

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年06月09日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590805

研究課題名（和文） 制御性T細胞とTh17を標的とした心血管炎症性疾患の治療

研究課題名（英文） Analysis of regulatory T cells and helper T cells in myocarditis and its application to the therapy for inflammatory cardiovascular diseases.

研究代表者

小玉 誠 (Kodama Makoto)

新潟大学 医歯学系 准教授

研究者番号：10242447

研究成果の概要（和文）：

心筋炎における Th17 の役割を解析した。ラット心筋炎における IL-17、IL-17R、IFN γ の遺伝子発現の時期を検討し、Th17 サイトカインは Th1 サイトカインより早期から病変部に発現することを示した。さらに IL-17、IL-17R、IL-23、IL-23R の mRNA を発現する細胞を明らかにした。次に間葉幹細胞を用いて、Th1/Th2/Th17 バランスの制御と心筋炎の発症抑制効果について検討した。間葉幹細胞は Th1 T 細胞と Th17 T 細胞を抑制することにより免疫調節作用を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Alterations of IL-17-related protein expressions were investigated. The results showed that IL-17 was expressed more highly than IFN-gamma expressed by Th1 cells in alpha/beta T cells and the peaks of IL-17 related protein expression in the heart were the early phase of EAM. Then we focused on helper T cell differentiation in allogenic FM-MSC administered EAM rats. Administration of FM-MSC improved left ventricular ejection fraction. The percentage of Th1 cells and Th17 cells were significantly reduced by FM-MSC administration. Thus, intravenous administration of allogenic FM-MSCs ameliorates EAM via the suppression of Th1/Th17 immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分子心臓病態学

キーワード：内科、免疫学、心筋炎、Th17

1. 研究開始当初の背景

心筋炎はもとより、心不全、心室リモデリング、動脈硬化性粥腫の破綻など多くの心血管病態の進展に炎症が関与している。免疫担当細胞が異物処理を有効に行なっている姿が組織学的には炎症であり、炎症の存在は組織に外来異物あるいは不要老廃組織が生じていることを示している。炎症そのものは生体を維持する上で重要な異物除去反応であるが、異物だけでなく周辺の正常な組織にも少なからず影響を及ぼす。浮腫・炎症性細胞浸潤・線維増生・炎症性物質などの影響で炎症周囲の正常な組織が機能障害を起こすこと、さらには細胞死が起こることを collateral damage と呼ぶ。動脈硬化症のプラーク内に見られる炎症も、酸化 LDL の除去という有益な反応と、線維性皮膜を脆弱にしてプラーク破裂の危険性を高めるという生体に不利な collateral damage の二面性を有している。したがって、治療目的で生体内の炎症をコントロールするときは、有益な異物除去反応を温存し、collateral damage だけを抑制するような工夫が必要である。

ラットの実験的自己免疫性心筋炎は心筋ミオシンを抗原とした臓器特異炎であり、急性期病態はヒト巨細胞性心筋炎に類似し、慢性期病態はヒト拡張型心筋症に類似する。小動物に簡便に作成でき、疾患発症率が 100% であり、びまん性心筋障害による慢性心不全を呈するなどの特徴があり、心筋炎の解析とともに心不全の解析にも用いられている。急性期から治癒期にかけて末梢血 T 細胞のサイトカイン産生特性を調べると、急性期は IFN γ 産生 T 細胞 (Th1) が増加し、治癒期になると IL-4 産生 T 細胞 (Th2) が増加してくる。Th2 細胞が優位な期間は抗原を再感作しても心筋炎を再発しない。Th1/Th2 バランスの変化を反映して心筋組織におけるサイトカイン mRNA の発現も変化する。すなわち心筋炎発症初期は炎症性サイトカイン (IL-1、MCP-1) と Th1 サイトカイン (IL-2、IFN γ 、TNF α) が発現し、急性期を過ぎると Th2 サイトカイン (IL-4、IL-10) の発現が優位となる。このような Th1/Th2 バランスの変化は急性リンパ球性心筋炎の症例においても観察される。Th1/Th2 バランスの変化は抗原の差よりも、臓器炎の始まりと終息を制御する免疫現象と思われ、心筋炎に限らず心室リモデリングや動脈硬化プラークでも同様の Th1/Th2 バランスによる病態制御が報告されてきた。

近年、臓器炎における collateral damage に Th1 細胞よりも深く関与する T 細胞集団として Th17 が指摘され注目されている。T 細胞は抗原刺激と同時に受けるサイトカイン刺激の種類により Th1、Th2、Th17 のいずれかに分化する。IL-12 刺激を受けた T 細胞は Th1、

IL-4 刺激を受けたものは Th2、そして IL-23 刺激を受けて活性化されると Th17 に分化する。Th17 細胞は IL-17 を産生分泌する。IL-17 受容体 (IL-17R) は T 細胞の他、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞にも発現しており、これらの細胞が IL-17 によって刺激される。Th1 を誘導する IL-12 と Th17 を誘導する IL-23 は共に IL-12p35 分子を有しており、これまで IL-12p35 欠損マウスで得られた知見により Th1 依存性病態として理解されてきた現象は Th17 依存性病態である可能性があり、再検討する必要がある。

2. 研究の目的

心筋炎や炎症性プラークなど心血管系の炎症性病変の進展は Th1 優位環境が炎症を増幅し、Th2 優位環境が炎症の終息を導くとこれまで考えられてきた。ところが第三のヘルパー T 細胞集団 Th17 が発見され、臓器特異炎、慢性炎症、自己免疫における臓器障害には Th17 が中心的役割を果たしていることが明らかになってきた。したがって Th1/Th2 バランスで捉えられていた種々の疾患の病態を再考する必要が出てきた。また、一度惹起された炎症が持続するのか治癒するのか、その方向は regulatory T 細胞が制御している。そこで、心筋炎における Th17 と regulatory T 細胞の役割を明らかにし、炎症性心血管系疾患の新たな治療標的を見つけ出す。

3. 研究の方法

実験的自己免疫性心筋炎における Th17 優位性の経時的变化を解析する。末梢血の T 細胞に mitogen 刺激を加え、IL-17 産生細胞の頻度を発症から治癒まで経時的に評価する。同時に Th1、Th2 の頻度も調べ、病態形成への関与を解析する。

Th17 の選択的抑制による心筋炎抑制効果を検討する。ラット IL-23R 遺伝子と免疫グロブリンの融合遺伝子を作成する。さらに IL-23 の受容体結合ドメインだけを用い、IL-23R に結合するが刺激入力作用の乏しい分子を設計する。これと免疫グロブリン融合遺伝子を作成する。

抗原の感作により実験的自己免疫性心筋炎を発症した LEW-GFP ラットの T 細胞を Lewis ラットに移入し、心筋炎の発症と治癒過程での移入 T 細胞の体内動態を解析する。

4. 研究成果

(1) 実験的自己免疫性心筋炎における Th17 の役割を解析した。ラット心筋炎では IL-17 と IL-17R の遺伝子は IFN γ よりも早く、まだ炎症性細胞浸潤がごくわずかな時期に心臓

内に既に発現していた IL-17 mRNA を発現する細胞は $\alpha\beta$ T 細胞である。IL-17R を発現しているのは $\alpha\beta$ T 細胞とマクロファージに加えて、線維芽細胞と血管内皮細胞などの心筋間質細胞分画であった。Th17 を誘導する IL-23 はマクロファージが発現しており、IL-23R (受容体) を発現している細胞は $\alpha\beta$ T 細胞である。すなわち、心筋ミオシン反応性 T 細胞が抗原刺激を受けて活性化すると IL-17 を分泌し、線維芽細胞に作用して線維を増生させ、血管内皮細胞に働いて血管透過性を高め、細胞浸潤と浮腫を生み出し、マクロファージに作用して IL-23 の分泌を誘導するものと考えられる。IL-23 は Th17 に作用して活性化の増幅と維持に働くものと考えられる。

(2) 次に実験的自己免疫性心筋炎に対する胎膜由来間葉系幹細胞の心筋炎抑制作用を検討した。胎膜由来間葉系幹細胞を静脈内投与することにより、炎症性細胞浸潤を抑制し、MCP-1 の発現が抑えられ、心機能が改善することが確認できた。また、ラット及びヒトの心筋炎における lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (Lcn2/NGAL) の発現を調べ、心筋炎病変部の心筋細胞・血管壁細胞・線維芽細胞・好中球にこれが強発現することを見出した。

(3) 薬物を用いて実験的自己免疫性心筋炎に対する発症抑制効果と治療効果を検討し、自己免疫性心筋炎の発症機序を解明する。特に TH1/Th2/TH17 バランスを評価し、その選択的遮断を試みる。実験的自己免疫性心筋炎は CD4-T 細胞が心筋間質に侵入し、心筋ミオシンに反応して活性化し様々な炎症性細胞を血管外へ遊走させることによって引き起こされる。したがって、T 細胞および炎症性細胞の血管外への遊走が重要である。フコイダンは血管内皮細胞のセレクチンを非特異的に遮断するため、炎症性細胞の血管外への遊走を抑制する可能性がある。フコイダンをを用いて実験的自己免疫性心筋炎の発症抑制効果を検討した。フコイダン投与により、心筋炎病変を縮小し、左室機能を保持し、CD4-T 細胞の浸潤を抑制することができた。

(4) フォスフォジエステラーゼ 3 と 4 (PDE3, 4) を阻害する phenylpyridazinone の心筋炎後拡張型心筋症に対する効果を検討した。心筋ミオシンの感作によりラットに実験的自己免疫性心筋炎を発症させ、急性期が過ぎてから phenylpyridazinone を投与した。PDE 阻害薬により心筋の線維化病変が縮小し、3 型コラーゲン量を減少させた。TGF- β と TNF- α の mRNA 発現を抑制し、肥満細胞の頻度を減少させ組織ヒスタミン濃度を減少させた。この結果、心筋細胞の肥大が抑制され、心筋炎後拡張型心筋症への進展抑制効果があるものと考えられた。

(5) これまでに実験的自己免疫性心筋炎とヒト心筋炎では心筋組織において lipocalin-2 と hepcidin が発症早期から強発現することを確認した。いずれも細胞内鉄代謝に重要な分子である。炎症による組織障害によって流出するヘムが心臓在住マクロファージを強力に活性化し、サイトカイン分泌を刺激し、炎症の増幅に関与していることを明らかにした。

(6) Th1/Th2/Th17 バランス、Th17 の制御による心筋炎の発症抑制について検討した。自己骨髄間葉幹細胞とアロ胎盤膜由来間葉幹細胞は免疫調節作用があり実験的自己免疫性心筋炎における心筋障害を減弱させることが報告されている。間葉幹細胞による免疫調節のメカニズムはよくわかっていない。実験的自己免疫性心筋炎は Th1 T 細胞が発症誘導の主役を担っており、また、Th17 T 細胞が炎症の増幅・遷延に関わっていると考えられているため、間葉幹細胞が Th1、Th17 に及ぼす影響を検討した。間葉幹細胞の静注により実験的自己免疫性心筋炎を発症したラットの心機能低下を軽減できた。心筋炎病変ではマクロファージの浸潤が抑制された。末梢血 CD4 陽性 T 細胞中の Th1 T 細胞分画は間葉幹細胞治療により縮小し、Th17 T 細胞分画も縮小していた。また、病変部への浸潤細胞の解析では Th17 T 細胞の頻度が減少していた。次にヒトリンパ球に対する間葉幹細胞の影響を培養系で検討した。ヒト CD4 陽性 T 細胞とヒト胎盤膜由来間葉幹細胞を共培養すると、Th1 T 細胞と Th17 T 細胞の分化と増殖が抑制された。この結果から間葉幹細胞は Th1 T 細胞と Th17 T 細胞を抑制することにより免疫調節作用を発揮することが示唆され、様々な自己免疫疾患、炎症性疾患への応用の可能性が示された。

(7) 自己免疫性心筋炎から拡張型心筋症への進展のメカニズムを動物モデルを用いて検討した。心筋炎から拡張型心筋症に進展する過程で AMP-activated protein kinase、ACE-2/angiotensin 1-7 系、endothelin-1、が関わっていることを薬理学的手法により示し、論文に報告した。

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 19 件)

1. Jiao S, Hanawa H, Suzuki T, Hu YH, Yoshida K, Ogura M, Ohno Y, Ito M, Kashimura T, Obata H, Kodama M. Estimation of paracrine signaling using quantitative RT-PCR from multiple patchy lesion samples. Mol

- Cell Probes 27: 109-113, 2013. 査読有り
2. Arumugam S, Thandavarayan AR, Arozal W, Sari RF, Giridharan VV, Soetikno V, Palaniyandi SS, Harima M, Suzuki K, Nagata M, Takagi R, Kodama M, Watanabe K. Quercetin offers cardioprotection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin-1/MAPK signaling. *Free Radical Research* 46: 154-163, 2012. 査読有り
 3. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 53(3): 420-8, 2012. 査読有り
 4. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Nakamura T, Arozal W, Sari FR, Giridharan VV, Soetikno V, Palaniyandi SS, Harima M, Suzuki K, Nagata M, Kodama M, Watanabe K. Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med* 16(9): 2176-85, 2012. 査読有り
 5. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Ma M, Giridharan VV, Arozal W, Sari FR, Sukumaran V, Lakshmanan A, Soetikno V, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Modulation of endoplasmic reticulum stress and cardiomyocyte apoptosis by mulberry leaf diet in experimental autoimmune myocarditis rats. *J Clin Biochem Nutr* 50(2): 139-44, 2012. 査読有り
 6. Sukumaran V, Veeraveedu PT, Lakshmanan AP, Gurusamy N, Yamaguchi K, Ma M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Olmesartan medoxomil treatment potently improves cardiac myosin-induced dilated cardiomyopathy via the modulation of ACE-2 and ANG 1-7 mas receptor. *Free Radic Res* 46(7): 850-60, 2012. 査読有り
 7. Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Giridharan VV, Soetikno V, Harima M, Suzuki K, Nagata M, Tagaki R, Kodama M, Watanabe K. Involvement of AMPK and MAPK signaling during the progression of experimental autoimmune myocarditis in rats and its blockade using a novel antioxidant. *Exp Mol Pathol* 93(2): 183-9, 2012. 査読有り
 8. Sukumaran V, Veeraveedu TP, Gurusamy N, Lakshmanan PA, Yamaguchi K, Ma M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sciences* 90: 289-300, 2012. 査読有り
 9. Arumugam S, Thandavarayan AR, Palaniyandi SS, Giridharan VV, Arozal W, Sari RF, Soetikno V, Harima M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Candesartan cilexetil protects from cardiac myosin induced cardiotoxicity via reduction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats: Involvement of ACE2-Ang (1-7)-mas axis. *Toxicology* 291: 139-145, 2012. 査読有り
 10. Watanabe K, Arumugam S, Thandavarayan AR, Kodama M. Experimental autoimmune myocarditis: role of renin angiotensin system. *Myocarditis*. Edited by Daniela Cihakova, InTech - Open Access Publisher, 309-320, 2011. 査読有り
 11. Mito S, Thandavarayan RA, Ma M, Lakshmanan A, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Inhibition of cardiac oxidative and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by curcumin treatment contributes to protection against acute myocarditis. *Free Radical Res* 45: 1223-1231, 2011. 査読有り
 12. Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V, Suzuki K, Kodama M, Aizawa Y. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull* 34: 974-979, 2011. 査読有り
 13. Kamal FA, Watanabe K, Ma M, Abe Y, Elbarbary R, Kodama M, Aizawa Y. A novel phenylpyridazinone, T-3999,

- reduces the progression of autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels* 26: 81-90, 2011. 査読有り
14. Sukumaran V, Veeraveedu TP, Gurusamy N, Yamaguchi K, Lakshmanan PA, Ma M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/Mas receptor axis. *Int J Biol Sci* 7: 1077-1092, 2011. 査読有り
 15. Hao K, Hanawa H, Ding L, Ota Y, Yoshida K, Toba K, Ogura M, Ito H, Kodama M, Aizawa Y. Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. *Mol Immunol* 48: 1191-1202, 2011. 査読有り
 16. Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu TP, Gurusamy N, Ma M, Yamaguchi K, Suzuki K, Kodama M, Aizawa Y. Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and cardiac inflammatory mediators in rats with heart failure induced by experimental autoimmune myocarditis. *Int J Biol Sci* 7: 154-167, 2011. 査読有り
 17. Tanaka K, Ito M, Kodama M, Tomita M, Kimura S, Hoyano M, Mitsuma W, Hirono S, Hanawa H, Aizawa Y. Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16: 79-86, 2011. 査読有り
 18. Hanawa H, Ota Y, Ding L, Chang H, Yoshida K, Otaki K, Hao K, Kasahara S, Kodama M, Nakazawa M, Aizawa Y. IL-1 receptor accessory protein-Ig/IL-1 receptor type II-Ig heterodimer inhibits IL-1 response more strongly than other IL-1 blocking biopharmaceutical agents. *J Clin Immunol* 31: 455-464, 2011. 査読有り
 19. Sukumaran V, Watanabe K, Veeraveedu PT, Ma M, Gurusamy N, Rajavel V, Suzuki K, Yamaguchi K, Kodama M, Aizawa Y. Telmisartan ameliorates experimental

autoimmune myocarditis associated with inhibition of inflammation and oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 652: 126-135, 2011. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 誠 (Kodama Makoto)

新潟大学 医歯学系 准教授

研究者番号 : 1 0 2 4 2 4 4 7