

成果報告書＜概要＞

施設・所属：慶應義塾大学医学部循環器内科

氏名： 安西 淳

1. 概要の構成は自由ですが、留学成果報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。
2. 研究目的、研究手法、研究成果など、一般の方にもわかりやすくしてください。
3. 3.A4 1ページでまとめてください。（図表・写真などの貼付を含む、日本語）

＜課題名＞心筋梗塞後心不全に対する新規治療標的の同定

＜研究目的＞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、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、梗塞後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は未だ不明であり、これらが明らかとなれば、新たな治療のターゲットとなり得ると考えられる。MI 後には梗塞部に Neutrophils, Ly6C^{high} monocytes, Macrophages の浸潤がダイナミックに認められるが、それらは骨髄での造血に依存していることが知られていた。しかしながら、梗塞後のどのような刺激が骨髄の造血を促すかについては不明であった。造血成長因子の一つである Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)は、主に Neutrophils, Ly6C^{high} monocytes, Macrophages といった myeloid cell の分化、増殖などに関与していることが報告されているが、MI 後心不全における役割は、いくつか相反する報告があるものの、詳細に検討されていなかった。今回我々は、GM-CSFに着目し、心筋梗塞後組織障害、及び心不全における役割を検討した。

＜研究方法＞GM-CSF ノックアウト(Csf2KO)マウス、及び GM-CSF receptor ノックアウト(Csf2rbKO)マウス（これらの遺伝子改変マウスは、定常状態では骨髄の細胞数や細胞分画が野生型と変化がない）、及びコントロールとして野生型マウスを用い、研究を行う。MI 後表現型の主な readout として、生存率、梗塞部における炎症性サイトカインの遺伝子発現、組織学的評価、心機能の評価を用いる。マウスの心臓、骨髄から細胞を抽出し、フローサイトメトリー法により、それぞれの臓器に存在する細胞分画の評価を行う。

＜研究結果＞野生型と比較し、Csf2KO マウスでは MI 後の生存率が改善し、梗塞部位への day 3 における neutrophils, Ly6C^{high} monocytes, day 7 における Macrophages の浸潤が有意に減少していた。それに伴うように IL-1 β 、IL-6、MMP-9 などの炎症性サイトカインの発現は KO マウスで減少し、心臓 MRI を用いて評価した心機能も改善していることが明らかとなった。Csf2 の遺伝子発現を各組織で時系列を追って検討すると、梗塞部で MI 後早期に上昇していた。GM-CSF の産生細胞をフローサイトメトリー法、及び RTPCR で検討すると、心臓線維芽細胞であることが明らかとなった。ヒトの autopsy の検体を用いて評価したところ、GM-CSF 陽性細胞は MI 後早期の梗塞部位で増加しており、線維芽細胞のマーカーである Vimentin と共染色されることが示された。また、GM-CSF の線維芽細胞からの産生は、いくつかの Toll-like receptor を介していることが明らかとなった。梗塞部位局所での GM-CSF の役割を検討するために Ly6C^{high} monocytes を組織ヘリクルートする主要なケモカインである CCL2 に着目すると、GM-CSF が CCL2 の主な産生細胞である Ly6C^{high} monocytes と Macrophages に作用して、その発現を亢進させ、血中の Ly6C^{high} monocytes のリクルートメントを促進することが、in vitro、及び in vivo の実験で明らかとなった。さらに、GM-CSF は主に Neutrophils, Ly6C^{high} monocytes, Macrophages といった GM-CSF receptor を発現している細胞を刺激し、IL-1 β 、IL-6、MMP-9 などの遺伝子発現を更新させていることを、遺伝子解析、ex vivo imaging で明らかにした。次いで、GM-CSF の骨髄での役割を検討した。マウス MI 後、血清中の GM-CSF の濃度は増加するが、GM-CSF が骨髄に到達し、造血を促すことをパラビオーシスの実験を用いて示した。その機序として、GM-CSF が骨髄中の myeloid cell への分化に重要な multi-potent progenitor 3 (MPP3)という特異的な stem progenitor サブセットに作用し、MI 後の造血を促していることが、in vitro、in vivo の実験で明らかとなった。実際に Csf2KO、Csf2rbKO マウスでは、MI 後骨髄中の Neutrophils や Ly6C^{high} monocytes の数が野生型と比較して減少していた。最後に、野生型マウスに MI を作製後、抗 GM-CSF 中和抗体と Control IgG を投与する 2 群にランダムに分けて、MI 後の生存率の検討を行ったところ、抗 GM-CSF 中和抗体投与群で生存率が改善することが明らかとなった。

＜結論＞GM-CSF はその局所での作用、並びに全身における作用により過剰な炎症を引き起こし、MI 後の組織障害を進展させ、心不全を増悪させ得る主要な原因因子の一つと考えられた。GM-CSF を標的とした治療が、梗塞後心不全患者に対する新規治療法になり得ると考えられた。