

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15855

研究課題名（和文）拡張型心筋症における心筋内への各炎症細胞浸潤の臨床的、病理学的意義の解明

研究課題名（英文）Pathological significance of myocardial infiltrating inflammatory cells in patients with dilated cardiomyopathy

研究代表者

中山 貴文（Nakayama, Takafumi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：00791154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では臨床的に拡張型心筋症の診断に至った症例の心筋生検検体を用い、炎症細胞浸潤と臨床像の関連を検証した。

2015年から2019年に心筋生検を行った128例の臨床データおよび、Tリンパ球、Bリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、制御性Tリンパ球、MHCなどの染色と定量を行った。しかし臨床データと病理データの間には、現段階では報告に足る有意義な関連を見出す事は出来ていない。臨床的拡張型心筋症の診断の多彩さ、また病理標本作成の条件・アーチファクトなどが問題だったと考える。本分野は他施設とも協力して多角的に検証を進めており、研究期間を過ぎてしまうが、本研究に関する解析と報告を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症における慢性心筋内炎症細胞浸潤は、予後予測や病態理解において近年注目されている。本研究で得た臨床データと検体データ、もしくは非有意な結果となった原因を更に検証し、今後の自施設、他施設、両者における研究計画・遂行に役立てたい。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the relationships between infiltrating inflammatory cells and clinical features in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy clinically.

Among 128 patients who underwent myocardial biopsy, we obtained clinical data and pathological counts of T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, regulatory T cells, and MHC. However, no significant relationship between clinical data and pathological results has been found. We believe the variety of diagnoses of dilated cardiomyopathy, the conditions, and artifacts of pathological specimen preparation were one of the problems. We are discussing this topic further with the other researchers outside; then we want to report the results after the fund period.

研究分野：心筋症

キーワード：心筋生検 リンパ球 マクロファージ 樹状細胞 炎症細胞浸潤 拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

DCM は心筋細胞の変性や間質線維化により、左室拡大と収縮不全をきたす予後不良の疾患である。近年、DCM の臨床像を呈する症例の中に、心筋生検で持続的炎症細胞浸潤を認める症例があり、心機能低下の機序に関連する可能性が提唱され、炎症性拡張型心筋症 inflammatory DCM (DCMi) と呼ばれる様になった。心筋生検組織のリンパ球浸潤(+マクロファージ浸潤) $14/\text{mm}^2$ として定義され、我々は DCMi 患者は予後が悪い事を報告した。また同時に、M2 マクロファージの浸潤が線維化量と予後に独立して関与している事を見出した。

一方で、急性心筋梗塞発症後の炎症細胞浸潤については既に報告がある。急性期障害心筋の除去に T リンパ球、M1 マクロファージが、線維化や修復に M2 マクロファージが関与している。しかし、急性心筋梗塞後では心筋修復・線維化は致命的な合併症(心破裂など)を回避する為に有益な反応であるが、DCM での修復・線維化における炎症細胞浸潤の役割は明らかでは無い。我々の上述研究では M2 マクロファージ 数が左室線維性リモデリングおよび予後悪化と関連している可能性が示唆された為、更なる検証が必要と考えられた。また、DCM における T リンパ球のサブタイプ(CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球)、B リンパ球、樹状細胞および樹状細胞サブタイプ(成熟樹状細胞、未成熟樹状細胞)など、その他免疫担当細胞による予後や病態における関与も明らかにされていない。

2. 研究の目的

- (1) DCM 患者のパラフィン埋没保存された心筋生検検体を再薄切し、特殊免疫染色を行う事で心筋に浸潤した単位面積当たりの炎症細胞数を測定し分布を明らかにする(単位面積あたりの CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球、CD20 陽性 B リンパ球、CD68 陽性マクロファージ、CD163 陽性 M2 マクロファージ、CD209 陽性樹状細胞、CD83 陽性成熟樹状細胞、MHC-class 陽性量、線維化量を定量する)
- (2) 臨床データをカルテから収集し、それぞれの炎症細胞との関与や予後への影響を確認する。それぞれの炎症細胞間の関係や、線維化との関係を解析し、DCM 心筋内での免疫応答を検索する。
- (3) また、肥大型心筋症(HCM)患者(もしくはその他心疾患患者)とも比較し、炎症細胞分布・役割・予後への影響の違いも明らかにしたい。

3. 研究の方法

2015 年 1 月~2019 年 2 月までに、DCM もしくは肥大型心筋症(HCM)を疑い診断目的で心筋生検を施行された 149 例を対象にデータを後ろ向きに収集した。カルテから患者基礎データ(入院時バイタル、身長、体重、既往歴、心不全入院回数、初回心不全入院から心筋生検までの期間、内服薬、喫煙、飲酒など)、一般臨床検査データ(BNP 含む採血検査、心電図、レントゲン、心臓エコー検査)、および右心カテーテル圧 データを収集した。

パラフィン保存された心筋生検検体を再度薄切し、抗 CD3 抗体(T リンパ球)、抗 CD4 抗体(ヘルパー T リンパ球)、抗 CD8 抗体(キラー T リンパ球)、抗 CD20 抗体(B リンパ球)、抗 CD68 抗体(マクロファージ)、抗 CD163 抗体(M2 マクロファージ)、抗 CD209 抗体(樹状細胞)、抗 MHC class 抗体、抗 PD1 抗体、抗 FOXP3 抗体(制御性 T 細胞)で免疫染色を行った。

4. 研究成果

診断群は DCM123 例、HCM15 例、心筋炎 4 例、アミロイドーシス 3 例、サルコイドーシス 4 例であった。DCM 患者のうち、透析患者 2 名、検体不良 4 名を除き 117 例で解析を行った。

(1) 臨床データ

平均年齢 61 歳、BMI22.7、左室拡張末期径 59mm、左室駆出率 31%、採血 BNP 値 673pg/mL 、心房細動症例 39 例であった。予後データ収集では 25 例での心不全再入院が観察された。アンギオテンシン変換酵素阻害薬もしくはアンギオテンシン受容体拮抗薬の内服率は 63%、遮断薬の内服率は 71%であり、十分な内服が開始される前の診断群である事が示唆される。

(2) 病理データ

今回の組織検体の中には、CD20 陽性細胞、CD68 陽性細胞、PD1、FOXP3 陽性細胞、CD11c 陽性細胞は殆ど観察されなかった。DCM における B リンパ球、PD1 陽性細胞、制御性 T 細胞の浸潤数については、現段階では一般的な浸潤数は十分報告されていないため、真に存在しないか、我々の染色条件不良の可能性があるか判断は難しい。CD68 陽性細胞が見られない事については DCM 検体内での報告が複数ある為、我々の染色データ不良であると言わざるを得ないと考える。CD3 陽性細胞については何度か条件を変えて染色を試みたもののアーチファクトが強く、細胞数カウントに難渋した。リンパ球分画として CD4、CD8 陽性細胞はほぼ同等数が観察された。CD163 陽性細胞は $30\text{--}60$ 個/ mm^2 と過去の報告や我々の過去の経験より多く、CD209 陽性細胞数 $20\text{--}40$ 個/ mm^2

程であった。(個数を「程」としたのは、アーチファクトのため評価不適切な可能性のある標本も無視できない症例数あった為。)

(3) 臨床データと病理データとの関連

今回の研究で得られた臨床データ(基礎データ、採血データ、心エコーデータ、右心カテテルデータ、予後データ)と病理データ(CD3、CD4、CD8、CD163、CD209、MHCclass 陽性細胞数)の関連を検証した。しかし残念ながら、今回計測し得た病理データは、どの臨床データとも有意な相関を示さなかった。また DCM と HCM の間でも、炎症細胞浸潤の分布に明らかな違いは確認されなかった

(4) まとめ

結果について

DCM123 例、HCM15 例で検証を行った。

DCM 群は過去の報告と同等の心機能であったが、十分な抗リモデリング薬の導入が行われる前の患者群であった可能性がある。

CD20 陽性細胞(B リンパ球)、CD68 陽性細胞(M₁)、PD1、FOXP3 陽性細胞、CD11c 陽性細胞は検体内に観察されなかった。染色条件不良の可能性が否定できない。

観察し得た病理データと臨床データに有意な関連性は見出されなかった。

考察・今後について

本研究では現段階では新たな知見を報告するに至らなかった。存在するはずの炎症細胞の染色が不十分であった事から、染色条件の問題を改めて確認する必要がある。過去他施設で行われたものと同条件で染色を行ったものでも結果不良の結果もあり、染色機器、備品の違い等の可能性も否定は出来ない。

染色が可能であった炎症細胞浸潤についても明らかな臨床的意義を唱えるに至らなかったが、DCM 患者群に膠原病関連心機能低下、癌治療関連心機能低下、アルコール性心機能低下、拡張相肥大型心筋症疑いなどの症例を含んでおり、多彩な背景を持っていた事が原因である可能性がある。これら病態で分類すると各疾患毎の症例数が減る為、更に規模を拡大した背景別の検証も必要と考えられた。

研究者は非虚血性心筋症における心筋内炎症細胞浸潤の意義についての研究を継続している。具体的には 2022 年他施設共同研究として報告された本邦 DCM 患者を広く登録した研究のサブ解析では有意な結果が得られ、現在執筆中である。また今年度より米国留学を行い、人剖検心での検証、動物実験での検証、細胞実験での検証を開始している。今回の臨床研究での実験結果は残念であるが、染色に使った条件や機器のフィードバックを行い、「臨床データの詳細の再確認後に、本研究での病理データと臨床データの関連の再検証」「今回の研究の経験を、今後の他研究に活かす」事に役立て、引き続き本分野の発展に寄与したい

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------