

平成30年6月25日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461098

研究課題名(和文) 特発性拡張型心筋症における樹状細胞の心筋浸潤および成熟化の臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical impact of infiltration and maturation of dendritic cells in patients with dilated cardiomyopathy

研究代表者

菅野 康夫 (Sugano, Yasuo)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00317124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DCM患者182例に対し、免疫染色で炎症細胞浸潤を同定した。心筋浸潤したCD3、CD68、CD163陽性細胞はそれぞれ中央値で8.1/mm<sup>2</sup>、22.3/mm<sup>2</sup>、6.5/mm<sup>2</sup>であった。細胞浸潤が高度な患者では有意に予後が悪く(それぞれp=0.007、p=0.011、p=0.022)、CD163陽性(M2マクロファージ)細胞浸潤は膠原線維沈着と相関し(p<0.001)、独立した予後規定因子であった(ハザード比1.77、p=0.004)。マクロファージのM2への極性変化のDCM予後との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biopsy samples from 182 DCM patients were immunohistochemically stained with antibodies to infiltrating cells. Median numbers of myocardial CD3, CD68 and CD163-cell infiltrates were 8.1/mm<sup>2</sup>, 22.3/mm<sup>2</sup>, 6.5/mm<sup>2</sup>, respectively. Patients with higher counts of infiltrating CD3-, CD68- and CD163-positive cells had significantly poorer outcomes (p=0.007, p=0.011 and p=0.022, respectively). A high CD163-positive infiltrate count was independently associated with worse outcome in multivariate Cox regression analysis (hazard ratio=1.77, p=0.004), and multivariate linear regression analysis revealed that the CD163 cell count was an independent determinant of CAF (p<0.001).

DCM with increased myocardial immune activation was associated with poor long-term outcome. The association between M2 macrophages and collagen formation suggests the phenotypic polarisation of macrophages toward M2 may be associated with ventricular remodeling in DCM.

研究分野：循環器内科

キーワード：拡張型心筋症 心不全 炎症 線維化 リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

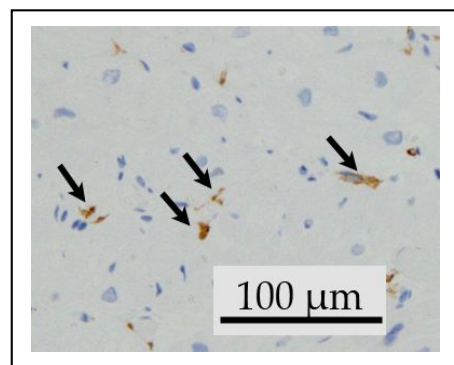
特発性拡張型心筋症 (DCM) は心室の収縮障害および拡張を特徴とする疾患であり、心不全や心臓突然死を来す。厚生労働省の特定疾患に指定されている難病であるが、その病因や予後の規定因子は明らかにされていない。一部の DCM においては、心筋の炎症や免疫応答の異常が病態と深く関わることが知られるが、詳細は不明である。今回申請者らは、国立循環器病研究センター（以下、「当センター」）に心不全として入院し、DCM と診断された患者の心筋生検組織標本を染色し、その臨床像と比較検討することにより、免疫応答を司る樹状細胞の心筋への浸潤および成熟化がその病因・病態・予後・治療反応性などといかなる関連があるかを探索する。

申請者らはこれまで、心筋梗塞モデルマウスを用いた研究で、梗塞後リモデリングにおける免疫応答の異常が心不全の予後に関与していること (Cardiovasc Res 2005;65:446-456, Journal of Immunology 2008;23:334-340) さらに免疫担当細胞の中で樹状細胞がマクロファージの分化を制御し、梗塞後治癒過程では M2 マクロファージへ分化することで組織修復を促進することを示し、心臓リモデリングにおける免疫応答の意義を明らかにした (Circulation 2012;125:1234-1245)。

DCM は、心筋細胞の変性や間質線維化により、心室の拡大および収縮不全をきたす疾患である。遺伝的素因、ウイルス感染、自己免疫異常の関与が指摘されているが、病因は依然不明である。国の難病に指定されており、我が国の統計では 5 年生存率は約 5 割、心臓移植適応例の 80% を占めるきわめて予後不良の疾患である。しかしながら、臨床像、特に治療効果や予後は症例によって大きく異なり、例えば 遮断薬の反応性を見ても効果差が大きく、その予測因子は明らかでない。近年、DCM の臨床像を呈する症例の中に、心筋生検で持続的な炎症細胞浸潤を認める症例が少なくなく、心機能低下の機序に関連する可能性が指摘されている (Herz 2000;25:189-199)。こうした症例は inflammatory DCM と呼ばれ、心筋生検サンプルでのリンパ球またはマクロファージの浸潤が  $\geq 14/\text{mm}^2$  で定義される。DCM における炎症の持続にはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞によるリンパ球の活性化が関与している可能性が示唆されている。近年、DCM 患者の心筋生検標本の免疫組織染色において、成熟型・未熟型樹状細胞のマーカである CD83・CD209 陽性細胞が存在することが示され、健常者と比し DCM 症例において減少していることが示された (Eur J Heart Fail 2013;15:974-985)。一方で重症心不全を伴う DCM 患者の血液中の樹状細胞は増加していることが報告されてお

り (Int J Cardiol 2009;131:246-256) 一定の見解は得られていない。樹状細胞はその成熟段階により貪食能や抗原提示能が異なる。未熟な樹状細胞は、貪食能は高いものの抗原提示能は低く、炎症性刺激や CD40L シグナルを介して成熟化し、強い抗原提示能を獲得し、T リンパ球の活性化や M1/M2 マクロファージの分極化の制御を司る (右図)。今回申請者らは、DCM におけるこれら免疫担当細胞、特に樹状細胞の心筋浸潤と成熟化に着目し、研究に着手した。

申請者の所属機関は、DCM をはじめとした重症心不全入院がきわめて多く、そのほとんどの症例で心筋生検を施行し確定診断を行っている。申請者らは、2005 年より 2012 年に当院に心不全で入院し右室心筋生検を施行し DCM と診断した 590 例のデータベースを作成した。診断時および診断後経時的の各種臨床パラメータを含むデータベースであり、現在解析進行中である。また、心筋生検組織の免疫組織染色についても、本研究の連携研究者が中心となり進められており、実際、免疫担当細胞のマーカである CD68 (マクロファージ)、CD163 (M2 マクロファージ)、CD209 (未熟樹状細胞) などの免疫染色を行い、一部の DCM 症例においてこれらの細胞浸潤が高度に認められることを確認した (下図)。本研究では、パラフィン包埋保存されている DCM 患者右室心筋生検標本を新たに薄切、染色することにより、樹状細胞を中心とした免疫担当細胞の役割を解明する。



## 2. 研究の目的

本研究は 4 年間の研究期間内に、DCM における免疫担当細胞の役割、特に樹状細胞の心筋への浸潤および成熟化の意義を明らかにすることを目的とする。樹状細胞を成熟、未成熟それぞれのマーカで染色し、その存在が DCM 患者の臨床像および予後にいかなる影響を与えるかを探索する。目的達成のために、当センターデータベースを利用した予後に関する後ろ向き研究を行う。作成した DCM データベースより、LVEF < 40%、弁膜症の併存の除外など適応基準を満たす症例を絞り込む。診断時、6 か月後、3 年後の NYHA 分類、運動耐容能、血液検査、各種画

像（心電図、胸部レントゲン、心臓超音波、MRI、RI等）投与薬剤のデータを診療録より収集・集計する。また死亡または心不全による入院、致死的不整脈の出現などの転帰を追跡する。病理組織に関しては、HE染色およびMasson-Trichrome染色の確認および解析に加え、保存されたパラフィン包埋ブロックを薄切し、CD3（リンパ球）、CD68、CD163、CD209、CD83（成熟樹状細胞）、CD40L、テネイシンCの特殊免疫染色を行う。各々について単位面積あたりの浸潤細胞の実数をカウントする。また、Masson-Trichrome染色およびテネイシンCに関しては全体に対する染色範囲の比率を算出、それぞれ数値化する。得られた心筋生検組織データおよび診療記録からのデータを含む総合データベースを詳細に解析・検討することにより、DCMの病態および予後における免疫担当細胞の浸潤との関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

申請者らは、本研究の基盤として所属施設の過去の病歴から8年間、計590例にわたるDCM（疑い含む）からなるデータベースを作成した。実臨床で診断されたDCM症例の病態・予後と病理組織所見との関係を追及し真実を探り出すことが本研究の主旨である。

まず、DCMデータベースより適応基準を満たす症例の絞り込み、データ整理、パラフィン包埋された検体の薄切および免疫組織染色をおこなう。

適応基準を満たす症例の絞り込み  
DCMの診断は、World Health Organization/Internal Society and Federation of Cardiology (ISFC) task forceに基づいて行われる（Circulation 1996;93:841-2）。データベースの患者診療録を詳細に調査し、心臓超音波 modified Simpson法で左室駆出率40%以下、左室拡張末期径55mm以上の症例で、有意な弁膜症を除外、心臓手術の既往、明らかな急性心筋炎の既往のない症例を適応基準とする。診療録より既往、臨床経過、身体所見、内服薬、画像所見、血液検査、心臓カテーテル結果を確認したうえで、本研究の登録症例とする。データベース中ランダムに選択された70症例について検討したところ、適応基準を満たすと判断された症例は48例（69%）であった。したがって同データベース中、約400例が研究対象となる。

血液検査および画像データの収集  
以下の検査値やデータにつき診療録より確認し、データベースに入力する。主要項目は、患者背景、一般身体所見、血液検査、尿検査、心電図、胸部X線、NYHA分類、心臓超音波所見、RI所見、投薬内容、および心血管イベントの有無、発現日、転帰、観察終了日とする。

MRI所見の評価

心臓MRIを施行した症例に関しては、左室および右室の拡張末期容積、収縮末期容積、駆出率、LV mass indexを算出する。また、ガドリニウム遅延造影（LGE）の解析は、正常心筋に関心領域を設定し、その信号強度と標準偏差から決定した閾値をもとに異常増強効果の面積を測定する。MRI画像データの解析はziostation2ソフトウェア（ザイオンフト）にて行う。

組織所見のデータベース化

診断時に染色したHE染色およびMasson-Trichrome染色に加え、ホルマリン固定パラフィン包埋された右室心筋生検組織を新たに薄切し、スライド標本作製する。各種免疫組織染色〔CD3（リンパ球）、CD68（マクロファージ）、CD163（M2マクロファージ）、CD209（未熟樹状細胞）、CD83（成熟樹状細胞）、CD40L、テネイシンC〕を行う。なお、抗体の最適化や条件付けはすでに行われており、心筋組織での各マーカー陽性細胞の検出は確認されている。単位面積（mm<sup>3</sup>）あたりの各陽性細胞の数をカウントする。テネイシンCおよびMasson-Trichrome染色に関しては全体に対する陽性面積率で数値化する（Circulation 1998;98:2621-2628）。

データ解析

心筋生検組織標本の評価は主に、i) CD3陽性T細胞+CD68陽性マクロファージの合計数、ii) CD163/CD68陽性細胞（M2マクロファージの割合）、iii) CD83/CD209陽性細胞（成熟樹状細胞の割合）、iv) Collagen Volume Fraction、v) テネイシンC陽性面積率を指標とする。それぞれ群分けし、心不全の重症度、投薬による改善度、予後（死亡および心不全入院、致死性不整脈の出現）との関連を、適切な層別解析もしくは回帰モデルを用いた解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) 患者背景

当初の研究計画では8年間の連続症例を母集団とする予定であったが、組織切片を染色するにあたり時間が経過した検体を使用することは信頼性の担保を損なうと判断し、5年間、183例を研究対象とした。平均年齢51±15歳、男性79%、BNPの中央値は162pg/mLであった。心エコーでの左室径は拡張期/収縮期で67±9/57±10mm、左室駆出率は30±11%、遮断薬およびRAS阻害薬の導入率はそれぞれ88%、84%と概ね適切な心不全治療がされていると考えられた。MRIに関してはデバイス植込み後などの理由から施行患者数が少なく、今回は解析しなかった。

#### 2) テネイシンC

母集団全体のうち、保存された心筋組織検体からテネイシンC（TNC）免疫染色を行い、解析が可能だった123症例を対象とした。AUC

解析より求めたカットオフ点 (TNC%=2.3%) を基準として High TNC 群 (n=22) Low TNC 群 (n=101) に分け生存分析を行ったところ、High TNC 群は有意に予後不良であった (図 1)。心筋生検前、6 ヶ月後の両方で心エコー施行が可能であった 94 例 (High TNC: n=15, Low TNC: n=79) を比較したところ、High TNC では Reverse remodeling の抑制がみられ、収縮期および拡張期左室径、左室収縮率の改善度は有意に低かった (図 2)。TNC% に対する多変量線形回帰分析を行ったところ、糖尿病の合併が有意の規定因子であることが判明した ( -coefficient=0.199, p=0.034 )。

図 1

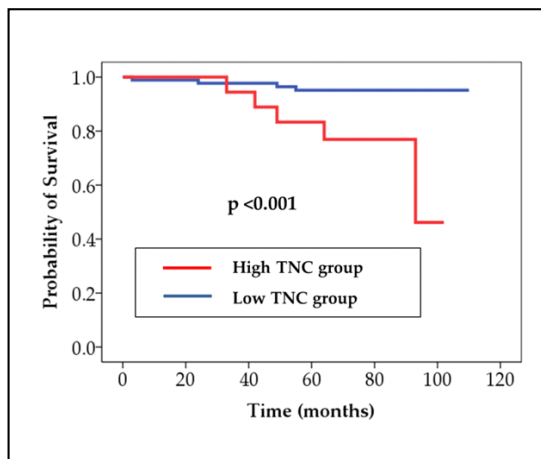
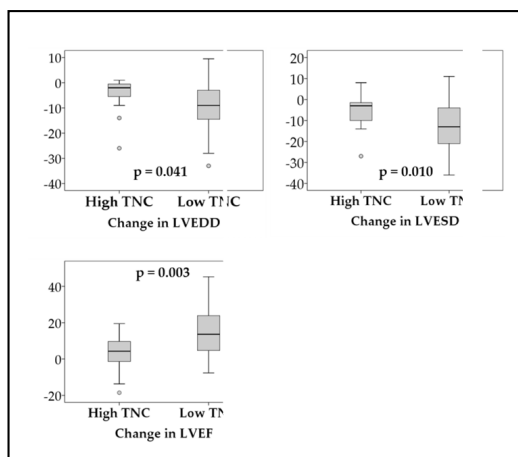


図 2



### 3) 免疫担当細胞浸潤

最終的に着目した免疫担当細胞として、T リンパ球 (CD3)、全マクロファージ (CD68)、M2 マクロファージ (CD163)、樹状細胞 (CD209) について解析した。その他の候補となる表面マーカーは良好な染色結果が得られなかった。研究計画時に予想した結果と異なり、樹状細胞浸潤は予後や病態と明らかな関係を示すことができず、他の 3 種類の subset について深く解析した。特異的な抗体での染色結果と浸潤細胞数は図 3 の如き結果

であった。それぞれの細胞数で AUC を求め、予後解析を行うと、T リンパ球 (CD3)、全マクロファージ (CD68)、M2 マクロファージ (CD163) の Cut-off ラインはそれぞれ 14/mm<sup>2</sup>、32/mm<sup>2</sup>、10/mm<sup>2</sup> となり、いずれの細胞も浸潤細胞の増加が予後不良と関連していた (図 4)。Cox 比例ハザード解析を行うと、CD163 陽性細胞数 > 10/mm<sup>2</sup> が独立した規定因子であることが明らかになった。

図 3

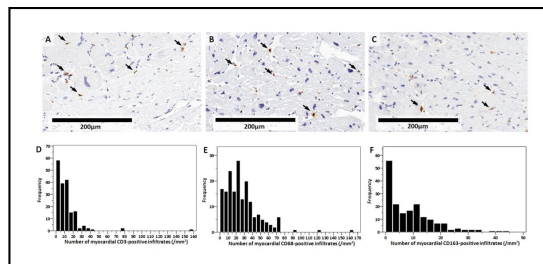
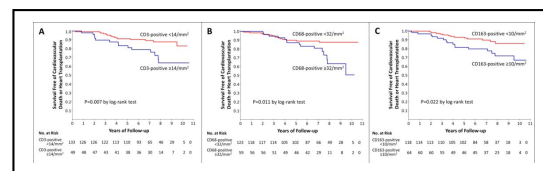


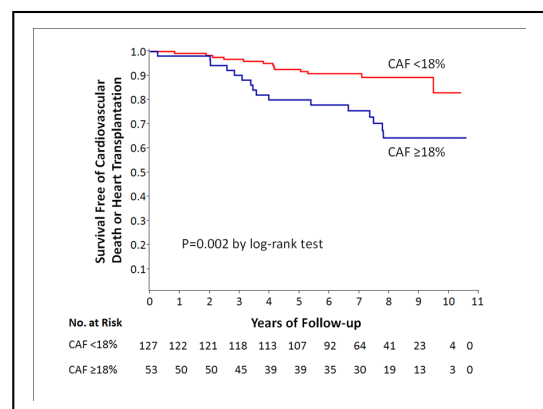
図 4



### 4) 膠原線維沈着

Masson-trichrome 染色を行い、デンストメトリー法で膠原繊維沈着度 (Collagen Area Fraction: CAF) を測定した。AUC で算出したカットオフ点 (CAF=18%) で分けると、高 CAF では予後不良だった (図 5)。CAF は TNC と有意な正の相関 (r=0.329, p<0.001) を持っていた。多変量線形回帰分析では M2 マクロファージ (CD163) 浸潤が CAF の有意な規定因子であった ( -coefficient=0.258, p<0.001 )。

図 5



## 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 2 件)

Clinical impact of the presence of macrophages in endomyocardial biopsies of patients with dilated cardiomyopathy. Nakayama T, Sugano Y, Yokokawa T, Nagai T, Matsuyama TA, Ohta-Ogo K, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Ohte N, Yasuda S, Anzai T. *Eur J Heart Fail.* 19:490-498;2017. 査読あり  
Significance of myocardial tenascin-C expression in left ventricular remodelling and long-term outcome in patients with dilated cardiomyopathy. Yokokawa T, Sugano Y, Nakayama T, Nagai T, Matsuyama TA, Ohta-Ogo K, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Yasuda S, Takeishi Y, Ogawa H, Anzai T. *Eur J Heart Fail.* 18:375-85;2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

Inhibitory Effect of Myocardial Tenascin-C against Recovery of Ejection Fraction in Patients with Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy Yasuo Sugano et al. American Heart Association (AHA) 2017 Scientific Sessions  
Deleterious Effect of Increased Myocardial Tenascin-C Expression with Macrophages Activation in Dilated Cardiomyopathy Yasuo Sugano et al. American Heart Association (AHA) 2016 Scientific Sessions  
Poor Long-Term Prognosis in Patients with Inflammatory Dilated Cardiomyopathy Diagnosed by Immunohistochemistry-Based Criteria Yasuo Sugano et al. American Heart Association (AHA) 2015 Scientific Sessions  
Significance of Myocardial Tenascin-C Expression in Association with Infiltrative Inflammatory Cells in Patients with Dilated Cardiomyopathy Yasuo Sugano et al. American College of Cardiology (ACC) 2015 Scientific Sessions  
Effect of myocardial infiltration of dendritic cells, macrophages and T lymphocytes on long-term prognosis in patients with Dilated Cardiomyopathy Takafumi Nakayama, Yasuo Sugano et al. American Heart Association (AHA) 2014 Scientific Sessions

〔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〕

特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野 康夫 (SUGANO Yasuo)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00317124

(2)研究分担者

安斉 俊久 (ANZAI Toshihisa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長

研究者番号：60232089

(3)連携研究者

大郷 恵子 (OUGOU Keiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師

研究者番号：

30601827