

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790875

研究課題名（和文） 心筋梗塞後創傷治癒過程における骨髄由来樹状細胞の役割

研究課題名（英文） Regulatory Role of Dendritic Cells in Postinfarction Healing and Left Ventricular Remodeling

研究代表者

安西 淳 (ANZAI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50528164

研究成果の概要（和文）：我々は、マウス心筋梗塞モデルを用いて樹状細胞が骨髄から梗塞部に浸潤することを世界で初めて示した。また、骨髄由来の樹状細胞を選択的に除去できるマウスモデルを作製し、樹状細胞が炎症性、抗炎症性の単球/マクロファージを制御することで、梗塞後の炎症、免疫応答において保護的に働く可能性を明らかにした。以上より、樹状細胞は梗塞後心不全の新たな治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We first identified that dendritic cell (DC) infiltrates into the infarcted heart from the bone marrow. Conditional ablation of bone marrow-derived DC resulted in deteriorated left ventricular function and remodeling through augmented infiltration of proinflammatory monocytes/macrophages and, conversely, impaired recruitment of anti-inflammatory monocytes/macrophages in the infarcted myocardium. These results suggest that DC is a potent immunoprotective regulator during the postinfarction healing process, via controlling monocyte/macrophage homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：樹状細胞、心筋梗塞、免疫応答、炎症反応

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞 (myocardial infarction: MI) に対する再灌流療法の発達は、急性期死亡率を劇的に低下させたが、重症例の救命によって梗塞後左室リモデリングによる慢性心不全の有病率をむしろ増加させるというパラドックスを生んだ。MI 後の組織修復の過程には免疫応答の賦活化とこれに付随した炎症反応が発生する。我々は生体内の免疫系を統括する樹状細胞 (dendritic cell: DC) が MI 後に梗塞部位に浸潤することを、ラットの MI モデルを用いて過去に報告した。しかしながら、MI 後創傷治癒過程における DC の果たす役割については現在明らかではない。

2. 研究の目的

MI 後創傷治癒過程における DC の役割を明らかにし、梗塞後心不全に対する新たな治療標的を同定する。

3. 研究の方法

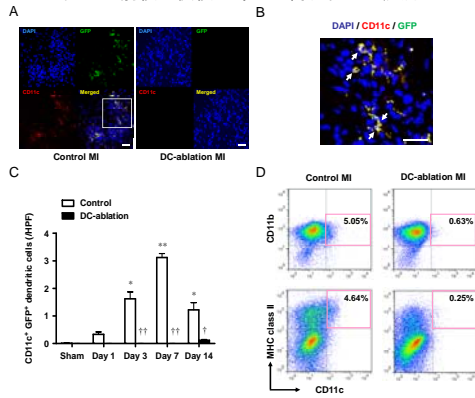
骨髄由来の DC の役割を解明するために、DC の特異的マーカーである CD11c のプロモーターの下流にサルのジフテリア毒素受容体 (diphtheria toxin receptor: DTR) と GFP を組み込んだ遺伝子改変マウス (CD11c-DTR/GFP マウス) の骨髄を、致死量 (10Gy) の放射線を照射した野生型

(wild-type: WT) マウスに移植する骨髄移植モデルを作製した。この骨髄移植モデルにジフテリア毒素 (diphtheria toxin: DT) を投与することで、骨髄由来の DC を選択的に除去できる。主に DT を投与して DC を除去する DC-ablation 群と PBS を投与する対照群の 2 群を用い、MI 後の生存率、心機能、炎症細胞浸潤、炎症マーカーなどを評価する。

4. 研究成果

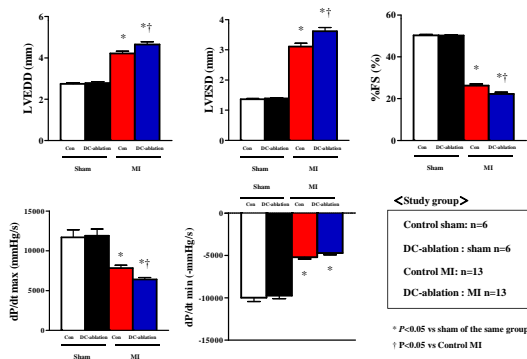
まず、CD11c⁺ GFP⁺ DC、あるいは CD11c⁺ MHC class II⁺ DC が DT 投与によってほぼ完全に除去されること、DT が DC 以外の免疫担当細胞には影響を与えないこと、また DT が骨髄移植をしていない通常の WT マウスには全く影響を与えないことを最初に確認した。MI 後の DC を免疫蛍光染色法にて確認すると、正常の心臓にはほとんど認めない GFP⁺ DC が、MI 後 7 日目をピークに梗塞部に浸潤していた (図 1)。DT を投与すると心臓に浸潤する DC

図1: 心筋梗塞後梗塞部への樹状細胞の浸潤



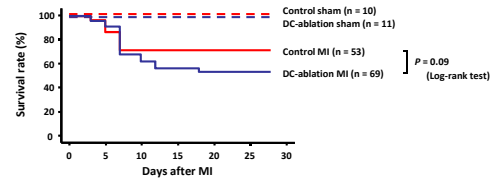
をほぼ完全に除去できるため、DC は MI 後に骨髄より動員されると考えられた。さらに、MI 後 7 日目の梗塞部組織を collagenase、elastase、DNase 処理した後に CD45⁺ の白血球を AutoMACS で抽出し、FACS で検討すると、梗塞部に浸潤する CD11c⁺ DC は CD11b と共に MHC class II を高発現することが明らかとなった。その後、DT を投与し DC を MI 後一週間除去した DC-ablation 群と、PBS を投与した対照群とで、28 日目の心機能を心臓超音波検

図2: DC-ablation群で梗塞後左室リモデリングが進展



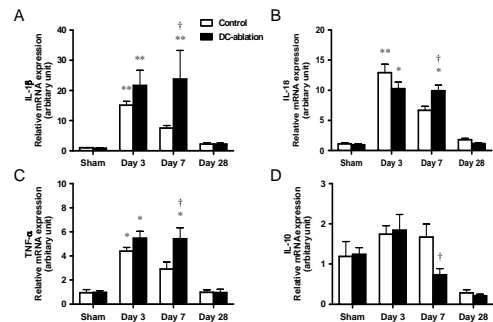
査、カテ先マノメーターで検討すると、DC-ablation 群で左室拡張末期径の拡大が高度であり、収縮能の低下は顕著であった (図 2)。これらの心機能を反映し、28 日における生存率は、有意差は認めないものの、

図3: 心筋梗塞後生存率



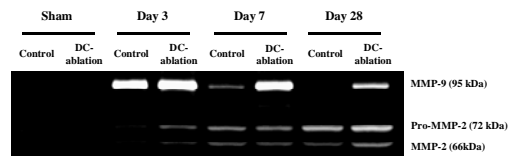
DC-ablation 群で低い傾向にあった (図 3)。両群での梗塞部における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-18、TNF- α) の mRNA レベルでの発現を時系列で測定すると、対照群では 3 日目がピークであり、その後徐々にその発現が低下するのに対し、DC-ablation 群では 7 日目においても高値を維持しており、MI 後の炎症反応が遷延していることが考えられた (図 4A-C)。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 の発現は DC-ablation 群で有意

図4: 心筋梗塞後炎症性マーカーの時系列評価



に低下していた (図 4D)。また、MI 後の心機能低下、左室リモデリングに関与する因子の一つである matrix metalloproteinase (MMP)-9 の活性を時系列に沿ってゼラチン・ザイモグラフィ法にて検討すると、対照群では 3 日目がピークであり、その後徐々に低下するのに対して、DC-ablation 群では 3 日目、7 日目では MMP-9 の活性が高値を維持し、28 日

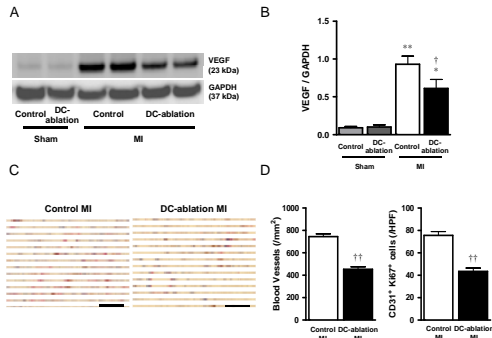
図5: DC-ablationでMMP-9の発現が増加する



目においても継続してその発現を認めた (図 5)。一方で、MI 後の創傷治癒過程に保護的に働く因子の一つである血管新生の程度について、抗 CD31、抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織学的染色法で検討すると、CD31⁺ Ki67⁺ 増

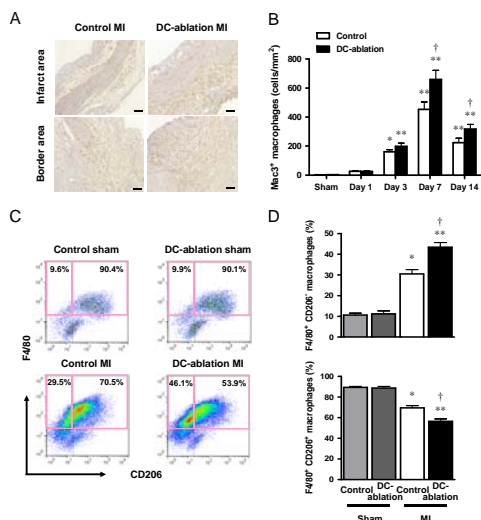
殖性内皮細胞の発現が対照群と比較して、DC-ablation 群において有意に抑制されていた (図 6)。以上の結果より、DC を除去したマウスでは、高度の炎症反応が持続するため、MI 後左室リモデリングが増悪することが推測された。DC 以外の炎症性細胞の浸潤、特に

図6: 心筋梗塞後血管新生の評価



MPO⁺ 好中球、CD3⁺ T 細胞、Mac3⁺ マクロファージについて免疫組織学的染色法にて検討すると、好中球、T 細胞に関しては、対照群、DC-ablation 群で浸潤の程度は大きな差を認めなかったが、マクロファージの浸潤については、DC-ablation 群で有意に亢進していた。近年、マクロファージには炎症性 M1 マクロファージと抗炎症性 M2 マクロファージの 2 種類の分画が存在することが知られている。MI 後 7 日目の梗塞部組織から CD45⁺ の白血球を AutoMACS で抽出し、F4/80 と CD206 で染色して FACS にて展開すると、DC-ablation 群において、炎症性 F4/80⁺ CD206⁻ M1 マクロファージの浸潤が対照群と比較して有意に多く、抗炎症性 F4/80⁺ CD206⁺ M2 マクロファージの浸潤は有意に低いことが明らかとなった (図 7)。さらにマクロファージの前駆体として知

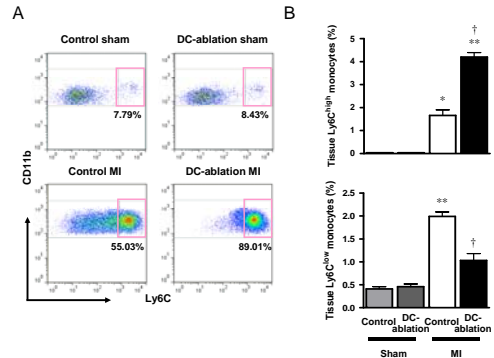
図7: DC-ablationでマクロファージが増加する



られる単球についても検討を加えた。MI 後の創傷治癒の過程には、マクロファージと同様に、炎症性 Ly6C^{high} 単球と、抗炎症性 Ly6C^{low} 単球の 2 つの分画の浸潤が重要であることが

知られており、Ly6C をマーカーに用いて、末梢血中、及び梗塞部組織中の炎症性、抗炎症性単球の浸潤を同様に FACS にて確認すると、DC-ablation 群において、炎症性 Ly6C^{high} 単球の浸潤は対照群と比較して有意に多く、抗炎症性 Ly6C^{low} 単球の浸潤は有意に低下していた (図 8)。

図8: DC-ablationで炎症性単球が増加する



以上より、DC は、炎症性、抗炎症性の単球/マクロファージを制御することで、MI 後の炎症、免疫応答において保護的に働く可能性が示唆された。DC は MI 後心不全の新たな治療のターゲットになりうると考えられた。

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 1 件)

Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, Sugano Y, Takahashi T, Abe H, Mochizuki S, Sano M, Yoshikawa T, Okada Y, Koyasu S, Ogawa S, and Fukuda K. Regulatory Role of Dendritic Cells in Postinfarction Healing and Left Ventricular Remodeling. Circulation; 125: 1234-1245 (2012) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 第 20 回マクロファージ国際分子細胞生物学国際シンポジウム YIA session 2012 年 6 月 15 日 東京にて開催

Anzai A, Anzai T, Nagai S, Koyasu S, Fukuda K.

Regulatory Role of Dendritic Cells in Post-Infarction Healing and Left Ventricular Remodeling.

2. 第 28 回国際心臓研究学会日本部会 YIA session 2011 年 12 月 2 日 東京にて開催

Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Kaneko H, Sugano Y, Sano M, Yoshikawa T, Koyasu S, Fukuda K.

Regulatory Role of Dendritic Cells in

- Post-Infarction Healing and Left Ventricular Remodeling.
3. 米国心臓協会学術集会 2011年11月15日 オランダにて開催
Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Sano M, Yoshikawa T, Koyasu S, Ogawa S, Fukuda K.
Dendritic Cell is an Immunoprotective Regulator in Post-Infarction Healing and Left Ventricular Remodeling.
4. 第75回日本循環器学会総会 2011年8月3日 横浜にて開催
Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Kaneko H, Sugano Y, Sano M, Yoshikawa T, Koyasu S, Fukuda K.
Selective Depletion of Dendritic Cells Resulted in Deteriorated Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安西 淳 (ANZAI ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50528164