

図2 心筋ミオシン免疫10日目に、単回投与した Pertussis Toxin (PTX) の心筋組織におけるサイトカイン並びにケモカインに対する効果をELISA kitを用いて検討した。*p<0.01 対 コントロール

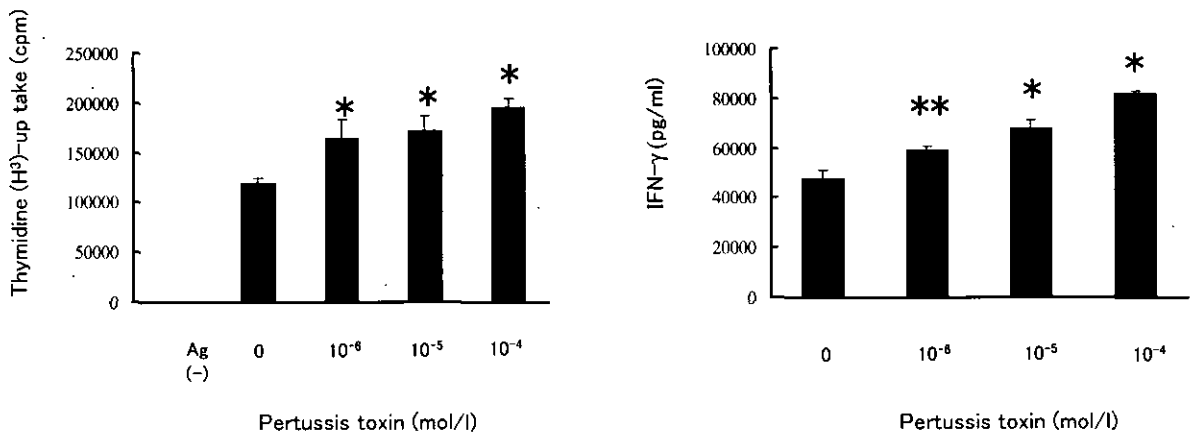


図3 Pertussis Toxin の心筋ミオシンによって刺激された心筋炎惹起性 T 細胞活性に対する効果をELISA kit および細胞内サイミジン (³H) 摂取測定により検討した。
*p<0.01, **p<0.05 対 コントロール

拡張型心筋症におけるムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序

小川 聡

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科学

研究要旨

拡張型心筋症(DCM)患者におけるムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序の意義を明らかにするために、ELISA 法により同受容体に対する自己抗体(M2-Ab)を測定した。DCM の 40% に同自己抗体を検出した。本自己抗体陽性患者は陰性患者に比べて、持続性心房細動を高頻度に認めた。多変量解析により、同自己抗体の存在が心房細動の予測因子となった。患者血清から IgG 分画を精製し、chick embryo に添加することにより、上室性期外収縮が誘発された。ムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序は、DCM 患者の心房細動の発生素地となることが明らかとなった。

研究目的

DCM 患者におけるムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序の臨床的意義を明らかにする。

研究方法

DCM 患者 104 例、心機能障害のない持続性孤発性心房細動患者(af)100 例、心疾患のない健常者 100 例を対象とした。ムスカリン M2 受容体第二細胞外ループに一致するペプチドを用いた ELISA 法により、患者全血清あるいは IgG 分画における M2-Ab を検出した。年齢、性別、治療薬、心機能、不整脈などの臨床的特徴との関連を調査した。患者血清から精製した IgG 分画を chick embryo に添加することにより、M2-Ab の心調律に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

試験に際しては、患者本人に本試験の主旨を説明し、同意を得た。

研究結果

全血清を用いた検討では、DCM 患者の 40%、af の 24%、健常者の 8% に M2-Ab を検出した。IgG 分画を用いた検討では、各々 36%、24%、8% であっ

た。DCM 患者のうち、自己抗体陽性例では陰性例に比べて心房細動を高頻度に認めた(40% vs. 18%, $p < 0.03$)。多変量解析により、本自己抗体の存在が心房細動の最も強力な予測因子となった。自己抗体陽性の DCM 患者および af 患者血清から精製した IgG は chick embryo において上室性期外収縮を惹起した。

考察

M2-Ab は外向き K 電流の増加と内向き Ca 電流の増加と関連し、活動電位の短縮をきたすことが知られている。このことが DCM 患者に見られる心房細動の発生素地となっていることが予測される。一方、器質的心疾患のない af 患者においても本自己抗体が検出された。このことは DCM 患者における自己抗体の存在が心機能障害に関与するというよりも、むしろ心房細動に関与することを支持する知見である。さらに、心房細動の発生素地として自己免疫機序という新しい概念を提唱するものである。

結論

ムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序は DCM 患者における心房細動および孤発性心房細動の発生素地となることが明らかとなった。

研究発表

学会発表

1. Baba A, Yoshikawa T, Shimada M, Akaishi M, Ogawa S: Induction of cardiac hypertrophy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with congestive heart failure. 67th Japanese Circulation Society Meeting, Mar, 2003
2. Baba A, Yoshikawa T, Shimada M, Akaishi M, Ogawa S: Epitope mapping of autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase in the patients with

- dilated cardiomyopathy. 67th Japanese Circulation Society Meeting, Mar, 2003
3. Baba A, Yoshikawa T, Tsuchimoto K, Ogawa S, Fu M: Proarrhythmic autoantibodies produced against muscarinic 2 acetylcholine receptors in patients with dilated cardiomyopathy. The international Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003, Oct, 2003
 4. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S, Fu M: Proarrhythmic autoantibodies produced against M2 muscarinic acetylcholine receptors: new upstream targets of atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. 7th Meeting of Japanese Heart Failure Society, Oct, 2003
 5. Yoshikawa T, Baba A, Iwata M, Ogawa S: Autoantibodies against 1-adrenergic receptors in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. The International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003, Oct, 2003

心不全の重症化機構と遺伝子治療

豊岡 照彦

東京大学医学部器官病態内科・保健センター

研究要旨

拡張型心筋症 (DCM) の末期に代用される心不全の重症化機構の解明は、その予防・治療を開発する上で極めて重要である。筆者らは DCM を自然発症する TO-2 系ハムスターはジストロフィン結合蛋白 (DAP) の一つ、 δ -サルコグレルカン (SG) の欠失によること、同一の δ -SG 遺伝子の変異によりトでも DCM を起し、心移植の適応となったこと、更に正常配列の δ -SG 遺伝子を長期発現可能で生体に無害な rAAV ベクターを用いて TO-2 ハムスターをレスキューできる事を示した。今回は、この先天性遺伝子欠損動物を生後 5~40 週迄、血行動態、ジストロフィンの免疫染色と Western blotting, Evans Blue による in situ の細胞膜透過性を上記遺伝子の治療の有無の条件下で検討した。それらの結果から筆者らは「心筋細胞の選択的なジストロフィンの崩壊が心不全を来す」病態進行仮説を提唱する。

研究目的

心不全の重症化機構を解明するとともに、遺伝子治療も含む新たな治療法を開発する。

研究方法

下記の 3 種の重症心不全を用いた。①自然発症 DCM ハムスター、②イソプロテノール負荷による急性心不全、③冠動脈結紮による慢性心不全、心不全の指標として、血行動態、ジストロフィンの免疫組織染色と Western blotting、細胞膜透過性を Evans Blue 蛍光画像で確認し、更に既に報告した遺伝子治療を行って各指標への影響を検討する。(倫理面への配慮)

本学に於ける動物実験に関するガイドラインを遵守すると同時に血行動態測定時の苦痛も麻酔条件下を最適化して軽減した。

研究結果

生後 5~15 週令迄は、左室圧 (LVP)、左室拡張末期圧 (EDP) と中心静脈圧 (CVP) は正常対照動物と同様、生長に伴う変化を呈したが、25~40

週で LVP は徐々に低下し、EDP と CVP は漸増した。この時ジストロフィンは細胞膜から細胞質に移行 (translocation) し、60~200kD に断片化した。また移行した細胞の膜透過性も亢進していた。

考察

こうした病理像は心不全の結果又は並行現象ではなく、原因である事は既に発表した遺伝子治療 (Kawada et al., PNAS 2003) によって、上記の指標が改善した事から実証された事から肯定された。

結論

このジストロフィン崩壊現象は先天性の δ -SG 欠損動物のみならず、後天性のイソプロテノール負荷による急性心不全、冠動脈結紮による慢性心不全でも共通して示された。

健康危険情報

実験動物、実験条件等で特に危険な面は無い。また遺伝子治療に用いた rAAV ベクターは既に米国でヒトに用いられており安全性は確認されている。

研究発表

論文発表

1. Kawada T, Toyo-oka T. Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom. Signal transduction and cardiac hypertrophy. Eds. N.S.dhalla et al, 2003
2. Horii K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy.

- Curr.Pharm.Biotechnol. 4477-84, 2003
3. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyo-oka T, Kato T. Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ.Res.* 93; 948-56, 2003.
 4. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 59; 419-27, 2003.
 5. Abe T, Hikiji H, Shin WS, Koshikiya N, Shima S, Nakata J, Susami T, Takato T, Toyo-oka T. Targeting of iNOS with antisense DNA plasmid reduces cytokine-induced inhibition of osteoblastic activity. *Am.J.Physiol (Endocrinol Metab)* 285; E614-21, 2003.
 6. Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro T, Nagata T, Goto A, Toyo-Oka T, Fujita T, Uehara Y. Effects of the anti-platelet aggregation drug dilazep on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens.Res.* 26; 185-91, 2003.
 7. Koizumi T, Hikiji H, Shin WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyo-oka T. Cell density and growth-dependent down-regulation of both intracellular calcium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J.Biol.Chem.* 278; 6433-9, 2003.

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

特許取得

1. 米国特許, 拡張型心筋症の遺伝子治療用ベクター

特発性心筋症の基礎・臨床研究

—apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1)—

堀 正二

大阪大学大学院医学研究科病態情報内科学

研究要旨

心不全発症においては心機能低下を伴う心拡大といういわゆる心臓リモデリングが重要な規定因子である。リモデリングにおける apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1) の関与をそのノックアウトマウスを用いることにより検討し、ASK1 がリモデリング進展に大きな役割を果たしていることを明らかにした。

研究目的

心不全発症においては心機能低下を伴う心拡大といういわゆる心臓リモデリングが大きな役割を占めている。本研究ではその分子機構を明らかにし心不全発症、進展に対する治療法の開発を目指す。

研究方法

リモデリングに重要な役割を果たしていると考えられる細胞内情報伝達物質に対する遺伝子改変マウスを使って、心不全の病態に与える影響を検討する。(倫理面への配慮)

大阪大学組換え DNA 実験指針および医学科動物実験委員会指針に従って実施した

研究結果

MAP キナーゼキナーゼキナーゼの一種である apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) のノックアウトマウスでは心筋梗塞後あるいは圧負荷後心臓リモデリングが抑制された。

考察

心臓リモデリング、心不全発症に ASK1 活性化を介したアポトーシスが大きな役割を果たしている。ASK1 は心不全治療の新しい分子標的になる可能性が示唆される。

結論

心不全発症の重要な規定因子である心臓リモデリングには ASK1 が大きな関与をしている。

研究発表

論文発表

1. Yamaguchi, et al, Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling
2. Higuchi et al. The small GTP-binding protein rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kB

学会発表

1. 山口修他, Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling, 日本循環器学会, 東京, 平成 16 年 3 月

ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける抗心筋抗体の検討

松崎 益徳

山口大学医学部器官制御医科学講座循環病態内科学

研究要旨

我々はマウスウイルス性心筋炎慢性期において、同種同量の CVB3 を再接種することにより再感染が成立し抗体価の上昇と署名な心拡大を来すことを報告し、ウイルス再感染が何らかの抗心筋抗体産生を引き起こし更に特発性心筋症（DCM）の発症に関与している可能性を示唆している。更に別の実験からウイルス再感染における心筋抗体のサブタイプは IgM であり、その対応抗原は心筋細胞膜にあることが確認された。そこでこれらの結果を基にウイルス性心筋炎再感染における自己抗原の同定を試み、心筋炎と DCM の関連を明らかにすることを目的とした。

研究目的

本学会議研究において DCM の成因における自己免疫機序の関与を解明することを課題としている。我々は心筋炎マウスを用い、ウイルス性心筋炎慢性期（3W+/40W-）に再度、同量同種の coxsackievirus B3（CVB3）ウイルスを接種（3W+/40W+）することにより再感染が成立し、2週間後に著明な心拡大を来すことを報告した（JCJ, 1999）。本モデルの病態と病因を明らかにする目的で生理学、病理組織学かつ免疫学的観点から解析した。

研究方法

マウス再感染モデルは CVB3 ウイルスを用い既報の方法にて作成した。死亡率の検討、心機能評価、組織学検討に加え、病態の免疫学的解析に、ウイルス中和抗体価測定（NT法）、血清 CPK 測定、蛍光免疫染色、免疫電子顕微鏡、二次元電気泳動、LC-MS/MS 法による質量解析を行った。

（倫理面への配慮）

本動物実験の計画及び施行に関しては山口大学動物実験倫理委員会より承認を受けそのガイドラインを遵守して行った【Law (No. 105) and Notification (No.6) of the Japanese Government】。

研究結果

ウイルス初感染後の中和抗体価の経時的解析では、初感染後に抗体価は急性期に上昇し、比較的長期間に高値を持続し、その為 10, 20, 30W ではウイルス再感染は成立しなかった。しかし、40W では中和抗体価は底値となり再感染が成立可能であった。再感染後は有意な死亡率の増加（23%）、CPK 値の上昇、心エコー上 LVEDD, LVESD の拡大と %FS

の低下、組織学的には炎症細胞浸潤を伴わない著明な心拡大・線維化率の増加が認められた。心筋組織の免疫学的解析では、3W+/40W+ 群の心筋細胞組織表面及び間質性組織に IgM の沈着が認められ、さらに免疫電子顕微鏡でもその局在が確認された。二次元電気泳動及び引き続き行われた LC-MS/MS 法により再感染群でのみ発現する spots のうち hsp60, aldolase A が同定された。この hsp60 は再感染群において心筋細胞表面に発現していることが免疫染色法により確認された。この結果、hsp60 はウイルス性心筋炎再感染において重要な役割をしていることが示唆された。

考察

CVB3 再感染により心機能低下を伴う心拡大を認め、本モデルは拡張型心筋症類似の病態を呈していると考えられ、心筋炎から心筋症発症のメカニズムを解明するうえで有用と思われた。

本モデルにおいて質量解析により同定された HSP60, α -cardiac actin Tropomyosin, ATPase β chain 等の抗心筋自己抗体は、心拡大や心機能低下などの再感染後の病態に様々な形で関与している可能性が示唆された。また、この時細胞膜に発現する HSP60 は他の抗原とは違い、心筋障害反応の上流に位置すると予想された。実際にヒトに於いても、DCM の患者に抗 HSP 抗体陽性者が多いことは既に Maish らにより報告されており、ウイルス性心筋炎再感染モデルが DCM の発症機序の解明の一助になると考えられた。

結論

DCM の発症と病態形成に、ウイルス再感染により惹起された抗心筋抗体及び液性免疫が関与してい

ることが強く示唆された。

研究発表

論文発表

1. Induction of Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in the Recipient Heart Following Donor Heart Myocardial Infarction: New Insights into the Pathological Role of Tumor Necrosis Factor- α from a Novel Heterotopic Cardiac Transplant-Coronary Ligation Rat Model.
Hiroshi Nakamura, Satoko Takata, Seiji Umemoto, Gorge Naik, Gordon Moe, Peter Liu, Masunori Matsuzaki.
Journal of the American College of Cardiology Vol. 42 No.1, 173-181, 2003.
2. 心筋梗塞後におけるリモデリングと心機能低下の遠隔作用：分離心筋梗塞モデルにおける腫瘍壊死因子 α の動態と作用の検討
中村浩士, 高田智子, 梅本誠治, 松崎益徳
Journal of Cardiology 41(1):41-42, 2003
3. 今日の治療指針 2004 年度版／心筋炎
中村浩士, 松崎益徳 医学書院 285-286, 2004.
4. Identification of Autoantibodies with the Corresponding Antigen for Repetitive Coxsackievirus Infection-Induced Cardiomyopathy
Satoko Takata, Hiroshi Nakamura, Seiji Umemoto, Kazuhito Yamaguchi, Taichi Sekine, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka, Masunori Matsuzaki.
Circulation Journal (in press).

学会発表

1. 高田智子, 中村浩士, 三浦俊郎, 加藤智啓, 西岡久寿樹, 松崎益徳
ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける自己抗体の検討
第 47 回日本リウマチ学会総会, 開催地：東京, 平成 15 年 4 月 25 日
2. 中村浩士
リモデリング関連遺伝子の新しいスクリーニング法：ラット分離心筋梗塞モデルの応用 (Y I A 賞：最優秀賞)
第 82 回日本循環器学会中国地方会, 開催地：広島, 平成 14 年 5 月 24 日
3. 野瀬義夫, 中村浩士, 高田智子, 松崎益徳
Isolated noncompaction of LV myocardium (INVM) 3 例の心筋生検組織像の比較検討
第 25 回心筋生検研究会, 久留米, 平成 15 年 11 月 28 日
4. 高田智子, 中村浩士, 梅本誠治, 三浦俊郎, 松崎益徳
ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける心筋自己抗原の同定
第 25 回心筋生検研究会, 久留米, 平成 15 年 11 月 29 日

知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

特許取得

1. 特願 2001-011866
中村浩士, 松崎益徳, 吉田勉, 山口 TLO
『広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法』
2. 米国特許出願：10/141608
Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida.
An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and

application for drug screening and regenerative medicine.

3. 特願 2004-044096

中村浩士, 松崎益徳, 山口 TLO

『分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法』

PD-1 欠損マウスを用いた拡張型心筋症における心筋トロポニン T の関与についての解明

松森 昭

京都大学大学院医学研究科循環器内科学

研究要旨

拡張型心筋症を発症する PD-1 受容体欠損マウスでは、抗心筋トロポニン I (cTnI) 抗体が多く産生されていることを確認した。抗 cTnI モノクローナル抗体を野生株 BALB/c マウスに投与したところ、収縮能低下を伴った左室拡張の原因となることが示唆された。また、正常心筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入は抗 cTnI 抗体投与により有意に増加した。抗 cTnI 抗体による心筋における持続的な Ca^{2+} 流入増大が、心機能障害や心拡大の原因であることが示唆された。

研究目的

拡張型心筋症(DCM)の原因の一つとして自己免疫の関与が指摘されている。PD-1 受容体欠損マウスでは、心臓に特異的な 30 kDa のタンパクに対する自己抗体が多く産生されていることを我々は報告した。本研究では PD-1 欠損マウスにおける DCM モデルでの 30 kDa 抗原とそれに対する自己抗体反応の役割について検討することを目的とする。

研究方法

30 kDa 抗原は SDS-PAGE および逆相 HPLC 法により精製され、心筋トロポニン I (cTnI) と同定された。抗 cTnI 抗体の関与を検討するため、抗 cTnI モノクローナル抗体を野生株 BALB/c マウスに投与した。Millar 社製 1.4Fr コンダクタンスカテーテルを用い、左室圧容積関係を測定した。(倫理面への配慮) 京都大学動物実験内規に従った。

研究結果

抗体投与 1 2 週後、抗 cTnI 抗体投与群では、正規化収縮末期エラストランスはコントロール IgG 投

与群に比べ有意に低下した (5.27 ± 0.82 vs 17.36 ± 4.63 mmHg/ μ L \cdot 100mg in control)。拡張末期容積 (24.8 ± 1.4 vs 19.2 ± 0.7 μ L in control) および拡張末期圧は有意に上昇し、駆出率 (50.8 ± 7.6 vs $79.3 \pm 5.3\%$ in control) は有意に低下した ($p < 0.05$)。心拍数には二群間に差はなかった。これらの血行動態上の結果より長期的な抗 cTnI 抗体投与は収縮能低下を伴った左室拡張の原因となることが示唆された。さらに、ボルテージ・クランプ法を用いて、単離心筋における抗 cTnI 抗体の影響を検討した。正常心筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入は抗 cTnI 抗体投与により有意に増加した。

考察

抗 cTnI 抗体が拡張型心筋症の病態に関与している可能性が示唆された。

結論

抗 cTnI 抗体による心筋における持続的な Ca^{2+} 流入増大が、心機能障害や心拡大の原因であることが、これらの結果より示唆された。

研究発表

論文発表

1. Nishio R, Shioi T, Sasayama S, Matsumori A. Carvedilol Increases the Production of Interleukin-12 and Interferon-gamma and Improves the Survival of Mice Infected With the Encephalomyocarditis Virus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:340-345, 2003
2. Okazaki T., Yoshimasa T., Nishio R, Mitsuiye T., Mizoguchi A, Jian W, Ishida M, Matsumori A, Minato N, Honjo T. Autoantibodies against Cardiac Troponin I are Responsible for the Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Deficient. Mice. *Nature Medicine* 9:1477-1483, 2003

ダール高血圧感受性ラットの心肥大，心不全に対するチアゾリン誘導体 Pioglitazone の効果の検討

横山 光宏

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸病態学講座

研究要旨

ダール食塩感受性高血圧ラットは高食塩食で高血圧性心肥大から心不全に移行する，高血圧性心不全のモデル動物である。このモデルに，チアゾリン誘導体の一つである Pioglitazone を投与した。同薬剤は，血圧を低下させず心肥大抑制効果は認めなかったが，収縮性心不全の進展を抑制し，治療効果を認めた。その機序に AP-1 による転写活性の抑制が関与している可能性が示された。

研究目的

糖尿病患者は高血圧や心肥大を伴うものが多く認められる。過度な心肥大は心不全への移行を起こすことが知られ，高血圧性心不全に対して，有効な治療方法の確立が求められている。インスリン抵抗性改善剤であるチアゾリン誘導体は心臓に対して，（１）心肥大抑制効果や（２）虚血再還流障害に対する保護作用および（３）心筋梗塞後のリモデリングの抑制効果などが報告され，循環器疾患に対する治療効果が期待されている。我々は，同薬剤が高血圧性心肥大および高血圧性心不全に有効か検討した。

研究方法

ダール食塩感受性高血圧ラットを以下の２群に分け，検討を行った。６週齢で高食塩負荷食のみを開始したコントロールの高食塩負荷群と，６週齢でチアゾリン誘導体の一つである Pioglitazone (5mg/kg/day) の経口投与を，高食塩負荷食と同時に開始した高食塩負荷+Pioglitazone 群の２群に分けた。心肥大期の１３週齢と１６週齢において，体重，血圧測定，心臓超音波検査などの検討を行い，心肥大あるいはその後の心不全の発症を抑制できるか検討した。また心不全期に，左室内圧の測定および局所あるいは全身での神経体液性因子の測定などを行った。

（倫理面への配慮）

実験動物の取扱いに関しては，神戸大学大学院医学系研究科の定めるガイドラインにもとづき，苦痛を与えない様十分な麻酔を行うなどの配慮のもと実験を行った。

研究結果

コントロールの高食塩負荷群と高食塩負荷+Pioglitazone 群で血圧や血糖値に有意差はなかった。１３週齢の心肥大期における左室壁厚に有意差はなく，両群とも心肥大を呈していた。Pioglitazone は心肥大を抑制しなかった。１６週齢の心不全期においてコントロール群では左室壁厚の菲薄化が進行していたが，高食塩負荷+Pioglitazone 群では左室壁厚の菲薄化が抑制され，また左室拡張末期径，収縮末期径も有意に縮小していた。血清中の BNP や ET-1 の発現レベルは低下しており，左室での mRNA レベルも低下していた。左室の核蛋白を用いた検討では AP-1 の DNA binding activity は有意に低下しており，Pioglitazone 投与における AP-1 との Negative Interference がその機序として推察され，ET-1 の発現レベルの低下の原因と推察された。

考察

Pioglitazone は，ダール食塩感受性高血圧ラットに対し，心肥大抑制効果は認めなかったが，心不全の進展を抑制した。更に，その機序に左心室での AP-1 による転写活性の抑制が関与している可能性が示された。

結論

チアゾリン誘導体は血圧と無関係に高血圧性心不全の進展を抑制する効果がある可能性が示された。

研究発表

論文発表

1. Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy. Kawai M et al. Hypertension. 2003 41(4):956-62.

研究発表

論文発表

1. Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy. Kawai M et al. Hypertension. 2003 41(4):956-62.
2. PI 3-kinase-Akt-p70 S6 kinase in hypertrophic responses to leukemia inhibitory factor in cardiac myocytes. Hiraoka E et al. Kobe J Med Sci. 2003 49(1-2):25-37
3. Arg389Gly polymorphism of the human beta1-adrenergic receptor in patients with nonfatal acute myocardial infarction. Iwai C et al. Am Heart J. 2003 146(1):106-9.
4. Decreased mAKAP, ryanodine receptor, and SERCA2a gene expression in mdx hearts. Rohman MS et al. Biochem Biophys Res Commun. 2003 10(1):310:228-35.
5. Echocardiographic assessment of right ventricular obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. Shimizu M et al. Circ J. 2003 67(10):855-60.
6. Correlation of connexin43 expression and late ventricular potentials in nonischemic dilated cardiomyopathy. Kitamura H et al. Circ J. 2003 67(12):1017-21.
7. Glycogen synthase kinase-3 is involved in the process of myocardial hypertrophy stimulated by insulin-like growth factor-1. Satomi-Kobayashi S et al. Circ J. 2004 68(3).
8. Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. Toh R et al. J Am Coll Cardiol (2004, in press)
9. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, inhibits transition from cardiac hypertrophy to heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. Kawai M et al. (in submission)

学会発表

1. Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy 第 67 回日本循環器学会 (2003 年 3 月)
2. Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall prevents the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats 第 67 回日本循環器学会 (2003 年 3 月)
3. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, inhibits transition from cardiac hypertrophy to heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats 第 7 回日本心不全学会 (2003 年 10 月)
4. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, preserved contractile function in Dahl salt-sensitive hypertensive rats 第 68 回日本循環器学会 (2004 年 3 月発表予定)
5. Why can myoblast transplantation combined with cardiotrophin-1-gene transfection alleviate the transition to heart failure in Dahl rats? (第 68 回日本循環器学会 2004 年 3 月発表予定)

心筋症モデルハムスターにおける心筋細胞死の様式に関する研究

藤原 久義

岐阜大学再生応用（循環器内科学）

研究要旨

ハムスターでは心筋症の病態を呈するいくつかのストレインがみられ、ヒト心筋症のモデルとして有用である。多くのモデルでは若年期より心筋細胞の脱落が始まる。その後、進行性に多発性の脱落巣が形成され線維化が著明となり、心拡大、心収縮力の低下をきたして心不全死に至る。しかし、これらのモデルにおける心筋細胞死の様式については不明な点が多く、ハムスターのいくつかの系統では心筋症モデルハムスターでは進行性の心筋細胞脱落がみられるが、心筋細胞死の様式は現在まで明らかにされていない。今回の研究で我々は、心筋症のモデルである UM-X7.1 系統（ δ -sarcoglycan gene mutation）ハムスターにおける心筋細胞脱落に、apoptosis とは異なるもうひとつの programmed cell death としての autophagic cell death が関与していることを発見した。今後、心筋症における autophagic cell death の分子機構の解明を通して、autophagic cell death の予防が可能になれば新しい心筋症の治療開発につながる可能性がある。

研究目的

心筋症モデルハムスターでは進行性の心筋細胞脱落がみられるが、心筋細胞死の様式は現在まで明らかにされていない。本研究の目的はその心筋細胞死の様式を形態学的に解明することである。

研究方法

UM-X7.1 系統（ δ -sarcoglycan gene mutation）心筋症ハムスター（U）10, 20, 30 週令オス各 8 匹ならびにコントロールとして同週令のオス Golden ハムスター（G）各 8 匹を用いた。これらの心臓において組織学的（HE, マッソントリクロム, エバンスブルー）、免疫組織学的（ユビキチン, in situ nick end-labeling 法=TUNEL）、ならびに電子顕微鏡による超微形態的検討を行った。（倫理面への配慮）

動物は過剰の麻酔により屠殺し苦痛を最小限にした。

研究結果

UM-X7.1 ハムスターの心ではいずれの週令においても心筋細胞の巣状の脱落と線維化をみとめ、その面積は週令とともに増加した。Autophagy のマーカーのひとつであるユビキチン封入体を含む心筋細胞の頻度は各週令で UM-X7.1 において有意に高頻度であった（10 週令：0.10 \pm 0.07% in G vs 3.28 \pm 0.52% in U, 20 週令：0.38 \pm 0.27% in G vs 2.76 \pm 0.85% in U, 30 週令：0.51 \pm 0.34% in G vs 2.92

\pm 0.75% in U)。一方、TUNEL 陽性心筋細胞は各群各週令のいずれにおいてもみとめられなかった。超微形態では、UM-X7.1 の心筋細胞において、変性したミトコンドリア、グリコーゲン顆粒、ミエリン様構造物を含む空胞がみられ、autophagic vacuole と考えられた。一方、典型的なアポトーシス像は見出されなかった。エバンスブルー生体染色では UM-X7.1 において陽性心筋細胞の頻度が有意に高く、同心筋細胞における細胞膜の透過性の亢進ないし破壊が示唆された。

考察

Autophagy はライソゾームによる細胞内小器官の除去機構であるが、この機構自体によって細胞が死に到る autophagic cell death が apoptosis とは異なるもうひとつの programmed cell death として近年注目を浴びている。最近、不全心の心筋細胞において、autophagic cell death の存在が報告されている。UM-X7.1 系統心筋症ハムスターの心筋細胞の autophagic cell death に関して、今後、(1) Autophagic degeneration と autophagic cell death の厳密な関連（連続性の証明）；(2) Autophagic cell death の心機能への影響の程度；(3) 不全心における autophagic cell death の分子機構；(4) Autophagic cell death 阻害による心不全治療への応用の可能性を明らかにしてゆく必要がある。

結論

UM-X7.1 系統心筋症ハムスターの心筋細胞死の様式は主に autophagic cell death であると推察された。

心筋の肥大とリモデリングにおける NF- κ B の役割

竹下 彰, 久保田 徹

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

研究要旨

NF- κ B は、炎症反応の中心的な転写因子であり、ヒトの不全心において活性化されている。本研究では、種々の心不全モデルにおいて NF- κ B の活性化を抑制し、心不全治療の新たな標的分子としての NF- κ B の可能性を検討した。その結果、NF- κ B の活性化を抑制すると、アンジオテンシンによる心筋肥大や TNF- α による心筋障害が有意に抑制されることが明らかとなった。よって、NF- κ B は、炎症反応だけでなく、心筋の肥大やリモデリングにおいても重要な役割を果たしており、心不全治療の新たな標的分子となりうることが示唆された。

研究目的

心筋症・心不全の発症と進展における NF- κ B の役割を明らかにし、心不全治療の新たな標的分子としての NF- κ B の可能性を検討する。

研究方法

生体内において長期的に NF- κ B の活性化を阻止する手段として NF- κ B (p50) ノックアウトマウスを用い、野生型マウスと比較検討した。心不全モデルとしては、①アンジオテンシン持続注入モデルと②心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスの2つを用いた。

①アンジオテンシン持続注入モデル

8週齢のオスのマウスの腹腔内にオスモティックミニポンプを植え込み、アンジオテンシン (2 μ g/kg/min) を持続投与し、テイルカフにて血圧を測定した。4週間後に心エコーを行い、その後、心重量、組織像、心筋における炎症性サイトカインの発現などを比較検討した。

②心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウス

久保田らが開発した心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスは、心筋局所での NF- κ B の活性化と炎症細胞の浸潤を認め、心不全のために死亡する。TNF- α 過剰発現マウスと NF- κ B (p50) ノックアウトマウスを掛け合わせることで NF- κ B (p50) 遺伝子が欠損した TNF- α 過剰発現マウスを作成し、炎症性サイトカインによる心筋障害が NF- κ B の抑制によって阻止できるか否か検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学総長および医学部動物実験委員会の承認を得て、関連法案ならびに「九州大学医学部における動物実験に関する指針」に準拠して行っ

た。

研究結果

①アンジオテンシン持続注入モデル

アンジオテンシンを野生型マウスに4週間持続投与したところ、体血圧の上昇と左室肥大を認めた。NF- κ B (p50) をノックアウトしたところ、体血圧の上昇はむしろ高度であったにもかかわらず、左室肥大が有意に抑制された。野生型マウスでは、アンジオテンシンの持続投与によって、心筋における ANP と TNF- α の発現亢進を認めたが、NF- κ B (p50) ノックアウトマウスでは、ANP の発現は抑制されていたものの、TNF- α の発現はむしろ亢進していた。さらに興味深いことに、NF- κ B (p50) ノックアウトマウスでは、JNK のリン酸化が抑制されていた。心エコーを施行したところ、NF- κ B (p50) ノックアウトマウスでは、体血圧の上昇と TNF- α の発現亢進にもかかわらず、左室短縮率は良好に保たれていた。

②心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウス

心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスの心筋において NF- κ B が活性化されていることを EMSA にて確認した。スーパーシフトの結果から、活性化された NF- κ B の多くが p50 のホモダイマーで、一部が p50-p65 のヘテロダイマーであることが示唆された。心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスと NF- κ B (p50) ノックアウトマウスを交配し、心筋特異的に TNF- α を過剰発現する p50 のホモノックアウトマウスを作成したところ、心筋における NF- κ B の活性化は完全に抑制されたが、予想に反して、心筋における炎症性サイトカインの発現や炎症細胞の浸潤は不変であった。しかし、NF- κ B (p50) をノッ

クアウトした心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスでは、心筋肥大と MMP-9 の活性化、アポトーシスが有意に抑制され、12 週齢までの観察で、左室短縮率と生存率の有意な改善が認められた。

考察

心不全は各種心疾患の末期像であり、その予後は悪性腫瘍に匹敵するほど悪く、また患者の日常生活を著しく制限することとなり、その効果的な予防法や治療法の開発は社会的見地からも極めて重要である。近年の基礎的・臨床的研究により、交感神経活動の亢進やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化、エンドセリン、炎症性サイトカイン、活性酸素種などが、心不全の発症と進展において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。本研究の目的は、炎症反応の中心的な転写因子である NF-kB に着目し、NF-kB の活性化が心不全の発症と進展に果たす役割を明らかにすることである。

NF-kB のサブユニットには p50, p52, RelA (p65), c-Rel, RelB の 5 つがあるが、最も一般的なのは p50 と p65 からなるヘテロ二量体である。通常は不活化因子 I κ B と結合して細胞質内に存在し、炎症性サイトカインや活性酸素種、リポ多糖類などの刺激によって I κ B がリン酸化・分解されると核内へ移行して活性型となる。ヒトの末期不全心では炎症性サイトカインの発現とともに NF-kB の活性化が認められることが報告されている。NF-kB によって誘導される遺伝子には、種々のサイトカインやケモカイン、接着分子、誘導型 NO 合成酵素など免疫応答や炎症反応に深く関わっているものが多い。最近、培養心筋細胞を用いた *in vitro* の実験において、アンジオテンシンやエンドセリン、フェニレフリンなどによる心筋細胞の肥大反応においても NF-kB の活性化が深く関与していることが明らかとなった。よって、不全心における NF-kB の活性化が心筋細胞の肥大や炎症反応を惹起し、心筋傷害的に作用している可能性が示唆される。一方、NF-kB の活性化はアポトーシスを抑制することも報告されており、NF-kB の活性化が不全心に保護的に

作用している可能性も否定できない。従って、本研究では、種々の心不全マウスモデルにおいて、NF-kB 活性化阻止の生体内における長期効果を検討し、NF-kB が心不全治療の新たな標的分子となりうるか否かを検証した。

本研究では、心不全モデルとして、①アンジオテンシン持続注入モデルと②TNF- α 過剰発現マウスの 2 つを用いたが、NF-kB の活性化を抑制することで、アンジオテンシンによる心筋肥大と TNF- α による心筋障害が有意に抑制されることが明らかとなった。よって、生体内においても、NF-kB の活性化が、心筋の肥大とリモデリングにおいて重要な役割を担っていることが示唆された。

一方、心筋における炎症性サイトカインの発現については、NF-kB の活性化を抑制したところ、心筋特異的 TNF- α 過剰発現マウスでは不変、アンジオテンシン持続注入モデルではむしろ亢進するという予想に反した結果となった。本研究では、NF-kB の活性化を抑制する手段として p50 ノックアウトマウスを用いたが、近年、p50 のホモダイマーは、p50-p65 のヘテロダイマーとは異なり、むしろ抗炎症的に作用することが報告されている。よって、このことが、心筋における炎症性サイトカインの発現をむしろ促進する結果につながった可能性が示唆された。本研究では、NF-kB の活性化の抑制によって、炎症性サイトカインの発現が不変または促進されたにもかかわらず心筋肥大が有意に抑制されており、このことは従来のサイトカイン仮説を覆す結果となった。心筋の肥大とリモデリングにおける炎症性サイトカインと NF-kB の相互作用について、さらなる検討が必要と思われる。

結論

NF-kB を阻止することで、アンジオテンシンによる心筋肥大や TNF- α による心筋障害が有意に抑制された。NF-kB は、炎症反応だけでなく、心筋の肥大やリモデリングにおいても重要な役割を果たしており、心不全治療の新たな標的分子となりうる可能性が示唆された。

研究発表

論文発表

1. Machida Y, Kubota T, Kawamura N, Funakoshi H, Ide T, Utsumi H, Li YY, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of tumor necrosis factor- α increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H449-H455.

2. Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation*. 2003;107:1418-23.

学会発表

第7回 日本心不全学会（平成15年10月23 - 25日，大阪）

1. Kawano S, Kubota T, Kawamura N, Monden Y, Tsutsui H. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *J Card Fail* 9: S145, 2003.
2. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Tsutsui H. Blockade of NF- κ B activation does not affect myocardial inflammation but improves cardiac function and survival in TNF- α -induced cardiomyopathy. *J Card Fail* 9: S176, 2003.

American Heart Association Scientific Sessions 2003 (November 9-12, 2003. Orlando)

3. Kawano S, Kubota T, Kawamura N, Monden Y, Tsutsui H. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Circulation* 108: IV-214, 2003.
4. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Tsutsui H, Feldman AM. Blockade of NF- κ B activation does not affect myocardial inflammation but improves cardiac function and survival in TNF- α -induced cardiomyopathy. *Circulation* 108: IV-214, 2003.

マウスの実験的ウイルス性心筋炎における costimulatory molecule (PD-1, PD-L1, PD-L2) の発現とその役割の解析

世古 義規, 永井 良三

東京大学大学院医学系研究科循環器内科

八木田 秀雄, 奥村 康

順天堂大学医学部免疫

東 みゆき

東京医科歯科大学歯学部分子免疫

研究要旨

T細胞の抗原特異的な活性化に対して negative signal を媒介する costimulatory molecule である PD-1/PD-1 ligands pathway の心筋炎における役割を解明するため、ウイルス性心筋炎のマウスの実験モデルを用いて、PD-1/PD-L1/PD-L2 の発現を解析するとともに、これらの分子に対するモノクローナル抗体を *in vivo* に投与して心筋障害に対する効果を解析した。心筋炎において PD-L1 が心筋細胞上に発現誘導され、PD-1/PD-L1 pathway を阻害することにより心筋障害が増強した。このことから、心筋組織内浸潤細胞上の PD-1 と心筋細胞上の PD-L1 を介する pathway を介して、浸潤細胞の活性化を抑制することにより心筋障害の形成に抑制的に作用していると考えられた。PD-1/PD-1 ligands pathway を賦活化する免疫療法は、ヒトの急性心筋炎・拡張型心筋症の治療・予防に有効である可能性が考えられた。

研究目的

拡張型心筋症は難治性で心臓移植の最大の適応疾患であり、その発症を予防したり内科的に治療することは社会的に大きな課題となっている。我々はこれまで、拡張型心筋症の病因であるウイルス性心筋炎のマウスの実験モデルを用いて、T細胞の抗原特異的な活性化に必須と考えられる costimulatory signal (副刺激シグナル) を媒介する costimulatory molecule が心筋障害に重要な役割を果たすことを報告してきた。すなわち、immunoglobulin/integrin family の ICAM-1/LFA-1, VCAM-1/VLA-4, B7/CD28, TNF receptor/ligand family の CD40/CD40L, CD30/CD30L, CD27/CD27L, OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, Fas/FasL 等について解析したところ、特に B7-1/CD28, ICAM-1/LFA-1, CD40/CD40L, 4-1BB/4-1BBL, Fas/FasL の pathway が心筋障害の形成に重要であることを明らかにしてきた。これらの pathway は T細胞の活性化に対して positive signal を伝達すると考えられているが、これに

対して negative signal を伝達する costimulatory molecule として CTLA4 や CD28/B7 family の programmed death (PD)-1 とその ligand である PD-L1, PD-L2 が知られている。PD-1 knockout マウスを用いた研究により PD-1/PD-1 ligands pathway は末梢での tolerance や自己免疫疾患の予防に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。本研究の目的は、急性心筋炎・拡張型心筋症における PD-1/PD-1 ligands pathway の果たす役割を検討するため、マウスのウイルス性心筋炎の実験モデルを用いて、心筋組織におけるこれらの分子の発現誘導や心筋障害の形成に果たす役割を解析した。

研究方法

- (1) C3H/He マウスに Cocksackievirus B3 (CVB3) を接種し経時的に屠殺、心筋組織における PD-1/PD-L1/PD-L2 の発現を TSA 法による蛍光抗体染色で解析した。
- (2) C3H/He マウスの胎児心より初代培養心筋細胞を作成し、IFN- γ (100 U/ml) を *in vitro* で 48

時間負荷し、PD-L1/PD-L2 の発現誘導を同様に TSA 法による蛍光抗体法で、心筋細胞を同定するために心筋ミオシンの二重染色にて解析した。

(3) C3H/He マウスを 5 群（各 8 匹ずつ）に分けて CVB3 を接種し (day 0 とする), A 群には control rat IgG, B 群には抗 PD-1 (blocking) 抗体, C 群には抗 PD-1 non-blocking) 抗体, D 群には抗 PD-L1 (blocking) 抗体, E 群には抗 PD-L2 (blocking) 抗体, F 群には (抗 PD-L1 [blocking] 抗体+抗 PD-L2 抗体), をそれぞれ 5 mg/Kg (day 0) と (day 3) に投与した。炎症が daydayday ピークとなる 7 で屠殺。心臓を赤道面で 2 分割して、一方をホルマリン固定後 HE 染色を施行。もう一方を液体窒素にて凍結後、一部より RNA を抽出し RT-PCR を施行した。さらに赤道面の凍結切片を作成して TUNEL 染色を行った。(A) 心臓の赤道面での全断面積に対する心筋障害（細胞浸潤+心筋壊死）の生じた面積の比を測定することにより、心筋障害の形成に対するこれらの抗体投与の効果を比較検討した。(B) 心筋組織内浸潤細胞の活性化に対する抗 PD-1 (blocking) 抗体投与の効果を検討するため、そのマーカーとして各種の cytokine や costimulatory molecule 等の immune mediator (IL-2, IFN- γ , CD40L, FasL, perforin) や CVB3 genome, および internal standard として GAPDH の発現を半定量的 PCR 法により解析した。(C) 心筋組織内浸潤細胞の apoptosis に対する抗 PD-1 (blocking) 抗体投与の効果を検討するため、TUNEL 染色により apoptosis を起こした浸潤細胞の割合を control 群と比較検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物は麻酔下に屠殺しており、動物愛護上特に倫理面の問題はないと判断した。

研究結果

(1) 心筋炎の心筋組織における PD-1/PD-L1/PD-L2 の発現：PD-L1 は、正常の心筋組織では血管内皮細胞にわずかに発現を認めるのみであったが、ウイルス接種後 1 週目をピークとして心筋細胞上に強い発現が誘導された。また、ウイルス接種後 2～3 週目以降になると間質細胞やさらに血管内皮細胞上に強い発現が誘導された。これに対して PD-L2 は、正常およびウイルス接種後の心筋組織においてほとんど発現を認めず、ウイルス接種後に浸潤細胞の一部（すなわち T 細胞）において発現を認めるのみであった。一方 PD-1 は、正常およびウイルス接種後の心筋組織においてほとんど発現を認めなかった

が、少なくとも急性期のほとんどすべての浸潤細胞（すなわち NK 細胞と T 細胞を含む）において強い発現を認めた。

(2) 培養心筋細胞における PD-L1/PD-L2 の発現の誘導：PD-L1 は、無刺激のコントロール群の培養心筋細胞ではほとんど発現を認めなかったが、IFN- γ の刺激により強い発現が培養心筋細胞上に誘導された。これに対しては PD-L1 は、IFN- γ 刺激前より構成的な中等度の発現が認められ、IFN- γ の刺激により有意な発現の増強を認めなかった。

(3) 心筋炎の心筋障害に対する抗 PD-1/PD-L1/PD-L2 抗体投与の効果：

(A) 心臓の赤道面での全断面積に対する心筋障害（細胞浸潤+心筋壊死）の生じた面積の比は、A 群 (control rat IgG 投与) で (7.95 \pm 3.82 % [mean \pm SD], n=8), B 群 (抗 PD-1 [blocking] 抗体投与) で (13.61 \pm 2.79 %), C 群 (抗 PD-1 [non-blocking] 抗体投与) で (8.44 \pm 2.60 %), D 群 (抗 PD-L1 [blocking] 抗体投与) で (11.39 \pm 4.83 %), E 群 (抗 PD-L2 [blocking] 抗体投与) で (7.52 \pm 3.52 %), F 群 (抗 PD-L1 [blocking] 抗体+抗 PD-L2 抗体投与) で (8.63 \pm 7.64%) であった。心筋障害の程度は、A 群に比べて B 群で有意に (p=0.025) 増大していた。C 群も A 群に比べて増大する傾向が見られたが有意ではなかった。これに対して C 群, E 群, F 群では心筋障害の増大傾向は認められなかった。

(B) 心筋組織内浸潤細胞の活性化に対する抗 PD-1 (blocking) 抗体投与の効果を検討するため、A 群および B 群のマウスの心筋組織より RNA を抽出して IL-2, IFN- γ , CD40L, FasL, perforin, CVB3 genome の発現を半定量的 RT-PCR 法により解析したところ、IL-2 の発現については両群間で有意差を認めなかったが、IFN- γ , CD40L, FasL, perforin, CVB3 genome の発現は抗 PD-1 (blocking) 抗体を投与した B 群で有意の増強を認めた。internal standard としての GAPDH の発現は各マウス間でほぼ同等であった。

(C) A 群および B 群のマウスの心筋組織内浸潤細胞の中で apoptosis を起こした浸潤細胞の割合を TUNEL 染色により比較検討したところ、両群間で有意差を認めなかった。

考察

我々はこれまで、マウスの急性ウイルス性心筋炎において種々の costimulatory molecule の果たす役割を解析し、中でも B7-1/CD28, ICAM-1/LFA-

1, CD40/CD40L, 4-1BB/4-1BBL, Fas/FasL の pathway が心筋障害の形成に重要であることを報告してきた。これらの pathway は T 細胞の抗原特異的な活性化に positive signal を媒介すると考えられるが、今回、negative signal を媒介するとされる PD-1/PD-1 ligands pathway の役割を解析したところ、この pathway は心筋障害の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに PD-1 ligands の中でも、PD-L1 が心筋細胞等に発現誘導されることにより、浸潤細胞上の PD-1 と心筋細胞上の PD-L1 を介する pathway によりこの作用が媒介されていることが明らかとなった。また、PD-1/PD-L1 pathway による心筋障害抑制の機序としては、主として浸潤細胞の活性化の抑制が考えられ、浸潤細胞の apoptosis 誘導によるものではないと考えられた。これに対して PD-L2 は、少なくとも急性ウイルス性心筋炎の本モデルにおいてはほとんど関与していないと考えられた。さらに我々は、PD-1 を介する pathway を agonistic に刺激する抗体を投与した実験により PD-1/PD-1 ligands pathway を賦活化することにより、マウ

スの急性ウイルス性心筋炎の心筋障害を有意に抑制できることを見出している。このことから、agonistic 抗体や薬物などにより PD-1/PD-1 ligands pathway を賦活化する免疫療法は、ヒトの急性心筋炎の治療、ひいては拡張型心筋症への進展予防に有効である可能性が強く示唆された。

結論

本研究では、ウイルス性心筋炎のマウスの実験モデルを用いて、T 細胞の抗原特異的な活性化に対して negative signal を媒介するとされる CD28/B7 の costimulatory molecule PD-1/PD-1 ligands pathway の役割を解析した。心筋炎において PD-L1 が心筋細胞上に発現誘導されることにより心筋組織内浸潤細胞上の PD-1 と心筋細胞上の PD-L1 を介する pathway が活性化され、浸潤細胞の活性化を抑制することにより心筋障害の形成に抑制的に作用していると考えられた。PD-1/PD-1 ligands pathway を賦活化する免疫療法は、ヒトの急性心筋炎・拡張型心筋症の治療・予防に有効であると考えられ、臨床応用に向けた検討が期待される。

研究発表

学会発表

1. 2003年10月18日 札幌

心筋症・心不全国際シンポジウム

Roles of Costimulatory Molecules in the Development of Murine Acute Myocarditis Caused by Coxsackievirus B3.