

かを検討した。

【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) (2)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 週齢雌ルイスラットに 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% ビ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ルイ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 週令ルイ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 2 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 SCID マウス一匹あたり 1x10⁷ 又は 2.5x10⁷/ 0.5ml を腹腔内より移入した。移入後 20 日目 (各々 n=3) に肉眼的および組織学的に心筋炎を評価した。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・エオジン染色し観察した。

【結果と考察】

SCID マウスへの移入実験では、全例で肉眼的および組織学的に心筋炎の発症を認め、細胞数の増加につれて心・体重比では差がないものの心筋炎は重症化していた(表1)。また、皮膚所見や下痢もなく、肉眼的にはGVHDは起こしていないと思われた。組織学的には、単核球と多核球とからなる細胞浸潤と心筋細胞の融解、間質の線維化像を認め、細胞移入によるラット自己免疫性心筋炎の像と類似していた(図3)。しかし、ミオシン免疫によるEAMに特徴的な巨細胞は認められなかった。

自己免疫性心筋炎では3分子複合体を介し、すなわち、抗原提示細胞上に提示された心筋ミオシン内の約10-20アミノ酸からなるエピトープをT細胞受容体が認識し、活性化したT細胞が主体となって心筋の炎症病変を形成するT細胞免疫応答が働いている。そこで、ラットCM2特異的心筋炎惹起性T細胞と抗原提示細胞との反応をみるため、抗原特異的試験を施行した。SCIDマウスの抗原提示細胞はSCIDマウスのバックグランドであるBalb/cマウスの胸腺細胞と脾細胞を用いた。コントロールであるルイスラットの胸腺細胞と脾細胞にはCM2特異的に反応があったが、SCIDマウスのバックグランドであるBalb/cマウスの胸腺細胞と脾細胞では、CM2において反応は認められなかった(図4)。つまり、本モデルは、1)ヒト心筋炎惹起性T細胞株の病変惹起性の証明手段、2)異なるMHC拘束下での病変惹起の意義付け、を検討するのに有用な手段と考えられた。

【結論】

我々は、ラットCM2特異的心筋炎惹起性T細胞株の樹立に成功した。ラットCM2特異的心筋炎惹起性T細胞株をSCIDマウスへ移入すると、心筋炎の発症を認めた。

【参考文献】

- (1) Omerovic E, et al.: Induction of cardiomyopathy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*, 32:271-280,2000.
- (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.

図1

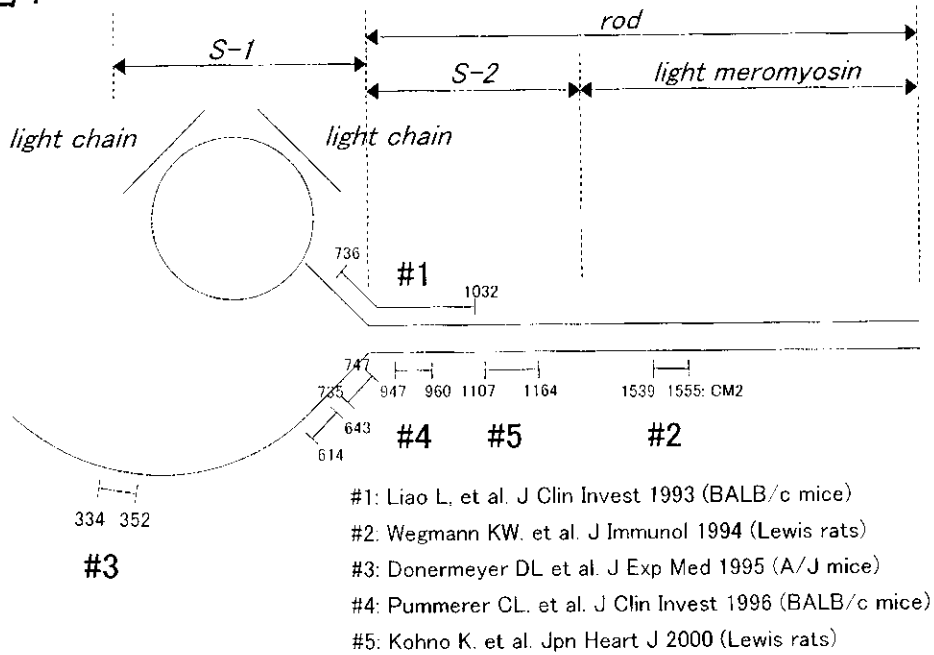


図1: 心筋ミオシンの分子構造と T 細胞エピトープ(心筋炎惹起ペプチド)の存在部位。

図2

抗原特異的試験 (^3H -thymidine uptake)

組織 (ナイーブリスラットへの移入後20日目)

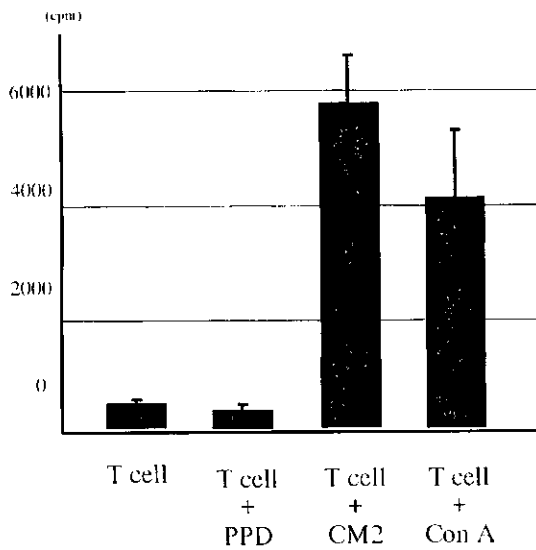


図2: ラット CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞の抗原特異的試験(左図)およびナイーブリスラットへ移入後 20 日目の組織像(右図;ヘマトキシリン・エオジン染色 X100)。

図3



図3: CM2 特異的心筋炎惹起 T 細胞株の SCID マウスへの細胞移入による心筋炎の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色, (A: X 1, B: X 40, C: X 200)).

図4

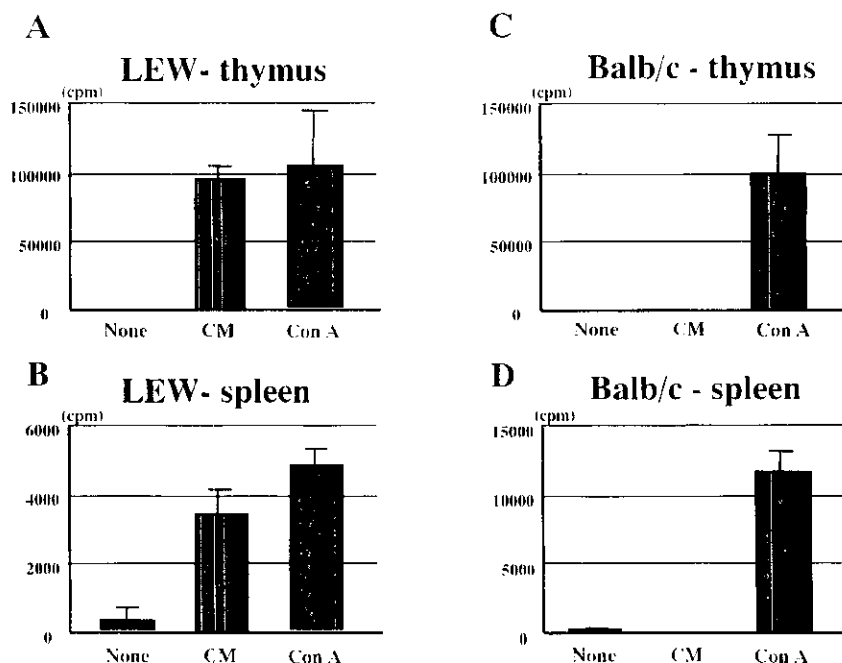


図4: 各抗原提示細胞におけるラット CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞の抗原特異的試験 (A: ルイスラット胸腺細胞、B: ルイスラット脾細胞、C: BALB/C マウ胸腺細胞、D: BALB/C マウ脾細胞)。

表1

| | 細胞数 | 体重 (g) | 心筋炎スコア | 心室液 | 胸水 | 心重量 (g) | 心/体重 |
|---|-------------------|--------|--------|-----|----|---------|-------|
| 1 | 1×10^7 | 19.2 | 1 | なし | なし | 0.112 | 0.583 |
| 2 | 1×10^7 | 19.6 | 1 | なし | なし | 0.101 | 0.515 |
| 3 | 1×10^7 | 21.8 | 1 | なし | なし | 0.117 | 0.536 |
| 4 | 2.5×10^7 | 20 | 1 | なし | なし | 0.107 | 0.535 |
| 5 | 2.5×10^7 | 21.5 | 4 | なし | なし | 0.099 | 0.460 |
| 6 | 2.5×10^7 | 21.5 | 2 | なし | なし | 0.113 | 0.525 |

表1: ラット CM2 特異的心筋炎惹起性 T 細胞株の SCID マウスへの移入実験結果。

心臓サルコイドーシス患者心筋における 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインの発現に関する研究

大阪医科大学第三内科

寺崎文生・浮村 聡・下村裕章・東口治弘・神崎裕美子・出口寛文・北浦 泰
葉山ハートセンター心臓血管外科
堀井泰浩・磯村 正・須磨久善

研究要旨

諸種のサイトカインがサルコイドーシス（サ症）の病因・病態に関与することが報告されているが、心臓サルコイドーシス（心サ症）におけるサイトカインの実態は明らかにされていない。本研究は心サ症患者の心筋組織における炎症性サイトカインの発現とその特徴を明らかにすることを目的として行われた。その結果、心サ症患者の心筋において特異的な炎症性サイトカインの発現亢進が認められ、その多くが 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインであった。1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカイン、とりわけ IL-12 および IFN- γ は心サ症の病因・病態に重要な役割を果たすことが示唆され、心サ症の心筋組織を用いた診断および活動性の評価に際して有用と考えられた。

A. 研究の背景と目的

サルコイドーシス（サ症）は原因不明の全身性多臓器疾患で非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を特徴とする。とりわけ、心臓サルコイドーシス（心サ症）は死因として極めて重要である。心サ症の予後と治療においてはとくに早期診断が重要であるが、心臓以外の他臓器病変の明らかでない場合その早期診断は容易ではない。近年、諸種のサイトカインがサ症の病因・病態に関与することが報告されているが、心サ症におけるサイトカインの実態は明らかにされていない。本研究は心サ症患者の心筋組織における炎症性サイトカインの発現とその特徴を明らかにすることを目的とする。また、それらの結果が心サ症の診断と治療に役立つか否か考察する。

B. 研究方法

拡張型心筋症様病態を呈した心サ症患者 9 例（左室縮小形成術時切除心筋 6 例、生検心筋 2 例、剖検心筋 1 例）および特発性拡張型心筋症（DCM）患者 10 例（左室縮小形成術時切除心筋）を対象とした。左室縮小形成術時切除心筋の一部をホルマリン固定後、パラフィン包埋し HE 染色および諸種サイトカインに対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行いサイトカイン蛋白の局在を検討した。また、下記の定量的 PCR 法を用いて諸種サイトカイン mRNA の発現解析を行った。

本研究施行に際して、研究対象患者に研究目的と方法につき説明を行い承諾（インフォームドコンセント）を得た。

[定量的 PCR 法のプロトコール]

左室縮小形成術時切除心筋の一部は直ちに凍結し、 -80°C に保存、グアネジウムチオサイアネート法による mRNA の抽出を行った。Random hexamers をプライマーとして逆転写反応を行い、ABI 社提供のコントロール用 Human total RNA と切除心筋の RNA から cDNA を作成した。作成した cDNA を用いて ABI 社 PRISM7700 により 12 種のサイトカイン (interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-15, interferon- γ (IFN- γ) および TNF- α) の mRNA について定量的解析を行った。すなわち各々の cDNA に対して、Ribosomal RNA とターゲット遺伝子に対するプライマー、プローブの組を用い、ABI 社 PRISM7700 にて同一チューブでリアルタイムの定量的 PCR を行った。切除心筋におけるターゲット遺伝子の発現量はコントロール RNA 内のターゲット遺伝子の量に対する相対的な値として求めた。

C. 研究結果

[サイトカイン mRNA の定量的 PCR]

検索した諸種炎症性サイトカイン中、IL-1 α 、IL-2、IL-12p40、IFN- γ mRNA が心サ症患者心筋において発現が著明に亢進していた。IL-1 β 、IL-8、IL-10、IL-15、TNF- α の mRNA の発現は心サ症および DCM 両者の心筋に認められた。IL-4 および IL-5 の発現は両疾患ともに認められなかった (表 1)。

[サイトカイン蛋白の局在]

免疫組織学的検索では IL-12 および IFN- γ が心サ症患者心筋において特異的に陽性で IL-12 はサルコイド肉芽腫内の大型単核球および多核巨細胞に、IFN- γ の染色性が一部のリンパ球や血管壁に強く認められた (図 1)。IL-12 と IFN- γ は肉芽腫病変の高度な症例において発現がより高度であった。DCM 患者心筋でも軽度の炎症性細胞浸潤が存在するが、これらにおいては IL-12 および IFN- γ の発現はみられなかった。

D. 考察

諸種のサイトカインがサ症の病因・病態に関与することが報告されているが、心サ症におけるサイトカインの実態は明らかにされていなかった。本研究により心サ症患者の心筋組織における炎症性サイトカインの発現とその特徴が明らかになった。すなわち、特異的な炎症性サイトカインの発現亢進が認められ、その多くが 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインであった。これらは、他の臓器 (主として肺) における過去の報告に類似するものである。また、免疫組織学的検索では IL-12 および IFN- γ が心サ症患者心筋において特異的に陽性で IL-12 はサルコイド肉芽腫内の大型単核球および多核巨細胞に、IFN- γ の染色性が一部のリンパ球や血管壁に認められた。

心サ症の予後と治療においてはとくに早期診断が重要であるが、心臓以外の他臓器病変の明らかでない場合その診断は容易ではない。心サ症の確定診断は心筋生検で非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を証明することに

より行われるが、巨細胞を含む典型的な肉芽腫が認められる機会は少ない。心筋生検で非特異的なマクロファージやリンパ球の炎症性細胞浸潤を観たとき、それらが IL-12 や IFN- γ 陽性であれば、心サ症の可能性があり本症診断の一助になると考えられる。

また、本研究の研究対象患者においては 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインの末梢血レベルは必ずしも上昇しておらず（データ未発表）、末梢血のサイトカインレベルは心筋組織におけるサルコイド肉芽腫の活動性を必ずしも反映しないと考えられる。

E. 結論

心サ症患者の心筋において特異的な炎症性サイトカインの発現亢進が認められ、その多くが 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインであった。1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカイン、とりわけ IL-12 および IFN- γ は心サ症の病因・病態に重要な役割を果たすことが示唆され、心サ症の心筋組織を用いた診断および活動性の評価に際して有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

Expression of helper T cell type 1 cytokines in cardiac sarcoidosis.

第 5 回日本心不全学会 2001 年 10 月

Marked expression of helper T cell type 1 cytokines in cardiac sarcoidosis.

国際心臓研究学会第 18 回日本部会 2001 年 10 月

Enhanced expression of helper T cell type 1 cytokines in myocardium from patients with active cardiac sarcoidosis.
第 66 回日本循環器学会（シンポジウム）
2002 年 4 月

Enhanced expression of helper T cell type 1 cytokines in myocardium from active cardiac sarcoidosis.
International Congress on
Cardiomyopathies and Heart Failure
2002 年 5 月

G. 図表の説明

表 1

心筋組織におけるサイトカイン mRNA の発現。S: 心臓サルコイドーシス D: 特発性拡張型心筋症 n: 検出せず

図 1

左室縮小形成術時切除心筋に認められたサルコイド肉芽腫の抗 IL-12 抗体を用いた免疫組織染色。多核巨細胞（矢印）と大型単核球（類上皮細胞）に高度の染色性が認められる。（ $\times 100$ ）

表 1

| 症例 | 性別 | 年齢 | IL-1 α | IL-1 β | IL-2 | IL-4 | IL-5 | IL-8 | IL-10 | IL-12p35 | IL-12p40 | IL-15 | IFN- γ | TNF- α |
|-----|----|----|---------------|--------------|-------|------|------|-------|--------|----------|----------|----------|---------------|---------------|
| S1 | M | 60 | n | 0.382 | 0.883 | n | n | 0.688 | n | 0.268 | n | 0.142 | 0.0429 | 0.00347 |
| S2 | F | 51 | 53.4 | 526 | 22.5 | n | n | 101 | 0.127 | 5.02 | 22.2 | 5.03 | 128 | 0.693 |
| S3 | F | 59 | 4.38 | 69.6 | 1.34 | n | n | 198 | 0.0237 | 2.81 | 0.865 | 1.95 | 1.67 | 0.179 |
| S4 | F | 50 | 4.72 | 20.6 | 0.35 | n | n | 5.6 | 0.0032 | 1.34 | 0.868 | 0.32 | 45.3 | 0.126 |
| S5 | F | 56 | n | 48.8 | 3.01 | n | n | 89.9 | 0.0424 | 14.92 | 2.53 | 2.85 | 9.51 | 0.551 |
| S6 | M | 36 | 1.72 | 11.5 | n | n | n | 5.84 | 0.0284 | 4.54 | 0.591 | 0.857 | 7.24 | 0.0724 |
| D1 | M | 60 | n | 3.68 | n | n | n | 23.3 | n | 16.16 | n | 0.555 | n | 0.121 |
| D2 | M | 56 | n | 0.525 | n | n | n | 0.358 | 0.0021 | 0.795 | n | 4.21E-01 | n | 0.225 |
| D3 | F | 56 | n | 10.2 | n | n | n | 17.6 | 0.072 | n | n | 0.353 | n | 0.0176 |
| D4 | M | 55 | n | 1.74 | n | n | n | 2.65 | n | 1.41 | n | 0.195 | n | 0.264 |
| D5 | F | 48 | n | n | n | n | n | 0.532 | n | 0.281 | n | 1.19E-01 | n | 0.0404 |
| D6 | M | 65 | n | 3.24 | n | n | n | 0.55 | 0.0025 | 0.58 | n | 3.03E-01 | 0.0096 | 26.4 |
| D7 | M | 61 | n | 0.112 | n | n | n | 0.423 | 0.0016 | 0.807 | n | 1.46E-01 | n | 0.0745 |
| D8 | M | 49 | n | 0.803 | n | n | n | 0.291 | n | 0.554 | n | 7.91E-02 | n | 0.0122 |
| D9 | F | 51 | 17.9 | 103.9 | n | n | n | 63.3 | n | 0.351 | n | n | n | 0.0401 |
| D10 | M | 47 | n | 1.35 | n | n | n | 5.79 | n | n | n | 4.52E-01 | n | 0.0485 |

表 1

大阪医科大学 第三内科 寺崎、北浦

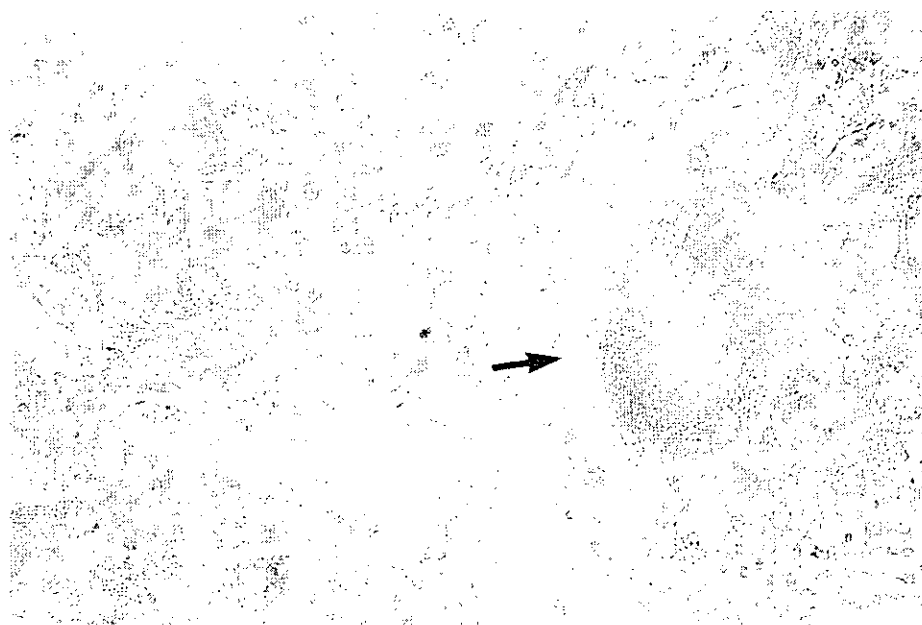


図 1

肥大型心筋症患者におけるCD36欠損症と心筋BMIPPシンチグラムに関する研究

大阪医科大学 第三内科

金高大悟、宗宮浩一、今井 真、田中孝生、北浦 泰

A. 研究目的

肥大型心筋症の一部に脂肪酸代謝異常が示唆されている。以前、我々は心筋細胞膜に長鎖脂肪酸輸送蛋白が存在し、これが血小板・単球の膜蛋白CD36と同一性を有すること、CD36ホモ欠損および、複合ヘテロ異常が心筋BMIPPシンチで欠損をきたすことを報告してきた。そこで、心筋細胞膜における脂肪酸取り込み障害が肥大型心筋症の病因の一部ではないかと考え、血小板・単球のCD36発現異常を検索し、心筋BMIPPシンチグラムとの関係を検討した。

B. 方法

疾患の既往の無い健常者88人(M:49, F:39)と、心疾患を持つ107人(M:75, F:32)そして、心筋脂肪酸代謝シンチで欠損を示した43人(M:26, F:17)、全238名につきCD36蛋白の発現量と、CD36遺伝子型の相関を調べた。遺伝子型はCD36遺伝子のcoding regionを調べた。CD36蛋白の発現量は、抗CD36モノクローナル抗体を用いたMFIによるフローサイトメトリで定量した。

CD36遺伝子型が判明し心筋脂肪酸シンチを行った29名(CD36遺伝子正常者(WT)16名、ヘテロ異常(single mutation:CD36^{+/-})9名、ホモ異常および複合ヘテロ異常(double

mutation:CD36^{-/-})4名)について各CD36遺伝子型ごとにBMIPPシンチの取り込みカウントを心臓/縦隔における集積比(H/M ratio)により半定量化した。尚、WTには健常者6名と心疾患患者10名、CD36^{+/-}には健常者4名と心疾患患者5名、CD36^{-/-}は全員心疾患患者であった。H/M ratioを求める際の関心領域(region of interest: ROI)は、心臓全域と、五箇所に分類した各領域について調べた。本研究施行に際し、研究対象者に研究目的と方法につき説明を行い承諾(インフォームド Consent)を得た。

C. 結果

遺伝子型では、WT、CD36^{+/-}そしてCD36^{-/-}は、141人、44人、53人であった。WT、CD36^{+/-}、CD36^{-/-}それぞれの単球でのMFIでは、 35.7 ± 8.5 、 15.2 ± 3.4 、 0.4 ± 0.3 であった($P < 0.0001$)。血小板ではWT、CD36^{+/-}、CD36^{-/-}それぞれ 27.1 ± 10.6 、 11.5 ± 6.3 、 0.5 ± 0.3 であった($P < 0.0001$) (図1)。2型CD36欠損症に、WTとCD36^{+/-}が認められた。2型CD36欠損症の症例の家族と血縁関係の無い218名の単球と血小板のMFIと血縁関係の無い218名の調べることで、単球でのCD36の発現は遺伝子型に依存していたが、血小板では関連は認められなかった。

BMIPPシンチにおいてH/M ratioは、

WT、CD36^{+/-}、CD36^{-/-}でそれぞれ 2.28 ± 0.10 、 1.90 ± 0.06 、 1.40 ± 0.11 ($p < 0.0001$)であった(図 2, 3)。WT、CD36^{+/-}において、健常者と心疾患患者との H/M ratio を比較すると、有意差は無かった。(WT:健常者 VS 心疾患患者、 2.29 ± 0.08 vs 2.27 ± 0.12 , CD36^{+/-}: 1.90 ± 0.07 vs 1.89 ± 0.05)

D. 考 察

単球の CD36 の発現レベルは遺伝子形に依存していた。CD36 蛋白の血小板特異的な欠損の機序は知られていないが、血小板の MFI 低値の頻度から、CD36 遺伝子とは別に血小板特有の制御因子が継代していることが考えられる。2 型 CD36 欠損症は、14 人認めた。そのうち六名は単球の MFI で中間値をとった。一方、8 名では CD36 遺伝子の coding region で異常は認められず、単球の MFI で正常値をとった。

CD36^{-/-}だけでなく CD36^{+/-}も WT と比べ長鎖脂肪酸の取り込みの有意な低下を認めた。心筋の CD36^{-/-}では肝臓への脂肪酸取り込みが存在するにも関わらず心筋への脂肪酸取り込みを認めないことが知られている。本研究より CD36^{+/-}異常者の心筋における CD36 発現は約半分であると考えられ、これらの患者心筋では脂肪酸輸送障害のあることが示唆される。心筋は長鎖脂肪酸利用効率が高く、心疾患により低下することが知られている。今回 CD36^{-/-}について比較することはできなかったが CD36^{+/-}、WT については、健常者と心疾患患者との比較で心筋全体の H/M ratio については有意差は無かった。

しかし、今回の調査で、外来通院可能な比較的安定した群を心疾患患者に選んでいるため、今後重篤な心疾患患者を含めた群との比較が必要と思われる。

血小板、単球共に CD36 蛋白の発現が認められない群を 1 型 CD36 欠損症、血小板のみに欠損が認められる群を 2 型 CD36 欠損症と定義されている。2 型 CD36 欠損症のなかで、3 名が血小板は CD36 は欠損し単球の CD36 は存在していた。単球の CD36 発現は、うち 2 名で WT と同じで 1 名は半量だった。単球での CD36 蛋白発現が WT と同様の 2 名には、遺伝子異常は認められず、残りの 1 名には CD36^{+/-} 遺伝子異常が認められた。これらから、2 型 CD36 欠損症は血小板のみの欠損症と、CD36 遺伝子異常と血小板のみの欠損の複合型の 2 群に分けられる。(図 4)

E. 結 論

単球の CD36 の発現レベルは遺伝子型に依存していた。血小板膜状での CD36 の発現は、他の coding region が影響しており、2 型 CD36 欠損という分類の一面を成している。心筋細胞上の CD36 欠損を反映させる意味では、遺伝子型による分類が適していると思われる。

CD36^{+/-}だけでなく、CD36^{+/+}も、心筋の長鎖脂肪酸取り込みに有意な低下を認めた。これらは心疾患の存在によるものではなく、遺伝子異常によるものと考えられ、心筋の長鎖脂肪酸取り込みは CD36 遺伝子によって規定されている事が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

Imai M, Tanaka T, Kintaka T, Ikemoto T, Shimizu A, Kitaura Y. Genomic heterogeneity of typeII CD36 deficiency. *Clin Chim Acta* 2002;321:97-106

Kintaka T, Tanaka T, Imai M, Adachi I, Narabayashi I, Kitaura Y. CD36 Genotype and Llong-chain fatty acid uptake in the heart. *Circ J.* 2002 Sep; 66(9): 819-25.

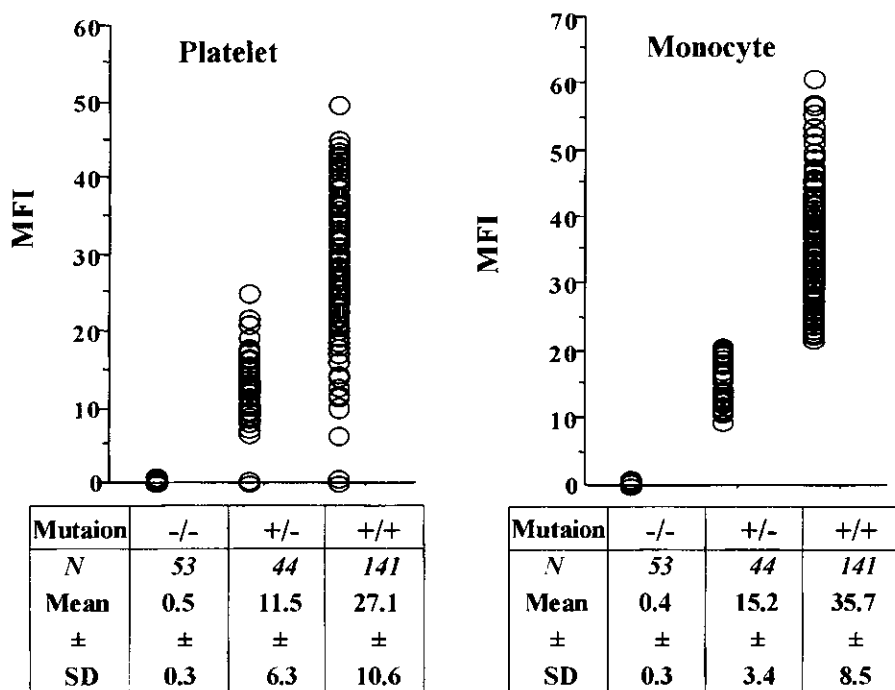


図1
フローサイトメトリーを用いた、血小板及び単球での CD36 蛋白発現の分析。横軸は対数スケールで表示。縦軸の破線は wild type の平均値。上から homozygote C478T ($CD36^{-/-}$), heterozygote Del539AC ($CD36^{+/-}$), wild type.

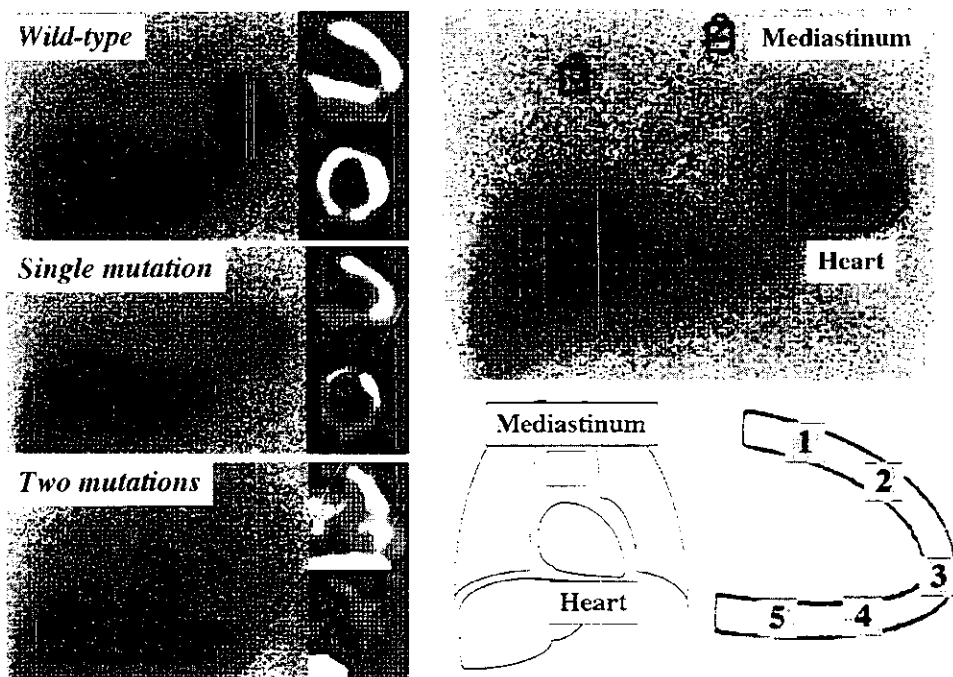


図2
BMIPP シンチの取り込みカウントは用手的に輪郭を決めた心臓全域と縦隔で計測した (右上)。その概略図 (下中央)。心筋の各部の取り込みは五カ所において計測した。その概略図 (右下)。各表現型でのシンチグラム上から $CD36^{+/-}$ (A), $CD36^{-/-}$ (B), wild type (C) (左)

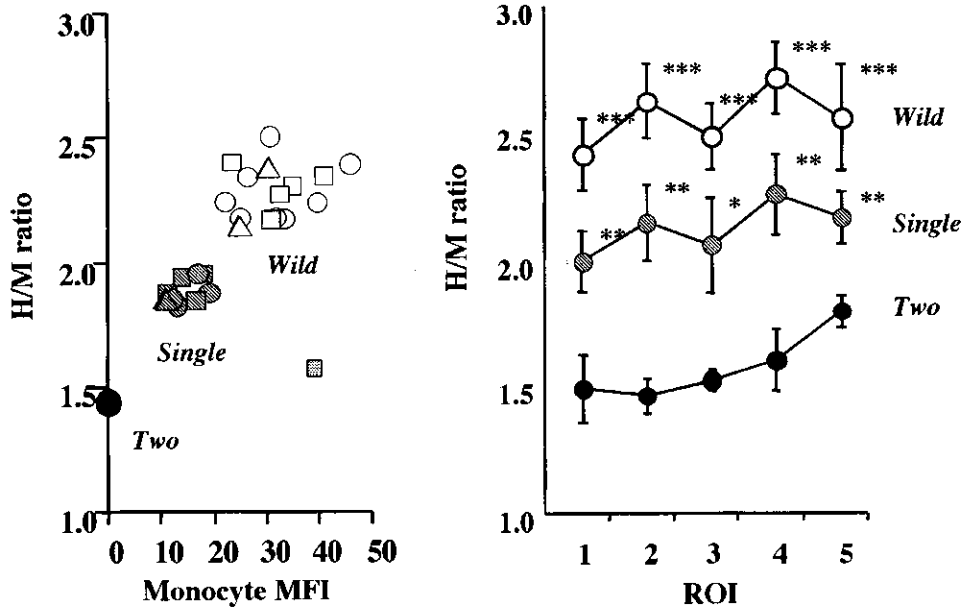


図3 心臓全域の H/M 比と、単球の MFI 値(左) 心筋各領域の H/M 比。

| Platelet specific Mechanism(?) | Mutation in Coding region | Platelet CD36 | Monocyte CD36 | Previous typing | Coding region genotype | CD36 mediated LCFA uptake in the heart |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|--------------------|------------------------|--|
| | | | | Normal | +/+ | Normal |
| | | | | Type II deficiency | +/- | About half of normal |
| | | | | Normal | +/+ | Normal |
| | | | | Type I deficiency | -/- | Null |

図4 単球と血小板の発現型および表現型の関係、そして CD36 蛋白の機能。
左端の六角形と長方形は、血小板上での CD36 蛋白の発現制御因子と CD36 遺伝子の coding region を表している。白抜と黒塗りは遺伝子の wild type と欠損を表している。一番下の灰色の六角形は、coding region の欠損が homozygote に存在するため、血小板上での CD36 蛋白の発現制御因子は正常、欠損どちらも考えられる。正六角形と円はそれぞれ血小板および単球の表現型を表している。黒塗りは欠損を、半分黒塗りにされたものは減少を表している。

厚生科学研究費補助金（特発性心筋症調査研究事業）

分担研究報告書

C型肝炎ウイルスに起因する心筋症の疾患感受性領域の同定に関する研究

研究者 猪子 英俊 東海大学医学部 分子生命科学系 教授

研究要旨

昨年度までの研究において、抗HCV抗体陽性の心筋症患者についてHLA遺伝子解析を行い、拡張型ではHLA-A*1101, 肥大型では-DRB1*0901, -DQB1*0303に有意な相関を見いだした。しかしながら、HLA遺伝子の近傍に心筋症の発症に関与する未知non-HLA遺伝子が存在する可能性を追求するため、TNF遺伝子の約50kbセントロメア側に存在している1kBL遺伝子に着目し、遺伝子多型解析を行った。その結果、1kBL遺伝子プロモーター領域に見いだされている4ヶ所の塩基配列多型のうち、DCM患者20例中9例に-422番付近のTの繰り返し数8回から9回への増加 ($p < 0.001$)が認められた。また、HCMにおいても-263番の一塩基多型Gが増加傾向にあり、ホモ接合体も4例と、有意な増加($p < 0.005$)を認めた。さらに-63番ではTの有意な減少 ($p < 0.0006$)がみられ、1kBL遺伝子の、HCV抗体陽性心筋症発症への関与が考えられた。

A. 研究目的

拡張型、肥大型などの心筋症が、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus : HCV)が引き金となって発症することが知られている。HCV感染者の肝炎発症の有無には、HLA遺伝子多型が深く関与していることを考慮し、我々は昨年度までの研究において、抗HCV抗体陽性の心筋症患者についてHLA遺伝子解析を行った。その結果、拡張型(dilated cardiomyopathy : DCM)ではHLA-A*1101, 肥大型(hypertrophic cardiomyopathy : HCM)では-DRB1*0901,-DQB1*0303に有意な相関を見いだしている。

このように拡張型と肥大型で相関するHLA遺伝子が異なる事実は、両者の発症

機序が異なることを示唆している。しかしながら、HLA遺伝子の近傍に心筋症に関与する未知non-HLA遺伝子が存在する可能性がある。そこで、この可能性を追求するため、昨年度に14種の多型マイクロサテライトを用いて疾患感受性領域の相関解析によるマッピングを行ったところ、HLAクラスIII領域に存在するTNF(tumor necrosis factor)遺伝子近傍のマーカーに有意な相関がみられた。そこで本年度は、TNF遺伝子の約50kbセントロメア側に存在している1kBL遺伝子に着目し、遺伝子多型解析を行った。

B. 研究方法

抗HCV抗体陽性のDCM患者22例、HCM

患者38例の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、IkBL遺伝子のプロモーター領域の440bpをPCR法にて増幅し、得られた産物は直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いたDCM、およびHCM患者からの試料採取にあたっては、当大学倫理委員会の承認のもと、研究目的、方法、試料の採取や提供が患者に及ぼす影響、さらに人権擁護の方法等について十分な説明を行い、提供の同意が得られたもので、研究実施にあたっては、倫理面での配慮を十分に行った。

C. 研究結果

これまでにIkBL遺伝子プロモーター領域に見いだされている-422, -325, -263, -63番の4ヶ所の塩基配列多型のうち、HCV陽性DCM患者20例中9例に-422番付近のTの繰り返し数8回から9回への増加 ($p < 0.001$) が認められた。また、HCMにおいても-263番の一塩基多型Gが増加傾向にあり、ホモ接合体も4例と、有意な増加 ($p < 0.005$) を認めた。さらに-63番ではTの有意な減少 ($p < 0.0006$) がみられた。

D. 考察

松森らは、HCV感染を考慮しない (この頃HCVは未同定) HCMとHLAの関係についても、すでにHLA-DR4が疾患感受性因子であることを報告しており、HLA遺伝子多型が心筋症の発症に関与していることが示唆される。一方、我々が行ったHCV抗体陽性心筋症についても、HLA遺伝子の発症への関与が強く疑われる結果を得ている。しかし、HLAクラスIII領域には、TNF遺伝子をはじめIkBL, ATP6G, BAT1など、疾患発症に関与するHLA以外の感受性遺伝子が多く存在しており、HLA遺伝子の近傍に心筋症に関与する未知non-HLA遺伝子が

存在する可能性も考えられた。

実際、前年度までに我々が行った多型マイクロサテライトマーカーを用いた疾患感受性領域マッピングの結果では、拡張型、肥大型ともにHLAクラスIとクラスII領域間に存在するHLAクラスIII領域テロメア側TNFA遺伝子周辺約100kbに最も強い相関を示し、この領域に、HCVに起因する心筋症に深く関与する遺伝子が存在する可能性が考えられた。

IkBL遺伝子はTNF遺伝子の約50kbセントロメア側に存在する機能不明の遺伝子で、NFkBファミリーに属する。今回の解析において、プロモーター領域に見いだされている4種の多型を中心に解析を行ったが、DCMでは-422番におけるT8からT9への繰り返し数の増加、またHCMにおいても-63番における一塩基多型に有意な相関が認められ、IkBL遺伝子の心筋症への関与が示唆された。最近我々は、慢性関節性リウマチなどの炎症性疾患や、IDDMなどの遺伝子解析において、IkBL遺伝子多型との相関を見いだしていることは、興味深い。さらに、HCV陽性心筋症とIkBL遺伝子との相関は、HLAとの相関より有意な結果を得ていることから、今後はIkBL遺伝子周辺に位置しているATP6G, BAT1などの新規遺伝子についても多型解析を行い、HCVに起因する心筋症についての関与を探る予定である。

E. 結論

HLAクラスIII領域に存在する新規遺伝子である、IkBL遺伝子プロモーター領域に見いだされている4ヶ所の塩基配列多型のうち、HCV陽性DCM患者20例中9例に-422番付近のTの繰り返し数8回から9回への増加 ($p < 0.001$) が認められた。また、HCV陽性HCMにおいても-263番の一塩基多型Gが増加傾向にあり、ホモ接合体も4例と、有意な増加 ($p < 0.005$) を認めた。さらに-63番

ではTの有意な減少($p < 0.0006$)がみられ、HCVに起因する心筋症についてのIkBL遺伝子の関与が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Aoki M, Yamamoto R, Sawada A, Inoko H : A microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low-affinity Fce receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like cell line, U937. *J Clinical Immunology* 20 : 424-433, 2001.
- 2) Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T : Association between CabA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, BAX and TGFb-RII gene mutations in gastric cancer patients. *International J Cancer* 91 : 481-485, 2001.
- 3) Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki S, Honma T, Inoko H, Asakura H : A close relationship of triplet polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 57 : 9-14, 2001.
- 4) Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Sasazuki T, Inoko H : A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 71 : 263-270, 2001.
- 5) Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Verity D, Katsuyama Y, Ando H, Onari K, Goto K, Imagawa Y, Mandnat W, Fayyad F, Stanford M, Ohno S, Inoko H : Microsatellite mapping of a susceptible locus within the HLA region for Behcet's disease using Jordanian patients. *Hum Immunol* 62 : 186-190, 2001.
- 6) Shiina T, Ando A, Suto Y, Kasai , Shigenari A, Takishima N, Kikkawa E, Iwata K, Kuwano Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y, Sano K, Nogami M, Kawata H, Li S, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Tashiro H, Tamiya G, Kohda A, Okumura K, Ikemura T, Soeda E, Mizuki N, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Genomic anatomy of a premier Major Histocompatibility Complex paralogous region on chromosome 1q21-22. *Genome Research* 11 : 789-802, 2001.
- 7) Matsuzaka K, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 57 : 397-404, 2001.
- 8) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Yoshida M, Katsuhiko O, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H : HLA class I genotyping including HLA-B*51 allele typing in the Iranian patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 57 : 457-462, 2001.
- 9) Gasper JA, Shiina T, Inoko H, Edwards SV : Songbirds genomics: Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75: 26-34, 2001.
- 10) Ando A, Kawata H, Murakami T, Shigenari A, Shiina T, Sada M, Tsuji T, Toriu A, Nakanishi Y, Mitsunashi T, Sekikawa K, Inoko H : cDNA cloning and genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class II DMA gene. *Anim Genet.* 32 :73-77, 2001.
- 11) Holland LZ, Rached LA, Tamme R, Holland ND, Inoko H, Shiina T, Burgdorf C, Lardelli M : Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (AmphiNotch): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates. *Dev Biol.* 232 :493-507, 2001.
- 12) Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A : Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57 : 520-535, 2001.
- 13) Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M : Autoreactive CD4(+) T-cell clones to

- beta(2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood*. 98 :1889-1896., 2001.
- 14) Kulski JK, Martinez P, Longman-Jacobsen N, Wang W, Williamson J, Dawkins RL, Shiina T, Naruse T, Inoko H : The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-G. *J Mol Evol*. 53 :114-123, 2001.
- 15) Tsuda TT, Tsuda M, Naruse T, kaata H, Ando A, Shiina T, Fukuda M, Kurita M, KeMaho I, Kuliski JK, Inoko H: Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on seunce variation in MHC class II gene. *Immunogenetics* 53 : 712-716, 2001.
- 16) Taniguchi Y, Sato M, Tanaka O, Sekiguchi M, InokoH, Kimura M : HOXD3 regulates expression of JAGGED1, a ligand for Notch receptors. *Nuclei Acids Reserach Supplement No.1* : 43-44, 2001.
- 17) Taniuchi Y, Suzuki H, Ohtsuka M, Kikuchi N, Kimura M, Inoko H : Isolation and characteriation of three gemnes paralogus to mouse Ring3. *Nuclei Acids Reserach Supplement No.1* : 247-248, 2001.
- 18) Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Suzuki K, Yomeyama Y, Mizuki N, Honma T, Inoko H, Asakura H: A stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA-antigens associated with ulcertive colitis. *Tissue Antigens* 58 : 71-76, 2001.
- 19) Sano K, Yabuki Y, Imagawa Y, Shiina T, Mizuku N, Ohno S, KulskinJK, Inoko H : The absence of disease-specific polmorphisms within the HLA-B51 gene taht is teh susceptible locus for Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 : 77-82, 2001.
- 20) Romphruk, AV, Naruse TK, Romphruk A, Kawata T, Pauapairoj, Kulski JK, Leelayuwat, Inoko H : Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *TissueAntigens* 58 : 83-89, 2001.
- 21) Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, Nomura E, Onari K, Ohno S, Inoko H. HLA-B*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B*5101 with Japanese patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 :181-184, 2001.
- 22) Kulski JK, Dunn DS, Gaudieri S, Shiina T, Inoko H : Genomic and phylogenic analysis of the human CD1 and HLA class I multicopy genes. *J Mol Evol*. 53 :642-650, 2001.
- 23) Ishikawa Y, Kashiwase K, Okai M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Koderu Y, Juji T. Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 28 :603-607, 2001.

2. 学会発表

- 1) 河田寿子、中島舞子、吉川枝里、成瀬妙子、猪子英俊.リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いたDNAmiddle-high resolution typing法の検討. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.
- 2) 吉川枝里、中島舞子、河田寿子、成瀬妙子、猪子英俊. LongReadTowerTM SystemとABI PRISM 377 を用いたSBT法の比較. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.
- 3) 邵文碩、安波道郎、高橋めぐみ、柴田宏樹、太田正穂、勝山善彦、猪子英俊、浜口和之、坂田利家、木村彰方. 1型糖尿病 (IDDM)の易罹患性に寄与するHLA領域遺伝子の解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.
- 4) 松澤由美子、佐野和美、今川由香利、矢吹和朗、椎名隆、成瀬妙子、猪子英俊. HLA-B遺伝子全領域に関する新しいゲノムシーケンシング解析法の確立. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.
- 5) 橋本奈美、勝山善彦、椎名隆、金子剛久、吉川枝里、成瀬妙子、太田正穂、猪子英俊. HLAクラスIおよびクラスIII領域にお

ける日本人ハプロタイプのゲノムシーケンシング解析-1: 遺伝子領域 433kbのPCR増幅とシーケンシング. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

6) 勝山善彦、太田正穂、橋本奈美、椎名隆、金子剛久、吉川枝里、成瀬妙子、大森榮、福島弘文、猪子英俊. HLAクラスIおよびクラスIII領域における日本人ハプロタイプのゲノムシーケンシング解析-2: 遺伝子領域内のSNP解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

7) 中島舞子、吉川枝里、太田正穂、勝山善彦、木村彰方、松森昭、篠山重威、成瀬妙子、猪子英俊. 抗HCV抗体陽性心筋症のHLA遺伝子解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

8) 佐藤昌子、屋部登志雄、成瀬妙子、植木純一、柏瀬貢一、田中秀則、大橋順、十字猛夫、猪子英俊、花岡一雄、徳永勝士. 帯状疱疹後神経痛とHLAクラスI, IIの関連について. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

9) 佐野和美、椎名隆、水木信、猪子英俊. ベーチェット病におけるMICA遺伝子の解析. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

10) 高橋めぐみ、柴田宏樹、安波道郎、木村彰方、太田正穂、勝山善彦、猪子英俊. HLAに連鎖した高安動脈炎感受性遺伝子領域のマッピング. 第10回日本組織適合性学会大会. 2001年11月. 福岡.

11) 岡本浩一、岡晃、牧野悟士、松坂恭成、馬淵智生、辻ひとみ、細井美沙、長塚由美枝、田宮元、猪子英俊. ゲノムワイド相関解析による尋常性乾癬感受性遺伝子の検索. 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.

12) 牧野悟士、岡本浩一、林英樹、藤本慶、遠藤高帆、伝田晃弘、徳保江里子、佐藤理恵、多加喜アスミ、長塚由美枝、今西規、五條堀孝、岡晃、田宮元、猪子英俊.

ゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーの設定. 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.

13) 井原征治、田中秀則、成瀬妙子、竹腰正隆、前田史子、坂本朋昭、猪子英俊. HLA-B51 抗体特異的組み換えヒトFab抗体の分離と解析. 第24回日本分子生物学会年会. 2001年12月. 横浜.

拡張型心筋症患者の抗心筋自己抗体に関する研究

分担研究者 小川聡 慶應義塾大学医学部内科学教授

研究要旨

拡張型心筋症(DCM)の患者血清には様々な抗心筋自己抗体が検出されるが、その病態生理学的意義については明らかではない。本研究はDCM患者における自己抗体を複数の方法で検出し、各抗体と臨床像との関連を明らかにすることを目的とした。DCM患者122例、健常者120例を対象として、1)標準的な間接蛍光抗体法による抗心筋抗体(FITC)、2)全心筋組織を抗原としたイムノブロット法による抗心筋抗体(IB)、ELISA法による3)抗 β 1受容体(B)、4)抗ムスカリンM2受容体(M)、および抗Na-K-ATPase抗体(N)について検討した。DCM患者において各抗体陽性率は、FITC 40%、IB 38%、B 39%、M 42%、N 30%であった。健常者では各6%、4%、6%、8%、2%であった。いずれかの方法で陽性を示した患者はDCM患者85%、健常者14%であった。心房細動はM抗体陽性者に高率で、非持続性心室頻拍はN抗体陽性者に高率であった。DCM患者の多くに何らかの抗心筋自己抗体が検出され、その内のいくつかはDCM患者の病態と関連することが示唆された。

馬場彰泰、吉川勉、小川聡
慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

【研究目的】

DCM患者においては様々な抗心筋自己抗体が検出される¹⁾。ミヨシン感作急性心筋炎の心筋病変は抗ミヨシン抗体によってトランスファーされない²⁾ことから、この様な自己抗体は急性心筋炎後の単なる遺残物であると考えられてきた。しかし、これらの自己抗体の少なくとも一部は生物学的活性を有するものがあることが明らかになってきた^{3,4)}。さらには、抗心筋自己抗体をイムノアフェレーシスによって除去すると自覚症状と循環動態が改善することが報告された⁵⁾。これらの報告は、DCM患者に検出される自己抗体がその病態に何らかの役割を果たすことを示唆する。本研究は、複数の方法で自己抗体を検出し、その臨床像との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】

慶應義塾大学病院または関連施設で治療中のWHO/ISFC診断基準を満たすDCM患者122例と、対照として明らかな疾患のない健常者120例について検討した。DCM患者については、心プールシンチにて左室駆出率が40%以下であることを確認し、安定期にNYHA心機能分類の評価を行い、左室駆出率、安静臥床30分後の血漿ノルエピネフリン濃度(高速液体クロマトグラフィー)と血漿心房利尿ホルモン濃度(RIA)の測定、心エコー図検査と24時間ホルター心電図検査を行った。ホルター心電図検査上、3連発以上の心室性期外収縮を心室頻拍と定義した。得られた血清を用いて、1)標準的な間接蛍光抗体法による抗心筋自己抗体、2)全心筋組織を抗原としたイムノブロット法による検出、ELISA法による3)抗 β 1受容体抗体、4)抗ムスカリンM2受容体抗体、および抗Na-K-ATPase抗体を測定した。各自己抗体と臨床背景との関連につき検討した。

【結果】