

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08922

研究課題名(和文) 活動性心筋炎による難治性重症心不全に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文) New Diagnosis and Treatment in Fulminant Myocarditis

研究代表者

竹内 一郎 (TAKEUCHI, Ichiro)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90327346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：活動性心筋炎を基盤とした拡張型心筋症は難治性急性心不全を引き起こし、人工心臓および心移植を必要とする。故に、その治療は世界的課題となっている。病態進展の主要な機序としてウイルス感染後自己免疫応答が考えられている。本検討では、この一連の免疫過程を制御できる治療標的として転写因子インターフェロン制御因子(IRF)ファミリーに注目した。IRFの拡張型心筋症における治療標的としての意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋ミオシン免疫により作成したマウス自己免疫性心筋炎心筋症を用いて、IRFタンパク発現を解析した結果、IRF-7およびIRF-9発現はそのリン酸を含め有意な変動を示さなかった。また、IRF-3発現はそのリン酸化も含めて、ミオシン免疫拡張型心筋症期において低下していた一方、IRF-5発現が心筋炎活動期から心筋症期にかけて持続的に増加していた。さらに、免疫染色にて、心筋組織浸潤免疫細胞においてIRF-5の発現が認められ、特に樹状細胞核内のIRF-5が同定された。本モデルにおいても、ミオシン免疫心筋組織においてIRF-5と共にTh17転写因子の発現が認められた。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy based on active myocarditis leads to intractable acute heart failure, requiring artificial heart lung and heart transplantation. Therefore, its treatment has become a global challenge. The major mechanism of disease progression is thought to be the autoimmune response after viral infection. In this study, we focused on the interferon regulatory factor (IRF) family of transcription factors as a therapeutic target that can regulate this immune process, and clarified the significance of IRF as a therapeutic target in dilated cardiomyopathy.

研究分野：救急医学

キーワード：心筋炎

1. 研究開始当初の背景

活動性心筋炎を基盤とした拡張型心筋症は難治性急性心不全を引き起こし、人工心肺および心移植を必要とする。故に、その治療は世界的課題となっている。病態進展の主要な機序としてウイルス感染後自己免疫応答が考えられている。本検討では、この一連の免疫過程を制御できる治療標的として転写因子インターフェロン制御因子 (IRF)ファミリーに注目した。

心筋炎および引き続き拡張型心筋症は予期せず薬物治療抵抗性の重症心不全・心原性ショックを引き起こし、多くの症例が人工心肺そして心臓移植を必要とする。しかしながら、病態進展を抑制し、予後を改善する決定的な治療介入法は未だに確立されていない。病態進展の主要な機序として考えられてきたのが自己免疫応答である。事実、心筋構成成分に対する自己抗体が心筋炎・心筋症患者より検出されてきた。我々は、心筋ミオシン免疫により作成される実験的自己免疫性心筋炎モデルを用いて、難治性心不全の制御機序を探求してきた(Circ J. 2002, Circulation. 2006, Vaccine. 2013)。

最近、Th17T 細胞惹起性自己免疫応答は、心筋炎・心筋症の発症進展において中心的な役割を果たしていることが示されてきた。Th17T 細胞の誘導において転写因子 Retinoid-related Orphan Receptor gamma (ROR γ t) が、その分化および増殖においてインターロイキン(IL)-6、IL-1、IL-23 および TGF- β 発現が重要な役割を果たすことが明らかとされてきた。一方、古典的 T 細胞サブセットである Th1/Th2 は Th17 免疫の成立を阻害する(図-1)。これらの一連の T 細胞免疫バランスが心筋炎・心筋症の進行を決定することができる。

インターフェロン制御因子 (IRF)ファミリーは、感染ウイルスの排除における重要な機序として知られている。一方、中でも IRF-3/7 は心筋アポトーシスおよび心筋繊維化における制御因子としても注目されている。さらに、IRF-3/7 は Th17T 細胞の分化増殖における一つの制御因子であることが示されてきた。しかしながら、IRF-3/7 の自己免疫性心筋炎における役割は不明なままである。

我々は、IRF-3 遺伝子欠損マウスを用いた前実験にて、心筋炎惹起性コクサッキーB3 ウイルス感染後の心筋組織における IL-17 とその関連サイトカイン発現と IRF-3 の関係を見出した。

しかしながら、上記の研究アプローチではウイルス感染による影響を排除することができず、本検討では、IRF 遺伝子欠損マウスへのミオシン免疫により作成した実験的自己免疫性心筋炎モデルを用いて、心筋炎・心筋症の進展制御における IRF-3 および IRF-7 の意義を検討する。

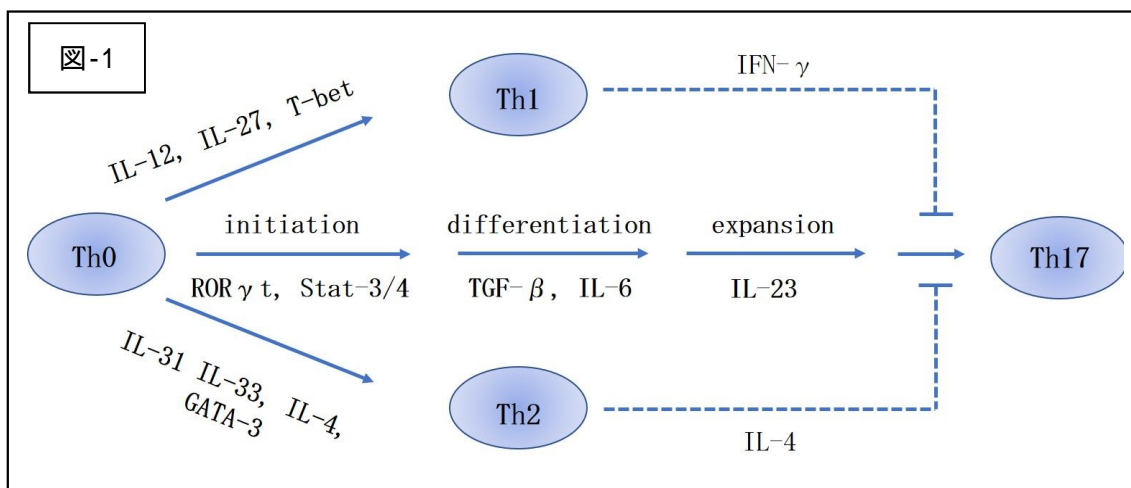


図 1. Th1/Th2 による Th17 免疫阻害

2. 研究の目的

IRF の拡張型心筋症における治療標的としての意義を明らかにする。

- (1) 自然免疫において中心的な役割を果たす IRF-3/7 に、心臓自己免疫応答の制御因子という新たな基礎的意義を与える。
- (2) 活動性心筋炎・心筋症における新たな制御機序と治療標的としての IRF-3/7 の意義を明らかにする。

人工心肺の導入回避あるいはその離脱を可能とし、心臓移植に依存せずに難治性重症心不全の予後を劇的に改善する新たな治療戦略の開発に貢献する。

3. 研究の方法

(A)自己免疫性心筋炎モデルの作成 (B)分子生物学的解析:心筋組織における IRF タンパク発現の経時的推移をウエスタンブロットにて、その局在を免疫染色にて解析する。(C)フローサイトメトリー法;心臓浸潤細胞における IRF 発現および核内移行を解析する。(D) BALB/C バックグラウンド遺伝子改変マウスの作成。

本研究では、以下の仮説を立て、免疫学および分子生物学的アプローチから検証する。

- (1) ミオシン免疫マウスにおいて、IRF-3/7 は心筋組織炎症、心機能障害、および拡張型心筋症への進展を阻害する。
 - (2) IRF-3/7 は心筋組織における Th17 免疫シグナルを抑制する。
 - (3) IRF-3/7 は心筋組織における Th17 免疫の抑制因子である Th2(IL-31, IL-33, IL-4, GATA-3) 或いは Th1(IL-12, IL-27, IFN- γ , T-bet)発現を促進する。
 - (4) Th17 転写因子である ROR γ や Stat3 或いは Th17 活性化に必要な IL-23 受容体と IRF-3/7 との物理的および機能的な負の相互作用を認める。
 - (5) Th1/Th2 転写因子である T-bet/GATA-3 と IRF-3/7 との正の相互作用を認める。
- 最終的に、IRF-3/7 は Th1/Th2/Th17 の免疫シグナルのバランスを制御することにより、ミオシン惹起性心臓自己免疫応答を抑制し、心筋症の進展をコントロールすることを明らかとする。

In vivo 実験

- (1) 野生株マウスおよび IRF-3 或いは IRF-7 遺伝子欠損マウス加えて IRF-3/7 遺伝子二重欠損マウスの準備
マウス購入後、交配飼育を繰り返し、目標数の6週オス欠損およびコントロールマウスを準備する。

- (2) 実験的自己免疫性心筋炎モデルの作成

我々が以前報告した如く(Vaccine. 2013)、野生型マウスおよび IRF-3 遺伝的欠損マウスに心筋ミオシンを免疫することにより実験的自己免疫性心筋炎を惹起する。引き続き免疫後7日、14日、21日、および35日のポイントで、心エコーを施行し、心臓サンプルを摘出する。

- (3) 表現型解析

組織学的検討:各ポイントにおける心筋サンプルに対してヘマトキシリン・エオジン染色を施行し、心筋組織炎症の重症度を評価する。

免疫学的検討:各ポイントで摘出された心筋サンプルに対して、CD3 および IL-17A/IFN- γ 抗体を用いた FACS を行う。心筋組織における Th17/Th1T 細胞の浸潤を定量的に評価する。

炎症性サイトカイン:各ポイントにおける心筋組織の IL-6、IL-1 および TGF- β mRNA 発現を RT-PCR にて評価する。

Th 免疫サブセット:各ポイントにおける心筋組織の Th17 免疫(IL-17A, IL-23, IL-23 受容体および ROR γ mRNA)、Th1 免疫(IL-27, IFN- γ および T-bet mRNA)および Th2 免疫(IL-4 および GATA-3)を RT-PCR にて検討する。

心臓形態学的検討:各ポイントにおいて、心エコーにより左室壁厚、左室拡張・収縮期末期径、左室流入波形および左室収縮能を評価する。拡張型心筋症への進展を評価する。

- (4) 心臓組織における IRF-3/7 と Th 特性活性化の関係:各ポイントにおける心筋組織のリン酸化 stat3/4/6 のタンパク発現をウエスタンブロットにて評価する。

In vitro 実験

- (5) マクロファージにおける、IRF-3/7 による IL-6、TGF- β 、IL-31、IL-33、IL-12、IL-27 および IL-23p19 産生の制御

ミオシン免疫後、IRF-3/7 欠損およびコントロールマスの大腿骨髄よりマクロファージを分離し、Toll-like 受容体 (TLR)-3 或いは TLR-4 リガンド(poly; IC 或いは LPS)で刺激する。ELISA 法にてサイトカインのタンパクレベルを測定する。

RAW246.7 マクロファージにマウス IRF-3/7 プラスミドを遺伝子導入し、IRF-3 過剰マクロファージを作成。TLR-3/4 リガンドで刺激し、同様に ELISA 法によりサイトカインレベルを測定する。

- (6) IRF-3/7 による T 細胞特性の制御:ミオシン免疫後、IRF-3/7 欠損およびコントロールマスの脾臓から、FACS により CD3/CD4 陽性 T 細胞を分離。分離後 TLR-3/4 リガンドで刺激し、IL-4/GATA-3、IFN- γ /T-bet および IL-17A /ROR γ t mRNA レベルを RT-PCR で測定する。

- (7) IRF-3/7 と Th 転写因子(STAT3, ROR γ , T-bet, GATA-3)との物理的相互作用:HEK293 細胞にそれぞれのプラスミドを遺伝子導入し、免疫沈降法にて両方向性のタンパク結合を検討する。

4. 研究成果

心筋ミオシン免疫により作成したマウス自己免疫性心筋炎心筋症を用いて、IRF タンパク発現を解析した結果、IRF-7 および IRF-9 発現はそのリン酸を含め有意な変動を示さなかった。また、IRF-3 発現はそのリン酸化も含めて、ミオシン免疫拡張型心筋症期において低下していた一方、IRF-5 発現が心筋炎活動期から心筋症期にかけて持続的に増加していた。さらに、免疫染色にて、心筋組織浸潤免疫細胞において IRF-5 の発現が認められ、特に樹状細胞核内の IRF-5 が同定された。心筋症の進展において Th17 T 細胞が重要な役割を果たしていることが知られており、樹状

細胞は Th17 活性を制御することが報告されている。本モデルにおいても、ミオシン免疫心筋組織において IRF-5 と共に Th17 転写因子の発現が認められた。したがって、IRF-5 シグナルの心筋炎後心筋症進展における病原的な役割が推測された。これらの結果に基づいて、現在マウス遺伝子背景をバッククロスした IRF-5 total 遺伝子欠損マウスおよび cre-loxp system を用いて、IRF-5 loxp と CD11c cre マウスの交配により樹状細胞選択的 IRF5 遺伝子欠損マウスを作成している。今後はこれらの遺伝子改変マウスを用いて、心筋炎心筋症における IRF-5 の機能的役割を分子免疫学および病理形態学的に検討する。さらに、IRF5 阻害剤による表現型への影響も併せて検討する。

<引用文献>

1. Nishii M, Inomata T, Takehana H, Naruke T, Yanagisawa T, Moriguchi M, Takeda S, Izumi T. Prognostic utility of B-type natriuretic peptide assessment in stable low-risk outpatients with nonischemic cardiomyopathy after decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Jun 17;51(24):2329-2335.
2. Nishii M, Inomata T, Niwano H, Takehana H, Takeuchi I, Nakano H, Shinagawa H, Naruke T, Koitabashi T, Nakahata J, Izumi T. Beta2-Adrenergic agonists suppress rat autoimmune myocarditis: potential role of beta2-adrenergic stimulants as new therapeutic agents for myocarditis. *Circulation*. 2006 Aug 29;114(9):936-944.
3. Nishii M, Inomata T, Takehana H, Takeuchi I, Nakano H, Koitabashi T, Nakahata J, Aoyama N, Izumi T. Serum levels of interleukin-10 on admission as a prognostic predictor of human fulminant myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Sep 15;44(6):1292-1297.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 竹内一郎	4. 巻 33
2. 論文標題 劇症型心筋炎の発症機序解明と治療法開発に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 上原記念生命科学財団研究報告集	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高熊朗, 西井 基継, 佐治 龍, 竹内 一郎
2. 発表標題 自己免疫性心筋炎とプロスタグランジンE2受容体の関連
3. 学会等名 第47回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田康生, 布瀬史哉, 大場望, 廣見太郎, 酒井和也, 野垣文子, 内山宗人, 西井基継, 竹内一郎
2. 発表標題 実験的心筋炎モデルの作成とその解析.
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	内山 宗人 (UCHIYAMA Munehito) (00384842)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	西井 基継 (NISHII Mototsugu) (20383573)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	
研究分担者	安部 猛 (ABE Takeru) (80621375)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教 (22701)	
研究分担者	小川 史洋 (OGAWA Fumihiro) (80383610)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	

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