

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390192

研究課題名(和文)心筋リモデリングにおけるナチュラルキラーT細胞による炎症制御機構の解明と治療応用

研究課題名(英文)Role of natural killer T cells in myocardial remodeling and its therapeutic implication.

研究代表者

筒井 裕之(Tsutsui, Hiroyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70264017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の基盤となる心筋リモデリングでNKT細胞が果たす役割を検討した。心筋梗塞後心不全モデルマウスの心臓ではNKT細胞が急性期より増加し、NKT細胞を特異的に刺激する α -GalCerを投与すると、心筋でIL-10が増加し心筋リモデリングの進展が抑制された。虚血再灌流傷害モデルマウスでも同様の結果が得られた。 α -GalCerを自己末梢血単核球より分化させた樹状細胞に添加し、細胞製品として投与するとNKT細胞を効果的に活性化させることが可能である。本品をGLP基準下マウスに投与したが、明らかな毒性は確認されず、本品は心不全に対する新たな治療法として期待され、現在臨床試験に向け準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of natural killer T (NKT) cells in myocardial remodeling and failure. The infiltration of NKT cells was increased in the heart from the mice after myocardial infarction (MI). The administration of α -Galactosylceramide (α -GalCer), which specifically activates NKT cells, to the MI mice further enhanced the NKT cell infiltration and LV interleukin-10 gene expression, and inhibited LV remodeling. α -GalCer also inhibited LV remodeling after ischemia/reperfusion injury.

α -GalCer-pulsed human dendritic cells (α -GalCer/DC), which differentiated from autologous peripheral blood mononuclear cells, can efficiently activate NKT cells. α -GalCer/DC were administered to nude mice under the GLP standard and any toxicity was observed throughout the follow-up period, suggesting that

α -GalCer/DC may be a novel therapeutic strategy against heart failure. Now we are preparing for the phase I study of α -GalCer/DC in patients with heart failure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子心臓学

1. 研究開始当初の背景

薬物療法・非薬物療法の進歩によって、心不全の予後は格段に改善してきたが、梗塞後心不全の重症例の予後は未だに不良であり、患者は増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心不全の病態形成に関与する心筋リモデリングの機序の解明とそれに基づく新たな治療法の開発は重要な研究課題である。近年、心筋リモデリングの形成・進展に、心筋組織における炎症や酸化ストレスの遷延化・慢性化が関与することがあきらかにされてきた。

生体における炎症が、TNF- α などTh1サイトカインとIL-10などのTh2サイトカインの「Th1/Th2バランス」によって調節されていることがあきらかにされ、その制御機構の解明が急速に進展している。ナチュラルキラーT (NKT)細胞は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から刺激を受け種々のサイトカインを産生する炎症細胞のひとつであるが、Th1/Th2バランスを調節し生体における炎症を制御する「炎症調節細胞」としての役割を担っている。さらに、NKT細胞による炎症制御の特徴は、相互に相手の産生するサイトカインが負のフィードバック調節をかけTh1/Th2バランスを適正化する点である。すなわち、炎症部位がTh1優位の場合は、NKT細胞は刺激によってTh2優位の応答を誘導する。最近、SLEや関節リウマチなどの自己免疫疾患において、NKT細胞の機能低下に起因する炎症制御機構の破綻がTh1優位の炎症遷延化に関与することが報告された。さらにNKT細胞の活性化によりTh1/Th2バランスをTh2へシフトさせることにより自己免疫疾患やガンを改善することも報告された。また、抗炎症性サイトカインIL-10リコンビナント投与により、梗塞後心筋における炎症遷延化が抑制され、心不全が改善することも報告されている(Krishnamurthy Circ Res 2009)。このような成績は、NKT細胞が、自己免疫疾患にとどまらず慢性炎症が

重要な役割をはたしている心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する可能性を支持するものである。さらに、NKT細胞の活性化によりIL-10などのTh2抗炎症性サイトカインを誘導し、心不全の病態を改善できると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NKT細胞の機能低下に起因する炎症制御機構の破綻が、心筋炎症を遷延化・慢性化させ、心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与するという仮説を検証するとともに、NKT細胞の活性化による心筋組織における炎症制御という独自のパラダイムに基づく新たな心筋リモデリング・心不全の予防・治療法の開発を目指すものである。最近、NKT細胞を活性化する α -Galactosylceramide (α -GalCer)がTh1優位の慢性炎症を改善しガンの増殖・転移を抑制することが報告された(J Clin Invest 2010)。我々自身も、予備研究として梗塞後心不全モデルマウスに α -GalCerを投与すると心筋リモデリング・心不全が抑制されることを確認している。このような成績は、『心筋におけるTh1優位の慢性炎症が、心筋リモデリング・心不全の病態形成に関与しており、NKT細胞による炎症制御によりそれらを抑制しうる』という我々の仮説を支持するものである。このような背景をふまえて、『 α -GalCerは、NKT細胞活性化を介してTh1/Th2バランスを適正化しTh1優位の慢性炎症を基盤とする心筋リモデリングの発症・進展を抑制する』という仮説を検証する本研究を着想するに至った。

3. 研究の方法

本研究では、梗塞後心不全モデルマウスを用いて不全心筋における炎症遷延化とTh1/Th2バランスの解析を行うと同時に、NKT細胞による炎症制御機構をTh1/Th2バランスに着目してin vitro細胞レベルとin vivo動物実験の両面から解析する。これらの結果

をふまえ、心筋リモデリング・心不全の形成・進展における NKT 細胞の役割をあきらかにする。さらに、 α -GalCer を用いた NKT 細胞活性化による Th1/Th2 バランスの適正化を介した炎症制御により心筋リモデリング・心不全が抑制できるかどうかを検討する。また、樹状細胞を担体とした α -GalCer による NKT 細胞活性化の手法を確立し、臨床応用可能な新たな心筋リモデリング・心不全の予防法・治療法としての有効性・安全性を検証する。iPS 細胞から作成した NKT 細胞の心筋リモデリング・心不全に対する効果についても検討する。

4. 研究成果

(1) 24 年度は、心筋リモデリングに及ぼす慢性炎症の制御因子としての NKT 細胞の役割について検討した。心筋梗塞 (MI) 後心不全モデルマウスを作成し、非梗塞部心筋から単核球を分離し、フローサイトメトリー法で NKT 細胞を検出した。NKT 細胞は偽手術 (Sham) 群心筋では極めて少数ながら存在し、MI 7 日後の心筋では 2 倍に増加した。NKT 細胞を特異的に活性化する α -GalCer 投与 (手術後 1 および 4 日目) により 7 日後の NKT 細胞は著明に増加した。Sham マウスでは α -GalCer 投与 28 日後には NKT 細胞は元のレベルまで減少したが、MI マウスでは 28 日後もその増加が維持された。

MI 後心筋組織では 7 日目にマクロファージやリンパ球浸潤が有意に増加し、 α -GalCer 投与によっていずれもさらに増加した。M1 マクロファージや M2 マクロファージおよび MCP-1 や RANTES 遺伝子発現は MI で増加し α -GalCer 投与によりさらに増加した。 α -GalCer 投与によって Interferon- γ 、TNF- α 、IL-17 や IL-10 遺伝子発現も有意に増加した。28 日後では、MI で IL-10 のみ増加し、これは NKT 細胞の動態と全く一致した。

以上より NKT 細胞が炎症細胞浸潤およびケモカインやサイトカインの誘導を制御することにより心筋リモデリングおよび心不全の

発症・進展に対して抑制的に作用することがあきらかとなった。

(2) 25 年度は、心筋リモデリングに及ぼす慢性炎症の制御因子としての NKT 細胞の役割についての検討を進めるとともに、 α -GalCer 投与が梗塞後心不全モデルマウスの生存率が有意に改善し、心筋リモデリングおよび心不全の進展が抑制されることを確認した。さらに α -GalCer は横行大動脈縮窄による圧負荷肥大心や冠動脈の一過性結紮による虚血再灌流傷害に対して、心筋保護作用を有していることを新たに見出した。以上より NKT 細胞が炎症細胞浸潤およびケモカインやサイトカインの誘導を制御することにより心筋リモデリングおよび心不全の発症・進展に対して抑制的に作用することがあきらかとなった。

(3) 26 年度は、慢性炎症を制御し、心筋リモデリングの進展を抑制するための効率的な NKT 細胞活性化方法に関する検討を行った。アフェレーシスでヒト末梢血単核球を採取し、IFN- γ ・IL-2 存在下で樹状細胞に分化誘導させて α -GalCer を添加した細胞製品が、生体内で安定して NKT 細胞を活性化することを確認した。また、本細胞製品の臨床応用を想定して、生体 (マウス) に反復投与した際の影響について確認するとともに、表面抗原を中心に細胞製品の特性解析を行ない、ヒト NKT 細胞を安定して効率的に活性化することのできる、 α -GalCer をパルスした樹状細胞の製造方法を確立した。

以上より、 α -GalCer をパルスした樹状細胞は心筋リモデリングおよび心不全に対する新たな治療法として期待でき、現在 First-in-Human 試験に向け準備を進めているところである。

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 16 件)

1. Hamaguchi S, Kinugawa S,
Tsuchihashi-Makaya M, Matsushima S,

Sakakibara M, Ishimori N, Goto D, Tsutsui H: Hyponatremia is an independent predictor of adverse clinical outcomes in hospitalized patients due to worsening heart failure.

J Cardiol. 63(3):182-188, 2014Mar;63(3):182-8. doi: 10.1016/j.jcc.2013.07.012. 査読有

2. Hamaguchi S, Kinugawa S,

Tsuchihashi-Makaya M, Goto D, Tsutsui H: Weekend versus weekday hospital admission and outcomes during hospitalization for patients due to worsening heart failure: a report from Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD).

Heart Vessels. 29(3):328-335, 2014. doi: 10.1007/s00380-013-0359-5. 査読有

3. Imamura T, Kinugawa K, Ohtani T, Sakata Y, Higo T, Kinugawa S, Tsutsui H, Sunagawa K, Komuro I:

Assessment of quality of life during long-term treatment of tolvaptan in refractory heart failure: design and rationale of the AQUA-TLV study.

Int Heart J. 55(3):264-267, 2014

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Assessment+of+quality+of+life+during+long-term+treatment+of+tolvaptan> 査読無

4. Hamaguchi S, Kinugawa S, Matsushima S, Fukushima A, Yokota T, Sakakibara M, Yokoshiki H, Tsuchihashi-Makaya M, Tsutsui H: JCARE-CARD Investigators:

Clinical characteristics and CHADS2 score in patients with heart failure and atrial fibrillation: Insights from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD).

Int J Cardiol. 176(1):239-242, 2014 doi: 10.1016/j.ijcard.2014.06.068. No abstract available. 査読有

5. Fukushima A, Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Sobirin MA, Ono T, Takahashi M, Suga T, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Kadoguchi T, Yokota T, Okita K, Tsutsui H:

(Pro)renin receptors in the skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with post-infarct heart failure in mice.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 307(6):E503-514, 2014

doi: 10.1152/ajpendo.00449.2013. 査読有

6. Hirabayashi K, Kinugawa S, Yokota T, Takada S, Fukushima A, Suga T, Takahashi M, Ono T, Morita N, Omokawa M, Harada K, Oyama-Manabe N, Shirato H, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H:

Intramyocellular lipid is increased in the skeletal muscle of patients with dilated cardiomyopathy with lowered exercise capacity.

Int J Cardiol. 176(3):1110-2, 2014

doi: 10.1016/j.ijcard.2014.07.113. No abstract available. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.07.113. Epub 査読有

7. Yokota T, Kinugawa S, Yamato M, Hirabayashi K, Suga T, Takada S, Harada K, Morita N, Oyama-Manabe N, Kikuchi Y, Okita K, Tsutsui H: Systemic oxidative stress is associated with lower aerobic capacity and impaired skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome.

Diabetes Care. 36(5):1341-1346, 2013 doi: 10.2337/dc12-1161. 査読有

8. Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Masaki Y, Furihata T, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice.

J Mol Cell Cardiol. 62:179-188, 2013

doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.06.004. 査読有

9. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Sobirin MA, Masaki Y, Mizushima W, Kadoguchi T, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J Appl Physiol*. 114(7):844-857, 2013. doi: 10.1152/jappphysiol.00053.2012. 査読有

10. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Yokota T, Matsushima S, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Katsuyama R, Oba K, Okita K, Tsutsui H: Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure.

Int J Cardiol. 168(5): e142-4, 2013

doi: 10.1016/j.ijcard.2013.08.073. No abstract available. 査読有

11. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Okita K, Matsushima S, Tsutsui H: Increased plasma soluble (pro)renin receptor levels are correlated with renal dysfunction in patients with heart failure.

Int J Cardiol. 168(4):4313-4314, 2013

doi: 10.1016/j.ijcard.2013.04.176. No abstract available. 査読有

12. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K:

Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity

by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance.

PLoS ONE. 7(2):e30568, 2012

doi: 10.1007/s00259-012-2297-3. 査読有

13. Hamaguchi S, Kinugawa S, Sobirin MA, Goto D, Tsuchihashi-Makaya M, Yamada S, Yokoshiki H, Tsutsui H; for the JCARE-CARD Investigators.

Mode of death in patients with heart failure and reduced vs. preserved ejection fraction: report from the registry of hospitalized heart failure patients.

Circ J. 76(7):1662-1669, 2012

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481105>
査読無

14. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Goto D, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H; The JCARE-CARD Investigators.

Loop diuretic use at discharge is associated with adverse outcomes in hospitalized patients with heart failure: a report from the Japanese cardiac registry of heart failure in cardiology (JCARE-CARD).

Circ J. 76(8):1920-1927, 2012

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665070>
査読無

15. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Hirabayashi K, Suga T, Azalia P, Takada S, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice.

Circ Res. 111(8):1037-47, 2012

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22887770>
査読無

16. Chiba S, Naya M, Iwano H, Yoshinaga K, Katoh C, Manabe O, Yamada S, Wakasa S, Kubota S, Matsui Y, Tamaki N, Tsutsui H: Interrelation between myocardial oxidative metabolism and diastolic function in patients undergoing surgical ventricular reconstruction. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 40(3): 349-55, 2013 doi: 10.1007/s00259-012-2297-3 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 筒井裕之: 心不全治療 Hot Topics 第105回日本循環器学会中国地方会, 2014年12月6日, ANA クラウンプラザホテル宇部(山口県宇部市)

2. 筒井裕之: HFpEF の疫学 第37回日本高血圧学会総会, 2014年10月17日, パシフィコ

横浜(神奈川県横浜市)

3. Tsutsui H: Role of Innate Immunity in Cardiac Inflammation. American Heart Association 2013, 2013年11月20日, Dallas, USA

4. 筒井裕之: HFPEF の治療戦略~現状と将来~ 第16回日本心不全学会学術集会, 2012年12月1日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

5. 筒井裕之: エビデンスに基づく心不全治療~知るから創るへ~ 第100回日本循環器学会中国・四国合同地方会, 2012年6月22日, 広島国際競技場(広島県広島市)

〔図書〕(計13件)

1. 絹川真太郎, 筒井裕之: 心不全治療薬 福井次矢監修, 小松康弘, 渡邊裕司編: Pocket Drugs 2014, p162-171, 医学書院, 東京, 2014年

2. 筒井裕之: ESC急性および慢性心不全の診断・治療 ガイドライン2012 小室一成, 佐地勉, 坂田隆造, 赤阪隆史編: Annual Review 循環器, p86-91, 中外医学社, 東京, 2014年

3. 筒井裕之: 慢性心不全 堀 正二, 永井良三編: 循環器疾患最新の治療2014-2015, p242-247, 南江堂, 東京, 2014年(分担執筆)

4. 筒井裕之: 心不全 小川 聡, 井上 博, 筒井裕之編: 専門医のための循環器病学, 医学書院, 東京, 2014年

5. 筒井裕之: 心不全 内科学書, p93-104, 中山書店, 東京, 2013年(分担執筆)

6. 筒井裕之, 絹川真太郎: 急性心不全 堀 正二, 永井良三編: 循環器疾患最新の治療 2012-2013, p271-277, 南江堂, 東京, 2012年(分担執筆)

7. 筒井裕之: 慢性心不全の診断と治療 内科学, p597-602, 西村書店, 東京, 2012年(分担執筆)

8. 筒井裕之: 「全身に血液を送るポンプ」心

臓を護(まも)る 知のフロンティア 北海道大学の研究者は、いま 第2号, p68-69, 北海道大学アドミッションセンター, 札幌, 2012年(分担執筆)

9. 筒井裕之: 心不全診断・治療の変遷 井上博, 許俊鋭, 檜垣實男, 代田浩之, 筒井裕之編: 今日の循環器疾患 治療指針, p277-283, 医学書院, 東京, 2012年(分担執筆)

10. 筒井裕之: 心不全診断の進め方 井上博, 許俊鋭, 檜垣實男, 代田浩之, 筒井裕之編: 今日の循環器疾患 治療指針, p284-290, 医学書院, 東京, 2012年(分担執筆)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

1. 名称: 樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法
発明者: 筒井裕之・絹川真太郎・石森直樹・斎藤晶理
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/055547
出願年月日: 2015年2月26日
国内外の別: 国外

2. 名称: 樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法
発明者: 筒井裕之・絹川真太郎・石森直樹・斎藤晶理
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2014-36070
出願年月日: 2014年2月26日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 裕之 (TSUTSUI Hiroyuki)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70264017

(2) 研究分担者

絹川 真太郎 (KINUGAWA Shintaro)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 60399871

石森 直樹 (ISHIMORI Naoki)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号: 70399848

(3) 連携研究者

徳原 教 (TOKUHARA Satoshi)
北見赤十字病院 循環器内科・副部長
研究者番号: なし

齋藤 晶理 (SAITO Akimichi)
北海道大学・大学院医学研究科・医員
研究者番号: 40735502

西川 幹人 (NISHIKAWA Mikito)
帯広協会病院・循環器内科・医員
研究者番号: なし

高橋 将成 (TAKAHASHI Masashige)
市立釧路総合病院・心臓血管内科・医師
研究者番号: なし

福島 新 (FUKUSHIMA Arata)
University of Alberta Cardiovascular
Research Centre・doctoral fellow
研究者番号: なし

菅 唯志 (SUGA Tadashi)
立命館大学・スポーツ健康科学部・研究員
研究者番号: 30708673

高田 真吾 (TAKADA Shingo)
北海道大学・北海道大学病院・COI 研究員
研究者番号: 60722329

門口 智泰 (KADOGUCHI Tomoyasu)
順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員
研究者番号: なし

正木 芳宏 (MASAKI Yoshihiro)
砂川市立病院 循環器内科・医長
研究者番号: なし

降旗 高明 (FURIHATA Takaaki)
北海道大学・大学院医学研究科・大学院生
研究者番号: なし

小野 太祐 (ONO Taisuke)
北見赤十字病院・循環器内科・医員
研究者番号: なし

平林 鑑 (HIRABAYASHI Kagami)
苫小牧市立病院・循環器内科・医長
研究者番号: なし

本間 恒章 (HOMMA Tsuneaki)
国立病院機構北海道医療センター・循環器
内科・医師
研究者番号: なし