

## 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 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590812

研究課題名（和文）心臓樹状細胞の細胞動態に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the Cell Kinetics of Cardiac Dendritic Cell

## 研究代表者

和泉 徹（IZUMI TOHRU）

北里大学・医学部・名誉教授

研究者番号：80143775

## 研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は心臓樹状細胞(dendritic cell: DC)の役割とその制御機構を明らかとすることである。まず、心筋ミオシン上の炎症惹起性エピトープ (CM2 ペプチド)に特異的な GFP ラベル化 T 細胞株 (心筋ミオシン反応性 T 細胞: CMT) を作成し、その移入実験により DC の活性動態を解析した。その結果、(1) T 細胞サブセットの変化と自己免疫性心筋炎の活性化については、GFP - CMT が直接心筋組織に浸潤し、炎症を惹起した。また、GFP - CMT は数日で消退し、それに引き続き新たな CD4 陽性 T 細胞、Th17 T 細胞浸潤が出現した。この現象は T 細胞 Population の交代であり、DC が深く関わっていた。(2) DC の細胞動態については、GFP 非ラベル化 CMT を GFP 発現ラットに移入した実験的心筋炎において GFP 陽性 DC の検出・同定を試みた。さらに、GFP 陰性 CD3 陽性細胞を心筋組織より単離し、DC 細胞動態をフローサイトメトリー解析した。しかし、キメラモデルの作成に多くの時間を費やし、十分な成果を得るに至らなかった。GFP 陽性 DC の心筋組織内への動員とその近傍における Th17 T 細胞による炎症惹起・遷延、DC における Th17 免疫を制御する IL-23/-27 バランス、そのサイトカインバランスを制御する TLR シグナル伝達経路の同定など、興味ある課題が見つかった。一方、Cylindromatosis (CYLD) は NF- $\kappa$ B の抑制因子であり、かつ自然免疫の活性化因子でもある。この CYLD の発現機序は未だ不明である。今回活性化された心筋炎マクロファージを検索したところ、Interferon regulatory factor (IRF)-3 がこの活性化に強く関与していることが知られた。そこで、系統的な検索を加え、このシグナル系は心筋炎を惹起し、劇症化させ、遷延化する、との興味深い結果を得た。現在、活性化されたシグナルと心臓樹状細胞との関わり合いを新たに検索している。

## 研究成果の概要（英文）：

To clarify dynamic mechanism of cardiac dendritic cell (DC) is the present purpose. Firstly, I established a novel GFP labeled T cell line specific reactive to cardiac myosin (CMT) using CM2 peptide, and analyzed DC activation by the transfer experiment. As a result, persistence of autoimmune myocarditis and change of T cell subsets were seen. The GFP-CMT infiltrated into the myocardium directly and induced inflammation. In addition, Th17 T cells appeared in vicinity of the lesions following after disappearance of GFP-CMT. This phenomenon was an alternation of T-cell. The DC played an important role in the process. For DC cell kinetics, I investigated the transfer myocarditis in GFP overexpressed rat employing non GFP-labeled CMT, and tried to detect GFP-positive DC. Then, I isolated GFP-negative CD3-positive cells and tested them by Flowcytometry. However, I consumed much time to create their chimera models, and so failed to obtain sufficient results. IL-23/27 balance, Th17 immunity, GFP-positive DC mobilization and its TLR signaling emerged as challengeable tasks. On the other hand, Cylindromatosis (CYLD) is an activator of natural immunity and an inhibitor of NF- $\kappa$ B. Expression of this CYLD has been still unclear. In the present search on activated macrophage, it is suggested that Interferon regulatory factor (IRF)-3 is extensively involved in its expression. From a systematic analysis, to provoke myocarditis, to prolong it and to fall into fulminant type, this signal seems to be essential. Currently, DC kinetics in this signaling becomes a new theme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：

心臓樹状細胞、自己免疫性心筋炎、ミオシン反応性 T 細胞、GFP、Th17T 細胞、Cylindromatosis (CYLD)、Interferon regulatory factor (IRF)-3

1. 研究開始当初の背景

本研究は、我々の先行研究“心臓樹状細胞を賦活化するメカニズムに関する研究 2007～2009年”の成果の中で、GFP でラベルされたトランスジェニック ラットの開発に成功し、自己免疫性心筋炎における免疫担当細胞の局所動態をはじめて可視化したことに基づいている。

2. 研究の目的

自己免疫性心筋炎ラットの GFP 陽性細胞や移入 GFP 陽性細胞を追跡することにより、①心臓樹状細胞 (DC) を賦活化、②DC の細胞動態、③DC と免疫応答、を明らかにしようと企画された。

3. 研究の方法

当初の計画に従い、既報の実験的自己免疫性心筋炎/心筋症のラットモデルを対象に、①心臓組織を用いた樹状細胞の形態・サブセット解析、②心臓樹状細胞の抗原提示能の解析、③心臓樹状細胞の起源と動態の観察、④心臓樹状細胞を用いた免疫応答制御の解析、⑤心臓樹状細胞を用いた各種心疾患の治療法の確立、を目指して研究は始められた。しかしながら、研究の進捗とともに GFP をラベルしたトランスジェニック ラットを用いた心筋ミオシン反応性 T 細胞 (CMT) の作成に成功したことから、その移入による実験的自己免疫性心筋炎を使った DC 動態の解析を先行させた。また、心筋炎マクロファージの観察結果から Interferon regulatory factor (IRF)-3 の役割が注目され、そのシグナル活性化機構の解明に挑んだ。

4. 研究成果

(1) T 細胞サブセットの変化と活動性心

筋炎について： GFP 化 CMT は直接心筋組織に浸潤し、活動性心筋炎を惹起した。また、GFP ラベル化 CMT は数日以内で消退し、それに引き続いて心筋組織内に新たな CD4 陽性細

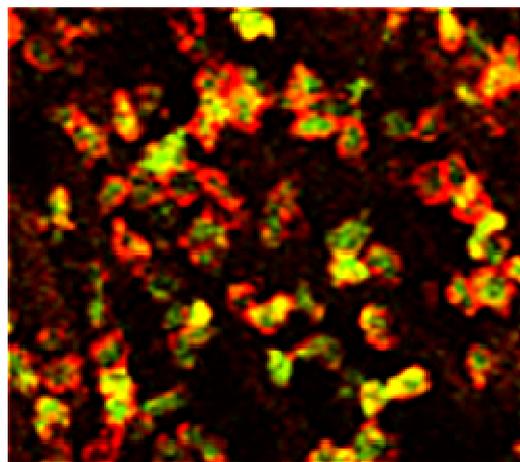


図-1 移注された CMT 細胞と DC 動態観察

胞 T、Th17 T 細胞浸潤が出現した。この現象はエピトープ スプレッディングによる T 細胞 Population 交代である。いずれの場合にも DC が深く関わっている。(2)DC の細胞動態について： GFP 非ラベル化 CMT を GFP 過剰発現ラットに移入した実験的心筋炎から GFP 陽性 DC の検出・同定を試みた。さらに、GFP 陰性 CD3 陽性細胞を心筋組織より単離し、DC 動態をフローサイトメトリーにて解析してみた。しかし、キメラモデルの作成に多くの時間を費やし、十分な成果を得るに至らなかった。GFP 陽性 DC の心筋組織内への動員とその近傍における Th17 T 細胞による炎症惹起・遷延、DC における Th17 免疫を制御する

IL-23/-27 バランス動態、このサイトカインバランスを制御するTLRシグナル伝達経路の同定など、挑戦的課題が提言されてきた。

Cylindromatosis (CYLD)は、自然免疫の重要な活性化因子であるNF- $\kappa$ Bに対する抑制因子として知られている。このCYLDの発現機序については未だ不明の点が多い。今回の研究において、活性化された心筋炎マクロファージを検索していたところ、Interferon regulatory factor (IRF)-3がCYLD発現を直接制御していることが明らかとなった。

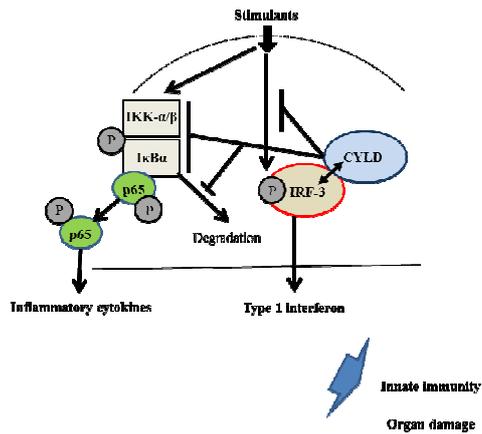


図-2 IRF-3 シグナル伝達経路

そこで、この制御機構の機能的役割を系統的に検索したところ、このシグナル系は図2の如く、自然免疫の制御を介して、心筋炎の惹起、遷延化および劇症化を抑制する重要な分子経路である、との結果を得た。現在、このシグナル系の活性化と心臓樹状細胞の細胞動態との関わり合いが新しい検索対象である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

(1). Ukimura A, Ooi Y, Kanzaki Y, Inomata T, Izumi T.: A National Survey on Myocarditis Associated with Influenza H1N1pdm2009 in the Pandemic and Postpandemic Season in Japan. J Infect Chemother. 19(3):426-31, 2013. 査読有

(2). Izumi T., Nishii M: Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Acute Myocarditis, Interleukin-10. Herz, 37(6): 627-31, 2012. 査読有

(3). Niwano S, Hirasawa S, Niwano H, Sasaki S, Masuda R, Sato K, Masuda T, Izumi T.: Cardioprotective Effects of Sarcolemmal and Mitochondrial K-ATP Channel Openers in an Experimental Model of Autoimmune

Myocarditis. Role of the Reduction in Calcium Overload during Acute Heart Failure. Int Heart J. 53(2):139-45, 2012. 査読有

(4). Yanagisawa T, Inomata T, Watanabe I, Maekawa E, Mizutani T, Shinagawa H, Koitabashi T, Takeuchi I, Izumi T.: Clinical Significance of Corticosteroid Therapy for Eosinophilic Myocarditis. Inter Heart J. 52(2):110-3, 2011. 査読有

(5). Niwano S, Niwano H, Sasaki S, Fukaya H, Yuge M, Imaki R, Machida Y, Izumi T.: N-acetylcysteine suppresses the Progression of Ventricular Remodeling in Acute Myocarditis: Studies in an Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM) Model. Circulation J, 75(3):662-71, 2011. 査読有

(6). Takeuchi I, Imaki R, Inomata T, Soma K, Izumi T.: MRI is useful for diagnosis of H1N1 fulminant myocarditis... Circulation Journal. 74(12):2758-9, 2010. 査読有

(7). Ukimura A, Izumi T., Matsumori A.: A National Survey on Myocarditis Associated with the 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan. Circulation J, 71(10):2193-9, 2010. 査読有

[学会発表] (計2件)

(1). Izumi T., Nishii M.: Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Acute Myocarditis, Interleukin-10. International Symposium on Inflammatory Heart Disease. Held in Sept 21st, 2012, Marburg, Germany.

(2). Izumi T.: Fulminant Myocarditis. Special Lecture in Harbin Medical University. Held in Sept. 19th, 2011, Harbin, China.

[図書] (計8件)

(1). 鍋田 健、猪又孝元、和泉 徹: 循環器疾患の診断と治療—心筋炎—. 医薬と薬学. 2013, 8ページ, 自然科学社.

(2). 小坂橋俊美、和泉 徹: 新型・季節性インフルエンザ診療ガイド 2012-2013 新型インフルエンザによる心筋炎とは. 日本医事新報. 2013, 2ページ, 日本医事新報社.

(3). 品川弥人、和泉 徹: 急性心筋炎: 胸痛の鑑別とその治療方針を知る. Heart View.

2012, 8 ページ, メジカルビュー社.

(4). 小坂橋俊美、**和泉 徹**: 新型・季節性インフルエンザ診療ガイド 2011-2012 新型インフルエンザによる心筋炎とは. 日本医事新報、2012, 2 ページ, 日本医事新法社.

(5). 西井基継、**和泉 徹**: 拡張型心筋症の発症機序-ウイルス感染と自己免疫応答. Cardiac Practice、2011, 6 ページ, メジカルレビュー社.

(6). 品川弥人、**和泉 徹**: [診療ガイドラインを読む] 急性および慢性心筋炎の診断・治療に関するガイドライン (2009 年度版) の概要、RAJJ. 2010, 3 page, Renin Academy Japan.

(7). 柳澤智義、**和泉 徹**: 心筋炎から拡張型心筋症へ. 医学のあゆみ. 2010, 5 ページ, 医歯薬出版.

(8). 前川恵美、**和泉 徹**: 心筋症・心筋炎基礎と臨床の最前線 2010、注目される心筋炎劇症型心筋炎. 総合臨床. 2010, 6 ページ, 永井書店.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和泉 徹 (IZUMI TOHRU)

北里大学・医学部・名誉教授

研究者番号: 8 0 1 4 3 7 7 5