

入された移植骨髄細胞が血管内皮細胞に分化、血管新生を促進し、心機能を改善することも報告された³⁾。そこで我々は、より臨床応用を前提とした観点から、ウサギの虚血・再灌流梗塞心に対して、標識した自家骨髄細胞の末梢静脈からの移植を試み、心筋再生ならびに心機能改善の可能性について検討した。myosin heavy chain (MHC) 免疫染色を施した組織切片より計測された梗塞サイズ及び心臓超音波的検討から、骨髄移植は梗塞サイズ縮小、心機能改善に有効であった。また共焦点レーザースキャン顕微鏡にて、標識された骨髄細胞が心筋梗塞巣に浸潤し、その一部がMHCを発現していることから、骨髄由来細胞の心筋細胞への分化が示唆され、電顕的観察においても、成熟過程にあると考えられる心筋細胞を確認した。一方、骨髄移植後にCD31陽性毛細血管および α -smooth muscle actin (SMA) 陽性細動脈の有意な増生、残存正常心筋細胞の代償性肥大は認められなかった。以上より、虚血・再灌流モデルにおいて、末梢静脈注入法による自家骨髄細胞移植は、心筋細胞再生により解剖学的・機能的修復をもたらす可能性が示唆された。

【研究目的】

骨髄細胞移植による*in vivo*での心筋再生は、マウスの非再灌流梗塞心モデルにおいて、同種間骨髄細胞の直接心筋注入にて既に試みられ、良好な結果が得られたことが報告されている¹⁾。しかしなが

ら、虚血・再灌流モデルに対して、また静注による自家骨髄細胞移植の効果は明らかにされていない。そこで、我々は従来のモデルとは異なり、比較的大型動物であるウサギの虚血・再灌流モデルで、末梢静脈注入法による骨髄細胞移植の効果を検討した。

【研究方法】

日本白色家兎（6週令）の両側腸骨から約10mlの骨髄液を採取し、Ficoll（日本抗体研究所）を用いた比重分離にて、単核球群（BM-MNC）を収集した。一方、このウサギに対して、冠動脈を30分結紮後再灌流にて心筋梗塞を発生させ、再灌流後5時間が経過した時点で、分離収集されたBM-MNCを末梢静脈より注入した（BM群）。一方、心筋梗塞発生後、salineのみを静脈注入したS群をコントロールとした。

〈Protocol 1〉上記の通り分離収集したBM-MNCを静脈投与する前に、赤色蛍光色素である1,1'-dioctadecyl-1 to 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perhydrate (DiI; Molecular Probe) で標識した後³⁻⁴⁾ 末梢静脈より注入した (n=5)。こうして得られた骨髄細胞移植ウサギを1週間後にペントバルビタールの大量投与にて安楽死させ、心筋組織を、心筋細胞に対するmyosin heavy chain (CHEMICON)、血管内皮細胞に対するCD31 (DAKO)、血管平滑筋細胞に対する α -smooth muscle actin (DAKO) の免疫

染色をそれぞれ施し、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡（Carl Zeiss社）にて観察した。加えて、電顕観察を行った（HITACHI）。

〈Protocol 2〉 BM群（n=10）、S群（n=10）をそれぞれ心筋梗塞発生1カ月間経過観察し、心臓超音波検査（Aloka SD5500）にて心筋梗塞前、1カ月後の心機能を追跡した。最終的にProtocol 1と同様に安楽死させた。得られた心筋組織について、MHC、CD31、SMAに対する免疫組織染色およびHematoxilin & eosin（HE）染色を施し、組織学的検討を行った。MHC染色切片上にて、全左室面積（LV）に対する陳旧性梗塞巣面積（SA: scar tissue area）の比（SA/LV）を計測し、両群間で比較した。梗塞組織のrisk areaにおいてCD31、SMA染色によりそれぞれ同定される微小血管あるいは細動脈数を、また、risk areaおよびnon-risk areaの残存心筋細胞横断径を計測した。

全てのデータはmean±SDで示され、BM群、S群間にてt検定を行った。p値<0.05を有意差ありとした。

【結果と考察】

骨髄細胞由来心筋細胞の再生

骨髄移植後1週間経過した心筋組織において、共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡にて、risk area内の梗塞領域と非梗塞領域の境界領域のみにDiI陽性細胞、即ち骨髄由来細胞の浸潤を確認した。加えて

MHCに対する免疫組織染色にて、DiI陽性及びMHC陽性の細胞が確認され、骨髄由来細胞の心筋細胞への分化が示唆された（図1）。また骨髄移植1週間後の心筋組織を電顕にて観察したところ、心筋細胞の特徴である介在板が存在する一方で、electron-lucentな細胞質にthin filamentの太さに相当するmyofilamentが豊富に存在する細胞がみられた。これらは横紋構造を有しないがmyofilamentの中にZ band様の構造物がみられ、発生段階にある未熟心筋細胞と考えられた（図2）。

心機能の改善

心機能の推移について、心臓超音波検査により左室壁厚（梗塞壁厚/正常壁厚 IWT/NWT）、左室拡張末期径（EDD）、左室駆出率（EF）を指標に検討した。左室壁厚において、BM群ではS群に比し、有意に壁厚が保たれ（図3a）、同様に左室拡張末期径においても骨髄移植群が、有意に左室の拡大が抑制された（図3b）。左室駆出率についても、BM群において左室壁運動が有意に改善した（図3c）。

陳旧性梗塞サイズ、血管新生および心筋細胞のサイズからみた心機能改善のメカニズム

MHC染色切片上にて、計測された陳旧性梗塞サイズ（SA/LV）を

BM群、S群で比較した。再灌流1カ月後の慢性期においては、BM群の梗塞サイズはS群のそれに比し、有意に縮小した（図4a）。BM群及びS群において、CD31陽性毛細血管、及びSMA陽性細動脈の血管数を比較検討したところ、毛細血管、小動脈いずれも、1カ月の慢性期ではBM群とS群に有意差は認められなかったが（図4b-c）、これは従来の非再灌流モデルと異なり、本研究のような再灌流モデルは梗塞組織に血流がなされているため、血管新生を必要としないためと思われる。さらに、残存心筋細胞の横断径についても両群間に差は認めなかった。

以上より、虚血・再灌流モデルにおいて、骨髄細胞移植による心機能改善の主要なメカニズムは、血管新生あるいは残存心筋肥大ではなく、移植骨髄細胞からの心筋細胞再生によることが示唆された。

【結論】

ウサギ虚血・再灌流モデルにおいて、末梢静脈注入法による自家骨髄細胞移植では、移植細胞は梗塞心筋組織へと浸潤し、心筋細胞へ分化することで、心機能を改善させる可能性が示唆された。この方法は、容易に臨床応用が可能であり、大梗塞後の慢性心不全予防に有効である可能性がある。

【参考文献】

- 1) Oric D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410; 701-703.
- 2) Tomita S, Ren-Ken L, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow improves damaged heart function. *Circulation*. 1999; 100(suppl II): II-247~II-256
- 3) Kawamoto A, Heon-Cheol G, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001; 103: 634-637.
- 4) Regnerson B, Bengtson L, Haegerstrand A, Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry*. 1992; 97: 329-333.

図1

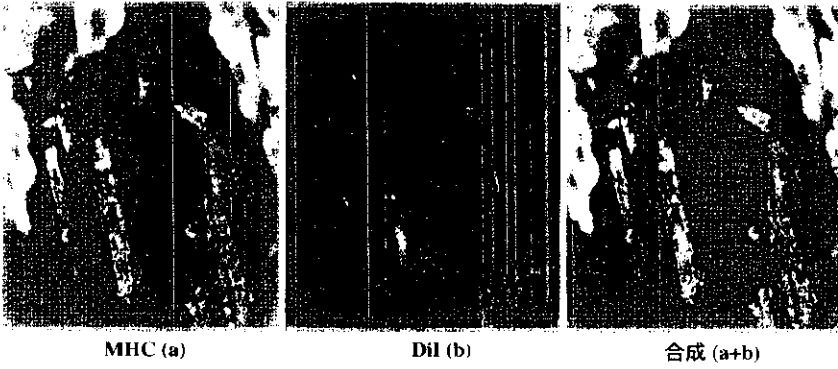


図1：骨髄由来細胞から分化した心筋細胞。(a) myosin heavy chain (緑)。(b) Dil (赤)。(c) aとbの合成像

図2

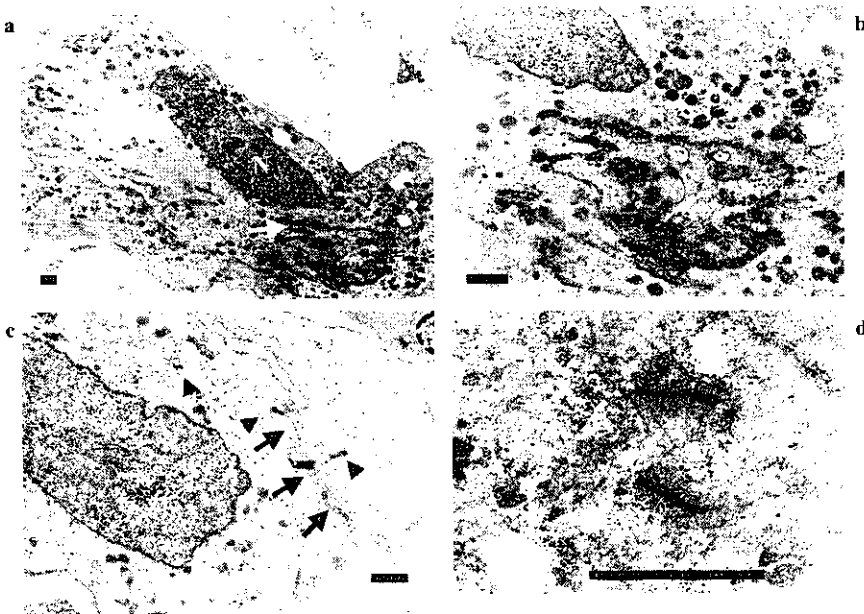


図2：骨髄移植施行後7日経過した梗塞心筋組織内に存在する未熟心筋細胞の超微形態。(a) electron-lucentな細胞質内にmyofilamentが密に存在するもの、Z-bandが認められない。非常に発達した介在板が存在する。(b) 高倍率で観察した介在板。(c) Z-band様構造が散在する細胞。(d) 高倍率で観察したZ-band様構造。N、核。Bar=1 μm。N、核。→：介在板。▲：Z-band。

図3

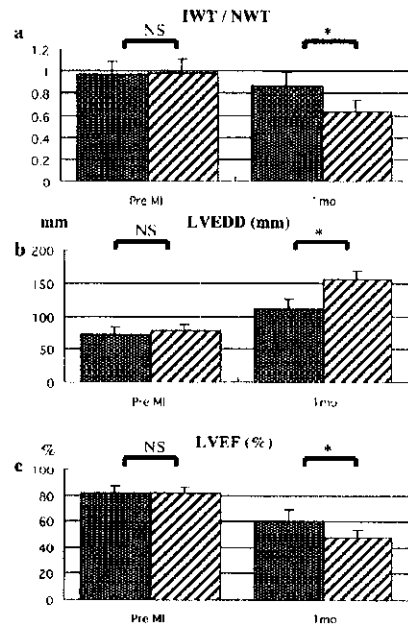


図4

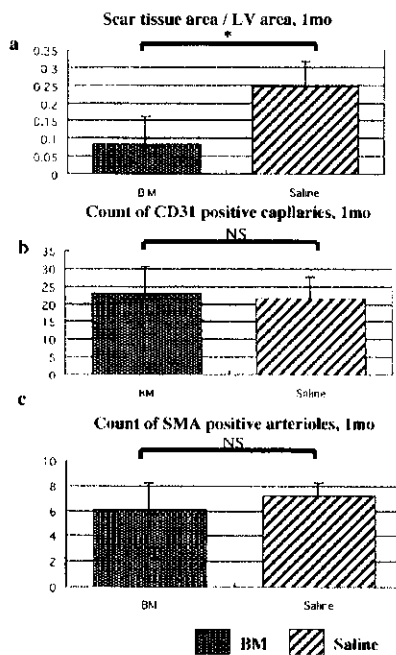


図3：心臓超音波検査による虚血前および虚血・再灌流後慢性期の心機能評価。(a) 梗塞壁厚/正常壁厚比。(b) 左室拡張末期径。(c) 左室駆出率。(NS、有意差なし *、 $p < 0.05$)

図4：虚血・再灌流後慢性期の(a) myosin heavy chain染色切片上での陈旧性梗塞巣面積/全左室面積比 (b) risk area内のCD31陽性毛細血管数 (c) risk area内の α -smooth muscle actin陽性細胞脈数 (NS、有意差なし *、 $p < 0.05$)

—平成13年度研究報告書—

心筋細胞のFas誘導性アポトーシスに対する抵抗性のメカニズム
—MKP-1過剰発現によるJNK活性化の抑制—

岐阜大学医学部第二内科

竹村元三・青山琢磨・丸山留美・香田雅彦・早川健司・川瀬幸典

湊口信也・藤原久義

同循環器再生医学講座

高橋知之・小財健一郎

【研究要旨】

最近われわれは培養心筋細胞のアポトーシスはFas刺激単独では誘導されないが、転写阻害剤であるactinomycin D (AD)を少量同時投与することにより誘導されることを報告した。しかしながら、その分子機構は解明されていない。今回、われわれは「Fas単独刺激は心筋細胞においてアポトーシス促進過程を活性化するのみならず、同時にその過程の一部を不活化しており、その不活化はADにより解除される。」という仮説をたて、心筋細胞におけるFas下流の分子機構の解明を試みた。新生児マウスより単離培養した心筋細胞に対し、アゴニスト抗Fas抗体 (FA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)によるFas刺激をAD (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下で行ったところ(FA+AD)、Fasの過剰発現、Fas下流のシグナル伝達経路のうち"alternate pathway"に位置するc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化、Baxの過剰発現、caspase-3の活性化、Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD)の不活化（すなわちCADの活性化）、そしてDNA断片化ならびにアポトーシスの形態が観察された。FA単独ないしAD単独では上記の変化はみとめられなかった。一方、FA単独刺激により、JNKを含むMitogen-activated protein kinases (MAPKs)を不活化するmitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) mRNAの過剰発現がみとめられた。このMKP-1 mRNA過剰発現はFA+ADあるいはAD単独では生じなかった。MKP-1に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドで前処理した心筋細胞はFA単独刺激によりアポトーシスに陥った。これに対し、JNK1に対するアンチセンスで前処理した心筋細胞はFA+AD刺激によってもアポトーシスに陥らなかった。一方、FA+AD処理によりFas下流の"Classic pathway"に位置するCaspase-8の活性化はみられず、またp38 MAPKやextracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化もみとめられなかった。以上より、1) FA+ADによる心筋細胞のアポトーシスはJNK, Bax, Caspase-3, CADを介するalternate pathwayに依存し、これにはFasの過剰発現というポジティブフィードバック機構も含まれる。2) Fas刺激にてMKP-1が過剰発現しJNKの過剰な活性化を抑制する。これがFas単独刺激では心筋細胞のアポトーシスがおこらない理由と考えられた。

【研究目的】

Fas/Fasリガンド系は種々の細胞においてアポトーシスを誘導する。しかしながらある種の細胞においては、Fas刺激単独ではアポトーシスは誘導されない。この場合、actinomycin Dなどの転写阻害剤あるいはcycloheximideなどの蛋白合成阻害剤を少量、同時投与することによりアポトーシスが誘導される。われわれは培養心筋細胞がこの範疇に属する細胞であることを報告した(1-3)。

現在、本現象の分子機構は未だ解明されていない。そこでわれわれは以下の仮説を立てた。「Fas刺激はアポトーシス促進シグナル伝達を活性化する一方で、同時にその一部を抑制している。その抑制はactinomycin D等の転写阻害剤により解除され、アポトーシスが実行される。」本研究では培養心筋細胞におけるFas刺激の下流のシグナル伝達の解明を試みた。

【研究方法】

新生児マウス(BALB/C)より単離、5%FBS含有MEMにて培養した心筋細胞に対し、vehicle (PBS)、アゴニスト抗Fas抗体 (FA, 1 μ g/ml, Pharmingen)単独、actinomycin D (AD, 0.05 μ g/ml, Sigma)単独、あるいは両者の併用 (FA+AD)にて、刺激した。細胞死はトリパンブルーによる色素排除法で判定した。アポトーシス関連蛋白、すなわち extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)ならびにそれぞれのリン酸化蛋白 (p-ERK, p-Jun, p-p38 MAPK)、およびcaspase-8の蛋白発現レベルの定量化をWestern blot法で行ない、Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1)のmRNAの定量をNorthern blot法で行った。さらにJNK1, MKP-1のantisense oligonucleotide(AS)で前処理した心筋細胞に対しFas刺激を行い、細胞死を判定した。

【研究結果】

心筋細胞において抗Fas抗体単独ではJunのリン酸化はみられず、すなわちc-Jun N-terminal kinase (JNK)活性化はみとめられなかったが、AD存在下(FA+AD)では刺激後30分後よりJNK活性化がみられた(図1)。ADのかわりにフォスファターゼ阻害剤 vanadateを用いた場合でもJNK活性化がみられた。一方、いずれの刺激によってもERK, p38 MAPKのリン酸化はみとめられなかった。

次にMAPKsを脱リン酸化により不活化するMKP-1の発現を調べた。図2に示すように、抗Fas抗体単独刺激により、心筋細胞においてMKP-1のmRNAは時間依存性に増加した。ところが、ADの同時処理によりこの増加は抑制された。

次にASを用い、MKP-1ならびにJNKの機能を抑制し、Fas刺激に対する感受性の変化を調べた。心筋細胞をMKP-1のASで前処理すると、Fas単独刺激で心筋細胞死がみられ、その程度はASの用量に依存していた(図3)。逆に、JNK1のASで前処理すると、FA+AD刺激によっても心筋細胞死がおこりにくくなり、その程度はASへの用量依存を示した(図3)。

Western blot法で培養心筋細胞にcaspase-8のバンドが確認されたが、その活性型の発現はいずれの刺激によっても見られなかった。

【考察】

Fas刺激の下流には”classic pathway”と”alternate pathway”の2つの異なるシグナル伝達経路がいくつかの細胞種で確認されているが(4,5)、心筋細胞においては不明である。Classic pathwayではFas刺激後、Fas-associated death domain (FADD)を介してcaspase-8の活性化がおこる。活性化型caspase-8は直接あるいはミトコンドリアcytochrome c依存性にcaspase-3を活性化する。今回の結果では、caspase-8の活性化はみとめられず、したがってFas刺激による心筋細胞アポトーシスはclassic pathwayに依存しないと考えられる。Kosekiらはアポトーシス阻害作用を有するapoptosis repressor with the caspase recruitment domain (ARC)が骨格筋ならびに心筋に特異的に発現していることを報告した(6)。ARCはFADDとcaspase-8の結合を競合的に阻害し、caspase-8の活性化を抑制する。本研究におけるcaspase-8の非活性化はARCに関連した現象である可能性がある。

Alternate pathwayではまずFas結合蛋白DaxxがFasに結合する(5)。DaxxはMAPK kinase kinaseであるapoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1)を活性化し、JNKならびにp38 MAPK経路を活性化する(4,5)。JNK, p38MAPKはAP-1などの転写因子を活性化してアポトーシス誘導の方向へ作用すると考えられている(7)。図4に培養心筋細胞におけるFas刺激下流のシグナル伝達の仮説を呈示する。われわれは本研究ならびに以前の研究にて、FA+AD刺激は心筋細胞では、JNK活性化、Bax蛋白の上昇、caspase-3活性化、最終的にDNA断片化とアポトーシス形態を誘導することを明らかにした。すなわち、心筋細胞のFA+AD刺激によるアポトーシスのシグナル伝達経路はJNK活性化を含むalternate pathwayであることが示された。

これらの現象はFA単独あるいはAD単独刺激ではおこらなかった。一方、JNKを不活化するMKP-1のmRNAレベルの上昇がFA単独刺激にて見られ、この上昇はADの同時処理(FA+AD)にて抑制された。MKP-1のASにより心筋細胞を前処理すると(すなわちMKP-1の機能をブロックすると)、その細胞はFA単独刺激だけで細胞死が誘導されるようになり、逆に、JNK1のASにて心筋細胞を前処理すると(すなわちJNK1の機能をブロックすると)、細胞はFA+ADで刺激されても死ななくなった。したがってFA単独刺激で心筋細胞においてアポトーシスが誘導されないのは、FAによりJNKを不活化するMKP-1が過剰発現されるからと推察される。そしてADはこのMKP-1過剰発現を抑制することにより、FA+AD刺激で心筋細胞のアポトーシスが実行される。

【結論】

- 1)培養心筋細胞のFas誘導性アポトーシスのシグナル伝達経路はJNK活性化を含むalternate pathwayである。
- 2)Fas刺激単独で心筋細胞においてアポトーシスが誘導されないのは、Fas刺激によりJNKを不活化するMKP-1が過剰発現されるためであり、ADはこのMKP-1過剰発現を抑制する。

【参考文献】

1. Takemura G, Kato S, Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi S, Fukuda K, Fujiwara T, Fujiwara H. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *J Pathol.* 2001; 193: 546-556.
2. Maruyama R, Takemura G, Aoyama T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Qiu X, Ohno Y, Minatoguchi S, Miyata K, Fujiwara T, Fujiwara H. Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy -Beating and rate are associated with the apoptotic process. *Am J Pathol.* 2001; 159: 683-691.
3. 青山琢磨、竹村元三、早川健司、香田雅彦、川瀬幸典、丸山留美、湊口信也、藤原久義、藤原兌子。Fas誘導性新生児マウス心筋細胞アポトーシスにおけるアポトーシス関連因子の発現。厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班平成11年度研究報告集p.53-56, 2000
4. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; 275: 90-94.
5. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89: 1067-1076.
6. Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 5156-5160.
7. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331.

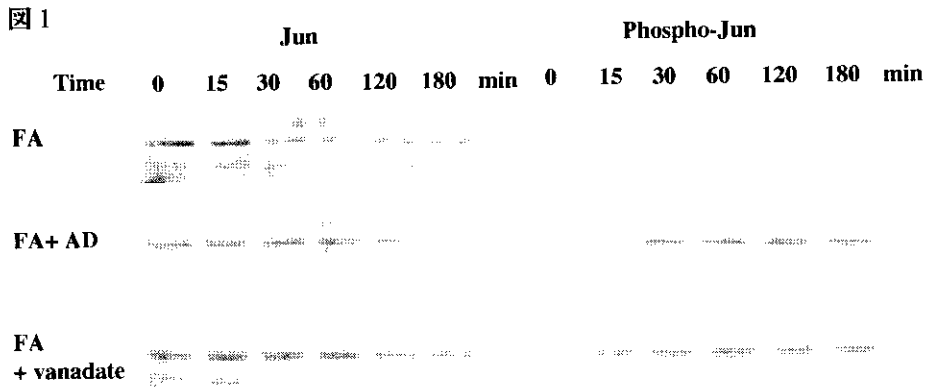


図1 Fas刺激による心筋細胞におけるJunのリン酸化。Western blot法にてFas刺激単独ではリン酸化されたJun (p-Jun)、すなわちJNKの活性化は見られないが、ADあるいはvanadateの同時投与によりp-Junのバンドが出現する。

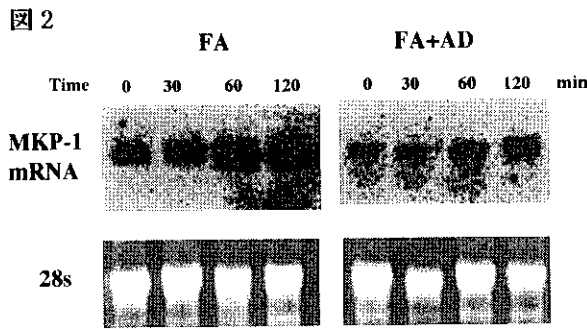


図2 Fas単独刺激による心筋細胞におけるMKP-1 mRNAの過剰発現 (Northern blot法)。これはADの同時処理(FA+AD)により抑制される。

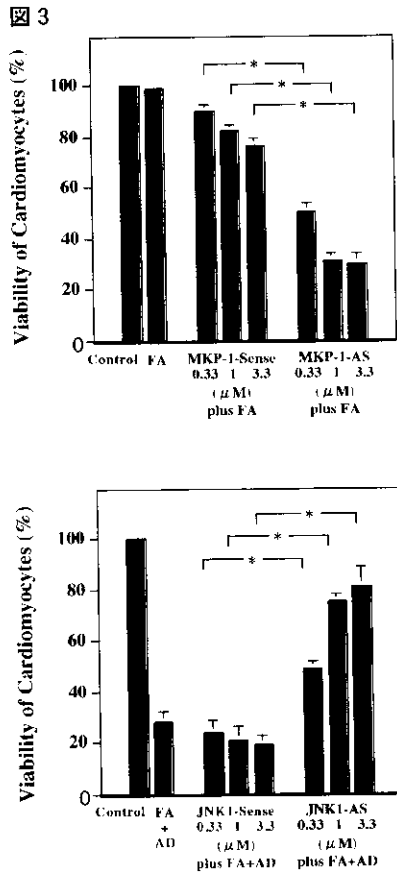


図3 MKP-1, JNK1のantisense oligonucleotide前処置による心筋細胞のFas感受性の変化。心筋細胞をMKP-1のASで前処理すると、Fas単独刺激で心筋細胞死がみられ、その程度はASの用量に依存した。逆に、JNK1のASで前処理すると、FA+AD刺激によっても心筋細胞死がおこりにくくなり、その程度はASへの用量依存を示した。

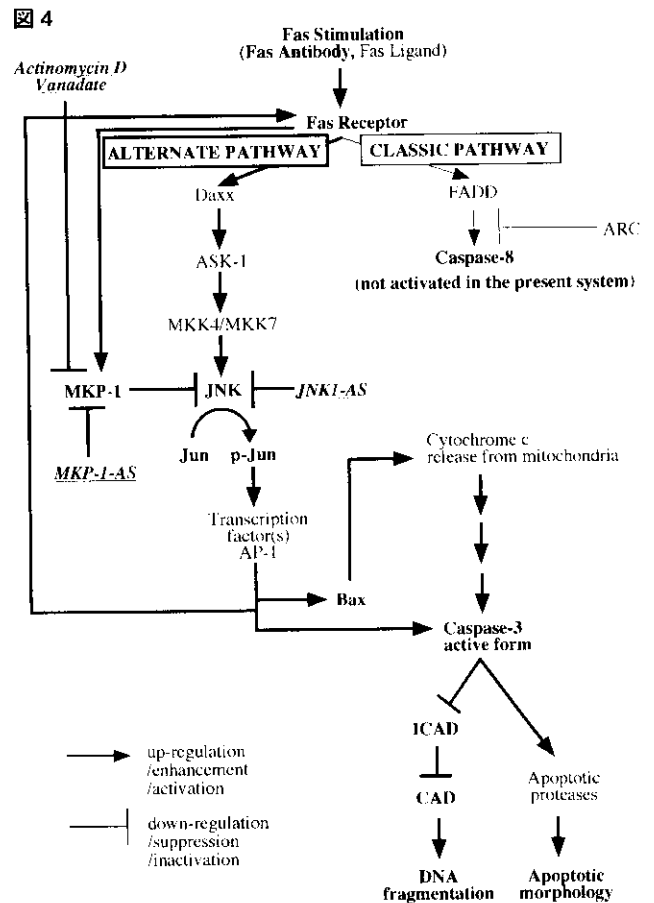


図4 本実験より推察される培養心筋細胞におけるFas刺激のシグナル伝達。

心筋炎惹起性 T 細胞移入による実験的持続活動性心筋炎の解析

北里大学内科学 II 竹端 均、

猪又孝元、西井基継、中畑潤一、和泉 徹

【研究要旨】

拡張型心筋症の病態成因の一つに自己免疫性T細胞クローンによる活動性心筋炎の発症・増悪・持続が考えられている。本研究では、心筋炎惹起性T細胞株の樹立と移入実験による経時的サイトカイン messenger RNA (mRNA)の発現とT細胞受容体レパートリーの検討を行った。肉眼的心筋炎は4日目より認め、少なくとも180日目まで持続していた。組織学的にも4日目で炎症細胞浸潤および心筋細胞の融解・断列を認め、9日目に炎症のピークを認めた。180日目にはほとんどの部位が線維化に置き換わっていたが、極一部に線維化を伴わない炎症細胞の浸潤および心筋細胞の融解・断列を認め活動的な炎症の持続が認められた。心筋細胞におけるサイトカイン mRNA は、Th1 サイトカインおよび Th2 サイトカインは共に9日目でピークを認め、以後減少していた。また、180日目においても Th1 サイトカイン mRNA の出現を認めた。心筋細胞における T 細胞 β 鎖受容体レパートリーの検索では、急性期から慢性期にかけて限局化が認められた。

【研究目的】

拡張型心筋症は左室内腔の拡大と壁運動低下をきたす疾患群であり、終末像では心臓移植が必要な致死的疾患である。しかし、その病因究明はいまなお不十分である。現在、拡張型心筋症の病態成因の一つにウイルス感染を契機とし分子相同性の機構を介した自己免疫性T細胞クローンによる活動性心筋炎の発症・増悪・持続が考えられている。小玉らは心筋ミオシン感作にてラット重症心筋炎を創成することに成功し(実験的自己免疫性心筋炎; experimental autoimmune myocarditis: EAM)、また繰り返し感作することにより拡張型心筋症(自己免疫性心筋症)が発症されることを見出した(1)。本モデルはCD4陽性T細胞による細胞性免疫が主病態を形成する。即ち、自己免疫性心筋炎における細胞性免疫機序を解明することは、ヒト拡張型心筋症の発症・増悪・持続を知るうえで極めて重要である。最近、Wegmann らは心臓構成蛋白であるミオシンの一部のペプチド

(CM2; a.a.1539-1555)に特異的に反応するCM2特異的T細胞株を樹立した。このCM2特異的T細胞株をナイーブリスラットに移入すると心筋炎を発症する(Transfer Myocarditis: TM)ことが報告されている(2)。

一方、多くのサイトカインが心筋細胞障害や心機能に影響を与えることが知られ、心疾患の病態形成に対して各種免疫系因子の関与が注目されている。

本研究では、心筋炎惹起性T細胞株の樹立と移入実験による経時的サイトカイン messenger RNA (mRNA)の発現とT細胞・鎖受容体レパートリーの検討を目的とする。

【研究方法】まず、ミオシンにおけるT細胞エピトープであるCM2ペプチド(a.a.1539-1555)を抗原として、CM2特異的心筋炎惹起性T細胞株の樹立を試みた。6週齢雌リスラットにCM2ペプチド(2.5mg)を等量の完全フロイドアジュバントと混合し総量0.5mlを皮下注射しEAMを作製した。免疫後9日目にリンパ節から細胞を分離し、CM2ペプチド50 μ l(100mg/ml)で刺激を加え、再刺激用培養液(Complete medium: Dulbecco's modified eagle medium, 1% 非必須アミノ酸, 1% グルタミン, 1% L-アスパラギン, 1% ピルビン酸ナトリウム, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン, 5 X 10⁻⁵ β 2-メルカプトエタノール ; 1% 自家血清)内で培養を開始した。2-3日後に重層法にて活性化細胞を抽出した後、増殖用培養液(Complete medium + 10% Con A 培養上清 + 10% ウマ血清)内で培養を継続した。培養細胞が静止期に入った5-7日後、各抗原と照射(5000 rad)済自家胸腺細胞とともに培養T細胞を再刺激用培養液内で再刺激した。その後は同様に細胞増殖をはかり、これらの過程を必要細胞数が得られるまで繰り返した。これらの細胞を抗原特異性試験およびリスラットに細胞移入した。抗原特異性試験は、96well U 底プレートを用い、3x10⁴/wellのT細胞、1x10⁷/wellの照射済自家胸腺細胞、および抗原としてCM2(細胞樹立時と同最終濃度)およびPPD(10 mg/ml)、Con A(2.5 mg/ml)を200 mL/wellの再刺激用培養液内で48時間反応させた。0.5 mCi/wellの³H-サイミジンを加え18時間後に回収し放射活性を測定した。細胞移入は、再刺激直後のT細胞1x10⁷/匹をナイーブな5週令リスラットの尾静脈より静注投与し、21日後に屠殺した。屠殺後心臓は肉眼的観察を行なった後、ホルマリン固定させ、ヘマトキシリン・エオジン染色にて顕微鏡学的検索を行なった。図1に示した

ように、抗原特異的試験においては CM2 および Positive control である Con Aのみ反応し、CM2 に対する特異性を認め、またナイーブルイスラットへの移入実験では、肉眼的・組織学的に心筋炎の発症を認めた。つまり、CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞株が作製できた。この細胞株をルイスラット一匹あたり $1 \times 10^7 / 0.5 \text{ ml}$ を尾静脈より移入した。移入後 4、9、18、40、180 日目(各々 $n=5$)に肉眼的および組織学的に心筋炎を評価した。コントロールとしては 180 日目相当のルイスラットを用いた($n=3$)。肉眼的評価としては、心体重比および肉眼的スコアを用いた。肉眼的スコアとは具体的には、0 点:心筋炎なし、1 点:一ヶ所のみ白い斑点がある、2 点:白い斑点が 2 ヶ所以上あり、かつ全表面面積の 1/3 未満である、3 点:白い斑点が 2 ヶ所以上あり、かつ全表面面積の 2/3 未満である、4 点:白い斑点が 2 ヶ所以上あり、かつ全表面面積の 2/3 以上である。組織学的評価としては、心臓横断切片を 10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後ヘマトキシリン・エオジン染色にて顕微鏡学的検索を行なった。4、9、18、40、180 日目(各々 $n=5$)における心筋組織のサイトカイン mRNA の発現を RNase protection assay にて評価した。心筋組織から ISOGEN 法(Nippon gene)にて RNA を抽出した。rCK-1 multi-probe template sets (Pharmingen)と [^{32}P] UTP にて合成されたプローベと抽出した RNA をハイブリダイゼーションした。これを、5%アクリラマイド尿素ゲルで電気泳動した。泳動後乾燥したゲルをイメージングプレートに挟み、その後 Image Analyzer (FLA 2000, FUJIFILM)で測定した。個々のサイトカイン mRNA 濃度を標準化するために個々の GAPDH の濃度で割った。4 日目の値を 100%として示した。また、各々の心筋 RNA を Goldらの報告(3)に基づく T 細胞受容体 V \cdot 鎖プライマーを用いて、Taq polymerase(TAKARA)にて RT-PCR を施行した(94°C, 45 秒 + 58°C, 1 分 + 72°C, 1 分; 30 サイクル)。

【結果と考察】

肉眼的スコアおよび心体重比はコントロールに比し 4 日目より高値を認め 180 日目まで持続していた(図2)。組織学的にも 4 日目で炎症細胞浸潤および心筋細胞の融解・断列を認め、心筋炎所見として観察された。炎症細胞浸潤は 4 日目では右室の心外膜側のみに認めたのみであったが、9 日目には左室広範囲に炎症が普及した。18 日目に炎症細胞浸潤は軽減し、若干の線維化が出現していた。40 日目には更に線維化が進行して

いた。180 日目にはほとんどの部位が線維化に置き換わっていたが、極一部に線維化を伴わない炎症細胞の浸潤および心筋細胞の融解・断列を認め活動的な炎症の持続が認められた(図3)。

心筋細胞におけるサイトカイン mRNA は、インターロイキン (IL)-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF)- α およびインターフェロン (IFN)- γ などの Th1 サイトカインおよび IL-4 と IL-10 などの Th2 サイトカインは共に 9 日目でピークを認め、以後減少していった。また、180 日目においても Th1 サイトカイン mRNA の出現を認めた(図4)。

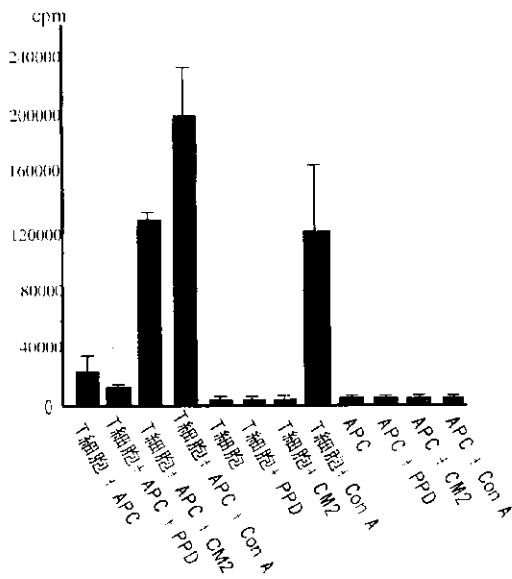
心筋細胞における T 細胞 β 鎖受容体レパートリーの検索では、炎症極期の 9 日目にバンドが認められた V β 1, 2, 5.1/5.2, 6, 8.1/8.2, 8.5, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 に対し 180 日目までバンドが持続して認められたのは、V β 2, 11, 13, 14, 16, 17, 19 であり、T 細胞 β 鎖受容体レパートリーの限局化を認めた(図5)。

CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞株を用いて自己免疫性心筋炎を細胞性免疫の面から検討した。従来までのミオシンの免疫による実験的自己免疫性心筋炎は、一過性の炎症経過をたどり免疫後 40 日目には炎症細胞浸潤は消失し線維化に置き換わっている(4)。しかし、CM2 特異的心筋炎惹起性 CD4 陽性 Th1 細胞株を移入した心筋炎は、少なくとも移入後 180 日目まで活動性心筋炎が持続しており、慢性心筋炎モデルとして注目できる。このモデルにおいてサイトカイン mRNA の動向を明らかにした。従来までのミオシンの免疫による実験的自己免疫性心筋炎は、炎症極期から終息期にかけて、Th1 から Th2 サイトカインにシフトすることが報告されている(5)。本慢性心筋炎モデルでは、Th1 と Th2 サイトカインが同様な推移を示した。注目すべきことは、180 日目においても Th1 サイトカインが出現していたことである。このことが、炎症が持続している原因の一つの可能性はある。また、限局された T 細胞 β 鎖受容体レパートリーが急性期から慢性期にかけて限局化されており、心筋炎の慢性化に関与していると考えられた。今回の結果から、心筋炎惹起性 T 細胞株による活動性心筋炎は慢性化することが証明され、T 細胞 β 鎖受容体が限局化されてきたことより慢性化する原因 T 細胞クローンは数種に絞り込める具体的可能性が出てきた。今後、更に CDR3 領域の特異性からも解析していく必要がある。

【参考文献】

- (1) Kodama M, et al.: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol of Immunopathol*, 57: 250-262,1990.
- (2) Wegmann KW, et al.: Identification of myocarditogenic peptides from cardiac myosin capable of inducing experimental allergic myocarditis in Lewis rats. *J Immunol*, 153: 892-900,1994.
- (3) Gold DP, et al.: Characterization of the immune response to a secondary encephalitogenic epitope of basic protein in Lewis rats. *J Immunol*, 148: 1712-1717,1992.
- (4) Izumi T, et al.: Experimental autoimmune myocarditis and its pathomechanism. *Herz* 25: 274-8,2000.
- (5) Okura Y, et al.: Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 491-502,1997.

図1



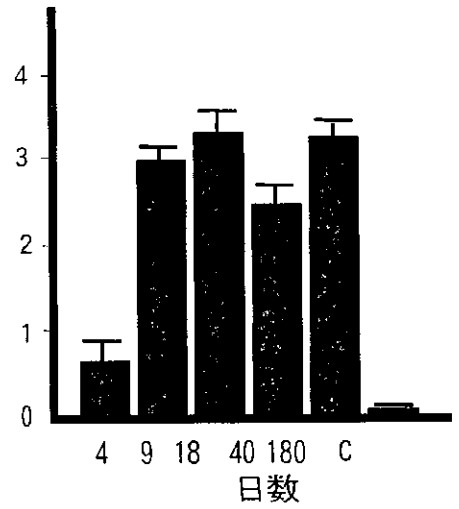
組織 (ルイスラットへの移入後20日目)



図1: ラット CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞の抗原特異的試験(左図) およびブレイズラットへ移入後 20 日目の組織像(右図)

図2

肉眼的スコア



心重量 (g) / 体重 (kg)

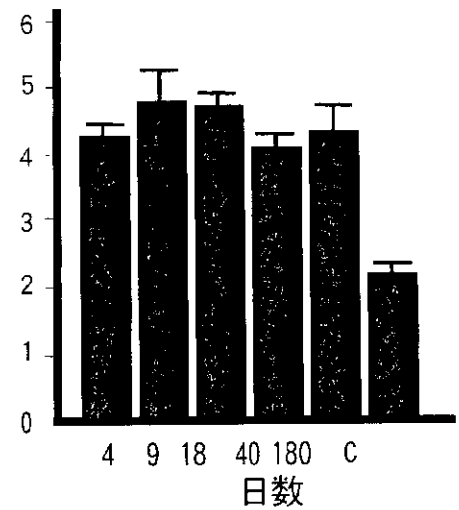


図2: 肉眼的スコア(左図)および心体重比(右図)

図3

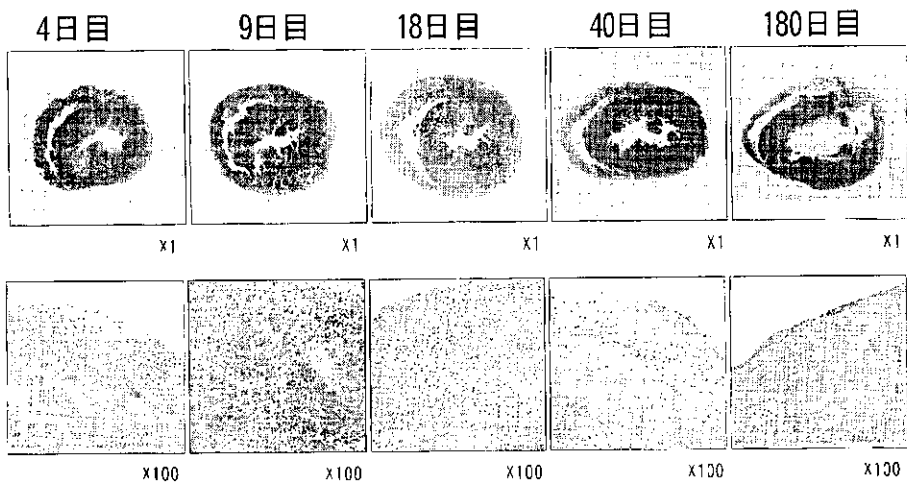


図3: 4, 9, 18, 40, 180 日目に於ける典型的組織像。A&F: 4 日目, B&G: 9 日目, C&H: 18 日目, D&I: 40 日目(x1), E&J: 180 日目(x1) (ヘマトキシリン・エオジン染色: A-E: x 1, F-J: x 100)

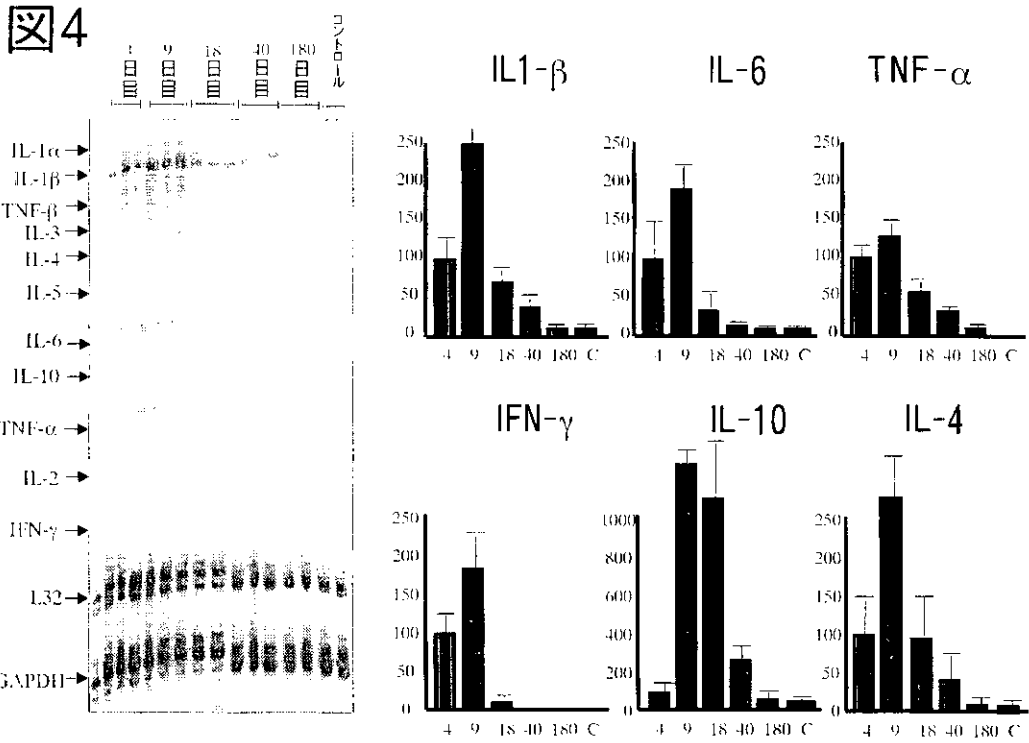


図4: 心筋組織におけるサイトカインのRNase protection assayの代表例(左図)。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-4 mRNAをGAPDHで補正し、4日目を100%に標準化した(右図)。C: コントロール(180日目の正常ルイスラット)

図6

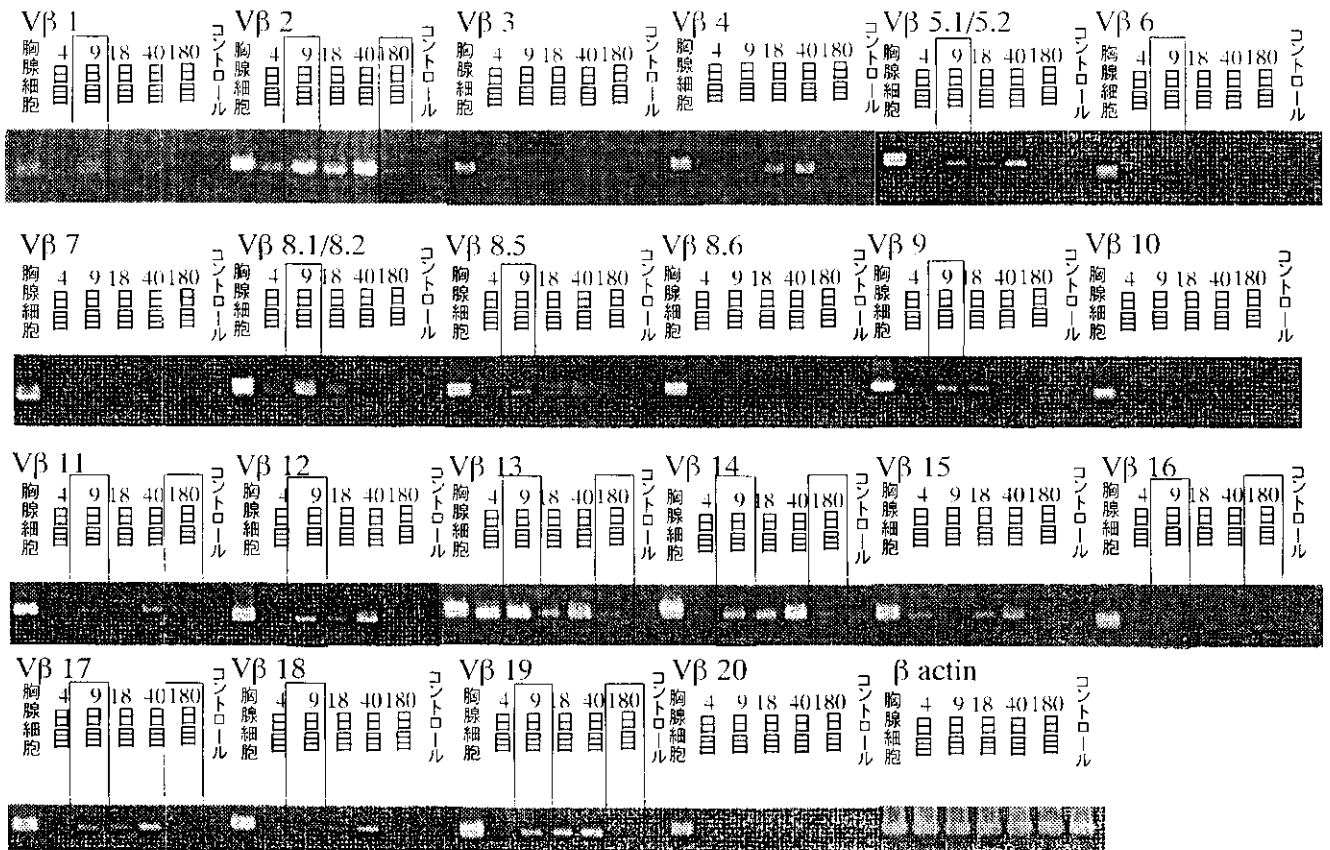


図5: 心筋細胞におけるT細胞 β 鎖受容体レパートリーのRT-PCR典型例

SCID マウスを用いたラット自己免疫性心筋炎惹起性 T 細胞株の異種間細胞移入

北里大学医学部内科学Ⅱ 竹端 均、

猪又孝元、西井基継、松田千絵子、河野 健、

町田陽二、中畑潤一、和泉 徹

【研究要旨】

心筋ミオシン免疫による実験的自己免疫性心筋炎は、ヒト心筋症・心筋炎における自己免疫機序解明における有力な実験モデルとして汎用されてきている。心筋ミオシンの T 細胞エピトープの一つである CM2 ペプチド (a.a.1539-1555)を用いて、ラット心筋炎惹起性 T 細胞株の樹立を行い、その細胞株を SCID マウスへ移入し、種を越えて心筋炎惹起能があるか否かを検討した。心筋炎は全てにおいて認められ、また、移入する細胞数が多いほど、心筋炎は重症化した。

【研究目的】

ヒト拡張型心筋症の病態成因の一つとしてウイルス感染を契機として分子相同性の機構を介した自己免疫性 T 細胞クローンによる活動性心筋炎の慢性化機転が考えられている。しかし、直接的な確証にいたる報告は皆無であり、その背景として心筋炎惹起性 T 細胞株を樹立できてこなかったことが、拡張型心筋症の自己免疫関与の証明に大きな支障をきたしていると考えられる。

現在のところ心筋ミオシンの T 細胞エピトープは 5 つ発見されており、その中でルイスラットにおける T 細胞エピトープは、図 1 に示す No2 と No5 の二つである。それぞれを用いて、T 細胞株の樹立を試みたところ No2 のエピトープに対する細胞株の樹立に成功した。また、この細胞株をルイスラットに移入すると心筋炎を発症することを確認している。今後、この手法を用いてヒト拡張型心筋症における T 細胞株を樹立できた際、その T 細胞株が心筋炎惹起能があるか否かを確認する方法が必要となる。

近年拡張型心筋症患者のリンパ球を SCID マウスへ移入したところ、SCID マウスの左室径は増大したことが報告された(1)。今回我々は、ラット心筋炎惹起性 T 細胞株の細胞移入により SCID マウスへの心筋炎惹起が可能か否