

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08048

研究課題名(和文)心外膜脂肪に潜む免疫細胞を介した心筋梗塞後心不全における炎症進展機序の解明

研究課題名(英文)Role of Pericardial Fat Immune Cells in Myocardial Infarction

研究代表者

安西 淳 (ANZAI, Atsushi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50528164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウス心筋梗塞モデルを用いて、梗塞後に心外膜脂肪においてinterleukin (IL)-3を産生するB細胞が誘導されることを見出した。IL-3受容体発現細胞を検討すると、主に梗塞部位のmacrophage, monocyteにその発現が認められた。これらmyeloid cellはMI後の炎症性サイトカインの主なsourceであるため、マウス骨髄細胞よりBone marrow-derived macrophageを誘導し、IL-3で刺激すると、IL-1, IL-6, CCL2などの炎症性サイトカインが強力に誘導されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器疾患における心外膜脂肪の意義を示した研究は少ない。本研究はIL-3を介した心外膜脂肪と心臓monocytes/macrophageのクロストークが梗塞後の過剰な炎症を誘導・増幅する機序を示すのみならず、心外膜脂肪がどのように循環器疾患に影響を与えるのかを明らかにする研究になり得る。さらにはヒト検体を用いた臨床研究へ発展する可能性を秘めており、心筋梗塞後心不全を予防する新規治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified that interleukin (IL)-3-expressing B cells expand in the pericardial fat in response to myocardial infarction in mice. IL-3 receptor is highly expressed in cardiac macrophages and inflammatory monocytes. In vitro experiments using bone marrow-derived macrophages further revealed that IL-3 stimulates them to produce inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1beta, IL-6, and CCL2, suggesting that pericardial B cell-derived IL-3 accelerates infarct inflammation, thereby leading to poor outcomes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋梗塞 炎症 免疫応答

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞(MI)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。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、新たな治療のターゲットとなり得ると考えられる。

心外膜脂肪(pericardial adipose tissue: PAT)は心臓の外側に位置する異所性内臓脂肪であり、発生学的には腹部内臓脂肪と同様に中胚葉より分化する。肥満に伴う腹部内臓脂肪の増大が全身性炎症反応を惹起し、動脈硬化進展、MIなどの心血管疾患発症の危険因子、また心血管イベント発症後の予後不良因子となり得ることは数多くの臨床・基礎研究において報告されている。一方、PATに関しては、その容積が、腹部内臓脂肪を含めたその他の危険因子と独立して、隣接する冠動脈の動脈硬化進展、さらには心血管疾患の発症・予後に関与することが幾つかの臨床研究において報告されているが(Rosito GA et al. *Circulation* 2008, Shah RV et al. *JACC Cardiovasc Imaging* 2017 etc) 基礎研究からのアプローチはほぼ皆無であり、PATがどのように患者の予後に寄与するのかの詳細な機序は明らかではない。

Interleukin-3 (IL-3)は、マウスにおいて1981年に(Ihle JN et al., *J Immunol* 1981)、ヒトでは1986年に(Yang YC et al., *Cell* 1986)クローニングされた造血成長因子の一つであり、造血幹細胞、肥満細胞、好塩基球などに作用し、細胞の分化、成熟、増殖を促進することが知られている(Nicola NA et al., *Blood* 1996, Lantz C et al., *Nature* 1998)。これまでにアレルギーや悪性腫瘍、感染症などの領域で主に研究が行われてきているが(Mach N et al., *Blood* 1998, Mangi MH et al., *Cytokines Cell Mol Ther* 1999, Siracusa MC et al., *Nature* 2011, 研究業績発表論文#4 etc)、その多彩な機能に関わらず、心血管疾患を含めた多くの病態におけるIL-3の役割は今もなお不明である。

申請者は、マウス心筋梗塞後4日目の心外膜脂肪に浸潤する炎症細胞をflow cytometryにより検討した。その結果興味深いことに、心外膜脂肪の容量が心筋梗塞を作製しないshamのマウスと比較してMI後に増加すること(sham  $12 \pm 2$  vs. MI  $26 \pm 4$  mg)、MI後の心外膜脂肪にはshamのマウスの心外膜脂肪と比較して、monocyte, macrophage, T細胞, B細胞などの炎症細胞が多数存在すること(図1)さらに興味深いことに、shamマウスではほぼ見られなかったInterleukin-3 (IL-3)を産生するB細胞(IgM<sup>+</sup>)が強力に誘導されることを見出した(図2)。上記同一のマウスの腹部内臓脂肪の炎症細胞の数にはほぼ変化がなかったこと、心筋梗塞部位、脾臓、腹部内臓脂肪にはIL-3産生細胞の増加が認められなかったこと(図2)などから、MI後にIL-3が心外膜脂肪特異的に誘導されることと考えられる。前述のように、IL-3は造血成長因子であり、マウス敗血症モデルにおいて骨髄での好中球・単球の産生を強力に促進することが報告されている一方で、MI後の過剰な好中球・単球の浸潤は、予後を悪化させることが知られている。これらの事実、過去の報告を踏まえ、心外膜脂肪に存在するB細胞由来のIL-3が心筋梗塞後の過剰な炎症を誘導しているのではないかという仮説をもとに、本研究を行う。

### 2. 研究の目的

本研究では、IL-3産生B細胞が梗塞後心不全に及ぼす影響を明らかにするとともに、IL-3により修飾される炎症・免疫応答を標的とした新たな治療法へと発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではMI後心不全におけるIL-3の役割を明らかにするためにIL-3KOマウスを用いる。実験モデルにはマウスの心筋梗塞モデルを用い、コントロールとして同腹子のIL-3<sup>+/+</sup>マウス(以下、野生型: WT)を用いる。心外膜を損傷しないように注意を払い、WT及びIL-3KOマウスを、心筋梗塞を作製するMI群、同様の手技であるものの冠動脈を結紮しないsham群にそれぞれ分け、4群における28日間での生存率(Kaplan-Meier分析)、28日目における心機能、血行動態(心エコー、1.7Frカテ先マノメーター)、0, 1, 4, 7, 14, 28日目での梗塞部位、心外膜脂肪、腹部内臓脂肪、血液、骨髄、脾臓における炎症細胞数(flow cytometry)、3, 7日目にお

図1. マウスMI後、心外膜脂肪における炎症細胞の変化

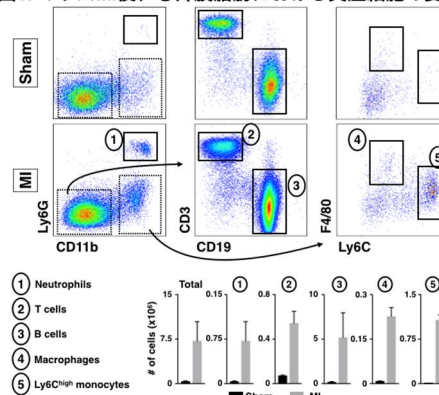
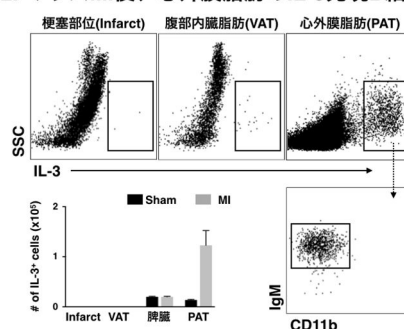


図2. マウスMI後、心外膜脂肪のIL-3発現B細胞



る梗塞部位での IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MMP-2, MMP-9, IL-10, VEGF, TGF- $\beta$ , MCP-1 などの炎症性・抗炎症性サイトカイン ( RT-qPCR, Western blot, ELISA ) 梗塞部位の線維化 ( 病理組織染色 ) などの評価を行う。また、組織切片を用いた IL-3 及び B 細胞マーカーの共染色や、心外膜脂肪に存在する白血球の subset をそれぞれ sorting 後に IL-3 の遺伝子発現を確認することで、心外膜脂肪の IL-3 産生 B 細胞に関して、さらなる評価を行う。また、IL-3KO マウスと B 細胞欠損マウス (  $\mu$ MT マウス ) の骨髄を用いた mixed bone marrow chimera により B 細胞特異的 IL-3KO マウスを作製し、表現型の評価を行う。

#### 4 . 研究成果

IL-3 のターゲットとして梗塞部位における IL-3 受容体 (  $\alpha$  subunit: CD123,  $\beta$  subunit: CD131 ) の発現を検討すると、主に macrophage, monocyte にその発現が認められた ( 図 3 )。これら myeloid cell は MI 後の炎症性サイトカインの主な source であるため ( Nahrendorf M et al. *J Exp Med* 2007, マウス骨髄細胞より Bone marrow-derived macrophage (BMDM) を誘導し、IL-3 で刺激すると、IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 などの炎症性サイトカインが強力に誘導されることが明らかとなった ( 図 4 )。

これらのデータから、IL-3 が全身性に骨髄での造血を促すだけでなく、梗塞部位局所においても重要な役割を担っている可能性が示唆される。この局所での機能を in vivo で検討するため、IL-3KO マウスと B 細胞欠損マウス (  $\mu$ MT マウス ) の骨髄を 1:1 で混合し、致死放射線照射を行った野生型 C57B/6 マウスに骨髄移植を行う mixed bone marrow chimera により B 細胞特異的 IL-3KO マウスを作製した。コントロールは IL-3KO マウスの代わりに野生型マウスを用いた。B 細胞特異的 IL-3KO マウスに MI を作製し、1 ヶ月後の生存率、心機能の評価を行ったところ、B 細胞特異的 IL-3KO マウスで改善傾向にあった。また梗塞部位での浸潤細胞の評価を flow cytometry を用いて行くと、B 細胞特異的 IL-3KO マウスで Ly6Chigh 単球、マクロファージの集積や、IL-1 , IL-6, CCL2 などの炎症性サイトカインの発現が低下していた。一方、骨髄、末梢血中の好中球、単球などの myeloid cell の数にはコントロール群と明らかな差を認めなかった。

今後は IL-3 がどのように心外膜脂肪に誘導されるかを検討していく。MI 後には Toll-like receptor を介した自然免疫シグナルが炎症の導入に重要であることが報告されているため、TLR2、TLR4、Myd88KO マウスなどを用いて心外膜脂肪の IL-3 産生 B 細胞を flow cytometry 法で検討する。また、MI 作製前と後の心外膜脂肪から B 細胞を sorting し、網羅的解析を行うことで IL-3 産生亢進の機序解明を試みる。

図3. 梗塞部においてIL-3受容体はmacrophages, monocytes に発現する

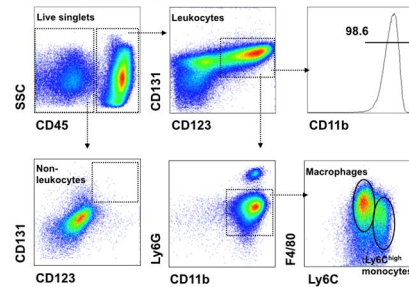
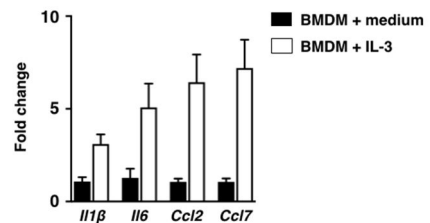


図4. IL-3はmacrophageからの炎症性サイトカインの発現を誘導する



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinichi Goto, Genki Ichihara, Yoshinori Katsumata, Seien Ko, Atsushi Anzai, Kohsuke Shirakawa, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Hidenori Moriyama, Takahiro Hiraide, Hiroki Kitakata, Takayasu Kobayashi, Keiichi Fukuda, Motoaki Sano	4. 巻 85
2. 論文標題 Time-Series Transcriptome Analysis Reveals the miR-27a-5p-Ppm1l Axis as a New Pathway Regulating Macrophage Alternative Polarization After Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 929 - 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kohsuke Shirakawa, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Yoshinori Katsumata, Atsushi Anzai, Hidenori Moriyama, Hiroki Kitakata, Takahiro Hiraide, Seien Ko, Shinichi Goto, Genki Ichihara, Keiichi Fukuda, Tohru Minamino, Motoaki Sano	4. 巻 9
2. 論文標題 MerTK Expression and ERK Activation Are Essential for the Functional Maturation of Osteopontin-Producing Reparative Macrophages After Myocardial Infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of American Heart Association	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.017071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Anzai A, Mindur JE, Halle L, Sano S, Choi JL, He S, McAlpine CS, Chan CT, Kahles F, Valet C, Fenn AM, Nairz M, Rattik S, Iwamoto Y, Fairweather D, Walsh K, Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK	4. 巻 216
2. 論文標題 Self-reactive CD4+ IL-3+ T cells amplify autoimmune inflammation in myocarditis by inciting monocyte chemotaxis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 369-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安西 淳
2. 発表標題 心筋梗塞後炎症ネットワークの理解
3. 学会等名 CVMW2020 心血管代謝週間（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安西 淳
2. 発表標題 Deciphering stromal-inflammatory cell crosstalk identifies a novel mechanism underlying post-infarction cardiac repair
3. 学会等名 第4回 BCVR2020 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------