
原 著

ラット心筋梗塞再環流モデルに対する アシアロエリスロポエチン投与の有効性

高山 亜美

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野

(主任：相澤義房教授)

The Effects of Asialoerythropoietin on Coronary Reperfusion Model in Rats

Tsugumi TAKAYAMA

Division of Cardiology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【目的】急性心筋梗塞の予後は経皮冠動脈インターベンション治療の標準化によって改善したが、これに代わって慢性心不全の治療があらたな目標となった。赤血球造血因子のエリスロポエチン (EPO) には造血器以外の臓器・組織に対する生存/保護作用があることが明らかになってきた。我々はこれまで各種 EPO 誘導体の生物作用の違いに関する一連の研究をおこなってきたが、今回はラット心筋梗塞再環流モデルを用いて EPO とアシアロ EPO (AEPO) の心筋保護効果を比較した。

【方法と結果】ラット冠動脈左前下降枝を 30 分間結紮することで心筋梗塞再環流モデルを作成した。500 IU/kg/day の EPO または AEPO またはメEDIUMの持続静脈内投与を行い、28 日後の心機能、組織染色、および心臓での mRNA 発現を比較した。左室駆出率 (%) はコントロール：42.6 ± 2.3, rhEPO 投与群：53.2 ± 5.4, rhAEPO 投与群：60.2 ± 5.2 であった。また心筋梗塞面積比率 (%) はコントロール：8.24 ± 0.88, rhEPO 投与群：7.68 ± 0.53, rhAEPO 投与群：3.17 ± 0.68 ($p < 0.01$) であった。rhEPO 投与による心筋梗塞および心機能の改善効果はわずかであったが、rhAEPO による改善効果は顕著であった。AEPO 群では心筋の抗アポトーシス因子 Bcl-2 および心筋保護因子 eNOS の強い発現が見られた。EPO 投与群では多血症による心負荷増大に起因すると思われる IL-6 および BNP の発現増強が見られたが、AEPO 投

Reprint requests to: Tsugumi TAKAYAMA
First Department of Internal Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医学部第一内科学教室 高山 亜美

与では多血症の誘発はなかった。心臓における EPO を介した生理的なパラクリンのシステムを推測する目的で、正常ヒト細胞を用いた mRNA 発現解析を行った。冠動脈血管内皮および同平滑筋に EPO の発現が見られ、心筋に対する恒常的な細胞保護作用に関与している可能性が推測された。

【結論】AEPO は多血症を誘発することなく、強い心筋保護作用を持つことが示された。本 EPO 誘導体はおそらく生理的な生体内自然物の 1 つであり、安全に臨床応用される可能性がある。また心臓では冠動脈血管内皮および同平滑筋の発現する EPO を介した、心筋保護の生理的なパラクリンが存在することが示唆された。

キーワード：心筋梗塞，再環流モデル，エリスロポエチン，アシアロエリスロポエチン，心筋保護作用

緒 言

急性心筋梗塞 (AMI) はカテーテル的にバルーンあるいはステントを用いて冠動脈狭窄/閉塞を解除する経皮冠動脈インターベンション治療 (PCI) の標準化により大幅に死亡率が低下したが、それに伴って表面化した慢性期心不全による QOL・労働力の低下および医療費の増大を改善することが新たなテーマとなった。

エリスロポエチン (EPO) は赤血球造血因子として発見され、腎性貧血の治療に用いられてきた。EPO/EPO 受容体 (EPOR) システムは赤血球系造血細胞のみならず心血管系や中枢神経などの多様な臓器に存在しており¹⁾、EPOR からの Jak/stat 経路などの細胞内シグナルを活性化し、細胞保護作用・血管新生作用等の多彩な生物作用を介して一定の役割を果たしていることが推測されている。

AMI 動物モデルの治療実験において、EPO の全身投与は梗塞範囲の縮小と心機能の予後を改善した²⁾³⁾。我々は動物下肢虚血モデルに対する EPO 投与が血管新生作用を示すことを示したが⁴⁾、AMI においても虚血心組織において EPO が強い血管新生作用を示すことが心機能改善の作用機序として重要であることが明らかとなった⁵⁾。

臨床において先行した研究として、貧血を合併した慢性心不全患者を対象とした試験で EPO 投与が心機能を改善したが⁶⁾、我々は急性心筋梗塞患者を対象としたパイロット臨床試験を、本学を中心とした多施設共同研究として実施し、急性心

筋梗塞 1 枝病変患者の PCI 後に 12,000 国際単位の rhEPO を静脈内投与した。左室機能の低下が著しい左前下降枝 1 枝病変患者の 6 ヶ月後の左室駆出率の自然回復 (Δ LVEF) がプラゼボ群では 5.3%であったのに対し、EPO 投与群では 15.3%であり、EPO 投与が AMI 後の慢性心不全の発症を予防することを報告した⁷⁾。

ヒトの EPO はアミノ酸 165 残基からなる糖タンパクで、1 コの O-型糖鎖と 3 コの N-型糖鎖を有し、2 カ所の S-S 結合によって一定の形状を保つ⁸⁾。EPO の生物活性には糖鎖が必須であるためヒト cDNA を大腸菌に発現させて得られた EPO は活性を持たない。各糖鎖の生合成は単糖の複雑な付加と刈り込みのあと、最終的に α (2 \rightarrow 3) シアル酸転移酵素によってシアル酸を付加されて終了する (シアル酸キャッピング)。腎臓から分泌される EPO は 1 分子あたり 10 ~ 14 コのシアル酸を有する。シアル化された EPO とシアル化されないかまたは脱シアル化されたシアル酸をもたないアシアロ EPO (AEPO) ではその生物活性が著しく異なる⁹⁾。AEPO は糖鎖末端がガラクトースで終止し、肝臓のクッパー細胞に発現しているアシアロ糖タンパク受容体 (ガラクトース受容体)¹⁰⁾ によって速やかに代謝されるため、血中濃度が上昇せず in vivo での造血活性を欠く。

我々はこれまで各種 EPO 誘導体における、造血作用以外の生物活性に関する一連の研究をおこない、その中で rhEPO に比し rhAEPO に強い血管新生作用があり、血管再生治療に応用可能であることを示した (特許第 4200509 号, 平成 20 年

10月)。今回は急性心筋梗塞の薬物治療への応用を目指し、ラット心筋梗塞再環流モデルに対するEPOとAEPOの効果と比較する目的で研究をおこなった。

材料と方法

ラット心筋梗塞再環流モデルの作成

チャールスリバー (Yokohama, Japan) より8-10週齢の雄Lewisラット (280~320g) を購入し実験に用いた。全ての実験手順はGuide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 86-23; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) に基づき無菌的に行われた。研究計画は施設の動物研究委員会からの承認を受けた。

あらかじめRPMI1640メディウム (Nipro, Tokyo, Japan) で希釈したリコンビナント・ヒト・エリスロポエチン (rhEPO) またはアジアロEPO: rhAEPO (いずれも Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を満たしたAlzet小浸透圧ポンプ (Model 2004, Durect, Cupertino, CA) にAlzetラット頸静脈カテーテル (Durect) を接続し37°Cで48時間以上静置し準備した。

ラットをアトロピン筋注による前処置後、ケタミン筋注により麻酔し、気管内挿管を行い、人工呼吸器 (Mouse Ventilator Model 687, Harvard Apparatus, South Natick, MA) を用いて呼吸管理 (10 ml/kg, 80/min) した。右側臥位で左側胸部より開胸し心臓を露出し、左前下行枝をナイロン糸で結紮し、30分後に虚血解除して再灌流モデルを作成した。同時に右あるいは左内頸静脈に頸静脈カテーテルを挿入し、浸透圧ポンプを背部皮下に埋没させた。虚血解除と同時にrhEPO 500IU/kg/day, rhAEPO 500IU/kg/day, または同容量のメディウムの持続投与を開始し、閉胸し抜管した。

心筋梗塞作成の28日後に、2%イソフルラン吸入麻酔下で心エコー (EUB6500 and 13 MHz linear scan probe, Hitachi, Ibaraki, Japan) により心機能を計測した。その後開腹して下大静脈より採血したのち心臓・脾臓・肝臓を摘出し重量を測定

した。

心臓摘出標本の処理

心基部で切断し心臓を摘出し、中心線で心臓を二分割した。中心線より心基部側へ向けて1mm厚で順に切り出し、目視にて梗塞部・境界部・非梗塞部の判定を行い、境界部をRNA抽出に用いた。中心線より心尖部側は10%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。この中から心基部側の部分と心尖部側の部分を切り出し (厚さ5 μ m), H.E.染色およびAzan Mallory染色を行った。心基部側のAzan Mallory染色標本をBX60顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて20倍で観察し、Olympus TVシステムDP50を用いてデジタル画像を作成した。Mac SCOPE (Mitani, Fukui, Japan) を用いて画像処理を行い、心筋梗塞面積比率を計算した。

RNA発現解析のための標本作製

EPOの作用機序を推測する目的で、ラット心筋梗塞再環流モデルの心標本以外に以下のヒトの臓器・細胞におけるRNA発現解析を行った。購入したヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC: Cell Applications, San Diego, CA), ヒト冠動脈血管平滑筋細胞 (HCASMC: Cell Applications), およびヒト心臓線維芽細胞 (HCF: Cell Applications) は培養を行わず、そのままRNAを抽出した。ヒト左心室Total RNA (HLV: Ambion, Austin, TX) およびヒト腎Total RNA (total kidney: Ambion) はそのまま解析に用いた。

EPOおよびEPORの細胞当たりの発現量は極めて微量であるため、陽性コントロールサンプルを得る目的で健康な男性成人2名 (31才および38才) から文章による同意ののちに骨髄を採取した。骨髄から単核細胞 (MNC) を分離し、そこからさらにPE-標識抗CD34抗体 (Becton Dickinson, San Diego, CA) と免疫磁気ビーズ法 (Myltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて既報の手順によりCD34陽性細胞を精製した (CD34陽性純度それぞれ90および95%)¹¹⁾。

Total RNAの抽出にはトリゾル試薬 (Life

表1 Primers for QRT-PCR

	Sense primer	Antisense primer
rat γ -Actin	gaccttccttccgggcatggagt	tggaggggctgactogtcatact
rat COX6A	cgcacccaaggagaccac	aaaggattgacgtggggatt
rat CD45	gcatgaactagagatgagcaaaga	gcagaatataggctgaggattgt
rat BNP	ctgggaagtcctagccagtct	gtctatcttctgccccaaagcag
rat Bcl-2	tataagctgtcacagaggggctac	ctgactggacatctctgcaaagtc
rat IL-6	aatttgccattgaaaatctgctc	ttcttcaagtgtttcaagatgag
rat IL-6Ra	ctgggacccaagttactacttgtt	ctcgtggttgtcatagtcttcaac
rat eNOS	tatttccaaggaagttacagagcc	tatggttacagatgtaggtaaca
rat EPO	ctgctgcttttactatccttgcta	tatgaagctgaagactctctggtg
rat EPOR	acacctacctggtattggatgaat	acaccacaaggtacaggtacttca
human PBGD	ccatgtctggttaacggcaat	cttcaaggagtgaacaaccagg
human EPO	actgtcccagacaccaaagttaat	gaaattggagtagactcggaagag
human EPOR	aactacagcttctcctaccagctc	gagacgtcatgggtgtctcag
human IL-6	cagaacgaattgacaaacaattc	gcatctagattctttgcctttttc
human IL-6Ra	gtcaaagacattcacacatggat	tactgaagaagaatcttgcactgg
human Bcl-2	ctgggagaacagggtacgataac	gagggtcagggtggaccacag
human eNOS	gagatggtcaactatttctgtcc	acaccacgtcatactcatccatac

Technologies, Tokyo, Japan) を用い、5 μ g の Total RNA からランダムプライマー及び Takara PCR キット Ver.2.1 (Takara, Tokyo, Japan) を用いて cDNA を作成し、定量 PCR に用いた。

定量 PCR

mRNA 発現量を各サンプルから得られた cDNA を用い、既報のとおり real-time quantitative RT-PCR (QRT-PCR) 法によって定量した¹²⁾。表1 に QRT-PCR に用いたプライマー配列を示す。internal standard としてヒト PBGD またはラット γ -アクチンを測定した。QRT-PCR には LightCycler (Roche, Indianapolis, IN) を用い、95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、72 $^{\circ}$ C 13 秒を 1 サイクルとし計 45 サイクル施行した。RNA 1 μ g あたりの各 RNA のコピー数を計算し、各指標のコピー数の PBGD (ヒト) または γ -アクチン (ラット) のコピー数に対する比として表示した。各サン

ルのうち、LightCycler による γ -アクチンの実測値が 1.0 (約 1.8×10^6 コピー/ μ g 総 RNA) 未満のサンプルは、RNA の質に問題のある不良サンプルとして解析から除外した。

統計

各群の測定値は mean \pm SEM で表記し、多群間の比較は one-way ANOVA によって行い、引き続き Bonferroni's Multiple Comparison Test により各群間の差の検定を行った。p < 0.05 をもって有意とした。

結 果

心機能の解析

図1 に心エコーによる解析結果を示す。1 回心拍出量は左室拡張末期径 (LVEDd) と左室収縮末期径 (LVESd) の関数であり、左室駆出率

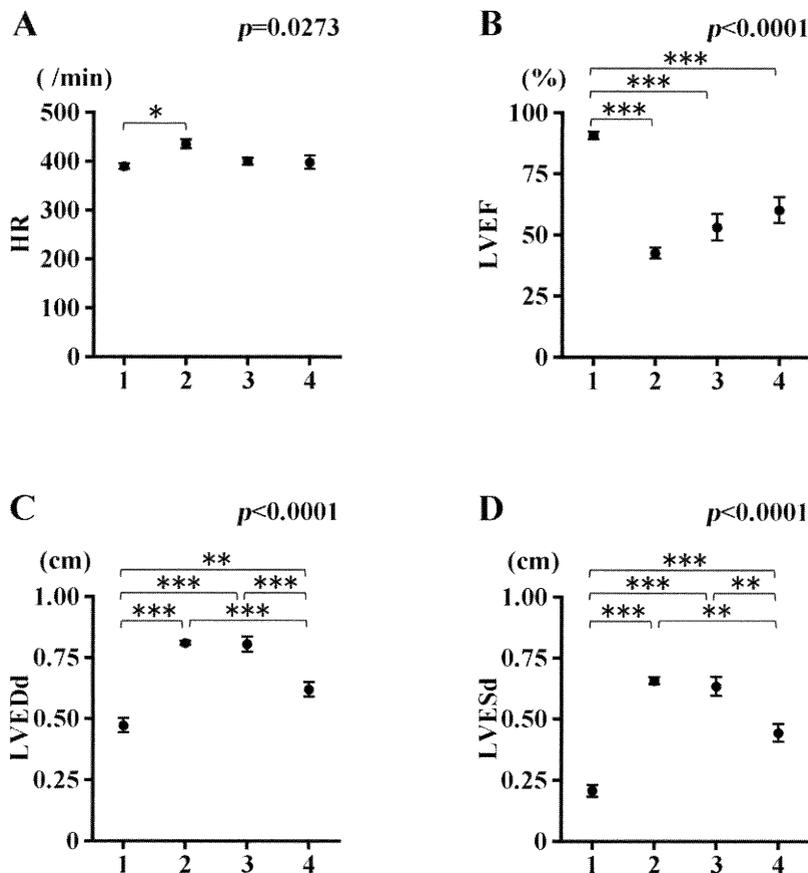


図1 心機能の解析

ラット心筋虚血再環流 28 日後の心機能を心エコーで測定した。パネル A：心拍数，B：左室駆出率，C：左室拡張末期径，D：左室収縮末期径，1：正常ラット (n = 5)，2：心筋梗塞後メディウム持続投与 (4)，3：500 IU/kg/day rhEPO 持続投与 (5)，4：500 IU/kg/day rhAEPO 持続投与 (5)。EPO より AEPO の方が有意に強い心機能改善効果を示した。one-way ANOVA で解析したあと (右上の p 値)，Bonferroni's Multiple Comparison Test により各群間の差の検定を行った：*，< 0.05；**，< 0.01；***，< 0.001。

(LVEF) は 1 回心拍出量を左室拡張末期容積で除した値である。心拍数 (HR/min) は健常ラット (n = 5)：389.0 ± 5.6，虚血再環流後メディウム投与群 (4)：435.3 ± 9.0，rhEPO 投与群 (5)：399.8 ± 7.2，rhAEPO 投与群 (5)：397.8 ± 13.7 と，メディウム投与群でやや増加していたが，左

室駆出率等の機能解析に大きな影響を与える変化ではなかった。左室駆出率 (%) は健常ラット：90.7 ± 1.5，メディウム投与群：42.6 ± 2.3，rhEPO 投与群：53.2 ± 5.4，rhAEPO 投与群：60.2 ± 5.2，左室拡張末期径 (cm) は健常ラット：0.472 ± 0.029，メディウム投与群：0.810 ±

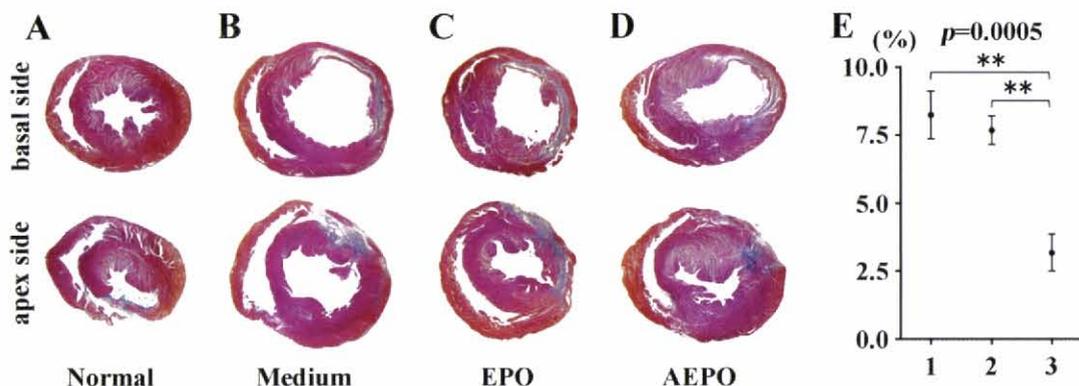


図2 心筋梗塞面積比率

ラット心筋虚血再環流28日後の心臓を摘出し中心線で2分断し、中心線より心尖部側を固定し標本とした(アザン染色:パネルA~D)。上段:心基部寄りの断面,下段:心尖部寄りの断面。心筋梗塞面積の断面面積全体に対する比率を測定した(パネルE)。パネルA:正常ラット(n=5),パネルBおよびパネルE-1(4):メディウム持続投与,パネルCおよびパネルE-2(5):rhEPO持続投与,パネルDおよびパネルE-3(5):rhAEPO持続投与。EPOよりAEPOの方が有意に強い心筋梗塞縮小効果を示した。one-way ANOVAで解析したあと(右上のp値),Bonferroni's Multiple Comparison Testにより各群間の差の検定を行った:**,<0.01。

0.008, rhEPO投与群:0.805 ± 0.031, rhAEPO投与群:0.620 ± 0.030, また左室収縮末期径(cm)は健常ラット:0.206 ± 0.024, メディウム投与群:0.658 ± 0.015, rhEPO投与群:0.635 ± 0.038, hAEPO投与群:0.444 ± 0.036であった。メディウム投与群と比較してEPO投与群では心機能がやや改善したが有意ではなかった。後述のとおりEPO投与群では多血症による心負荷の増大があり,これが心機能の不十分な回復に影響していた可能性がある。一方,AEPO投与群では有意に著明な心機能の改善効果が見られた。

心筋梗塞面積縮小効果

図2に心筋梗塞のAzan Mallory染色標本および心筋梗塞面積の測定を示す。心筋梗塞面積比率(%)はメディウム投与群(n=4):8.24 ± 0.88, EPO投与群(5):7.68 ± 0.53, AEPO投与群(5):3.17 ± 0.68であった。メディウム投与群に比しEPO投与群では有意な心筋梗塞面積の縮小は見られなかったが,AEPO投与群では有意な心筋梗塞面積の縮小が観察された。

EPO誘導体の造血作用

図3に赤血球造血亢進のマーカーとして,血中ヘモグロビン値および脾臓重量を示す。ラットおよびマウスでは造血の亢進に際して主に脾臓での赤血球系の髄外造血が観察される。Hb(g/dl)測定値は健常ラット(n=5):13.1 ± 0.3, メディウム投与群(n=4):12.8 ± 0.3, EPO投与群(5):19.9 ± 1.2, AEPO投与群(5):13.6 ± 0.8であり,また脾臓重量(g)は健常ラット:0.532 ± 0.002, メディウム投与群:0.661 ± 0.015, EPO投与群:1.210 ± 0.155, AEPO投与群:0.669 ± 0.035であった。EPO投与群では著明な赤血球造血の亢進が見られたが,AEPO投与群での造血の亢進は観察されなかった。このことからEPO投与群では多血症誘発による心負荷の増大が存在することが想定された。

心筋梗塞境界部におけるmRNA発現量

結果を図4に示す。心筋梗塞部では組織の壊死が強くmRNAの解析ができなかったため,境界部での解析を行った。心筋特異的なマーカーであ

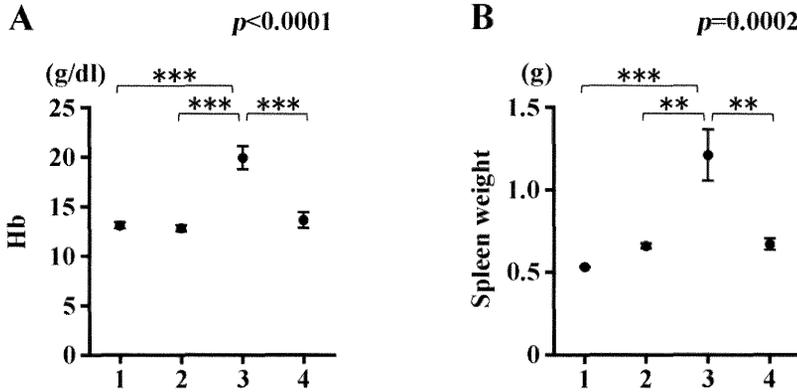


図3 EPO誘導体の造血作用

ラット心筋虚血再環流 28 日後の血中ヘモグロビン値 (パネル A) および脾重量 (パネル B, 髓外造血) を示す。1: 正常ラット (n = 5), 2: 心筋梗塞後メディウム持続投与 (4), 3: rhEPO 持続投与 (5), 4: rhAEPO 持続投与 (5)。EPO 投与によって赤血球造血の亢進が観察されるが, AEPO には造血作用が認められない。one-way ANOVA で解析したあと (右上の p 値), Bonferroni's Multiple Comparison Test により各群間の差の検定を行った: *
*, < 0.01; ***, < 0.001.

る COX6A の発現量は, メディウム投与群, EPO 投与群および AEPO 投与群でほぼ等しかったので, この 3 群の他のマーカーの比較に筋量の影響を考えなくてよい。また組織に浸潤している白血球量のマーカーである CD45 の発現量は, 有意差は出なかったものの, メディウム投与群や EPO 投与群に比し AEPO 投与群では正常ラット程度に低い値を取ったことから, 白血球に由来するマーカーの解釈に影響を与える。

心不全に呼応して発現の上昇する BNP の分布は, 図 1 の心機能の分布とは関連せず, 図 3 の血中ヘモグロビン値の分布と一致したことから, 多血症による心負荷の増大を反映したものと推測された。Bcl-2 は主に白血球や心筋に発現する抗アポトーシス因子である。AEPO 投与群では白血球マーカーが少ないにも拘わらず Bcl-2 の発現量が多いことから, 心筋での Bcl-2 発現が誘導されたことが推測された。

IL-6 の発現は BNP の発現の分布と一致したことから, やはり多血症による心負荷の増大を反映したものと推測された。eNOS は血管内皮およ

び心筋に発現し, 発現細胞自身に対する保護作用を持つ。eNOS 発現量の分布には有意差が見られなかったが, AEPO 投与群で Bcl-2 と同様に eNOS の発現量が高いことから, これも AEPO による直接または間接的作用である可能性がある。また IL-6 が eNOS の発現を抑制することが知られているが¹³⁾, EPO 投与群で eNOS の発現が少ないことは IL-6 の影響である可能性がある。

正常ヒト心臓細胞成分における mRNA 発現

EPO/EPO 受容体システムの心における生理的な意義を理解する目的で, 正常ヒト心の各種細胞での mRNA 発現を解析した (n = 2, 図 5)。EPO および EPOR は他の分子に比し生理的発現量が少ないため, mRNA 発現量が少ない場合の評価が問題となる。骨髄では未熟な造血前駆細胞からの EPO 分泌によるオート/パラクリンシステムの存在が知られているので¹⁴⁾, 正常人骨髄 CD34 陽性細胞を陽性コントロールとして比較した。

血管内皮および心筋の細胞内には eNOS が発現しており, 細胞保護作用に寄与する¹⁵⁾。また抗

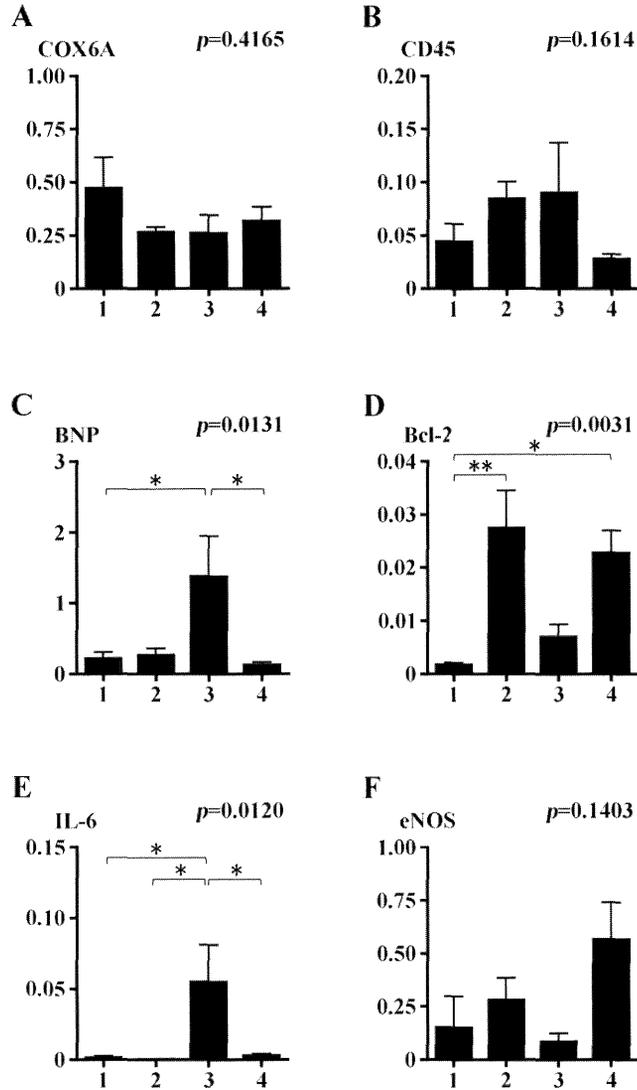


図4 心筋梗塞境界部における mRNA の発現量

ラット心筋虚血再環流 28 日後の心臓を摘出し中心線で 2 分断し、中心線より心基部側へ向けた連続切片を作成し、心筋梗塞境界部から RNA を抽出した。各 RNA コピー数の γ -アクチン RNA コピー数に対する比を解析した。1：正常ラット (n = 4)、2：心筋梗塞後メディウム持続投与 (3)、3：rhEPO 持続投与 (3)、4：rhAEPO 持続投与 (5)。心筋特異的マーカーの COX6A 発現量には差がなく、浸潤した白血球のマーカー CD45 の発現量では EPO 投与に比し AEPO 投与で少ない傾向が見られた。心不全マーカー BNP は EPO 投与でのみ著しい上昇が見られ、多血症による心不全の発症が推測された。AEPO 投与群では CD45 発現量が少ないにも拘わらず、白血球および心筋に主に発現している抗アポトーシス因子 Bcl-2 の強い発現が見られ、心筋の Bcl-2 誘導作用があることが推測された。EPO 投与群で IL-6 の誘導が見られたが、EPO による直接作用か心不全による誘導かはわからない。血管内皮および心筋に発現している細胞保護作用のある eNOS は、AEPO 投与群で発現の多い傾向が見られた。

アポトーシス因子の1つである Bcl-2 は血液細胞および心筋細胞に発現していることが知られている¹⁶⁾。主に心筋からなる左室 (HLV) および冠動脈血管内皮 (HCAEC) に eNOS が発現しており、他の細胞には発現していなかった。また HLV・HCASMC および骨髄細胞に Bcl-2 が発現しており、他の細胞には発現していなかった。このことから mRNA 発現量の解析に信頼性があることが推測される。

造血系未分化細胞に IL-6 受容体が発現していることが知られているが、心臓成分では冠動脈血管平滑筋細胞 (HCASMC) および心線維芽細胞 (HCF) に恒常的に IL-6 が発現しており、一方 IL-6 受容体は HLV にわずかに発現していた。EPO は HCAEC および HCASMC で骨髄 CD34 陽性細胞に匹敵する発現量がみられ、HLV および HCF での測定値は低く、発現していない可能性が高い。また腎臓には EPO の恒常的な発現は見られなかった。心臓細胞成分における EPOR の恒常的な発現は微量である。このことから HCAEC および HCASMC においておそらくパラクリンとして発現している EPO の心内における標的細胞種は不明であった。

考 察

肝臓での速やかな代謝を受け、血中濃度が上昇しないため造血活性を欠く AEPO が、なぜこのような強力な心筋保護作用を持つのかは不明である。造血系に発現している EPOR1 量体は EPO の存在下にホモ 2 量体を形成して Jak2/stat5 経路を介して細胞内へシグナルを伝える。これに対し EPO 感受性の非造血系組織には EPOR とサイトカイン受容体共通 β 鎖 (βc , CD131) のヘテロ 2 量体として存在し、やはり Jak2/stat5 のリン酸化を介した活性化が行われる¹⁷⁾。EPO の糖鎖末端はシアル酸で終止し、3 つの N-型糖鎖と 1 つの O-型糖鎖はいずれも末端が強く陰性に荷電するが、AEPO ではガラクトースが露出して陽性に荷電する。EPO と AEPO は *in vitro* では同等の赤芽球増殖活性を示すことから、両者の EPOR それ自

体に対する親和性には差がないと思われるが、 βc のリガンド結合部位周辺には酸性アミノ酸残基がクラスターを形成する部位 (WSXWS モチーフの近傍) と塩基性アミノ酸残基がクラスターを形成する部位 (前者より膜寄り) が存在し、AEPO の糖鎖は前者に EPO の糖鎖は後者に結合する可能性があり、これによって WSXWS モチーフを介した細胞内への情報伝達に差が生じる可能性が指摘される¹⁸⁾。

我々の今回の検討では、心筋細胞に EPOR が発現しているかどうかは明らかではなかった。造血のみならず心臓の発生においても EPO/EPOR システムは必須であり¹⁹⁾、胎児期における心筋細胞の増殖には心外膜から分泌されるエリスロポエチンとレチノイン酸が必要である²⁰⁾。EPO 投与は虚血性心筋障害を改善するが³⁾、その機序の1つとして、EPO 投与が虚血によって誘導される心筋細胞のアポトーシスを心筋の Akt-依存性シグナル経路を介して阻害することが報告されており、この中で新生児ラットの心室心筋細胞に EPOR が発現していることを免疫染色法によって示している²¹⁾。成体ラットを用いた研究でも心筋細胞に EPOR が発現しているというものがあるが、彼らは免疫染色法および定性的 RT-PCR 法によって示している²²⁾。彼らが RT-PCR に用いたサンプルはランゲンドルフ還流法によって心臓から得られたものであり、心筋細胞以外の成分を混じている可能性がある。元来、EPOR は他のサイトカイン受容体と比較して、はるかに少量しか発現しておらず、抗 EPOR 抗体を用いて細胞を染色することには困難があったが、ましてやさらに EPOR 発現量の少ない非造血系細胞では免疫染色法で判断することには慎重を要する。これに対し、EPO の作用が心筋での Akt-経路および Jak/stat3-経路を介することを明らかにしたグループは²³⁾、精製した心筋細胞および心臓線維芽細胞からそれぞれ抽出した蛋白をサンプルとした Western blot 解析によって、EPOR 蛋白が心筋細胞ではなく線維芽細胞に発現していることを明らかにした²⁴⁾。EPO は線維芽細胞に作用し、何らかの液性因子の分泌を介して心筋の Jak/stat3-

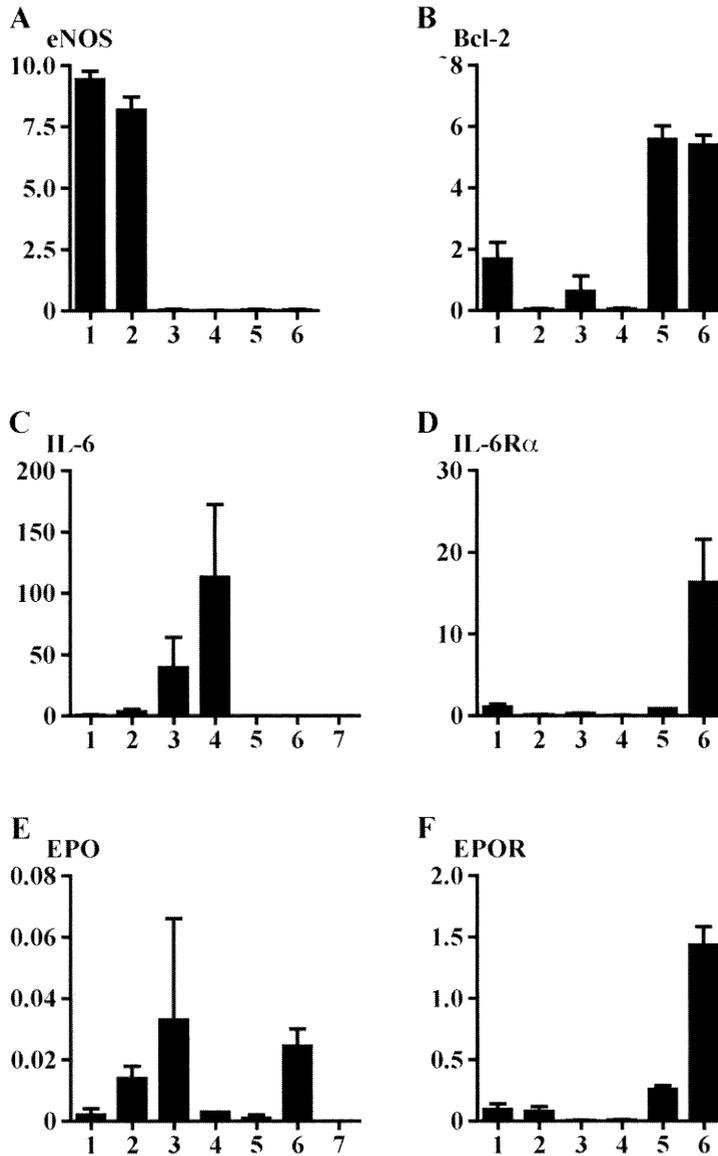


図5 ヒト組織・細胞でのRNAの発現

各パネルのカラムのうち、1：左室、2：冠動脈血管内皮、3：冠動脈血管平滑筋、4：心線維芽細胞、5：骨髄単核細胞、6：骨髄CD34陽性細胞、7：腎臓。

パネルA：eNOSは左室（心筋）と内皮に発現している。パネルB：Bcl-2は血液細胞と左室および平滑筋に発現している。パネルC：IL-6は平滑筋と線維芽細胞に発現している。パネルD：IL6受容体は造血前駆細胞に発現している。心筋細胞にもわずかに発現している可能性がある。パネルE：EPOは造血前駆細胞・内皮および平滑筋に発現している。パネルF：EPO受容体は骨髄細胞に発現している。心臓における発現量は少ない。

経路を活性化すると結論づけている。実際、EPOR conditional KO を用いた心筋梗塞再環流モデル実験でも、EPO の心筋への作用には stat3 のリン酸化が係わっていることが示されている²⁵⁾。

EPO が心線維芽細胞に作用して分泌される心筋保護性サイトカインは何かということが新たな問題となる。心筋細胞には IL-6R が発現しており、IL-6 は CD126/GP130 ヘテロ受容体を介して GP130 の活性化により stat3 をリン酸化する。GP130 は IL-6・LIF・CNTF・Cardiotrophin-1 (CT-1)・IL-11 および oncostatin M の受容体共通 β 鎖であり、これらいずれのサイトカインによっても stat3 のリン酸化は起こる。また、AEPO には強い血管新生作用があるが、これは AEPO が線維芽細胞からの IL-6 分泌を活性化することによる間接作用であると考えられる²⁶⁾。しかも、EPO の心筋梗塞改善作用には、心臓虚血部位での血管新生効果が重要な働きをしていた⁵⁾。AEPO の心筋保護作用も再び IL-6 分泌を介した間接作用であることは十分に考えられる。今回の研究では心筋梗塞後早期の IL-6 の発現を調べていないので、これについては不明である。また、IL-6 は本質的には急性期に分泌され、組織保護および血管新生・肉芽形成などの治癒機転に大きく係わるマスターサイトカインの 1 つであるが、慢性的な IL-6 の発現は本来病的な現象であり、慢性炎症性貧血・関節炎・心肥大などの不適切な生体反応を惹起する。

ところで心臓を形成する主な細胞は心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および筋線維芽細胞を含む線維芽細胞群であり、他にマクロファージや肥満細胞および毛細血管周囲に分布する白血球が存在する。全身の貧血または低酸素血症に呼応して腎臓からの EPO 分泌が起こるが、心臓に限局した心筋虚血の場合はこれに該当せず、心臓内での EPO/EPOR パラクリンシステムの存在が想定される。上記のように心筋虚血に反応して EPOR の発現が増強する心線維芽細胞が、同じく虚血に反応した細胞の分泌する EPO によって刺激され、何らかの液性因子を介して心筋保護作用を発現することが想定されるが²⁴⁾、心臓内で虚

血に反応して EPO を産生・分泌する細胞が何であるかを調べる必要がある。

心臓とならんで EPO/EPOR システムが重要な働きをしている臓器に中枢神経がある。中枢神経でも虚血に反応して EPO および EPOR の発現が亢進するが、それぞれ発現している細胞に関する信頼のおける研究は意外と少ない。少なくとも純化した細胞の *in vitro* の反応に関しては、神経細胞・血管内皮およびミクログリアは酸化ストレス負荷の培養条件で外来性 EPO に反応しているので、これらが EPOR を発現していることはほぼ間違いない²⁷⁾。また虚血反応性に EPO の発現が亢進するのは主に海馬・内包・皮質および中脳であるが、具体的な分泌細胞の正確な特定には注意を要する。実際、腎臓における EPO 分泌細胞の同定が報告されたのですら、2008 年になってからである²⁸⁾。

EPO は赤血球系細胞の生存に必須の因子であり、腎は貧血・低酸素応答性に EPO を分泌するが恒常的には EPO を分泌していないことから、恒常的な造血においては赤血球系細胞の生存を保証するために骨髄内での EPO のパラクリンシステムが存在することが推測される。実際に、赤芽球系前駆細胞 (CD34 陽性細胞の一部) それ自身が EPO を分泌するようであり²⁹⁾、今回の検討でも骨髄 CD34 陽性細胞が一定の EPO を恒常的に発現していた。これを EPO 発現細胞の陽性コントロールとして、ヒト心臓の各種細胞での mRNA 発現を観察した結果、冠動脈血管内皮および平滑筋細胞が心臓における EPO 産生細胞である可能性が示唆された。血管内皮および平滑筋は EPO 分泌を介して心筋を保護するには都合の良い解剖学的な位置にある。虚血に陥った骨格筋組織・心臓あるいは中枢神経で発現する EPO が AEPO であるか否かに興味を持たれる。今後、プロテオミクス解析法を用いて、パラクリン EPO の糖鎖解析を行う予定である。

結 語

EPO には直接または間接作用としての心筋保

護作用があり、一部の施設では急性心筋梗塞の薬物療法としてEPO投与が試みられている。非造血性EPO誘導体のAEPOには自然型EPOよりもはるかに強力な心筋梗塞治療効果が認められた。今後、臨床への応用が期待される。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました第一内科学教室相澤義房教授、鳥羽健講師、埜晴雄講師、および保健学科基礎生体情報学講座 仲澤幹雄教授に深謝いたします。また、共同で研究を行った第二外科学教室の磯田学先生および浅見冬樹先生に心より深謝いたします。

文 献

- 1) Maiese K, Li F and Chong ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. Review. JAMA 293: 90-95, 2005.
- 2) van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH and Schoemaker RG: Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 46: 125-133, 2005.
- 3) Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A and Brines M: Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. Proc Natl Acad Sci USA 100: 4802-4806, 2003.
- 4) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Makoto Naito M, Takahashi M and Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. J Mol Cell Cardiol 40: 629-638, 2006.
- 5) Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M and Hori M: Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. J Am Coll Cardiol 48: 176-184, 2006.
- 6) Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, Blum M, Keren G, Baruch R, Schwartz D, Yachnin T, Steinbruch S, Shapira I, Laniado S and Iaina A: The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. J Am Coll Cardiol 37: 1775-1780, 2001.
- 7) Suzuki H, Kato K, Ozawa T, Toba K, Akutsu Y, Iso Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yokoyama S, Fukuda N, Akazawa K and Aizawa Y: Late Breaking Clinical Trials: Evaluation of the Prospective Observation of erythropoietin-administration for the treatment of Acute Myocardial Infarction (EPO-AMI). Circ J 73, Supple I: 126, 2009.
- 8) Imai N, Kawamura A, Higuchi M, Oh-eda M, Orita T, Kawaguchi T and Ochi N: Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. J Biochem 107: 352-359, 1990.
- 9) Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda M, Fujiwara M, Shimonaka Y and Ochi N: Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressing effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. Eur J Biochem 194: 457-462, 1990.
- 10) Kolb-Bachofen V, Schlepper-Schäfer J, Vogell W and Kolb H: Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin-mediated endocytosis. Cell 29: 859-866, 1982.
- 11) Toba K, Hanawa H, Fuse I, Sakaue M, Watanabe K, Uesugi Y, Higuchi W, Takahashi M and Aizawa Y: Difference in CD22 molecules in human B cells and basophils. Exp Hematol 30: 205-211, 2002.
- 12) Hanawa H, Watanabe K, Nakamura T, Ogawa Y, Toba K, Fuse I, Kodama M, Kato K, Fuse K and

- Aizawa Y: Identification of cryptic splice site, exon skipping, and novel point mutation in type I CD36 deficiency. *J Med Genet* 39: 286 - 291, 2002.
- 13) Saura M, Zaragoza C, Bao C, Herranz B, Rodriguez-Puyol M and Lowenstein CJ: Stat3 mediates interleukin-6 inhibition of human endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem* 281: 30057 - 30062, 2006.
- 14) Sato T, Maekawa T, Watanabe S, Tsuji K and Nakahata T: Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *J Clin Invest* 106: 263 - 270, 2000.
- 15) Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA and Michel T: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810 - 22814, 1996.
- 16) Kirshenbaum LA and de Moissac D: The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 96: 1580 - 1585, 1997.
- 17) Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T and Cerami A: Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14907 - 14912, 2004.
- 18) 鳥羽 健, 加藤公則: 総説 エリスロポエチンの心・血管系疾患への応用. *循環器科* 66: 424 - 432, 2009.
- 19) Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X and Iruela-Arispe ML: Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126: 3597 - 3605, 1999.
- 20) Stuckmann I, Evans S and Lassar AB: Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 255: 334 - 349, 2003.
- 21) Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV and El-Sherif N: Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 990 - 994, 2003.
- 22) Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E and Arcasoy MO: Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 18: 1031 - 1033, 2004.
- 23) Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS and Koch WJ: A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112: 999 - 1007, 2003.
- 24) Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS and Koch WJ: Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 279: 20655 - 20662, 2004.
- 25) Tada H, Kagaya Y, Takeda M, Ohta J, Asaumi Y, Satoh K, Ito K, Karibe A, Shirato K, Minegishi N and Shimokawa H: Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 71: 466 - 477, 2006.
- 26) 鳥羽 健, 小澤拓也, 相澤義房: 総説 エリスロポエチン誘導体の血管新生作用. *Angiology Frontier* 8: 61 - 69, 2009.
- 27) Maiese K, Li F and Chong ZZ: Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 25: 577 - 583, 2004.
- 28) Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S and Yamamoto M: Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 111: 5223 - 5232, 2008.
- 29) Sato T, Maekawa T, Watanabe S, Tsuji K and Nakahata T: Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *J Clin Invest* 106: 263 - 270, 2000.

(平成 21 年 12 月 21 日受付)