

心臓の免疫応答に関する研究

所属機関 北里大学医学部内科学
研究者名 和泉 徹

心臓移植と免疫に関する研究では、移植心慢性拒絶反応に細胞周期調節遺伝子を標的とした遺伝子治療の有効性について研究が進められた。E2F デコイの強力な内膜新生作用、及び bcl-x の抑制によるアポトーシスの誘導が移植心冠動脈内膜肥厚抑制に有効であるか否かをマウス心移植モデルを用いて検証したところ、転写因子である E2F は静止期では不活性化されているが、細胞周期調節において S 期進展に必要な細胞周期調節遺伝子群を活性化し細胞増殖を引き起こした。さらに E2F 結合配列と同じ配列をもつ 2 本鎖核酸化合物（デコイ）の導入により、転写因子 E2F の結合を競合的に阻害すると考えられた。一方、動脈硬化におけるアポトーシスの重要性も明らかにされた。アポトーシスは bcl-x などの抑制因子と bax などの促進因子のバランスで制御されているが、増殖する血管平滑筋細胞のアポトーシスの誘導により内膜肥厚が抑制されると考えられる。非免疫抑制下に生ずる移植心冠動脈硬化における血管平滑筋増殖においても、細胞周期調節遺伝子である E2F デコイ遺伝子の導入およびアンチセンス bcl-x オリゴはその進展予防に効果があることが実験的に示された。臨床応用に向けてさらに検討を重ねることが必要である。

心筋の自己免疫応答に関する研究ではモデル動物における自己免疫性心筋症の発症メカニズムを自己抗原の観点から検討してきた。現在まで同動物モデルでは細胞性免疫主体の自己免疫応答が注目されており、免疫反応の 3 分子複合体モデルを考える上で、T 細胞が認識するアミノ酸は 15-20 程度と考えられていた。ところが、この研究結果、それを大幅に超える 30 アミノ酸が心筋炎惹起に必要であることが明らかとなった。このアミノ酸数の解釈は ELISA を用いた自己抗原に対する抗体価測定にて立証することが可能であった。即ち、活性化 B 細胞が抗原提示機能の一端を担っており、心筋炎惹起には T 及び B 細胞のいずれをも活性化させるエピトープが必要であり、なおかつ各々が独立しているため長いアミノ酸が必要である。心臓の自己免疫における抗原、T 細胞、心筋樹状細胞（抗原提示細胞）の 3 分子複合体の重要な部分が明らかになりつつある。心臓の自己免疫応答に注目し、拡張型心筋症との関連や心筋障害のメカニズムの検索を行っている研究者は少なく、その重要性に比して解明されていない点が多い。実験的自己免疫性心筋炎モデルは自己タンパクである心筋ミオシン分画感作によりヒト心筋炎、心筋症に類似した臨床経過をとる。なぜ心筋において免疫破綻が生じるのか、また各免疫担当細胞がどのような役割を果たしているのかを詳細に検討し、臨床応用を試みる点が独創的であり、今後の更なる展開が待たれている。

現在までヒト樹状細胞の同定には S-100 抗体と HLA-DR 抗体の組み合わせ法を用いてきたが、両抗体による陽性細胞には解離が認められており、新たなマーカーが必要となってきた。心筋樹状細胞の発生と分化に関する研究では、ヒト樹状細胞の新たなマーカーとして Birbeck 顆粒に対する抗体とマクロファージ前駆細胞の抗体に注目し、ヒト胎児組織、及び、種々心筋疾患症例を対象にその分化機構を再検討した。その結果、心筋樹状細胞は胎児心では胎生 5 ヶ月から発現し散在性に分布するようになること、および心筋炎において重要な役割を演ずることが推測された。本研究において樹状細胞の心臓における意義に新たな視点が得られたが、樹状細胞とマクロファージの分化の振り分けがどのようになさ

れるかについては完全には明確にされておらず、今後これらの成果をふまえ、心臓樹状細胞とマクロファージの分化機序、心筋炎における両細胞の役割が課題となる。

心筋炎・心筋症と免疫に関する研究では、①心筋梗塞後心不全への炎症性サイトカイン関与とその転写因子である NF- κ B 活性について、②マウスウィルス性心筋炎モデルにおける肥満細胞の役割、を検索した。まず、ラットの左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成し、炎症性サイトカイン mRNA、形態、NF- κ B について調べた。その結果、早期には梗塞部にサイトカイン mRNA が発現したが、20 週後には非梗塞部に強かった。この非梗塞部での mRNA 発現は左室径の増大と相関していた。また IL-1 β のみが非梗塞部のコラーゲン量と相関した。活性化型 NF- κ B は 20 週後には非梗塞部に検出された。この転写因子 NF- κ B は血管内皮細胞や間質の浸潤細胞にみられ、特に IL-1 β 陽性細胞において NF- κ B の活性化が見られた。次いで、マウスウィルス性心筋炎における肥満細胞の役割を免疫学的側面より検討した。その結果、肥満細胞はウィルス性心筋炎において、ウィルスの排除には有利に働くものの、組織の炎症を悪化させ生存率を低下させるものと考えられた。肥満細胞はヘルパー T 細胞サブセットのバランスを Th1 優位に偏位させたと考えられる。

生体防御からみた心臓の免疫応答に関する研究では、動脈硬化進展の分子機構を単球、マクロファージの遊走活性化に関与するケモカイン分子 MCP-1 を中心に明らかにし、新たな治療法への応用の可能性を検討することを試みた。まず末梢血液中の MCP-1 濃度を測定し、動脈硬化危険因子との相関を検定し、さらに、培養細胞を用い、女性ホルモンエストロゲンの MCP-1 産生抑制の分子機構について検討を行った。その結果、エストロゲンの MCP-1 産生抑制は分子機構のひとつとして NF- κ B を介したものであることが明らかにした。また MCP-1 の受容体である CCR2 と結合する分子を検索し、粥状動脈硬化進展制御のための分子標的となり得るか検討したところ、MCP-1 の CCR2 を介した細胞遊走に重要な役割を担う新規遺伝子を得られた。この分子は粥状動脈硬化進展を制御するための分子標的となる可能性が示唆され、今後の展開が期待される。

以上

I 心臓移植と免疫に関する研究

信州大学医学部第一内科 磯部光章
(現 東京医科歯科大学医学部第三内科)

1. 研究目的

細胞周期調節遺伝子の発現と、アンチセンス cdk2kinase 遺伝子導入による内膜肥厚進展予防効果について検索し、移植心慢性拒絶反応に細胞周期調節遺伝子を標的とした遺伝子治療が有効である可能性が示された。転写因子である E2F は静止期では不活性化されているが、細胞周期調節において S 期進展に必要な細胞周期調節遺伝子群を活性化し、細胞増殖を引き起こす。E2F 結合配列と同じ配列をもつ 2 本鎖核酸化合物 (デコイ) の導入により、転写因子 E2F の結合を競合的に阻害することが期待される。一方、動脈硬化におけるアポトーシスの重要性が明らかにされている。アポトーシスは bcl-x などの抑制因子と bax などの促進因子のバランスで制御されていることが示されている。増殖する血管平滑筋細胞のアポトーシスの誘導により内膜肥厚が抑制される可能性が考えられる。そこで E2F デコイの強力な内膜新生作用、さらに bcl-x の抑制によるアポトーシスの誘導が移植心冠動脈内膜肥厚抑制に有効であるか否かをマウス心移植のモデルを用いて検討した。

2. 研究計画、並びに対象・方法

DBA/2 マウス (オス 20-25g) の心臓を摘出して B10D2 マウス (オス 20-25g) に異所性に移植した。異所性心移植は既報の通り行った。即ち、HVJ-liposome 法による遺伝子導入は ODN をドナー心の大動脈より注入し、4°C で 10 分間留置した。E2F デコイとして 5'-CTA-GAT-TTC-CCG-CG-3'、3'-TA-AAG-GGC-GCC-TAG-5' を用いた。bcl-x のアンチセンス ODN として 5'-GTT-GCT-CTG-AGA-CAT-TTT-3'、センス ODN は 5'-AAA-ATG-TCT-CAG-AGC-AAC-3' を用いた。ドナーへの免疫抑制等の治療は行わなかった。移植心は 28 日目に採取した。いずれの移植心も凍結薄切病理標本を作製し、Elasticavan Gieson 染色により冠動脈の肥厚内膜の内弾性板内占拠率を以下のように算出した。IEL (内弾性板) で囲まれた面積 - 血管内腔面積 / IEL で囲まれた面積。発現の強さはスコア化 (score 0-3) して、半定量的に評価した。アポトーシスは TUNEL 法により検出し、陽性細胞を半定量的に評価した。

3. 研究成果

E2F デコイ投与はデコイ投与群、コントロール遺伝子導入群とも 4 匹ずつ、それぞれ 24 血管について検討を行った。無導入群 (内弾性板内占拠率 $60 \pm 23\%$) では冠動脈内膜肥厚を認めたのに対し、E2F デコイ導入群 ($15 \pm 9\%$ 、 $p < 0.01$) ではその進展は著明に抑制されていた。同様に血管内膜での ICAM-1 の発現は無導入群 (2.3 ± 0.8) で著しく、E2F デコイ導入群 (0.7 ± 0.5 、 $p < 0.01$) では抑制されていた。VCAM-1 の発現も同様であった (1.8 ± 0.4 vs 1.0 ± 0.2 、 $p < 0.01$)。また PDGF-BmRNA の発現も E2F デコイ群で抑制されていた (1.6 ± 1.0 vs 1.0 ± 0.2 、 $p < 0.01$)。cdk2 and cdc2 kinase mRNA の発現も同様に有意差をもって抑制されていた。一方病理学的に検討した拒絶反応の程度については各群で差を認めなかった。アンチセンス ODN 導入群では内膜肥厚の抑制が認められ、TUNEL 陽性細胞の増加していた。また血管内皮における ICAM-1、VCAM-1 の発現も抑制されていた。

4. 考察

接着分子の阻害による寛容の誘導は我々が世界に先駆けて開発した方法である。このモデルを使用して臨床応用可能な免疫抑制法の可能性を検討する点に特色がある。また移植心冠動脈硬化に対する遺伝子治療も斬新な方法であり、慢性拒絶のみならず、虚血再灌流障害や急性拒絶の軽減効果をも期待されるところである。非免疫抑制下に生ずる移植心冠動脈硬化における血管平滑筋増殖においても細胞周期調節遺伝子である E2F デコイ 遺伝子の導入およびアンチセンス bcl-x オリゴはその進展予防に効果があることが明らかになった。臨床応用に向けてさらに検討を重ねることが必要である。

5. 研究成果の発表

1. Suzuki J, Isobe M, Aoki M, Morishita M, Yamazaki S, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Antisense Cdk2 kinase oligonucleotide inhibits ICAM-1 expression in murine cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc*, 30: 89-90, 1998
2. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Down-regulation of endothelin-1 expression in allograft coronary arteries after gene therapy targeting cdk2 kinase. *Transplant Proc*, 30: 1007-1008, 1998
3. Yazaki Y, Isobe M, Hiramitsu S, Morimoto S, Hiroe M, Ohmichi K, Nakano T, Saeki M, Izumi T, Sekiguchi M: Clinical features and prognosis of cardiac sarcoidosis presenting as dilated cardiomyopathy: a comparative study with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 82: 537-540, 1998
4. Yazaki Y, Isobe M, Yamazaki S, Sekiguchi M, Usuda N: Ultrastructural and immunohistochemical analysis of biopsy-proven chronic active myocarditis with numerous clusters of lymphocytes. *Virchows Archiv*, 433: 161-166, 1998
5. Yamazaki S, Isobe M, Suzuki J, Tojo S, Rorie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Role of selectin-dependent adhesion in cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 17: 1007-16, 1998
6. Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Sensitive diagnosis of cardiac allograft rejection by detection of cytokine transcription in situ. *Cardiovasc Res*, 40: 307-313, 1998
7. Takamoto M, Isobe M, Sugane K: The role of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4 interactions on T helper 2 cytokine production by lung T cells of toxocaracanis-infected mice. *Immunology*, 95: 419-426, 1998
8. Hokibara S, Takamoto M, Isobe M, Sugane K: Effects of monoclonal antibodies to adhesion molecules on eosinophilic myocarditis in *Toxocara canis*-infected CBA/J mice. *Clin Exp Immunol*, 114:236-244, 1998
9. Watanabe Y, Yoshimura R, Wada S, Suzuki J, Ohyama A, Kishimoto T, Isobe M: Nonmuscle and smooth muscle myosin heavy-chain expression in rat renal allografts. *Transplant Proc* 30: 2024-2025, 1998

10. Schoenbeck A, Isobe M, Suzuki J, Kato M, Kitazawa N, Amano J, Endoh M, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Expression of cell division cycle 2 kinase transcription in chronically rejected cardiac allografts of non-human primates. *Heart Vessels*, 12: 275-279, 1997
11. Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M: Cytokine profile of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation*, 66: 1504-1510, 1998
12. Isobe M, Suzuki J: Prevention of transplantation associated arteriosclerosis. *The Ischemic Heart*, ed. Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, Dhalla NS, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp551-562, 1998
13. Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Prevention of cardiac allograft arteriopathy by antisense cdc2 kinase oligonucleotide. *Transplant Proc*, 31: 867-868, 1999
14. Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Antisense cdc2 kinase oligonucleotide inhibits adhesion molecule expression in cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc*, 31: 955-956, 1999
15. Isobe M: Sensitive Detection of cardiac allograft rejection by radioimmune scintigraphy targeting accessory molecules on cardiac myocytes. *Cardiac Allograft Rejection*. ed. Dec W, Ballester M, Narula J, Springer-Verlag, in press.
16. Yamagami S, Tsuru T, Ohkawa T, Endo H, Isobe M: Suppression of allograft rejection with anti-ab T cell receptor antibody in rat corneal transplantation. *Transplantation*, in press
17. Suzuki J, Isobe M, Okubo Y, Amano J, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Differential regulation of cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *Transplant Immunol*, in press
18. Kamijima T, Isobe M, Suzuki J, Izawa A, Kumazaki S, Fukui D, Arai M, Urayama H, Nishimaki K, Sekiguchi M, Kawasaki S: Enhanced Embryonic Nonmuscle Myosin Heavy Chain Isoform And Matrix Metalloproteinase Expression in Aortic Abdominal Aneurysm With Rapid Progression. *Cardiovasc Pathol*, in press
19. Isobe M, Suzuki J: Prevention of transplantation associated arteriosclerosis. *The Ischemic Heart*, ed. Mochizuki S, Takeda N, Nagano M, Dhalla NS, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp551-562, 1998
20. Isobe M: Sensitive Detection of cardiac allograft rejection by radioimmune scintigraphy targeting accessory molecules on cardiac myocytes. *Cardiac Allograft Rejection*. ed. Dec W, Ballester M, Narula J, Springer-Verlag, in press.
21. Isobe M, Hori J, Suzuki J: Immunosuppression by blocking α 4 integrin and VCAM-1. *Cur Top Microbiol Immunol* 231: 85-98, 1998

22. Isobe M, Suzuki J: New approaches to the management of acute and chronic cardiac allograft rejection. *Jpn Circ J*, [Special article] 62: 315-327, 1998.
23. Suzuki J, Isobe M, Aoki M, Morishita M, Yamazaki S, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Antisense Cdk2 kinase oligonucleotide inhibits ICAM-1 expression in murine cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc*, 30: 89-90, 1998
24. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Amano J, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Down-regulation of endothelin-1 expression in allograft coronary arteries after gene therapy targeting cdk2 kinase. *Transplant Proc*, 30: 1007-1008, 1998
25. Yamazaki S, Isobe M, Suzuki J, Tojo S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Role of selectin-dependent adhesion in cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 17: 1007-16, 1998
26. Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo Y, Sekiguchi M: Sensitive diagnosis of cardiac allograft rejection by detection of cytokine transcription in situ. *Cardiovasc Res*, 40: 307-313, 1998
27. Watanabe Y, Yoshimura R, Wada S, Suzuki J, Ohyama A, Kishimoto T, Isobe M: Nonmuscle and smooth muscle myosin heavy-chain expression in rat renal allografts. *Transplant Proc* 30: 2024-2025, 1998.
28. Schoenbeck A, Isobe M, Suzuki J, Kato M, Kitazawa N, Amano J, Endoh M, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Expression of cell division cycle 2 kinase transcription in chronically rejected cardiac allografts of non-human primates. *Heart Vessels*, 12: 275-279, 1997
29. Yamagami S, Kawashima H, Endo H, Tsuru T, Shibui H, Kagawa Y, Hori J, Yamagami H, Isobe M: Cytokine profile of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation. *Transplantation*, 66: 1504-1510, 1998
30. Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Prevention of cardiac allograft arteriopathy by antisense cdc2 kinase oligonucleotide. *Transplant Proc*, 31: 867-868, 1999.
31. Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Antisense cdc2 kinase oligonucleotide inhibits adhesion molecule expression in cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc*, 31: 955-956, 1999
32. Yamagami S, Tsuru T, Ohkawa T, Endo H, Isobe M: Suppression of allograft rejection with anti-ab T cell receptor antibody in rat corneal transplantation. *Transplantation*, in press
33. Suzuki J, Isobe M, Okubo Y, Amano J, Kawauchi M, Takamoto S, Sekiguchi M: Differential regulation of cardiac allograft acceptance by blocking cell adhesion of ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *Transplant Immunol*, 7: 65-72, 1999

34. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Izawa A, Yamazaki S, Okubo Y, Kaneda Y, Sekiguchi M. E2F decoy suppresses E-selectin expression in murine cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc* 31: 2018-9, 1999
35. Suzuki J, Izawa A, Morishita R, Kaneda Y, Sawa Y, Okubo Y, Ogihara T, Sekiguchi M, Isobe M: Antisense cdc2 kinase oligonucleotide inhibits adhesion molecule expression in cardiac allograft arteriopathy. *Transplant Proc*, 31: 955-956, 1999
36. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y. Antisense bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res*, 45:783-787, 2000
37. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Kaneda Y, Amano J: Gene Therapy for Heart Transplantation-associated Coronary Arteriosclerosis. *Ann NY Acad Sci*, in press
38. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y: Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis using antisense proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotide. *Transplantation*, in press.
39. Kitabayashi H, Isobe M, Suzuki J, Yazaki Y, Sekiguchi M: FTY720, with a unique mechanism of action, prevents development of experimental autoimmune myocarditis. *J Cardiovasc Pharmacol*, in press
40. Suzuki J, Isobe M, Kawauchi M, Endoh M, Amano J, Takamoto S: Altered expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in acutely rejected myocardium and coronary arteriosclerosis in cardiac allografts of nonhuman primates. *Transplant Immunol*, in press.
41. Suzuki J, Isobe M, Mitsui F, Takei M, Amano J, Sekiguchi M: Immature Mesenchyme Cells in the Channels of Cardiac Myxoma Secrete Interleukin-6. *Cardiovasc Pathol*, in press
42. Takahashi W, Suzuki J, Izawa A, Takayama K, Yamazaki S, Isobe M: Inducible nitric oxide-mediated myocardial apoptosis contributes to graft failure during acute cardiac allograft rejection in mice. *Jpn Heart J*, in press

II 心筋の自己免疫応答に関する研究

北里大学医学部内科学 和泉 徹

1. 研究目的

心筋ミオシンを感作する事により発症する実験的自己免疫性心筋炎は、心筋炎が終焉した後、再感作することにより拡張型心筋症化し、さらに心筋症の発症機序の解明に重要な役割を果たすと考えられる。我々はラット心筋炎モデルを用いて自己免疫性心筋症の発症メカニズムを検索した。

2. 研究計画、並びに対象・方法

心筋ミオシン感作により心筋炎が惹起される実験的自己免疫性心筋炎モデルは既に心筋ミオシン分画 96 アミノ酸内に抗原エピトープが存在し、さらに T 細胞移注試験により心筋炎が惹起されることより細胞性免疫主体の自己免疫反応モデルである事が明らかとされている。同モデルを用いて T 細胞が認識する抗原を絞り込み、また、抗原特異的 T 細胞株の樹立を行う。さらに抗原提示細胞としての心筋樹状細胞に注目し、いわゆる免疫学的 3 分子複合体モデルの解明を進める。

3. 研究成果

我々は心筋ミオシン重鎖ロッド部分の 1070-1169 の後半 40 アミノ酸内にエピトープが局在していることを明らかにした。現在までラット心筋炎モデルは T 細胞が免疫応答の主体であると考えられており、自己障害性 T 細胞が認識するアミノ酸数は 10-20 程度であるとの観点より更なるエピトープの絞り込みを行った。しかし、結果的に絞り込まれたアミノ酸は 1124-1153 の 30 アミノ酸でありそれ以上エピトープを絞り込むと心筋炎は惹起されなかった。細胞性免疫における 3 分子複合体モデルを考える上で最終的に 10-20 程度のアミノ酸があれば T 細胞は抗原を認識できるはずなので、このアミノ酸の長さは T 細胞に依存するのではなく、抗原提示機能に関わっている可能性が考えられた。近年、B 細胞が強力な抗原提示能を有していることが再認識されてきた。そこで我々は種々ペプチドを作成し、自己抗原に対する抗体価の変動を ELISA 法を用いて検討した。心筋炎惹起ラットは全例で抗原（心筋ミオシン）抗体価が上昇しており、非惹起群は抗体価の上昇を認めなかった。このことより、心筋ミオシンの一部が B 細胞を活性化し、抗原提示能を高める事が、自己免疫応答を介する心筋障害を惹起するのに必要条件ではないかと考えられた。つまり、T 細胞と B 細胞、各々のエピトープが同時に存在するため、長いアミノ酸数が必要であるとの解釈である。

4. 考察

心臓の自己免疫における抗原、T 細胞、心筋樹状細胞（抗原提示細胞）の 3 分子複合体の重要な部分が明らかになりつつある。心臓の自己免疫応答に注目し、拡張型心筋症との関連や心筋障害のメカニズムの検索を行っている研究者は少なく、その重要性に比して解明されていない点が多い。我々が作成した実験的自己免疫性心筋炎モデルは自己タンパクである心筋ミオシン分画感作によりヒト心筋炎、心筋症に類似した臨床経過をとる。なぜ心筋において免疫破綻が生じるのか、また各免疫担当細胞がどのような役割を果たしているのかを詳細に検討し、臨床応用を試みる点が独創的であり、今後の更なる展開が待たれている研究分野である。

5. 研究成果の発表

1. Hanawa H, Inomata T, Okura Y, Hirano S, Ogawa Y, Izumi T, Kodama M, 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* 1998 Jul. 27; 83(2):

2. Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S, Abo T.: Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res* 1998 Jun. 1; 82(10):1035-42
3. Yazaki Y, Izumi T, et al: Comparison of clinical features and prognosis of cardiac sarcoidosis and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 82: 537-40, 1998.
4. Ito H, Izumi T, et al: Effect of prolonged administration of a urinary kininase inhibitor, ebelactone B on the development of deoxycortico-sterone acetate-salts hypertension in rats. *Brit J Pharmacol*, 126: 613-20, 1999.
5. 松田千絵子、和泉 徹: 免疫と心筋症。治療学。 32: 54-57、1998
6. 大倉祐二、和泉 徹: NOSmRNA の解析 ribonuclease protein assay の応用。続心筋代謝実験法。 556-561. 1998
7. 和泉 徹: 遷延する心筋炎と特発性心筋症に関する研究。厚生省特定疾患に関する微生物研究班 平成 10 年度報告書 46-48、1999
8. Ken Kohno, Tohru Izumi, et al: Advantage of recombinant technology for the identification of cardiac myosin epitope of severe autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Jpn. Heart. J.*, 41: 2000 67-77.
9. Hiroyuki Yokoyama, Tohru Izumi, et al: Cardiac Dendritic Cells and Acute Myocarditis in the Human Heart. *Jpn Circ. J.*, 64: 57-64, 2000
10. Ken Kohno, Tohru Izumi, et al: Resuscitation from Fulminant Myocarditis Associated with Refractory Ventricular Fibrillation. *Jpn. Circ. J.*, 64: 139-143, 2000

Ⅲ 心筋樹状細胞の発生と分化、病態に関する研究

新潟大学医学部病理学 内藤 真

1. 研究目的

従来ヒト胎芽・胎児の樹状細胞の発生は、Watanabe らの免疫組織学的観察がある。それによれば、ヒト胎児においては胸腺髄質に S-100 陽性細胞が出現し樹状細胞となり、その後リンパ網内系組織に分布する。しかしヒト心臓の樹状細胞の発生と分布についての報告はない。心臓樹状細胞の発生と分化をヒト個体発生の観点から検討してみたが、ヒトにおいて樹状細胞のマーカーとして決め手になる抗体はないと結論付けた。そこで、S-100 抗体と HLA-DR 抗体を組み合わせて同定してみると、両抗体による陽性細胞には解離があり、分化機構を検討するには新たなマーカーが必要と考えられた。そこで、さらに新たに作成された Birbeck 顆粒に対する抗体とマクロファージ前駆細胞の抗体を用いて 1)心臓を含むヒト胎児組織 2)種々心筋疾患症例について検討した。

2. 研究計画、並びに対象・方法

免疫組織化学には抗 S-100 抗体 (polyclonal、DAKO)、CD1a (monoclonal、Immunotech)、Lag (anti-human Langerhans cell: monoclonal、IBL)、CD68 (KP-1) を用いた。材料としてヒト胎芽・胎児 (胎齢 1-10 ヶ月) 人工流産および剖検例の心臓 20 例およびウイルス性心筋炎症例 4 例を用いた。

3. 研究成果

①胎齢 4 カ月未満の胎芽・胎児には胸腺を含め、いずれの臓器にも樹状細胞は認められなかった。②心臓では胎齢 5 カ月から心筋間、心内膜下、あるいは血管周囲結合織内に散在性に樹状細胞が少数出現し、6 カ月に最多となり、その後漸減した。③いずれの抗体でも陽性細胞は類円形を呈するものが多く、一部樹状の形態を呈した。④CD1a と Lag 抗体を用いた免疫染色所見は合致しており、抗 S100 蛋白抗体単独による樹状細胞の検出より信頼性が高いと考えられた。⑤ウイルス性心筋炎では樹状細胞の著増が観察された。なお、胎生期後半から成人期の心臓には一定密度の樹状細胞が常在した。以上の成績から、胎児では樹状細胞が心臓において胎生 5 ヶ月から発現し、散在性に分布するようになること、および心筋炎において重要な役割を演ずることが推測された。

4. 考察

本研究において樹状細胞の心臓における意義に新たな視点が得られたが、樹状細胞とマクロファージの分化の振り分けがどのようになされるかについては明確にされておらず、今後これらの成果をふまえ、心臓樹状細胞とマクロファージの分化機序、心筋炎における両細胞の役割が明らかにされることが期待される。

5. 研究成果の発表

1. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M: Distribution of Heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101: 604-612, 1998
2. Takatsuka H, Umezu H, Hasegawa G, Usuda H, Ebe Y, Naito M, Shultz LD: Bone remodeling and macrophage differentiation in osteopetrosis (op) mutant mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor. *J Submicr Cytol Pathol* 30:239・247, 1998
3. Takahashi K, Miyakawa K, Wynn AA, Nakayama K, Myint YY, Naito M, Shultz LD, Tominaga A, Takatsu K: Effects of granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor on the development and differentiation of CD5-positive macrophages and their potential derivation from a CD5-positive B-cell lineage in mice. *Am J Pathol* 152: 445-456, 1998
4. 和田洋一郎、高久幹夫、竹屋元裕、内藤 眞、児玉龍彦: プラーク崩壊の分子生物学的メカニズム。 *Cardiologist*3:13-17, 1998
5. Sonoda Y, Mukaida N, Wang J, Shimada・Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, Harada

- A, Inoue M, Matsushima K: Physiological regulation of post-ovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol* 160:6159-6165, 1998
6. Umezu H, Naito M, Ebe Y, Umeda S, Shultz LD: Macrophages and dendritic cell populations in the flaky skin (fsn) mutant mice. *Dendritic Cells* 8: 27-31, 1998
 7. Watanabe K, Toba K, Ogawa Y, Kodama M, Hirono S, Ohkura Y, Hanawa H, Nakamura Y, Aoki Y, Fuse I, Aizawa Y, Miyajima S, Kusano Y, Nagatomo T, Hasegawa G, Naito M: Hypertrophic cardiomyopathy with type I CD36 deficiency. *Jpn Circulation J* 62: 541-542, 1998
 8. 内藤 眞、薄田 浩幸、梅津 哉: 破骨細胞、病理と臨床 16:1082-1088, 1998
 9. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Mitsuyama M: Development, differentiation, and host defense function of Kupffer cells. In *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*, eds. K. Tanigawa, M. Ueno, Springer-Verlag, Tokyo, p.66-75, 1998
 10. Takahashi K, Takeya M, Miyakawa K, Hagiwara S, Wynn AA, Naito M, Yamada M: The multiple roles of macrophages in hepatic granuloma formation in mice. In *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*, eds. K. Tanigawa, M. Ueno, Springer-Verlag, Tokyo, p.128-140, 1998
 11. Shiratori Y, Knai F, Hamada H, Moriyama H, Hikiba Y, Naito M, Omata M: Modulation of hepatic sinusoidal cell function by transduction of genes in the liver: Gene therapy for hepatic micro-metastasis. In *Liver Diseases and Hepatic Sinusoidal Cells*, eds. K. Tanigawa, M. Ueno, Springer-Verlag, Tokyo, p.296-306, 1998
 12. Shibata S, Asano T, Noguchi A, Naito M, Ogura A, Doi K: Peritoneal macrophages Play an important role in eliminating human cells from severe combined immunodeficient mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes. *Immunol* 93: 524-532, 1998
 13. 内藤 眞、梅津哉: 血中樹状細胞。樹状細胞—免疫システムの司令塔。今井大・玉置邦彦・笠島武 編、p.101-103, 1998
 14. 内藤 眞、梅津哉: ヴェール細胞。樹状細胞—免疫システムの司令塔。今井大・玉置邦彦・笠島武 編、p.73-75, 1998
 15. Watanabe K, Ohta Y, Toba K, Ogawa Y, Hanawa H, Hirokawa Y, Kodama M, Tanabe N, Hirono S, Ohkura Y, Nakamura Y, Kato K, Aizawa Y, Fuse I, Miyajima S, Kusano Y, Nagamoto T, Hasegawa G, Naito M: Myocardial CD36 expression and fatty acid accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency. *Ann Nucl Med* 12: 261-266, 1998
 16. Kyaw Y, Hasegawa G, Takatsuka H, Shimada-Hiratsuka M, Umezu H, arakawa M, Naito M: Expression of macrophage colony-stimulating factor and scavenger receptors in pregnant uterus of mice. *Arch Histol Cytol* 61: 383-393, 1998

17. Miyazaki T, Hirokami Y, Matsushashi N, Takatsuka H, Naito M: Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Exp Med* 189: 413-422, 1999
18. Ito S, Naito M, Kobayashi Y, Takatsuka H, Jiang S, Usuda H, Umezu H, Hasegawa G, Arakawa M, Shultz LD, Elomaa O, Tryggvason K: Roles of Macrophage Receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. *Arch Histol Cytol* 62: 83-95, 1999
19. Myint YY, Miyakawa K, Naito M, Shultz LD, Oike Y, Yamamura K, Takahashi K: Granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. *Am J Pathol* 154: 553-566, 1999
20. Hatano H, Tokunaga K, Ogose A, Imaizumi S, Hayami T, Yamagiwa H, Hotta T, Endo N, Takahashi HE, Naito M: Origin of histiocyte-like cells and multinucleated giant cells in malignant fibrous histiocytoma: Neoplastic or reactive? *Pathol Int* 49: 14-22, 1999
21. Ito S, Naito M, Kobayashi Y, Takatsuka H, , Jiang S, Usuda H, Umezu H, Hasegawa G, Arakawa M, Shultz LD, Elomaa O, Tryggvason K: Roles of Macrophage Receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. *Arch Histol Cytol* 62: 83-95, 1999
22. Ebe Y, Go Hasegawa G, Takatsuka H, Umezu H, Mitsuyama M, Arakawa M, Mukaida N, Matsushima K, Naito M: The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 49: 519-532, 1999
23. 内藤 眞、高塚尚和、江部祐輔、伊藤重雄、梅津哉 : マクロファージコロニー刺激因子欠損マウス (op) の加齢による骨髓造血の変化。新潟医誌 1999
24. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, Kodama T: An in vitro co-culture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19: 2330-2339, 1999
25. Yamamoto T, Ebe Y, Hasegawa G, Kataoka M, Yamamoto S, Naito M: Expression of scavenger receptor class A and CD 14 in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Pathol Int* 49:983-992, 1999
26. Naito M, Hasegawa G, Ito S, Ebe r: Development and differentiation of macrophages, osteoclasts, and dendritic cells. In *Mechanical Loading of Bones and Joints*. ed. HE Takahashi, Springer-Verlag Tokyo, p.35-42, 1999
27. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435-447, 1999
28. Umeda S, Beamer WG, Takagi K, Naito M, Hayashi S-I, Yonemitsu H, Yi T, Shultz

- LD: Deficiency of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase activity results in heightened osteoclast function and decreased bone density. *Am J Pathol* 155: 223-233, 1999
29. 内藤 眞 : マクロファージとリンパ組織。リンパ学 22: 15-20 1999
 30. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Stoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T: PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4: 597-609, 1999
 31. Takeishi, T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M: The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 62: 413-422, 1999
 32. Kumamoto Y, Suematsu M, Shimazu M, Kato Y, Sano T, Makino N, Hirano K, Naito M, Wakabayashi G, Ishimura Y, Kitajima M: Kupffer cell-independent acute hepatocellular oxidative stress and decreased bile formation in post-cold-ischemic rat liver. *Hepatology* 30: 1454-1463, 1999
 33. Jiang Shuying、高塚尚和、貝津智佳子、向田直史、Shultz LD、内藤 眞 : 大理石病マウス (op/op) における LPS 肝障害。肝類道壁細胞研究の進歩、第 11 巻、(谷川久一、内藤 眞、市田隆文編)、37-40、アークメディア、東京、1999
 34. 小林義昭、内藤 眞、渡部久美、宮地智香子、安保徹、荒川正昭、下條文武、鈴木宏志、児玉龍彦 : LPS 肝障害におけるスカベンジャー受容体の機能解析。肝類道壁細胞研究の進歩、第 11 巻、(谷川久一、内藤眞、市田隆文編)、22-25、アークメディア、東京、1999
 35. 竹石利行、高塚尚和、平野謙一郎、小林隆、畠山勝義、内藤 眞 : 肝再生における Kupffer 細胞の役割。肝類道壁細胞研究の進歩、第 11 巻、(谷川久一、内藤眞、市田隆文編)、107-110、アークメディア、東京、1999
 36. 和田洋一郎、竹屋元裕、内藤 眞、油谷浩幸、二木鋭雄、児玉龍彦 : 動脈硬化における血管壁細胞およびマクロファージの役割と遺伝子発現解析。Free Radicals in Clinical Medicine フリーラジカルの臨床。14 巻、(近藤元治、内海耕造、吉岡保、吉川敏一編)、日本医学館、東京、59-62、1999
 37. Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, Nagatomo T, Fuse K, Ito M, Hirono S, Ohkura Y, Kato K, Kodama M, Aizawa y: Effects of long-term treatment with carvedilol in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis. *J Cardiovascular Pharmacol* 34 (Suppl. 4): S77-S80, 1999

IV 心筋炎・心筋症と免疫に関する研究

京都大学医学部第三内科 松森 昭

1. 研究の目的

腫瘍壊死因子 (TNF) α 、インターロイキン (IL) $1b$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインは心筋に対し機能異常を惹起する。我々は心筋炎モデル、高血圧性心不全モデルにおいてこれらのサイトカインの病態への関与を報告してきた。そこで、心筋梗塞後の心不全へ移行する際の炎症性サイトカインの関与とその発現に重要な転写因子である NF- κ B について検索した。次いで肥満細胞 (mast cell) について検討した。肥満細胞はヒスタミンのほか、インターロイキン (interleukin, IL)、腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、インターフェロンガンマ (IFN- γ) などの各種サイトカイン、キマーゼやトリプターゼなどのプロテアーゼ、ヘパリンなど豊富な生理活性物質を産生する。しかしながら、心血管疾患における肥満細胞の役割についてはほとんど検討がなされていない。そのため、肥満細胞の心血管疾患における役割を、マウス心筋炎モデルで検索した。

2. 研究計画、対象・方法

10 週齢雄ウイスターラットを麻酔後、左冠動脈走行部を絹糸で結紮し、心筋梗塞モデルを作成し、(1)定量的 PCR 法による梗塞部、非梗塞部における TNF- α 、IL- $1b$ 、IL-6 の mRNA 発現、(2)経胸壁的心エコー法による形態の変化、(3)遺伝子発現量と心エコーデータ、心臓内コラーゲン濃度との相互関係、(4)IL- $1b$ 陽性細胞およびマクロファージの分布、(5)ゲルシフト法による活性化型 NF- κ B の検出、(6)活性化型 NF- κ B を認識する抗体による組織の免疫染色、で検討した。また、マウスウイルス性心筋炎モデルにおける肥満細胞の役割を免疫学的側面より検討した。遺伝的に肥満細胞を欠失した WBB6-F1W/W^v マウスとそのコントロールとして WBB6-F1 +/+マウスに脳心筋炎ウイルス (encephalo-myocarditis virus, 以下 EMCV) を腹腔内投与し、1.14 日目までの生存率、2.7 日目の心臓の組織像、3.5 日目の心臓内のウイルス量、4. 心臓内の IL-4、IL-10、IL-12、IFN- γ の蛋白量を測定した。

3. 研究成果

心筋梗塞群では梗塞作成後 1 週より有意な左室内径の拡張を認め (6.9 vs. Sham 8.6mm, $p < 0.05$)、この傾向は 20 週まで持続した。1 週後に梗塞部に著明な TNF- α 、IL- $1b$ 、IL-6 の mRNA 発現を認めたが、20 週後には非梗塞部にて梗塞部および Sham 群に比し有意に強い発現を認めた (TNF- α 、35 vs. 8 and 9; IL- $1b$ 、31 vs. 5 and 10; IL-6、41 vs. 10 and 11%、 $p < 0.05$)。この非梗塞部でのサイトカイン mRNA 発現は、8 週、20 週において左室拡張末期径と有意な相関を示した (TNF- α 、 $r = 0.743$; IL- $1b$ 、 $r = 0.719$; IL-6、 $r = 0.713$)。また、IL- $1b$ 発現のみが非梗塞部心筋内コラーゲン容積と有意な相関を示した ($r = 0.86$)。1 週後、梗塞部の浸潤細胞において IL- $1b$ が陽性であり、一方 20 週後梗塞部は癒痕化し、残存細胞に陽性細胞が認められた。さらに非梗塞部の血管内皮、平滑筋細胞、マクロファージが IL- $1b$ 陽性細胞であった。一方、ゲルシフト法により、心筋梗塞後 20 週において非梗塞部の心筋において非標識オリゴヌクレオチドによって競合される、活性化型 NF- κ B が検

出された。また免疫染色法により、この活性化型 NF- κ B は非梗塞部の血管内皮細胞、間質の浸潤細胞に認められ、上記の IL-1 β 陽性細胞において NF- κ B の活性化が認められた。肥満細胞の検討では、W/W^v 群は+/+群に比べ、1) 生存率は有意に高値であった (10 匹/13 匹 vs 4 匹/13 匹、 $p < 0.05$)。2) 壊死、細胞浸潤とも有意に軽度であった (壊死 0.11 ± 0.11 vs 0.78 ± 0.15 、細胞浸潤 0.11 ± 0.11 vs 1.00 ± 0.24 ; $p < 0.01$)。3) 心臓組織中のウイルス量は、逆に、有意に高値であった ($4.40 \pm 0.50 \cdot 10^5$ vs $1.58 \pm 0.68 \times 10^5$; * $P < 0.05$)。4) 3 日目の心臓組織中の IL-4 は有意に低値であった。また、IL-10 も低値の傾向にあり、IL-12 は逆に高値の傾向であった。また 1. Mast cell はウイルス性心筋炎において、ウイルスの排除には有利に働くものの、組織の炎症を悪化させ、生存率を低下させるものと考えられた。2. Mast cell がヘルパー T 細胞サブセットのバランスを Th1 優位に偏位させた可能性が示唆された。

4. 考察

心筋梗塞後の慢性期において、非梗塞心筋に炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。この非梗塞部の炎症性サイトカインの発現は左室拡張末期径やコラーゲン量と相関することにより、サイトカイン遺伝子発現が梗塞後のリモデリングと関係するものと考えられる。また、EMCV によるウイルス性心筋炎マウスモデルの病態形成における各種サイトカインの役割についてはその全貌を明らかにできたと考えている (T. Shioi et al, *Circulation*. 1996;94:2930-2937)。しかしながら、非常に多種類のサイトカインを産生・放出する肥満細胞とその疾患関与については、アレルギー反応のほかはほとんど解明されて折らず、心血管疾患における役割については尚更である。今後、本研究を端緒として臨床研究の方面でも大きく発展するものと期待される。

5. 研究発表

1. Matsumori A, Ono K, Sasayama S. Coronary reperfusion and cytokines. Edited by Abiko Y, Karmazyn M Springer-Verlag, Tokyo, pp.157-177, 1998.
2. Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Okada M, Sasayama S. Circulating hepatocyte growth factor as an early marker of arterial thrombus formation. *Jpn Circ J*. 62:311-313, 1998.
3. Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Wang W-Z, Yamada T, Ono K, Sasayama S. Denopamine, a β_1 -adrenergic agonist, prolongs survival in a murine model of congestive heart failure induced by viral myocarditis. Suppression of tumor necrosis factor alpha production in the heart. *J Am Coll Cardiol* 32:808-815, 1998.
4. Matsumori A, Ono K, Okada M, Miyamoto T, Sato Y, Sasayama S. Immediate increase in circulating hepatocyte growth factor/scatter factor by heparin. *J Mol Cell Cardiol* 30:2145-2149, 1998.
5. Matsumori A, Ohashi N, Sasayama S. Hepatitis C virus infection and hypertrophic cardiomyopathy. *Ann Int Med* 129:749-750, 1998.
6. Kim CS, Matsumori A, Goldberg L, Doye AA, McCoy Q, Gwathmey JK. Effects of

- pranidipine, a calcium channel antagonist, in an avian model of heart failure. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 13:455-463, 1999.
7. Takashige N, Naruse TK, Matsumori A, Hara M, Nagai S, Morimoto S, Hiramitsu S, Sasayama S, Inoko H. Genetic polymorphisms at the tumour necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 54:191-193, 1999.
 8. Matsumori A, Igata H, Ono K, Iwasaki A, Miyamoto T, Nishio R, Sasayama S. High doses of digitalis increase the myocardial production of proinflammatory cytokines and worsen myocardial injury in viral myocarditis: A possible mechanism of digitalis toxicity. *Jpn Circ J* 63:934-940, 1999.
 9. Furukawa Y, Matsumori A, Hwang MW, Hirozane T, Ono K, Shioi T, Sasayama S. Cytokine gene expression during the development of graft coronary artery disease in mice. *Jpn Circ J* 63:775-782, 1999.
 10. Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, Yamada T, Taniguchi R, Sasayama S, Matsumori A. Serial circulating concentrations of C-reactive protein and cytokines in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol* 22:811-813, 1999.
 11. Yamada T, Matsumori A, Wang WZ, Ohashi N, Shiota K, Sasayama S. Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *Heart and Vessels* 14:29-37, 1999.
 12. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Contribution of endothelin-1 to myocardial injury in a murine model of myocarditis. Acute effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist. *Circulation* 100: 1823-1829, 1999.
 13. Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, Yabe D, Taniwaki M, Furukawa Y, Kobuke K, Tashiro K, Lu Z, Andon NL, Schaub R, Matsumori A, Sasayama S, Chien KR, Honjo T. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon injured arteries. *J Biol Chem* 274:22476-22483, 1999.
 14. Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation* 100:1102-1108, 1999.
 15. Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang MW, Miyamoto T, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S. Mast cells apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vivo. *Circulation* 100: 1443-1449, 1999.
 16. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Sasayama S. FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation. *Circulation* 100: 1322-1329, 1999.
 17. Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S, Masutani H, Yodoi J, Kitsis RN, Taga T, Matsumori A, Sasayama S. GATA transcription factors mediate leukemia inhibitory factor-responsive transcription of the b-myosin heavy chain gene

- during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 274:12811-12818, 1999.
18. Matsumori A, Ohashi N, Nishio R, Kakio T, Hara M, Furukawa Y, Ono K, Shioi T, Sasayama S. Apical hypertrophic cardiomyopathy and hepatitis C virus infection. *Jpn Circ J* 63:433-438, 1999.
 19. Iwasaki A, Matsumori A, Yamada T, Shioi T, Wang W-Z, Ono K, Nishio R, Okada M, Sasayama S. Pimobendan inhibits the production of proinflammatory cytokines and gene expression of inducible nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 33:1400-1407, 1999
 20. Okada M, Matsumori A, Ono K, Miyamoto T, Sasayama S. Hepatocyte growth factor is a major mediator in heparin-induced angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 255:80-87, 1999.
 21. Ono K, Matsumori A, Furukawa Y, Igata H, Shioi T, Matsushima K, Sasayama S. Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 79: 195-203, 1999.
 22. Gwathmey JK, Kim CS, Hajjar RJ, Khan F, DiSalvo TG, Matsumori A, Bristow MR. Cellular and molecular remodeling in an animal model of dilated cardiomyopathy treated with the b-blocker carteolol. *Am J Physiol* 276:H1678-1690, 1999.
 23. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/ monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 84:306-314, 1999.

V 生体防御からみた心臓の免疫応答に関する研究

東京大学医学部衛生学 松島綱治

1. 研究の目的

代表的な生活習慣病である動脈硬化症は、わが国の死因において重要な地位を占める虚血性心疾患、脳血管障害の基盤となる病態であり、その成立、進展機構を明らかにすることは、臨床的にも予防医学的にも極めて重要な課題である。粥状動脈硬化巣（プラーク）の形成過程は、広い意味で炎症という概念でとらえられ、内皮細胞障害を基本とする組織損傷に対して、マクロファージ、好中球、リンパ球などの免疫担当細胞の反応が、その発症の引き金になるものと考えられている。粥状動脈硬化症の初期には血液由来の単球が内皮細胞に接着し、活性化されたのち血管内皮下に侵入し、マクロファージとなり変性リポ蛋白を貪食し泡沫化する。この過程には単球の遊走、活性化に関与するケモカインである、単球走化活性化因子 Monocyte Chemoattractant Protein-1（以下 MCP-1）が重要な役割を演じることが報告されている。本研究は、動脈硬化進展の分子機構を単球、マクロファージの遊走活性化に関与するケモカイン分子 MCP-1 を中心に明らかにし、新たな治療法への応用の可能性を検討することを目的とした。

2. 研究計画、対象・方法

ヒト末梢血液中の MCP-1 濃度を測定し、動脈硬化危険因子との相関を明らかにすることを試みた。次に培養細胞を用い、女性ホルモンエストロゲンの MCP-1 産生抑制の分子機構について検討を行った。また MCP-1 の受容体である CCR2 と結合する分子を酵母 two-hybrid system を用い検索し、粥状動脈硬化進展制御のための分子標的となるか否かの検討を行った。

3. 研究成果

動脈硬化危険因子の生理的要因としての、性、年齢の流血中 MCP-1 濃度に及ぼす影響を検討した。約 400 例での検討の結果、流血中 MCP-1 濃度は、女性に比べ、男性で高値を示し、男女ともに加齢とともに増加していた。しかし、虚血性心疾患または脳血管障害などの動脈硬化病変を有する者と、性、年齢を一致させた健常対象者間には有意な差を認めず、末梢血液中の MCP-1 濃度は動脈硬化病変の有無や程度を評価する指標とはなりえなかった。エストロゲンが MCP-1 産生を低下させることは既に報告されているが、その分子機構は明らかにされていない。そこで、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用い MCP-1 産生に及ぼす、エストロゲンの影響及びその分子機構について検討した。ヒト MCP-1 遺伝子の発現調節領域の塩基配列は既に明らかにされているが、エストロゲン応答エレメントのコンセンサス配列は見出されていない。一方、-2,600bp 近傍に 2ヶ所の NF- κ B (Nuclear factor- κ B) サイト、A1 (-2640/-2632)、A2 (-2612/-2603) が認められる。NF- κ B は、種々のサイトカイン類が様々な刺激に応じて発現が上昇する時に重要な役割を演じる転写因子であることが知られているため、この 2ヶ所の NF- κ B サイトを、Sp-1 サイトを含む近位プロモーター領域と連結したルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、IL-1 α に対する応答性を検討した。このレポーター遺伝子は、IL-1 α 刺激に反応した活性が上昇するが、IL-1 α 刺激と同時に、17 β estradiol (E2) を添加すると濃度依存的にレポーター遺伝子の活性は低下した。エストロゲンの MCP-1 産生抑制が NF- κ B サイトを介したものであることを確認する目的で、2ヶ所の NF- κ B サイト (A1、A2) をプローブにゲルシフト分析を行うと、E2 にて処理した核蛋白を用いると、p50/p65 ヘテロダイマーの NF- κ B サイトへの結合は濃度依存的に低下した。以上の成績よりエストロゲンの MCP-1 産生抑制分子機構のひとつとして NF- κ B を介したものであることが明らかとなった。ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の cDNA ライブラリーを用い、CCR2 の細胞内ドメインを bait とし、yeast two-hybrid システムにより CCR2 の結合分子の検索を行い、新規遺伝子を得ることに成功した。この分子は CCR2 と結合するが別のケモカイン受容体である CXCR4 とは結合しなかった。アンチセンス DNA を発現させこの分子の発現を抑制すると、CCR2 のリガンドである MCP-1 に対する細胞遊走能が有意に抑制された。すなわちこの分子は、MCP-1 の CCR2 を介した細胞遊走に重要な役割を担う分子であることが推測され、粥状動脈硬化進展を制御するための分子標的となる可能性が示唆された。

4. 考察

MCAF/MCP-1 およびその受容体である CCR2 の動脈硬化進展に及ぼす影響を明らかにする

ことは、動脈硬化における特異的分子標的を明らかにすることにつながり、臨床応用を考える上で重要である。

5. 研究発表

1. Yoneyama H, Harada A, Imai T, Baba M, Yoshie O, Zhang Y, Higashi H, Murai M, Asakura H, Matsushima K: Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J Clin Invest* 1998 Dec 1; 102(11): 1933-41
2. Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, Nagai Y, Matsushima K: IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998 Nov; 64(5): 642-9
3. Tozawa Y, Ueki A, Manabe S, Matsushima K: Stress-induced increase in urinary isatin excretion in rats: reversal by both dexamethasone and alpha-methyl- P-tyrosine. *Biochem Pharmacol* 1998 Oct. 15; 56(8):1041-6
4. Furukawa K, Takahashi T, Arai F, Matsushima K, Asakura H: Enhanced mucosal expression of interleukin-6 mRNA but not of interleukin-8 mRNA at the margin of gastric ulcer in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. *J Gastroenterol* 1998 Oct; 33(5) :625-33
5. Mori N, Mukaida N, Ballard DW, Matsushima K, Yamamoto N: Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates human interleukin 8 gene through acting concurrently on AP-1 and nuclear factor-kappa B-like sites. *Cancer Res* 1998 Sep. 1; 58(17):3993-4000
6. Murayama T, Mukaida N, Khabar KS, Matsushima K: Potential involvement of IL-8 in the pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *J Leukoc Biol* 1998 Jul. ;64(1):62-7
7. Zhang Y, Harada A, Wang JB, Zhang YY, Hashimoto S, Naito M, Matsushima K: Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit+bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998 Jul. 1; 92(1): 118-28
9. Sonoda Y, Mukaida N, Wang JB, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T, Harada A, Inoue M, Matsushima K: Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J Immunol* 1998 Jun 15; 160(12):6159-65
10. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998 Jun 11; 393(6685):591-4
11. Kuno K, Matsushima K: ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem*

1998 May 29; 273(22): 13912-7

12. Kimura H, Kasahara Y, Kurosu K, Sugito K, Takiguchi Y, Terai M, Mikata A, Natsume M, Mukaida N, Matsushima K, Kuriyama T: Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein -1. *Lab Invest* 1998 May; 78(5):571-81
13. Higashi H, Mukaida N, Harada A, Watanabe S, Ikeda N, Suzuki Y, Matsushima K: Prevention of endotoxin shock through targeting leukocyte adhesion molecules. *Prog Clin Biol Res* 1998; 397:327-34
14. Asagoe K, Yamamoto K, Takahashi A, Suzuki K, Maeda A, Nohgawa M, Harakawa N, Takano K, Mukaida N, Matsushima K, Okuma M, Sasada M: Down -regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha. *J Immunol* 1998 May 1; 160(9):4518-25
15. Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Kobayashi K, Su S, Mukaida N, Matsushima K: Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leukoc Biol* 1998 Apr.; 63(4):493-9
16. Inadera H, Egashira K, Takemoto M, Ouchi Y, Matsushima K. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *J Interferon Cytokine Res.* 19:1179-1182, 1999.
17. Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H. MIP-1 alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 56:995-1003, 1999.
18. Terai M, Jibiki T, Harada A, Terashima Y, Yasukawa K, Tateno S, Hamada H, Oana S, Niimi H, Matsushima K. Dramatic decrease of circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in Kawasaki disease after gamma globulin treatment. *J. Leukoc Biol* 65:566-572, 1999.
19. Ono K, Matsumori A, Furukawa Y, Igata H, Shioi T, Matsushima K, Sasayama S. Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 79: 195-203, 1999.
20. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 84:306-314, 1999.
21. De Benedetti F, Pignatti P, Bernasconi S, Gerloni V, Matsushima K, Caporali R, Montecucco CM, Sozzani S, Fantini F, Martini A. : Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Relation to onset types, disease activity, and synovial fluid leukocytes. *J*

- Rheumatol 26 425-431, 1999.
22. Inadera H, Sekiya T, Yoshimura T, Matushima K.: Molecular analysis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens and xenoestrogens in MCF-7 cells. *Endocrinology* 141:50-59, 2000.
 23. Sar B, Oishi K, Wada A, Hitayama T, Matstushima K, Nagatake T. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 production by *Pseudomonas* nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial-like cells. *Microb. Pathog* 28:17-23, 2000.