masakazu)

神戸大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80437483

(3) 連携研究者

裏出 良博 (URADE, Yoshihiro)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構

・教授

研究者番号：10201360