原　　著

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

吉　田　　剛

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）

Characteristics of Cardiac Myocyte/Non-myocyte Transformation and Infiltrating Cells in Experimental Autoimmune Myocarditis

Tsuyoshi YOSHIDA

Division of Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(*Professor Yoshifusa AIZAWA*)

要　旨

心筋炎の後，心臓リモデリングが進行すると拡張型心筋症様慢性心不全状態となる．心筋炎における心臓リモデリングでは物理的負荷のほかに，炎症性浸潤細胞やサイトカインなども成因にかかわっていると考えられるがその詳細は明らかになっていない．そこで我々は心臓から心室筋細胞（心筋細胞），浸潤細胞（T細胞，マクロファージ），非心筋非炎症性細胞を分離する方法を確立し，ラット実験的自己免疫性心筋炎（EAM）における各細胞群の遺伝子発現の特徴について検討を行った．正常ラット，急性期および慢性期EAMラットの各心臓にLangendorff還流装置でコラゲナーゼを還流し細胞の単離を行い，次いでステンレススチール製の篩を使い心筋細胞を分離した．残りの非心筋細胞群をビーズ抗体・マグネット細胞分離装置を用いてさらにT細胞，マクロファージ，非心筋非炎症細胞へ分離した．各検体よりRNAを抽出した後，定量的RT-PCRを行い心筋炎の病態形成に関わると思われる蛋白の発現を遺伝子レベルで検討した．急性期EAMでは心筋細胞の収縮，弛緩をつかさどるカルシウムハンドリング関連蛋白リアノジン受容体，球状筋小胞体Ca-ATPase，カルセクエストリンの減少がみられた．心臓リモデリングに関与しているアンジオテンシン－アルドステロン系についてはアルドステロン受容体が心筋細胞で強く発現し，アンジオテンシン変換酵素，アンジオテンシンⅡtype 1受容体は非心筋非炎症性細胞で主に発現していた．また心筋炎の急性期にはアルドステロン合成酵素

Reprint requests to: Tsuyoshi YOSHIDA
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1-757
新潟大学医学部第一内科学教室　　吉田　剛

が非心筋非炎症性細胞，マクロファージで僅かに発現していた．サイトカイン，ケモカインの発現においてはIL-10やMCP-1が非炎症性非心筋細胞より発現しており，おそらく線維芽細胞からの発現によるものと考えた．またEAMの初期にみられるオステオポンチンはマクロファージ，非心筋非炎症性細胞から分泌され，その受容体の1つCD44を持つT細胞及びマクロファージ自身に対し細胞の活性化を促進させていると考えられた．また接着因子としての作用を併せ持つケモカイン，フラクタルカインも心筋細胞から強い発現が認められた．これは，外界からの異物に対する免疫機構を心筋細胞自身が備えている可能性が推測された．心筋細胞と非心筋非炎症性細胞は，互いに密接に関わりながら病変を形成するだけでなく，免疫担当細胞とも密接にクロストークしながら，心筋炎の病態形成に関与するものと考えられた．

キーワード：実験的自己免疫性心筋炎，心臓細胞分離，カルシウムハンドリング関連蛋白，アンジオテンシン-アルドステロン系，サイトカイン

はじめに

心筋梗塞などによって心筋細胞が脱落すると，機械的負荷や神経体液因子，細胞増殖因子の作用で残存する心臓構成細胞（心筋細胞，繊維芽細胞，血管内皮細胞，平滑筋細胞など）に形質変換がおこり，組織構築が変化して心臓リモデリングが進行する．心筋炎ではこれらの因子に加えて，多彩な炎症性浸潤細胞と数多くのサイトカインが心臓リモデリングの形成にかかわっている．しかしin vivoにおいて各々の細胞がどの様な遺伝子を発現し他細胞と影響し合い，病態を形成しているかは現在十分検討されていない．今回我々は実験的自己免疫性心筋炎（EAM）ラットの心臓でこれらの細胞がどのように関わっているのかを検討するため心臓を構成する各細胞を分離した後，定量的RT-PCR法を用いて様々な化学物質の遺伝子発現について解析した．

方　法

EAMの作成

既報のごとく精製したブタ心筋ミオシンと同量の完全フロイントアジュバント（含結核死菌11mg/ml）を混和したものを生後8週齢ルイスラットの両足底へ各100μlずつ皮下注射し，EAMを作成した[1]．ミオシン感作後第18病日目を急性期EAMラット，3ヶ月以上経過したものを慢性期EAMラットとした．

Langendorff還流装置を用いたラット心室構成細胞の単離法

ラットをエーテル麻酔し心臓の摘出を行った後Langendorff還流装置を用いて38℃の条件下，大動脈より経冠動脈的に1.8mM $CaCl_2$含有Tyload（140mM NaCl，0.33mM NaH_2PO_4，5.4mM KCl，0.5mM $MgCl_2$，5mM HEPES，pH 7.4 with NaOH）を還流し血管内細胞成分の洗い出しを行った．引き続き同装置でCollagenase 400mg/l含有，$CaCl_2$非含有Tyload液を心室筋が軟化するまで還流した後，摘出した両心室をKB液（70mM glutamic acid，25mM KCl，11mM glucose，10mM taurine，10mM KH_2PO_4，10mM HEPES，0.5mM EGTA，pH 7.3 with KOH）内で掻破し心室構成細胞の単離を行った．単離後の細胞はKB液に浮遊させ，以降は氷上あるいは4℃の条件下で取り扱った．

心臓単離細胞の分離

単離した心室構成細胞を目開き38μmのステンレス製篩を用いて心室筋細胞（心筋細胞）のみを捕捉・分離した．急性期EAM心室細胞においては38μm篩を通過させた細胞浮遊液をさらに20μm篩に通し完全に心筋細胞を除去し，浮遊液に含まれた細胞を非心筋細胞とした．非心筋細胞からフローサイトメトリー法によってEAM浸潤細胞の分画を検討した．次いで非心筋細胞にPE標識抗ラット$\alpha\beta$T細胞受容体抗体（BD PharMingen，SanDiego，USA）を反応させた後，二次抗体抗PEマイクロビーズ抗体（Miltenyi Biotec Gmbh，Germany）を結合させ磁気細胞分

表1 使用プライマー

Gene	Sense primer	Antisense primer
Desmin	5'-gaggaaatccaactgagagaaga-3'	5'-agtctgaaaccttggacttgtacc-3'
CD3ζ	5'-gatcccaaactctgctatatgcta-3'	5'-ctttcatgccaatctcactgtag-3'
iNOS	5'-tcacctacttcctggacatcacta-3'	5'-agggaggagctgatggagtagtag-3'
Collagen type 3	5'-cgcaattgcagagacctgaa-3'	5'-acagtcatgggactggcatttat-3'
Calponin 1	5'-aacataggaaatttcatcaaagcc-3'	5'-gtagactgatagttgcctgatcca-3'
von Willebrand factor	5'-agaggctacacatctctcagaagc-3'	5'-gaccttcttcttcttgaaaccttg-3'
α cardiac myosin	5'-acaaggttaaaaacctgacagagg-3'	5'-tactgttctgctgactgatgtcaa-3'
β cardiac myosin	5'-cactccagaagagaagaactccat-3'	5'-ccagttgaacatcttctcgtacac-3'
Ryanodine receptor	5'-ggaaagtgaccttctttcagacat-3'	5'-aggctatgattttcttccagaatg-3'
SERCA	5'-ggatcagaggtgccatctactact-3'	5'-aagcagagtcattacacagagcac-3'
Calsequestrin	5'-tgaagtgaatgaagttggcttcta-3'	5'-agtaagcaacaagcagaggaaagt-3'
ACE	5'-caactggcattataacaccaacat-3'	5'-ttatatttgtcagatcaggctcca-3'
AT1 receptor	5'-ttggaaagctctaaagaaggctta-3'	5'-tatttcaggagctggaggaaatac-3'
AT2 receptor	5'-aaagtgtttggttcttttctgacc-3'	5'-atatttttcattaaggcaatccca-3'
Aldosterone synthetase	5'-agaatcctaaactcagacctggtg-3'	5'-cacatcctcttgtctcagtgtctc-3'
Aldosterone receptor	5'-ttcttggatgtgtctatcatcgtt-3'	5'-tgtaatttgtcctcatctcctcaa-3'
IL-10	5'-actgctatgttgcctgctcttact-3'	5'-gaattcaaatgctccttgatttct-3'
IL-10 receptor	5'-tgacagtgacctagtccagaactc-3'	5'-ttgattccactgtctacttggtgt-3'
IL-2	5'-ctgagagggatcgataattacaaga-3'	5'-attggcactcaaatttgttttcag-3'
MCP-1	5'-ctgtctcagccagatgcagttaat-3'	5'-tatgggtcaagttcacattcaaag-3'
PD-1	5'-cagcaaccagactgaaaaacag-3'	5'-acaatgaccaagccttgaaact-3'
PD-1 ligand	5'-gcagattcccagtagaacagaaat-3'	5'-acattagttcatgctcagaagtgg-3'
IFN-γ	5'-atctggaggaactggcaaaaggacg-3'	5'-ccttaggctagattctggtgacagc-3'
IFN-γ receptor	5'-aagagtttattatgtgccgaaagg-3'	5'-tgtattaacttgccagaaagacga-3'
TNF-α	5'-atgggctccctctcatcagt-3'	5'-actccagctgctcctctgct-3'
Osteopontin	5'-aacggatgactttaagcaagaaac-3'	5'-tactgttcatcagaaacagggaaa-3'
CD44	5'-actacttcactggaaggctacacc-3'	5'-aagatgataagccactctggaatc-3'
Fraktalkine	5'-ctcgccaatcccagtgaccttgctc-3'	5'-gattggtagacagcagaactcggccaaatg-3'
CX3CR1	5'-agctgctcaggacctcaccat-3'	5'-gttgtggaggccctcatggctgat-3'

離カラム（Miltenyi Biotec Gmbh）を通し，αβT細胞の分離を行った．同様にαβT細胞分離後の非心筋細胞へPE標識抗ラットCD11bc抗体（BD PharMingen），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マクロファージを分離した．最後に残った細胞を非T細胞・マクロファージ非心筋細胞（非心筋非炎症性細胞）とした．

RNAの抽出およびcDNAの合成

各病期の心筋細胞（正常心筋細胞 n = 3，急性期EAM心筋細胞 n = 4，慢性期EAM心筋細胞 n = 3），αβT細胞（n = 3），マクロファージ（n = 3）非心筋非炎症性細胞（n = 3）のRNAをTrizol（LifeTecnologies，Tokyo，Japan）を使い抽出した．そして2.5～5.0μg RNA，random primers，Moloney-murin-leukemia virus reverse transcriptaseから全20μlとして各cDNAを合成した．

定量的RT-PCRスタンダードサンプルプラスミドの作成

心筋炎ラット心筋より得られたcDNAをAmpliTaq polymerase（TOYOBO，Osaka，Japan）を使い**表1**に示す．各primerについて94℃ 60秒，58℃ 90秒，73℃ 120秒を計35サイクルで増幅しpGEM-T vectorへ組込んだ．さらにMagExtractor plasmid Kit（TOYOBO）を使い*Echerichia Coli* JM109 competent cellsへ導入し，導入細胞を増殖した後plasmidを再抽出し，シリコンチューブ壁面への付着を防ぐため10ng/μg MA2 RNA（Roche，Indianapolis，IN，U.S.A）含有DNase-free waterに希釈保存した．なお心臓単離細胞の分離，RNA抽出過程に個体サンプル

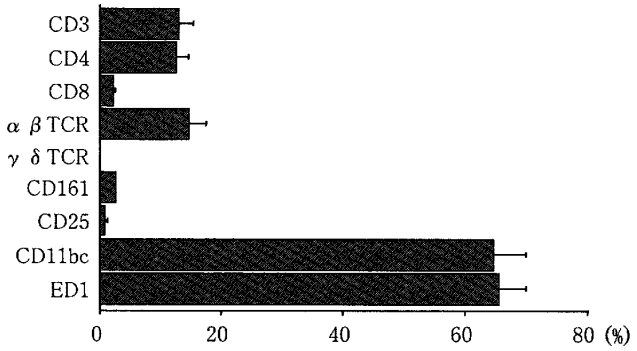


図1　急性期EAM浸潤細胞の分画
EAM浸潤細胞の分画を検討した．Macrophageが65％，T細胞は14％，NK細胞は全体の2％未満であった．T細胞のキャラクターについてはCD4陽性CD8陰性αβT細胞がほぼ全体を占めていた．(n=5，平均±標準偏差)

間でmRNAの断片化の影響を受ける可能性があることから，我々はcDNA合成時にrandom primerを用い，すべての遺伝子について約250から350bpの範囲でPCR定量ができるようprimerを設型した．

定量的RT－PCR

各サンプルcDNAを10ng/μg MA2 RNA含有DNase－free waterに100倍希釈し5μgを定量的RT－PCRに使用した．勾配希釈したstandard plasmidとサンプルcDNAはplasmidの作成時に使用したprimerとLightCycler－FastStart DNA Master SYBR Green Ⅰ（Roche）と共に増幅した．また同時に逆転写前のRNAをnegative controlとした95℃10分で熱変性を加えた後three－step cycle法（熱変性95℃0秒，アニーリング62℃10秒，伸張反応72℃13秒）を計40サイクル施行した．各standard plasmidの発光シグナルが指数関数的に増幅するサイクル数をLightCycler softwareにより算出しstandard曲線を描出した．各サンプルの絶対コピー数はstandard曲線からLightCycler softwareで算出した．

mRNA絶対コピー数の補正値算出法

各個体間においてmRNA断片化の影響を考慮し，γ-アクチンで補正した．またγ-アクチンは各細胞群で差がみられたことから以下のような式でmRNAの絶対量補正値を算出した．

目的mRNA絶対コピー数の補正値（コピー数/総RNA 1μg）＝

$$\frac{\text{各個体の目的mRNA絶対コピー数}}{\text{各個体のγアクチンmRNA絶対コピー数}} \times \text{各細胞群のγアクチンmRNA絶対コピー数の平均値}$$

結　　果

急性期EAM浸潤細胞（図1）

EAM浸潤炎症細胞分画は，マクロファージが65%，T細胞は14％，NK細胞は全体の2％未満であった．T細胞のキャラクターについてはCD4陽性CD8陰性のαβT細胞がほぼ全体を占めていた．

急性期EAM心室分離細胞における特異的細胞遺伝子発現の検討（図2）

分離細胞の特徴を遺伝子発現レベルで検討するため，それぞれの細胞に特異的なDesmin（心筋細胞），CD3ζ（T細胞），CD11b（マクロファージ），Collagen type 3（線維芽細胞），calponin 1（心筋細胞あるいは平滑筋細胞），von Willebrand factor（内皮細胞）のRNA発現量を測定した．**図2**に示すように各群で特異的遺伝子の発現が高値を示し，非心筋非炎症性細胞は線維芽細胞，内皮細胞，平滑筋細胞などから構成されていると考えられた．

心筋収縮蛋白およびカルシウムハンドリングに関わる蛋白の遺伝子発現の変化（表2）

α型ミオシン重鎖RNAの発現量は正常ラット心筋細胞で優位に高く（vs. acute EAM $p < 0.0001$，vs. chronic EAM $p = 0.0131$），急性期に最も低値であった．一方β型ミオシン重鎖は正常ラット心筋細胞において有意に低値であり（vs. acute EAM $p = 0.0006$，vs. chronic EAM $p = 0.0027$）急性期EAM心筋細胞で最も高値であった．

リアノジン受容体（RyR），球状筋小胞体Ca－ATPase（SERCA）は正常心筋細胞と比較して急

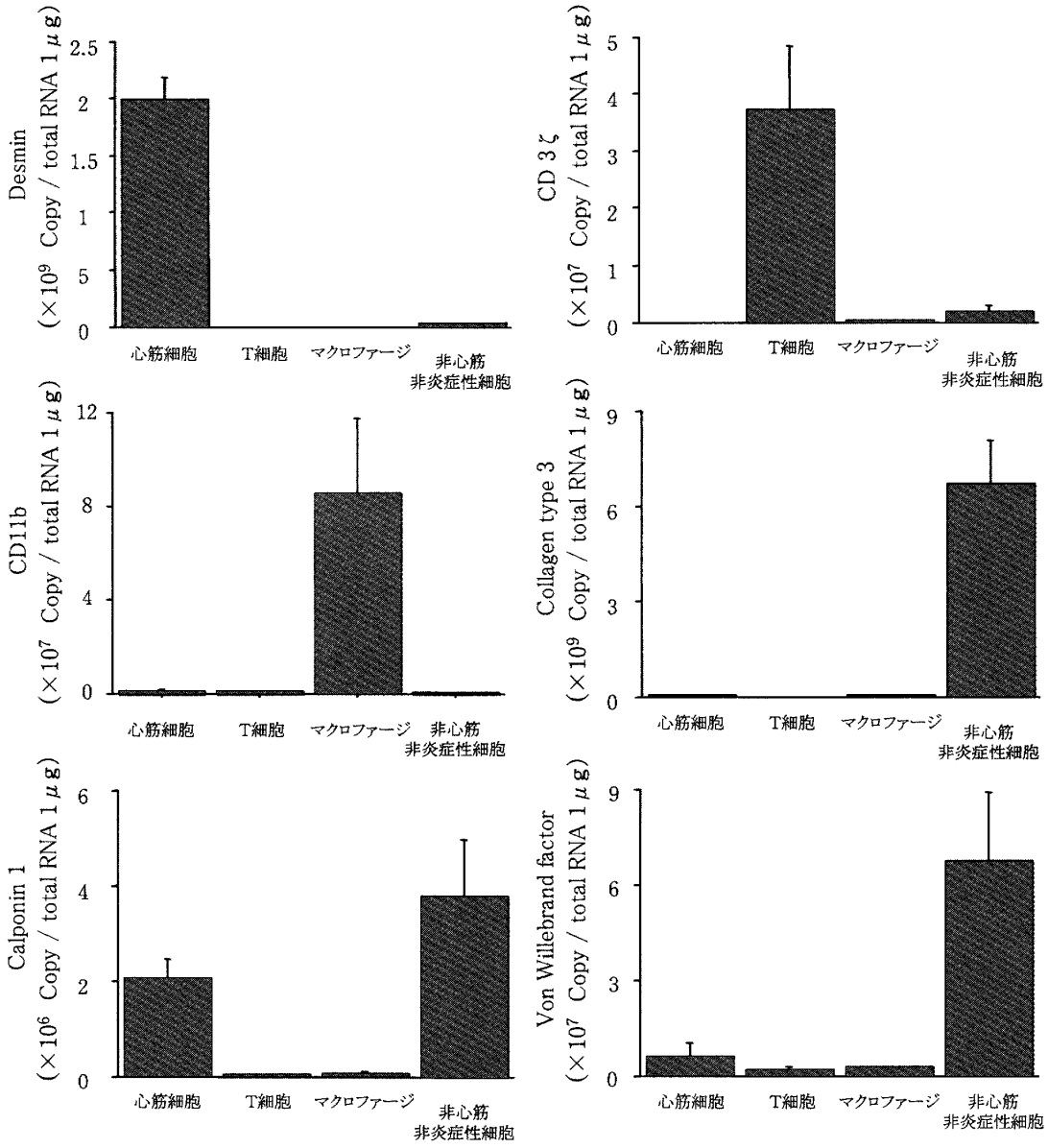


図2　急性期EAM心臓分離細胞における特異的細胞遺伝子の発現
Desmin（心筋細胞），CD3 ζ（T細胞），CD11bc（マクロファージ），Collagen type 3（繊維芽細胞），calponin 1（心筋細胞あるいは平滑筋細胞），von Willebrand factor（内皮細胞）のRNA発現量を定量的PCR法を行い測定した．各群で特異的に高値を示し，非心筋非炎症性細胞は繊維芽細胞，内皮細胞，平滑筋細胞などから構成されていると考えられた．（平均±標準誤差）

性期EAM心筋細胞では約1/3にまで減少し，慢性期EAM心筋細胞では増加傾向を認めた．カルセクエストリンの発現量も正常心筋細胞と比較して急性期EAM心筋細胞では約半分にまで減少し慢性期EAM心筋細胞には正常心筋細胞とほぼ同レベルにまで回復していた．

アンジオテンシン－アルドステロン系の遺伝子発現（表2，表3）

心筋炎急性期で，アンジオテンシン変換酵素（ACE）発現は非心筋非炎症性細胞で最も高く，

表 2　正常心筋細胞及び急性期，慢性期 EAM 心筋細胞の遺伝子発現

遺伝子	正常心筋細胞	急性期EAM心筋細胞	慢性期EAM心筋細胞
Desmin	440,000±36,500	1,990,000±198,000 (4.52±0.45)	473,000±92,200 (1.08±0.21)
α cardiac myosin	23,300,000±817,000	2,240,000±628,000 (0.096±0.027)	14,700,000±1,850,000 (0.63±0.08)
β cardiac myosin	2,61,000±6,679,000	27,300,000±2,720,000 (10.5±1.0)	24,700,000±3,270,000 (9.47±1.26)
Ryanodin receptor	1,920,000±499,000	718,000±105,000 (0.37±0.05)	1,390,000±83,900 (0.72±0.04)
SERCA	1,460,000±157,000	481,000±95,300 (0.33±0.06)	1,180,000±57,700 (0.81±0.04)
Carcequestrin	243,000±42,600	124,000±7,950 (0.51±0.03)	339,000±34,400 (1.40±0.14)
ACE	1,610±798	7,210±2,890 (4.47±1.79)	3,430±3,090 (2.12±1.92)
Aldosterone receptor	2,160±116	1,480±304 (0.68±0.14)	2,000±115 (0.92±0.05)
IFN-γ receptor	8,740±1,910	5,650±1,290 (0.65±0.15)	5,950±1,950 (0.68±0.22)
TNF-α receptor	1,400±413	7,930±1,420 (5.67±1.02)	2,130±1,080 (1.52±0.77)
Fractalkine	8,620±1,790	18,300±2,210 (2.13±0.26)	12,700±1,840 (1.47±0.21)

コピー数の平均値±標準誤差　単位：$\times 10^3$ Copy / total RNA 1 μg　（ ）内は正常心筋細胞の平均値と各検体との比の平均値±標準誤差

また心筋細胞でも極少量みられた．そして心筋細胞の ACE 発現は正常心筋に比べ急性期心筋炎で約 4 倍上昇していた．AT1 受容体はほとんどが非心筋非炎症性細胞で発現していた．AT2 受容体は T 細胞，マクロファージ，非心筋非炎症性細胞の何れにも発現がみとめたが AT1 受容体発現量に比しその発現量はきわめて少ないものであった．アルドステロン合成酵素は非心筋非炎症性細胞で発現がみられ，マクロファージにも少量の発現が認められた．アルドステロン受容体の発現は心筋細胞で高く，非心筋非炎症性細胞にも認められた．各病期の心筋細胞でアルドステロン受容体発現量を比較したが，各々に有意な変化は認めなかった．

サイトカインの発現（表 2，表 3）

IL-10 は主に非心筋非炎症性細胞に高い発現がみられ，その受容体はマクロファージ，ついで T 細胞の順に強く発現されていた．IL-2 は T 細胞から，MCP-1 は主に非心筋非炎症性細胞から発現され，わずかにマクロファージからも発現がみられた．PD-1 は T 細胞が発現し，そのリガンドは主にマクロファージが持っていた．INFγ は T 細胞から発現が認められ，その受容体は T 細胞，マクロファージ，非心筋非炎症性細胞に強い発現を認めたほか，心筋細胞での発現も確認された．TNFα は急性期 EAM においてマクロファージから発現が多く認められ，その受容体は非心筋非炎症性細胞，次いでマクロファージに多くみられたが，心筋細胞にも少量認められた．オステオポンチンは急性期 EAM においてマクロファージ，非心筋非炎症性細胞に強い発現を認め，一方その受容体の 1 つである CD44 については T 細胞，マクロファージ，非心筋非炎症性細胞の順に強い発現を認めた．フラクタルカインは非心筋非炎症性細胞，また心筋細胞からも高い発現が認められ，その受容体である CX3CR1 はマクロファージ，T 細胞が高い発現を示した．

考　　察

細胞分離

今回 Langendorff 潅流装置を使い経冠動脈的に

表3　急性期EAM各分離細胞の遺伝子発現

遺伝子	心筋細胞	T細胞	マクロファージ	非心筋非炎症性細胞
Desmin	1,990,000,000±198,000,000	997,000±224,000	2,480,000±437,000	27,900,000±3,260,000
CD3ζ	102,000±20,900	37,200,000±11,300,000	201,000±13,500	1,950,000±835,000
CD11bc	1,270,000±479,000	1,260,000±270,000	85,500,000±31,800,000	385,000±174,000
Collagen type 3	30,600,000±4,470,000	13,700,000±3,650,000	33,400,000±9,490,000	6,700,000,000±1,350,000,000
Calponin 1	2,060,000±392,000	26,000	60,000±33,000	3,780,000±1,180,000
von Willebrand factor	6,060,000±4,200,000	2,050,000±566,000	2,700,000	67,500,000±21,500,000
ACE	7,210,000±2.880,000	N. D.	4,500,000	70,300,000±14,200,000
AT1 receptor	2,650,000±1,850,000	3,080,000	2,490,000	284,000,000±40,900,000
AT2 receptor	9,810	329,000±238,000	374,000±103,000	296,000±123,000
Aldosterone synthetase	N. D.	N. D.	45,000±13,900	138,000±16,400
Aldosterone receptor	1,480,000±304,000	N. D.	29,000±13,900	445,000±125,000
IL-10	14,400±1,560	266,000±89,900	101,000±1,680	3,450,000±1,250,000
IL-10 receptor	683,000±160,000	8,150,000±2,580,000	22,400,000±5,380,000	2,430,000±849,000
IL-2	5,960	442,000±130,000	N. D.	5,720
MCP-1	1,360,000	654,000±113,000	13,100,000±6,810,000	134,000,000±18,600,000
PD-1	37,600±7,570	20,700,000±7,000,000	221,000	100,000±14,500
PD-1 ligand	337,000±109,000	6,200,000±2,130,000	43,200,000±10,900,000	3,360,000±257,000
IFN-γ	N. D.	6,200,000±1,030,000	N. D.	N. D.
IFN-γ receptor	5,650,000±1,290,000	32,300,000±3,400,000	40,600,000±3,950,000	34,300,000±3,280,000
TNF-α	667,000±166,000	2,980,000±420,000	50,600,000±21,300,000	1,850,000±141,000
TNF-α receptor	7,930,000±1,420,000	2,910,000±217,000	36,300,000±2,250,000	66,800,000±12,100,000
Osteopontin	9,190,000±3,370,000	1,770,000±703,000	125,000,000±76,200,000	56,000,000±22,900,000
CD44	15,900,000±1,430,000	152,000,000±49,9000,000	109,000,000±25,200,000	36,100,000±966,000
Fraktalkine	18,300,000±2,210,000	557,000±251,000	974,000±241,000	30,400,000±3,230,000
CX3CR1	1,280,000±209,000	8,450,000±1,720,000	11,400,000±2,260,000	836,000±185,000

コピー数の平均値±標準誤差　単位：Copy / total RNA 1 μg　N. D., not determined

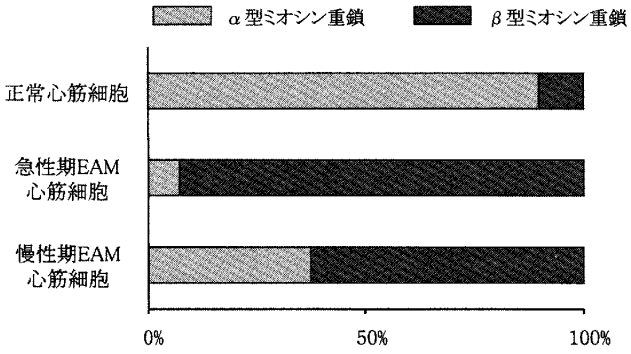


図3　ミオシン重鎖分画の変化
α型ミオシン重鎖は正常心筋細胞で優位であるが，急性期，慢性期EAM心筋細胞ではβ型ミオシン重鎖が優位となる．

collagenaseを心臓組織内へ潅流し心臓構成細胞を単離した．さらにステンレススチール製篩を用いて心筋細胞/非心筋細胞とに分離した．我々が行ったフローサイトメトリーを用いたEAM炎症性浸潤細胞の検討は組織免疫染色法での浸潤細胞のこれまでの検討とほぼ同様な結果が得られた[2]．さらにEAM非心筋細胞をビーズ抗体細胞分離システムを用いて分離したT細胞，マクロファージの純度は高く（92.3％，95.7％），非心筋非炎症性細胞へのT細胞・マクロファージの混入も非常に低値であった（2.7％）．心筋細胞，T細胞，マクロファージのマーカーとしてdesmin，CD3ζ，CD11bcの発現量を各細胞群で測定した．その結果何れの細胞群も特異的な遺伝子を強く発現しており，細胞分離の精度は高いものと思われた．

各病期におけるEAMミオシン重鎖分画の変化

ミオシン重鎖の表現型は胎仔期にはβ型が優勢であるが新生仔期までにα型とβ型の比が逆転し，成獣期にはα型が優勢となる．単離心筋細胞から定量的RT-PCR法でミオシン重鎖の表現型を検討したところ正常ラット心筋細胞ではα型が優勢であったが急性期EAMではα型，β型の表現型は劇的な変化をみせ，その比はほぼ逆転した．慢性期EAMには比率の回復はみられるものの依然β型優勢であった（**図3**）．これは細胞単離をしていないラット心室細胞でのミオシン重鎖表現型の検討とほぼ同様の結果であった[3]．以上よりコラゲナーゼ処理や篩を用いた心室単離・細胞分離行程を経てもRNA発現レベルではなんら細胞に影響を及ぼしていないと考えられた．

カルシウムハンドリング関連蛋白の発現

臨床的に劇症型心筋炎の急性期は心機能が著しく低下し，大動脈内バルーンパンピングや経皮的心肺補助装置などの心肺補助循環法を必要とし，急性期を脱するとこれら補助循環装置から離脱でき多くは正常心機能へ回復する．急性期心筋炎の心筋細胞ではどの様な遺伝子が発現し，可逆的な収縮能の低下がもたらされているのかは明らかではない．一方細胞レベルでは心筋細胞の収縮/弛緩の制御は主にカルシウムハンドリングが中心的役割を果たしている．収縮期には心筋細胞膜電位の上昇によりL型Caチャネルから流入した少量のカルシウムがセカンドメッセンジャーとして働き，球状筋小胞体（SR）内カルシウムがRyRから放出され細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらす．拡張期はSERCAが細胞内カルシウムをSRに取り込み細胞内カルシウム濃度を低下させ，カルセクエストリンはSERCAによって取り込まれたカルシウムをSR内に貯蔵する機能を有する．我々は単離心筋細胞を使って各病期におけるカルシウムハンドリング関連蛋白RyR，SERCA，カルセクエストリンについて検討した．RyR，SERCA，カルセクエストリンはいずれも急性期EAMにおいて低下していた．RyRの減少は収縮期細胞内カルシウム濃度の上昇を押さえ心筋収縮能の低下をもたらす．一方SERCA，カルセクエストリンの減少は拡張期SRのカルシウム取り込みとSR内のカルシウム保持能を低下させ拡張期細胞内カルシウム過負荷を生じ細胞弛緩能の低下と細胞障害作用をもたらすと考えられる．またカルシウム貯蔵能が低下することより収縮期のSRからのカルシウム放出も制限されると考えられる．これら急性期EAM心筋細胞にみられる遺伝子発現の変化が急性心筋炎の極期に一過性に心機能低下をもたらす原因であると推測する．今後これら分子的機序のさらなる解明により急性心筋炎治療の治療戦略の拡大が期待される．

アンジオテンシンーアルドステロン系の発現

近年体循環系レニンーアンジオテンシンーアルドステロン（RAA）系のほかに心血管，腎，脳など局所臓器に組織RAA系が存在し，圧負荷あるいは梗塞心などでは心筋細胞肥大や組織線維化といった心臓のリモデリングへの関与が言われている[4]．ACE阻害剤を内服している重症心不全患者にアルドステロン受容体拮抗薬スピロノラクトンを追加したところ総死亡率がスピロノラクトン併用で約30％改善したという報告は，組織アルドステロンの心不全における影響として注目を集めている[5]．さらにアルドステロンは心筋の線維化を促進する因子としても注目されている[6]．我々の研究ではアルドステロン受容体発現は心筋細胞および非心筋非炎症性細胞で認められたが，その発現量は心筋細胞で有意に高値であった．したがって急性期EAM心臓組織でアルドステロンは心筋細胞を直接刺激して，何らかの影響を与えていると思われた．Harada E.らは心筋細胞と非心筋細胞の混在した心臓培養細胞で，アルドステロンがACE mRNA発現を増幅させR-A-A系にポジティブフィードバックを与えていると報告した[7]．我々も分離心筋細胞からACE mRNAの発現を認め，さらに極期でその発現が上昇している結果を得ている．しかしACE mRNAの発現の主体は非心筋非炎症性細胞にあり，心筋細胞と非心筋非炎症性細胞の間に何らかのクロストークが存在していることが推測される．さらにACEがアンジオテンシンⅠをアンジオテンシンⅡへ変換し非心筋非炎症性細胞（おそらくは線維芽細胞と考えるが）の持つAT1受容体を介して心臓に線維化をもたらす可能性があるのではないかと考えている．Mizuno Y.らは，アルドステロンの合成が，不全心で産生されていると報告しているが[8]，我々の検討では，非心筋非炎症性細胞が主に産生していると考えられた．

サイトカインの発現

一般にIL-10は2型ヘルパーT細胞（Th2）から分泌され，IL-4，IL-5，IL-6と共にTH2サイトカインの一種で液性免疫促進作用と細胞性免疫を促進させる1型ヘルパーT細胞（Th1）の抑制作用を持つ[9]．Watanabe K.らは細胞性免疫反応が病態の中心をなすEAMにおいて，遺伝子導入によりIL-10を過剰発現させ心筋炎の進行を効果的に抑制したと報告しており[10]，IL-10はEAMの発症から治癒過程において重要なサイトカインの1つといえる．当初我々は急性期EAM心臓組織におけるIL-10産生細胞はTh2，つまりT細胞と考えていたが[11]，今回の研究ではIL-10の分泌は非心筋非炎症性細胞が担っていることが判った．近年慢性リウマチ患者の線維芽細胞型の滑膜細胞がIL-10を産生しているとの報告もあり[12][13]，EAM心においても線維芽細胞がIL-10を分泌している可能性があると思われる．またMCP-1はマクロファージを遊走促進させるケモカインであるが，これを最も産生する細胞は非心筋非炎症性細胞であった.これも非心筋非炎症性細胞がマクロファージに対して，重要な役割を持っていることが推測される．

T細胞を初期に活性化させるサイトカインの一種と考えられているオステオポンチンも，EAMの発症初期に急激に上昇すると報告されているが[3]，その産生細胞はマクロファージあるいは非心筋非炎症性細胞が主なものであった．オステオポンチン受容体を持つT細胞の活性化にマクロファージや非心筋非炎症性細胞が関与している可能性が推測された．

心筋細胞と免疫細胞がどの様に関わるのかはまだ十分に理解されていないが，今回の結果から互いがかなり直接的な作用を及ぼし合っている可能性があることが示唆された．つまり，細胞表面に膜蛋白として存在し，ケモカインと細胞接着分子の性質を併せ持つフラクタルカインが，心筋細胞で高い発現が認められ，その受容体を持っているマクロファージやT細胞に何らかの影響を与えている可能性が考えられる．近年，脳においても神経細胞自体がフラクタルカインを持っていることが明らかにされている[14][15]．心筋細胞も同様に外界からの病原体の攻撃から，免疫細胞を誘導，防御している可能性が推測される．一方これまで心筋細胞がTNFα受容体を発現しているということは過去に報告されてきたが[16]，今回の研究

ではINFγ受容体も心筋細胞から発現されていると思われた．このことより心筋細胞は免疫細胞から何らかの直接的な影響を受けている可能性が推測される．

このように心筋細胞では，急性心筋炎によって，心機能に影響を及ぼす様々な遺伝子発現が変化している．急性期には，心筋細胞が炎症細胞，非炎症細胞と密接に関わり合いながら，単に受動的に影響を受けているだけではなく，それらの細胞に，何らかの指示を与えている可能性が強く考えられた．また非心筋非炎症性細胞も炎症細胞から影響を受けているだけではなく，炎症細胞に様々な指示を与えていることが強く示唆された．

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) 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 103: 623-632 2002.

4) Re RN: The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. Curr Opin Cardiol 16: 317-327 2001.

5) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 341: 709-717 1999.

6) Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A and Pitt B: Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. Circulation 102: 2700-2706 2000.

7) Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, Nakamura S, Kuwahara K, Saito Y, Nakao K and Ogawa H: Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. Circulation 104: 137-139 2001.

8) Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K, Harada E, Nakayama M, Nakamura S, Ito T, Shimasaki Y, Saito Y and Nakao K: Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. Circulation 103: 72-77 2001.

9) Fiorentino DF, Bond MW and Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. Ⅳ. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 170: 2081-2095 1989.

10) Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H and Miyazaki J: Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. Circulation 104: 1098-1100 2001.

11) Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S and Abo T: Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol 29: 491-502 1997.

12) Hirth A, Skapenko A, Kinne RW, Emmrich F, Schulze-Koops H and Sack U: Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Res 4: 117-125 2002.

13) Cho ML, Kim WU, Min SY, Min DJ, Min JK, Lee SH, Park SH, Cho CS and Kim HY: Cyclosporine differentially regulates interleukin-10, interleukin-15, and tumor necrosis factor a production by rheumatoid synoviocytes. Arthritis Rheum 46: 42-51 2002.

14) Hatori K, Nagai A, Heisel R, Ryu JK and Kim SU: Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. J Neurosci Res 69: 418-426 2002.

15) Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C and Taupin V: Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. Glia 29: 305-315 2000.

16) Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R and Mann DL: Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. Circulation 92: 1487-1493 1995.

（平成15年2月4日受付）