

氏名（本籍）	野口慶	（東京都）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1127号	
学位授与日付	令和2年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Time-course analysis of cardiac and serum galectin-3 in viral myocarditis after an encephalomyocarditis virus inoculation	
審査委員	（主査）教授	竹内保
	（副査）教授	大倉宏之 教授 小倉真治

論文内容の要旨

【目的】

Galectin-3 はレクチンファミリーに属する糖結合蛋白質の一つで、好中球や好塩基球、マスト細胞、組織球等の炎症細胞で発現し、細胞の成長やアポトーシス、mRNA のスプライシングに関与する他、局所的な炎症メディエーターとしても重要な役割を担っている。また心筋炎や心筋症など心不全に至る心線維化疾患は難治性のものが多く、病初期における組織の線維化を早期発見、治療することが臨床上重要となっており、近年の臨床研究では、血清 Galectin-3 値は心筋の炎症や線維化を反映するバイオマーカーとなり得ることが示唆されている。治療においては Galectin-3 を標的とした分子治療薬が心筋の炎症や線維化、機能不全を有意に改善させたという報告もあるが、その評価はまだ定まっていない。その一因として、これまでの研究は血清の Galectin-3 値と比較した対象が、心エコーなどの非侵襲的でマクロ的なものであり、ミクロ的な視点すなわち心筋炎の微小環境を病理組織で解析したものが無いことが挙げられる。そこで本研究では、ウイルス性心筋炎マウスモデルを用いて、血清 Galectin-3 のバイオマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

急性心筋炎を引き起こす Encephalomyocarditis virus (EMCV) を用いたウイルス性心筋炎マウスモデルを用いた。生後 6 週 of C57BL/6J 野生型マウスに EMCV を腹腔内投与し、投与後 0, 12, 24, 48, 96 時間, 7, 10 日に、麻酔下にて、心筋組織と血清採取を行った。心筋組織は、心臓を短軸で切り出して標本作製し、H&E 染色による病理組織学的炎症評価と Azan 染色による心筋線維化の評価を行った。さらに、Galectin-3 および活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 抗体を用いた免疫組織化学染色、蛍光二重免疫染色を行うことで、Galectin-3 の発現細胞やその局在を解析した。血清については、ELISA 法を用いて Galectin-3 の血清濃度を測定した。これらの因子の経時的な変化の相関関係を統計学的手法で解析した。その時間経過と心筋組織変化との対応を評価した。さらに、ヒト拡張型心筋症モデルで、心不全に至る δ -sarcoglycan (SG) ノックアウト (KO) マウスにおいても、Galectin-3 発現細胞の出現を調べた。

【結果】

H&E および Azan 染色による病理組織学的評価では、EMCV 投与後 48 時間までは著変はみられない

が、投与後 96 時間で心筋の線維化を生じ、同部で免疫組織化学染色により Galectin-3 陽性細胞の浸潤 (132 ± 65 個/mm²) を認めた。投与後 7 日で Galectin-3 陽性細胞浸潤はピーク (349 ± 87 個/mm²) に達し、その後漸減していった。また、蛍光二重免疫染色の結果、Galectin-3 は Iba-1 との共発現を示し、浸潤する Galectin-3 陽性細胞は活性化マクロファージであることが示された。心筋組織内の Galectin-3 陽性細胞数と心筋線維化の程度を経時的に定量化し、統計学的検定を行ったところ、Galectin-3 陽性細胞数と心筋線維化は、EMCV 投与後 48 時間と 96 時間の間で有意に増加 ($P < 0.05$) していた。血清 Galectin-3 値は、EMCV 投与後 24 時間と 48 時間では 30ng/mL 未満で非投与群と差はなかったが、EMCV 投与後 96 時間では非投与群と比較して 82 ± 15 ng/mL と有意な上昇 ($P < 0.05$) がみられ、投与後 7 日の 123 ± 32 ng/mL まで上昇し続けた。これら 3 因子の結果の統計学的相関関係を調べると、組織中の Galectin-3 陽性細胞数と心筋線維化の程度、血清 Galectin-3 値はいずれも正の相関関係にあった。さらに、 δ -SG KO マウスにおいても心筋組織中に Galectin-3 陽性細胞の出現を伴う病変がみられた。

【考察】

Galectin-3 はウイルス性心筋炎において病初期の段階で増加し、同時に心筋の線維化も進んでいることが示唆された。Galectin-3 はウイルス性心筋炎において、病初期に活性化マクロファージにおいて発現し、Galectin-3 陽性マクロファージは線維化部位に集簇し、時間経過により Galectin-3 陽性細胞数と共に線維化が促進されることが明らかとなった。血清 Galectin-3 値は、この心筋微小環境の変化を反映するように増加しており、血清 Galectin-3 値は心筋炎での心筋傷害・線維化の良いバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

【結論】

ウイルス性心筋炎のみならず、他の心筋線維化を来す疾患と血清 Galectin-3 との関連について、継時的に病理組織学的心筋微小環境を解析した報告はこれまでになく、本研究の結果から、血清 Galectin-3 値は心筋炎の微小環境を映し出す良いバイオマーカーであることが示唆され、血清 Galectin-3 値の測定を行うことで、心筋炎の診断や病勢評価に有用である可能性が示された。さらに、今後心筋線維化をきたす他の疾患モデルでバイオマーカーとなりえるか検証を進めて行く必要がある。

論文審査の結果の要旨

申請者 野口 慶は、近年の臨床研究において心筋炎や線維化のバイオマーカーとされている Galectin-3 について、ウイルス性心筋炎マウスモデルを用いて病理組織学的に心筋微小環境を継時的に解析することで、臨床的に不明な初期病変において線維化病態形成に重要な役割を果たすことを明らかとした。また、血清 Galectin-3 値の測定が心筋炎の診断や病勢評価に有用であることを示し、さらに、拡張型心筋症モデルである δ -SG KO マウスでも Galectin-3 による解析の有用性を示した。

本研究成果は、Galectin-3 が心筋炎あるいは心線維化疾患において超早期からの線維化病態形成に重要であることを示唆し、今後の研究および Galectin-3 を標的とした治療の発展に少なからず寄与すると認められる。

[主論文公表誌]

Noguchi K, Tomita T, Kanayama T, Niwa A, Hatano Y, Hoshi M, Sugie S, Okada H, Niwa M, Hara A: Time-course analysis of cardiac and serum galectin-3 in viral myocarditis after an encephalomyocarditis virus inoculation.

Plos One. 2019; 14(1): e0210971.

Published online 2019 Jan 23. doi: 10.1371/journal.pone.0210971