The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	免疫学的監視機構による梗塞後心筋細胞死誘導機構の解明と新規心不全治療法の開発
Author(s)	松本, 浩太朗
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72333
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

2018 年度（平成 30 年度）博士学位論文

免疫学的監視機構による梗塞後心筋細胞死誘導機構の解明と新規心不全治療法の開発

大阪大学大学院　薬学研究科　創成薬学専攻

臨床薬効解析学分野　松本浩太朗

目次

略語一覧 ・・・

略語一覧

ABC: avidin-biotin-complex

α-MHC: α-myosin heavy chain

β-gal: β-galactosidase

BSA: bovine serum albumin

ChIP: chromatin immunoprecipitation

EF: ejection fraction

FACS: fluorescence-activated cell sorter

FS: fractional shortening

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GPI: glycosylphosphatidylinositol

H60: histocompatibility 60

HF: heart failure

Hif-1: hypoxia-inducible factor-1

HR: heart rate

JAK: janus kinase

MACS: magnetic activated cell sorting

MI: myocardial infarction

MIC: major histocompatibility complex I chain–related molecule

MOI: multiplicity of infection

MULT1: UL16-binding protein-like transcript 1

NKG2D: natural killer group 2 member D

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

PI3K: phosphoinositide-3-kinase

Rae-1: retinoic acid early induced transcript-1

ROS: reactive oxygen species

STAT: signal transducer and activator of transcription

TCR: T cell receptor

TG: transgenic

ULBP: UL16-binding protein

VEGF: Vascular endothelial growth factors

WT: wild type

緒論

心筋梗塞 (MI) は、心不全 (HF) 発症の主たる原因の一つである。医学の目覚ましい進歩にも関わらず、その予後の悪さから、MI 後心不全に対する新規治療標的の探索が必要不可欠である。心筋細胞死は心不全発症に大きく寄与していることが知られている[1, 2]が、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。従来、心筋細胞死は、活性酸素種 (ROS) 産生や Ca^{2+}過負荷によって細胞内シグナルが活性化し、細胞自律的に引き起こされると考えられてきた[3-5]。一方、近年、心血管疾患と免疫・炎症反応の密接な関係が報告されている。MI 急性期にはマクロファージや好中球が心臓組織に浸潤し、炎症反応を引き起こす[6, 7]。その後、炎症反応により活性化された線維芽細胞が、心筋細胞の脱落によってできたスペースを埋め合わせる[8, 9]が、線維芽細胞は心筋細胞のような収縮力を有していないため、慢性期の心リモデリングへと繋がる[10, 11]。この一連の過程において、免疫細胞がどのように心筋細胞死を誘導するのか明らかにされておらず、このメカニズムを解明することで、免疫反応の制御を機序とした新規心不全治療法の開発に繋がる可能性がある。

生体内には免疫学的監視機構という異物排泄機構が備わっている[12, 13]。この機構では、NK 細胞や γδT 細胞といった細胞傷害性免疫細胞が、癌細胞やウイルス感染細胞を認識し、細胞死を誘導する。細胞死誘導過程においては、細胞傷害性免疫細胞上に発現している活性化受容体、Natural killer group 2 member D (NKG2D) が、癌細胞やウイルス感染細胞上に発現する NKG2D リガンド (NKG2DL) に結合し、パーフォリン・グランザイム B を放出することでアポトーシスを誘導することが報告されている[14-16]。NKG2DL は、正常細胞ではほとんど発現が認められないが、癌発症時やウイルス感染時に発現誘導される。

心筋細胞と癌細胞は、増殖・分化の観点からは正反対の性質を有する。一方、細胞保護や血管新生シグナルに関しては共通性が見受けられる。例えば、ストレス時に心筋細胞において活性化される Janus kinase (JAK)/Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)、Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt シグナルは、癌細胞においても、細胞保護効果をもたらす。また、JAK/STAT シグナル、Vascular endothelial growth factors (VEGF)/Akt シグナルは、心筋細胞及び癌細胞に共通の血管新生シグナルである。

本研究では、癌細胞と虚血等のストレス条件下において傷害を受けた心筋細胞で活性化するシグナルに上記のような共通性を見出し、免疫学的監視機構が心筋細胞死誘導にも関与している可能性を想起した。即ち、心筋細胞が虚血等のストレス下に置かれた際、細胞表面に NKG2DL が発現し、これを認識した免疫細胞によって心筋細胞死が誘導されるという、NKG2D/NKG2DL 相互作用を介した細胞非自律的な細胞死を想起した。そこで、本研究では、新規心筋細胞死機構の解明を目指し、免疫細胞と心筋細胞の相互作用という観点から細胞死について追究した。

方法

動物実験

全ての動物実験は、大阪大学大学院薬学研究科動物委員会及び理化学研究所神戸キャンパスによるガイドラインに従って行われた。実験には 8-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用し、$p53^{-/-}$マウスは理研バイオリソース研究センターから購入した [17]。解析時にはイソフルランを用いて安楽死させ、マウスに与える苦痛を最小限にした。

心筋細胞特異的トランスジェニック (TG) マウス (CAG/CATZ/Rae-1ε (Retinoic acid early induced transcript-1ε) マウス) の作製は、理化学研究所に依頼した [18]。実験では 2 ラインの解析を行い、同様の結果を得た。心筋細胞特異的 Rae-1ε 過剰発現マウスは、CAG/CATZ/Rae-1ε マウスを α-myosin heavy chain (α-MHC)-MerCreMer マウスと交配し、タモキシフェン (8μg/g/day) を 14 日間連続で腹腔内投与することにより得た。なお、α-MHC-MerCreMer マウスは、Jeffery Molkentin 先生 (Cincinnati Children's Hospital Medical Center and Howard Hughes Medical Institute) より提供して頂いた。

MI モデルの作製は、既報に準じ、左室前下行枝を結紮することで作製した [19]。

抗 Rae-1ε 阻害抗体を用いた実験では、マウスをランダムに 3 グループ (Phosphate buffered saline (PBS) 投与群、control IgG 投与群、抗 Rae-1ε 阻害抗体投与群) に振り分け、MI 手術を施した。その後、PBS、control IgG 抗体、抗 Rae-1ε 阻害抗体を MI 後 1 日目と 7 日目に腹腔内投与した。

定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR は、心臓組織あるいは培養心筋細胞から RNA を QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を用いて抽出後、SYBR green system (Applied Biosystems) を用い、添付のプロトコルに従って行った。使用したプライマーの配列は Table 1 に示す。

免疫組織化学

MI3 日目に心臓組織を回収し、O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan) で凍結した。凍結ブロックは Leica CM 1950 (Leica) で 5μm 厚の切片にし、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定、3%ウシ血清アルブミン (BSA) でブロッキングした。切片は Avidin-biotin-complex (ABC) 法により染色し、同時に核と細胞質をヘマトキシリンとエオジンでそれぞれ染色した。

蛍光免疫染色では、単離心筋細胞を 4% PFA で固定した後、透過処理を施した。その後、抗 α-actinin 一次抗体及び Alexa Fluor 488/546 標識二次抗体を用いて染色した。核は Hoechst で染色し、染色画像は FSX-100 (Olympus) で撮影した。使用した抗体は Table 2 に示す。

組織学的評価

MI14 日目のマウスから心臓を回収後に作製した凍結切片 (5μm厚) をアセトンで固定し、マッソントリクローム染色を行った。左室に対する線維化領域の面積比及び周囲長比は Image J software (National Institutes of Health) で測定した。梗塞壁厚は梗塞領域の異なる 3 点で測定し、平均した。

MI 後マウスからの心筋細胞単離

心筋細胞は既報に従って単離した [20]。心臓組織を還流し、0.05%コラゲナーゼ B 及び D (Roche) と 0.04%プロテアーゼ XIV (Sigma) で酵素処理した。細胞懸濁液は 200μm セルストレイナーで濾過し、続いて 40μm セルストレイナーで濾過した。40μm セルストレイナー上に残った細胞を心筋細胞として使用した。なお、心筋細胞の純度は約 70〜80%である。

ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは既報に従って行った [21]。使用した抗体は Table 2 に示す。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

MI 後 3 日目に心臓組織を回収し、Simple ChIP Kit (Cell Signaling Technology) を用いて ChIP アッセイを行った。手順は添付のプロトコルに従った。使用したプライマーの配列は Table 3 に示す [22]。

フローサイトメトリー (FACS)

MI4 日目あるいは 7 日目のマウスにヘパリンナトリウム (50U/mouse) (WAKO) を腹腔内投与し、梗塞心を回収後、PBS と 0.025%コラゲナーゼ溶液 [0.0125%コラゲナーゼ B、0.0125%コラゲナーゼ D、0.002%プロテアーゼ XIV] で還流した。その後、心臓組織を細かく刻み、37℃の 0.1%コラゲナーゼ溶液 [0.05%コラゲナーゼ B、0.05%コラゲナーゼ D、0.002%プロテアーゼ XIV] で酵素処理した。得られた細胞は 70μm セルストレイナーで濾過し、3% FBS を含んだ PBS で懸濁し、さらに 40μm セルストレイナーで濾過した。PE あるいは FITC 標識抗体を加えた後、FACS Aria II (BD Biosciences) 及び BD FACS Diva software (BD Biosciences) で解析した。使用した抗体は Table 2 に示す。

細胞培養

新生仔ラット心筋細胞は既報に従って準備した [21]。初代培養 24 時間後、p53 アデノウイルスベクターを 10 multiplicity of infection (MOI) で感染させた。

in vitro 細胞死アッセイでは、心筋細胞を Rae-1ε あるいは β-ガラクトシダーゼ (β-gal) アデノウイルスベクターで感染させた後、γδT 細胞と 24 時間共培養した。

アデノウイルスベクター

Rae-1ε を発現するアデノウイルスベクターは既報に従って作製した[21]。また、p53 を発現するアデノウイルスベクターは、坂東泰子先生より提供して頂いた[23]。

パーコール法と磁気細胞分離 (MACS) 法

Cell Separation Magnet (BD Biosciences) を用いて、MACS 法により、γδT 細胞を単離した。脾臓をすり潰し、70μm セルストレイナーで濾過後、Lysing buffer (BD Bioscience) で赤血球を取り除いた。その後、40/80%パーコールバッファー (GE Healthcare) に懸濁し、25 分間遠心分離を行った。白血球を多く含む 40%と 80%パーコールバッファーの間の層を回収し、Fc 受容体をブロッキングし、BD IMag™ Buffer (BD Biosciences) に懸濁、ビオチン化抗体を添加した。インキュベート後、Streptavidin Particles Plus-DM (BD Biosciences) と反応させ、磁石により回収した。

TUNEL 染色

アポトーシス陽性心筋細胞は、In Situ Apoptosis Detection Kit (Takara) を用いて検出した。心臓凍結切片を 4% PFA で固定後、3% BSA でブロッキングし、DNA ニックをラベリングした。抗 α-MHC 一次抗体、Alexa Fluor 546 標識二次抗体で共染色し、TUNEL 及び α-MHC 陽性細胞をアポトーシス陽性心筋細胞として計測し、心臓組織 $1mm^2$ あたりのアポトーシス陽性心筋細胞数を算出した。

心機能評価

1.5%イソフルランで麻酔を施した後、iE33 (Philips) の M モードを使用し、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室短縮率及び心拍数を盲検下で測定した。

重量解析

MI14 日目のマウスから心臓及び肺を回収し、重量を測定後、体重に対する各臓器重量の比率を測定した。

統計解析

二群間の比較は Student's *t* 検定によって行い、他群間の比較は One-way ANOVA 後、Dunnet あるいは Tukey-Kramer 検定で行った。$P<0.05$ を有意水準とし、データは平均値 ± 標準偏差で示した。

Table 1. PCR primers used in the present study

Gene	Direction	Sequence
Rae-1 (α, β, γ, δ, ε)	forward	5'-GCTGTTGCCACAGTCACATC-3'
	reverse	5'-CCTGGGTCACCTGAAGTCAT-3'
Rae-1δ	forward	5'-CAGCAGATGAAGTGAAGTGC-3'
	reverse	5'-CATCCATTTTCTGACTGCATCC-3'
Rae-1ε	forward	5'-GCCACAGTCACATCTGTCAG-3'
	reverse	5'-GGTTGTGTCAAACATTTGCCAG-3'
MULT1	forward	5'-CAATGTCTCTGTCCTCGGAA-3'
	reverse	5'-CTGAACACGTCTCAGGCACT-3'
H60	forward	5'-GGACAGTGCTCAGTGAATGG-3'
	reverse	5'-TGGCCCAGAATCCATCAATG-3'
GAPDH	forward	5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'
	reverse	5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
p53	forward	5'-CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT-3'
	reverse	5'-AGCTGGCAGAATAGCTTATTGAG-3'
NKG2D	forward	5'-CCCTTCTCACCACCAGTTAA-3'
	reverse	5'-CCAATCAGGGTCAGGACAAG-3'
Perforin	forward	5'-GTACAGTTTTCGCCTGGTAC-3'
	reverse	5'-GATAAAGTGCGTGCCATAGG-3'
Granzyme B	forward	5'-CCACTCTCGACCCTACATGG-3'
	reverse	5'-GGCCCCCAAAGTGACATTTA-3'
Rae-1ε TG genotyping	forward	5'-TTGGATCCGGAACCCTTAAT-3'
	reverse	5'-CCCCTGAACCTGAAACATAA-3'
MICA/B	forward	5'-CTGGCATCTTCCCTTTTGCA-3'
	reverse	5'-TTTCCGTTCCCTGTCAAGTC-3'
ULBP1	forward	5'-TTAACCACAAGGCCAAAGCC-3'
	reverse	5'-CATGGGCTTCATGCTCACAA-3'
ULBP2/5/6	forward	5'-TAAATGTCACAACGGCCTGG-3'
	reverse	5'-TCTGTCCATCGAAACTGAGC-3'
ULBP3	forward	5'-CAGCTGTATGCCACAGATGC-3'
	reverse	5'-GAACTTCCGTCCATCGAAGC-3'
ULBP4	forward	5'-CAGTGATCCTTCCACTCTGC-3'
	reverse	5'-AGTCTCCCTTTGAGAGCTTC-3'

Table 2. Antibodies used in the present study

Target	Manufacturer	Cat. #
Rae-1 (α, β, γ, δ, ε)	R&D systems	MAB17582
α-actinin	Sigma-Aldrich	A7811
p53	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
p53	Cell Signaling Technology	2524
GAPDH	Millipore	MAB374
CD16/32	BioLegend	101302
CD49b-PE	BioLegend	108907
γδTCR-PE	BioLegend	118107
NKG2D-FITC	BioLegend	115711
γδTCR-biotin	eBioscience	13-5711-82
Rae-1ε	R&D systems	MAB1135
α-MHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-20641
cleaved caspase3	Cell Signaling Technology	9664

Table 3. Primers used in the ChIP assay

Primer 1	forward	5'-GACCTTGCTCTTGCTCTGTT-3'
	reverse	5'-TGCTGAGCCTTCTTCTAGTC-3'
Primer 2	forward	5'-AGGCTAAGCAAGTCATGAGG-3'
	reverse	5'-CTCCTAGATGGCTCCTAGCA-3'
Primer 3	forward	5'-CTGCTAGGAGCCATCTAGGA-3'
	reverse	5'-TGATCCACAGAGATCTGCTC-3'
p53-binding site of p21 gene	forward	5'-CAAGCCCTTCCCAGACTTCC-3'
	reverse	5'-TCTAGAGATCGCTGCCCAGA-3'

結果

心筋梗塞後の心筋細胞において Rae-1 が発現上昇した

C57BL/6J マウスに MI 手術を施し、NKG2DL の心臓における発現を検討した。マウス NKG2DL は Rae-1、UL16-binding protein-like transcript 1 (MULT1) (Swiss Prot ID MULT1: Q330P3)、histocompatibility 60 (H60) (Swiss Prot ID H60a: Q3TDZ7, H60b: B1B212, H60c: B1B213) の 3 つのファミリーから構成されるが、このうち Rae-1 の発現上昇が最も顕著であった (Figure 1A)。定量的 RT-PCR により Rae-1 mRNA を測定したところ、MI 後 3〜4 日目をピークに、24.7±8.6 倍に発現上昇した (Figure 1B)。Rae-1 ファミリーは Rae-1α〜Rae-1ε (Swiss Prot ID Rae-1α: O08602, Rae-1β: O8603, Rae-1γ: O8604, Rae-1δ: Q9JI58, Rae-1ε: Q9CZQ6) の 5 つのアイソフォームで構成され、このうち、Rae-1δ と Rae-1ε は C57BL/6J マウスで、残りの Rae-1α、β、γ は Balb/c マウスで発現することが報告されている [15]。どのアイソフォームが梗塞後心臓組織において発現誘導されるか検討するために、各リガンド特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、Rae-1δ と Rae-1ε 共に発現上昇が認められた (Figure 1C) が、NKG2D 受容体に対する親和性の高さ [16] から Rae-1ε に着目して研究を進めた。抗 Rae-1 抗体を用いて心臓組織を免疫染色したところ、Rae-1 は梗塞領域及び境界領域の傷害心筋組織端に局在していることが明らかになった (Figure 1D)。さらに、抗 Rae-1 抗体、抗 α-actinin 抗体、Hoechst を用いた共染色の結果、梗塞心から単離した心筋細胞上に Rae-1 が発現していた (Figure 1E)。Rae-1 を発現した心筋細胞の割合は、non-MI: 0%、MI3d: 13.6% であった。

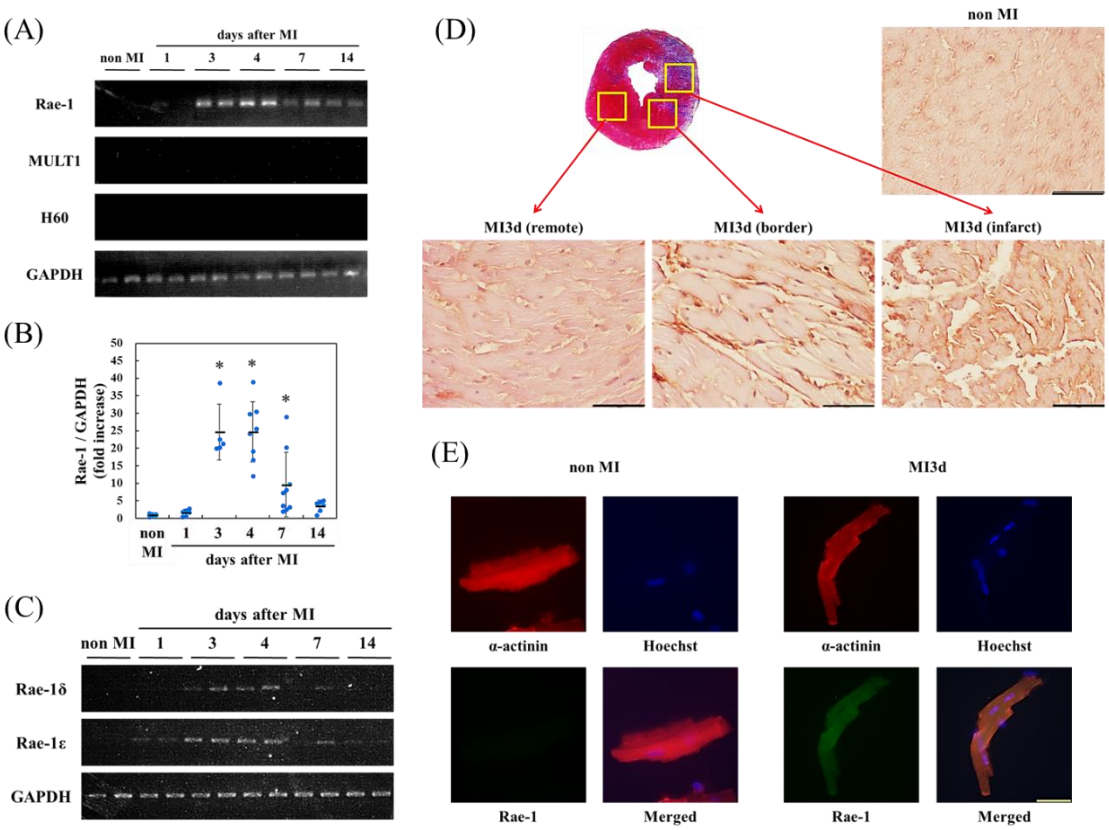

Figure 1. Rae-1 expression was up-regulated in injured cardiomyocytes after MI.

(A) *The expression of NKG2DL mRNA after MI.* Mice were subjected to MI operation, and total RNA was prepared from the murine post-infarct hearts. The expression of Rae-1, MULT1, H60 transcripts was analyzed by RT-PCR. Representative data are shown. (n=5 mice for each time point) (B, C) *The up-regulation of Rae-1 mRNA expression after MI.* Mice were subjected to MI operation, and total RNA was prepared from the murine post-infarct hearts. (B) The expression of Rae-1 transcripts was measured by quantitative RT-PCR and normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 mice for MI3d, n=6 mice for MI1d, 14d, n=7 mice for non-MI, n=8 mice for MI4d, n=9 mice for MI7d) *P<0.05 v.s. non-MI by one-way ANOVA followed by Dunnet test. (C) The expression of Rae-1 isoforms, Rae-1δ and Rae-1ε, was analyzed by RT-PCR. Representative data are shown. (n=5 mice for each time point) (D, E) *Immunohistochemical analysis of Rae-1 expression.* (D) Murine heart sections were prepared 3 days after MI. The sections were stained with anti-Rae-1 antibody. Representative images are shown (Bar; 50μm). (n=5 mice for non-MI and MI3d) (E) Cardiomyocytes were isolated from infarcted heart tissue by Langendorff reflux apparatus, followed by co-staining with anti-Rae-1 and anti-α-actinin antibodies, and Hoechst. Representative images are shown (Bar; 20μm). (n=5 mice for non-MI and MI3d)[24]

Rae-1 は p53 の活性化によって発現誘導された

Rae-1 の発現メカニズムを解明するため、心筋細胞に様々な刺激を加え、検討を行った。炎症反応は心リモデリングと密接に関係しているため、新生仔ラット培養心筋細胞を TNF-α や IL-1β といった炎症性サイトカイン、あるいは LPS で刺激したが、Rae-1 の発現に変化は見られなかった (Figure 2A)。これまでに、p53 の活性化がヒト NKG2DL の一つである UL16-binding protein (ULBP) 2 の発現上昇を引き起こすという報告[25]がされていたため、p53$^{-/-}$マウス及び p53 アデノウイルスベクターを用いて検討を行った。既報通り[26]、p53 mRNA の心臓における発現は MI 後に上昇し、ピーク時で 5.7±2.7 倍になった (Figure 2B)。ウェスタンブロッティングにより p53$^{-/-}$マウスで p53 タンパク質が欠損していることを確認した後、Rae-1 の発現検討を行った結果、p53$^{-/-}$マウスでは野生型 (WT) マウスと比較して、54.7±16.9%の顕著な Rae-1 発現抑制が見られた (Figure 2C, D)。次に、新生仔ラット培養心筋細胞に p53 アデノウイルスベクターを用いて p53 を過剰発現させたところ、p53 の下流分子である p21 と共に Rae-1 の発現上昇が確認された (Figure 2E, F, G)。さらに、p53 が直接 Rae-1 の転写制御を行っているか明らかにするために、ChIP アッセイを行った。Rae-1ε 遺伝子のプロモーター領域に p53 の結合コンセンサス[27]を 3 か所見つけ、このうち 2 か所に p53 が結合していることを確認した (Figure 2H)。

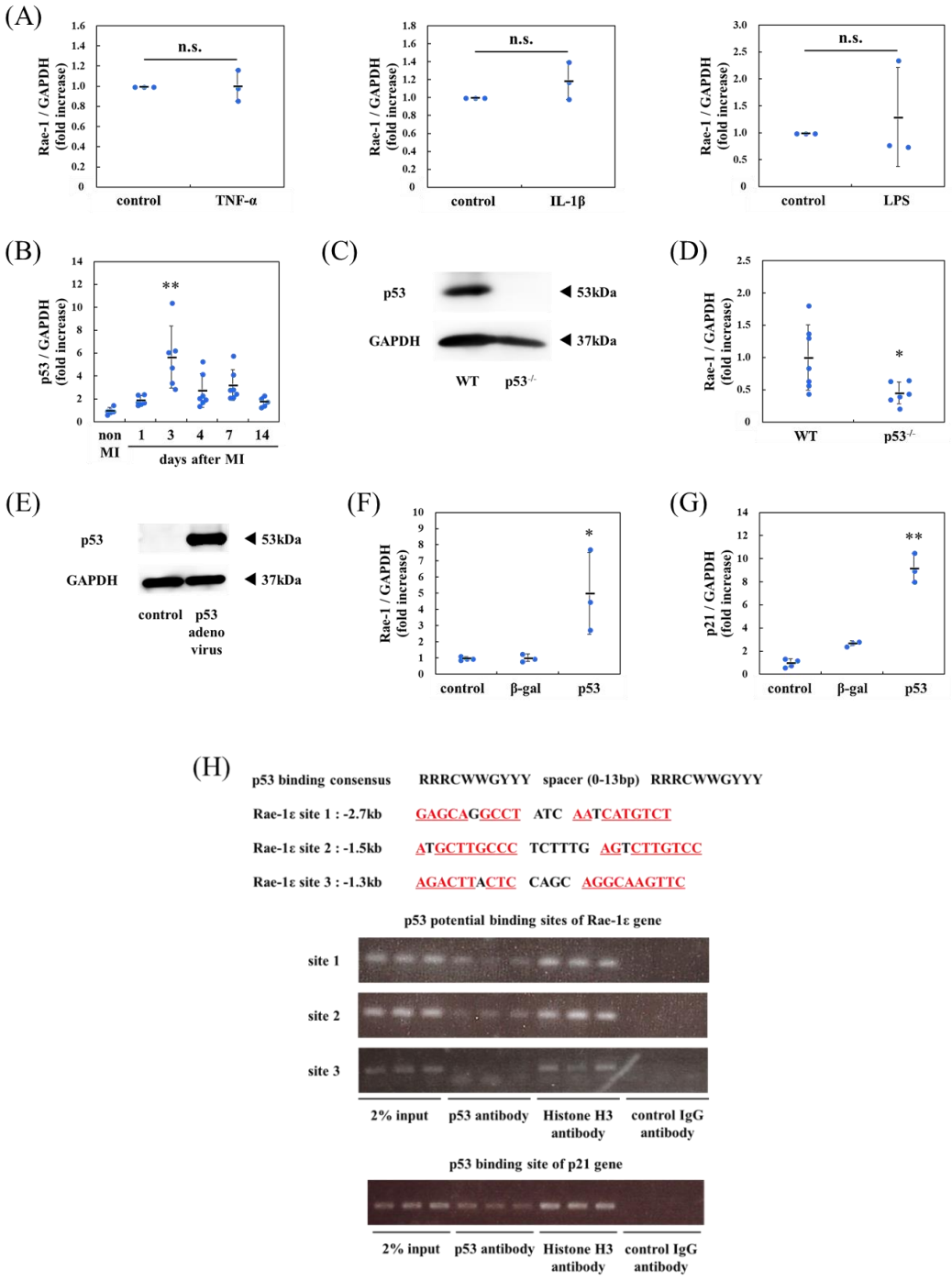
(A)
Rae-1 / GAPDH (fold increase)
n.s.
control
TNF-α
IL-1β
LPS
(B)
p53 / GAPDH (fold increase)
**
non MI
1
3
4
7
14
days after MI
(C)
p53
GAPDH
53kDa
37kDa
WT
p53-/-
(D)
*
(E)
control
p53 adeno virus
(F)
β-gal
(G)
p21 / GAPDH (fold increase)
(H)
p53 binding consensus RRRCWWGYYY spacer (0-13bp) RRRCWWGYYY
Rae-1ε site 1 : -2.7kb GAGCAGGCCT ATC AATCATGTCT
Rae-1ε site 2 : -1.5kb ATGCTTGCCC TCTTTG AGTCTTGTCC
Rae-1ε site 3 : -1.3kb AGACTTACTC CAGC AGGCAAGTTC
p53 potential binding sites of Rae-1ε gene
site 1
site 2
site 3
2% input
p53 antibody
Histone H3 antibody
control IgG antibody
p53 binding site of p21 gene

Figure 2. Rae-1 expression was regulated by p53.

(A) *The effects of proinflammatory cytokines or LPS on Rae-1 expression.* Cultured neonatal rat cardiomyocytes were incubated with cytokines (TNF-α or IL-1β, 100ng/mL) or LPS (1μg/mL) and were harvested after 24 hours. Quantitative RT-PCR was performed for Rae-1 mRNA. The expression of the transcripts was normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=3 for each condition) (B) *The induction of p53 transcripts after MI.* Post-infarct hearts were collected and quantitative RT-PCR was performed to measure p53 mRNA level. The expression of the transcripts was normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 mice for MI14d, n=6 mice for non-MI, MI1d, MI3d, n=7 mice for MI4d, MI7d) **P<0.01 v.s. non-MI by one-way ANOVA followed by Dunnet test. (C, D) *The reduced expression of Rae-1 mRNA in p53$^{-/-}$ mice.* WT mice or p53$^{-/-}$ mice were exposed to MI operation. (C) The lysates from infarcted hearts 3 days after MI were immunoblotted with anti-p53 and anti-GAPDH antibodies. Representative results are shown. (n=6 for p53$^{-/-}$ mice, n=7 for WT mice) (D) Three days after MI operation, total RNA was prepared from WT or p53$^{-/-}$ mice and Rae-1 mRNA level was measured by quantitative RT-PCR. The expression of Rae-1 transcripts was normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=6 for p53$^{-/-}$ mice, n=7 for WT mice) (right) *P<0.05 v.s. WT by Student's *t*-test. (E-G) *The up-regulation of Rae-1 mRNA by p53 adenovirus infection.* (E) The lysates from cultured cardiomyocytes were immunoblotted with anti-p53 and anti-GAPDH antibodies. Representative results are shown. (n=3 for control and p53 adenovirus group) (F, G) The expression of Rae-1 and p21 transcripts was measured by quantitative RT-PCR and normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=3 for each condition) *P<0.05, **P<0.01 v.s. β-gal by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test. (H) *Identification of p53-binding sites in the promoter region of Rae-1ε gene.* Database search pointed out 3 putative binding sites of p53 in *Rae-1ε* gene. Heart tissue was harvested from mice 3 days after MI and ChIP assay was performed using anti-p53 and anti-phospho-histone antibodies and non-immune IgG in triplicate. PCR data are shown. The primers for *p21* gene were used as positive control. (n=3 for each condition)[24]

NKG2D 発現免疫細胞は心筋梗塞後、心臓組織に浸潤した

NKG2DL が MI 後、心筋細胞上に発現誘導されることが示されたため、次に NKG2D^{+}免疫細胞の動態について検討を行った。定量的 RT-PCR により梗塞後心臓組織では MI 後 7 日目をピークに NKG2D mRNA の発現が 12.2±11.0 倍になることが明らかになった (Figure 3A)。NKG2D は NK、NKT、γδT あるいは CD8^{+} T 細胞に発現していることが知られている。FACS により解析したところ、梗塞心において、NKG2D^{+} γδT 細胞は検出できたが、その他の NKG2D^{+}細胞は検出できなかった (Figure 3B)。さらに、免疫学的監視機構において NKG2D^{+}細胞から産生されるパーフォリン及びグランザイム B の mRNA を定量的 RT-PCR で測定したところ、それぞれ 2.2±0.5 倍、23.9±12.5 倍となっていた (Figure 3C, D)。パーフォリン及びグランザイム B はパーコール法及び MACS 法によって濃縮した γδT 細胞で検出され、濃縮前のサンプルではほとんど確認できなかったため、γδT 細胞から産生されていることが明らかになった (Figure 3E)。これらの結果から、梗塞心における NKG2D^{+}免疫細胞は、主に γδT 細胞であることが示唆された。

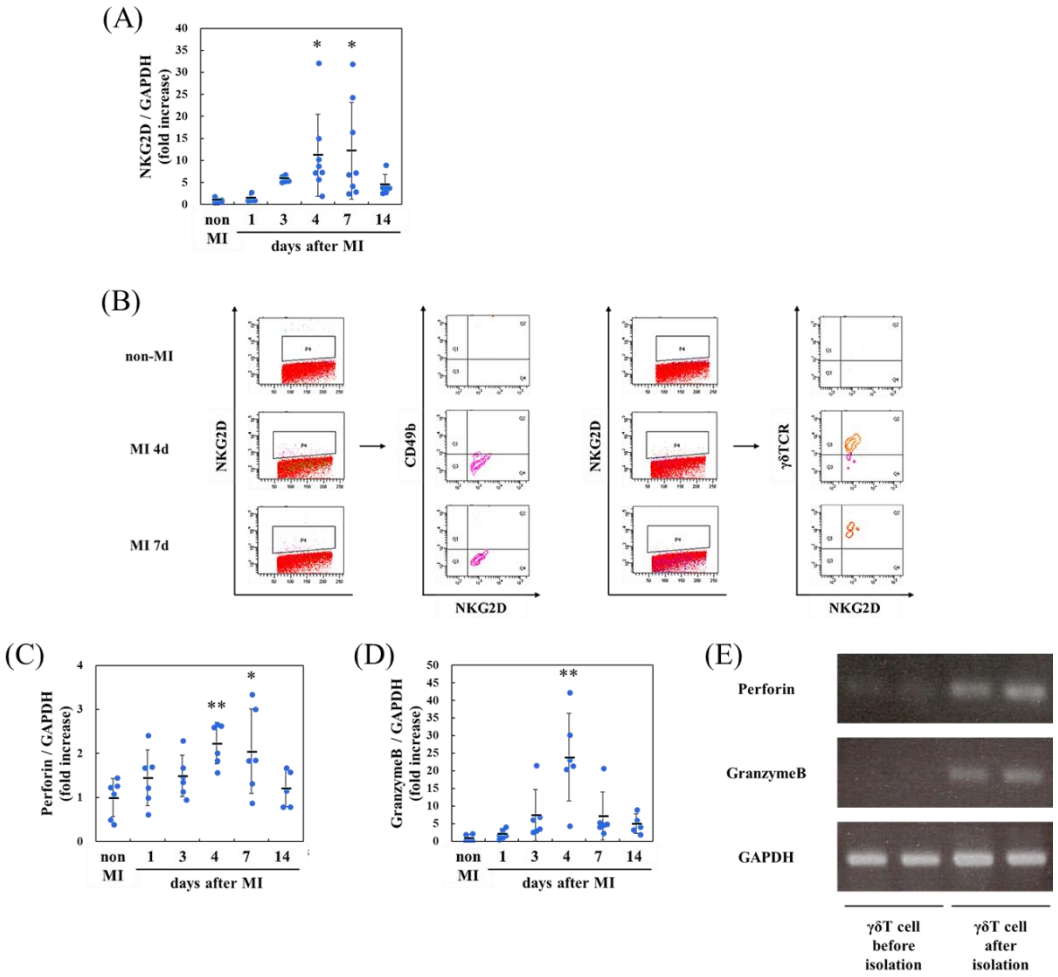

Figure 3. NKG2D-expressing γδT cells infiltrated into the post-infarct heart.

(A) *The expression of NKG2D mRNA in the post-infarct myocardium.* Total RNA was prepared from the murine post-infarct hearts. The expression of NKG2D transcripts was measured by quantitative RT-PCR and normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 mice for MI3d, n=6 mice for MI1d, n=7 mice for non-MI, MI14d, n=8 mice for MI4d, MI7d) *P<0.05 v.s. non-MI by one-way ANOVA followed by Dunnet test. (B) *Identification of NKG2D-expressing cells by flow cytometry.* The infiltrated cells were isolated from infarcted hearts of mice 4 and 7 days after MI. The harvested cells were stained with PE-conjugated anti-CD49b or PE-conjugated anti-γδTCR and FITC-conjugated anti-NKG2D antibodies for flow cytometry. Representative images are shown. (n=3 for each time point) (C, D) *The increased expression of perforin and granzyme B.* Quantitative RT-PCR was performed for perforin and granzyme B at indicated time points after MI. The expression of the transcripts was normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 mice for MI14d, n=6 mice for non-MI, MI1d, MI3d, MI4d, MI7d) *P<0.05, **P<0.01 v.s. non-MI by one-way ANOVA followed by Dunnet test. (E) *Perforin and granzyme B were produced in γδT cells.* Four days after MI, γδT cells were prepared from hearts. The expression of perforin and granzyme B transcripts in the samples before and after γδT cell purification was analyzed by RT-PCR. Representative data are shown. (n=4 for each condition)[24]

NKG2D 発現 γδT 細胞は心筋細胞アポトーシスを誘導した

心筋細胞-γδT 細胞間相互作用の生物学的意義について検討するため、Rae-1ε を過剰発現させた新生仔ラット培養心筋細胞を γδT 細胞と 24 時間共培養し、アポトーシス陽性心筋細胞の割合を測定した。まず、アデノウイルスベクターを用いて Rae-1ε が過剰発現できていることを蛍光免疫染色により確認した (Figure 4A)。また、パーコール法及び MACS 法によって γδT 細胞が濃縮できていることを FACS により確認した (Figure 4B)。幼若な心筋細胞では少し Rae-1 が発現しているため、アデノウイルスベクターを感染させていない群でも γδT 細胞との共培養により 6.1±5.7%のアポトーシス陽性心筋細胞の増加が見られた。Rae-1ε を過剰発現させた場合はさらにアポトーシス陽性心筋細胞の増加が見られ、コントロールである β-gal アデノウイルスベクターを感染させた場合と比較して 16.6±6.9%増加した (Figure 4C, D)。したがって、NKG2D/NKG2DL 相互作用を介して心筋細胞のアポトーシスが誘導されていることが示された。

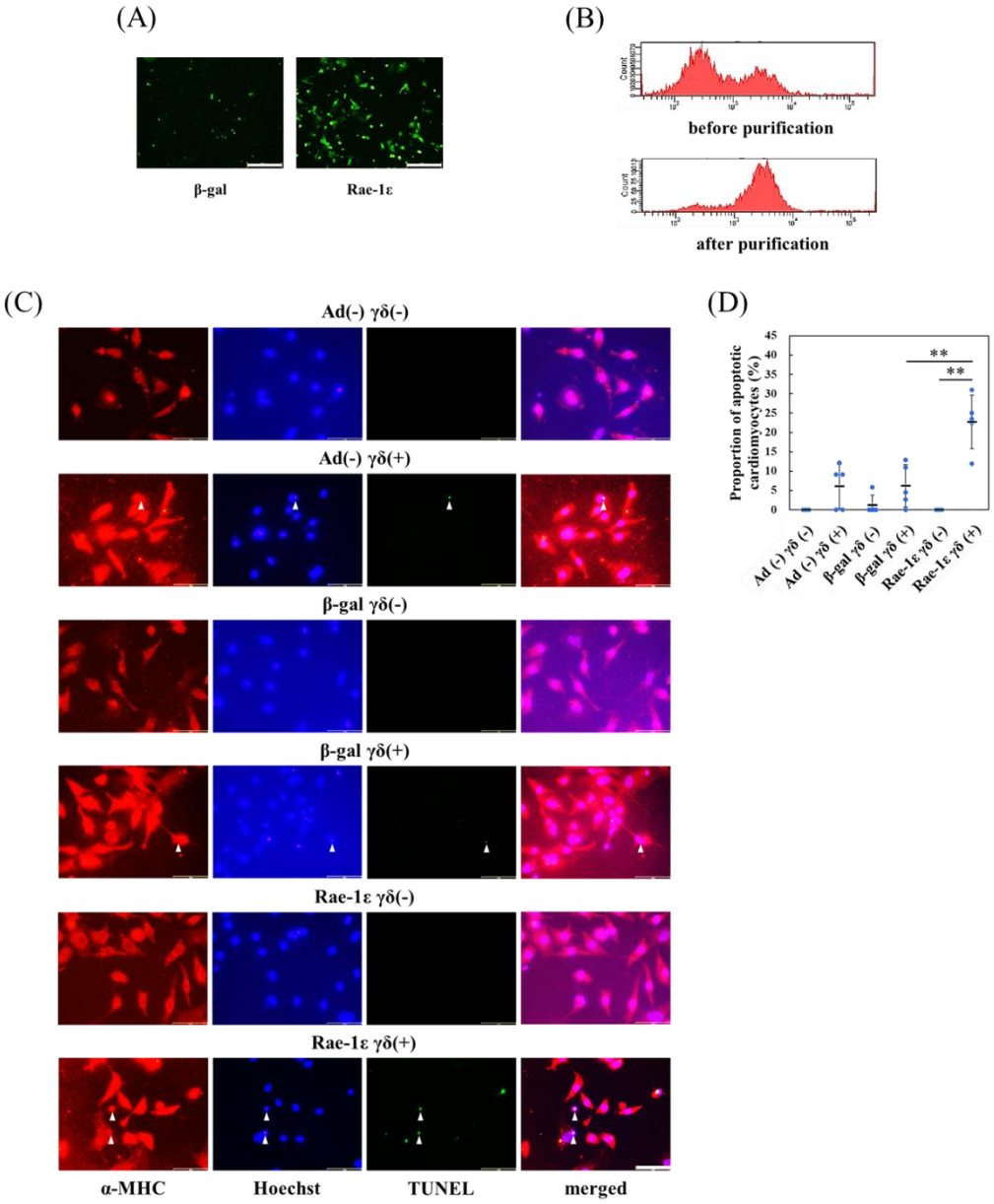
(A)
β-gal
Rae-1ε
(B)
before purification
after purification
(C)
Ad(-) γδ(-)
Ad(-) γδ(+)
β-gal γδ(-)
β-gal γδ(+)
Rae-1ε γδ(-)
Rae-1ε γδ(+)
α-MHC
Hoechst
TUNEL
merged
(D)
Proportion of apoptotic cardiomyocytes (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
Ad (-) γδ (-)
Ad (-) γδ (+)
β-gal γδ (-)
β-gal γδ (+)
Rae-1ε γδ (-)
Rae-1ε γδ (+)

Figure 4. Apoptotic cell death was induced in cultured rat cardiomyocytes by co-culture with γδT cells.

(A) *Adenoviral overexpression of Rae-1ε.* Cultured neonatal rat cardiomyocytes were infected with adenovirus vector expressing Rae-1ε or β-gal, a control, at 10 MOI. Virus-infected cardiomyocytes were immunostained with anti-Rae-1ε antibody. Representative images are shown (Bar; 200μm). (n=4 for each condition) (B) *Preparation of γδT cells by percoll method and MACS.* γδT cells were isolated by percoll method and MACS. Purity of γδT cells was confirmed by flow cytometry. Representative images are shown. (n=4 for each condition) (C, D) *Induction of cardiomyocyte apoptosis by co-culture with γδT cells.* Neonatal rat cardiomyocytes transfected with adenovirus vector expressing Rae-1ε or β-gal, a control, followed by co-culture with γδT cells for 24 hours. TUNEL staining was performed. Cells were also co-stained with anti-α-MHC antibody and Hoechst to identify cardiomyocyte nuclei. (C) Representative images are shown (Bar; 50μm). (D) TUNEL positive cardiomyocytes were counted (α-MHC, Hoechst and TUNEL merged cells). Data are shown as mean ±S.D. (n=5 for each condition) **P<0.01 v.s. β-gal γδ (+), Rae-1ε γδ (-) by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test.[24]

NKG2D/NKG2DL 相互作用阻害により、心筋梗塞後の心筋細胞アポトーシスが抑制された

心リモデリングにおける NKG2D/NKG2DL 相互作用の重要性について in vivo で検討を行うため、抗 Rae-1ε 阻害抗体を用いて NKG2D/Rae-1ε 間の相互作用を阻害した。MI 後 1 日目に抗 Rae-1ε 阻害抗体を腹腔内投与し、3 日目に心臓を回収、解析を行った。コントロールとして抗ラット IgG 抗体を投与し、無処置群には PBS を投与した。アポトーシス陽性心筋細胞の割合を測定するために、TUNEL 染色を行ったところ、TUNEL 陽性細胞は主に境界領域で多く観察された[28]。抗 Rae-1ε 阻害抗体投与群ではコントロール IgG 抗体投与群に比べ、アポトーシス陽性心筋細胞数が減少していた (control IgG 9.1±2.9 cells/mm^2, anti-Rae-1ε antibody 3.5±2.1 cells/mm^2) (Figure 5A, B)。さらに、抗 Rae-1ε 阻害抗体投与による心筋線維化及び心機能への影響を検討した。MI 後 1 日目と 7 日目に抗 Rae-1ε 阻害抗体を腹腔内投与し、14 日目においてマッソントリクローム染色を行った結果、線維化割合、線維化周囲長比が抗 Rae-1ε 阻害抗体投与群で減少していた (fibrotic area: control IgG 43.1±10.0%, anti-Rae-1ε antibody 30.8±8.7%, fibrotic circumference: control IgG 57.3±13.3%, anti-Rae-1ε antibody 42.9±11.3%) (Figure 5C, D, E)。また、左室壁厚も維持されていた (control IgG 0.76±0.21mm, anti-Rae-1ε antibody 1.08±0.23mm) (Figure 5F)。これら組織学的検討と一致して心機能低下も抑制されていた (Table 4)。さらに、重量解析の結果、有意な差は得られなかったものの、抗 Rae-1ε 阻害抗体投与群において心重量・体重比、肺重量・体重比の抑制傾向が見られた (Figure 5G, H, I)。

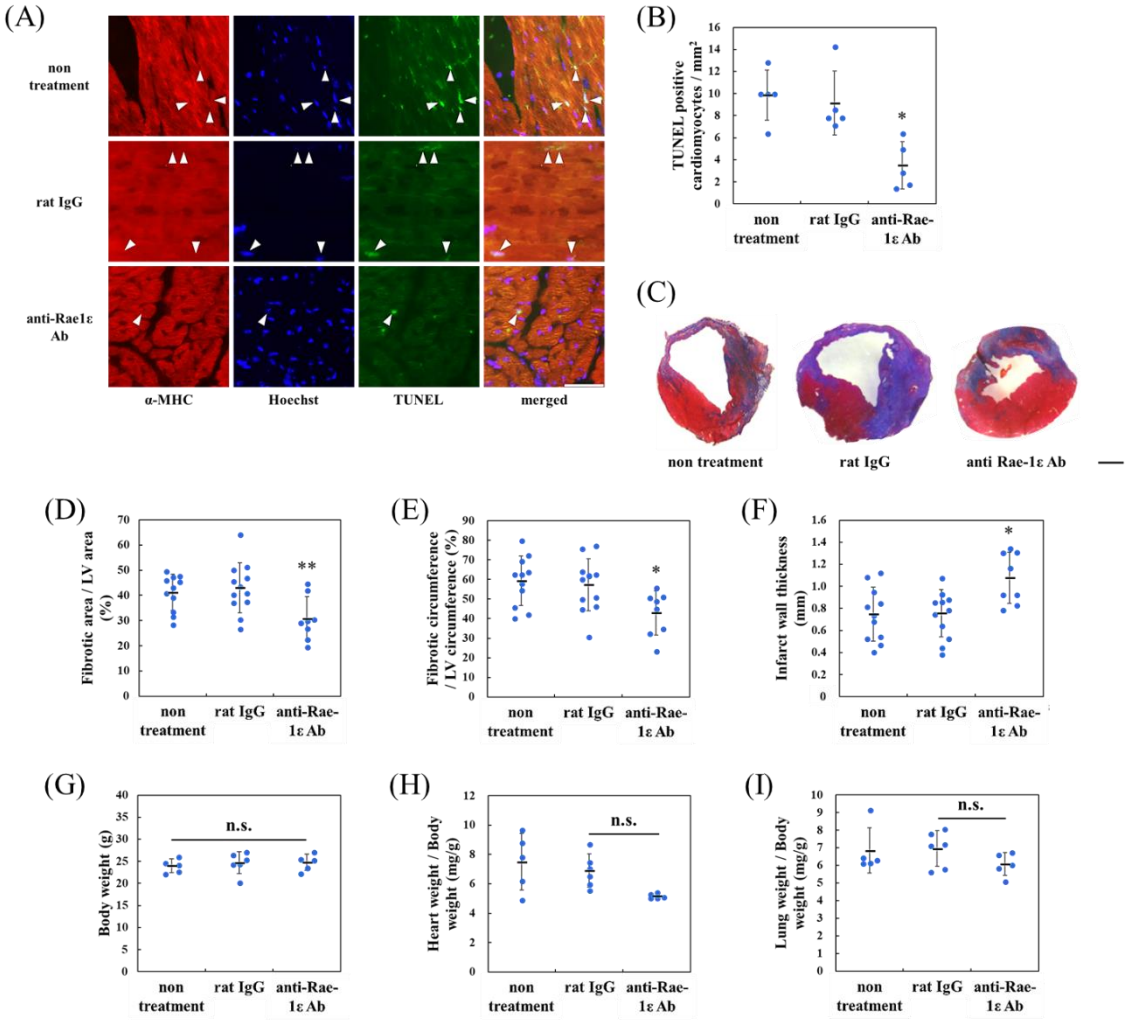
(A)
non treatment
rat IgG
anti-Rae1ε Ab
α-MHC
Hoechst
TUNEL
merged
(B)
TUNEL positive cardiomyocytes / mm²
non treatment
rat IgG
anti-Rae-1ε Ab
(C)
non treatment
rat IgG
anti Rae-1ε Ab
(D)
Fibrotic area / LV area (%)
(E)
Fibrotic circumference / LV circumference (%)
(F)
Infarct wall thickness (mm)
(G)
Body weight (g)
n.s.
(H)
Heart weight / Body weight (mg/g)
(I)
Lung weight / Body weight (mg/g)

Figure 5. Blockade of NKG2D/NKG2DL interaction showed cardioprotective effects after MI. (A, B) *Inhibitory effects of anti-Rae-1ε antibody on cardiomyocyte apoptosis after MI.* Anti-Rae-1ε antibody or rat IgG (100μg) was intraperitoneally administered 1 day after MI. Murine heart sections were prepared 3 days after MI. TUNEL staining was performed. (A) Representative images are shown (Bar; 50μm). (B) TUNEL positive cardiomyocytes were counted (α-MHC, Hoechst and TUNEL merged cells). Data are shown as mean ±S.D. (n=5 for non-treatment, rat IgG and anti-Rae-1ε antibody group) *P<0.05 v.s. rat IgG by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test. (C-F) *Inhibitory effects of anti-Rae-1ε antibody on post-infarct cardiac remodeling.* Anti-Rae-1ε antibody or rat IgG (100μg) was intraperitoneally administered 1 and 7 days after MI. Murine heart sections were prepared and Masson's trichrome staining was performed 14 days after MI. (C) Representative images are shown (Bar; 1mm). The ratio of fibrotic area to LV area (D), the ratio of fibrotic circumference to LV circumference (E) and infarct wall thickness (F) were quantitatively estimated. Data are shown as mean ±S.D. (n=8 mice for anti-Rae-1ε antibody administration group, n=11 mice for non-treatment group, n=12 mice for rat IgG administration group) *P<0.05, **P<0.01 v.s. rat IgG by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test.[24] (G-I) *Gravimetric data*. Body weight (G), the ratio of heart weight to body weight (H) and the ratio of lung weight to body weight (I) are demonstrated. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 mice for non-treatment group, anti-Rae-1ε antibody administration group, n=6 mice for rat IgG administration group)

Table 4. Cardiac function in antibody administration experiments

Days after MI	2		
	Non-treatment	Non-immune IgG	Anti-Rae-1ε Ab
LVIDd (mm)	3.4 ± 0.7	3.7 ± 0.4	3.7 ± 0.4
LVIDs (mm)	1.9 ± 0.5	2.0 ± 0.3	2.1 ± 0.3
FS (%)	43.9 ± 5.8	44.2 ± 5.5	44.0 ± 2.8
HR (bpm)	565.2 ± 98.9	557.0 ± 105.2	587.6 ± 46.4

Days after MI	7		
	Non-treatment	Non-immune IgG	Anti-Rae-1ε Ab
LVIDd (mm)	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.5	4.1 ± 0.3
LVIDs (mm)	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.3	2.3 ± 1.2*
FS (%)	36.2 ± 4.3	37.7 ± 2.2	43.7 ± 2.4*
HR (bpm)	599.2 ± 60.0	565.0 ± 63.0	582.2 ± 64.3

Days after MI	14		
	Non-treatment	Non-immune IgG	Anti-Rae-1ε Ab
LVIDd (mm)	5.1 ± 0.6	5.4 ± 0.7	3.7 ± 0.5††
LVIDs (mm)	3.5 ± 0.5	3.8 ± 0.7	2.2 ± 0.4††
FS (%)	32.0 ± 3.2	30.6 ± 4.3	41.9 ± 2.0††
HR (bpm)	576.8 ± 56.6	604.0 ± 39.0	561.8 ± 45.3

LVIDd: Left Ventricular Internal Dimension in diastole, LVIDs: Left Ventricular Internal Dimension in systole, FS: Fractional Shortening, HR: Heart Rate. Data are shown as mean ±S.D. *P<0.05 v.s. day7-rat IgG administration group by Student's *t*-test. ††P<0.01 v.s. day14-rat IgG administration group by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test.
n=5 mice for non-treatment and anti-Rae-1ε group, n=6 mice for non-immune IgG group.

心筋細胞特異的 Rae-1ε 過剰発現 TG マウスでは心筋梗塞後の病態が悪化した

上記の通り、NKG2D/NKG2DL 相互作用の阻害によって心リモデリングが減弱した。しかし、抗 Rae-1ε 阻害抗体投与が全身に作用し、二次的に心臓に影響を及ぼした可能性を否定できないため、NKG2D/NKG2DL 相互作用の心臓における意義について検討を進めた。心筋細胞特異的 Rae-1ε 過剰発現 TG マウスを作製し、ウェスタンブロッティングによって Rae-1ε の過剰発現を確認した (Figure 6A)。コントロールには、α-MHC-MerCreMer マウスを用いた。作製した TG マウスは、正常に発育し、特に変わった表現型は観察されなかった。Rae-1ε の過剰発現が MI 後の炎症に関与しているか IL-6、IL-1β、TNF-α といった炎症性サイトカインの発現を確認したが、コントロールと比較して変化は見られなかった (data not shown)。また、血管密度にもコントロールと比較して差は見られなかった (Figure 6B)。MI 後 3 日目に TUNEL 染色を行ったところ、アポトーシス陽性心筋細胞の顕著な増加が認められた (Cre 11.2±1.5 cells/mm^2, TG 27.9±10.8 cells/mm^2) (Figure 6C, D)。同時に、断片化カスパーゼ 3 を検出することで、アポトーシスシグナルの活性化を確認した (Figure 6E, F)。また、梗塞後心筋線維化の増悪 (Cre 35.2±10.6%, TG 46.5±14.1%) (Figure 6G, H)、肥大化を伴った心機能の低下が引き起こされた (Table 5)。さらに、重量解析の結果、TG マウスでは有意に肺重量・体重比が増加しており、顕著な肺鬱血を認めた (Figure 6I, J, K)。以上の結果から、NKG2D/NKG2DL 相互作用の心筋細胞における増強は梗塞後心リモデリングを悪化させることが明らかになった。

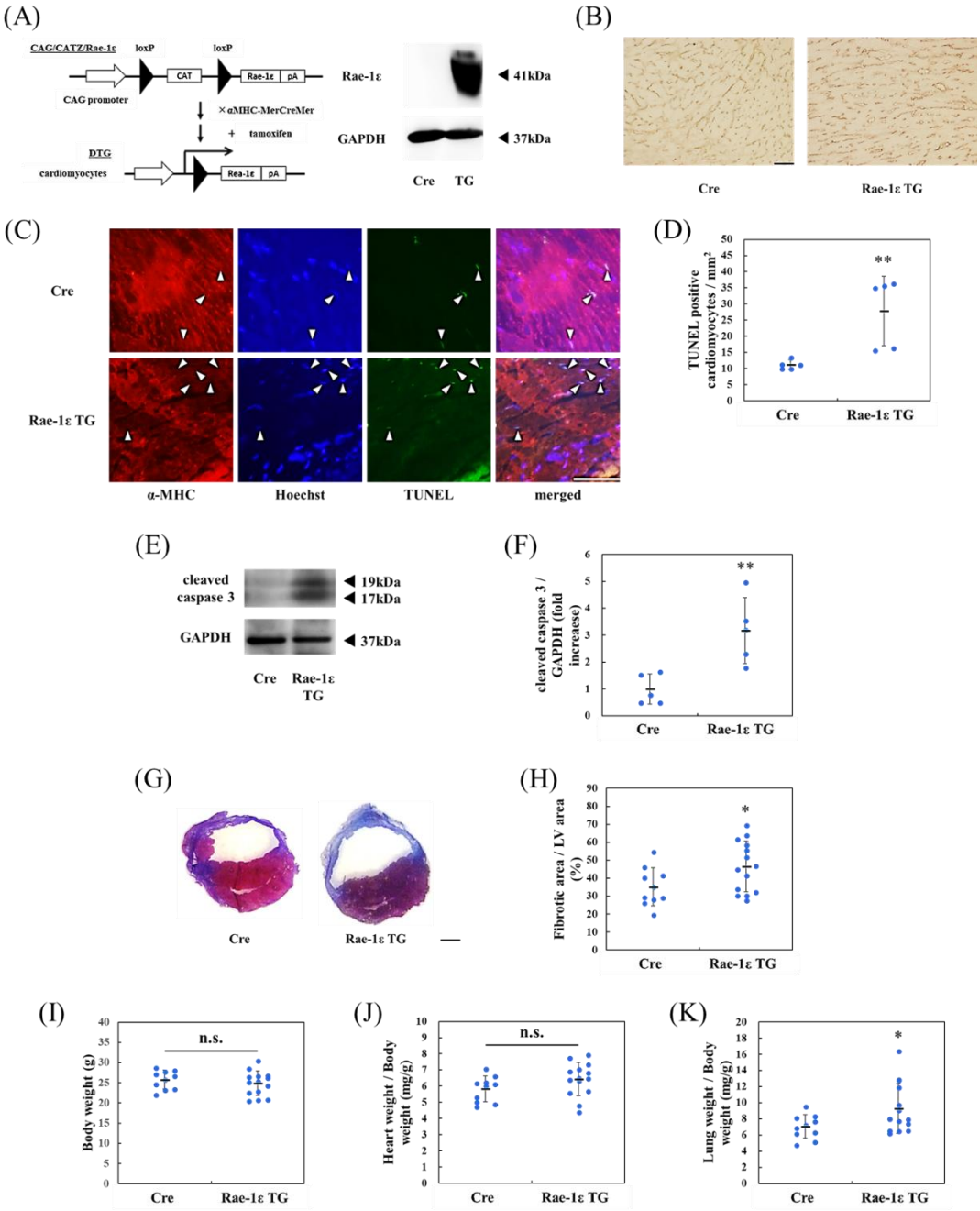
(A)
CAG/CATZ/Rae-1ε
loxP
loxP
CAT
Rae-1ε
pA
CAG promoter
×αMHC-MerCreMer
+ tamoxifen
DTG
cardiomyocytes
Rea-1ε
pA
Rae-1ε
41kDa
GAPDH
37kDa
Cre
TG
(B)
Cre
Rae-1ε TG
(C)
Cre
Rae-1ε TG
α-MHC
Hoechst
TUNEL
merged
(D)
TUNEL positive cardiomyocytes / mm²
**
Cre
Rae-1ε TG
(E)
cleaved caspase 3
19kDa
17kDa
GAPDH
37kDa
Cre
Rae-1ε TG
(F)
cleaved caspase 3 / GAPDH (fold increaese)
**
Cre
Rae-1ε TG
(G)
Cre
Rae-1ε TG
(H)
Fibrotic area / LV area (%)
*
Cre
Rae-1ε TG
(I)
Body weight (g)
n.s.
Cre
Rae-1ε TG
(J)
Heart weight / Body weight (mg/g)
n.s.
Cre
Rae-1ε TG
(K)
Lung weight / Body weight (mg/g)
*
Cre
Rae-1ε TG

Figure 6. Post-infarct cardiac remodeling was aggravated in cardiomyocyte-specific transgenic mice expressing Rae-1ε.

(A) *Generation of tamoxifen-inducible cardiomyocyte-specific Rae-1ε overexpressing mice.* Transgenic strategy is shown (left). The lysates from the hearts of Cre, control, and Rae-1ε TG mice were immunoblotted with anti-Rae-1ε and anti-GAPDH antibodies. Representative results are shown (right). (n=3 for Cre and Rae-1ε TG mice) (B) *Capillary density in post-infarct heart.* Murine heart sections were prepared from Cre or TG mice 14 days after MI. The sections were stained with anti-CD31 antibody. Representative images are shown (Bar; 50μm). (n=5 for Cre and Rae-1ε TG mice) (C, D) *Measurement of apoptotic cardiomyocytes in TG hearts after MI.* Murine heart sections were prepared 3 days after MI. TUNEL staining was performed. (C) Representative images are shown (Bar; 50μm). (D) TUNEL positive cardiomyocytes were counted (α-MHC, Hoechst and TUNEL merged cells). Data are shown as mean ±S.D. (n=5 for Cre and Rae-1ε TG mice) **P<0.01 v.s. Cre by Student's *t*-test. (E, F) *Detection of cleaved caspase 3 in TG hearts after MI.* (E) The lysates from the hearts of Cre and Rae-1ε TG mice were immunoblotted with anti-cleaved caspase 3 and anti-GAPDH antibodies. Representative results are shown. (F) The ratio of cleaved caspase 3 to GAPDH was quantitatively estimated. Data are shown as mean ±S.D. (n=5 for Cre and Rae-1ε TG mice) **P<0.01 v.s. Cre by Student's *t*-test. (G, H) *Estimation of post-infarct fibrosis in TG hearts.* Murine heart sections were prepared, and Masson's trichrome staining was performed 14 days after MI. (G) Representative images are shown (Bar; 1mm). (H) The ratio of fibrotic area to LV area was quantitatively estimated. Data are shown as mean ±S.D. (n=10 for Cre mice, n=14 for Rae-1ε TG mice) *P<0.05 v.s. Cre by Student's *t*-test.[24] (I-K) *Gravimetric data of post-infarct TG hearts*. Body weight (I), the ratio of heart weight to body weight (J) and the ratio of lung weight to body weight (K) are demonstrated. Data are shown as mean ±S.D. (n=10 for control mice, n=14 for TG mice) *P<0.05 v.s. control by Student's t test.

Table 5. Cardiac function in experiments using TG mice

Days after MI	0		2	
	Non-TG	TG	Non-TG	TG
LVIDd (mm)	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.5	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.3
LVIDs (mm)	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.6 ± 0.3*
FS (%)	52.3 ± 3.3	52.2 ± 2.8	44.3 ± 2.7	40.9 ± 4.5*
HR (bpm)	486.1 ± 73.0	537.4 ± 45.5	519.9 ± 74.9	505.8 ± 54.7

Days after MI	7		14	
	Non-TG	TG	Non-TG	TG
LVIDd (mm)	4.4 ± 0.4	5.0 ± 0.5†	4.8 ± 0.6	5.0 ± 0.5
LVIDs (mm)	2.6 ± 0.4	3.3 ± 0.4†	3.1 ± 0.5	3.4 ± 0.5
FS (%)	40.2 ± 4.2	33.5 ± 3.3†	35.2 ± 2.4	33.0 ± 3.7
HR (bpm)	523.5 ± 61.1	524.6 ± 58.1	498.2 ± 54.9	529.6 ± 58.7

*P<0.05 v.s. day2-Cre mice, †P<0.05 v.s. day7-Cre mice by Student's *t*-test.
n=10 for Cre mice, n=14 for Rae-1ε TG mice.

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では、p53 の活性化により ULBP1 が発現上昇した

これまでの検討により、抗 Rae-1ε 抗体を用いて NKG2D/NKG2DL 相互作用を阻害すると心リモデリングが減弱することが明らかになった。したがって、NKG2DL に対する阻害抗体の投与は、新規心不全治療法になる可能性がある。しかし、NKG2DL は動物種間で保存されておらず、臨床応用を考えた際、Rae-1ε に対応するヒトの NKG2DL を同定する必要がある。ヒト NKG2DL は、これまでに 2 つのファミリー、8 つのリガンド (Swiss Prot ID MICA: Q29983, MICB: Q29980, ULBP1: Q9BZM6, ULBP2: Q9BZM5, ULBP3: Q9BZM4, ULBP4: Q8TD07, ULBP5: Q6H3X3, ULBP6: Q5VY80) が報告されている。これらのうち、ULBP1、2、3 及び 6 は Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーで細胞膜に結合しており [14-16]、Rae-1ε と共通の構造を有しているため、これら 4 つのリガンドのうちいくつかが治療標的の候補となる可能性が高いと考えられる。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 [29] に p53 のアデノウイルスベクターを感染させたところ、ULBP1 mRNA が約 200 倍に発現上昇していた (Figure 7)。したがって、ヒト NKG2DL のうち ULBP1 が Rae-1ε に対応するリガンドであると考えられる。

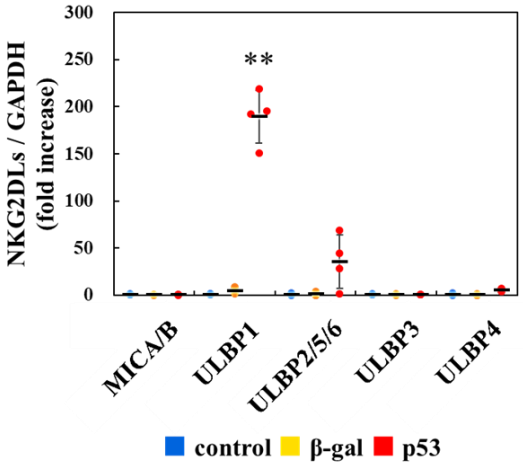

Figure 7. ULBP1 was up-regulated by p53 activation in human iPS cells-derived cardiomyocytes. *The expression of human NKG2DL mRNA after the infection with adenovirus vector expressing p53.* Total RNA was prepared from cultured human iPS cells-derived cardiomyocytes transfected with adenovirus vector expressing p53. The expression of MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3, ULBP4 transcripts was measured by quantitative RT-PCR and normalized with that of GAPDH. Data are shown as mean ±S.D. (n=3 for β-gal group, n=4 for control and p53 groups) **P<0.01 v.s. β-gal by one-way ANOVA followed by Tukey Kramer test.[24]

考察

本研究では、梗塞後心筋細胞死の新規メカニズムを解明することを目的に、免疫学的監視機構に着目して検討を行った。

これまでの検討から、心筋細胞が虚血等の病的ストレスに曝された際、細胞上に NKG2DL の一つである Rae-1 が p53 を介して発現すること、発現した Rae-1 を標的として NKG2D^{+}免疫細胞 (主に γδT 細胞) が梗塞後心臓組織に浸潤することが明らかになった。これら心筋細胞と免疫細胞間の相互作用により、心筋細胞にアポトーシスが誘導された。そこで、MI 後に抗 Rae-1ε 抗体を用いて相互作用を阻害したところ、心筋細胞アポトーシス及び心筋線維化の抑制、心機能の改善が見られた。さらに、心筋細胞特異的 Rae-1ε 過剰発現 TG マウスでは、MI 後、心不全病態の悪化が認められた。したがって、以上の結果から、NKG2D/NKG2DL 相互作用によるシグナルの活性化が心筋細胞死を誘導し、心リモデリングに繋がることが示された。

NKG2DL が、癌細胞やウイルス感染細胞上に発現することは既に報告されていたが、今回初めて梗塞後心筋細胞上にも発現することを見出した。非常に興味深いことに、癌抑制遺伝子として知られる p53 が心筋細胞における NKG2DL の発現誘導に必要不可欠であることも同時に見出した。以前、Hypoxia-inducible factor-1 (Hif-1) 依存的に誘導される血管新生促進因子を p53 が阻害することで血管新生及び心機能を抑制することが報告されていた [30]。そこで、MI 後の心臓組織における血管密度を Rae-1ε TG マウスとコントロールマウスで比較してみたが、有意な差は見られなかった (data not shown)。したがって、p53 は血管新生を介してではなく、NKG2DL の発現誘導を介して心リモデリングの悪化に関与していることが示唆された。このことは、心リモデリングにおける p53 の新たな役割を提唱するものである。

NKG2D 受容体を発現する免疫細胞はいくつか報告されているが、MI 後の心臓組織に存在する NKG2D^{+}免疫細胞は主に γδT 細胞であった。これまでの報告で、γδT 細胞受容体 (γδTCR) を欠損させると、MI 後の生存率が顕著に改善するという報告がされている [31] が、本研究の結果と照らし合わせてみても、γδT 細胞が心筋細胞死を誘導するエフェクター細胞としての機能を担っていると言える。しかし、γδT 細胞の生物学的機能は非常に複雑であり、単一の集団であるとは断言し難い。実際に、MI 後に浸潤する RORγt^{+} γδT 細胞は γδTCR を発現しているものの心筋細胞保護的に働く [32]。残念ながら、本研究では NKG2D^{+} γδT 細胞と RORγt^{+}γδT 細胞の遺伝子発現プロファイルを比較することはできなかったが、NKG2D^{+} γδT 細胞では RORγt の発現が検出できなかったため、少なくとも RORγt^{+}γδT 細胞とは異なる可能性が高い。したがって、γδT 細胞は細胞傷害的、細胞保護的に働く 2 種類のサブタイプに大別できる。

近年、腫瘍循環器学領域の研究が盛んに行われ、心筋細胞と癌細胞が共通の生存シグナル

を有していることが報告されている[33-39]。例えば、HER2 シグナルは心筋細胞の生存を促進しているため、HER2 発現癌細胞の増殖を抑制する分子標的薬であるトラスツズマブは心筋症を引き起こすことが知られている[40]。同様に、血管新生抑制薬は優れた抗腫瘍効果を示すが、血管新生促進因子は心臓の恒常性維持に重要な役割を担っているため、重大な副作用として心筋虚血や心機能不全を引き起こす[41,42]。このように、心筋細胞と癌細胞の共通性に注目が集まる中、本研究では、これら 2 種類の細胞に対して共通の免疫機構が働いているという新たな知見を加えた点で非常に意義深いものであると言える。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた検討により、Rae-1ε に対応するヒト NKG2DL が ULBP1 であることを示唆する結果を得た。また、p53 アデノウイルスベクターの感染により NKG2DL を発現誘導したヒト iPS 細胞由来心筋細胞と NK 細胞を共培養したところ、細胞傷害活性が確認された (data not shown)。したがって、ULBP1 の阻害抗体やデコイタンパク質等を用いて心筋細胞・免疫細胞間の相互作用を阻害することで細胞傷害活性が抑制されれば、将来、臨床応用できる可能性が十分あると考えられる。

さらに、近年、心筋細胞シートを用いた治療法[43]が注目を集めているが、iPS 細胞を用いたシートでは他家移植にならざるを得ず、既存の免疫抑制剤を用いても 100%免疫拒絶反応を抑えるのは難しいのが現状である。新生児の心筋細胞等、幼若な心筋細胞には NKG2DL が発現している可能性が高く、iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞も例外ではない。したがって、心筋細胞シート使用時の免疫拒絶反応に免疫学的監視機構が働いている可能性があり、抗体投与等により NKG2D/NKG2DL 相互作用を阻害することで生着率が向上する可能性が考えられる。このように免疫学的監視機構の抑制は、虚血性心疾患治療に留まることなく、より広い領域での臨床応用が期待できる。

総括

現在、心不全に対する治療法としては、心臓組織に傷害を与える神経体液性因子 (レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、交感神経系) 阻害薬が用いられているものの、依然予後不良であり、新規治療法の開発が強く望まれている。本研究では、心血管疾患と免疫・炎症反応の密接な関係に着目し、免疫学的な観点から新規心筋細胞死メカニズムを追究した。

本研究により、MI 後、傷害を受けた心筋細胞上に p53 を介して NKG2DL の一つである Rae-1 が発現誘導され、NKG2D を発現した免疫細胞 (主に γδT 細胞) が心臓組織に浸潤することで、心筋細胞死が誘導されることが明らかになった。そして、MI 後、NKG2D/NKG2DL 相互作用を抗 Rae-1ε 抗体により阻害したところ、心筋細胞アポトーシス、心筋線維化及び心機能悪化の抑制が見られ、さらに、心筋細胞特異的 Rae-1ε 過剰発現 TG マウスでは、心不全病態悪化が見られた。以上の結果から、NKG2D/NKG2DL システムを介した免疫細胞・心筋細胞間相互作用による心筋細胞死誘導機構が解明され、NKG2D/NKG2DL 相互作用を阻害することにより、心筋細胞死を抑制できることを見出した (Figure 8)。

これまで免疫反応の制御を機序とした心不全治療薬は考案されておらず、本研究成果が、画期的な心不全治療法の開発に貢献しうると考える。また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞等の細胞移植治療における免疫拒絶反応を抑制することにより、生着率を向上できる可能性がある。さらに、免疫学的監視機構が心筋細胞の病的状態をモニタリングするという機構は、生理的には長期のライフスパンにおける品質管理としての機能も有していると考えられ、循環器領域における新たな概念の提唱を意味するものである。

今後、心疾患における免疫反応の詳細なメカニズムがさらに解明され、免疫反応の制御による新規心疾患治療法が開発されることを期待する。

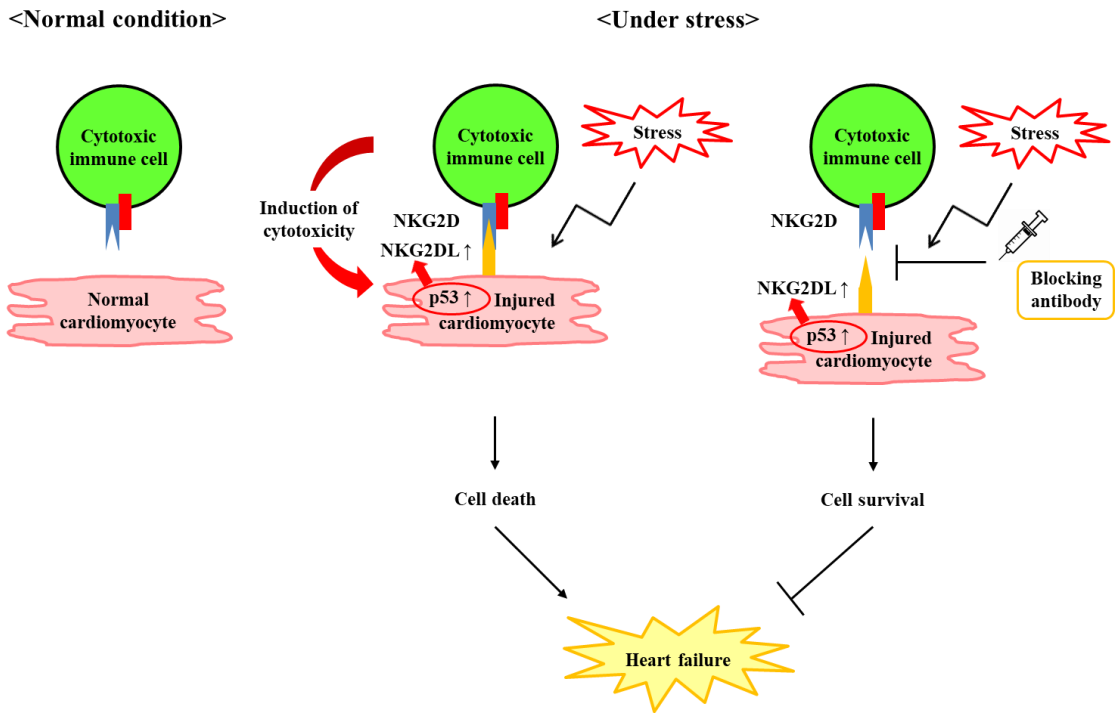

Figure 8. The schematic model of a novel treatment strategy against HF after MI.
NKG2DLs are not expressed on normal cardiomyocytes. However, NKG2DLs are induced via p53 under stress such as ischemia. Cytotoxic immune cells are activated by the interaction and cause apoptotic cell death of cardiomyocytes, leading to HF. When the interaction is blocked, cytotoxicity is decreased, and cardiomyocytes are protected from apoptosis.

引用文献

1. Moe GW and Marin-Garcia J. Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart failure reviews*. 2016;21:157-67.
2. Marunouchi T and Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2015;38:1094-7.
3. Hori M and Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;81:457-64.
4. Talukder MA, Zweier JL and Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84:345-52.
5. Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T and Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2003;5:789-94.
6. Carbone F, Nencioni A, Mach F, Vuilleumier N and Montecucco F. Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110:501-14.
7. Swirski FK and Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science (New York, NY)*. 2013;339:161-6.
8. Van Linthout S, Miteva K and Tschope C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res*. 2014;102:258-69.
9. Hartupee J and Mann DL. Role of inflammatory cells in fibroblast activation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;93:143-8.
10. Ma Y, Yabluchanskiy A and Lindsey ML. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2013;6:11.
11. Nahrendorf M and Swirski FK. Innate immune cells in ischaemic heart disease: does myocardial infarction beget myocardial infarction? *European heart journal*. 2016;37:868-72.
12. Waldhauer I and Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27:5932-43.
13. Ullrich E, Koch J, Cerwenka A and Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology*. 2013;2:e26097.
14. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W and Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413-41.
15. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews Immunology*. 2003;3:781-90.
16. Champsaur M and Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunological reviews*. 2010;235:267-85.

17. Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, Ueda Y, Nishikawa S, Yagi T, Tokunaga T, Takeda N, Suda Y, Abe S and et al. Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene*. 1993;8:3313-22.
18. Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA and Schneider MD. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:169-79.
19. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, Nakaoka Y, Komuro I, Takeda K, Matsumiya G, Azuma J and Fujio Y. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:684-91.
20. Miyawaki A, Obana M, Mitsuhara Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, Fukada SI, Maeda M, Nakayama H and Fujio Y. Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci Rep*. 2017;7:1407.
21. Tonegawa K, Otsuka W, Kumagai S, Matsunami S, Hayamizu N, Tanaka S, Moriwaki K, Obana M, Maeda M, Asahi M, Kiyonari H, Fujio Y and Nakayama H. Caveolae-specific activation loop between CaMKII and L-type Ca(2+) channel aggravates cardiac hypertrophy in alpha1-adrenergic stimulation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2017;312:H501-h514.
22. Zhang T, Gunther S, Looso M, Kunne C, Kruger M, Kim J, Zhou Y and Braun T. Prmt5 is a regulator of muscle stem cell expansion in adult mice. *Nature communications*. 2015;6:7140.
23. Morimoto Y, Bando YK, Shigeta T, Monji A and Murohara T. Atorvastatin prevents ischemic limb loss in type 2 diabetes: role of p53. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2011;18:200-8.
24. Matsumoto K, Obana M, Kobayashi A, Kihara M, Shioi G, Miyagawa S, Maeda M, Sakata Y, Nakayama H, Sawa Y and Fujio Y. Blockade of NKG2D/NKG2D Ligand Interaction Attenuated Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res*. 2018. In press. doi: 10.1093/cvr/cvy254.
25. Li H, Lakshmikanth T, Garofalo C, Enge M, Spinnler C, Anichini A, Szekely L, Karre K, Carbone E and Selivanova G. Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle*. 2011;10:3346-58.
26. Kossmehl P, Kurth E, Faramarzi S, Habighorst B, Shakibaei M, Wehland M, Kreutz R, Infanger M, AH JD, Grosse J, Paul M and Grimm D. Mechanisms of apoptosis after ischemia and reperfusion: role of the renin-angiotensin system. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2006;11:347-58.
27. Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, Venturelli OS,

Johnson TM, Oskoui PR, Xuan Z, Santo EE, Zhang MQ, Vogel H, Attardi LD and Brunet A. The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene*. 2011;30:3207-21.

28. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K and Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000;45:630-41.
29. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N and Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2008;26:101-6.
30. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y and Komuro I. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*. 2007;446:444-8.
31. Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K and Sano M. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e004408.
32. Enomoto D, Matsumoto K, Yamashita T, Kobayashi A, Maeda M, Nakayama H, Obana M and Fujio Y. RORgammat-expressing cells attenuate cardiac remodeling after myocardial infarction. *PLoS One*. 2017;12:e0183584.
33. Lee CL, Moding EJ, Cuneo KC, Li Y, Sullivan JM, Mao L, Washington I, Jeffords LB, Rodrigues RC, Ma Y, Das S, Kontos CD, Kim Y, Rockman HA and Kirsch DG. p53 functions in endothelial cells to prevent radiation-induced myocardial injury in mice. *Science signaling*. 2012;5:ra52.
34. Knight RA, Scarabelli TM and Stephanou A. STAT transcription in the ischemic heart. *Jak-stat*. 2012;1:111-7.
35. Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, Takahashi N and Taketomi A. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer science*. 2017;108:1947-1952.
36. Fujio Y, Maeda M, Mohri T, Obana M, Iwakura T, Hayama A, Yamashita T, Nakayama H and Azuma J. Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases. *Journal of pharmacological sciences*. 2011;117:213-22.
37. Chen Z and Han ZC. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Medicinal research reviews*. 2008;28:185-200.
38. Carmeliet P and Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.
39. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J and Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2018;18:89-102.
40. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ and Keefe

D. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20:1215-21.

41. Qi WX, Fu S, Zhang Q and Guo XM. Bevacizumab increases the risk of severe congestive heart failure in cancer patients: an up-to-date meta-analysis with a focus on different subgroups. *Clinical drug investigation*. 2014;34:681-90.
42. Penumetsa SC, Hoque MZ and Giugliano G. Reversible myocardial dysfunction following intraocular bevacizumab administration. *Journal of cardiovascular disease research*. 2013;4:58-60.
43. Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Funakoshi S, Yoshida Y, Yamanaka S, Shimizu T, Okano T, Daimon T, Toda K and Sawa Y. Enhanced Therapeutic Effects of Human iPS Cell Derived-Cardiomyocyte by Combined Cell-Sheets with Omental Flap Technique in Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Sci Rep*. 2017;7:8824.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行する上で、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻並びに御助力を賜りました藤尾慈先生に厚く御礼申し上げます。

本研究において、多大なる御指導、御助力を賜りました中山博之先生、前田真貴子先生、尾花理徳先生、毛利友美先生に厚く御礼申し上げます。

そして、多大なる御助力を頂いた澤芳樹先生、坂田泰史先生、宮川繁先生、坂東泰子先生、塩井剛先生、木原美帆先生に厚く御礼申し上げます。

また、日々の生活を温かく見守り、支えてくださった大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野の皆様、友人、そして家族に心より感謝致します。