

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18316

研究課題名（和文）心筋炎における微小炎症環境での動的ガレクチン3の役割の解明

研究課題名（英文）The role of galectin 3 in microenvironment of myocarditis.

研究代表者

館 正仁（Tachi, Masahito）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70646504

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）：ガレクチン3の血中濃度やガレクチン3陽性細胞の局在は、心筋炎だけでなく、心不全マウスモデルにおいても、ミクロレベルの組織学的な線維化や虚血に相関していることを突き止めた。ウイルス感染脳脊髄心筋炎マウスモデルにて、ガレクチン3血中濃度は、炎症の病理組織像に時系列で、見事に相関し、ゆるやかな慢性炎症ではfガレクチン3は発現せず、急性炎症早期にて発現するのである。また、同時に心不全マウスモデルでもガレクチン3陽性マクロファージの出現が、心筋炎の時と同様、炎症早期、線維化出現直前に起きてくることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全患者さんを対象とし、心筋生検を加えた病理組織解析での検証が直ちに可能となることが、本研究の特色といえる。炎症研究に対する新たな視点を提供でき、1細胞から個体まで、局所から全身までと炎症を社会と捉える新たな概念を打ち出し、救急領域から、新たな炎症研究のフィールドを作るきっかけとなった。

研究成果の概要（英文）：We found that the blood levels of galectin-3 and the localization of galectin-3-positive cells correlate with micro-level histological fibrosis and ischemia not only in myocarditis but also in a mouse model of heart failure. In a mouse model of viral-induced cerebrospinal myocarditis, galectin-3 blood levels correlated well with the histopathology of inflammation over time, showing that f-galectin-3 is expressed in the early stage of acute inflammation, but not in chronic inflammation. At the same time, in a mouse model of heart failure, galectin-3-positive macrophages appeared in the early stage of inflammation, just before the appearance of fibrosis, as in the case of myocarditis.

研究分野：救急

キーワード：ガレクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガレクチン 3 は、レクチンファミリーに属する糖結合タンパクで、炎症における線維化の発生と進行の中心的な役割を果たす。炎症の微小環境で、マクロファージを活性化させ、筋線維芽細胞を呼び寄せ、線維化を発生・促進すると考えられている。心不全や肺線維症、肝硬変、がん、さらには統合失調症など精神疾患での関与が指摘されている。

心不全や肺線維症など線維化を伴う疾患は、一旦完成した線維化を治療することはほぼ不可能である。つまり、線維化が起きる前に発見、治療、さらには予防するという早期介入が必須の疾患である。しかし、ガレクチン 3 のバイオマーカーとしての評価は一定していない。ガレクチン 3 の血中濃度が高いと心不全発症のリスクが高い(J Am Coll Cardio, 2012)が、予後因子としての有効性は不明である(J Am Coll Cardio, 2014)。これらの臨床研究は、CT 撮影画像検査や血液データなど非侵襲的検査と血中ガレクチン 3 濃度との相関を解析したもので、顕微鏡的組織解析や細胞レベルの解析は何ら行われていない。

今まで申請者は、救急症例で、全身臓器の病理組織診断と病理解剖を行ってきた。そこで、顕微鏡下の炎症は、急性～慢性期の多彩な細胞群からなる“不均一”な「炎症微小環境」から成り立ち、その正確な把握と理解が、CT など臓器検査や血液データなど個体レベルの検査に反映されることを感じていた。

### 2. 研究の目的

ガレクチン 3 の細胞・組織レベルでの炎症評価が、個体レベルの評価と関連しているか？を明らかとする。遺伝子改変マウスを用いて、「炎症微小環境」の 1 細胞レベルでの解析で、“不均一”な炎症細胞社会の異なる細胞群の構成とその社会でのガレクチン 3 の役割を検証する。また、ガレクチン 3 が線維化疾患の治療標的となり得るか？を明らかとする。ここでは、ガレクチン 3 発現細胞を炎症組織内で、選択的に欠損することで検証する。

### 3. 研究の方法

【研究計画 1】目的は、ガレクチン 3 発現細胞を可視化し、リアルタイムに追跡できるマウスを作ることで、ガレクチン 3 の炎症微小環境下での役割を調べる基盤とすることである。

方法) ガレクチン 3 発現レポーターマウスの作製 (右図): ガレクチン 3 発現細胞を可視化し、追跡するため、Gal3-DTR-GFP (緑色蛍光) マウスと Gal3-DTR-RFP (赤色蛍光) マウスの 2 種類を作製する。また、DTR (ジフテリア毒素レセプター) を GFP と RFP に融合しておく。ガレクチン 3 発現細胞を選択的に欠損・除去でき、GFP や RFP にてその除去率も可視化できる。用途によって、色は使い分ける。人工染色体(BAC)組換え法(研究協力者の富田作製)で、短期で作成する。

【研究計画 2】目的は、心筋炎モデルの「炎症微小環境」におけるガレクチン 3 発現細胞の由来(常在か? 骨髄由来か?)とその分布の特徴を知り、個体レベル(血中濃度)との相関を明らかとすることである。

方法) Gal3-DTR-GFP マウスで、心筋炎モデルでのガレクチン 3 の発現細胞と組織局在、血中濃度を調べる。(右図: 本研究での脳心筋炎モデル実験プロトコル): 心筋炎ウイルス(EMCV)感染により起きる心筋炎でのガレクチン 3 発現細胞の動向を組織解析する。申請者の先行研究での基礎データが蓄積されたプロトコルを用いる。脳炎では、ガレクチン 3 発現細胞(心筋ではマクロファージ、能ではミクログリア)が感染後 48 時間後の組織で捉えることができる。

更に、由来の異なるマクロファージを蛍光色素で可視化し、発生時期と分布を明らかとする

【研究計画 3】目的は、心筋炎の局所での“不均一”な「炎症微小環境」を構成する細胞群ごとの単一細胞のレベルのプロファイリングを行うことで、ガレクチン 3 発現マクロファージの動態を明らかとすることである。

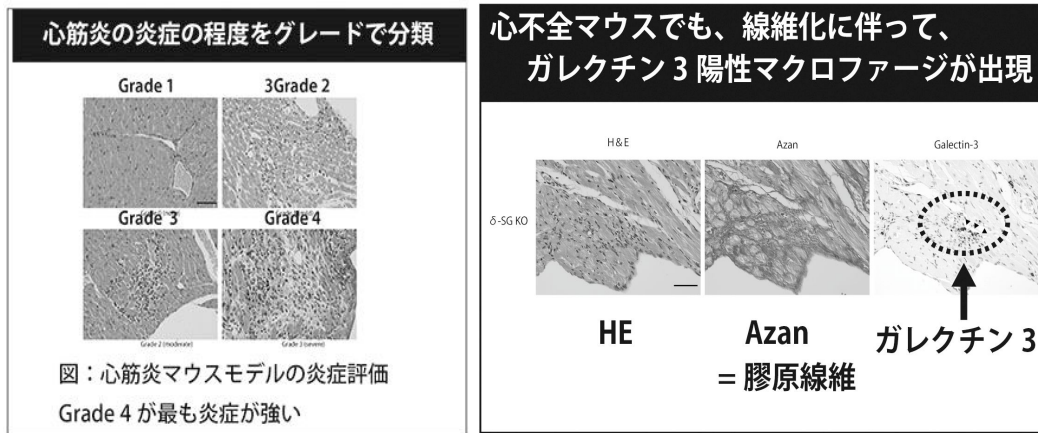
方法) 計画 1, 2 で得た炎症早期のガレクチン 3 発現細胞の可視化の結果から、不均一な組織分布に基づき、ガレクチン 3 陽性細胞を単離し、1 細胞 (シングルセル) 解析を行う。

右図のように、プロトコルのタイムポイントに合わせて、炎症辺縁部や線維化の強い部分を領域ごとに組織採取し、ガレクチン 3 陽性マクロファージをフローサイトメトリーで単離する。各領域 3 細胞程度をシングルセル解析する。この解析は、次世代シーケンサーによる RNA-Seq プロファイリングをまず行い、数理的解析により、トランスクリプトームをクラスタリングすることで、複雑で“不均一”な炎症組織内の個々のガレクチン 3 陽性マクロファージの異なる生態を調べ、炎症環境に対する亜集団の応答を調べる。この計画は炎症の時間依存性のプロセスにおける細胞機能と多様性を明らかとし、精度の高いバイオマーカーや治療標的探索の基盤となる。

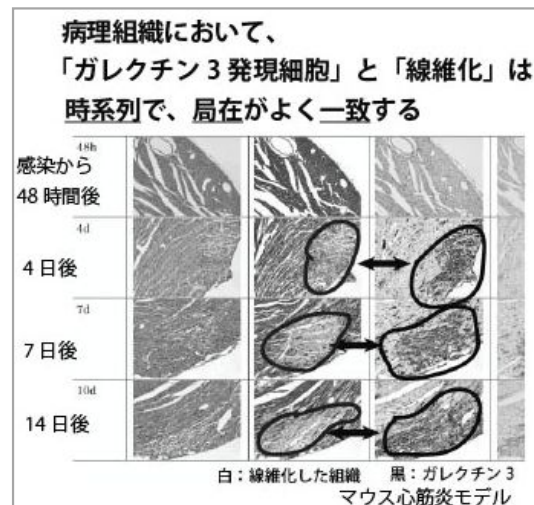
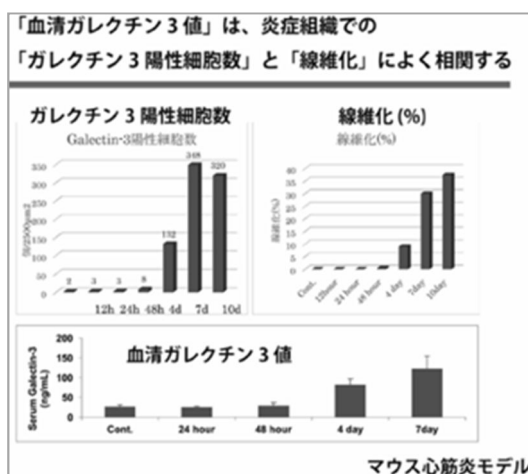
### 4. 研究成果

申請者は、ガレクチン 3 の血中濃度やガレクチン 3 陽性細胞の局在は、心筋炎だけでなく、心不全マウスモデルにおいても、ミクロレベルの組織学的な線維化や虚血に関連していることを突き止めた。ウイルス感染脳脊髄心筋炎マウスモデルにて、ガレクチン 3 血中濃度は、炎症の病理組織像に時系列で、見事に相関し、ゆるやかな慢性炎症ではガレクチン 3 は発現せず、急性炎症早期にて発現することを示した。

また、同時に申請者は、心不全マウスモデルでもガレクチン3陽性マクロファージの出現が、心筋炎の時と同様、炎症早期、線維化出現直前に起きてくることを検証した(下図：心不全マウスモデルでの、線維化(膠原線維染色)とガレクチン3抗体による免疫組織化学染色の結果)



申請者らは、ガレクチン3の「炎症微小環境」での役割を調べるために、脳心筋炎マウスモデルで、炎症急性期～慢性期でのガレクチン3発現細胞を解析した。脳炎の脳病変では、ガレクチン3は炎症早期にミクログリア(脳での常在マクロファージ)1細胞から発現を示し、炎症の進行とともに発現細胞と発現量の増加を認め、正の相関があることを見出した(Neurosci Lett. 2015; PLoS One, 2014)。心筋炎では、心筋組織でのガレクチン3発現マクロファージが1細胞から出現し、その発現細胞の増加と血中濃度の上昇、線維増生の三者は正の相関を示した。



(右上図：心筋炎モデルでのガレクチン発現と線維化の病理組織解析；左上図：ガレクチン3発現と線維化、血中濃度の相関)

これらの結果から、臨床研究でのガレクチン3のバイオマーカーとしての有効性は、細胞や組織レベルの「炎症微小環境」への理解の不十分さによると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tachi M, Okada H, Matsubishi N, Takemura G, Suzuki K, Fukuda H, Niwa A, Tanaka T, Mori H, Hara A, Yoshida K, Ogura S, Tomita H	4. 巻 8(9)
2. 論文標題 Human Colorectal Cancer Infrastructure Constructed by the Glycocalyx.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 E1270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8091270.	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 -

1. 著者名 Kamidani R, Okada H, Yasuda R, Yoshida T, Kasuzawa K, Ichihashi M, Kakino Y, Oiwa H, Kitagawa Y, Fukuta T, Suzuki K, Okamoto H, Miyake T, Tachi M, Kanada N, Iwai C, Shiba M, Yamada N, Nozawa S, Nakayama N, Doi T, Fushimi K, Yano H, Tomita H, Yoshida S, Iwama T, Ogura S.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Diffuse midline glioma in the spinal cord with rapid respiratory deterioration: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acute Medicine & Surgery	6. 最初と最後の頁 e500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ams2.500	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若山 佑豪、岡田英志、鈴木浩大、高田ちひろ、北川雄一郎、館正仁、土井智章、吉田隆浩、牛越博昭、吉田省造、小倉真治
2. 発表標題 敗血症性血管炎により誘発される腸管粘膜バリアの変化の検討
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

〔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
---------	---------