
原 著

ラット自己免疫性心筋炎の急性期において劇的な発現亢進を 認めた Pancreatitis Associated Protein (PAP) の検討

渡 辺 律 雄

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野

(主任: 相澤義房教授)

Evaluation of Pancreatitis Associated Protein Dramatically Overexpressed in Cardiomyocytes in Acute Phase of Experimental Autoimmune Myocarditis

Ritsuo WATABNABE

Division of Cardiology,

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yosifusa AIZAWA)

要 旨

劇症型心筋炎は、激しい炎症を伴い発症から回復にかけて心機能が著明に変化する。この経過において、心筋組織中の心筋炎を構成する細胞（心筋細胞、非心筋細胞あるいは炎症細胞）のクロストークが心機能障害の進展抑制や、心筋炎の病態形成に大きく関与していると推測される。今回我々は、ヒトの劇症型巨細胞性心筋炎に類似するラット実験的自己免疫性心筋炎（以下 EAM）において、心筋細胞の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較検討した。その結果、いくつかの遺伝子発現が大きく変化していることが示唆され、中でも pancreatitis associated protein (PAP I) は EAM 心筋細胞で、正常心筋細胞と比べて非常に発現が亢進していることを見いだした。定量的 RT-PCR でも、PAP I は組織学的に心筋炎をほとんど認めない発症のごく初期の第 6 日から第 9 日にかけて急激に発現量が増加し、心筋炎極期の第 18 日ではピークとなり、正常心筋細胞の約 1800 倍に達していた。また、極期の EAM ラットの心筋組織から分離精製した細胞群での定量的 RT-PCR の解析では、PAP I の発現は非心筋細胞ではなく、ほとんどが心筋細胞に認められた。PAP I のアイソフォームである PAP II, PAP III も心筋炎極期の第 18 日で著明な発現の亢進を認められた。PAP の転写活性化因子の 1 つと考えられている p8 の発現は、正常心筋細胞に比し第 18 日目の心筋細胞で約 12 倍

Reprint requests to: RITSUO WATABNABE
First Department of Internal Medicine
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学医学部第一内科学教室 渡辺律雄

の亢進がみられ、転写を活性化していると想定されている IL-6 も、正常の非筋細胞に比し第15日目の非筋細胞で約109倍に亢進していた。PAPの受容体の一つと考えられている regenerating gene (Reg) 受容体を有する細胞は、広汎であり、筋細胞および $\alpha\beta$ T細胞やマクロファージなどの炎症細胞、さらに線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞を含む非筋非炎症細胞にも発現が認められた。これらのことから、これらの PAP は EAM 筋細胞で劇的に発現が亢進し、産生分泌され、オートクリンとして筋細胞に、あるいはパラクリンとして周囲の細胞に影響を与えていると考えられた。心筋炎における筋細胞での PAP についての検討は全く報告されていないが、急性膵炎における PAP の報告では、分泌型ストレス蛋白としての作用、抗アポトーシス作用、細胞の再生に関与する作用などを有するとされており、心筋炎の病態形成や筋細胞障害の進展抑制などに大きく関与する可能性が考えられた。

キーワード：劇症型心筋炎、実験的自己免疫性心筋炎、DNA マイクロアレイ、pancreatitis associated protein

はじめに

劇症型心筋炎は重篤な炎症性心疾患である。急性期には筋組織に著明な炎症細胞浸潤と筋細胞の壊死・脱落を来し高度の心機能障害を引き起こし、時には致死的となる。慢性期になると炎症細胞浸潤は消退し、広範な線維化を認め、リモデリングが起こるが、心機能は徐々に回復傾向を示す。これらのことから、筋細胞の遺伝子発現は、この経過中著しく変化し、周囲の細胞とクロストークすることによって心機能障害の進展抑制や心筋炎の病態形成に大きく関与しているのではないかと推測される。今回我々は、ヒトの劇症型巨細胞性心筋炎に類似するラット実験的自己免疫性心筋炎 (EAM)¹⁾ の筋細胞と、正常ラットの筋細胞との遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較検討し、その中で大きく変化している遺伝子を選別した後、更に定量的 RT-PCR でこれらを確認しようと試みた。

心筋炎の心臓では、正常の心臓とは異なり、多数の炎症細胞の浸潤や線維芽細胞の増加などが認められる²⁾。そのため、単に心筋炎の心臓全体から抽出した RNA と正常の心臓全体から抽出した RNA とを比較しただけでは、非筋細胞の特徴である遺伝子発現の変化が大きく影響し、筋細胞の遺伝子発現変化の検討は困難になると考えられる。以前我々はランゲンドルフ還流装置下にコラゲナーゼ処理を行い、心臓から細胞を分離し、

ステンレス性ふるいを用いて筋細胞を精製する方法を確立した³⁾。この方法によって、炎症細胞の混入は3%以下、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などの非筋非炎症細胞の混入は10%以下に抑えることができる。我々はこの方法によって細胞を分離精製し、それを比較することによって、心筋炎における筋細胞のみの遺伝子発現の変化を測定することができると考えた。その結果、DNA マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR でも EAM 筋細胞で発現が亢進あるいは減弱している遺伝子がいくつか同定され、その中でも pancreatitis associated protein (PAP I) という心疾患では全く未知のタンパクが、劇的に発現が亢進していることがみいだされた。我々は、その関連遺伝子の発現についても検討を加えた。

方 法

1. EAM の作成

以前我々が報告したように、ブタの心臓から筋ミオシン精製し¹⁾、結核死菌を含んだ完全フロイントアジュバント (結核死菌濃度 5.5mg/ml) を同量加え十分に混和した後、8週齢 Lewis ラットの両足底に 100 μ l ずつ皮下注射し EAM を作成した¹⁾。

2. EAM 組織所見

EAM 第 6, 9, 12, 15, 18 日の心臓をホルマリン

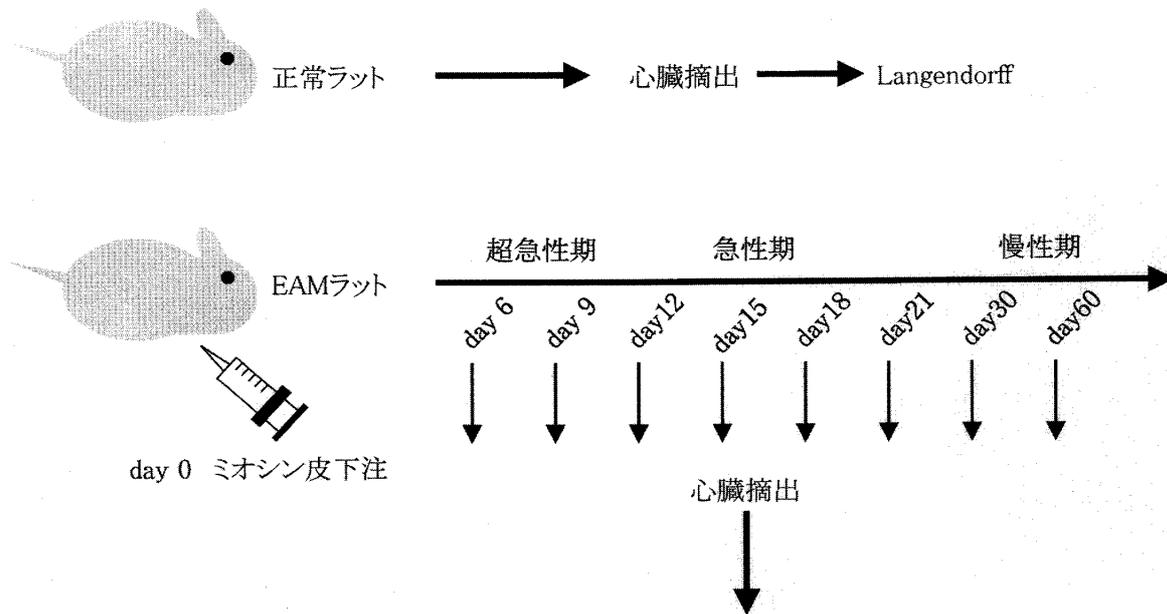


図1 正常ラットおよびEAMラットからの心臓摘出
正常ラットあるいは感作後第6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 60日目のEAMラットの心臓を拍動下で摘出し、Langendorff灌流法で心筋組織を灌流させた。

固定パラフィン包埋後、心室中部の横断切片をヘマトキシリン・エオジン染色した。

3. 心室の心筋細胞と非心筋細胞の単離精製

正常ラットあるいは感作後第6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 60日のEAMラットを、ペントバルビタールで麻酔後、気管切開を行い、人工呼吸管理下に開胸し、拍動下で心臓を摘出し大動脈より逆行性にカニューレを挿入し、心筋組織をLangendorff灌流装置を用いて37℃に維持された以下の各灌流液を経冠動脈的に灌流させた。つまり、まずTyrode (+) (1.8mM CaCl₂, 140mM NaCl, 0.33mM NaH₂PO₄, 5.4mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 5mM HEPES, 5.5mM glucose, pH 7.4) を灌流し、血管内や心腔内の血液成分の洗い流し、続いてコラゲナーゼ type II (Invitrogen Corporation) 400mg/lを含むTyrode (-) (140mM NaCl, 0.33mM NaH₂PO₄, 5.4mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 5mM HEPES, 5.5mM glucose, pH 7.4) で25分間灌流し、心筋組織の細胞間結合を酵素分解した。更にKB液 (70mM glutamic

acid, 25mM KCl, 11mM glucose, 10mM taurine, 10mM KH₂PO₄, 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, pH 7.3) で灌流し、コラゲナーゼを洗い流した後、4℃KB液中で灌流後の心臓を丁寧に分離し、心筋組織中の細胞を単離した。単離した細胞を含むKB液は、まず目開きサイズが120μmのステンレス性ふるいを通し、酵素分解されず単離できなかった大きな組織塊を除去した。通過した細胞を含むKB液は目開きサイズが38μmのステンレス性ふるいを通し、ふるい上の残った細胞をさらにもう一度同じふるいを通し、上に残った細胞を心筋細胞とした。またこのふるいを通した細胞を含むKB液は、更に目開きサイズが20μmのステンレス性ふるいに2~3回通し、完全に心筋細胞を除去し、通過した細胞を非心筋細胞とした(図1, 図2)。

4. 非心筋細胞からの炎症細胞と非心筋非炎症細胞の分離精製

非心筋細胞にPE標識抗αβT細胞受容体抗体(R73) (Pharmingen, San Diego, CA) を反応さ

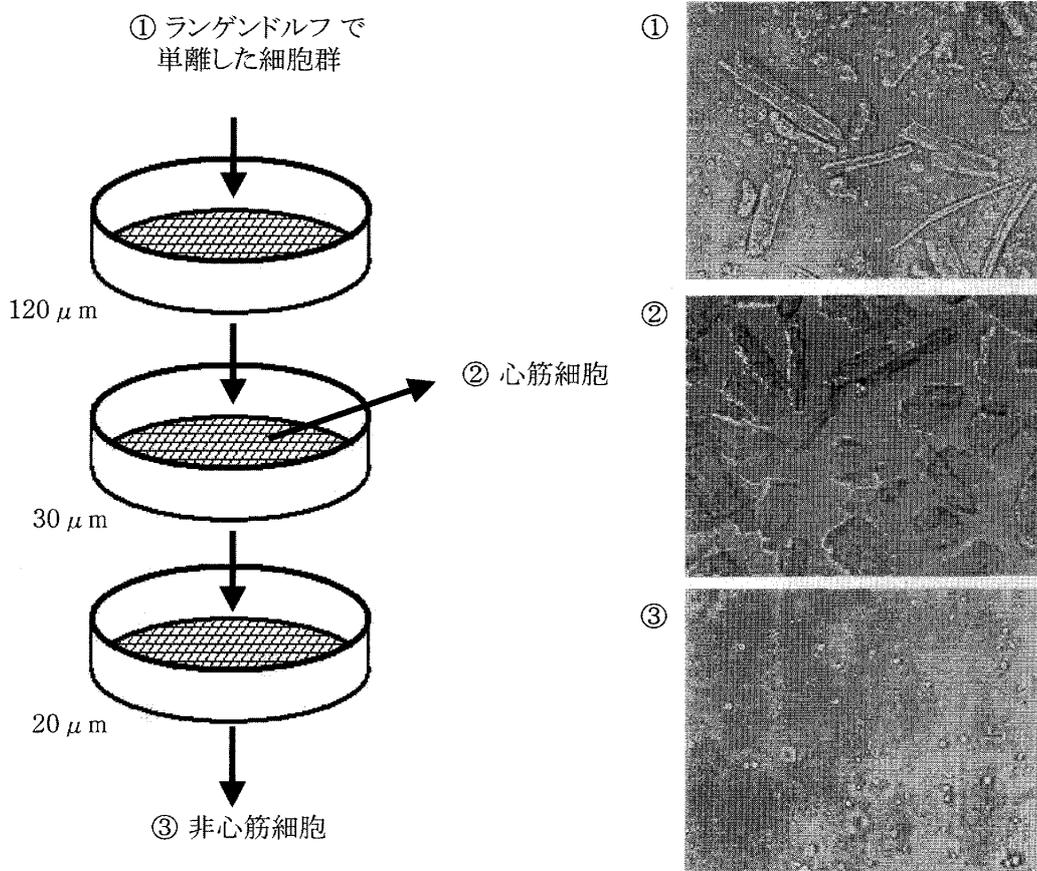


図2 単離された細胞からの心筋細胞および非心筋細胞の分離

- ①Langendorff灌流法で単離した細胞群. 心筋組織中のあらゆる細胞が含まれる. また完全に酵素分解されず細胞間結合が残っているために組織塊となっているものも含まれる.
- ②分離精製された心筋細胞. 目開きサイズ $120\mu\text{m}$ のステンレス性ふるいで捕捉して組織塊を除去した後に, 通過した細胞群は更に目開きサイズ $30\mu\text{m}$ のステンレス性ふるいに通した. 細胞径の小さな非心筋細胞はふるいを通すため, 心筋細胞だけが捕捉され, これを2~3回繰り返すことにより, 分離した心筋細胞の純度を高めた.
- ③分離精製された非心筋細胞. 目開きサイズ $30\mu\text{m}$ のステンレス性ふるいを通した細胞群は, 更に目開きサイズ $20\mu\text{m}$ のふるいで, 残っている心筋細胞や非心筋細胞塊を捕捉した. 通過した細胞群は細胞径の小さな非心筋細胞であり, これを2~3回繰り返すことにより分離した非心筋細胞の純度を高めた.

せた後, 抗 PE マイクロビーズ抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を結合させ, 磁気細胞分離カラム (Miltenyi Biotec) を通し, $\alpha\beta$ T細胞の分離を行った. その後同様に, PE 標識抗 CD11b 抗体 (OX-42) (Pharmingen, San Diego, CA) を反応させた後, 抗 PE マイクロビーズ抗体を反応させ, 磁気細胞分離カラムで

CD11b + 細胞 (マクロファージ/樹状細胞/顆粒腔細胞) を分離した. 最後に残った細胞を線維芽細胞, 血管内皮細胞, 平滑筋細胞などが含まれる非心筋非炎症細胞とした.

5. RNA の抽出

正常あるいは感作後第6, 9, 12, 14, 15, 18, 21,

28, 30, 60 日の EAM ラットの心筋細胞, 非心筋細胞, CD11b⁺細胞, $\alpha\beta$ T細胞, あるいは分離前の心臓から, それぞれ Trizol 試薬 (Life Technologies, 東京) を用いて RNA を抽出した.

6. DNA マイクロアレイ

正常心臓から分離精製された心筋細胞および心筋炎極期第 18 日の EAM の心臓から分離精製された心筋細胞から上記のように RNA を 5 μ g ずつ抽出し, この 2 検体でラット DNA マイクロアレイ (DNA chipTM, SIGMA-ALDRICH, 東京) を用いて 7793 種類の遺伝子発現の差を解析した.

7. cDNA の合成

それぞれ総 RNA 5 μ g と murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase, RNAase inhibitor, Random primer を用いて総量 20 μ l の cDNA を合成した.

8. 定量的 RT-PCR による mRNA の定量とスタンダード用のプラスミド作成

DNA マイクロアレイの結果から, 正常心筋細胞に比し, 心筋炎の心筋細胞で 2 倍以上の発現亢進あるいは減弱が認められた既知の遺伝子について文献的に考察し, 非心筋細胞の混入と考えられる遺伝子を除いた後, 残った候補遺伝子 (表 1a) について定量的 RT-PCR を行ったプライマーと, その他大きな変化の認められた PAP I に関連した遺伝子のプライマーを示した (表 1b). 定量的 RT-PCR スタンダード用のプラスミドは, EAM の心臓から得られた cDNA とプライマーをそれぞれ用いて PCR で増幅し, それらを pGEM-T easy ベクターに挿入し, MagExtractor plasmid Kit (TOYOBO, 大阪) にて精製した. 尚, プラスミドは, シリコン化したチューブに 10 ng/ml MS2 RNA (Roche, Indianapolis, IN) を含む DNase free 水で壁に吸着しないように希釈し, cDNA は同様に, シリコン化したチューブに 10 ng/ml MS2 RNA (Roche, Indianapolis, IN) を含む DNase free 水で 100 倍希釈して, その 5 μ l を定量的 RT-PCR に用いた. cDNA と希釈したプラ

スミドは, スタンダードのプラスミドを作成したプライマーと同じものと LightCycler - FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Indianapolis, IN) を用い, LightCycler で解析した (denaturation 95 $^{\circ}$ C, 10 秒, annealing 62 $^{\circ}$ C, 10 秒, extension 72 $^{\circ}$ C, 13 秒, 40 サイクル). 絶対コピー数は LightCycler ソフトウェアにより, 5 つのプラスミドのスタンダードを用いて計算した⁴⁾.

結 果

1. 分離前の心臓あるいは分離精製後の心筋細胞から抽出された心筋細胞特異遺伝子発現の比較

ランゲンドルフ還流装置下コラゲナーゼ処理の影響の有無を見るため, 心筋細胞特異遺伝子である心房性利尿ペプチド (ANP), α 鎖心筋ミオシンおよび β 鎖心筋ミオシンの遺伝子発現を, 正常心臓, 第 14, 21, 28 日の心筋炎の心臓でそれぞれ比較したところ, 分離前後でほぼ同様な変化が認められた (図 3). このことよりランゲンドルフ還流装置下コラゲナーゼ処理は心筋細胞の遺伝子発現に大きな影響は与えないと考えられた.

2. DNA マイクロアレイ

正常心筋細胞と EAM 第 18 日心筋細胞を比較した DNA マイクロアレイによる 7793 種類遺伝子解析のスキャットプロットを図 4 に示す. これらの中から, 正常心筋細胞に比し, 心筋炎の心筋細胞で 2 倍以上の発現亢進あるいは減弱が認められ, 非心筋細胞の混入だけでは説明のつかない候補遺伝子で, 定量的 RT-PCR でも同様な結果の得られた遺伝子を表 2a および 2b に示した. この中には ANP などがあった.

3. PAP アイソフォームの mRNA

PAP I の遺伝子発現は, EAM 第 18 日の分離精製した心筋細胞で亢進していた (図 5a). 第 18 日の分離精製した心筋細胞 (n = 7) と非心筋細胞 (n = 8) とで PAP I の発現を測定したところ, 明らかに心筋細胞で PAP I が大量に発現し

表1a 候補遺伝子の GenBank accession number と遺伝子名

GenBank accession	遺伝子名
M17084	major beta-globin
NM_012618	S100 calcium-binding protein A4 (S100a4)
M55149	pancreatitis associated protein (pap)
AF016181	putative pheromone receptor (Go-VN4)
AF014503	p8
X06564	140-kD NCAM polypeptide.
J00705	apolipoprotein E mrna.
L20869	gcd-10S
D10587	sp. mRNA for 85kDa sialoglycoprotein (LGP85)
M30689	Ly6-B antigen
M58404	hymosin beta-10 (testis-specific) gene
L10339	elongation factor-1 alpha (ef-1)
NM_031144	cytoplasmic beta-actin (Actx)
M13749	placental lactogen II (rPLII)
NM_019297	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (Chrn2)
NM_012679	Testosterone-repressed prostate message 2 (Trpm2)
NM_012589	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
NM_017138	laminin receptor 1 (Lamr1)
NM_012656	Secreted acidic cysteine-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc)
NM_017290	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (Atp2a2)
X99257	lamin C2
NM_012612	Natriuretic peptide precursor A, (pronatriodilatin, also Anf, Pnd) (Nppa)
X02904	glutathione S-transferase P subunit
S77900	myosin regulatory light chain isoform C [new-born, heart ventricle]
NM_053469	hepcidin antimicrobial peptide (Hamp)
NM_012862	Matrix Gla protein (Mgp)
S77858	non-muscle myosin alkali light chain [new-born, heart ventricle]
NM_019904	beta-galactoside-binding lectin (Lgals1)
X16957	mRNA for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C
NM_017020	Interleukin 6 receptor (Il6r)
NM_012512	Beta-2-microglobulin (B2m)
NM_017264	protease (prosome, macropain) 28 subunit, alpha (Psm1)
M11942	70 kd heat-shock-like protein
J02773	low molecular weight fatty acid binding protein
L10229	pancreatitis-associated protein (PAPII)
NM_020097	Reg receptor (Regr)
NM_012576	Glucocorticoid receptor (Grl)
M59786	dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha-1 subunit gene
U95001	developmentally-regulated cardiac factor (DRCF-5)
AF045564	development-related protein
M31178	calbindin D28
NM_138976	mitofusin 1 (Mfn1)
NM_012874	heart-derived c-ros-1 proto-oncogene (Ros1)
AF056034	F-actin binding protein b-Nexilin
S79797	enzymatic glycosylation-regulating gene [streptozotocin diabetic heart]

ていることが認められた (図 5b)。このことより、PAP I の発現亢進は、炎症細胞や線維芽細胞など非心筋非炎症細胞の混入のためではなく、何らかの刺激によって、心筋細胞が PAP I の発現を劇的に亢進するためと考えられた。そこで PAP アイソフォームである PAP II, PAP III を同様に測定したところ、どちらも EAM 第 18 日の分離精製した心筋細胞で明らかに亢進しており (図 5a)、これは同様に、心筋細胞でも十分な発現がみられ

るため非心筋細胞の混入によるものではなく (図 5b)、心筋細胞が何らかの刺激によって、これらの発現を亢進するためと考えられた。ただし、PAP I と異なり、PAP II では非心筋細胞でも約 1/5 ほど、PAP III ではほぼ同程度の発現がみられた。分離心筋細胞中の PAP I, PAP II, PAP III 発現の経過を、第 6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 60 日で測定したところ、PAP I, PAP III は心筋炎がほとんどみられない第 6 日から発現が少し増強し、発

表 1b プライマーの塩基配列

遺伝子名	forward primer	reverse primer
major beta-globin	5'-aaaggatgaacctgatgatgtt-3'	5'-gcccaacaacaatcaaatcata-3'
S100 calcium-binding protein A4 (S100a4),	5'-ctggatgtaatagtgtccacctt-3'	5'-acttctccgggctccttat-3'
pancreatitis associated protein (pap)	5'-tactgctatgccctgtttcagata-3'	5'-tcacatgtggtatctctccatctt-3'
putative pheromone receptor (Go-VN4)	5'-atctcagacaatgatcaaggcata-3'	5'-gtccaaaacaaaagtccatatac-3'
p8	5'-cttcccgaacctgtaaacatag-3'	5'-aggccttttcttccagattt-3'
140-kD NCAM polypeptide.	5'-ctgaagagcatccagtcacagat-3'	5'-tgcagttgtatttccaaagtcac-3'
apolipoprotein E mrna.	5'-aggacactatgacggagtaaaag-3'	5'-ctcaggtatgacactcacc-3'
gcd-10S	5'-tacctgaaatccagcacaactg-3'	5'-atctgtgacatgtccaaacacact-3'
sp. mRNA for 85kDa sialoglycoprotein (LGP85),	5'-agaccctaccgttgactgttag-3'	5'-attgtcctccagtcagaaaaac-3'
Ly6-B antigen	5'-cagatctgtgctatgaagtctg-3'	5'-caaagatctgtatgcaacagctca-3'
hyomysin beta-10 (testis-specific) gene	5'-gaatccgcagcttgcataa-3'	5'-tgaatttggcagctcgatt-3'
elongation factor-1 alpha (ef-1)	5'-aatgggacacaatgctgga-3'	5'-catgggtcatttccacagac-3'
cytoplasmic beta-actin (Actx)	5'-taaagagaagctgtgctatgttc-3'	5'-agtaatctctctgcatctctg-3'
placental lactogen II (rPLII)	5'-catgatctgtctcaaaagtgttc-3'	5'-cagaagctcctgaaattcttctc-3'
cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (Chrn2)	5'-acgaagctcctctctatccaatg-3'	5'-gatgaagctcaggtgatgtccac-3'
Testosterone-repressed prostate message 2 (Trpm2)	5'-ctagagggatcttctgaaaccagagc-3'	5'-atcatatcaaaaaggctggaac-3'
Interleukin 6 (interferon, beta 2)	5'-aatttgctattgaaatctgctc-3'	5'-ttctcaagtgctttcaagatgag-3'
laminin receptor 1 (Lamr1)	5'-cttcaactaccagatccaagcag-3'	5'-gggtccctgtagaagtaagatca-3'
Secreted acidic cystein-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc)	5'-gtcaccttgcagagagatgag-3'	5'-ttgtctagctcaggctcctcaag-3'
ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (Atp2a2)	5'-tgatcagcagcttgaagacttac-3'	5'-tttccactatccccaggaaacta-3'
lamin C2.	5'-taagaagcaactccaggatgaga-3'	5'-attatccagcttggcagatgatg-3'
Natriuretic peptide precursor A (pronatriodilatin, also Anf, Pnd) (Nppa)	5'-atggattcaagaacctgctagac-3'	5'-gctccaatcctgtcaactctac-3'
glutathione S-transferase P subunit.	5'-gagacctcaccctttaccaatca-3'	5'-aatctgcaaggaaatctggttac-3'
myosin regulatory light chain isoform C [new-born, heart ventricle]	5'-cttcattgacaaggagcactaca-3'	5'-atgagagtaactccacatagtt-3'
hepcidin antimicrobial peptide (Hamp)	5'-ctgctgtctctctctctctc-3'	5'-ctatgttatgcaacagagaccaca-3'
Matrix Gla protein (Mgp)	5'-ggcagccctgtgctatgaat-3'	5'-ctcctgaagtgcaggtttag-3'
non-muscle myosin alkali light chain [new-born, heart ventricle]	5'-aagactctgacagccaggtgtg-3'	5'-atctcagctctctctctctc-3'
beta-galactoside-binding lectin (Lgals1)	5'-acaacctgtcctacactcaac-3'	5'-actcaaggccacacacttaact-3'
mRNA for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C.	5'-gcctgaagcagatcaacaag-3'	5'-atcttgcagctggattttgtc-3'
Interleukin 6 receptor (Il6r)	5'-ctgggaccgaagtactactgtt-3'	5'-ctctgtgtgctatagttctcaac-3'
Beta-2-microglobulin (B2m)	5'-gatcttctgtgctgtctctct-3'	5'-agagtgcagctgtttaaactctgca-3'
protease (prosome, macropain) 28 subunit, alpha (Psm1)	5'-gctacagatacctcggatagagga-3'	5'-caatagatcatccctttgtctct-3'
70 kd heat-shock-like protein	5'-caaaagggagacaaaagtctca-3'	5'-gatttgacttcaaaaatccatcc-3'
low molecular weight fatty acid binding protein	5'-gaagctagtggacagcaaatit-3'	5'-atgagtttccactcacttagttcc-3'
pancreatitis-associated protein (PAPI)	5'-cttactgctatccttggtcaga-3'	5'-agaaactccaggtagctgttaga-3'
Reg receptor (Regr)	5'-ctgtatgtggtttagtggagag-3'	5'-caccctggaagtgagagatatt-3'
Glucocorticoid receptor (Gri)	5'-taagcctctattttaccggacac-3'	5'-cattaaaaacaggctctgactc-3'
dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha-1 subunit gene	5'-aatttgaacaagcaaccaaac-3'	5'-ctcttcgctggaacatctattat-3'
developmentally-regulated cardiac factor (DRCF-5)	5'-tgacagaatgcaactcactgtta-3'	5'-aagaactggatgcttctgttag-3'
development-related protein	5'-gccagatactgactctccatct-3'	5'-atcttcaggaaggtgttagtgg-3'
calbindin D28	5'-gctatcactgagatgaaacctt-3'	5'-gtctgtgactcagcaagttctg-3'
mitofusin 1 (Mfn1)	5'-tattcaatggaagagaggaagac-3'	5'-caaatctcaatgatttctgtg-3'
heart-derived c-ros-1 proto-oncogene (Ros1).	5'-agatttggttgactccagaag-3'	5'-atttgaagtgtttctgacctc-3'
F-actin binding protein b-Nexilin	5'-agaagagcaagaggaatgaga-3'	5'-agtagttctcttcaaccaccac-3'
enzymatic glycosylation-regulating gene [streptozotocin diabetic heart]	5'-tagtgcagctcactggagcttct-3'	5'-gtgaatgcagtagaatactgtgg-3'
pancreatitis-associated protein (PAPII)	5'-cttactgctatccttggtcaga-3'	5'-agaaactccaggtagctgttaga-3'
pancreatitis associated protein III (PAPIII)	5'-tgctatgcttggtaggtatcc-3'	5'-cagtgacttccagagacagaagaa-3'
Regeneration protein, lithostatin, pancreatic stone protein (Reg)	5'-gttccaatgctcactgctcact-3'	5'-ggaattgttaggatacccaggtct-3'
rat Reg receptor	5'-ctgtatgtggtttagtggagag-3'	5'-caccctggaagtgagagatatt-3'

表 1 の遺伝子の正常心筋細胞と EAM 第 18 日心筋細胞での fluorescent のシグナル強度、その比率、定量 RT-PCR のスタンダード用のプラスミドを作成するために使用した forward primer と reverse primer の sequence を示した。

症初期には劇的に増加し、極期の第 18 日には正常と比較すると PAP I は 1820 倍の発現増強が認められた (図 6a, 図 6b)。心不全時に、心筋細胞での発現増強が以前から報告されている ANP, BNP と比較してみても (図 6c), PAP I の発現の増強はかなり程度が大きく、また心筋炎の発症のごく初期から起こることが認められた。

4. PAP に関連した遺伝子の mRNA

PAP の転写活性化因子の 1 つと考えられている p8 の発現の経過を分離精製した心筋細胞で調べたところ、正常心筋細胞に比し第 18 日目の心筋細胞で約 12 倍の亢進がみられた。また、PAP の転写を活性化していると想定され、マクロファージ, T 細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞などから産生されるとされる IL-6 も、正常の非心筋細

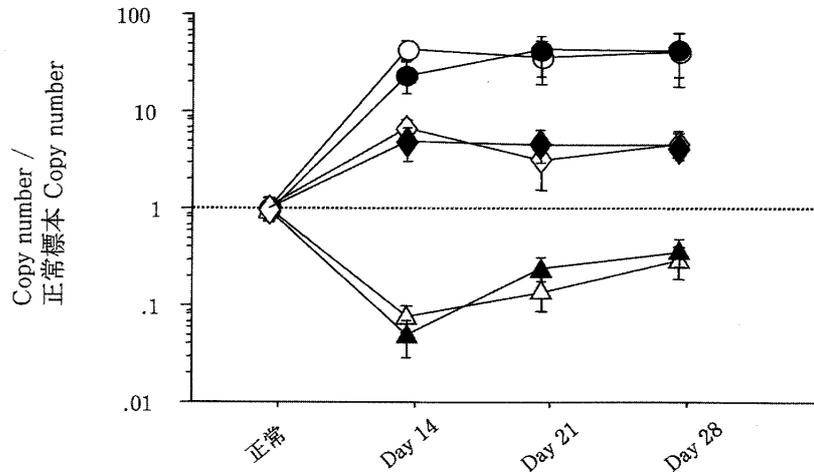


図3 心筋細胞と心筋組織での mRNA 発現の時間経過

○, 分離精製された心筋細胞の ANP. △, cardiac myosin. ◇, β cardiac myosin. ●, 分離前心筋組織中の ANP. ▲, α cardiac myosin. ◆, β cardiac myosin. 分離精製された正常心筋細胞あるいは分離前正常心筋組織での発現量を1としたときの, EAMの各時期(第14, 21, 28日)における心筋細胞での発現量の比を示す.

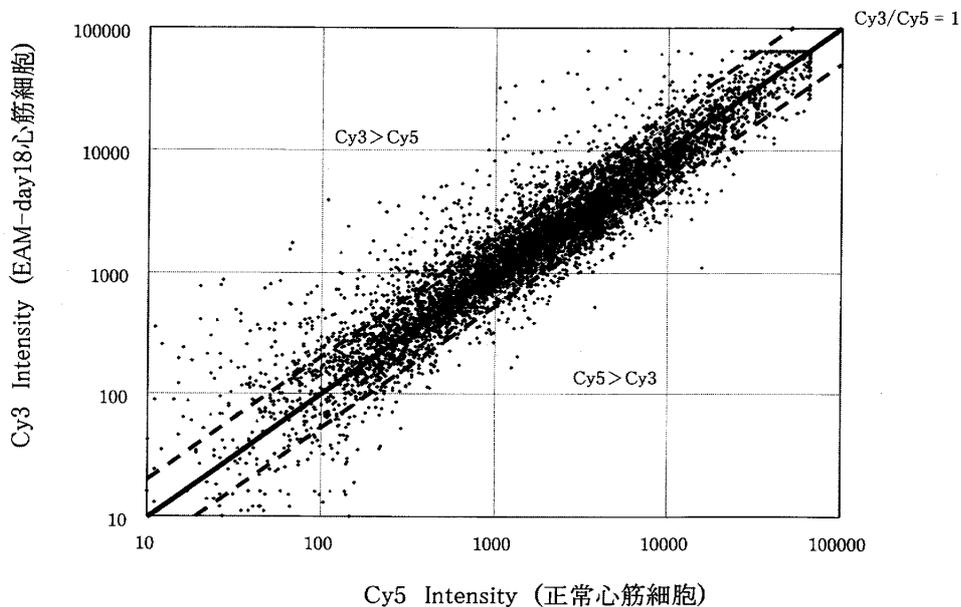


図4 DNA マイクロアレイのスクアットプロット

7900種類の遺伝子発現のスクアットプロット. 各遺伝子につき, 正常心筋細胞はCy5で, EAM第18日心筋細胞はCy3で, 標識されたサンプルをDNAマイクロアレイにハイブリダイゼーションして得られた fluorescent のシグナルの強度をプロットしたもの. 中央の太いラインはCy5とCy3の比が1であり, 上方の破線はCy3がCy5の2倍, 下方の破線はCy5がCy3の2倍であることを示す.

表 2a 定量 RT-PCR で EAM 第 18 日心筋細胞 > 正常心筋細胞であった遺伝子

EAM-Day18 心筋細胞 > 正常心筋細胞	シグナル強度		
	正常心筋細胞	EAM-Day18 心筋細胞	EAM/正常比率
Pancreatitis associated protein (PAP) mRNA, complete cds	3395	64917<	19.1<
Apolipoprotein E mRNA.	5553	64713<	11.6<
Natriuretic peptide precursor A, (pronatriodilatin, also Anf, Pnd) (Nppa), mRNA.	23047	64913<	2.8<
Matrix Gla protein (Mgp), mRNA.	29725	64912<	2.2<
S100 calcium-binding protein A4 (S100a4).	1866	36215	19.4
P8 mRNA, complete cds..	58	845	14.6
140-kD NCAM polypeptide.	236	3163	13.4
Gcd-10S mRNA, complete cds.	129	1440	11.2
Thymosin beta-10 (testis-specific) gene, complete cds.	2146	21987	10.2
Elongation factor-1 alpha (ef-1) mRNA, complete cds.	3423	31463	9.2
Cytoplasmic beta-actin (Actx), mRNA.	9024	60472	6.7
Testosterone-repressed prostate message 2 (Trpm2), mRNA.	10038	50597	5.0
Laminin receptor 1 (Lamr1), mRNA.	9352	40563	4.3
Secreted acidic cysteine-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc)	6243	24198	3.8
Glutathione S-transferase P subunit.	8985	23706	2.6
Hepcidin antimicrobial peptide (Hamp), mRNA.	4391	11405	2.6

シグナル強度はDNAマイクロアレイでの結果を示す。

正常心筋細胞, EAM 第 18 日心筋細胞でのそれぞれの fluorescent のシグナル強度を示す。
EAM/正常 倍率は, EAM 第 18 日心筋細胞/正常心筋細胞のシグナル強度の比を表す。

表 2b 定量 RT-PCR で正常心筋細胞 > EAM 第 18 日心筋細胞であった遺伝子

正常心筋細胞 > EAM-Day18 心筋細胞	シグナル強度		
	正常心筋細胞	EAM-Day18 心筋細胞	正常/EAM 比率
Enzymatic glycosylation-regulating gene [rats, Sprague-Dawley, streptozotocin diabetic, heart, mRNA.].	74	2	36.6
F-actin binding protein b-Nexilin mRNA, complete cds.	20208	4695	4.3
Rat heart-derived c-ros-1 proto-oncogene (Ros1), mRNA.	1903	615	3.1
Mitofusin 1 (Mfn1), mRNA.	9862	3290	3.0
Calbindin D28 mRNA, complete cds.	55329	20202	2.7

シグナル強度はDNAマイクロアレイでの結果を示す。

正常心筋細胞, EAM 第 18 日心筋細胞はそれぞれの fluorescent のシグナル強度を示す。
正常/EAM 倍率は, 正常心筋細胞/ EAM 第 18 日心筋細胞のシグナル強度の比を表す。

胞に比し第 15 日目の非心筋細胞で約 109 倍に亢進していた (図 7)。また PAP の受容体の一つと考えられている regenerating gene-(Reg) 受容体を有する細胞を, 第 18 日 EAM 心臓の分離精製した細胞群で調べたところ, 心筋細胞, $\alpha\beta$ T 細胞, マクロファージなどの炎症細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 平滑筋細胞を含む非心筋非炎症細胞など心筋炎心臓に存在する広範な細胞に発現していた (図 8)。

考 察

近年, DNA マイクロアレイ技術の進歩により, 膨大な遺伝子発現の解析を, 迅速におこなうことができるようになった。コクサッキー B3 によるウイルス性心筋炎において, マイクロアレイを使用し正常心筋との遺伝子発現で, 有意に変化している遺伝子を検索したり⁵⁾, ヒトにおいて, 正常心と肥大型心筋症による不全心との間で変化した

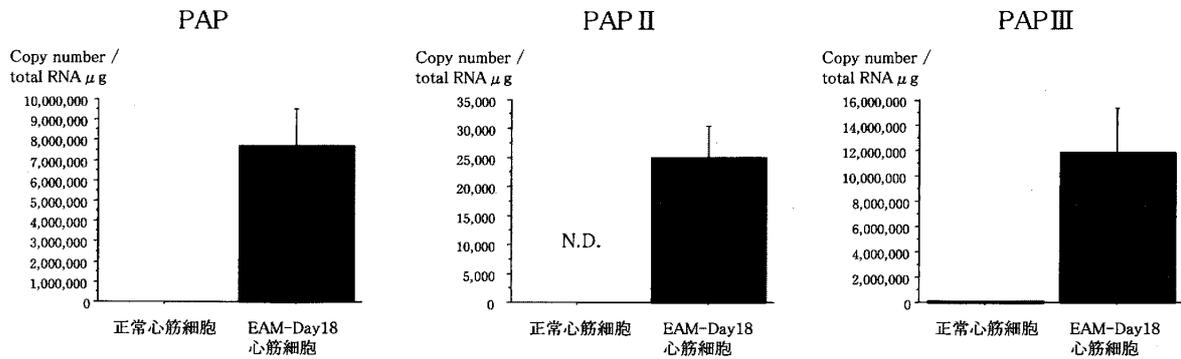


図 5a 正常心筋細胞と EAM 第 18 日心筋細胞での PAP isoform の mRNA コピー数
 定量的 RT-PCR により遺伝子発現量を測定した. PAP I (4,185 ± 1,111 vs
 7,683,534 ± 1,870,469 p = 0.002), PAP II (N.D. vs 24,888 ± 5,573), PAP III (53,781 ±
 7,265 vs 6,747,254 ± 873,330 p < 0.001). (平均値 ± 標準誤差)
 N.D.: not detected.

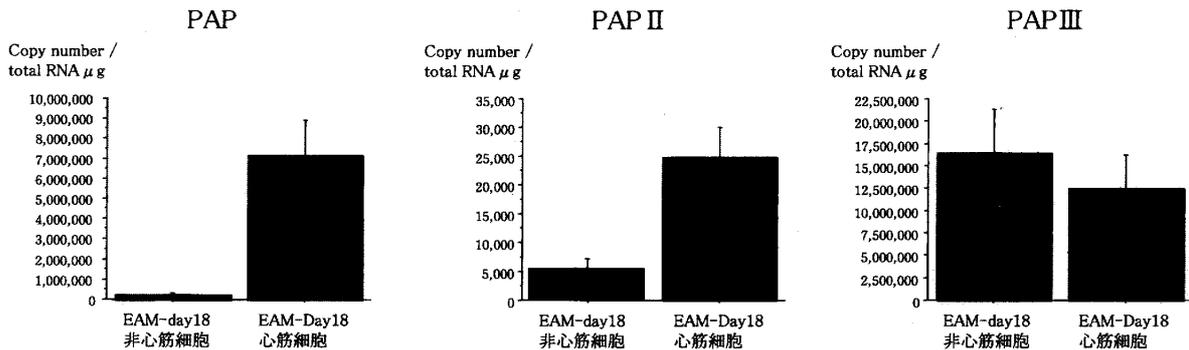


図 5b EAM 第 18 日での心筋細胞と非心筋細胞での PAP isoform の mRNA コピー数
 定量的 RT-PCR により遺伝子発現量を測定した. PAP I (231,843 ± 69,373 vs
 7,130,286 ± 1,750,158 p = 0.001), PAP II (5,079 ± 1,277 vs 24,781 ± 5,126 p = 0.022),
 PAP III (16,402,922 ± 4,947,950 vs 12,379,613 ± 3,837,135 p = 0.53). (平均値 ± 標準誤差)

遺伝子を検索したり⁶⁾, 不全心での左室補助循環 (LVAD) 装着前後の遺伝子発現の変化を検索したり⁷⁾, 多数の遺伝子の発現プロファイルを観察し, 治療に対する反応や予後を予測できる可能性もでてきた. しかし, 心筋炎や心筋梗塞, あるいは線維化の進んだ心筋症などは, 正常とは異なる細胞から構成されている. したがって, 心筋細胞の遺伝子発現の変化を見るときは, 単にそれらの混在した心筋組織を正常心筋組織と比較しても, 心筋細胞の遺伝子発現の変化がその他の細胞が発

現している遺伝子の影響を受けるため, 特異的な変化を同定することは困難と考えられる. 我々は, そのことを鑑み, 心筋細胞だけを高純度に分離精製し, 比較検討した. このような方法で心筋細胞の in vivo での変化を DNA マイクロアレイで比較した報告はないが, 今回の DNA マイクロアレイの解析において, 心筋炎での心筋細胞の遺伝子発現を見る上で, 心筋細胞に特異性の高い, 候補遺伝子を同定しやすかったと考えられる. ラット不全心では, 心筋細胞の ANP, β 心筋ミオシンの遺

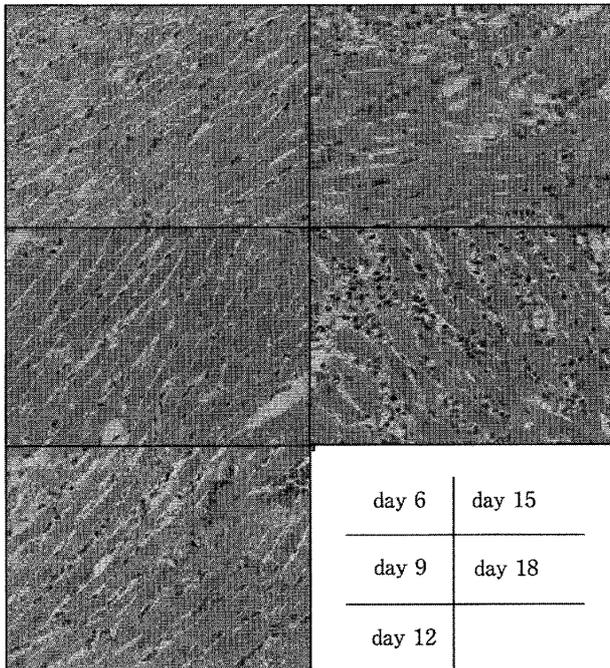


図 6a EAM 心筋組織の時間経過

第 6 日から第 9 日では明らかな炎症細胞浸潤は認めず心筋組織はほぼ正常に近い。第 12 日では炎症細胞浸潤を認めるようになり、第 15 日から第 18 日では著明な炎症細胞浸潤や心筋組織の壊死・脱落を認めるようになる。

伝子発現が増加し、 α 心筋ミオシンが減少することが報告されている⁴⁾。これらの遺伝子は、心筋細胞のみが発現する遺伝子である。分離する前の心筋組織でみたこれらの遺伝子発現変化は、我々が分離精製した心筋細胞と、ほぼ同様な変化が心筋炎の経過で認められた。このことは、我々の分離精製法が、心筋細胞の遺伝子発現をあまり変化させずに、生理的に近い心筋細胞の遺伝子発現を見ることができることを示していると考えられる。

今回我々は、そのような解析のデータをもとに、絞り込んだ遺伝子についてプライマーを作成し、定量的 RT-PCR によってその結果をさらに確かめた。いくつかの遺伝子では、少数混入した非心筋細胞の影響を受けたと考えられたり、DNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR で異なった結果

が見られたが、いくつかの興味深い候補遺伝子が浮かび上がった。その中でも今回検討を加えた PAP I は劇的な変化が見られ、非常に興味深い遺伝子であった。

PAP I は、正常の膵臓では発現量は少ないが、膵炎の急性期に外分泌細胞で劇的に発現が増加する蛋白として発見された⁸⁾。実験的膵炎モデルでも発現が亢進することが確認されている⁹⁾¹⁰⁾。また膵炎において、膵臓の再生している組織からクローニングされたため regenerating gene (Reg) としても研究されている。PAP I は Reg family^{11)–13)} の 1 つとして分類されており、膵臓 β 細胞の複製、成長、成熟に関与すると考えられている。また糖鎖を認識し結合するレクチン関連蛋白としての作用も有し⁸⁾、C type (カルシウム依存性) レクチン family に類似していると考えられている。分泌型ストレス蛋白としての作用⁸⁾¹⁴⁾、抗アポトーシス作用¹⁵⁾、細胞の再生に関与する作用¹⁶⁾ などの可能性が報告されている。PAP I 遺伝子は遺伝子長 2748bp であり、6 つの exon と 5 つの intron があり、transcription, splicing, translation され、シグナルペプチドを持つ 176 アミノ酸からなる蛋白となる。最終的に 26 アミノ酸からなるシグナルペプチドが切り離され、C 端に糖鎖認識部位を持つ 150 アミノ酸からなる分子量約 14Kda の蛋白として細胞外に分泌されることが考えられている。膵臓では前述したように、いくつか検討がされており、肝臓でも報告がみられるが¹⁶⁾、心臓では全く検索されておらず、心筋炎における心筋組織での役割についても全く不明である。上流の promoter 領域には IL-6 response element とグルココルチコイド response element があると推測されている¹²⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。よって IL-6 やグルココルチコイドなどの刺激により PAP の転写が促進され、遺伝子発現が活性化される可能性が示唆されている。今回の検討でも、EAM 心臓の非心筋細胞で IL-6 が増加しており、おそらくマクロファージや T 細胞、線維芽細胞などで IL-6 が産生され、PAP I の転写を促進した可能性も考えられる。また PAP I の転写活性化因子の 1 つとして p8 が考えられており、p8 は正常の膵臓にはほとんど発現してい

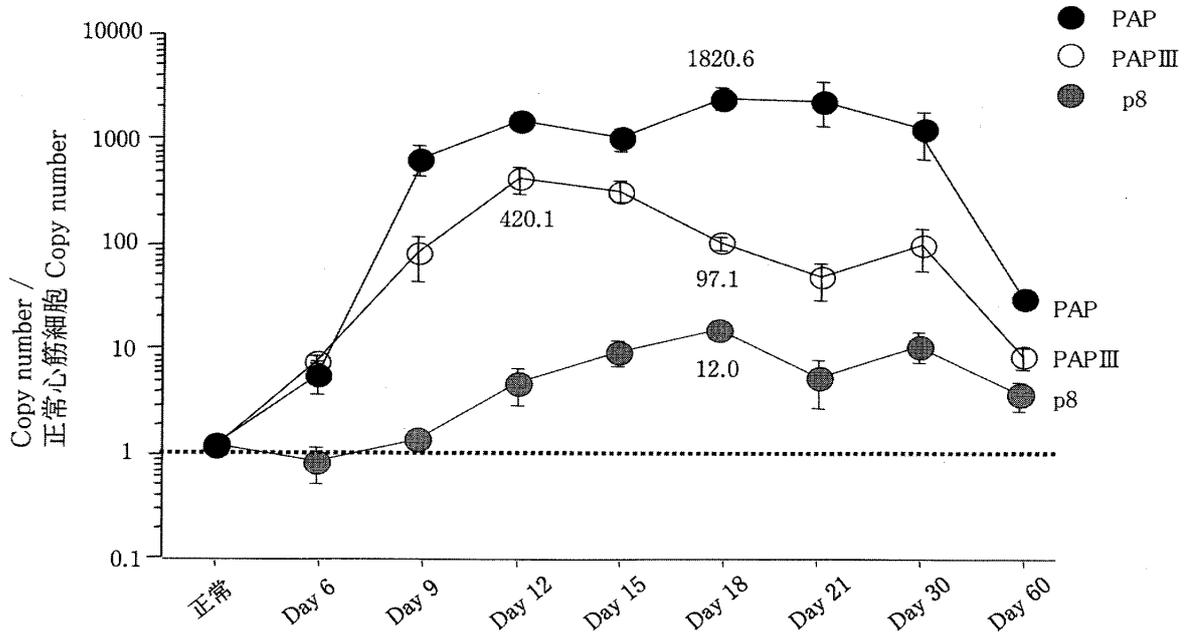


図6b EAM心筋細胞でのmRNA変化率の時間経過-1

PAP I, PAP III, p8の正常心筋細胞での発現量を1としたときの, EAMの各時期(第6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 60日)における心筋細胞での発現量の比.

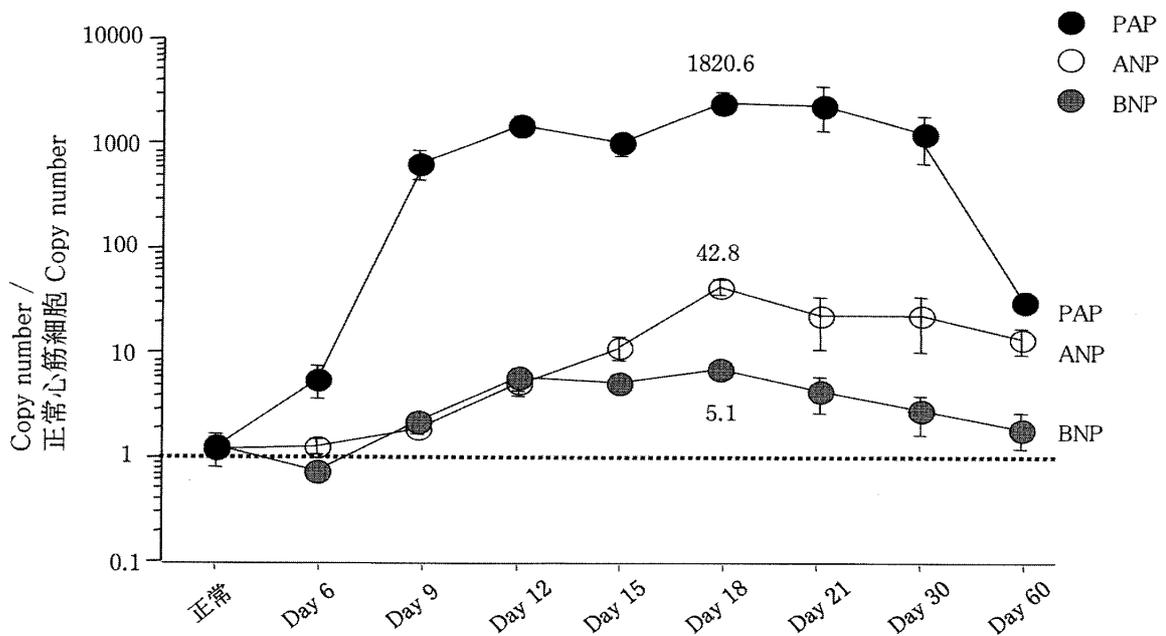


図6c EAM心筋細胞でのmRNA変化率の時間経過-2

ANP, BNPの正常心筋細胞での発現量を1としたときの, EAMの各時期(第6, 9, 12, 15, 18, 21, 30, 60日)における心筋細胞での発現量の比.

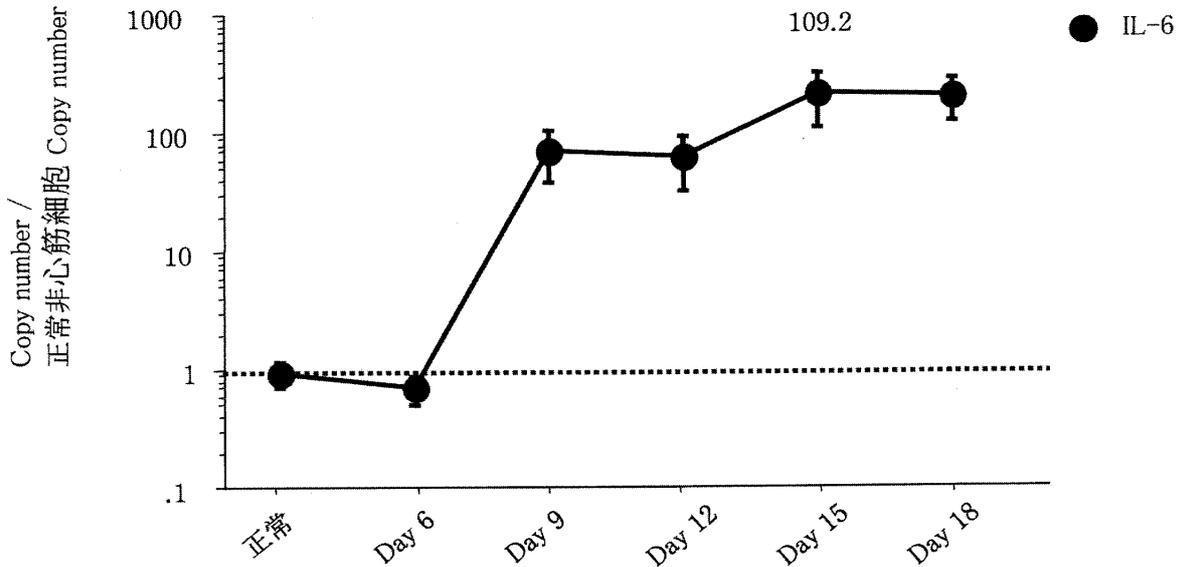


図7 EAM 非心筋細胞での IL-6 の mRNA 変化率の時間経過
IL-6 の正常非心筋細胞での発現量を 1 としたときの、EAM の各時期 (第 6, 9, 12, 15, 18 日) における非心筋細胞での発現量の比。

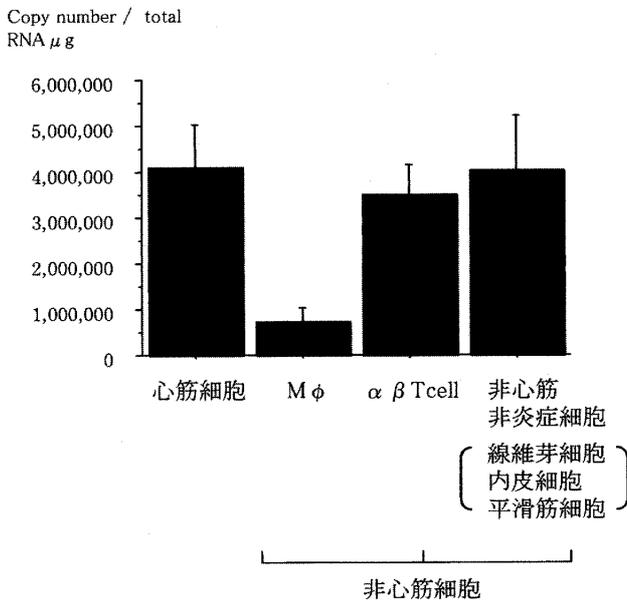


図8 心筋組織での Reg receptor の発現
EAM 第 18 日目の心筋組織中の心筋細胞, マクロファージ, $\alpha\beta$ Tcell, 線維芽細胞や血管内非細胞や平滑筋細胞を含む非心筋非炎症細胞での定量 RT-PCR による Reg receptor の発現量。平均値±標準誤差で示す。

ないが、PAPと同じように急性膵炎において発現が亢進すると言われている¹⁹⁾²⁰⁾。急性膵炎では PAP I の発現は p8 に依存性であるとする報告もある¹⁹⁾。今回の検討で、時間経過を見ると、p8 も第 18 日でピークとなり、正常の約 12 倍の発現がみられている。まだ不明な点も多いが、EAM の心臓でもこれを介して転写が亢進した可能性も考えられる。

PAP I はアイソフォームとして PAP II²¹⁾, PAP III²²⁾ がある。PAP II は PAP I と 74.3% のアミノ酸のホモロジーがあり、PAP III は PAP I と 66% のアミノ酸ホモロジーがあると報告されている。膵炎では同様に発現が亢進すると考えられており、同様な作用が推測されている。今回我々の PAP II, PAP III の DNA マイクロアレイの結果では、2 倍以上の変化する遺伝子としては見いだされなかったものの、定量的 RT-PCR の検討では、明らかに PAP I と同様に発現の亢進が認められた。これら PAP I, PAP II および PAP III の受容体は、まだ詳しくは判明していないものの、Reg 受容体がその一つであるとの報告がある。今

回この受容体の発現細胞を調べたところ、心筋細胞、 $\alpha\beta$ T細胞やマクロファージなどの炎症細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞を含む非心筋非炎症細胞など心筋炎の心臓に存在する細胞に広範に発現が認められた。オートクリン、パラクリンとしてどのように作用するのか、今後詳しく検討される必要がある。また、PAP Iの遺伝子発現の増加の割合は、現在、心不全のマーカーとして用いられているANP、BNPよりもはるかに大きいものであった。今後、心疾患の臨床的に用いられるマーカーとなる可能性もあり²³⁾、そのような点からも検討が望まれる。

謝 辞

御指導、御高閲をいただいた新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野の相澤義房教授に深く感謝します。また本研究の直接の御指導をいただいた新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野の埴晴雄先生に深く感謝します。

参 考 文 献

- 1) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 250-262, 1990.
- 2) Kodama M, Zhang S, Hanawa H and Shibata A: Immunohistochemical characterization of infiltrating mononuclear cells in the rat heart with experimental autoimmune giant cell myocarditis. *Clin Exp Immunol* 90: 330-335, 1992.
- 3) 吉田 剛: 自己免疫性心筋炎における心筋/非心筋細胞の形質変換と浸潤細胞の特徴. *新潟医学会雑誌* 118: 6-16, 2004.
- 4) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci (Lond)* 103: 623-632, 2002.
- 5) Taylor LA, Carthy CM, Yang D, Saad K, Wong D, Schreiner G, Stanton LW and McManus BM: Host gene regulation during coxsackievirus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ Res* 87: 328-334, 2000.
- 6) Barrans JD, Stamatiou D and Liew C: Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 964-969, 2001.
- 7) Blaxall BC, Tschannen-Moran BM, Milano CA and Koch WJ: Differential gene expression and genomic patient stratification following left ventricular assist device support. *J Am Coll Cardiol* 41: 1096-1106, 2003.
- 8) Iovanna J, Orelle B, Keim V and Dagorn JC: Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem* 266: 24664-24669, 1991.
- 9) Keim V, Rohr G, Stockert HG and Haberich FJ: An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion* 29: 242-249, 1984.
- 10) Keim V, Willemer S, Iovanna JL, Adler G and Dagorn JC: Rat pancreatitis-associated protein is expressed in relation to severity of experimental pancreatitis. *Pancreas* 9: 606-612, 1994.
- 11) Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y and Okamoto H: A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem* 263: 2111-2114, 1988.
- 12) Okamoto H: The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6: 254-262, 1999.
- 13) Zhang YW, Ding LS and Lai MD: Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 9: 2635-2641, 2003.
- 14) Graf R, Schiesser M, Lussi A, Went P, Scheele GA and Bimmler D: Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg, PAP I, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 105: 136-144, 2002.

- 15) Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn JC and Iovanna JL: The pancreatitis - associated protein is induced by free radicals in AR4 - 2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology* 114: 808 - 816, 1998.
- 16) Simon MT, Pauloin A, Normand G, Lieu HT, Mouly H, Pivert G, Carnot F, Tralhao JG, Brechot C and Christa L: HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and antiapoptotic functions through the PKA signaling pathway. *Faseb J* 17: 1441 - 1450, 2003.
- 17) Dusetti NJ, Frigerio JM, Keim V, Dagorn JC and Iovanna JL: Structural organization of the gene encoding the rat pancreatitis - associated protein. Analysis of its evolutionary history reveals an ancient divergence from the other carbohydrate - recognition domain - containing genes. *J Biol Chem* 268: 14470 - 14475, 1993.
- 18) Dusetti NJ, Ortiz EM, Mallo GV, Dagorn JC and Iovanna JL: Pancreatitis - associated protein I (PAP I), an acute phase protein induced by cytokines. Identification of two functional interleukin - 6 response elements in the rat PAP I promoter region. *J Biol Chem* 270: 22417 - 22421, 1995.
- 19) Vasseur S, Folch - Puy E, Hlouschek V, Garcia S, Fiedler F, Lerch MM, Dagorn JC, Closa D and Iovanna JL: p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti - inflammatory protein pancreatitis - associated protein I. *J Biol Chem* 279: 7199 - 7207, 2003.
- 20) Mallo GV, Fiedler F, Calvo EL, Ortiz EM, Vasseur S, Keim V, Morisset J and Iovanna JL: Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem* 272: 32360 - 32369, 1997.
- 21) Frigerio JM, Dusetti NJ, Keim V, Dagorn JC and Iovanna JL: Identification of a second rat pancreatitis - associated protein. Messenger RNA cloning, gene structure, and expression during acute pancreatitis. *Biochemistry* 32: 9236 - 9241, 1993.
- 22) Frigerio JM, Dusetti NJ, Garrido P, Dagorn JC and Iovanna JL: The pancreatitis associated protein III (PAP III), a new member of the PAP gene family. *Biochim Biophys Acta* 1216: 329 - 331, 1993.
- 23) Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC and Iovanna JL: Human pancreatitis - associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 90: 2284 - 2291, 1992.

(平成 17 年 1 月 20 日受付)