

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590907

研究課題名(和文)新しい動物モデルを用いた心サルコイドーシスの画期的な早期診断法の開発

研究課題名(英文) Mice model of cardiac sarcoidosis to understand the pathogenesis and develop clinical diagnostic and therapeutic strategies.

研究代表者

諸井 雅男 (Moroi, Masao)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医員

研究者番号：30256721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓サルコイドーシス(心サ症)の病態機序解明と新しい診断治療法の開発のためにマウスモデルの作成を試みた。アポE欠損マウスにコール酸含有高脂肪食を負荷すると冠動脈内にマクロファージの集簇と血管周囲へのマクロファージの遊走・繊維化を認めた。本モデルはマクロファージの活性化とそれに引き続く心筋の血管周囲の繊維化を引き起こす。マクロファージが主体である点が心サ症と共通している。マクロファージが主体となる炎症病変では糖の取り込みが著明となるが正常心筋細胞も糖を利用するため診断にはこれを抑制する必要がある。心サ症の活動性病変評価には18時間以上の絶食によるFDG PETが良い。

研究成果の概要(英文)：Cardiac sarcoidosis is a chronic disease of unknown etiology characterized by the formation of non-necrotizing epithelioid granulomas. The lack of an adequate animal model reflecting the pathogenesis of the human disease is one of the major impediments in studying sarcoidosis. The purpose of this study was to generate a mouse model of cardiac sarcoidosis to understand its pathogenesis and develop clinical diagnostic and therapeutic strategies.

Apo E^{-/-} mice after 16 weeks on a cholate-containing high-fat diet exhibited macrophage accumulation and interstitial fibrosis in the myocardium where no lymphocytes were observed. Thus, the model presented myocarditis strongly associated with macrophages. Inflammation mainly associated with macrophages could be detected by F-18 FDG PET, but normal myocardial cells also utilize FDG. A clinical study showed FDG PET with a fast of 18 h can detect active lesions of cardiac sarcoidosis by suppressing normal uptake of myocardium.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：サルコイドーシス 心筋症 心筋炎 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシス(サ症)は自然寛解する例も存在し、比較的予後は良好である。しかし心臓に病変が及べば、すなわち心サルコイドーシス(心サ症)では自然寛解の報告例はなく、心病変が予後を左右する。したがって心サ症は治療の観点からもサ症とは切り離して考える必要がある。現在、心サ症は診断の決め手に欠け、最も診断の難しい心疾患の1つである。また拡張型心筋症や不整脈源性右室異形成症などとして見逃されているケースも多々存在する。本症発症後、数年で心不全が顕現化することが多く、また突然死後病理解剖で本症であることが判明した症例も多い。このように心サ症は診断困難で致死的であるが、一方で早期に診断しステロイド治療を開始すれば予後けっして不良ではないことも判明している。

心サ症の確定診断には心内膜心筋生検がおこなわれる。非乾酪性肉芽腫の形成と肉芽腫の近傍のリンパ球および単球の浸潤、さらに封入体を有する多核巨細胞が認められれば確定診断となる。しかし実際の心内膜心筋生検におけるH・E染色標本では、肉芽腫が心筋にびまん性に分布しないために、その診断感度は20%以下と低い。近年、サ症はアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)の内因性感染により過敏性免疫反応が惹起された結果として発症するとの説が目されている。この病因論を展開している江石教授(東京医歯大)はアクネ菌に特異的な抗体(PAB抗体)による免疫染色を生検材料において検討している。このアクネ菌に特異的な抗体(PAB抗体)は、サ症リンパ節病変部において90%以上の症例で陽性所見を呈することから、リンパ節や肺病変においては病理組織診断上有用な補助診断法となりつつある。心筋生検材料を用いたPAB抗体による免疫染色法は、今までのパイロットスタディでたとえ肉芽腫がなくとも、何らかの炎症病変があれば、有用である可能性も示されている。

各種バイオマーカーによる補助診断および病態解明も試みられているが、特異的なバイオマーカーは現在のところ知られていない。アンジオテンシン転換酵素(ACE)やリゾチームの上昇が本症では認められるとされているが、心サ症でこれらのバイオマーカーの陽性率は40-50%である。さらに感度を上げるための新しいバイオマーカーについて検討することも現在、重要な課題となっている。Interleukin-12を中心としたTh1関連の炎症性サイトカイン、炎症や組織修復リモデリングに関わる重要な蛋白の一つであるテネイシンC、炎症関連蛋白の一つであるmyeloid-related protein complex(MRP8/14)は新しいバイオマーカーの候補である。特にテネイシンCは炎症組織から分泌され、炎症を制御するマトリックス蛋白であり、サ症の心筋組織修復期の比較的早期の病態への関

与が予想されている。いくつかのバイオマーカーの併用による効果的な心サ症の補助診断も検討する必要がある。また心サ症の病期によってもこれらのバイオマーカーの上昇時期は異なる可能性もあり、これらの検討は重要である。

近年、心サ症における画像診断法としてポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)やcardiac MRIが目されている。FDG PETではFDGの病変心筋部位への取り込みやcardiac MRIにおいては病変心筋部位の心外膜側に遅延造影が認められることが知られている。病変部位は心筋にびまん性に及ぶとされているが特に心室中隔基部や側壁に強い変化が認められることが多い。これらの心筋病変を早期にとらえる方法としてFDG PETやcardiac MRIによる画像診断は有力である。しかしながらFDG PETやcardiac MRIも心サ症に特異的な画像とは言いがたい。近年、炎症や組織修復リモデリングに関わるマトリックス蛋白であるテネイシンCがバイオマーカーとしても注目されており、サ症の心病変に発現している可能性が指摘されている。金沢大学の瀧らによりI-123やIn-111で標識されたテネイシンC抗体を心筋梗塞モデル動物に投与すると梗塞周辺領域にこれが集積していることがオートラジオグラフィにより確認されている。心サ症においてIn-111標識テネイシンC抗体の集積が認められるのかどうかは早期診断として興味のある課題である。

以上のように不明の点が多い心サ症であるが、その病態解明と早期診断法の開発は早急に取り組むべき課題である。そのために心サ症のモデル動物の開発は重要である。熱処理したアクネ菌をマウスに投与することによって肺サ症を発症するモデルが報告されているが(Iio K: *Acta Med Okayama*, 2010,64:75-83)これは急性発症モデルであるために実臨床に即した病期別の解析には適していない。すなわちバイオマーカーや画像による早期診断の有用性を検討するには適していない。Samokhinらは2010年に別の肺サ症モデルマウスを報告した(*Am J Pathol* 2010, 176:1148-1156)。このモデルはアポE欠損マウスにコール酸含有高脂肪食を16週間与えるとその40%に肺サ症を発症するというものである。その病態は不明であるが肺サ症発症にはアポE欠損マウスとコール酸含有高脂肪食の双方が必須であることが判明している。コール酸を含まない高脂肪食では肺サ症は発症しないことが確認されている。コール酸含有高脂肪食負荷アポE欠損マウスにはサ症の皮膚病変を認めているが心病変については調べられていない。

2. 研究の目的

本研究ではコール酸含有高脂肪食を負荷したアポE欠損マウスにおいてどのくらいの頻

度で心サ症を発症しているかを病理学的に検討する。この病理学的検討を元に、心臓の画像診断やバイオマーカーによる病態診断の可能性を検討する。この知見により、心サ症と診断されたヒトの臨床症状、心機能、バイオマーカーの値、心筋バイオプシー検体およびPETや心臓MRIによる病変の評価をおこなう。これにより心サ症の軽度の臨床症状と軽度の心機能の低下の患者にバイオマーカーによる選別を行い、比較的可能性の高い患者に適切な画像診断を施行するという新しい非侵襲的な早期診断法が開発できる。

3. 研究の方法

3-1 マウスモデルの検討

コール酸含有高脂肪食を16週負荷したアポE欠損マウス(12-20週齢)において病変を確認するため心臓、大動脈、肺、肝臓、腎臓の摘出し固定(4%パラホルムアルデヒド)を施行した。HE染色および免疫染色(CD68、テネイシンCの抗体による)を施行した。さらにサ症はアクネ菌の内因性感染により過敏性免疫反応が惹起された結果として発症するとの説が注目されているため、アクネ菌(死菌)をこのモデルに経鼻的に投与した。

3-2 ヒトでの臨床所見と心臓病変の検討

心サ症と診断されたヒトの症状などの臨床情報、心機能、血中バイオマーカー値(アンジオテンシン転換酵素濃度、リゾチーム濃度、interleukin-12濃度、myeloid-related protein complex(MRP8/14)濃度、テネイシンC濃度)、心筋バイオプシーによる検体標本の免疫染色によるサ症の同定、およびFDG PETやcardiac MRI, I-123-BMIPP/TI SPECTの所見とマウスの心筋標本の免疫染色所見を比較検討する。これにより、FDG PET, cardiac MRI, I-123 BMIPP/TI SPECTを行うことにより早期の活動性病変の診断が可能かどうかを検討する。

4. 研究成果

アポE欠損マウスにコール酸含有高脂肪食を16週間負荷すると、肺にマクロファージの集簇を斑状に認める。この病変はサルコイドーシスの肉芽腫に類似している。心筋には冠動脈内のマクロファージの集簇、血管外へのマクロファージの遊走、血管周囲の線維化を認めた。しかし、リンパ球の集積は認められず、マクロファージを主体とした心筋炎の動物モデルの可能性が示唆された。さらにアクネ菌(死菌)を経鼻的に投与した場合、炎症病変の変化は認められなかったため、このモデルでは、コール酸含有高脂肪食負荷の方が炎症病変形成の強い要因である可能性が考えられた。

ヒトにおける心サ症は早期にはマクロファージの集簇とその周囲のリンパ球の浸潤を認める。その後、マクロファージの一部が

上皮細胞様に変化し(類上皮細胞)肉芽腫を形成する。従って病変の中心はマクロファージであり、活性化したマクロファージでは糖代謝が活発である。一方、マクロファージをはじめとする炎症性細胞の浸潤により心筋細胞は障害を受け、障害心筋は脂肪酸よりも糖を利用する。正常心筋は18時間以上の絶食により糖よりも脂肪酸を利用するため、18時間以上の絶食を前処置としたF-18 FDG PET検査がサルコイドーシスによる炎症病変をとらえること可能性が示された。

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5件)

1. 廣江道昭、渡邊絵里、諸井雅男、保科瑞穂(共著): 心筋症 up to date CT・MRI から診るー心筋病理との関連についてー. Heart View 17(3): 24-39, 2013.3.
2. 石田良雄、汲田伸一郎、吉永恵一郎、宮川正男、諸井雅男、近藤千里、木曾啓祐(心臓サルコイドーシスのFDG PET診断に関する委員会、心臓核医学会): 心臓サルコイドーシスに対するF-18 FDG PET検査の手引き. 心臓核医学 15(3):35-47, 2013.7. ISSN 1346-2733 7月31日発行.
3. Morooka M, Moroi M, Uno K, Ito K, Wu J, Nakagawa T, Kubota K, Minamimoto R, Miyata Y, Okasaki M, Okazaki O, Yamada Y, Yamaguchi T, Hiroe M. Long fasting is effective in inhibiting physiological myocardial 18F-FDG uptake and for evaluating active lesions of cardiac sarcoidosis. EJNMMI Res. 2014 Jan 2;4(1):1. [Epub ahead of print]
4. Ishida Y, Yoshinaga K, Miyagawa M, Moroi M, Kondoh C, Kiso K, Kumita S. Recommendations for 18Ffluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging for cardiac sarcoidosis: Japanese Society of Nuclear Cardiology Recommendations. Ann Nucl Med 28: DOI 10.1007/s12149-014-0806-0, 2014.1.
5. 諸井雅男、廣江道昭: PETが役立つ心疾患と注意すべきアーチファクト. 救急・集中治療 26(1・2):73-79, 2014.3.22

[学会発表](計4件)

1. Nakagawa, T, Hiroe M, Morooka M, Minamimoto R, Ito K, Kubota K, Yamada Y, Yamaguchi T, Nagata M, Wakiya M, Kamimura M, Ikeda N, Tamori Y, Yamamoto M, Itoh S, Okazaki O, Hara H, Moroi M. Significance of cardiac imaging with F-18-DG-PET and

Iodine-123 BMIPP SPECT in patients with known or suspected cardiac sarcoidosis. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2012.3.17

2. 中川 堯、廣江道昭、諸岡 都、南本亮吾、伊藤公輝、窪田和雄、山田嘉仁、山口哲生、長田まこと、脇屋桃子、上村宗弘、池田長生、田守唯一、山本正也、伊藤信吾、岡崎 修、原 久男、諸井雅男：サルコイドーシス患者の心臓病変評価における FDG-PET と BMIPP-SPECT の有用性. 第 22 回日本心臓郭医学会総会・学術大会, 金沢, 2012.6.23
3. 諸井雅男、山田嘉仁、山口哲生、廣江道昭：心臓サルコイドーシスの活動性病変評価に FDG-PET は役立つのか？. 第 33 回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会. 東京, 2013.10.26.
4. 諸井雅男：PET/SPECT 活動性炎症像の評価. 第 35 回心筋生検研究会. 東京, 2013.11.1

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸井雅男 (独立行政法人国立国際医療研究センター) 研究者番号：30256721

(2) 研究分担者

廣江道昭 (独立行政法人国立国際医療研究センター) 研究者番号：80101872

窪田哲也 (独立行政法人国立健康・栄養研究所) 研究者番号：60385698

今中恭子 (三重大学 大学院医学研究科) 研究者番号：00242967
滝 淳一 (金沢大学 核医学研究科) 研究者番号：10251927