



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1618号
学位記番号	第1153号
氏名	中山 貴文
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	Clinical impact of the presence of macrophages in endomyocardial biopsies of patients with dilated cardiomyopathy (拡張型心筋症患者における心筋生検検体内にみられるマクロファージ出現の臨床的意義)  European Journal of Heart Failure 2017 Apr;19(4):490-498.
論文審査担当者	主査： 三島 晃 副査： 山崎 小百合, 大手 信之

## 論文内容の要旨

### 【背景】

拡張型心筋症(DCM)は左室拡大および左室収縮能低下をきたす予後不良疾患であるが、進行速度や薬剤抵抗性などは症例毎に様々である。DCMの原因や増悪機序は未だ明らかにはなっていないが、近年持続的な心筋炎症が疾患の増悪と関連している一群があり、免疫抑制療法が有効であるといった報告もなされた。心筋炎症にはTリンパ球およびマクロファージ(MΦ)が関与するとされているが、MΦには古典的な炎症性M1 MΦおよび抗炎症性M2 MΦがあり、心筋内M2 MΦは心筋梗塞後の壊死組織の線維化・修復やリモデリングにおける重要な役割を果たしている事も報告されている。しかしDCMでのTリンパ球やMΦが、心筋ダメージや線維化に対してどのような役割を担っているかは未だ解明されていない。本研究の目的は、DCM患者における、心筋炎症細胞浸潤と長期予後や線維化形成との関連を、特にMΦに注目し明らかにする事である。

### 【対象と方法】

2005年1月～2009年12月の間に、国立循環器病研究センターにおいて左室機能障害の原因診断目的で心筋生検を施行された連続症例を対象とした。左室機能障害の基準は、左室駆出率45%以下、左室拡張末期径が標準値の117%以上とした。虚血性心筋症、肥大型心筋症、一次性高度弁膜症、高血圧性心筋障害、その他二次性心筋症(サルコイドーシスやアミロイドーシス等)は除外した。また冠動脈本幹に51%以上の狭窄を有する症例、悪性疾患、心臓手術の既往、急性心筋炎の既往を有する、活動性のある感染症、膠原病を有する、もしくは免疫抑制療法を受けている症例は除外した。

対象患者のカルテから、身体情報、既往歴、内服歴、エコー検査、カテーテル検査、予後などの患者臨床情報を収集した。同センターへ通院されていない患者に関しては、郵送および電話での予後調査を行った。

また、対象患者のパラフィン埋没保存された心筋生検検体を薄切し、抗CD3抗体(T-リンパ球)、抗CD68抗体(総MΦ)、抗CD163抗体(M2 MΦ)を用いた特殊免疫染色、およびMasson's Trichrome染色(線維化の同定)を行った。標本をデジタル化し0.1mm<sup>2</sup>スナップショットをランダムで5か所撮影し、それぞれの領域に浸潤した炎症細胞数および線維化面積率を測定し、患者病理所見を定量化した。

### 【結果】

エントリー患者は182名、観察期間は平均6.9±2.4年、心臓死および心臓移植をエンドポイントとして、イベント数は観察期間に29例(約16%)であった。対象の年齢:51±15歳、男性:79%、NYHA class ≥ III : 30%、心不全期間:11±23ヶ月、左室拡張末期径:67±9 mm、左室駆出率:30±11%、血清C反応性ペプチド[median (IQR)]:0.11(0.04-0.31) mg/dl、推定糸球体濾過量(IQR):72(58-90) ml/min/1.73m<sup>2</sup>、BNP(IQR):162(71-422) pg/mlであった。退院時内服はβ遮断薬:88%、アンジオテンシン変換酵素阻害薬/受容体拮抗薬:84%、アルドステロン受容体拮抗薬:49%とほぼ最適な治療を受けている対象群であった。心筋生検検体内のCD3陽性、CD68陽性、CD163陽性細胞数(IQR)はそれぞれ、8.1(4.0-14.2)/mm<sup>2</sup>、22.3(12.1-36.0)/mm<sup>2</sup>、6.5(2.0-14.0)/mm<sup>2</sup>、また線維化面積率は15.1±6.8%であった。

CD3陽性、CD68陽性、CD163陽性細胞浸潤の多い群(≥14/mm<sup>2</sup>、≥32/mm<sup>2</sup>、≥10/mm<sup>2</sup>)は、それぞれ有意に長期予後が悪い事が確認され(Log-rank p=0.007、p=0.011、p=0.022)、Cox比例ハザードモデルではCD163陽性細胞数の多い群が独立して最も強く予後と関連していた(CD3、CD68、CD163でそれぞれp=0.517、0.334、0.005)。また線維化面積率が多い群(≥18%)も有意

に長期予後が悪いことが確認された(Log-rank  $p=0.002$ )。線維化面積率に対する多変量線形回帰分析(臨床データ、心筋内炎症細胞数含む)では、CD163 陽性細胞数( $p<0.001$ )と総ビリルビン( $p=0.026$ )のみが独立した有意な関連因子であった。

#### 【考察および結論】

今回の研究では、DCM 患者において心筋生検内 T リンパ球、総 M $\Phi$ 、M2 M $\Phi$  浸潤の多い群の長期予後が有意に悪い事を示した。また抗炎症性亜型である M2 M $\Phi$  が最も線維化面積率に関与し、同時に独立して長期予後に強く関わっている事も明らかになった。近年、炎症細胞浸潤 $\geq 14/mm^2$  (T リンパ球  $7/mm^2$  を含む)を伴う DCM を炎症性 DCM と分類し、炎症が予後増悪機序の一旦を担うと考えられているが、本研究では炎症性 DCM の自然予後が非炎症性 DCM より悪いことも裏付けた。

心筋梗塞後では M2M $\Phi$  が組織修復に有用・必要であるが、一方で DCM では今回 M2M $\Phi$  が予後増悪と関連しており、M2M $\Phi$  の臨床的意義に解離がみられた。これは心筋障害が限局的かびまん性かの違いによると考えられ、心筋梗塞後では壊死組織を線維化する事で心臓全体の機能を保ち、心破裂など重篤な合併症を防ぐのに対して、拡張型心筋症ではびまん性に線維化を起こす事で心臓全体の臓器リモデリングを進行させると推測された。

過去に DCM に対するステロイド療法には有意な効果が無いと報告されたが、近年になって炎症性 DCM に対してはステロイド含む免疫抑制療法によって心機能改善が得られるといった報告がなされ、心筋生検所見が重要視されつつある。本研究は DCM における炎症細胞浸潤の役割や意義をさらに明確にするとともに、免疫抑制療法の有用性を改めて示唆した。

## 論文審査の結果の要旨

【背景】 拡張型心筋症は左室拡大および左室収縮能低下をきたす予後不良疾患であるが、進行速度や薬剤抵抗性などは症例毎に様々である。拡張型心筋症の原因や増悪機序は未だ明らかにはなっていないが、近年持続的な心筋炎症が疾患の増悪と関連している一群があり、免疫抑制療法が有効であるといった報告もなされた。心筋炎症には T リンパ球およびマクロファージ(MΦ)が関与するとされているが、MΦには古典的な炎症性 M1 MΦおよび抗炎症性 M2 MΦがあり、心筋内 M2 MΦは心筋梗塞後の壊死組織の線維化・修復やリモデリングにおける重要な役割を果たしている事も報告されている。しかし DCM での T リンパ球や MΦが、心筋ダメージや線維化に対してどのような役割を担っているかは未だ解明されていない。本研究の目的は、DCM 患者における、心筋炎症細胞浸潤と長期予後や線維化形成との関連を、特に MΦに注目し明らかにする事である。

【対象と方法】 2005 年 1 月～2009 年 12 月の間に、国立循環器病研究センターにおいて左室機能障害の原因診断目的で心筋生検を施行された連続症例を対象とした（特定心筋症、冠動脈疾患を除く）。対象患者のパラフィン埋没保存された心筋生検検体を薄切し、抗 CD3 抗体(T-リンパ球)、抗 CD68 抗体(総 MΦ)、抗 CD163 抗体(M2 MΦ)を用いた特殊免疫染色、および Masson's Trichrome 染色(線維化の同定)を行った。標本をデジタル化し 0.1mm<sup>2</sup> スナップショットをランダムで 5 か所撮影し、それぞれの領域に浸潤した炎症細胞数および線維化面積率を測定し、患者病理所見を定量化した。

【結果】 エントリー患者は 182 名、観察期間は平均 6.9±2.4 年、心臓死および心臓移植をエンドポイントとして、イベント数は観察期間に 29 例(約 16%)であった。心筋生検検体内の CD3 陽性、CD68 陽性、CD163 陽性細胞数 (IQR) はそれぞれ、8.1 (4.0-14.2)/mm<sup>2</sup>、22.3 (12.1-36.0)/mm<sup>2</sup>、6.5 (2.0-14.0)/mm<sup>2</sup>、また線維化面積率は 15.1±6.8%であった。CD3 陽性、CD68 陽性、CD163 陽性細胞浸潤の多い群 (≥14/mm<sup>2</sup>、≥32/mm<sup>2</sup>、≥10/mm<sup>2</sup>) は、それぞれ有意に長期予後が悪い事が確認され (Log-rank p=0.007、p=0.011、p=0.022)、Cox 比例ハザードモデルでは CD163 陽性細胞数の多い群が独立して最も強く予後と関連していた (CD3、CD68、CD163 でそれぞれ p=0.517、0.334、0.005)。また線維化面積率が多い群 (≥18%) も有意に長期予後が悪いことが確認された (Log-rank p=0.002)。線維化面積率に対する多変量線形回帰分析 (臨床データ、心筋内炎症細胞数含む) では、CD163 陽性細胞数 (p<0.001) と総ビリルビン (p=0.026) のみが独立した有意な関連因子であった。

【審査の内容】 約 20 分間のプレゼンテーションの後に、まず第一副査の山崎教授より M2 MΦが心筋へ浸潤するトリガーは何か？ M2 MΦが心筋線維化を引き起こし心不全に至るメカニズムは何か？免疫染色標本において T リンパ球や MΦ数を定量した関心領域の選び方はどのようにしたか？などの計 7 項目、次に主査の三島から M2 MΦは抗炎症作用を有するのか？心筋生検のガイドライン上の位置づけは？など計 8 項目、第二副査の大手教授から主科の質問として、拡張型心筋症の原因は？炎症性拡張型心筋症に対して本邦における免疫抑制療法可能性は？など計 4 項目の質問がなされた。いずれに対しても概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると共に専門領域の知識を有すると判断した。本研究は拡張型心筋症における炎症細胞浸潤の役割や意義を明確にするとともに、免疫抑制療法の有用性を示唆した。以上をもって本論文の著者には、博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 三島 晃 副査 副査 山崎 小百合、大手 信之