

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

拡張型心筋症における好中球細胞外トラップの意義

研究分担者 竹石 恭知 福島県立医科大学 附属病院・病院長

研究要旨

本研究では、拡張型心筋症の病態進展に関与する分子機構として、無菌性炎症の誘導因子である好中球細胞外トラップ (NETs)に着目して、その意義を明らかにした。ヒト心内膜下心筋生検検体を用いた蛍光免疫染色によって、心筋組織におけるNETsを同定し、NETsを有する拡張型心筋症患者では、予後不良に関連することを見出した。Ex vivoでの解析では、細胞外に放出されたNETsを構成する分子自体が、心筋細胞におけるミトコンドリア機能障害に関連することを明らかにした。さらに、NETs形成に必須の分子であるペプチジルアルギニンデアミナーゼ4 (PAD4) の欠損では、マウス圧負荷後、左室でのNETs形成を誘導することなく、左室駆出率低下を抑制した。PAD4を介してNETsを阻害することは、心不全の発症を予防し、拡張型心筋症の臨床転帰を改善する治療標的となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

拡張型心筋症 (DCM) では、炎症はその病態で重要な役割を果たすが、無菌性炎症の誘導因子として注目される好中球細胞外トラップ (NETs) の意義は未解明である。本研究では、DCMにおけるNETsの意義を明らかにして、新規治療標的としての可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

心内膜下心筋生検を施行したDCM患者連続62例を対象に、心筋組織の蛍光多重免疫染色を行い、好中球エラスターゼ/サシトルリン/ヒストンH3+/DAPI+トロポニンIをNETsとして同定した。心不全を有さない非DCM患者11名を対照群とした。臨床背景やその予後との関連性について検討した。Ex vivoとin vivoによる解析を行った。

(倫理面への配慮)

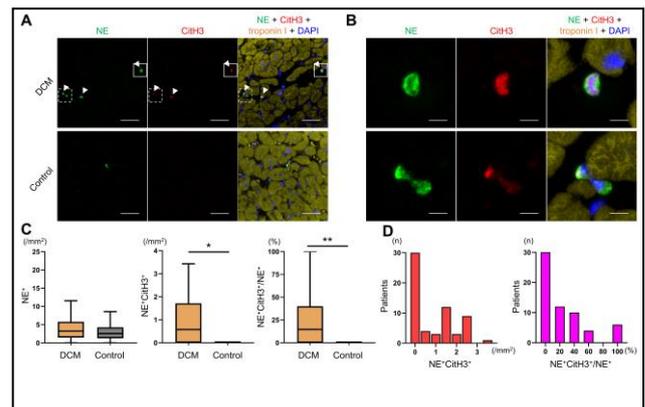
臨床研究プロトコルについては、福島県立医科大学倫理委員会での承認のもと研究を遂行している (承認番号2021016)。全症例において十分説明した上で同意を取得し、データベースに登録した。この際、各個人毎に符号又は番号を付して匿名化した。臨床データは匿名化後に解析され、個人情報等の安全管理措置個人情報保護にも十分に配慮した。個人データの漏洩を避けるため、データへのアクセス権限を設定しておき不正アクセスを防ぎ、またパソコンのウイルス対策も徹底する。人体から取得された試料においてはオートクレーブ処理を行った。

遺伝子組換え実験については、福島県立医科大学組換えDNA実験安全管理委員会承認のもと、組み換えDNA実験安全管理規則に従って遂行した。適切な拡散防止措置を講じ、廃棄物の物理的封じ込めを徹底し、安全対策には十分な配慮をしながら実験を行った。動物実験については、福島県立医科大学動物実験委員会承認のもと、福島県立医科大学動物実験指針を遵守して行った。動物実験に関する理念である3Rに配慮して、実験を遂行し、拡散防止措置または物理的封じ込め処置を順

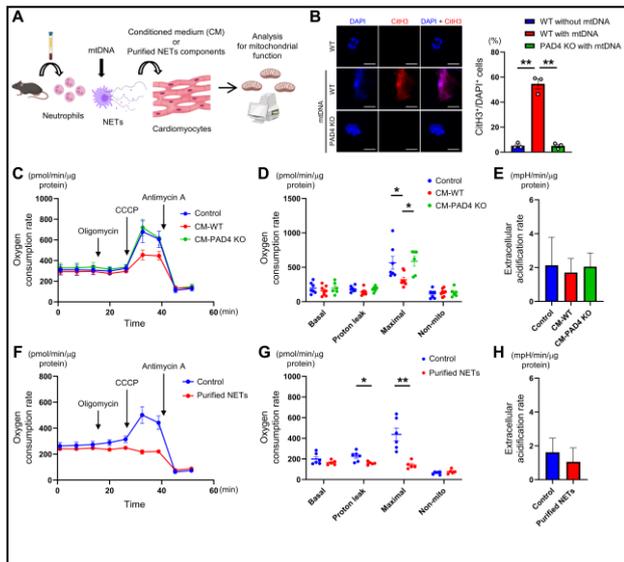
守した。

C. 研究結果

DCM患者における心筋組織面積当たりのNETs数および好中球あたりのNETsの割合は、心不全を有さない非DCM対照群と比較して、有意に高かった。



また、DCM患者におけるNETsの数は、左室駆出率 (LVEF) と負の相関を示した。NETsを有するDCM患者 (n=32) は、NETsを有さない患者 (n=30) よりもLVEFが低く、B型ナトリウム利尿ペプチドが高かった。多変量Cox比例ハザードモデルにおいて、NETsの存在はDCM患者における心イベントリスクの上昇と独立して関連していた。NETsがDCM患者の不良な転帰と関連する分子機構を解明するため、Ex vivoによる解析を行った。細胞外フラックスアッセイを行い、マウスの好中球からNETsを含有するコンディショニングメディウム、または精製NETs成分は、心筋細胞のミトコンドリアの最大酸素消費量の低下をもたらすことを見出した。一方、NETs形成に必須の分子であるpeptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) の欠損した好中球のコンディショニングメディウムでは、心筋細胞のミトコンドリア機能は保持されていた。



マウス大動脈縮窄後圧負荷モデルでは、心筋組織のNETsはストレス急性期で最も多く認められ、以後もNETsは消失することなくストレスが持続している間認められていた。圧負荷4週間後、野生型マウスではLVEFが低下したが、PAD4欠損マウスではNET形成を誘導することなくLVEFは維持された。

#### D. 考察

心不全の病態における炎症の意義についてこれまで報告がなされてきたが、抗サイトカイン療法や抗炎症療法の臨床試験では、DCMを含む心不全患者において有益性は得られていない。炎症細胞の中でも好中球の役割は十分に明らかにされていなかったが、心筋生検検体を用いた我々のアプローチは、DCM患者におけるNETsの新たな洞察を提供するものである。心筋組織におけるNETsを同定することで、DCM患者における病態を理解し、また心イベントリスクの層別化につながることを示唆される。NETsは、非心不全患者や偽手術したマウスの心臓組織には存在せず、マウス圧負荷ストレスによって初めて誘導されたことから、NETs形成はストレス病態に特異的であることが示唆される。心筋細胞が損傷を受けると、細胞内のミトコンドリアDNAが放出され、これが最初に炎症反応を引き起こすことが報告されている。ミトコンドリアDNAに存在するCpGモチーフは、細菌DNAと類似しており、これが好中球に発現するTLR9の活性化を通じて、NETsの形成を誘発するとされる。NETsのシトルリン化ヒストンは免疫原性があり、心筋細胞におけるミトコンドリア機能障害を誘導して、心機能障害と心不全の進展に関連する悪循環を引き起こす可能性がある。NETsがどのように心筋細胞のミトコンドリア機能障害に影響を及ぼすのか、正確な分子機構を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

DCM患者の心臓組織におけるNETsを同定することは患者の有害な転帰の予測やリスク層別化に役立つ精密医療につながる可能性がある。好中球におけるPAD4の欠損によって、心筋細胞におけるミトコンドリア機能障害を抑制したことから、PAD4阻害は、心機能障害や心不全の進展の抑制に寄与する可能性があり、さらなる研究が必要である。

#### E. 結論

心臓組織におけるNETsは、心筋細胞のミトコンドリア機能障害を誘導して、DCM患者の心機能障害や有害な転帰を引き起こすことが示唆された。PAD4を標的としてNETs形成を阻害することは、DCM患者の心不全の進展抑制につながる治療の可能性がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Abe S, Yoshihisa A, Ohara H, Sugawara Y, Sato Y, Misaka T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Nakazato K, Takeishi Y: Calcium-phosphorus product is associated with adverse prognosis in hospitalized patients with heart failure and and chronic kidney disease. *Int Heart J* 65, 84-93, 2024
- Tani T, Oikawa M, Misaka T, Ishida T, Takeishi Y: Heart failure post-myocardial infarction promotes mammary tumor growth through the NGF-TRKA pathway. *JACC CardioOncol* 6, 55-66, 2024
- Ohara H, Yoshihisa A, Ishibashi S, Matsuda M, Yamadera Y, Sugawara Y, Ichijo Y, Sato Y, Misaka T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y: Hepatic venous stasis index reflects hepatic congestion and predicts adverse outcomes in patients with heart failure. *J Am Heart Assoc* 12, e029857, 2023
- Nishiura K, Yokokawa T, Misaka T, Ichimura S, Tomita Y, Miura S, Shimizu T, Sato T, Kaneshiro T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Takeishi Y: Prognostic role of circulating LTBP-2 in patients with dilated cardiomyopathy: a novel biomarker reflecting extracellular matrix LTBP-2 accumulation. *Can J Cardiol* 39, 1436-1445, 2023
- Misaka T, Yoshihisa A, Ichijo Y, Ishibashi S, Matsuda M, Yamadera Y, Ohara H, Sugawara Y, Anzai F, Sato Y, Abe S, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y: Prognostic significance of spleen shear wave elastography and dispersion in patients with heart failure: the crucial role of cardio-splenic axis. *Clin Res Cardiol* 112, 942-953, 2023
- Tomita Y, Anzai F, Misaka T, Ogawara R, Ichimura S, Wada K, Kimishima Y, Yokokawa T, Ishida T, Takeishi Y: Targeting N-myristoylation through NMT2 prevents cardiac hypertrophy and heart failure. *JACC Basic Transl Sci* 8, 1263-1282, 2023

##### 2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- Ichimura S, Misaka T, Ogawara R, Nishiura K, Tani T, Tomita Y, Sato Y,

- Miura S, Yokokawa T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Takeishi Y. Neutrophil extracellular traps in heart tissue drive cardiac dysfunction and adverse outcomes in dilated cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
2. Misaka T, Sato Y, Sugawara Y, Ogawara R, Ichimura S, Tomita Y, Anzai F, Yokokawa T, Sato A, Shimizu T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Takeishi Y. Elevated levels of bicarbonate predict adverse outcomes in patients with chronic heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  3. Sato Y, Yoshihisa A, Sugawara Y, Misaka T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Nakazato K, Takeishi Y. Malnutrition stratified by marasmus and kwashiorkor in patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  4. Tani T, Oikawa M, Misaka T, Ishida T, Takeishi Y. Myocardial infarction promotes breast cancer growth through the nerve growth factor/tropomyosin receptor a pathway. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  5. Nishiura K, Yokokawa T, Misaka T, Ichimura S, Tomita Y, Miura S, Shimizu T, Sato T, Kaneshiro T, Oikawa M, Yoshihisa A, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y. Plasma LTBP-2 is associated with myocardial LTBP-2 and poor prognosis in dilated cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  6. Tomita Y, Misaka T, Sugawara Y, Anzai F, Sato Y, Kimishima Y, Yokokawa T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Takeishi Y. Reduced fetuin-A levels are associated with exercise intolerance in patients with heart failure and predict the risk of adverse outcomes. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  7. Tani T, Oikawa M, Ohara H, Yaegashi D, Sato Y, Yokokawa T, Miura S, Misaka T, Ishida T, Takeishi Y. Subclinical cardiac dysfunction in the patients treated with anthracycline-containing chemotherapy in the chronic phase. American Heart Association Scientific Sessions 2023 (2023.11.11-11.13, Philadelphia, USA)
  8. Ohara H, Yoshihisa A, Sugawara Y, Sato Y, Misaka T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y. Hepatic venous stasis index reflects hepatic congestion and predicts adverse outcomes in patients with heart failure. ESC Congress 2023 (2023.8.25-8.28, Amsterdam, Netherlands, Web)
  9. Ichimura S, Misaka T, Ogawara R, Nishiura K, Tani T, Tomita Y, Sato Y, Miura S, Yokokawa T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Ishida T, Takeishi Y. Inhibition of neutrophil extracellular traps through PAD4 prevents cardiac dysfunction and failure in mice by preserving mitochondrial function of cardiomyocytes. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  10. 三阪智史, 佐藤 悠, 菅原由紀子, 小河原峻, 市村祥平, 富田湧介, 安齋文弥, 横川哲朗, 佐藤彰彦, 清水竹史, 佐藤崇匡, 金城貴士, 及川雅啓, 小林 淳, 義久精臣, 八巻尚洋, 中里和彦, 竹石恭知. Elevated blood bicarbonate levels signify proximal nephron activation and predict adverse outcomes in patients with chronic heart failure. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  11. 西浦司人, 横川哲朗, 三阪智史, 市村祥平, 富田湧介, 三浦俊輔, 清水竹史, 佐藤崇匡, 金城貴士, 及川雅啓, 義久精臣, 中里和彦, 石田隆史, 竹石恭知. Impact of plasma and myocardial LTBP-2 on poor prognosis in dilated cardiomyopathy. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  12. 佐藤 悠, 義久精臣, 菅原由紀子, 三阪智史, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 八巻尚洋, 中里和彦, 竹石恭知. Marasmus-type and kwashiorkor-type malnutrition in patients with heart failure predict cardiac death. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  13. 佐藤 悠, 義久精臣, 菅原由紀子, 三阪智史, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 八巻尚洋, 中里和彦, 竹石恭知. Prevalence and predictor of cachexia in patients requiring repeated hospitalization for heart failure. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  14. Tomita Y, Misaka T, Sugawara Y, Anzai F, Sato Y, Kimishima Y, Yokokawa T, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yoshihisa A, Takeishi Y. Reduced fetuin-A levels are associated with exercise intolerance in patients with heart failure and predict the risk of adverse outcomes. 第88回日本循環器学会学術集会 (2024.3.8-3.10, 神戸)
  15. 市村祥平, 三阪智史, 小河原峻, 富田湧介, 三浦俊輔, 横川哲朗, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 義久精臣, 竹石恭知. Neutrophil extracellular traps in myocardial tissue associate with adverse outcomes in patients with heart failure through mitochondrial dysfunction of cardiomyocytes. 第27回日本心不全学会学術集会 (2023.10.6-10.8, 横浜)
  16. 西浦司人, 横川哲朗, 三阪智史, 富田湧介, 市村祥平, 三浦俊輔, 清水竹史, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 義久精臣, 八巻尚洋, 中里和彦, 石田隆史, 竹石恭知. LTBP-2 is associated with fibrosis and predicts poor prognosis in dilated cardiomyopathy. 第27回日本心不全学会学術集会 (2023.10.6-10.8,

- 横浜)
17. 富田湧介, 安齋文弥, 三阪智史, 小河原峻, 市村祥平, 和田健斗, 君島勇輔, 横川哲朗, 石田隆史, 竹石恭知. Targeting N-myristoylation through NMT prevents cardiac hypertrophy and heart failure. 第27回日本心不全学会学術集会 (2023.10.6-10.8, 横浜)
  18. 富田湧介, 安齋文弥, 三阪智史, 小河原峻, 市村祥平, 和田健斗, 君島勇輔, 横川哲朗, 石田隆史, 竹石恭知. NMTを介したN-ミリスチル化維持が心肥大と心不全を予防する. 第71回日本心臓病学会学術集会 (2023.9.8-9.10, 東京)
  19. 市村祥平, 三阪智史, 小河原峻, 富田湧介, 安齋文弥, 佐藤 悠, 三浦俊輔, 横川哲朗, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 義久精臣, 竹石恭知. 心臓組織の好中球細胞外トラップは拡張型心筋症における心機能障害と不良な転帰に関連する. 第71回日本心臓病学会学術集会

(2023.9.8-9.10, 東京)

20. 三阪智史, 義久精臣, 石橋伸治, 松田美津子, 山寺幸雄, 菅原由紀子, 佐藤 悠, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 竹石恭知. 心不全における脾臓の超音波エラストグラフィの意義: 心臓-脾臓連関の役割. 第71回日本心臓病学会学術集会 (2023.9.8-9.10, 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし