

Title	新規心不全治療法確立のための梗塞後心不全発症の分子メカニズムの解明
Author(s)	榎本, 大智
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61695
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (榎本 大智)

論文題名 新規心不全治療法確立のための梗塞後心不全発症の分子メカニズムの解明

論文内容の要旨

【 背景 】

心血管疾患は、先進国における死因別死亡率の上位に位置している。急性期に救命された症例が、慢性期に梗塞後心不全を発症していることから、亜急性期および慢性期における新規治療法の確立が急務だといえる。その中でも、亜急性期における炎症制御の詳細については、不明な部分が多く残されており、炎症制御を目的とした心疾患治療法の確立は未だ成功していない。このことから、炎症制御による治療を確立するには、まだ明らかにされていない個々の炎症関連細胞の機能や役割を明らかにしていく必要があると考えられる。

一方で、心筋梗塞慢性期においては、残存する心筋細胞を保護することが重要な治療戦略の一つと考えられており、その重要な標的として、心筋細胞におけるSTAT3分子が挙げられる。これまで、心臓の急性傷害時における検討は報告されているが、心筋梗塞慢性期については検討がなされていなかった。梗塞後心不全に対する長期予後の改善を目指した治療法の開発を行うためには、心筋細胞内STAT3の心筋梗塞慢性期における病態学的意義を含めたより詳細な機能解明が必要だと考えられる。

以上の背景から、本研究では、マウス心筋梗塞 (MI) モデルを用い、炎症関連細胞であるROR γ t陽性細胞の心筋梗塞亜急性期における機能解析と、慢性期における心筋細胞内STAT3の病態学的意義の解明の二つの検討を行った。

【 方法・結果 】

・心筋梗塞亜急性期におけるROR γ t陽性細胞の機能解析

心筋梗塞後の病態形成におけるROR γ t陽性細胞の関与を探るため、C57BL/6 JマウスにMIを施した後、梗塞心におけるmRNA発現量を定量的RT-PCR法により経時的に評価した。その結果、ROR γ t、IL-17A mRNA発現は、MI後1日目から増加し、7日目に最大となった。さらに、ROR γ tに対する免疫組織化学染色を行った結果、梗塞心の境界領域において、ROR γ t陽性細胞の浸潤が確認された。次に、MI後のROR γ t陽性細胞の動態と、その細胞種について検討するため、脾臓中の白血球をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、脾臓中のROR γ t陽性細胞の数は、MI後1日目から減少していることが明らかとなった。また、細胞マーカーによる解析の結果、脾臓から減少しているROR γ t陽性細胞は、主として γ δ T細胞であることが示された。

次に、MI後の病態形成におけるROR γ t陽性細胞の役割を明らかにするため、ROR γ tヘテロ欠損 (ROR γ t $^{-/-}$) マウスにMIモデルを作製し、検討を行った。その結果、ROR γ t $^{-/-}$ マウスにおけるMI後の生存率および心機能は、WTマウスに比べ、有意に悪化することが明らかとなった。さらに、MI後7日目の梗塞心にマッソントリクローム染色を施した結果、ROR γ t $^{-/-}$ マウスの線維化領域および線維化周囲長は、WTマウスに比べ、有意に増大していることが確認された。また、梗塞心における炎症関連分子のmRNA発現を定量的RT-PCR法を用いて解析した。その結果、ROR γ t $^{-/-}$ マウスにおいて、ROR γ t、IL-17A、IL-17F、IL-23R mRNA発現の有意な減少が確認されたが、その他の炎症性または抗炎症サイトカインについては、有意な変化は認められなかった。最後に、梗塞心における血管密度を免疫組織化学染色法により評価した。その結果、ROR γ t $^{-/-}$ マウスの血管密度は、WTマウスに比べ、有意に減少していることが明らかとなった。

・心筋梗塞慢性期における心筋細胞内STAT3の病態学的意義の解析

心筋梗塞後の心筋細胞内STAT3の内在的活性化について検討するため、C57BL/6 JマウスにMIを施し、梗塞心におけるSTAT3の活性化をウェスタンブロッティング法により経時的に評価した。その結果、活性化STAT3は、MI後1日目から増加し、その活性化はMI後10日目においても継続していた。

次に、心筋梗塞慢性期における心筋細胞内STAT3の病態学的意義を明らかにするため、タモキシフェン誘導性心筋特異的STAT3欠損 (STAT3 iCKO) マウスにMIモデルを作製し、検討を行った。本研究では、MI後11日目から24日目までタモキシフェンを腹腔内投与することで、心筋梗塞亜急性期以降において心筋細胞内STAT3を欠損させた。生存率解析および心エコー検査の結果、タモキシフェン投与後のSTAT3 iCKOマウスにおける生存率および心機能は、controlマウス比べて有意に低下することが明らかとなった。さらに、マッソントリクローム染色の結果より、STAT3 iCKOマ

ウスの梗塞心では、線維化周囲長の増大に加え、心壁厚の菲薄化が認められた。また、線維化関連遺伝子の発現を定量的RT-PCR法により測定した結果、STAT3 iCKOマウスの梗塞心において、MMP-9、Procollagen 1、Procollagen 3 mRNA発現の有意な増加が認められた。次に、MI後24日目の梗塞心に対してDHE染色を行い、ROS産生について検討した。その結果、STAT3 iCKOマウスの心筋細胞内におけるROS産生が、controlマウスに比べ、有意に上昇していることが明らかとなった。最後に、MI後の血管密度について免疫組織化学染色法およびヘマトキシリン&エオシン染色法を用いて評価した。その結果、STAT3 iCKOマウスの梗塞心では、controlマウスに比べ、血管密度の有意な減少が認められ、そのメカニズムは、血管新生抑制因子の発現上昇を伴った心筋肥大の亢進であることが明らかとなった。

【 考察・結論 】

本研究では、心筋梗塞病態に対し、亜急性期については炎症関連細胞におけるROR γ t、慢性期については心筋細胞内におけるSTAT3に焦点をあて、心筋梗塞および梗塞後心不全における病態制御メカニズムの一端を解明した。

心筋梗塞後に浸潤するROR γ t陽性細胞に対する検討により、ROR γ t陽性細胞は組織保護に寄与しており、その主たる細胞種は $\gamma\delta$ T細胞であることが示された。これらの結果により、ROR γ t陽性細胞を標的とした、炎症制御による新規治療法の確立が期待される。しかし、安全で有効な治療法を開発するためには、心保護作用を有した炎症関連細胞の活性化を特異的に誘導する方法や、組織損傷につながる炎症反応の制御など、臨床応用に向けたさらなる取り組みが必要だと考えている。

心筋細胞内STAT3の活性化が、心筋組織の急性傷害に対し心保護作用を示すことは、既に明らかとなっていたが、慢性期の病態に与える影響については、検討されていなかった。本研究において、心筋梗塞慢性期における心筋細胞内STAT3の欠損は、心筋梗塞病態の悪化を引き起こした。これらの結果は、心筋梗塞慢性期において、心筋細胞内STAT3が、心保護作用を有することを明らかにした新たな知見である。

今後、さらなる検討を深めることで、新たな治療戦略として、炎症関連細胞やサイトカインを標的とした炎症制御治療や、心筋細胞内STAT3を介した心保護治療の確立が成功することを願うと共に、本研究結果がその一助となることを期待している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (榎本 大智)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 藤尾 慈 副 査 教授 上島 悦子 副 査 教授 中川 晋作
論文審査の結果の要旨	
<p>心筋梗塞後の心不全発症機構に関しては、これまで梗塞後急性期の心筋傷害に着目した研究が多くを占めていた。本論文は、心筋梗塞後亜急性期、慢性期に心筋保護を担うシグナル伝達分子を新たに同定したものである。</p> <p>具体的には、梗塞後亜急性期においては、梗塞後心筋組織に浸潤する$\gamma\delta$T細胞に発現するRORγt分子が、血管新生を介して心筋リモデリングを抑制することを見出した。これまで、当該分子が心筋リモデリングに関与することを報告した研究はなく新規性が高い。また、梗塞後慢性期においては、STAT3分子に注目して研究を行った。STAT3に関しては、慢性期の人為的な活性化が心筋に傷害を与えるとの報告もあり、その意義に関して統一した見解が得られず問題となっていた。本研究は、極めてエレガントな手法で、梗塞後慢性期におけるSTAT3の心筋保護作用を示し、上記の問題を解決した。</p> <p>以上、本研究論文は、多角的な観点から、これまで知られていなかった心不全発症機構を解明した論文と結論づけられることにより、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。</p>	