
原 著

ラット心臓在住細胞に対するフリーのヘムによる 炎症促進蛋白発現の誘導

羽 尾 和 久

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)

Induction of Expression of Proinflammatory Protein by Free Heme in Rat Cardiac Resident Cells

Kazuhiha HAO

Division of Cardiology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

組織傷害によって放出される内因性物質は、いわゆる”デンジャーシグナル”として炎症を引き起こすことが知られるようになり、近年、その種類や炎症発症機序が少しずつ明らかになってきた。一方、最近我々は、DNA microarray の網羅的解析から、心筋炎組織中に、鉄の運搬や代謝に関連する蛋白発現が急激に上昇することを見いだした。これらのことから、我々は、何らかの鉄含有物質が、内因性リガンドとして、心臓の炎症を増強させるのではないかとの仮説を立てた。そこで今回、生体に広範囲に分布し、特に心臓中にも多く存在する鉄含有物質であるヘムが、心臓在住細胞に対して、どのような影響を及ぼすかを検討した。

正常ラット心臓からコラゲナーゼ処理後分離した細胞を2-3週間培養し、フリーのヘム（ヘミン）を添加し、細胞内活性酸素種（ROS）および炎症促進蛋白の発現を測定した。また、その培養細胞の特徴を免疫組織およびフローサイトメトリーにて検討した後、どの細胞が主に反応するかを調べるため、さらに分離精製した培養細胞、各種初代培養細胞およびマクロファージの細胞株で、同様に検討した。さらに、細胞内でのヘミンの作用部位を調べるため、ROS阻害薬、プロテアーゼ阻害薬による影響を検討した。

フリーのヘムによって、心臓在住培養細胞内にはROSが増加し、様々な炎症促進蛋白が強力

Reprint requests to: Kazuhisa HAO
First Department of Internal Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-754 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 - 754
新潟大学医学部第一内科学教室 羽尾和久

に誘導された。これらの発現誘導は、主として在住マクロファージがフリーのヘムに反応することによって起こり、線維芽細胞や平滑筋細胞とクロストークすることによって増強されると考えられた。また炎症促進蛋白発現増強は、ROSの阻害剤ではなく、多くがプロテアーゼ阻害薬によって抑制された。フリーのヘムは、心臓の炎症を引き起こす強力な内因性リガンドになりうることが示唆され、心筋傷害や心リモデリングに多大な影響を及ぼす可能性が考えられた。

キーワード：心筋傷害、サイトカイン、ヘム、デンジャーシグナル、自然炎症

緒 言

正常の心臓には、心筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、在住マクロファージ、肥満細胞など、様々な細胞が存在する。心臓に在住するこれらの細胞は、心筋炎や心筋梗塞など激しい心筋傷害が生じた時に、急激な環境の変化に反応し、様々なメディエーターを介して密接なクロストークをしていると考えられる¹⁾²⁾。このような心筋傷害において、心筋細胞内から局所に放出される様々な内容物は、これらの在住細胞に多大な影響を与えていると考えられる。最近、このような内因性の物質が、自然免疫を活性化し、強力な炎症反応を生じさせることが明らかになり、その物質の種類や機序がいくつか報告されるようになってきた。熱ショック蛋白³⁾、ヒアルロン酸⁴⁾、ファイブロンネクチン断片⁵⁾や尿酸⁶⁾は、炎症のカスケードの引き金となるいわゆる“デンジャーシグナル”として働くことが報告されている。これらは、病原微生物がない時でさえも、自然免疫を活性化し、炎症を引き起こすことがわかってきた^{6)–9)}。しかしながら、心筋傷害において、どのような内因性のデンジャーシグナルが存在し、どの細胞がそれらに反応して炎症促進蛋白を産生するのかという研究は、あまりされてこなかった。

ところで、最近我々は、ラットの心筋炎と正常の心臓から分離精製した心筋細胞の遺伝子発現を、DNA microarrayで網羅的に検索した結果、Lipocalin-2/NGAL、ヘプシジン、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)など、鉄の運搬や代謝に関連する蛋白が急激に増加していることを見いだした^{10)–12)}。傷害を受けた心臓で、これらの蛋白がどのような

役割を演じているのかはまだ明らかではない。しかし、この結果は、鉄に関連する何らかの物質に対して、在住細胞が、激しく反応していることを考えさせる。つまり言い換えれば、何らかの鉄含有物質が、心臓在住細胞の遺伝子発現に多大な影響を与えているのではないかと、さらに考えを進展させれば、その鉄含有物質が“デンジャーシグナル”となっている可能性を想定させる。心筋細胞は、収縮弛緩に必要な多大なエネルギーを産生するため¹³⁾、細胞内に高いレベルの酸素を維持する必要がある。そのために、心筋細胞は、ミオグロビンやチトクロームなどヘム鉄を豊富に蓄えている^{14)–16)}。一方、ミオグロビンは、心筋梗塞のバイオマーカーとして有用であることが知られている¹⁷⁾。この事実は、大量のヘム蛋白が心筋傷害によって細胞外に放出されることを意味し、局所でヘム蛋白が分解されれば、フリーのヘムがそこで大量に生じることを考えさせる¹⁸⁾¹⁹⁾。フリーのヘムは、脂溶性であるので、隣接する細胞の細胞膜にすばやく介入すると考えられる²⁰⁾。フリーのヘムに関しては、最近、活性酸素種(ROS)の産生を促進させると言われており²¹⁾²²⁾、またROSは、インフラマソームを介して、IL-1 β の分泌に関与するとの報告もある²³⁾²⁴⁾。さらにフリーのヘムは、内皮細胞や血液細胞の炎症促進因子の発現を誘導し²⁵⁾²⁶⁾、近位尿管管細胞株に対し、MCP-1の発現を誘導するとの報告もある²⁷⁾。つまりフリーのヘムは、このように、遺伝子発現の主要な誘導因子である可能性がある²⁸⁾。

このような背景から、今回我々は、フリーのヘムが心臓在住細胞に対して炎症を促進する内因性因子になるのではないかと仮説を立て、正常心臓から分離した培養細胞を用いて、フリーのヘム

がどのような影響を与えるか、特に炎症促進蛋白の発現に与える影響について検討した。さらに、正常心臓に常在する細胞が、どのような細胞であるかを同定し、フリーのヘムが、主にどの細胞に対して影響を与えるのか、またその想定される機序についても検討した。

材料と方法

1. 心臓在住培養細胞と培養法

8週齢の雄 Lewis ラットの両心室を無菌的に取り出し、血液を生理食塩水で十分洗い落として細かく刻んだ後、0.0075% タイプ II コラゲナーゼ (Invitrogen, Tokyo, Japan) 入り 0.25% トリプシン EDTA 溶液 (Invitrogen) 中で、37°C, 20 分間インキュベートし、茶こしを用いてすりつぶして細胞を分離した。その後、0.83% NH₄Cl 入り 0.17 M Tris buffer で溶血した後、125 μm の金属篩いを通して壊死組織片を取り除いた後、直径 35-mm 穴の dish に 2 ml の RPMI1640 溶液 (10% 非働化済み FBS, 100 unit/ml penicillin および 100 μg/ml streptomycin 入り) 中で 2-3 週間培養した。CD11bc 陰性心臓在住培養細胞は、さらに PE-conjugated CD11bc (OX-42) (Pharmingen, San Diego, CA) および抗-PE マイクロビーズ抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), MACS マグネット細胞ソーティングシステム (Miltenyi Biotec) を用いて、CD11bc 陽性細胞を除去して精製した後に、同様に 2-3 週間培養した。RPMI 溶液の交換は、いずれの場合も培養開始翌日に交換し、細胞が 80-90% コンフルエントになるまで、その後 2-3 回/週交換した。

2. 初代培養細胞、細胞株および培養法

初代正常ラット大動脈平滑筋培養細胞 (RASCs) (VEC Technologies Inc, Rensselaer, NY) と初代正常ラット心臓毛細血管内皮細胞 (VEC Technologies Inc) (RHMEC) は CS-C 培地キット R (DS Pharma Biomedical Co.) で、初代正常ラット心臓線維芽細胞 (CELL applications Inc, San Diego, CA) はラット線維芽細胞成

長培地 (CELL applications Inc) で、NR8383 ラットマクロファージ細胞株 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) は Ham's F12K medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) (2 mM L-グルタミンおよび 15% 非働化済みウシ胎児血清, 100 unit/ml penicillin および 100 μg/ml streptomycin) でそれぞれ培養した。培養液は、細胞が 80-90% コンフルエントになるまで 2-3 回/週交換した。

3. ヘム刺激および ROS, プロテアーゼ阻害薬による抑制

心臓在住培養細胞、各種初代培養細胞および細胞株 (n = 4) に、20 μM のヘミン (iron protoporphyrin chloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加え、経時的に細胞を採集した。また ROS 産生の阻害作用をもつスーパーオキシドスカベンジャーである 10 mM 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tiron) (Sigma-Aldrich) を hemin 付加の 3 時間前から培養液に加え、プロテアーゼ阻害薬は、hemin 付加の 1 時間前から 25 μM Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) (Sigma-Aldrich) あるいは 300 μM Tosyl-Lys-chloromethylketone (TLCK) (Sigma-Aldrich) を培養液に加えた。

4. フローサイトメトリー

心臓から分離した細胞および MACS マグネット細胞ソーティングシステムで CD11bc 陽性細胞を除去した CD11bc 陰性心臓在住細胞を、Phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ラット CD11bc 抗体 (OX-42) (BD Pharmingen) で染色し、フローサイトメトリー (FACScan; BD Pharmingen) にて解析した。また、2 週間培養した心臓在住培養細胞を Phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ラット CD11bc 抗体と FITC 標識マウス抗ラット RT1B (MHC class II antigen, I-A) (OX-6) (BD Pharmingen) で染色し、同様にフローサイトメトリーにて解析した。細胞内の ROS の測定は、心臓在住培養細胞の培養液を CM-H2DCFDA 色素液 (Invitrogen, Tokyo, Japan) で

表1 定量的RT-PCRに用いたプライマーのリスト

	センスプライマー	アンチセンスプライマー
rat MIP-1 α	5'-ccttgctgttctctctgcaac-3'	5'-catttagtccagctcagtgatgt-3'
rat CINC-1	5'-accctgctgctctctctgt-3'	5'-cctttgacatctttggacaatct-3'
rat CCL5	5'-tgaagatctccacagctgcat-3'	5'-attcttgaaccacctctctctgt-3'
rat G-CSF	5'-cttaagtccttggagcaagtggag-3'	5'-atccaggtgaagcattccaag-3'
rat GM-CSF	5'-atgtagatgccataaagaagctc-3'	5'-ctttatgaatcctcaaggttgg-3'
rat HO-1	5'-agtetatgcccaactctactcc-3'	5'-acgatagactgtttgaacttgg-3'

交換し, hemin (20 μ M) を添加後 60 分間インキュベートし, 0.25 %トリプシン EDTA 溶液で細胞を剥離, 遠心後, 0.002 %トリパンプルー添加 FACS 溶液に細胞を浮遊させ, フローサイトメトリーにて解析した. また ROS 産生の阻害作用をみるために, 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tiron) (Sigma-Aldrich) は, CM-H2DCFDA 色素液交換 3 時間前および交換後に 10 mM と終濃度となるように加えた.

5. 培養細胞染色

心臓在住培養細胞の特徴を同定するため, 上記のように分離した細胞を Lab-Tek II chamber slides (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) で 2 週間同様に培養し, メイギムザ染色を行い, 残りを免疫染色用に -20 $^{\circ}$ C に凍結した. 免疫染色は, アセトン・メタノールで 60 秒固定し, マウス抗 α -smooth muscle actin 抗体 (Sigma-Aldrich), ウサギ抗 factor VIII-related Ag 抗体 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), ウサギ抗 rat collagen type III 抗体 (Monosan, Uden, Netherlands), あるいはマウス抗ラット CD11bc 抗体 (OX-42) (BD Pharmingen, San Diego, CA) でインキュベートした後, 0.05M TBS で 3 回洗浄し, ビオチン化抗ウサギ・マウス抗体 anti-rabbit and anti-mouse Igs (LSAB2 kit; DakoCytomation, Vienna, Austria), ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ, ファストレッド色素を用いて染色し, マイヤーのヘマトキシリンで核を染色した.

6. RNA 抽出と定量的 RT-PCR

上述した検体から総 RNA を Trizol を用いて抽

出し, 2-5 μ g の RNA からランダムプライマーとマウス Moloney leukemia virus 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した. Interleukin-1 (IL-1) β , Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , IL-6, Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α , MIP-2, (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant) CINC-1, CINC-2, Chemokine (C-C motif) Ligand 5 (CCL5), Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Cyclooxygenase-2 (Cox-2), Prostaglandin E synthase (PGES), Inducible Nitric oxide synthase (iNOS), HO-1, Lipocalin-2/NGAL については, 以前報告したプライマー^{12) 29) - 31)} および表 1 に示すプライマーを用いた. 定量的 RT-PCR のコピー数を求めるスタンダードとして用いるプラスミドは, 上述のプライマーとラット心筋炎心臓の cDNA を用いて PCR を行い, pGEM-T easy ベクターに挿入した後, JM109 コンピテント大腸菌にトランスフォーメーションし, MagExtractor プラスミドキット (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて作成した. それらの mRNA の絶対コピー数は, 同じプライマー, SYBR Premix Ex Taq (Takara, Otsu, Japan) とライトサイクラーにて測定し (10 分間 95 $^{\circ}$ C, 次に 95 $^{\circ}$ C 10 秒, 62 $^{\circ}$ C 10 秒, 72 $^{\circ}$ C 13 秒を 45 サイクル), ライトサイクラーソフトウェアを用いてスタンダードカーブから求めた.

7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

培養上清を採集し, 遠心した後, その上清中の IL-1 β と TNF- α の値を Rat IL-1 β ELISA Kit および Rat TNF- α ELISA Kit (R & D Systems, Minneapolis, MN) を用いて測定した.

8. 統計解析

統計解析は, 経時的变化は one-way ANOVA と Bonferroni の多重比較 test, 阻害薬を用いた抑制実験は, non-paired t test を用いた. $p < 0.05$ を有意とし, 定量的 RT-PCR および ROS をフロ

ーサイトメトリーで求めた値は、平均 ± 標準偏差, ELISA で求めた値は平均 ± 標準誤差で示した。

結 果

1. 心臓在住培養細胞の特徴

心臓在住培養細胞 (図 1) は、免疫組織染色では、大部分の細胞が α -smooth muscle actin 陽性 (図 1C), collagen type III 陽性 (図 1D) で、線維芽細胞あるいは平滑筋細胞と思われる細胞と考えられ、一部が CD11bc 陽性細胞 (図 1E-1, 1E-2) の単核球, ごく少数の細胞が factor VIII-related antigen 陽性 (図 1F) の内皮細胞と考えられた。フローサイトメトリーでは、培養直前の細胞は、約 10% が CD11bc 陽性細胞のマクロファージあるいは好中球で (図 2A, C), 2-3 週培養した後の細胞は、約 10% がマクロファージ細胞 (図 3C, 図 1E-1, 1E-2), 約 1% 未満が MHC class II 陽性細胞と考えられた (図 3C)。培養前に CD11bc 陽性細胞を除去して精製した細胞群は、CD11bc 陽性細胞は 0.32% のみで (図 2B), ほとんどが CD11bc 陰性細胞に分離精製されていると考えられた。

2. ヘミンによる細胞内 ROS 産生

ヘミン刺激 1 時間後、心臓在住培養細胞内の ROS の産生は明らかに増加していた (図 4B)。またこの増加は、スーパーオキシドスカベンジャーである Tiron によってほぼ完全に抑えられた (図 4C)。

3. ヘミンによる炎症促進蛋白発現

心臓在住培養細胞をヘミンで刺激し、24 時間まで経時的にみたところ、表 2 に示すように、様々な炎症促進蛋白 (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2, CINC-1, CINC-2, CCL5, G-CSF, GM-CSF, Cox-2, PGES), iNOS および鉄関連蛋白の HO-1, Lipocalin-2/NGAL の急激で著明な遺伝子発現の上昇がみられた。またこの時、ヘミン刺激によって、培養上清

中に IL-1 β , TNF- α 蛋白の産生上昇もみられた (図 5)。しかし、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞をヘミンで刺激した場合には、MCP-1, MIP-2, CINC-1, HO-1 で軽度上昇がみられたものの、表 2 に示すような心臓在住培養細胞のヘミン刺激でみられた発現上昇は、ほぼ消失していた (表 3)。また、初代正常ラット大動脈平滑筋培養細胞 (表 4), 初代正常ラット心臓線維芽培養細胞 (表 5), 初代正常ラット心臓毛細血管内皮培養細胞 (表 6) でも、一部軽度発現上昇がみられるものの、表 2 に示すような急激で著明な発現上昇はみられなかった。そこで、CD11bc 陽性のマクロファージが重要と考え、ラットマクロファージの細胞株 NR8383 を用いてヘミンで刺激したところ、IL-1 β , TNF- α の顕著で著明な発現上昇がみられた (表 7)。その結果から CD11bc 陽性のマクロファージの産生する IL-1, TNF- α が特に重要と考え、CD11bc 陰性の心臓在住培養細胞に直接 IL-1 α , TNF- α で刺激をしたところ、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇が認められた (表 8, 表 9)。心臓在住細胞および細胞株で行ったそれぞれの遺伝子発現の結果は、3 回行った実験の中で、代表的な結果を表に示した。

4. ヘミンによる炎症促進蛋白発現に対する ROS 産生およびプロテアーゼ阻害による影響

心臓在住培養細胞に、ROS の産生を抑制する Tiron を加えてから、ヘミンで刺激しても、様々な炎症促進蛋白の顕著な上昇を抑制することはできなかった (表 10)。しかし、プロテアーゼ阻害薬である TPCK, TLCK を加えると、様々な炎症促進蛋白の顕著な遺伝子発現上昇は抑制された (表 11)。一方、HO-1 の遺伝子発現に対しては、TPCK, TLCK はヘミンによる発現上昇をさらに増強させた (表 11)。ヘミン刺激による発現誘導に対するこの TPCK, TLCK の作用は、NR8383 細胞株でも同様な所見がみられた (表 12)。

考 察

以前にも、ヘミンと炎症との関わりについては

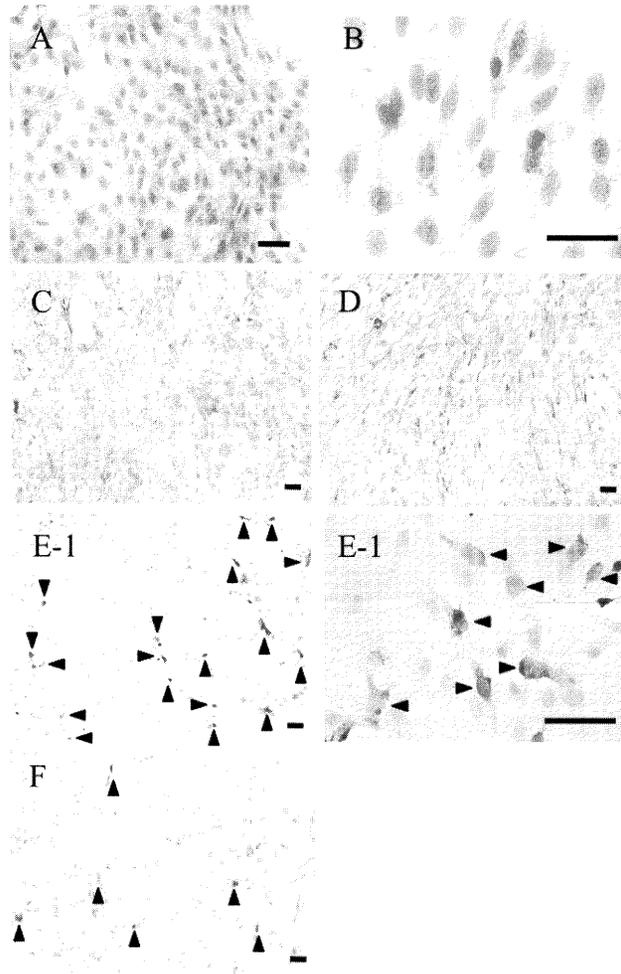


図1 2-3週間培養した心臓在住培養細胞

AとB；メイギムザ染色，C； α -smooth muscle actin 染色，D；collagen type III 染色，E；CD11bc 染色，F；factor VIII-related Ag 染色，CとDはほとんどの細胞が陽性．EとFでは，陽性細胞を矢印で示す．線長は100 μ mを示す．

いくつかの報告がある．ヘミンは血管透過性と接着因子の発現を増加させたり²⁶⁾，IL-8の発現を増強し多核白血球を活性化させ，白血球の病変部位への浸潤を促す³²⁾と報告がある．また，ヘミンは近位尿管上皮細胞のMCP-1の発現を誘導したり²⁷⁾，血管平滑筋に対して，組織因子やプラスミノゲン活性化因子インヒビター1の発現

を増強するとの報告もある²²⁾．このように，ヘミンは，炎症を増強させる因子としていくつか報告されている．一方，ヘミンは，その分解酵素であるHO-1を誘導し²⁷⁾²⁸⁾，HO-1は，炎症を軽減することが報告されている²⁶⁾．HO-1の炎症を軽減する作用は，以前から広く知られており，HO-1の欠損や異常のある動物³³⁾やヒト³⁴⁾で

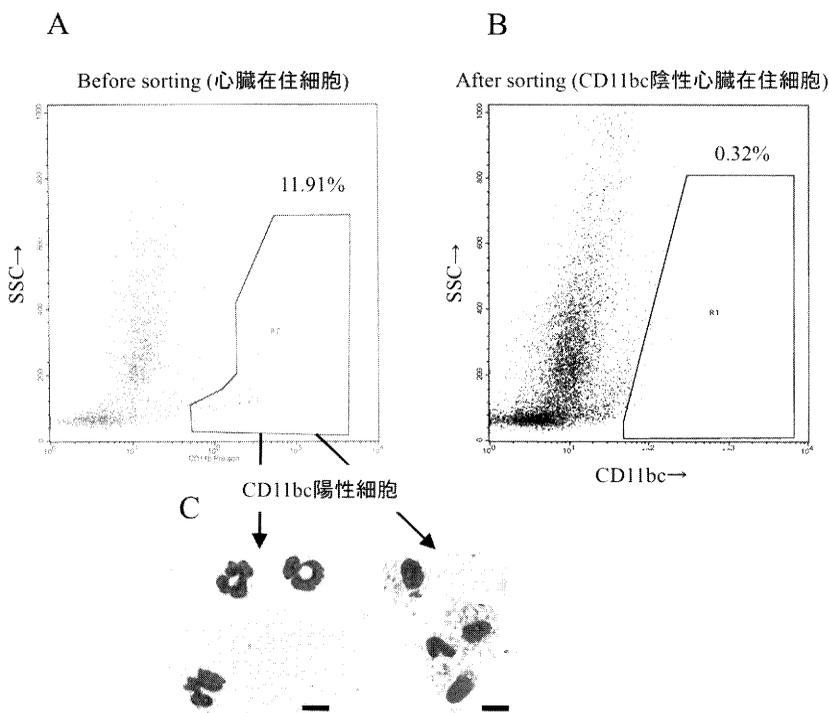


図2 分離直後の心臓在住細胞のフローサイトメトリー所見

A ; MACS マグネット細胞ソーティングシステム処理前, B ; 抗 CD11bc 抗体を用いた MACS マグネット細胞ソーティングシステム処理後, C ; CD11bc 陽性細胞をサイトスピンで処理後のメイギムザ染色. 線長は 10 μ m を示す.

は、主要臓器に炎症がおこることが報告されている。

今回の我々の検討で得られた新たな知見は、一つには、正常心臓の在住細胞の培養細胞でも、以前から言われているようなヘミンによる遺伝子発現が誘導されることが明らかになったことである。さらに、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-2、CINC-1、CINC-2、CCL5、G-CSF、GM-CSF、Cox-2、PGES などのたくさんの炎症促進因子、iNOS や Lipocalin-2/NGAL の発現が、ヘミンによって強く誘導されたことも新たな知見である。特に IL-1 と TNF- α の誘導は、今回の我々の検討で、初めて明らかになったことである。IL-1 や TNF- α は、他の炎症促進

蛋白を誘導することが広く知られていることから³⁵⁾³⁶⁾、IL-1 と TNF- α の発現誘導が、ヘミンと炎症の関係において、非常に重要な意味があると我々は考えている。今回の我々の検討では、マクロファージ細胞株である NR8383 も、ヘミンによって、IL-1 や TNF- α の発現が急激に増加していた。以前の我々の検討でも、ラット心筋炎の心臓で、IL-1 と TNF- α を最も強く発現する細胞は、CD11bc 陽性のマクロファージであり²⁾²⁹⁾、CD11bc 陽性細胞がヘミン刺激によって、IL-1 や TNF- α を誘導することが、とても大きな意味があると思われる。さらに、CD11bc 陰性心臓在住培養細胞、初代線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞では、急激な IL-1 や TNF- α や炎症促進蛋白

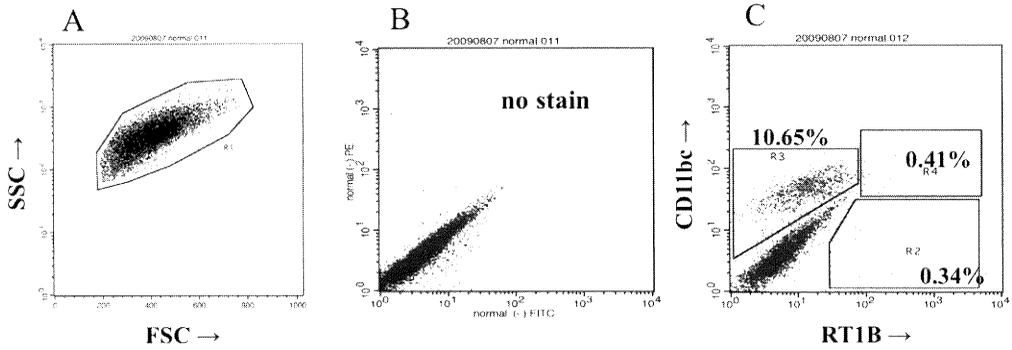


図3 2-3週間培養した心臓在住培養細胞のフローサイトメトリー所見

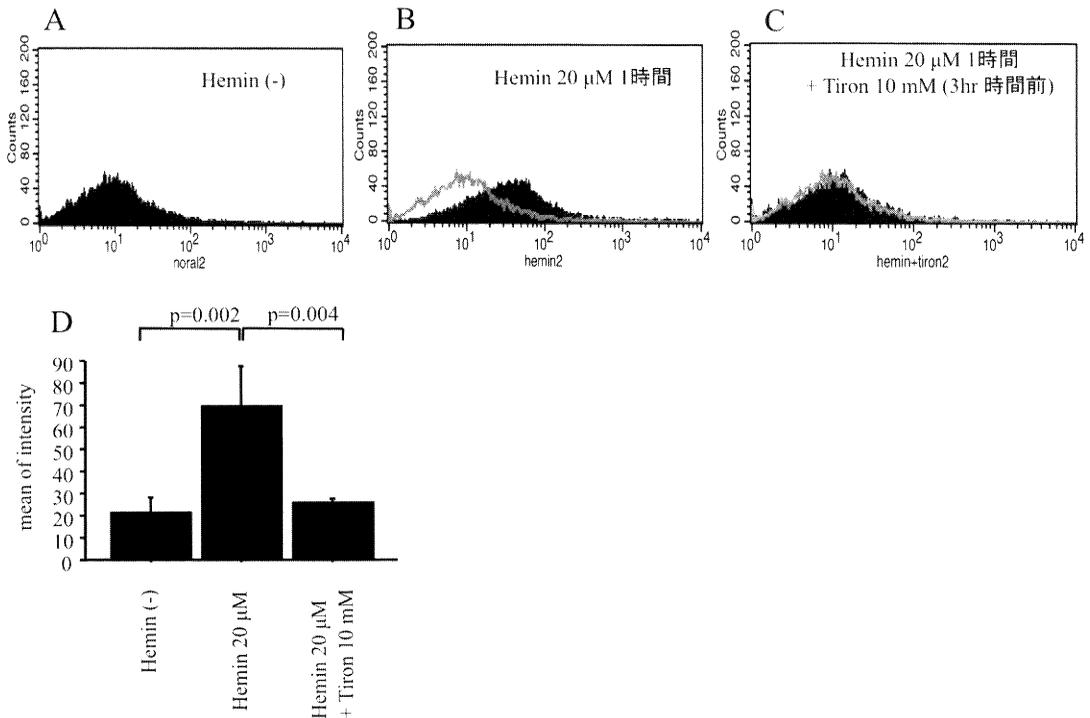


図4 2-3週間培養した心臓在住培養細胞をヘミンあるいはヘミンとTironで刺激したときの細胞内ROSの産生

A ;ヘミン刺激なし, B ;ヘミン刺激1時間, C ;ヘミン刺激1時間とその3時間前からのTiron投与, D ;細胞内ROSの産生を示す蛍光強度(同様に4回の実験を行った)

平均±標準偏差を示す. non-paired t testにて解析.

表2 ヘミン刺激による心臓在住培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)							
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 30分後	ヘミン刺激 1時間後	ヘミン刺激 2時間後	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 12時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	0.2940 ± 0.0703	10.20 ± 1.53	57.98 ± 17.30	105.3 ± 23.1 *	130.8 ± 27.1 *	222.5 ± 94.8 ***	329.0 ± 102.7 ***	139.7 ± 140.6 *
TNF-α	0.4761 ± 0.2323	7.245 ± 1.579	45.58 ± 11.05 **	89.95 ± 16.47 ***	124.2 ± 27.02 ***	108.6 ± 37.25 ***	10.90 ± 6.53	0.750 ± 0.666
IL-6	0.2528 ± 0.0646	0.2308 ± 0.0594	1.432 ± 0.250	7.857 ± 1.691	17.07 ± 4.201	98.16 ± 35.56 **	125.2 ± 66.5 ***	97.09 ± 121.79 **
MCP-1	1.701 ± 0.373	13.49 ± 4.69	40.20 ± 8.45	183.3 ± 55.1 **	319.4 ± 44.4 ***	527.8 ± 89.1 ***	449.5 ± 101.9 ***	265.7 ± 166.6 ***
MIP-1α	2.436 ± 0.530	76.29 ± 12.51	268.5 ± 58.7	449.3 ± 72.53 ***	818.9 ± 133.6 ***	1088 ± 283 ***	505.4 ± 131.2 ***	336.5 ± 218.3 **
MIP-2	0.04426 ± 0.03959	5.484 ± 0.771	35.12 ± 10.09	61.58 ± 15.29 **	158.5 ± 29.7 ***	150.0 ± 31.4 ***	85.21 ± 27.32 ***	74.41 ± 80.17 **
CINC-1	0.2692 ± 0.0583	1.177 ± 0.210	13.56 ± 2.83	23.44 ± 3.95	45.07 ± 5.46 **	141.5 ± 44.9 ***	107.5 ± 9.4 ***	33.68 ± 23.19 *
CINC-2	0.1015 ± 0.0635	0.1358 ± 0.0531	0.7305 ± 0.1458	3.891 ± 1.210	24.76 ± 9.19	107.9 ± 18.4 *	117.2 ± 51.5 *	168.3 ± 202.0 **
CCL5	0.002102 ± 0.002672	0.000611 ± 0.001222	0.002386 ± 0.001975	0.2037 ± 0.1082	4.479 ± 1.0632	35.61 ± 4.200 ***	54.61 ± 17.65 ***	22.32 ± 17.62 **
G-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	0.04056 ± 0.03971	0.4302 ± 0.2068	17.14 ± 6.938 ***	47.93 ± 13.19 ***	7.888 ± 8.185
GM-CSF	N.D.	N.D.	0.06179 ± 0.00589	1.649 ± 0.667	5.958 ± 1.409	37.09 ± 10.30 ***	15.46 ± 11.20 ***	0.8764 ± 0.2801
Cox-2	0.6539 ± 0.06606	0.5791 ± 0.0798	3.960 ± 0.853	13.08 ± 2.57	21.74 ± 2.84	73.19 ± 29.53 ***	75.29 ± 17.01 ***	33.84 ± 47.33 *
PGES	0.2323 ± 0.0255	0.1694 ± 0.0303	0.1355 ± 0.0360	0.1324 ± 0.0170	0.4662 ± 0.0576	8.031 ± 4.395	23.39 ± 3.66 ***	14.22 ± 18.00 **
iNOS	0.01354 ± 0.00602	0.007639 ± 0.003324	0.02337 ± 0.01003	0.3813 ± 0.0208	2.558 ± 0.513	79.07 ± 25.11 ***	100.5 ± 47.7 ***	106.7 ± 59.49 ***
HO-1	17.15 ± 1.35	43.28 ± 6.78	341.0 ± 44.7	905.7 ± 319.4 *	828.9 ± 74.7 *	827.8 ± 345.6 *	1424 ± 40 ***	1859 ± 1648 ***
Lipocalin-2	0.1638 ± 0.0680	0.5009 ± 0.7875	0.06411 ± 0.01128	1.279 ± 0.7464	5.213 ± 1.059	99.04 ± 37.76 **	395.2 ± 36.6 ***	256.4 ± 145.4 ***

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D. 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-) **p<0.01 vs ヘミン (-) ***p<0.001 vs ヘミン (-)

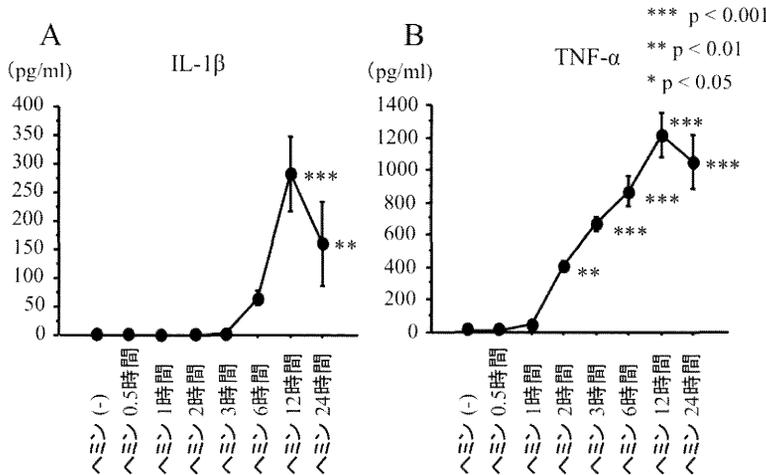


図5 2-3週間培養した心臓在住培養細胞をヘミンで刺激したときの培養上清中の蛋白濃度

A ; IL-1β, B ; TNF-α. 平均±標準誤差を示す. one-way ANOVAとBonferroniの多重比較testにて解析し,ヘミン刺激なしとの有意差を示す.

の強い誘導はヘミン刺激ではみられず, IL-1やTNF-α刺激によって様々な炎症促進蛋白の急激な誘導がみられている. これらの事実は, CD11bc陽性細胞のIL-1やTNF-α産生の重要性を, さらに裏付けるものと思われる. 心臓在住マクロファージは, 古くからその存在について言われてきたが³⁷⁾, あまりその詳細な機能は論じられてこなかった. 今後, 心疾患におけるこの細胞の役割

をさらに詳しく検討すべきであろう. また, 心臓に在住する平滑筋細胞, 線維芽細胞も, 炎症を誘導する細胞として, 我々は, 重要な役割を演じていると考えている. 以前の我々のラットの心筋炎の実験では, MCP-1, IL-6, Cox-2, PGES, CINC-2を最も多く発現している細胞は, マクロファージよりもこれら平滑筋細胞や線維芽細胞であった²⁾³⁰⁾. 平滑筋細胞, 線維芽細胞は, 炎症の

表3 ヘミン刺激によるCD11bc陰性心臓在住培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)			
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	N.D.	0.1254 ± 0.2194	0.01535 ± 0.01985	0.04278 ± 0.01895
TNF-α	0.002676 ± 0.005352	0.02190 ± 0.02749	0.01270 ± 0.02540	N.D.
IL-6	0.05131 ± 0.04193	0.08401 ± 0.03382	0.05618 ± 0.05411	0.1319 ± 0.0794
MCP-1	0.5275 ± 0.3665	4.409 ± 0.8002 ***	1.803 ± 0.948 *	1.859 ± 0.640 *
MIP-1α	0.1696 ± 0.2128	0.4483 ± 0.4425	0.2651 ± 0.2266	0.1967 ± 0.0579
MIP-2	N.D.	0.02089 ± 0.02088 *	N.D.	0.004907 ± 0.009815
CINC-1	0.2779 ± 0.2170	0.9197 ± 0.5571 *	0.5207 ± 0.3345	0.6734 ± 0.3008
CINC-2	0.09452 ± 0.06786	0.1910 ± 0.02493	0.1400 ± 0.1212	0.09508 ± 0.07395
CCL5	N.D.	0.01691 ± 0.03381	N.D.	N.D.
G-CSF	0.008634 ± 0.017269	N.D.	0.01704 ± 0.03409	N.D.
GM-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	0.005053 ± 0.010106
Cox-2	5.282 ± 3.532	4.803 ± 1.699	5.116 ± 5.515	4.853 ± 3.832
PGES	0.1483 ± 0.0984	0.1891 ± 0.0192	0.1842 ± 0.1688	0.2253 ± 0.1145
HO-1	8.920 ± 8.673	12.92 ± 10.90	13.13 ± 10.90	30.02 ± 18.16 *
Lipocalin-2	0.08688 ± 0.04866	0.1802 ± 0.0892	0.06136 ± 0.04387	0.1434 ± 0.07412

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-)

p<0.01 vs ヘミン (-) *p<0.001 vs ヘミン (-)

表4 ヘミン刺激による初代正常ラット大動脈平滑筋培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)			
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	N.D.	0.01038 ± 0.02076	0.009240 ± 0.018480	0.001769 ± 0.003538
TNF-α	0.7586 ± 0.4821	1.042 ± 0.743	0.4401 ± 0.5768	0.4418 ± 0.4553
IL-6	0.007913 ± 0.01372	0.01849 ± 0.02549	0.04429 ± 0.00995	0.02326 ± 0.02291
MCP-1	2.192 ± 2.534	23.69 ± 15.17 **	30.69 ± 6.56 ***	10.95 ± 3.48
MIP-1α	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MIP-2	N.D.	0.008392 ± 0.008434 *	0.01285 ± 0.00651 **	0.002453 ± 0.002236
CINC-1	0.1095 ± 0.1069	0.6729 ± 0.6068	0.9943 ± 0.7691 *	0.2294 ± 0.0712
CINC-2	0.3347 ± 0.1919	0.3477 ± 0.2095	0.2676 ± 0.1846	0.2628 ± 0.1768
CCL5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G-CSF	N.D.	N.D.	0.008278 ± 0.003189 ***	0.003130 ± 0.003661
GM-CSF	N.D.	0.008977 ± 0.011638	0.007633 ± 0.010473	N.D.
Cox-2	0.1880 ± 0.2284	0.2532 ± 0.2063	0.3810 ± 0.3038	0.2219 ± 0.0965
PGES	0.003021 ± 0.006041	0.006278 ± 0.007550	0.008603 ± 0.003047	0.003018 ± 0.003566
HO-1	9.021 ± 12.11	19.82 ± 15.03	18.91 ± 7.56	28.75 ± 15.92
Lipocalin-2	0.1245 ± 0.1730	0.1583 ± 0.1342	0.4660 ± 0.1698*	0.4492 ± 0.1821*

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-) **p<0.01 vs ヘミン (-)

***p<0.001 vs ヘミン (-)

表5 ヘミン刺激による初代正常ラット心臓線維芽培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)			
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	0.006016 ± 0.012033	0.04594 ± 0.02366 *	0.04583 ± 0.03868 *	0.02598 ± 0.02056
TNF-α	N.D.	0.0006664 ± 0.0013329	0.002299 ± 0.002945	N.D.
IL-6	0.09580 ± 0.02469	0.04344 ± 0.01756	0.04711 ± 0.03964	0.09305 ± 0.07017
MCP-1	1.614 ± 0.325	1.965 ± 0.861	2.993 ± 0.831	3.665 ± 1.901 *
MIP-1α	N.D.	0.05713 ± 0.07061	0.009232 ± 0.01846	0.03116 ± 0.02155
MIP-2	0.6889 ± 0.8413	0.1609 ± 0.1023	0.1108 ± 0.0717	0.1078 ± 0.0605
CINC-1	0.4538 ± 0.5199	0.1647 ± 0.1005	0.1311 ± 0.0746	0.2267 ± 0.0614
CINC-2	N.D.	N.D.	0.001280 ± 0.002560	0.005717 ± 0.011434
CCL5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
G-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GM-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cox-2	1.145 ± 0.774	0.5639 ± 0.3172	0.3828 ± 0.1540 *	0.6561 ± 0.1286
PGES	0.07171 ± 0.02337	0.04467 ± 0.02547	0.04965 ± 0.01779	0.1241 ± 0.0374 *
HO-1	11.96 ± 5.51	8.948 ± 3.597	14.57 ± 8.20	23.09 ± 6.62 *
Lipocalin-2	0.01611 ± 0.01132	0.007049 ± 0.005925	0.008516 ± 0.006836	0.04228 ± 0.01768**

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-) **p<0.01 vs ヘミン (-)

***p<0.001 vs ヘミン (-)

表6 ヘミン刺激による初代正常ラット心臓毛細血管内皮培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)			
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TNF-α	0.031 ± 0.06341	0.1118 ± 0.0808	0.02686 ± 0.04092	0.01940 ± 0.03879
IL-6	0.2703 ± 0.0633	0.2321 ± 0.1392	0.2183 ± 0.1156	0.1661 ± 0.1456
MCP-1	0.1379 ± 0.0342	2.726 ± 0.307 ***	1.082 ± 0.371 ***	0.6898 ± 0.2671 *
MIP-1α	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MIP-2	0.05068 ± 0.06828	0.6565 ± 0.3881 **	0.1445 ± 0.1180	0.08405 ± 0.04722
CINC-1	1.377 ± 0.228	6.131 ± 2.533 ***	2.134 ± 1.357	1.223 ± 0.342
CINC-2	0.6627 ± 0.1908	1.149 ± 0.8100	0.5738 ± 0.3108	0.3185 ± 0.1123
CCL5	0.03239 ± 0.03750	0.03281 ± 0.06563	0.01069 ± 0.02137	N.D.
G-CSF	0.02581 ± 0.02251	0.1078 ± 0.04302 **	0.01631 ± 0.0290	0.006639 ± 0.013277
GM-CSF	0.005173 ± 0.003871	0.04727 ± 0.02689 **	0.009099 ± 0.006330	0.003901 ± 0.000960
Cox-2	0.7272 ± 0.3018	1.181 ± 0.8199	0.6932 ± 0.4687	0.7714 ± 0.3873
PGES	N.D.	0.0009959 ± 0.0019919	N.D.	N.D.
HO-1	25.86 ± 9.78	107.2 ± 107.0	41.07 ± 38.53	19.47 ± 17.35
Lipocalin-2	0.08234 ± 0.02156	0.06268 ± 0.05010	0.02836 ± 0.01268	0.05868 ± 0.04421

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-)
p<0.01 vs ヘミン (-) *p<0.001 vs ヘミン (-)

表7 ヘミン刺激によるラットマクロファージ細胞株 NR8383 の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)							
	ヘミン (-)	ヘミン刺激 30分後	ヘミン刺激 1時間後	ヘミン刺激 2時間後	ヘミン刺激 3時間後	ヘミン刺激 6時間後	ヘミン刺激 12時間後	ヘミン刺激 24時間後
IL-1β	2.640 ± 1.638	14.11 ± 5.48	40.19 ± 19.47 *	88.10 ± 30.79 ***	63.73 ± 12.03 **	188.9 ± 32.3 ***	49.95 ± 27.84 **	71.78 ± 17.42 ***
TNF-α	0.4590 ± 0.2520	4.074 ± 0.491	13.02 ± 4.50 *	33.63 ± 7.02 ***	23.90 ± 5.95 ***	49.78 ± 12.03 ***	17.73 ± 13.16 **	4.902 ± 0.925
IL-6	N.D.	0.008220 ± 0.015307	N.D.	0.0007322 ± 0.0014645	0.01672 ± 0.01209	0.1962 ± 0.1094 ***	0.08808 ± 0.08426	0.1798 ± 0.0938 ***
MCP-1	5.388 ± 2.884	21.31 ± 1.950 *	25.22 ± 10.29 ***	31.44 ± 9.44 ***	10.15 ± 4.99	13.44 ± 1.07	12.57 ± 9.23	11.12 ± 1.80
MIP-1α	108.9 ± 68.1	599.8 ± 108.9	970.0 ± 368.4 **	1344 ± 343 ***	1180 ± 238.8 **	2358 ± 431 ***	1441 ± 789 ***	1211 ± 198 ***
MIP-2	0.01204 ± 0.00928	0.1688 ± 0.0557	0.4491 ± 0.2276	0.7383 ± 0.2591	0.2686 ± 0.1053	1.053 ± 0.307	1.652 ± 2.426 *	1.187 ± 0.236
CINC-1	0.1390 ± 0.0719	0.2236 ± 0.1007	0.1850 ± 0.1201	0.1678 ± 0.0762	0.1950 ± 0.0063	0.2306 ± 0.1200	0.2321 ± 0.2168	0.2333 ± 0.0584
CINC-2	0.1925 ± 0.0899	0.2272 ± 0.0926	0.2044 ± 0.1102	0.1438 ± 0.0774	0.1737 ± 0.0391	0.1818 ± 0.0848	0.1736 ± 0.1915	0.3094 ± 0.0637
CCL5	0.1521 ± 0.1911	0.1576 ± 0.2391	0.1496 ± 0.1839	0.1559 ± 0.0816	0.05417 ± 0.09264	2.212 ± 1.346	2.656 ± 3.901 *	2.070 ± 0.621
G-CSF	N.D.	0.09884 ± 0.19769	0.05006 ± 0.06321	0.3831 ± 0.2651	0.5411 ± 0.3198	4.315 ± 1.241 *	5.139 ± 6.695 **	4.586 ± 0.547 *
GM-CSF	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.04237 ± 0.03428 ***
Cox-2	0.2170 ± 0.1715	0.3963 ± 0.0750	0.2356 ± 0.1584	0.2233 ± 0.0476	0.3639 ± 0.1299	0.2937 ± 0.1842	0.2577 ± 0.2034	0.2427 ± 0.0389
PGES	N.D.	N.D.	N.D.	0.0008269 ± 0.0016539	0.0007369 ± 0.001276	0.004305 ± 0.006023	0.008089 ± 0.008680 **	0.002212 ± 0.003315
iNOS	0.1150 ± 0.0665	0.2815 ± 0.1111	0.1421 ± 0.0310	0.2495 ± 0.0349	0.2901 ± 0.0847	1.247 ± 0.5412	1.719 ± 2.225 **	4.307 ± 0.756 ***
HO-1	205.1 ± 97.1	348.7 ± 35.9	392.0 ± 201.3	412.1 ± 70.75	687.0 ± 217.3	3510 ± 1308 ***	1409 ± 493 **	967.7 ± 207.7
Lipocalin-2	0.1596 ± 0.1045	0.1694 ± 0.1661	0.2682 ± 0.2862	0.2290 ± 0.1030	0.9376 ± 0.4119	8.471 ± 2.055 ***	10.36 ± 3.76 ***	15.09 ± 4.187 ***

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs ヘミン (-)。**p<0.01 vs ヘミン (-) ***p<0.001 vs ヘミン (-)

表8 IL-1 α の刺激 (0.5ng/ml) による CD11bc 陰性心臓在住培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数 (x10 ³) / 総RNA(μg)			
	IL-1 (-)	IL-1刺激 3時間後	IL-1刺激 6時間後	IL-1刺激 24時間後
IL-1β	0.001694 ± 0.003389	0.4472 ± 0.3137 **	0.8324 ± 0.5434	0.3788 ± 0.3621
TNF-α	0.03854 ± 0.01949	2.855 ± 1.792 ***	0.4052 ± 0.1429	0.1365 ± 0.1033
IL-6	0.03009 ± 0.02025	0.9172 ± 0.5466	5.384 ± 3.064 *	8.537 ± 3.801 ***
MCP-1	0.2220 ± 0.1643	87.89 ± 51.55 **	53.62 ± 19.98 *	39.17 ± 17.81
MIP-1α	0.4495 ± 0.2371	1.445 ± 0.740 *	1.158 ± 0.511 *	2.810 ± 2.165
MIP-2	0.00244 ± 0.004334	4.435 ± 3.616	1.417 ± 0.967 *	1.417 ± 0.967
CINC-1	0.05395 ± 0.04221	26.67 ± 22.84 **	8.329 ± 4.870	7.582 ± 7.135
CINC-2	0.01431 ± 0.01114	7.834 ± 6.279 *	2.694 ± 2.404	4.860 ± 3.952
CCL5	N.D.	1.803 ± 1.699 *	0.7390 ± 0.6008	0.6995 ± 0.4840
G-CSF	N.D.	1.650 ± 1.260 *	0.5432 ± 0.3126	1.864 ± 1.187 **
GM-CSF	N.D.	2.188 ± 1.714 *	0.6285 ± 0.5068	1.195 ± 1.089
Cox-2	1.438 ± 0.871	21.49 ± 12.55 **	7.337 ± 2.868	14.56 ± 9.76 *
PGES	0.03098 ± 0.02079	0.1378 ± 0.1031	0.1100 ± 0.0635	0.7795 ± 0.6010 **
HO-1	2.168 ± 2.198	2.232 ± 1.906	0.9191 ± 0.5397	2.172 ± 1.748
Lipocalin-2	0.09306 ± 0.08724	2.144 ± 1.655	2.403 ± 1.320	41.92 ± 30.18 **

結果は平均 ± 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs IL-1 (-)
p<0.01 vs IL-1 (-) *p<0.001 vs IL-1 (-)

表9 TNF- α の刺激(0.5ng/ml)によるCD11bc陰性心臓在住培養細胞の遺伝子発現の変化

	mRNAのコピー数(x10 ³)/総RNA(μ g)			
	TNF- α (-)	TNF- α 刺激3時間後	TNF- α 刺激6時間後	TNF- α 刺激24時間後
IL-1 β	N.D.	0.08961 \pm 0.04554 ***	0.02837 \pm 0.02027	0.01530 \pm 0.01868
TNF- α	N.D.	0.6397 \pm 0.1172 ***	0.1330 \pm 0.01438 **	0.04395 \pm 0.02688
IL-6	0.3326 \pm 0.2090	0.3318 \pm 0.0555	0.5290 \pm 0.1940	1.019 \pm 0.199 ***
MCP-1	1.199 \pm 0.509	160.4 \pm 15.0 ***	135.9 \pm 15.33 ***	96.28 \pm 2.37 ***
MIP-1 α	N.D.	0.1736 \pm 0.1643 *	N.D.	N.D.
MIP-2	N.D.	5.297 \pm 0.406 ***	3.750 \pm 0.478 ***	1.002 \pm 0.212 **
CINC-1	0.1011 \pm 0.0354	8.001 \pm 1.231 ***	6.516 \pm 1.064 ***	3.646 \pm 0.553 ***
Cox-2	5.537 \pm 1.897	10.81 \pm 2.324 **	9.945 \pm 1.804 **	10.35 \pm 1.688 **

結果は平均 \pm 標準偏差で示す(n=4)。N.D.: 検出感度以下 *p<0.05 vs TNF- α (-)
p<0.01 vs TNF- α (-) *p<0.001 vs TNF- α (-)

表10 ヘミン刺激による心臓在住培養細胞の遺伝子発現誘導に対するTironの影響

	mRNAのコピー数(x10 ⁶)/総RNA(μ g)		
	ヘミン(-)	ヘミン6時間	ヘミン6時間+Tiron
IL-1 β	0.1933 \pm 0.3109	218.1 \pm 70.2	234.6 \pm 46.1
TNF- α	0.9150 \pm 0.1429	57.96 \pm 14.83	60.18 \pm 14.56
MCP-1	1.618 \pm 1.412	334.6 \pm 18.38	319.4 \pm 60.5
Lipocalin-2	2.104 \pm 3.761	37.50 \pm 8.34	54.15 \pm 12.35

結果は平均 \pm 標準偏差で示す(n=4)。Tironはヘミン刺激3時間前から添加

表11 ヘミン刺激による心臓在住培養細胞の遺伝子発現誘導に対するTPCKおよびTLCKの影響

	mRNAのコピー数(x10 ⁶)/総RNA(μ g)			
	ヘミン(-)	ヘミン6時間	ヘミン+TPCK6時間	ヘミン+TLCK6時間
IL-1 β	0.2453 \pm 0.1071	27.70 \pm 15.02	0.2027 \pm 0.3575 *	0.05287 \pm 0.05173 *
TNF- α	0.4469 \pm 0.2309	3.591 \pm 1.896	0.07268 \pm 0.1237 *	0.02897 \pm 0.02755 **
IL-6	1.071 \pm 0.259	7.494 \pm 3.271	4.143 \pm 1.079	4.059 \pm 0.948
MCP-1	14.88 \pm 4.36	163.6 \pm 58.2	10.55 \pm 3.38 **	5.419 \pm 2.683 **
MIP-1 α	3.865 \pm 1.506	16.62 \pm 8.27	0.6992 \pm 0.358 **	0.8150 \pm 0.2977 **
MIP-2	0.1083 \pm 0.0380	3.696 \pm 2.251	0.03904 \pm 0.07808 *	0.07938 \pm 0.04800 *
CINC-1	1.771 \pm 0.794	29.50 \pm 11.94	0.7641 \pm 0.2168 **	6.037 \pm 2.002 **
CINC-2	0.3914 \pm 0.2428	12.91 \pm 5.20	0.1120 \pm 0.0431 **	0.1772 \pm 0.1210 **
CCL5	0.1694 \pm 0.1439	1.188 \pm 0.8181	0.03835 \pm 0.04844 *	0.04509 \pm 0.06146 *
G-CSF	0.004733 \pm 0.005035	0.4407 \pm 0.2054	0.004072 \pm 0.008144 **	N.D. **
GM-CSF	0.004809 \pm 0.006675	0.4591 \pm 0.2426	0.001593 \pm 0.003186 **	0.003510 \pm 0.007020 **
Cox-2	38.08 \pm 13.40	46.61 \pm 5.34	23.74 \pm 8.08 **	14.86 \pm 4.07 ***
PGES	0.06438 \pm 0.02973	0.2561 \pm 0.0929	0.04720 \pm 0.02279 **	0.09705 \pm 0.05037 *
HO-1	27.52 \pm 14.60	134.1 \pm 30.28	922.2 \pm 132.9 ***	247.1 \pm 68.70 *
Lipocalin-2	0.531 \pm 0.1660	3.071 \pm 1.748	0.6074 \pm 0.3379 *	0.7747 \pm 0.3336 *

結果は平均 \pm 標準偏差で示す(n=4)。TPCK、TLCKはヘミン刺激1時間前から添加
*p<0.05 vs ヘミン6時間 **p<0.01 vs ヘミン6時間 ***p<0.001 vs ヘミン6時間

表12 ヘミン刺激によるラットマクロファージ細胞株NR8383の遺伝子発現誘導に対するTPCKおよびTLCKの影響

	mRNAのコピー数(x10 ⁶)/総RNA(μ g)			
	ヘミン(-)	ヘミン6時間	ヘミン+TPCK6時間	ヘミン+TLCK6時間
IL-1 β	75.29 \pm 14.17	462.1 \pm 126.3	30.25 \pm 7.21 ***	45.40 \pm 8.15 ***
TNF- α	16.60 \pm 1.95	90.65 \pm 2.81	16.19 \pm 2.31 ***	12.99 \pm 1.71 ***
MCP-1	29.85 \pm 5.05	66.65 \pm 10.99	19.61 \pm 3.17 ***	4.380 \pm 0.766 ***
HO-1	251.3 \pm 63.0	1249 \pm 197	1897 \pm 215 **	4247 \pm 724 ***

結果は平均 \pm 標準偏差で示す(n=4)。TPCK、TLCKはヘミン刺激1時間前から添加
*p<0.05 vs ヘミン6時間 **p<0.01 vs ヘミン6時間 ***p<0.001 vs ヘミン6時間

修復するときその重要性が一般にはいわれているが³⁸⁾、炎症細胞を局所に誘導する細胞としても、これらの細胞は重要であると我々は考えている。今回のデータからは、ヘミンに反応した心臓在住マクロファージが、平滑筋細胞、線維芽細胞などとクロストークし、様々な炎症促進蛋白を産生し、局所に白血球を浸潤させ、炎症を増強していることが示唆される。Wegenerらは、ヘミンをマウスに大量に静脈注射すると、肝臓に白血球の浸潤がみられると報告している²⁶⁾。彼らのデータと我々のデータを考え合わせると、*in vivo*でも、ヘミンによって、心臓に白血球が浸潤してくる可能性があると思われる。心筋梗塞の場合、心筋細胞が壊れ、大量のフリーのヘムが心臓局所に生じると考えられる。心筋梗塞巣に大量の白血球が浸潤してくることは周知の事実であるが、ヘミンによるこのような炎症促進蛋白の誘導が、大きく関与しているのかもしれない。いずれにしても、フリーのヘムが、心臓に与える影響をさらに検討する必要があると思われる。

以前我々は、心筋炎や心筋梗塞の心臓で、鉄関連蛋白の発現が急激に上昇することを見だし^{10)–12)}、これが今回の研究動機のひとつとなった。実際、今回の実験で、心臓在住培養細胞にヘミンを添加すると、鉄に関連する蛋白であるHO-1およびLipocalin-2/NGALの発現は有意に上昇した。ヘミンによるHO-1の発現誘導は古くから知られているが²⁷⁾²⁸⁾、Lipocalin-2/NGALの発現の誘導は、我々の報告がはじめてである。Lipocalin-2/NGALは、IL-1によって誘導されることが知られているが³⁹⁾⁴⁰⁾、今回のLipocalin-2/NGALの発現の誘導も、心臓在住マクロファージのIL-1産生によって、平滑筋細胞、線維芽細胞が反応し、Lipocalin-2/NGALの発現が増加した機序が最も考えられる。実際にIL-1を産生するCD11bc細胞を含まない心臓在住培養細胞は、ヘミンではなく、IL-1の刺激によってLipocalin-2/NGALの発現が誘導されており、今回の結果は、それを強く示唆している。Lipocalin-2/NGALは、鉄を細胞内外に移動させる蛋白である。ヘミンが局所で増加すると、今回

示されたようにHO-1が誘導され、局所ではヘミンの分解により、フリーの鉄の濃度も上昇すると考えられる。増加した細胞外のフリーの鉄は、発現が増強したLipocalin-2/NGALによって、細胞内に取り込まれる可能性がある。細胞外のフリーの鉄もROSを発生させることが指摘されており⁴¹⁾、Lipocalin-2/NGALは、フリーの鉄を細胞内に移動させ、フェリチンの中に鉄を貯蔵させることによって、ROSの発生を抑え、さらなる臓器傷害を抑制しているのかもしれない⁴²⁾。Lipocalin-2/NGALの心筋傷害に対する機能についても、今後の課題と思われる。

また心臓在住培養細胞に対する、ヘミンによる遺伝子発現誘導の機序であるが、我々は、当初、ROSの産生と深く関わっているのではないかと考え検討した。その理由は、ヘミンの遺伝子発現誘導は、ROSの産生が関連するとの報告があり²²⁾、また、最近、インフラマソームの活性化が、IL-1 β のプロセッシングや分泌に関与し⁴³⁾、その時にROSの産生が重要であるとの報告がいくつかあったからである²⁴⁾⁴⁴⁾。しかし、今回の我々の検討では、予想に反し、Tironによって細胞内のROSを抑制しても、遺伝子発現の変化はみられなかった。一方、TPCK、TLCKなどのプロテアーゼ阻害薬によって、多くの遺伝子発現が明らかに抑制された。これらのプロテアーゼ阻害薬は、細胞外で働くのではなく、細胞内で作用し、toll-like receptor 4 (TLR4) やIL-1受容体からのシグナルを抑制するとの報告がある⁴⁵⁾。TLR4のリガンドであるLPSは、IL-1やTNF- α など多くのサイトカインを産生させる⁴⁶⁾。そして、LPS、IL-1やTNF- α によるシグナルは、NF- κ Bの核移行抑制分子であるI κ Bの分解を引き起こし、核内NF- κ Bは炎症反応の主要な転写因子の一つとして働くことが広く知られている⁴⁷⁾。このようなことを考えると、プロテアーゼ阻害薬が強力に抑制したヘミンの炎症促進蛋白発現誘導は、NF- κ Bを介していることを示しているのかもしれない。また、今回の実験で、ヘミンによるHO-1の発現誘導については、TPCK、TLCKによって、抑制ではなく逆に増強がみられた。ヘミンによる

HO-1 遺伝子は, Bach1 の様な核内転写抑制因子によって制御されており, ヘムがこれと結合することによってこの抑制がはずれ, HO-1 の発現が誘導される機序が想定されている²⁸⁾. このように, フリーのヘムによる発現誘導は, いくつかの異なるシグナルを介している可能性が考えられる.

結 語

心筋傷害によって, 心臓局所に放出, 産生されると考えられるフリーのヘムは, 心臓在住培養細胞に対して, 強力に炎症促進蛋白の産生, 細胞内 ROS の産生を誘導した. この蛋白の多くは, まず在住マクロファージがフリーのヘムに反応することによって IL-1 や TNF- α を産生し, これらに線維芽細胞, 平滑筋細胞などが反応し, 炎症促進蛋白産生が増幅されるものと考えられた. このとき, ROS 産生は, フリーのヘムによる発現誘導にあまり関与せず, 細胞内のプロテアーゼが深く関与するものと考えられた.

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の講師 埜 晴雄先生, 同講師 鳥羽 健先生および保健学科 助教 太田好美先生に深謝致します.

文 献

- 1) Frangogiannis NG: The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 58: 88 - 111, 2008.
- 2) Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res* 68: 278 - 288, 2005.
- 3) Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V and Kolb H: Human 60 - kDa heat - shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212 - 3219, 1999.
- 4) Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD and Horton MR: Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177: 1272 - 1281, 2006.
- 5) Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC and Strauss JF, 3rd: The extra domain A of fibronectin activates Toll - like receptor 4. *J Biol Chem* 276: 10229 - 10233, 2001.
- 6) Shi Y, Evans JE and Rock KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516 - 521, 2003.
- 7) Beg AA: Endogenous ligands of Toll - like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23: 509 - 512, 2002.
- 8) Frantz S, Ertl G and Bauersachs J: Mechanisms of disease: Toll - like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4: 444 - 454, 2007.
- 9) Trendelenburg G: Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 867 - 881, 2008.
- 10) Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transl Res* 152: 119 - 127, 2008.
- 11) Isoda M, Hanawa H, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Hao K, Ding L, Tanaka K, Takayama T, Kato K, Okura O, Kodama M, Ota Y, Hayashi J and Aizawa Y: Expression of the peptide hormone hepcidin increases in cardiomyocytes under myocarditis and myocardial infarction. *J Nutr Biochem* in press.
- 12) Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M and Aizawa Y: Lipocalin - 2/neutrophil gelatinase - B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J* in press.

- 13) Brown DA, MacLellan WR, Laks H, Dunn JC, Wu BM and Beygui RE: Analysis of oxygen transport in a diffusion - limited model of engineered heart tissue. *Biotechnol Bioeng* 97: 962 - 975, 2007.
- 14) Wittenberg BA and Wittenberg JB: Myoglobin - mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7503 - 7507, 1987.
- 15) Wittenberg JB and Wittenberg BA: Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol* 206: 2011 - 2020, 2003.
- 16) Baron CP and Andersen HJ: Myoglobin - induced lipid oxidation. A review. *J Agric Food Chem* 50: 3887 - 3897, 2002.
- 17) Stone MJ, Willerson JT, Gomez - Sanchez CE and Waterman MR: Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. Results in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 56: 1334 - 1339, 1975.
- 18) Li RC, Saleem S, Zhen G, Cao W, Zhuang H, Lee J, Smith A, Altruda F, Tolosano E and Dore S: Heme - hemopexin complex attenuates neuronal cell death and stroke damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 11, 2009.
- 19) Nakahira K, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Akagi R and Morita K: Protective role of heme oxygenase - 1 induction in carbon tetrachloride - induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 66: 1091 - 1105, 2003.
- 20) Beri R and Chandra R: Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P - 450. *Drug Metab Rev* 25: 149 - 152, 1993.
- 21) Ryter SW and Tyrrell RM: The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro - and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28: 289 - 309, 2000.
- 22) Hasan RN and Schafer AI: Hemin upregulates Egr - 1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK - 1/2 - Elk - 1 and NF - kappaB. *Circ Res* 102: 42 - 50, 2008.
- 23) Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania - TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ and Ting JP: The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30: 556 - 565, 2009.
- 24) Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM and Ojcius DM: ATP activates a reactive oxygen species - dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282: 2871 - 2879, 2007.
- 25) Wagener, Feldman E, de Witte T and Abraham NG: Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM - 1, VCAM - 1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 456 - 463, 1997.
- 26) Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T and Figdor CG: Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counter - acted by heme oxygenase. *Blood* 98: 1802 - 1811, 2001.
- 27) Kanakiriya SK, Croatt AJ, Haggard JJ, Ingelfinger JR, Tang SS, Alam J and Nath KA: Heme: a novel inducer of MCP - 1 through HO - dependent and HO - independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F546 - 554, 2003.
- 28) Tsiftoglou AS, Tsamadou AI and Papadopoulou LC: Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther* 111: 327 - 345, 2006.
- 29) Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M and Aizawa Y: Effect of hydrodynamics - based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin - 1 receptor antagonist - Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation*

- 111: 1593 - 1600, 2005.
- 30) Chang H, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Elnaggar R, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: Hydrodynamic - based delivery of an interleukin - 22 - Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol* 177: 3635 - 3643, 2006.
- 31) Elnaggar R, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Chang H, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: The effect of hydrodynamics - based delivery of an IL - 13 - Ig fusion gene for experimental autoimmune myocarditis in rats and its possible mechanism. *Eur J Immunol* 35: 1995 - 2005, 2005.
- 32) Graca - Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja - Fidalgo C and Oliveira PL: Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99: 4160 - 4165, 2002.
- 33) Poss KD and Tonegawa S: Reduced stress defense in heme oxygenase 1 - deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10925 - 10930, 1997.
- 34) Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y and Koizumi S: Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase - 1 deficiency. *J Clin Invest* 103: 129 - 135, 1999.
- 35) Dinarello CA: Interleukin - 1 and interleukin - 1 antagonism. *Blood* 77: 1627 - 1652, 1991.
- 36) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV and Boldin MP: Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331 - 367, 1999.
- 37) Spencer SC and Fabre JW: Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of rat heart. *J Exp Med* 171: 1841 - 1851, 1990.
- 38) Porter KE and Turner NA: Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123: 255 - 278, 2009.
- 39) Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M and Borregaard N: Neutrophil gelatinase - associated lipocalin is up - regulated in human epithelial cells by IL - 1 beta, but not by TNF - alpha. *J Immunol* 171: 6630 - 6639, 2003.
- 40) Yndestad A, Landro L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Froland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Oie E, Gullestad L and Aukrust P: Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase - associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J* 30: 1229 - 1236, 2009.
- 41) Halliwell B and Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion - dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307: 108 - 112, 1992.
- 42) Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW and Vercellotti GM: Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267: 18148 - 18153, 1992.
- 43) Church LD, Cook GP and McDermott MF: Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 34 - 42, 2008.
- 44) Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT and Tschopp J: Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674 - 677, 2008.
- 45) Backhed F, Normark S and Richter - Dahlfors A: TLR4 - dependent lipopolysaccharide signalling in epithelial cells is independent of extracellular protease activity. *Cell Microbiol* 4: 297 - 303, 2002.
- 46) Eskay RL, Grino M and Chen HT: Interleukins, signal transduction, and the immune system - mediated stress response. *Adv Exp Med Biol* 274: 331 - 343, 1990.
- 47) Baldwin AS, Jr.: The NF - kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649 - 683, 1996.

(平成21年12月22日受付)