

心筋梗塞後の炎症・修復を制御する新規機序の解明

慶應義塾大学医学部循環器内科
安西 淳

研究の目的：

心筋梗塞(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、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後組織修復には免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、これらが一度過剰になるとかえって組織障害を進展させ、心不全を増悪させてしまう。MI後に免疫応答や炎症反応が過剰となる機序が明らかとなれば新規治療標的となり得ると考えられる。

本研究ではマイトジェン誘導性遺伝子Sipal (Signal-induced proliferation-associated gene 1) を中心としたMI後組織障害・修復機構の新たなメカニズムを明らかにし、新規治療法へと発展させることを目的とする。

研究の内容：

申請者はマウスモデルにおいて、正常の心臓とMIを作製した心臓梗塞部の遺伝子発現を比較した網羅的解析を行い、梗塞部で遺伝子Xが上昇していることを見出した。

Sipalはマイトジェン誘導性遺伝子で、これまで白血病、乳癌などの悪性腫瘍における役割は研究されているものの、MIを含めた心血管疾患における役割は全く知られていない。本研究では、心臓線維芽細胞の遺伝子Sipalと炎症細胞とのクロストークに着目し、様々な遺伝子改変マウスを用いて、MI後組織修復の過程における遺伝子Sipalの役割を明らかにする。

研究の方法と結果：

Sipalノックアウト (SipalK0) マウスにMI を作製し、28 日間観察すると、その生存率は野生型 (WT) マウスと比較して改善傾向にあり、左室駆出率や左室拡張末期径など左心機能の指標は有意差を持って良好であった。SipalK0マウスでは炎症急性期であるday4 でのLy6Chigh 単球の浸潤が有意に低く、qPCRで解析した炎症性サイトカインの遺伝子発現も有意に抑制されていた。炎症性サイトカインの産生源となり過剰な炎症に寄与するLy6Chigh 単球は、梗塞部局所で産生される炎症性ケモカイン、特にCCL2/CCL7 によって誘導され、組織障害を増悪させることが知られている。梗塞部でこれらケモカインの遺伝子発現を検討すると、SipalK0 マウスで有意に減少していた。

梗塞部においてどの細胞由来のSipal が重要かを骨髄移植(BMT)モデルで確認したところ、心臓間質細胞由来のSipal の重要性が示唆された。Flow cytometry 法により心臓間質細胞(CD45-)を内皮細胞、線維芽細胞、それ以外の三つに分け、Sipal-GFP/+レポーターマウスを用いてSipal の発現を検討すると、内皮細胞と線維芽細胞でSipal の発現を認めた。一方、各細胞群をFACS でソートし、CCL2 とCCL7 の遺伝子発現を検討すると、線維芽細胞でのみ有意な発現を認めた。

心臓線維芽細胞特異的Sipa1コンディショナルK0マウスであるTcf21Cre/+ Sipa1-flox/floxマウスを作成し、解析を行った。同マウスにタモキシフェン投与後にMIを作成すると、コントロールであるTcf21/+ Sipa1-flox/floxマウスと比較して、生存率が有意に高く、左心機能の著明な改善を認めた。さらに梗塞部位に集積する炎症細胞をflow cytometry法で解析すると、心臓線維芽細胞特異的Sipa1-コンディショナルK0マウスでは炎症急性期であるday 3でのLy6Chigh単球 (CD45+CD11b+F4/80-Ly6Chigh) の浸潤が有意に低く、qPCRで解析した梗塞部のInterleukin (IL) -1 β 、IL-6などの炎症性サイトカイン、CCL2/CCL7などの炎症性ケモカインの発現も顕著に抑制されており、心臓線維芽細胞特異的Sipa1-コンディショナルK0マウスにおいて、Sipa1-full K0マウスで見られた表現型が再現されたことを確認した。

マウスの心臓をCollagenaseI、DNaseなどの酵素処理により単細胞に分離し、Fibroblast Growth Factor (FGF), Epidermal Growth Factor (EGF) を含んだ培養液で1週間培養することで100%に近い純度の心臓線維芽細胞を選択的に採取・培養することに成功したため、野生型マウスとSipa1-K0マウスの心臓から心臓線維芽細胞を採取し、IL-1b、LPS、TGFbなどで24時間刺激し、遺伝子変化をqPCR法で検討したところ、刺激後にCCL2/CCL7、CXCL1などの炎症性ケモカインの発現上昇を認めた。一方、Sipa1-K0マウス由来の心臓線維芽細胞では野生型と比較してその上昇が有意に抑制されていた。以上より、MI後 Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs) により線維芽細胞が刺激され、炎症細胞を梗塞部へリクルートするケモカインの発現が亢進する過程に遺伝子Sipa1が深く関与し、MI後の過剰な炎症を起こす可能性が示唆された。

期待される成果：

本研究はMI後の遺伝子Sipa1の役割を明らかにしようとする世界初の研究である。心臓線維芽細胞由来Sipa1の役割に関する報告も過去に無い。MI後の心臓線維芽細胞の役割は幾つか報告されているが、心臓線維芽細胞自身が不均一な集団であることが最近明らかとなりつつあり、本研究でSipa1陽性心臓線維芽細胞という新たな細胞集団・治療標的を特定できる可能性がある。また、従来遺伝子Sipa1の下流分子として知られるRap1の発現に大きな変化を認めなかったことより、Sipa1の新たな生物学的側面の発見に繋がる可能性をも秘めている。Sipa1を標的としたsiRNA投与による癌治療法も過去に報告されており、MI後心不全を予防する新規治療法へ発展することも期待できると考えられる。

研究成果：

Anzai A*, Ko S, Fukuda K. Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and its Potential Implications for the Clinic. *Int J Mol Sci*; 23: 5214, 2022 (*corresponding author)