

心不全を重症化する新しい内因性免疫共役機序の解明

大阪大学大学院 医学系研究科 循環器内科学
真田 昌爾

1. はじめに

近年本邦を含めた先進諸国にて、生活習慣病の蔓延に伴い急性心筋梗塞等の急性冠症候群の発症数は著増している。本邦でも急性期再灌流療法の普及で急性期死亡（突然死）率は改善したが、急性期生存例の増加は逆に慢性心不全によるQOL低下症例の増加を招き、心不全は本邦統計でも今や単一臓器疾患で死因第1位となり、更に慢性心不全の5年生存率は急速進行性肺癌と同等に低く、心不全の克服は今や喫緊の医学的・社会的課題である。一方、EBMや非内科的治療の劇的な進歩にも関わらず、慢性心不全の予後は最近15年間で僅か5%しか改善していない現状がある（1）。これは従来慢性心不全治療のEBMに係る大きな懸案として、立証された有効なカスケードが僅かしかなく病態の多様性を反映していないと考えられ、その克服には病態解明には普遍的な視野に基づく一層多面的・包括的な発症進展機序の再検討が必要である。然るに全身で普遍的に生体調節に関わる免疫反応機序に関連する心筋組織・心筋収縮能制御に関する研究は今まで欠落していた。

最近、自然免疫を担うToll様受容体(TLR)が普遍的な組織構築の維持に重要と分かり、我々は早い段階から自己免疫機序の包括的な心不全病態生理及び心筋保護機序への関与を予測し、初期的検討結果として数万遺伝子の中から心筋伸展刺激時及び心筋組織圧負荷時における遺伝子発現プロファイルの網羅的検討を通じて、当時Orphan TLRの一種と考えられていたST2が1)不全心筋で発現し、2)その心臓特異的リガンドが新規Cytokine IL-33であり、3)IL-33/ST2が慢性心不全重症化に必須のGPCR刺激を抑制する事を、世界に先駆け報告した（2）。

2. 目的と方法

そこで本研究ではIL-33/ST2の1)心不全での病態生理学的意義の検討、2)GPCR経路との共役分子機序と心不全重症化への寄与の解明、3)共役機序の外部修飾による心不全治療への応用を目指し、自然免疫機序による心不全の病態生理解明と治療法開発への先鞭をつける研究を目指した。

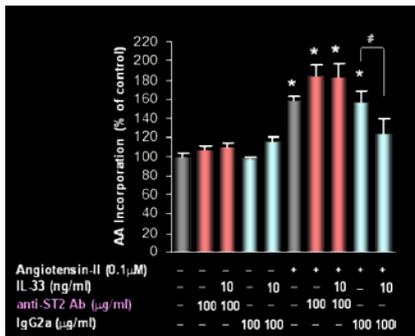
1)まず、新生仔ラット心筋細胞を用い、GPCR依存性ストレス負荷としてAT-II、フェニレフリンを付加し心筋を肥大させ、更に酸化ストレス負荷としてH2O2付加群を設け、リコンビナント型IL-33蛋白（rIL-33）を付加した際の反応性変化を検討した。

2)次にIL-33/ST2シグナルの下流ではNF- κ BとJNK/p38MAPKの活性が修飾を受ける（3）為、上記各群にてNF- κ B、JNK/p38活性化とIL-33による変化を、またERK・AktはIL-33で活性変化を受けないか、即ちIL-33/ST2がGPCR刺激により活性化されたNF- κ B・MAPKを確かに特異的に抑制するか検討した。

3)さらにIL-33KOマウスを用い、大動脈縮紮（TAC）圧負荷心不全モデルにて、心筋肥大・心拡大・心筋線維増加・心筋細胞死（ネクローシス・アポトーシス）及び心機能異常と、更に別グループで生存率の低下を検証した。

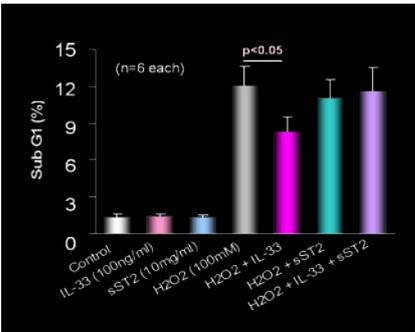
3. 結果 研究成果

新生仔ラット心筋細胞において、AT-IIとフェニレフリンは共にアミノ酸取り込みの増大を示し、肥大していたが、rIL-33は用量依存性にその取り込み増大を抑制した。また、IL-33と会合するST2の中和抗体を添加すると、心筋肥大はやや増強される傾向にあり、IL-33の肥大抑制作用を完全に遮断したが、対照となるIgG2a抗体ではそれらの反応は全く惹起されず、IL-33の添加により心筋肥大は有意に抑制された（図1）。



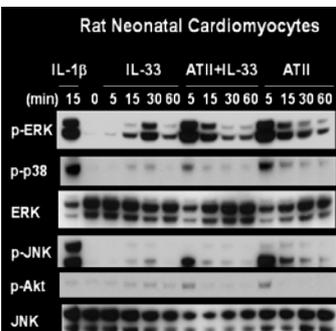
また、同じ培養心筋細胞モデルで刺激をH2O2負荷に変更したところ、24時間後に有意に心筋アポトーシスが誘導されたが、IL-33は特異的にこのアポトーシスを有意に抑制し、心筋保護作用を示し、この作用は可溶性のsST2を更に加える事で減弱した(図2)。

図1：IL-33/ST2によるGPCR由来心筋肥大の抑制作用



これらより、IL-33蛋白はST2受容体に特異的に作用する事で、少なくともGPCR由来刺激の抑制と、アポトーシス抑制作用を惹起し、心筋保護効果を発揮している事が示唆される。

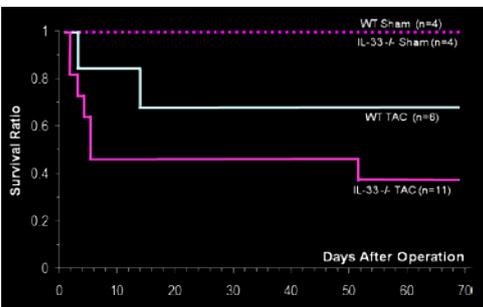
図2：酸化ストレス刺激に対するIL-33/ST2のアポトーシス惹起抑制作用



一方、更にこれらのリガンド/受容体反応の細胞内シグナル伝達機序についても検討を加えた。IL-33はNF-κBシグナルを活性化する一方、MAPKシグナルも修飾する可能性が示されている(3)為、本研究でもGPCR刺激下および更にIL-33蛋白を添加後のシグナル強度を検討したところ、

図3：IL-33によるGPCR刺激由来のJNK・P38MAPK活性化の選択的抑制

(図3)の様に、AT-IIによって活性化されたERKとAktは抑制せず、同様に活性化されたJNKとp38MAPKのみを選択的に抑制するという興味深い現象が観察された。



然るに、IL-33ノックアウトマウスに圧負荷(TAC)を施し、物理的的刺激による心不全を形成したモデルにおいて、その生命予後を検討した結果、(図4)のように、IL-33を産生しないマウスでは対照野生株群に比べて予後が有意に悪化する事が示された。

図4：マウスTACモデルにおける生命予後とIL-33

4. 考察 まとめ

本研究から、1)細胞ストレス因子のGPCR経路と自然免疫を担うTLR経路が実際に共役して新しい普遍的な心筋障害機序を形成する事が証明され、2)その治療として抑制性サイトカインであるIL-33が直接治療に資する事が出来る可能性が示唆され、2)さらに進んで多くの難治性細胞ストレス性疾患が包括的に制御・治療できる可能性が前進したと考えられる。ST2は臨床的心筋障害マーカーとして既に有用性が示され(4)、本研究が社会的利益に資する可能性は既に高い。加えて本研究は分野を超えて普遍的な免疫調節機構研究にも成果が波及し得る為、その意義は大きいと言える。

以上をまとめると、新たなTo11様受容体-リガンドシステムST2/IL-33は、物理的な心筋伸展刺激により心筋で発現増加し、NF-κBの活性抑制と関連して、GPCR受容体活性化に伴う心肥大・心筋肥大・心筋線維化・心機能不全を抑制する事が示唆された。またそのメカニズムとして、IL-33は選択的にJNKとP38MAPK活性化を抑制し、IL-33による細胞内シグナル機序とGPCR刺激との共役機序には、酸化ストレスやTLR complex形成に対する修飾の関与が示唆された。

今後は更に詳細なメカニズムの解明と、IL-33細胞内シグナル伝達機序の外部修飾による心不全治療への応用を目指す。

5. 發表論文、參考文獻

1. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2006;355:251-9.
2. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007;117:1538-49.
3. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23:479-90.
4. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:827-40.