

博士論文（要約）

論文題目

Neovascularization induced by hypoxia inducible transcription factor is associated with the improvement of cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis

（低酸素誘導転写因子により誘導される血管新生は、心筋炎における心機能低下を改善させうる。）

氏 名 多田 祐子

論文の内容の要旨

論文題目

Neovascularization induced by hypoxia inducible transcription factor is associated with the improvement of cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis

(低酸素誘導転写因子により誘導される血管新生は、心筋炎における心機能低下を改善させる。))

氏名 多田 祐子

【研究の背景と目的】

心筋炎は、急性心不全および慢性心不全の主要な原因であり、心筋炎における心機能低下は、予後不良因子である。心筋虚血は、虚血性心疾患のみならず、肥大心や産褥性心筋症など他の心筋症においても病態を悪化させることが報告されているが、心筋炎における虚血の病態意義は明らかでない。本研究では、心筋炎における虚血と血管新生に着目し、prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD) 阻害薬の有効性を検討することを目的として研究を行った。PHD 阻害薬は、低酸素誘導転写因子 (HIF) を安定化させることで、血管新生を促進する効果を持つ薬剤である。PHD 阻害薬は、心筋梗塞や圧負荷による心機能障害を改善させたという報告があるが、心筋炎に対する効果は不明である。今回、in vivo および in vitro で血管新生効果が示されている PHD 阻害薬 TM6008 を用い、急性心筋炎モデルでの治療効果を検討した。

【方法】

6-7 週令の雄 BALB/c マウスを用いて、自己免疫性心筋炎モデルを作成した。化学合成したマウス α ミオシン重鎖ペプチド(16 アミノ酸残基 : 614-629)と完全フロイントアジュバントを混和し、第 0 日と第 7 日の 2 回皮下注射し、免疫を賦活化した。治療群には、200mg/kg の PHD 阻害薬 TM6008 を連日経口投与し、対照群には、溶媒のみ (0.5%カルボキシメチルセルロース) を同様に投与した。また、非心筋炎誘導対照群として、薬剤のみを同様に経口投与した。免疫賦活後第 15 日と第 21 日にサンプルを採取し、炎症細胞浸潤、線維化、心機能の比較検討を行った。心筋炎の重症度は、心重量とヘマトキシリン-エオジン染色上の細胞浸潤面積の両者によって、評価した。心筋線維化は、マロリー染色で線維化面積を測定した。心機能は、エコー上の左室駆出率を求めた。また、心筋炎における虚血領域を評価するため、ピモニダゾール染色を行った。心臓における炎症性サイト

カイン・増殖因子 (TNF- α 、Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Interferon- γ 、TGF- β)、および HIF-1 α 、HIF-2 α の mRNA 発現を、リアルタイム PCR で継時的に観察した (第 0、9、12、15、18、21 日)。炎症極期である第 15 日の炎症性サイトカインの発現を治療群・非治療群の間で比較した。また、ウェスタンブロッティングで HIF-1 α 、HIF-2 α 、血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現を検討し (第 15 日)、比較した。抗 CD31 抗体を用いて、血管内皮細胞の免疫染色を行い、イメージ解析ソフトで計数して、血管数を比較した (第 21 日)。

【結果】

免疫賦活後第 15 日に心体重量比の上昇および、心臓組織内への高度炎症細胞浸潤を認めた。第 21 日には、線維化の進行と、有意な心機能の低下がみられた。心重量と炎症細胞浸潤による心筋炎の重症度評価では、第 15 日、21 日のいずれにおいても、TM6008 治療群と対照群の間には、有意差がなく、炎症の重症度には影響を与えないという結果であった。線維化は、TM6008 治療群では減少傾向が見られたが、有意差は見られなかった。一方、第 21 日の心機能は、TM6008 治療群で有意に改善した (左室駆出率:非治療群 $68.1 \pm 1.8\%$ 、治療群 $78.1 \pm 2.0\%$ 、 $P < 0.01$)。

リアルタイム PCR で検討した HIF-1 α の mRNA の発現は、心筋炎の経過に伴って上昇し、第 15 日に最高となったが、心筋炎の経過中の HIF-2 α の mRNA 上昇は見られなかった。

ウェスタンブロッティングでは、心筋炎の第 15 日に、非心筋炎群と比較して HIF-1 α および HIF-2 α の発現の有意な上昇がみられた。HIF-1 α の発現は、TM6008 投与による有意な上昇は見られなかったが (HIF-1 α /内在性コントロール:非治療群 2.9 ± 1.2 、治療群 3.9 ± 0.8 、 $P = 0.14$)、HIF-2 α は TM6008 投与群では、非投与群に比べ有意に上昇した (HIF-2 α /内在性コントロール:非治療群 0.16 ± 0.07 、治療群 0.64 ± 0.12 、 $P = 0.02$)。また、VEGF の発現も、TM6008 治療によって有意に上昇した (VEGF/内在性コントロール:非治療群 1.2 ± 0.4 、治療群 7.4 ± 1.1 、 $P = 0.01$)。

虚血細胞を検出するピモニダゾール染色では、心筋炎の極期において、炎症細胞浸潤巣の周囲の心筋細胞および間質細胞に染色が見られた。

CD31 陽性の血管内皮細胞数は、TM6008 投与群では、非治療群に比べ有意に上昇した (単位面積当たりの内皮細胞数:非治療群 0.19 ± 0.04 、治療群 0.32 ± 0.11 、 $P = 0.03$)。

炎症性サイトカイン (TNF- α 、Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Interferon- γ) および TGF- β の発現は、第 15～第 18 日でピークとなった。第 15 日における比較検討では、これらの発現には、治療群と非治療群で有意差はなかった。

【考察】

今回自己免疫性心筋炎の急性期における TM6008 の効果を検討した。PHD 阻害薬 TM6008 は、心筋炎の重症度を改善させなかったが、心機能を改善した。免疫染色による評価では、TM6008 の投与は、血管内皮細胞数を有意に増加させた。また、HIF により制

御される主要な血管新生因子である、VEGF の心臓における発現を亢進させた。TM6008 が、HIF の安定化を介して血管新生を亢進させ、虚血を改善させたことが、心筋炎後の心機能の改善の機序の一部であると考えられた。

TM6008 は、HIF-2 α の発現を有意に上昇させたが、HIF-1 α のタンパク量を有意に上昇させなかった。また、HIF-1 α の mRNA が、心筋炎の経過で強く発現した一方、HIF-2 α の mRNA は上昇しなかった。HIF-1 α は、とくに炎症性細胞において、Toll like receptor-NF-kappa B 経路により、転写が活性化されることが知られている。NF-kappa B は自己免疫性心筋炎においても活性化し、発症や病態に関与することから、HIF-1 α は、PHD 阻害剤や虚血によらず強く活性化されたと考えられた。一方、HIF-2 α は NF-kappa B 経路による転写の亢進を受けずに、PHD 阻害薬や虚血により安定化された可能性がある。

PHD 阻害薬が、心筋炎において VEGF の発現を上昇させた機序について、今後さらなる検討が必要である。

ピモニダゾール染色の所見は、心筋炎における虚血の存在を示唆した。心筋炎における虚血の機序として、組織破壊や浮腫、代償性心肥大、酸化ストレスなどの可能性が考えられる。虚血の改善は、心筋炎の有効な治療標的となりうると考えられた。

【結論】

PHD 阻害薬 TM6008 は、心筋炎における血管新生を亢進させ、心筋炎後の心リモデリングを改善させうる。