

心筋炎および心筋梗塞の心筋細胞における ヘプシジン遺伝子発現の検討

磯田 学

新潟大学大学院医歯学総合研究科

呼吸循環外科学分野

(主任：林 純一教授)

Expression of Hecpudin in Cardiomyocytes Under Rat Myocarditis and Myocardial Infarction

Manabu ISODA

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director. Prof. Junichi HAYASHI)

要 旨

鉄は様々な臓器において重要な生理的機能に参与しているが、最近、ヘプシジンというペプチドホルモンが鉄の恒常性において中心的な役割を示すことが明らかにされた。このホルモンは抗菌作用を持ち、炎症性サイトカインである IL-6 や鉄過剰によりその発現が増強し、フェロポルチンとの結合を介して鉄の細胞外への排出を抑制することが報告されている。心臓中にも、ある条件下でヘプシジンの発現が増強するとの報告があるが、心臓病におけるその発現の変化に関してはほとんど知られていない。今回私は、心筋炎あるいは心筋梗塞の心臓でヘプシジンの発現がどのように変化するかを検討した。ラット自己免疫性心筋炎およびラット心筋梗塞の心臓を、ランゲンドルフ還流装置にてコラゲナーゼ処理した後、心筋細胞、非心筋細胞を金属篩にて分離精製し、ヘプシジンの遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定した。さらにヒト心筋炎の心臓でヘプシジンの発現が増加するかを検討した。統計解析は one-way ANOVA と Bonferroni の多群間比較検定あるいは対応のない t 検定を用いた。ラット心筋炎および心筋梗塞において、ヘプシジンは心筋細胞にのみ発現していた。また、フェロポルチンは心臓中の様々な細胞で発現が認められた。ヘプシジンは、ラット心筋炎および心筋梗塞の心筋細胞において早期に 100 倍以上発現が増強し、IL-6 の発現との関係を見ると、強い正の相関が見られた (EAM $r = 0.781$, $p < 0.0001$; AMI $r = 0.563$, $p = 0.0003$)。それに対して、BNP の発現と IL-6 の発現との関係については、心筋炎および心筋梗塞いずれも有意な正の相関を認めたものの、ヘプシジンよりも小さい相関係数を示した (EAM $r = 0.516$, $p = 0.0052$; AMI $r = 0.387$, $p = 0.019$)。また、ヒトの心臓では、心筋炎のない症例群に比し心筋炎のある症例群で有意にヘプシジンの発現が

Reprint requests to: Manabu ISODA
Department of Thoracic and
Cardiovascular Surgery
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
新潟大学大学院医歯学総合研究科
呼吸循環外科学分野

磯田 学

増強していた (0.0400 ± 0.0195 vs 0.0032 ± 0.0017 , $p = 0.0045$). それに対して, BNPの発現については両群間で有意差は無かった (58.5 ± 24.1 vs 42.3 ± 21.4 , $p = 0.68$). 以上の結果から, ヘプシジンは心筋炎および心筋梗塞の心筋細胞で有意に発現が増強しており, その発現は炎症性サイトカインであるIL-6により誘導された可能性があると考えられた. このことは, 障害を受けた心臓において, ヘプシジンがフェロポルチンを介して鉄の分布に影響を及ぼしている可能性を示唆し, ヘプシジンは心臓での鉄の恒常性に重要な役割を担っている可能性があると考えられた.

キーワード：ヘプシジン, 心筋炎, 心筋梗塞, IL-6, 鉄の恒常性

緒 言

ヘプシジンは最近発見されたペプチドホルモンで, N端に24個のシグナルペプチドを含む84個のアミノ酸からなり, C端の25個のアミノ酸からなるペプチドが生理作用をもつ¹⁾. ヘプシジンは最初に肝臓でその発現が認められ²⁾, 鉄の恒常性の中心的な役割を示すと考えられている³⁾. ヘプシジンはフェロポルチンに結合することで鉄の細胞からの排出を阻害し⁴⁾, 貧血では発現が抑制され, 鉄過剰においては発現が増強する⁵⁾⁶⁾. 感染と炎症はヘプシジンの発現を増加させ⁵⁾, 炎症性サイトカインのIL-6によってその発現が誘導される³⁾⁷⁾. ヘプシジンによって細胞外スペースの鉄が低下すると, 細菌などの鉄の利用が抑制され, 宿主防御に重要な役割を示すと考えられている¹⁾. また, 鉄は多くの蛋白や酵素(ヘモグロビン, ミオグロビン, チトクロームなど)に必須のミネラルであるが⁸⁾⁹⁾, 一方で鉄は活性酸素種(ROS)を産生することで様々な組織・臓器障害に関与するとも考えられており¹⁰⁾, ヘプシジンは組織傷害にも大きく関わっている可能性がある¹¹⁾. 特に心筋細胞はミオグロビンを含み, 鉄を非常に多く含有する細胞の一つである¹²⁾¹³⁾. 鉄が様々な心臓病(ヘモクロマトーシスや虚血再還流傷害など)で病態生理学的な役割を演じることは以前から知られている¹⁴⁾¹⁵⁾. このような中で, 最近, 肝臓以外の臓器でもヘプシジンの発現が認められ, 皮膚の炎症や低酸素状態で心臓中に発現が増強することが報告された¹⁶⁾. ヘプシジンは心臓病でも重要な役割を示している可能性があると考えられるが, 心臓での発現変化やその役割につい

ては全くわかっていない.

ラットの自己免疫性心筋炎(experimental autoimmune myocarditis, 以下EAM)はヒトの劇症型心筋炎に類似し¹⁷⁾, 多くのリンパ球とマクロファージが浸潤する動物モデルである¹⁸⁾. EAMの心臓では様々なサイトカインが発現するが, ヘプシジンを誘導すると考えられているIL-6に関しても心臓内で発現が増強する¹⁹⁾²⁰⁾. また, 急性心筋梗塞(acute myocardial infarction, 以下AMI)の心臓では炎症のカスケードの引き金が引かれ, 様々なサイトカインが産生される²¹⁾. 本研究ではラットEAMとAMIでヘプシジンの発現がどのように変化するかを検討し, さらにヒトの心筋炎でもヘプシジンがどのように変化するかを検討した.

材料と方法

1. 動物

雄のルイスラットを日本チャールズリバー(Atsugi, Kanagawa, Japan)より購入し, 新潟大学脳研究所バイオリソースセンターで生後7週まで飼育し, 以下に示すようにEAMモデルを作成した. また雄のフィッシャーラットを同様に生後8週まで飼育し, AMIモデルを作成した. 動物の扱いは全経過を通じて我々の施設の承認を受けた指針に従った.

2. EAMモデルの作成

心筋ミオシンを既報のごとくブタの心臓から抽出(終濃度2 mg/ml)し, 10 mg/mlの結核死菌を含む完全フロイントアジュバント(Difco,

Detroit, Michigan) 同量と混和し, EAM を作成するために第0日目に足底に皮下注射した。

3. 心筋炎構成細胞の分離精製方法および心臓組織の採取方法

第18日目のEAMラットの心臓をランゲンドルフ装置還流下に20分間コラゲナーゼ処理して心筋炎心臓の構成細胞を分離した。次に38 μ mと20 μ mの金属篩を用いて、まず心筋細胞と非心筋細胞を既報のごとく精製した²²⁾。多くの炎症細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞、CD11bc⁺細胞であるため、PE-conjugated TCR $\alpha\beta$ (R73)、CD11bc(OX-42)(Pharminogen, San Diego, CA)を使用して抗-PEマイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、MACSマグネット細胞ソーティングシステム(Miltenyi Biotech)により、非心筋細胞から $\alpha\beta$ T細胞、CD11bc⁺細胞を精製し、その他の細胞(多くは線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞など)を非心筋非炎症性細胞(NCNI細胞)として分離精製した。このように精製された4つの分画について、ヘプシジン、チトクロームオキシダーゼサブユニット6a2(Cox6a2)、BNP、フェロポルチンの遺伝子発現を検討した。Cox6a2は心臓内では心筋細胞のみに発現する遺伝子であり、コントロールとして用いた²³⁾。

心筋細胞の遺伝子発現の時間経過を検討するために、正常ラットおよび第6、9、12、15、18、30、60日のEAMラットから、上述の方法で心筋細胞分画を精製し、ヘプシジン、Cox6a2の遺伝子発現を測定した。

ヘプシジンとIL-6の関係、BNPとIL-6の関係を調べるために、正常ラットおよび第6、9、12、15、18、30、60日のEAMラット、アジュバントのみを注射したコントロールラットから心臓の一部を採取した。ヘプシジン/Cox6a2とIL-6/ γ アクチンおよびBNP/Cox6a2の遺伝子発現の比を測定し、その相関を調べた。

4. AMIモデルと細胞の精製方法

フィッシャーラットを塩化バントバルビタール(30mg/kg筋注)麻酔下に開胸し、冠動脈左前下

行枝を糸で縛り、心筋梗塞モデルを作成した。開胸し、前下行枝を縛らずに閉胸したラットをコントロールとした。第3日目にラットを殺処置し、前下行枝の糸をほどいた後に、EAMラットと同様に上述したように心筋細胞、非心筋細胞を分離精製し、ヘプシジン、Cox6a2、BNPの遺伝子発現を調べた。

正常ラット、第1、3、7日目の心筋梗塞ラットおよび第1日目のコントロールラットを殺処置し、コラゲナーゼ処理をせずにその心室筋の一部を採取し、ヘプシジン遺伝子発現の時間経過を調べた。また、ヘプシジン/Cox6a2とIL-6/ γ アクチンおよびBNP/Cox6a2の遺伝子発現の比を測定し、その相関を調べた。

5. ヒト心不全症例の心臓標本

心不全を呈した26症例の心筋生検あるいは心筋剖検の一部を標本として採取した(表1)。心筋生検に関しては、心臓カテーテル検査時に得られた一つの心筋生検標本を半分に分け、一方を組織学的な検索のために用い、もう一方を遺伝子発現の検索のために用いた。剖検標本に関しては、同様な組織学的検査および遺伝子発現検査のために、死後12時間以内に心筋の一部を採取した。遺伝子発現検査のための標本は採取後すぐにTrizol(Invitrogen, Tokyo, Japan)でホモジュネートし、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。後日RNAの抽出を後述のように行い、ヘプシジン、Cox6a2およびBNPの遺伝子発現について測定した。

6. RNAの抽出と定量的RT-PCR

上述した標本から総RNAをTrizolを用いて抽出した。AMIモデルは、心筋梗塞部位として白く変色した左室前壁領域からRNAを抽出し、非梗塞部位として赤い左室後壁領域からRNAを抽出した。このようにして抽出した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。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ラットのヘプシジン、Cox6a2、フェロポルチン、 γ アクチン、BNP、IL-

表 1 症例の臨床データ

| 症例番号 | 年齢/性別 | 診断 | 剖検・生検 | 治療 | NYHA心機能分類 | 結果 | 死亡の原因 |
|-----------------|-------|----------------|-------|-----------------------|-----------|----|-------|
| 病理学的に心筋炎と診断 | | | | | | | |
| 1 | 64/男 | 慢性心筋炎 | 剖検 | カテコラミン | IV | 死亡 | 心不全 |
| 2 | 61/男 | 劇症型心筋炎 | 剖検 | カテコラミン IABP | IV | 死亡 | 心不全 |
| 3 | 69/男 | 劇症型心筋炎 | 剖検 | カテコラミン IABP PCPS | IV | 死亡 | 心不全 |
| 4 | 47/男 | 劇症型心筋炎 | 剖検 | カテコラミン IABP PCPS | IV | 死亡 | 心不全 |
| 5 | 66/男 | 劇症型心筋炎 | 剖検 | カテコラミン IABP PCPS | IV | 死亡 | 心不全 |
| 6 | 36/男 | 急性心筋炎 | 生検 | カテコラミン 利尿剤 | IV | 生存 | |
| 7 | 57/男 | 劇症型心筋炎 | 剖検 | カテコラミン IABP PCPS | IV | 死亡 | 心不全 |
| 病理学的に心筋炎ではないと診断 | | | | | | | |
| 1 | 61/女 | 拡張型心筋症 | 剖検 | カテコラミン | IV | 死亡 | 心不全 |
| 2 | 53/女 | 心臓弁膜症 | 剖検 | カテコラミン 利尿剤 | IV | 死亡 | 心不全 |
| 3 | 22/男 | 拡張型心筋症 | 剖検 | カテコラミン | IV | 死亡 | 心不全 |
| 4 | 20/女 | 原発性肺高血圧症 | 剖検 | カテコラミン | IV | 死亡 | 心不全 |
| 5 | 54/男 | 拡張型心筋症 | 生検 | ARB 利尿剤 | II | 生存 | |
| 6 | 50/女 | 心サルコイドーシス(治癒期) | 生検 | (-) | I | 生存 | |
| 7 | 59/男 | 拡張型心筋症 | 生検 | ACEI ジギタリス 利尿剤 | I | 生存 | |
| 8 | 25/男 | 好酸球性心筋症(治癒期) | 生検 | (-) | I | 生存 | |
| 9 | 59/女 | 感染性心内膜炎 | 剖検 | カテコラミン IABP PCPS | IV | 死亡 | 心不全 |
| 10 | 32/男 | 拡張型心筋症 | 生検 | ACEI ジギタリス 利尿剤 | I | 生存 | |
| 11 | 58/男 | ミトコンドリア脳筋症 | 生検 | ARB ジギタリス 利尿剤 β ブロッカー | III | 生存 | |
| 12 | 54/男 | 高血圧性心筋症 | 生検 | ARB 利尿剤 | II | 生存 | |
| 13 | 33/男 | 拡張型心筋症 | 生検 | ARB 利尿剤 | III | 生存 | |
| 14 | 31/女 | 頻脈誘発性心筋症 | 生検 | カテコラミン | IV | 死亡 | 多臓器不全 |
| 15 | 69/男 | 頻脈誘発性心筋症 | 生検 | ARB 利尿剤 β ブロッカー | III | 生存 | |
| 16 | 73/男 | 拘縮型心筋症 | 生検 | ARB ジギタリス 利尿剤 β ブロッカー | II | 生存 | |
| 17 | 44/女 | 心アミロイドーシス | 生検 | ARB 利尿剤 | II | 生存 | |
| 18 | 49/男 | 肥大型心筋症 | 生検 | 利尿剤 | III | 死亡 | 敗血症 |
| 19 | 46/男 | 拡張型心筋症 | 生検 | ACEI ジギタリス 利尿剤 | III | 生存 | |

IABP, 大動脈内バルーンポンピング, PCPS, 経皮的心肺補助装置, ARB, アンジオテンシンII受容体阻害薬, ACEI, アンジオテンシン変換酵素阻害薬

6, ヒトのヘプシジン, Cox6a2, BNP のプラスミドは, 以前報告したプライマー¹⁹⁾²⁰⁾²³⁾ および表 2 に示すプライマーを用いて PCR を行い, pGEM-T easy ベクターに挿入して 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, 上述した同じプライマー, 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 °C, 次に 95 °C 10 秒, 62 °C 10 秒, 72 °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. 細胞の染色

心筋梗塞の心臓から精製した非心筋細胞をサイトスピンにかけてスライド標本を作製し, May-Giemsa 染色を行った. 心筋細胞の精製分画は, 染

色をせずに倒立顕微鏡で観察した.

8. 統計解析

統計解析は one-way ANOVA と Bonferroni の多群間比較検定あるいは対応のない t 検定を用いた. $p < 0.05$ を有意とし, 定量的 RT-PCR で求めた値は平均±標準誤差で示した. 対数変換した IL-6/ γ アクチンの mRNA のコピー数比とヘプシジンあるいは BNP/Cox6a2 の mRNA のコピー数比の相関については回帰分析を用い, そのデータはピアソン相関係数およびフィッシャーの Z 変換 test で解析した.

結 果

1. 心臓内におけるヘプシジンの産生細胞

第 18 日目の EAM 心臓の分離精製分画の解析では, ヘプシジンの発現細胞は心筋細胞であった.

表2 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 hepcidin | 5'-ctgtctcctgcttctcctcct-3' | 5'-ctatgttatgcaacagagaccaca-3' |
| rat Cox6a2 | 5'-cgcatccaaggagaccac-3' | 5'-aaaggattgacgtgggatt-3' |
| rat ferroportin | 5'-atgctaccattagaaggattgacc-3' | 5'-cattcaagtcacggatgttagag-3' |
| human hepcidin | 5'-atggcactgagctcccagat-3' | 5'-cagcacatcccacactttgat-3' |
| human BNP | 5'-ctcctgctcttcttgcactg-3' | 5'-gggccatcttctcccctcaag-3' |
| human Cox6a2 | 5'-gtctgctgacctctgtgctg-3' | 5'-gtggctattgtggaacagagtgt-3' |

Cox6a2 および BNP も心臓では心筋細胞のみに発現すると考えられているが²⁴⁾²⁵⁾、同様に心筋細胞分画にその発現が認められた。一方、ヘプシジンが結合するとされるフェロポルチンは NCNI 細胞分画、心筋細胞分画、CD11bc⁺細胞分画に発現が認められた(図1)。第3日目のAMIのヘプシジン発現細胞も、心筋細胞にみられた(図2A)。なお、非心筋細胞で少量のヘプシジンの発現を認めたが、それは損傷を受けた心筋細胞の混入が原因と考えられた。(サイトスピン標本で損傷を受けた心筋細胞が非心筋細胞分画に観察され、図2B, C, Eに示すようにBNPやCox6a2も同様に非心筋細胞分画に少量混ざっている理由から)。

2. 心筋細胞中のヘプシジン発現の推移

心臓中のヘプシジンは心筋細胞のみに発現がみられることから、EAMの心臓から精製した心筋細胞分画におけるヘプシジンの遺伝子発現量の推移を調べた。ヘプシジンは、EAMの心筋細胞で第9日目頃から発現が増強し始め、第12日目にピークとなり、その後徐々に減少した(図3A)。一方、Cox6a2の遺伝子発現はいつもほぼ一定であった(図3B)。それ故、ヘプシジン/Cox6a2のmRNA比の変動は、ヘプシジンのmRNAのレベルと概ね同じであり、さらに細胞をコラゲナーゼ処理にて分離していないそのままの心臓標本から得られたヘプシジン/Cox6a2のmRNA比の変動とほぼ同様であった(図3C, 4A)。このような理由から、たとえ心臓に様々な炎症細胞が浸潤していよ

うとも、心筋細胞の単位RNAあたりのヘプシジンの量と、そのままの心臓標本からえられたヘプシジン/Cox6a2のmRNAの比は、ほぼ比例すると考えられた。皮膚の炎症でも心臓中のヘプシジンの発現増加があるとの報告があるが¹⁶⁾、アジュバントのみを注射した第18日目のコントロールラットの心臓では、第18日目のEAMの心臓よりもヘプシジン/Cox6a2の値は明らかに低かった(図4A)。

正常心臓の心筋細胞および非梗塞部位の心筋細胞はあまり減少しないと考えられるが、梗塞部位の心筋細胞は非心筋細胞に比べてかなり減少すると考えられるため、精製しないそのままの心臓組織からヘプシジンの発現量を調べても、心筋細胞あたりのヘプシジンの発現量を比較することは困難である。しかし、心筋梗塞心から精製された心筋細胞中のCox6a2のmRNAの量は、正常の心臓から精製された心筋細胞中のCox6a2のmRNAと同様であり(図5A)、かつCox6a2とヘプシジンは心臓では心筋細胞のみで発現が認められることから(図2A, B)、ヘプシジン/Cox6a2のmRNAの比は、心筋梗塞心の様々な場所での単位心筋細胞あたりのヘプシジンの発現量に比例すると考えられる。心筋梗塞部位でのヘプシジン/Cox6a2のmRNAの比は第1日目で最も高く、その後徐々に低下した。第1日目の非心筋梗塞部位とコントロールラットの心臓のヘプシジン/Cox6a2のmRNAの比は、正常の心臓のそれよりも少し高い値であるが有意ではなかった(図5B)。このコントロールラットでのわずかな値上

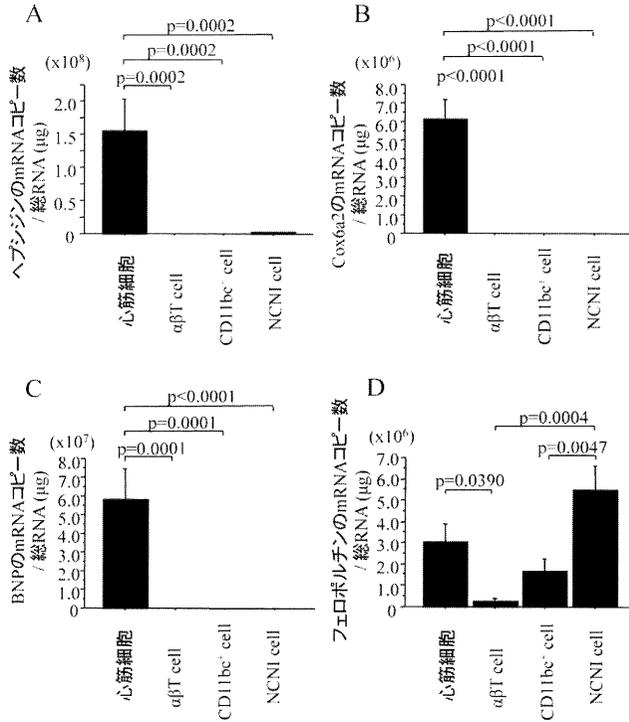


図 1

第 18 日目の EAM ラットを殺処置し、心筋細胞分画 (n = 5), $\alpha\beta$ T 細胞分画 (n = 5), CD11bc⁺ 細胞分画 (n = 5), NCNI 細胞分画 (n = 6) を分離精製した。A, ヘプシジンの mRNA コピー数/総 RNA (μ g); B, Cox6a2 の mRNA コピー数/総 RNA (μ g); C, BNP の mRNA コピー数/総 RNA (μ g); D, フェロポルチンの mRNA コピー数/総 RNA (μ g)。エラーバーは標準誤差。

昇は、開胸手術創の炎症が原因である可能性が考えられた。

3. IL-6 とヘプシジンの関係

ヘプシジンの発現は、IL-1 や TNF- α によってではなく、IL-6 によって誘導されると考えられている⁷⁾²⁶⁾。EAM 心臓中の IL-6 は NCNI 細胞で主に産生されるため²⁰⁾、EAM の心臓中の IL-6 はパラクラインとして働き、心筋細胞のヘプシジンを発現させると考えられる。このような理由で、心臓中の IL-6 の量を IL-6 mRNA コピー数/ γ アクチン mRNA コピー数で表し、心筋細胞中のヘプシジンの量をヘプシジン mRNA コピー数/Cox6a2 mRNA コピー数の比で表し、その結果を統計解析した。EAM から得られたデータでは、対数変換した IL-6 mRNA コピー数/ γ アクチン mRNA コピー数の比とヘプシジン mRNA コピー数/Cox6a2 mRNA コピー数の比の関係は、有意で強い正の相関関係を示した ($r = 0.781, p < 0.0001$) (図 5D)。また、AMI から得られたデータでも、それらは有意で強い正の相関関係を示した ($r = 0.563, p = 0.0003$) (図 4C)。一方、IL-6

一方、IL-6

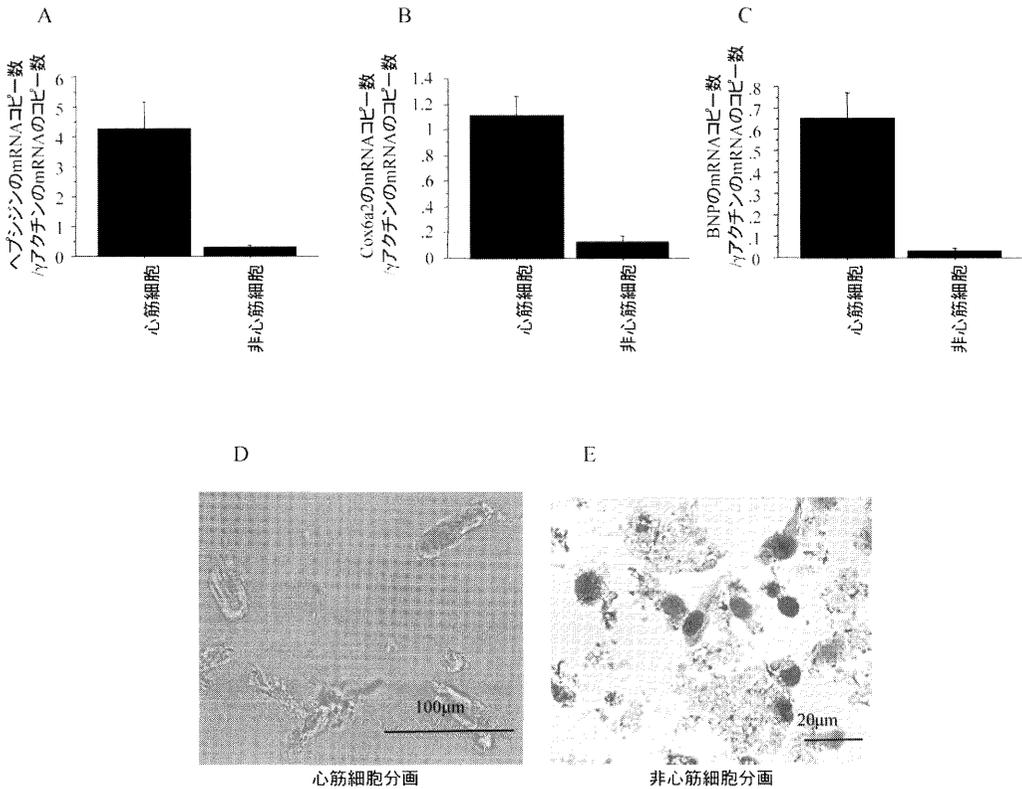


図2

第3日のAMIラットを殺処置し、心筋細胞分画 (n = 5) と非心筋細胞分画 (n = 5) を分離精製した。A, ヘプシジンの mRNA コピー数/ γ アクチンの mRNA コピー数; B, Cox6a2 の mRNA コピー数/ γ アクチンの mRNA コピー数; C, BNP の mRNA コピー数/ γ アクチンの mRNA コピー数; D, 心筋細胞分画の倒立顕微鏡像; E, サイトスピン処理した非心筋細胞分画 (May-Giemsa 染色)。損傷を受けた心筋細胞の混入がみられる。エラーバーは標準誤差。

mRNA コピー数/ γ アクチン mRNA コピー数の比と BNP mRNA コピー数/Cox6a2 mRNA コピー数の比の関係は、EAM でも AMI のデータでも有意な正の相関関係を示したが、IL-6 とヘプシジンとの相関係数と比較すると、小さい相関係数を示した (EAM, $r = 0.516$, $p = 0.0052$; AMI, $r = 0.387$, $p = 0.019$) (図 4D, 5E)。

4. ヒト心筋炎の心臓におけるヘプシジンの発現

ヒトの剖検心、生検心には様々な細胞が存在し、

その細胞の割合は検体ごとに異なるので、心筋細胞が発現する mRNA の量の割合は、検体によって異なる。しかしながら、上述したように心臓中のヘプシジンと Cox6a2 が心筋細胞のみで発現されるのであれば、ヘプシジン/Cox6a2 の mRNA の量の比は、検体中の心筋細胞におけるヘプシジン/Cox6a2 の mRNA の量の比に相当すると考えられる。それゆえ、病理学的に診断された心筋炎と非心筋炎の心臓検体でその比を測定し比較したところ、心筋炎では有意に高かった ($0.0400 \pm$

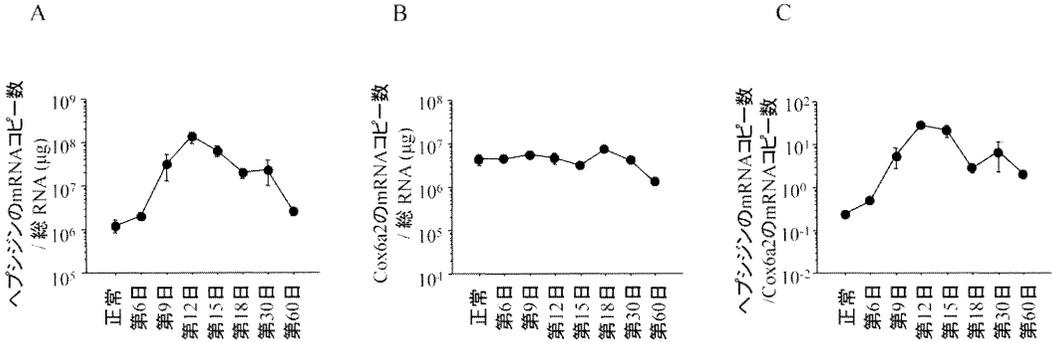


図 3

正常ラット (n = 4) と EAM ラット 第 6 日目 (n = 4), 第 9 日目 (n = 5), 第 12 日目 (n = 4), 第 15 日目 (n = 5), 第 18 日目 (n = 5), 第 30 日目 (n = 4), 第 60 日目 (n = 3) は殺処置した後, ランゲンドルフ装置還流下にコラゲナーゼ処置したのち, 金属篩を用いて心筋細胞を分離精製した. A, ヘプシジンの mRNA コピー数/総 RNA (μg); B, Cox6a2 の mRNA コピー数/総 RNA (μg); C, Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比. エラーバーは標準誤差.

0.0195 vs 0.0032 ± 0.0017, p = 0.0045). 一方, BNP/Cox6a2 の mRNA の量の比は, 両群間の差は有意ではなかった (58.5 ± 24.1 vs 42.3 ± 21.4, p = 0.68) (図 6).

考 察

最近, 皮膚の炎症や低酸素ストレスを与えたラットの心臓でヘプシジンが発現することが報告されたが¹⁶⁾, 今回の検討では, ヘプシジンが心筋炎および心筋梗塞部位の心筋細胞で強く発現することが示された. アジュバントのみを注射されたラットや開胸のみを行ったコントロールラットの心臓および非心筋梗塞部位の心臓では, ヘプシジンの発現は心筋炎の心臓や心筋梗塞部位の心臓よりも弱かった. これらの事実は, 全身的な状況よりも局所的な状況により, ヘプシジンの発現がより強い影響を受ける事を示していると考えられる. 実際に, 心臓の小片の標本から求めたヘプシジンの発現量は, IL-6 の発現量と強い正の相関を示していた. これは, 心臓中の NCNI 細胞が産生する IL-6 がその周りの心筋細胞に影響を与え, ヘ

プシジンの発現を増強させたものと推測させる.

フェロポルチンは細胞からの鉄の排出に関わっているが²⁷⁾, ヘプシジンが結合すると細胞内に移行し分解され, その作用が阻害される. フェロポルチンは心臓内では NCNI 細胞, 心筋細胞, CD11bc⁺細胞など, 様々な細胞に発現がみられた. 今回のデータから, 心筋炎や心筋梗塞部位の心筋細胞はサイトカインの影響によりヘプシジンを強く発現し, それらの細胞からの鉄の排出を抑えようとしたと考えられる. 鉄は貧血やヘモクロマトーシスだけでなく様々な疾患に関わっており, また, 酸素の運搬, ATP の産生, DNA 合成など, すべての生細胞にとって重要な代謝過程に必須のミネラルである. 一方, フリーの鉄や蛋白との結合の弱い鉄はフリーラジカルを産生し, 様々な障害を引き起こす原因にもなる²⁸⁾. 心筋細胞は鉄を多く含むため, 傷害を受けると鉄が放出され, 心筋炎や心筋梗塞の心臓では劇的に鉄の分布が変化しているものと考えられる. ヘプシジンは, 傷害を受けた心臓での鉄の分布を制御しているのではないかと思われるが, その詳細な役割に関しては今後の検討が必要であろう.

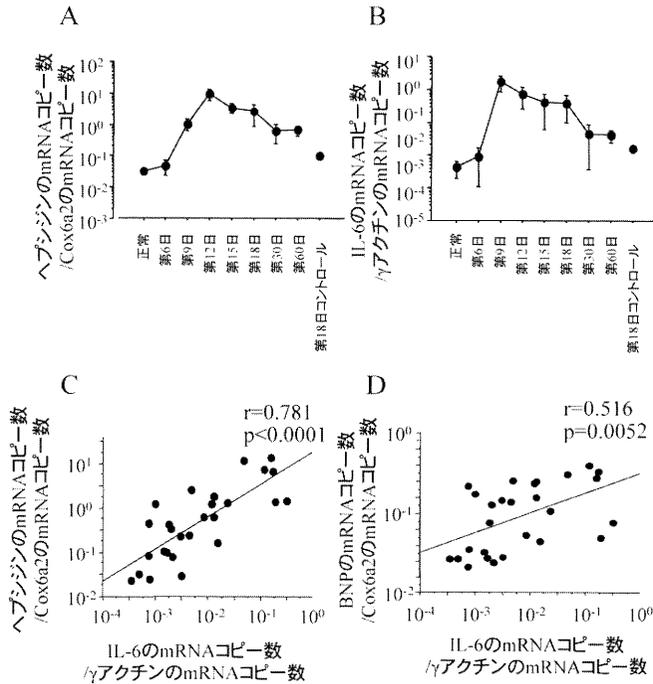


図4

正常ラット (n = 3) と EAM ラット 第 6 日目 (n = 4), 第 9 日目 (n = 3), 第 12 日目 (n = 3), 第 15 日目 (n = 5), 第 18 日目 (n = 4), 第 30 日目 (n = 3), 第 60 日目 (n = 4) と 第 18 日目のアジュバントのみを注射したコントロールラット (n = 4) は殺処置した後心臓を採取し, 各々の RNA を抽出し, 定量的 RT-PCR でヘプシジン, Cox6a2, γ アクチン, IL-6 および BNP の mRNA を測定した. A, Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比; B, γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比. エラーバーは標準誤差. C, 対数変換された γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比は, 対数変換された Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比に強い正の相関関係を示す. D, 対数変換された γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比は, 対数変換された Cox6a2 に対する BNP の mRNA の比に中程度の正の相関関係を示す.

心不全において貧血が進むのはよく知られている²⁹⁾. 心不全での貧血はしばしばエリスロポエチン不応性であり, 様々な機序が考えられている³⁰⁾. 心不全では炎症性サイトカインが増えているとの報告があるが³¹⁾³²⁾, 炎症性サイトカインは鉄代謝を乱し, 赤芽球前駆細胞に対する抑制作用を発

揮することによってエリスロポエチンの作用を阻害する事が知られている³⁰⁾³³⁾. 今回の検討で, 鉄の恒常性の中心的役割をするヘプシジンが, 心筋炎や心筋梗塞の心筋細胞で発現が増強していることを明らかにした. このことは, 心臓の中で産生された炎症性サイトカインが心筋細胞のヘプシジ

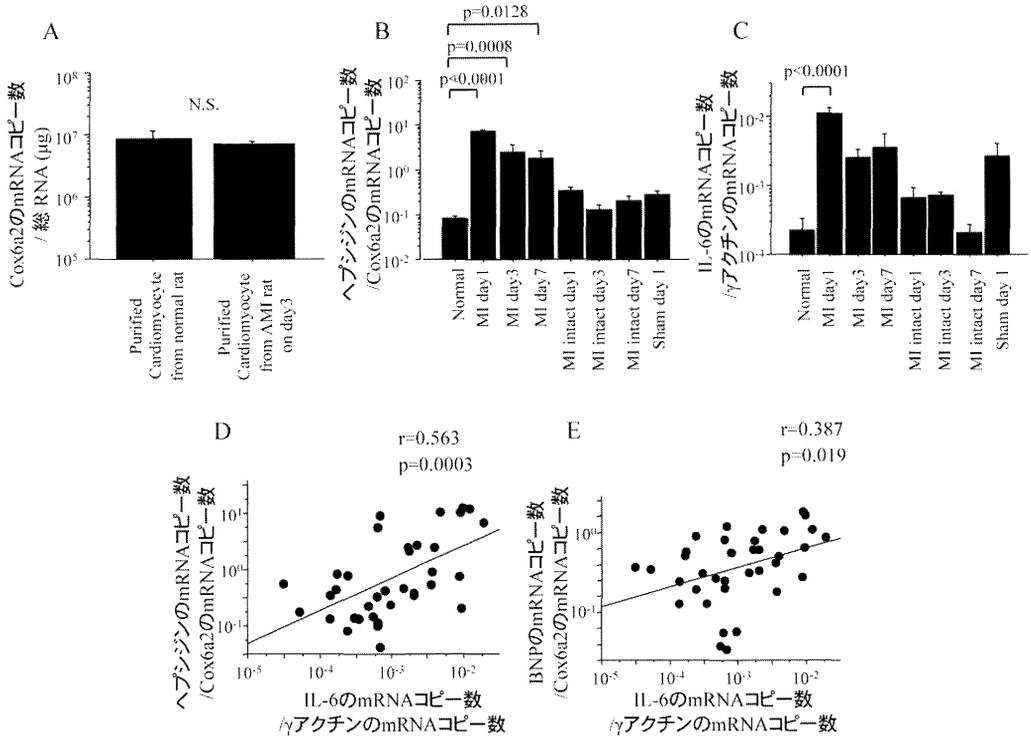


図 5

正常ラット (n = 4) と第 3 日目の AMI ラット (n = 5) は殺処置した後、心筋細胞を分離精製した。正常ラット (n = 7) と心筋梗塞ラット 第 1 日目 (n = 6), 第 3 日目 (n = 4), 第 7 日目 (n = 4) と開胸のみしたコントロールラット (n = 6) は殺処置した後心臓を採取し、各々の RNA を抽出し、定量的 RT-PCR でヘプシジン, Cox6a2, γ アクチン, IL-6 および BNP の mRNA を測定した。A, 正常ラットおよび第 3 日目の AMI ラットから精製された心筋細胞分画中の Cox6a2 の mRNA コピー数/総 RNA (μ g); B, Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比; C, γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比。MI は心筋梗塞部位で白くなった左室前壁。MI intact は非心筋梗塞部位で赤い左室後壁。Sham は開胸のみを行ったラット。エラーバーは標準誤差。正常群と他群との有意差を示す。D, 対数変換された γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比は、対数変換された Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比に高い正の相関関係を示す。E, 対数変換された γ アクチンに対する IL-6 の mRNA の比は、対数変換された Cox6a2 に対する BNP の mRNA の比にやや弱い正の相関関係を示す。

ンの発現を誘導し、その後貧血を引き起こす可能性を示唆しているのかもしれない。いずれにせよ、何らかの状況下で心筋細胞はヘプシジンを発現し、不全心はヘプシジンを分泌する臓器の一つであることが示唆された。不全心におけるヘプシジンの役割、貧血との関連につき今後検討が必要と

思われる。

結 語

ラット心筋炎、心筋梗塞で、心筋細胞がヘプシジンを発現することが示された。ヒトの心筋炎で

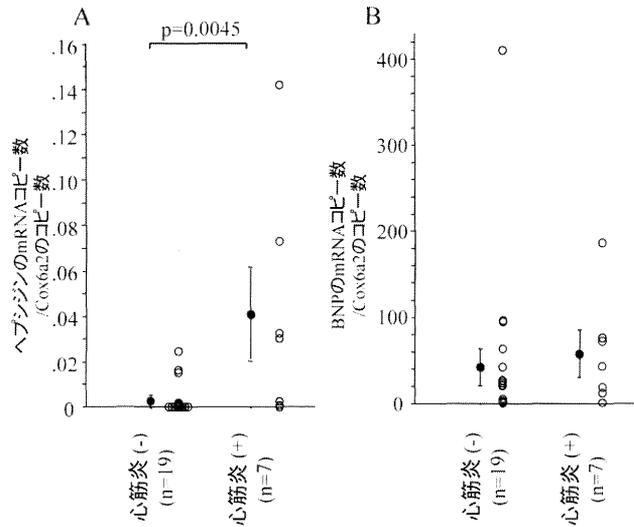


図6

心不全症例の生検および剖検の心臓標本から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR でヘプシジン、Cox6a2 および BNP の mRNA を測定した。A, Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比; B, Cox6a2 に対する BNP の mRNA の比。Cox6a2 に対するヘプシジンの mRNA の比は心筋炎症例で有意に高値であったが、BNP の mRNA の比は両群間で有意差はなかった。エラーバーは標準誤差。対応のない t 検定を行った。

も同様にヘプシジンの発現が亢進すると考えられ、炎症性サイトカイン IL-6 との相関が示唆された。今後、心臓でのその役割を十分検討する必要があると考えられる。

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の講師 埴 晴雄先生、同助教 加藤公則先生、および同講師 鳥羽 健先生に深謝致します。

文 献

- 1) Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P and Adermann K: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 480: 147-150, 2000.
- 2) Park CH, Valore EV, Waring AJ and Ganz T: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810, 2001.
- 3) Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A and Ganz T: Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 101: 2461-2463, 2003.
- 4) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T and Kaplan J: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093, 2004.

- 5) Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A and Vaulont S: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 110: 1037 - 1044, 2002.
- 6) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P and Loreal O: A new mouse liver - specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811 - 7819, 2001.
- 7) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK and Ganz T: IL - 6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271 - 1276, 2004.
- 8) Aisen P, Enns C and Wessling - Resnick M: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 940 - 959, 2001.
- 9) Ganz T: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 102: 783 - 788, 2003.
- 10) Halliwell B and Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion - dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307: 108 - 112, 1992.
- 11) Choi SO, Cho YS, Kim HL and Park JW: ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT - 3. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 312 - 317, 2007.
- 12) Baron CP and Andersen HJ: Myoglobin - induced lipid oxidation. A review. *J Agric Food Chem* 50: 3887 - 3897, 2002.
- 13) Walters FP, Kennedy FG and Jones DP: Oxidation of myoglobin in isolated adult rat cardiac myocytes by 15 - hydroperoxy - 5,8,11,13 - eicosatetraenoic acid. *FEBS Lett* 163: 292 - 296, 1983.
- 14) Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ and Backx PH: Taurine supplementation reduces oxidative stress and improves cardiovascular function in an iron - overload murine model. *Circulation* 109: 1877 - 1885, 2004.
- 15) Turoczi T, Jun L, Cordis G, Morris JE, Maulik N, Stevens RG and Das DK: HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res* 92: 1240 - 1246, 2003.
- 16) Merle U, Fein E, Gehrke SG, Stremmel W and Kulaksiz H: The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 148: 2663 - 2668, 2007.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Frangogiannis NG: The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal.* 8: 1907 - 1939, 2006.
- 22) 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.
- 23) Parsons WJ, Williams RS, Shelton JM, Luo Y, Kessler DJ and Richardson JA: Developmental regulation of cytochrome oxidase subunit VIa isoforms in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol* 270: H567 - 574, 1996.
- 24) Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Kawana M, Nishikawa T, Hosoda S, Tanaka I, Yoshimi T, Yoshihara I, Inagami T, Uemura H and Demura H: Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide coexist in the secretory granules of human cardiac myocytes. *Am J Hypertens* 4: 909 - 912, 1991.
- 25) Schlerf A, Droste M, Winter M and Kadenbach B: Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIa from heart and liver of the rat. *Embo J* 7: 2387 - 2391, 1988.
- 26) Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW and Muckenthaler MU: STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 109: 353 - 358, 2007.
- 27) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC and Zon LI: Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776 - 781, 2000.
- 28) Mladenka P, Simunek T, Hubl M and Hrdina R: The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res* 40: 263 - 272, 2006.
- 29) Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Leibovitch E, Brosh D, Laniado S, Schwartz D, Yachnin T, Shapira I, Gavish D, Baruch R, Koifman B, Kaplan C, Steinbruch S and Iaina A: The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. *J Am Coll Cardiol* 35: 1737 - 1744, 2000.
- 30) van der Putten K, Braam B, Jie KE and Gaillard CA: Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 47 - 57, 2008.
- 31) Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG and Mann DL: Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 103: 2055 - 2059, 2001.
- 32) Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM and Packer M: Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323: 236 - 241, 1990.
- 33) Macdougall IC and Cooper AC: Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 17: 39 - 43, 2002.

(平成21年1月20日受付)