

炎症と鉄代謝からみた心疾患

埴 晴 雄

新潟大学医歯学総合研究科循環器内科

Heart Disease from the Viewpoint of Inflammation and Iron Metabolism

Haruo HANAWA

Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

拡張型心筋症の病因の一つとして、以前より自己免疫異常が考えられてきた。我々は自己免疫性心筋炎（EAM）モデルでこれを検討し、心臓に在在する様々な非心筋細胞が重要な役割をしていることを明らかにした。正常心臓は、一見心筋細胞が大多数を占めると考えがちであるが、70-80%の細胞は、非心筋細胞であると言われている。それらが主役となってこのモデルが発症するという事実は、様々な疾患における心リモデリングにもこれらの細胞が重要であることを示唆する。また、近年明らかになってきた新しい鉄関連蛋白（ヘプシジン、リポカリン-2/NGAL、ヘムオキシゲナーゼ-1）が、心疾患でも心臓や全身で大きく変化していることがわかってきた。鉄は活性酸素の産生に深く関わり、またヘム蛋白はデンジャーシグナルとして Toll 様受容体を介して炎症を促進させることがわかってきた。無菌的な炎症や鉄代謝に関わる因子が心疾患に大きな影響を及ぼすことが示唆され、今後新たな治療のターゲットとなる可能性がある。

キーワード：自己免疫性心筋炎，サイトカイン，在住マクロファージ，鉄，ヘム蛋白，ヘプシジン，デンジャーシグナル，Toll 様受容体

はじめに

拡張型心筋症は、病因として遺伝的素因ととも

にウイルス感染と自己免疫異常が関与すると考えられている。我々は、1990年に当教室の小玉らがラットの実験的自己免疫性心筋炎（EAM）モデ

Reprint requests to: Haruo HANAWA
Department of Cardiovascular Biology and
Medicine, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

埴 晴 雄

ルを報告¹⁾して以来、自己免疫異常の関与について研究してきた。このモデルは、急性期はヒトの巨細胞性心筋炎モデル¹⁾、慢性期は拡張型心筋症モデルになると考えられる²⁾。このモデルの発症機序を検討することによって、ヒトの巨細胞性心筋炎、拡張型心筋症の一つの機序を明らかにできると考え、我々は様々な検討をしてきた。

I. EAMの発症機序(図1)

(1) EAM発症の契機

EAMは、T細胞依存性心筋炎であり³⁾、心臓以外の臓器には炎症が起こらない臓器特異炎である¹⁾。心筋ミオシンをアジュバントと混和し皮下注射するとEAMが発症し、EAMラットのT細胞を採取後刺激し正常ラットに移入すると、同様な心筋炎が発症する。このT細胞は、CD4陽性⁴⁾の

Th1⁵⁾あるいはTh17⁶⁾であり、限られたT細胞受容体のレパトアを有している⁷⁾。正常の心臓では、在住マクロファージのみがMHCクラスIIを発現している。よって病原性T細胞が在住マクロファージのMHCクラスII上のミオシンの断片を抗原として認識することが発症の契機になると考えられる。実際に、正常心臓の在住マクロファージは、心筋ミオシンの断片を提示していると報告されている⁸⁾。

(2) EAM発症の進展

病原性T細胞と心筋ミオシンを提示する在住マクロファージの接触によって、これらの細胞から炎症を惹起するサイトカインが産生される⁵⁾。この反応は、周囲に存在する筋線維芽細胞などを刺激し、炎症を進展させる様々な炎症促進蛋白を産生させる⁹⁾。心臓は、心筋細胞が多数を占める

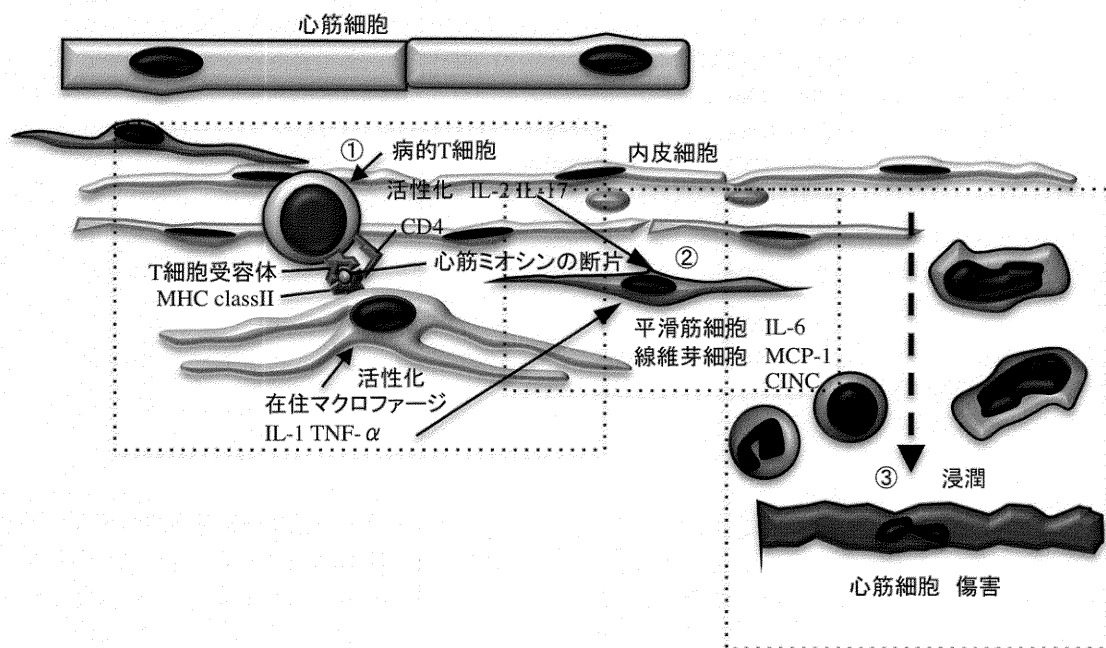


図1 EAMの発症機序

- ① 心筋ミオシンと反応する病的T細胞と心臓でMHC Class II上に心筋ミオシンの断片を提示する在住マクロファージが接触し、それらが活性化する。② ①によって産生されたIL-2, IL-17, IL-1, TNF-αなどによって、その周辺に存在する平滑筋細胞、線維芽細胞がIL-6, MCP-1, ケモカインなどを産生する。③ ①と②によって炎症細胞が心臓に浸潤し、心筋細胞を傷害する。

と考えがちであるが、70-80%は非心筋細胞であり、EAMではそれらが心筋傷害を引き起こす以前に様々な炎症促進蛋白を出すと考えられる。それによって炎症細胞が心臓に浸潤し、心筋細胞傷害が進行する。浸潤したマクロファージから産生されるiNOSによって過剰に産生されるNOが、心筋傷害の一つの重要な要素と考えられる¹⁰⁾。

Ⅱ. 心疾患における鉄代謝 (図2)

(1) 心疾患における鉄関連蛋白の変化

以前我々は、心筋炎の急性期に心筋細胞がどの

ように変化するのかを検討するために、DNAマイクロアレイを用いて心筋細胞の遺伝子発現の変化を網羅的に検索した¹¹⁾。その結果、EAMラットと正常ラットから精製した心筋細胞を比較すると、EAMラットの心筋細胞では、鉄に関連する蛋白(ヘプシジン、リポカリン-2/NGAL、ヘムオキシゲナーゼ-1)の遺伝子発現が著しく亢進していることを見いだした¹¹⁾⁻¹³⁾。これらは心筋梗塞、心肥大でも発現が同様に亢進しており、心疾患における心臓局所の鉄代謝の重要性を示唆する所見と考えられた。

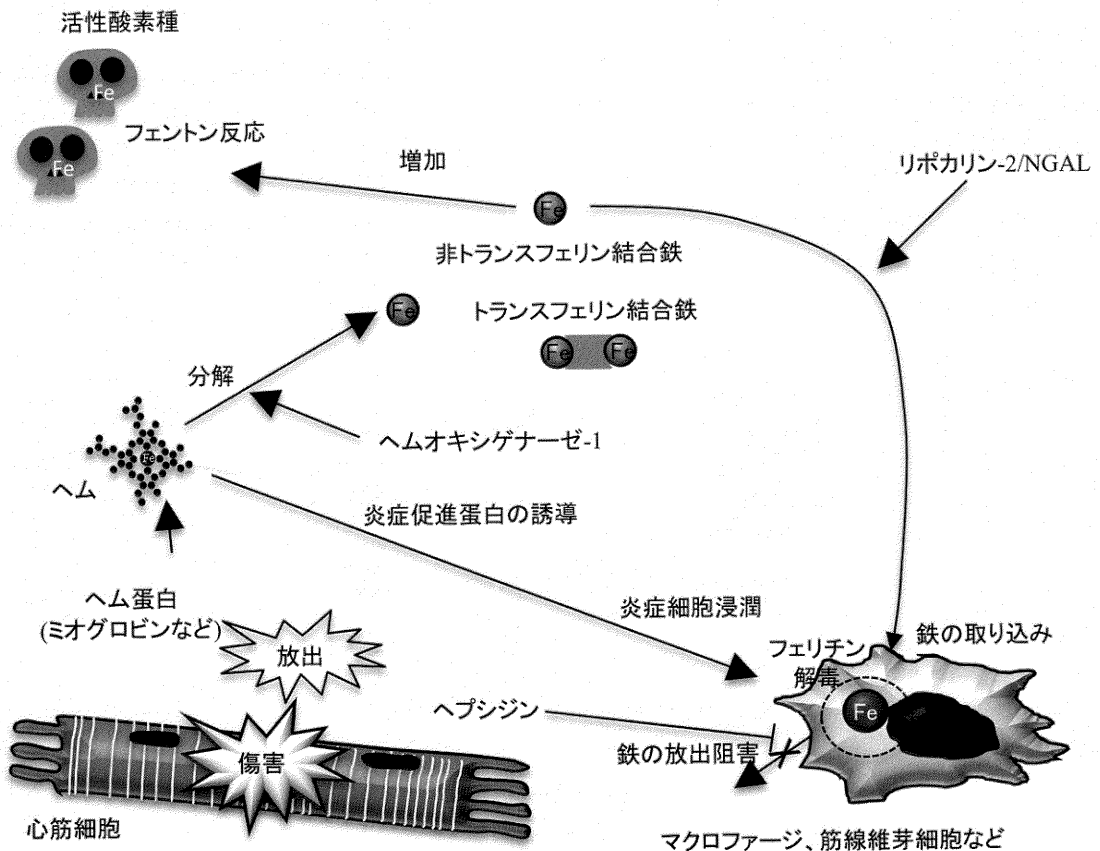


図2 心疾患において想定される心臓内の鉄代謝の概略

心筋細胞破壊が起こるとミオグロビンなどのヘム蛋白が放出され、ヘムはデンジャーシグナルとして炎症促進蛋白を誘導する。増加したヘムはヘムオキシゲナーゼ-1によって分解される。増加した鉄は、トランスフェリンと結合するが、非結合鉄はフェントン反応によって活性酸素種を産生し組織傷害を引き起こす。リポカリン-2/NGALは増加した鉄を細胞内に取り込み、ヘプシジンは細胞からの鉄の放出を抑制する。細胞内の鉄はフェリチンによって隔離され無毒化される。

(2) ヘム、ヘム蛋白による炎症促進蛋白の誘導

鉄に関連する蛋白がなぜ心疾患で著明に変化するのかは、心筋内の鉄が細胞外に放出され、鉄の局所での分布が大きく変わるためであろうと我々は推測した。鉄はすべての細胞に必須の元素であるが、特に心筋細胞は多くの鉄を含有している。とりわけ、ミオグロビンなどのヘム蛋白は、心筋細胞が傷害を受けると細胞外に大量に放出されると考えられる。そこで我々は、正常心臓から採取した培養細胞に、ヘムやヘム蛋白を添加する実験をしたところ、鉄関連蛋白が誘導され、さらに様々な炎症促進蛋白が強く誘導される¹⁴⁾ ことを見いだした。炎症促進蛋白の誘導は、Toll様受容体 (TLR)-4 を介した反応であり、ヘム蛋白はいわゆるデンジャーシグナルと考えられる¹⁵⁾¹⁶⁾。TLRは病原体 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識するだけでなく、自己の細胞が破壊され細胞外に放出されたもの (damage-associated molecular patterns, DAMPs) を

認識し、デンジャーシグナルとして炎症を引き起こすことがわかっている¹⁷⁾。

鉄は、エネルギー産生の必須元素である一方、過剰になると活性酸素を産生し組織傷害を促進するため、恒常性を保つための厳密な調節が生体にとって重要と考えられる。心疾患において鉄関連蛋白の発現が急激に亢進し、またヘム蛋白が炎症促進蛋白を誘導する現象は、鉄の恒常性を維持する調節機序の一面を示していると思われる (図2)。局所での鉄恒常性の調節機序は、心疾患に限らず様々な臓器傷害にも共通に存在する機序と考えられ、これを明らかにすることは臓器傷害の新たな治療のターゲットになる可能性がある。

(3) 心不全に合併する貧血

心不全では貧血が合併することが多い。その割合は心不全の重症度によって9.0%から79.1%と様々な報告されており、貧血が重症になると心不全による入院の割合や死亡率は増加する¹⁸⁾。心不全による貧血の原因は、血液希釈、慢性炎症、

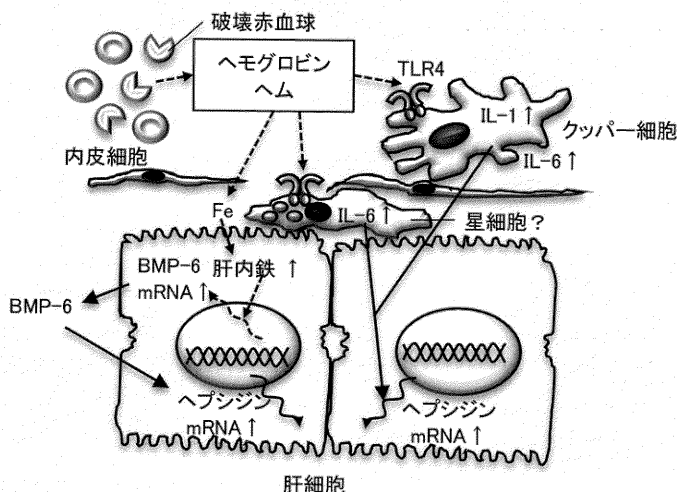


図3 肝うっ血による貧血、相対的鉄欠乏の成因としての不適切なヘプシジン産生の想定される機序 (引用文献16より)

肝うっ血によるヘプシジンの発現の亢進は2つの機序があると想定される。一つは肝うっ血により生じた破壊赤血球から放出された鉄が取り込まれ、肝細胞内の鉄濃度が上昇することによってBMP-6の産生が亢進し、ヘプシジンの発現が誘導される機序。もう一つは破壊赤血球からヘモグロビン、ヘムが放出され、TLR4を介してIL-6の産生が亢進し、ヘプシジンの発現が誘導される機序。

腎機能障害、溶血、消化管出血などがある。しかし、多くの心不全合併貧血は鉄不足が関与すると考えられている¹⁹⁾。我々は、心疾患と鉄に関わる研究から、心不全と貧血、鉄欠乏の関係に対して関心をもっていた。そこで、血清鉄の調節に中心的な役割を演じるヘプシジンが心不全に合併する貧血、鉄欠乏に深く関与するのではないかと考えていた。ヘプシジンは、主に肝臓で分泌され、血清鉄を低下させるホルモンである。また心不全で最もよく見られる肝臓の病理所見は肝うっ血である。そこで我々は、“肝うっ血がヘプシジンの産生に影響を与え、貧血、鉄欠乏が引き起こされるのではないか”との仮説を立てた。その仮説を意識しながら臨床症例を観察していたところ、それを支持する症例に遭遇した。その症例は、著明な肝うっ血を合併した重症な三尖弁閉鎖不全症例で、術前、ヘプシジン血中濃度が高値で貧血、相対的鉄欠乏を呈していた。しかし、術後肝うっ血の改善と伴にヘプシジン血中濃度が低下し、貧血、相対的鉄欠乏が改善した²⁰⁾。本来、ヘプシジンは貧血、鉄欠乏が存在すると低下し、血清鉄を上昇させ貧血、鉄欠乏を改善させる作用があるが、本症例は術前、逆にヘプシジンは高値であった。肝うっ血によってヘプシジンの産生が不適切に亢進し、貧血、相対的鉄欠乏を引き起こした可能性が考えられた。

(4) 肝うっ血モデルによる貧血の検討

上記の症例の経験から、我々はその仮説を証明すべく、ラットの下大静脈狭窄による肝うっ血モデルを作成し、肝うっ血と貧血、鉄欠乏、ヘプシジン産生の関係を検討した¹⁶⁾。その結果、肝うっ血モデルは慢性期まで貧血、鉄欠乏が持続し、ヘプシジンは全経過を通じて低下せず、不適切な産生亢進がみられた。一方、出血モデル、溶血モデルでは著明にヘプシジンの産生低下がみられ、速やかに貧血は改善した。肝うっ血モデルのヘプシジンの不適切な産生亢進の機序は、肝臓内の炎症による IL-6 の亢進と肝細胞内の鉄濃度の上昇による BMP-6 の亢進によって引き起こされると考えられた (図 3)。

Ⅲ. EAM, 鉄代謝解析からの考察

(1) 心疾患における非心筋細胞の重要性

a) 心疾患の原因としての重要性

拡張型心筋症の原因解明は、近年遺伝子解析技術の進歩から一つ一つ明らかにされ、着実に前進している。しかし、家族歴がない症例もかなり多いことを考えると、心筋細胞に発現する遺伝子異常の解析だけでは原因を特定できない症例も多いと思われる。それに対し、ウイルス原因説は一つの理にかなった説明である。また、我々は EAM モデルの機序の解析から、一つの重要な事実を得たと考えている。つまり、EAM は何ら心筋細胞に異常が無く、ウイルス感染がなくとも、重症な炎症が心臓に引き起こされ、慢性期には拡張型心筋症になりうるという事実である。心臓に在住するマクロファージ、またその周囲の筋線維芽細胞が一端炎症を引き起こそうと活性化されさえすれば、多くの心筋細胞が傷害を受けうる現象が存在するということである。心筋炎、拡張型心筋症の原因を考える場合に、我々循環器医は心筋細胞以外にも目を向ける必要があるのではないかと考える。

b) 心疾患の進展としての重要性

鉄代謝の解析結果は、様々な心疾患で引き起こされた心筋傷害の進展を考える場合にも、非心筋細胞に注目すべきであることを示唆している。つまり、心筋細胞が傷害を受け、ヘム蛋白などのデンジャーシグナルが放出されれば、非心筋細胞が活性化され、心筋細胞のさらなる傷害を引き起こす可能性がある。既に神経傷害においては、このような脳神経とミクログリアとの関わりの重要性が言われている²¹⁾。心筋細胞とその他の細胞が影響し合う機序 (図 4) を解明することは、心疾患の原因、進展を考える上で、重要なテーマと考える。

(2) 鉄代謝の重要性

鉄は細胞にとって必須でありながら、過剰になると活性酸素を産生する毒にもなりうるという点で、諸刃の剣ともいえるべきやっかいな物質である。またヘム蛋白は、デンジャーシグナルでもある。生体における鉄の恒常性維持の機序を解明するこ

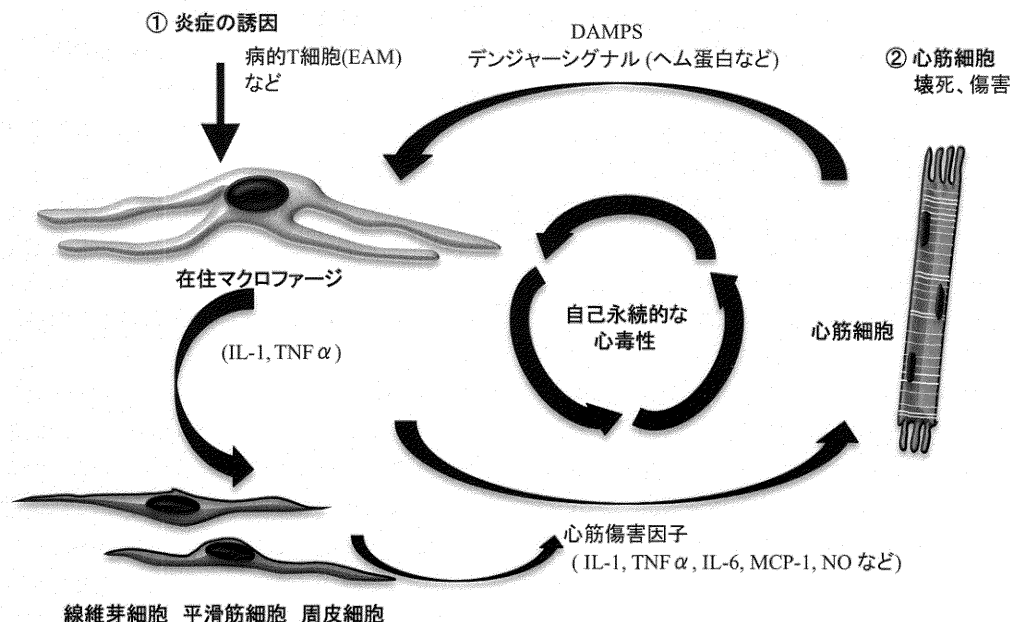


図4 在住マクロファージの活性化による進行性の心傷害
(引用文献21から心傷害を考察)

- ① 在住マクロファージが何らかの炎症の誘因(病的T細胞との接触などもその一つ)にさらされると活性化し、周辺の細胞を刺激することあいまって、様々な心筋傷害因子を産生し、心筋細胞傷害を引き起こす。
- ② 心筋細胞の壊死や傷害によってDAMPs(ヘム蛋白など)が放出され、それによって在住マクロファージなどの活性化が引き起こされる。様々な心疾患において、自己永続的なこれらの反応によって心傷害が進行する可能性がある。

とは、心臓だけでなく、全身の臓器傷害を考える上にも重要と考える。

おわりに

様々な臓器の実質細胞とその他の細胞の関わり
の機序、鉄恒常性維持の機序が解明されれば、臓
器傷害の新たな治療のターゲットとなる可能性が
あるのではないだろうか。

参考文献

- 1) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin Immunol Immunopathol 57: 250 - 262, 1990.
- 2) Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K and Shibata A: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. Circ Res 75: 278 - 284, 1994.
- 3) Kodama M, Matsumoto Y and Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. Circulation 85: 1918 - 1926, 1992.
- 4) Hanawa H, Tsuchida M, Matsumoto Y, Watanabe H, Abo T, Sekikawa H, Kodama M, Zhang S, Izumi T and Shibata A: Characterization of T cells infiltrating the heart in rats with experimental autoimmune myocarditis. Their similarity to extrathymic T cells in mice and the site of proliferation. J Immunol 150: 5682 - 5695, 1993.

- 5) Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S and Abo T: Recombinant murine interleukin - 12 facilitates induction of cardiac myosin - specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res* 82: 1035 - 1042, 1998.
- 6) Chang H, Hanawa H, Yoshida T, Hayashi M, Liu H, Ding L, Otaki K, Hao K, Yoshida K, Kato K, Toba K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: Alteration of IL - 17 Related Protein Expressions in Experimental Auto - immune Myocarditis and Inhibition of IL - 17 by IL - 10 - Ig Fusion Gene Transfer. *Circ J* 72: 813 - 819, 2008.
- 7) Hanawa H, Inomata T, Okura Y, Hirono S, Ogawa Y, Izumi T, Kodama M and Aizawa Y: T cells with similar T - cell receptor beta - chain complementarity - determining region 3 motifs infiltrate inflammatory lesions of synthetic peptides inducing rat autoimmune myocarditis. *Circ Res* 83: 133 - 140, 1998.
- 8) Smith SC and Allen PM: Expression of myosin - class II major histocompatibility complexes in the normal myocardium occurs before induction of autoimmune myocarditis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9131 - 9135, 1992.
- 9) Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res* 68: 278 - 288, 2005.
- 10) Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T and Imai S: Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ Res* 80: 11 - 20, 1997.
- 11) Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl Res* 152: 119 - 127, 2008.
- 12) Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura Y, Kodama M, Ota Y, Hayashi J and Aizawa Y: Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 21: 749 - 756, 2010.
- 13) Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M and Aizawa Y: Lipocalin - 2/neutrophil gelatinase - B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J* 74: 523 - 530, 2010.
- 14) Hao K, Hanawa H, Ding L, Ota Y, Yoshida K, Toba K, Ogura M, Ito H, Kodama M and Aizawa Y: Free heme is a danger signal inducing expression of proinflammatory proteins in cultured cells derived from normal rat hearts. *Mol Immunol* 48: 1191 - 1202, 2011.
- 15) Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao - Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graca - Souza AV and Bozza MT: Characterization of heme as activator of Toll - like receptor 4. *J Biol Chem* 282: 20221 - 20229, 2007.
- 16) Suzuki T, Hanawa H, Jiao S, Ohno Y, Hayashi Y, Yoshida K, Kashimura T, Obata H and Minamino T: Inappropriate expression of hepcidin by liver congestion contributes to anemia and relative iron deficiency. *J Card Fail* 20: 268 - 277, 2014.
- 17) Kono H and Rock KL: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279 - 289, 2008.
- 18) Go AS, Yang J, Ackerson LM, Lepper K, Robbins S, Massie BM and Shlipak MG: Hemoglobin level, chronic kidney disease, and the risks of death and hospitalization in adults with chronic heart failure: the Anemia in Chronic Heart Failure: Outcomes and Resource Utilization (ANCHOR) Study. *Circulation* 113: 2713 - 2723, 2006.

- 19) Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D, Leonti A, Tsolakis E, Drakos SG, Tsagalou EP, Maroulidis GD, Alexopoulos GP, Kanakakis JE and Anastasiou - Nana MI: Etiology of anemia in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 48: 2485 - 2489, 2006.
- 20) Suzuki T, Hanawa H, Ding L, Ito M, Kashimura T, Obata H, Hu YH, Jiao S, Namura O and Kodama M: Improvement of anemia with decreasing hepcidin levels following valve replacement for severe tricuspid regurgitation. *Eur J Haematol* 88: 551 - 552, 2012.
- 21) Block ML, Zecca L and Hong JS: Microglia - mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57 - 69, 2007.
-