
原 著

ラット実験的自己免疫性心筋炎に対する
Secretory leukocyte protease
inhibitor の効果

林 学

新潟大学大学院医歯学総合研究科

循環器学分野

(主任：相澤義房教授)

**The Effect of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor on
Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats**

Manabu HAYASHI

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

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【背景】虚血性心疾患，肺高血圧，ウイルス性心筋炎などの心血管系疾患動物モデルにおいて，近年エラスターゼインヒビターによる治療効果が報告されている．Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) はエラスターゼ，カテプシン G，プロテイナーゼ-3，肥満細胞キマーゼなどのセリンプロテアーゼを抑制し呼吸器疾患モデルでの抗炎症効果が知られているが心血管系に対する効果は不明である．本実験ではラット実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) に対する SLPI の効果を検討した．

【方法】実験① 24 匹の Lewis ラットを心筋ミオシンで感作 (day0) し，day-2, 5 に SLPI-IgG1Fc 融合遺伝子をプラスミドベクターを用いて筋肉内に導入し (N=12, SLPI 群)，対照群には empty プラスミドを導入した (N=12, コントロール群)．day17 に心体重比を測定，各群半数についてカテーテルによる血行動態の測定，病理組織学的検討を行った．実験② 16 匹の Lewis ラットを day0 に感作し，8 例に day1 から 20 まで C 端末半量体 SLPI (1/2SLPI) を腹腔内投与した (1/2SLPI 群, N=8)．対照には PBS を投与し (N=8, PBS 群) day21 に心体重比，血行動態

Reprint requests to: Manabu HAYASHI
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
新潟大学医学部内科学第一教室 林 学

を評価した。

【結果】実験①では心体重比はコントロール群に比して SLPI 群は有意に低値であった。病理組織で心筋壊死・線維化領域は SLPI 群で有意に減少していた。血行動態の指標は有意ではないが SLPI 群で改善傾向を認めた。実験②では 1/2SLPI 群と PBS 群で各項目に差は認められなかった。

【結論】SLPI は EAM に対し治療効果を有する可能性があるが、持続的投与が必要と考えられる。

キーワード：心筋炎, 自己免疫, SLPI, プロテアーゼインヒビター

緒 言

心筋炎は心筋の炎症であり、ウイルス、細菌などの感染、あるいは自己免疫、薬物、金属など多種多様な原因によって引き起こされる¹⁾。ラット実験的自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis, EAM) はミオシン感作により惹起される疾患であり、重篤なうっ血心不全を呈し、病理所見として多核巨細胞が認められ、ヒトの巨細胞性心筋炎の動物モデルと捉えられ²⁾、病態の解明、治療方法の開発に用いられている³⁾⁴⁾。

炎症部位では様々な炎症細胞が浸潤し、炎症細胞から放出される蛋白分解酵素による組織破壊は病変の形成を促進させると考えられる。主要な炎症細胞である好中球からはエラスターゼ、カテプシン G、プロテイナーゼ-3 などのセリンプロテアーゼが放出されるが、これらは細胞外マトリックスを分解する。マトリックスの一部である基底膜の破壊は、血管透過性を亢進させ炎症細胞のさらなる浸潤をもたらすと考えられる。近年、虚血性心疾患や大動脈瘤の血管壁の病変部において、エラスターゼ活性が亢進していることも示され、病態の形成、進展に関わっている⁵⁾⁶⁾。また肺高血圧、バルーン傷害後の血管内膜肥厚、ウイルス性心筋炎などの動物モデルではエラスターゼインヒビターによる治療効果が報告されている^{7)–10)}。

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) は好中球エラスターゼ、カテプシン G、プロテイナーゼ-3、肥満細胞キマーゼなど、多くのセリンプロテアーゼに対して抑制効果を有する物質である¹¹⁾¹²⁾。SLPI は二つのドメインより形成され、各

ドメインは互いに相同な構造を持っている。プロテアーゼインヒビターとしての首座はカルボキシルドメインであり、アミノ端ドメインは細菌、真菌、HIV-1 やインフルエンザ A などの感染抑制効果を有するとされている¹¹⁾¹²⁾。SLPI は呼吸器疾患や慢性関節リウマチの動物モデルでの治療効果が報告されている¹¹⁾¹³⁾。

プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビターと EAM の関連はいまだ不明であり、また心血管系における SLPI の効果も、いまだ報告されていない。そこで本研究では、ラット EAM における SLPI の効果を検討した。

対象と方法

1. 心筋炎の作成

9 週齢の雄性 Lewis ラットを心筋ミオシンで感作して EAM を作成した。心筋ミオシンは既報のごとくブタ心室筋より精製し、結核死菌濃度を 11mg/ml に調整した完全フロイントアジュバントと同量づつ混和し、ラットの両足底に皮下注射した²⁾。

2. プラスミド作成

SLPI の高い血中濃度を、より長期間得るために、IgG の Fc 部との融合蛋白を形成するようプラスミドを設計した。始めに、ラット脾の cDNA を鋳型とし PCR 法を用いてラット IgG1Fc を複製し、プラスミドベクター pCAGGS の EcoR I 部に挿入した。このとき同時に 5' 端に Swa I, Not I 制限酵素配列も挿入した (センスプライマー gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcggtgccca

gaaactgtg, アンチセンスプライマー gagagaga GAATTCactctggggtcatttaccggagagtgaggag). 同部の間に EAM ラット心の cDNA を鋳型として複製したラット SLPI を挿入した (センスプライマー gaGAATTCATTTAAATgaagtctctgCGGCCGCcactgggggaaggcagacttt). 以上の方法で, pCAGGS-rat SLPI-rat IgG1Fc を作成し, その治療効果の検討に用いた.

3. 筋肉内遺伝子導入

ラットをジエチルエーテルで麻酔した後に, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整したプラスミドを 50 μL ずつ前脛骨筋に 4 回注射し, 直後に既報のごとく electrical pulse を加えた¹⁴⁾.

4. C 端側半量体 SLPI (1/2 SLPI)

上述したようにプロテアーゼインヒビターとしての効果の首座は SLPI のカルボキシ端側ドメインである. このカルボキシ端側半量体 (1/2 SLPI) をリコンビナント蛋白 (ヒト遺伝子由来) として (帝人株式会社より供与) 治療実験に用いた.

5. 実験プロトコール

実験①遺伝子治療

24 匹の Lewis ラットを第 0 日に感作し, 第 2 日および第 5 日に筋肉内遺伝子導入を行った. 治療群には pCAGGS-rat SLPI-rat IgG1Fc を導入し (SLPI 群, N=12), 対照群には目的遺伝子を挿入していない empty pCAGGS を導入した (コントロール群, N=12). EAM の急性期に相当する第 17 日に屠殺し評価を行った. 全例について, 心体重比を測定した. 各群 6 匹ずつの半数に対して, ハロセン吸入麻酔下にカテーテルを挿入し, 中心静脈圧 (CVP), 平均血圧 (mAP), 左室拡張末期圧 (LVEDP), 収縮期圧最大上昇速度 (dp/dt max), 拡張期最大圧下降速度 (dp/dt min) を測定した¹⁵⁾. 屠殺後, 心臓を摘出し中部横断切片をホルマリン固定, パラフィン包埋処理後, Azan-Mallory 染色による病理組織学的検討を行った. 病理組織での心筋壊死・線維化領域はカラーイメージ画像解析ソフトウェア (Mac SCOPE ver. 2.6, MITANI Corp.) を用いて定量的に解析した.

実験② 1/2SLPI 腹腔内投与

16 匹の Lewis ラットを第 0 日に感作した. 治療群には 1/2SLPI 30mg/kg/日を PBS に溶解し 1 日 2 回に分け腹腔内投与した (1/2SLPI 群, N=8). 対照群には同量の PBS を投与した (PBS 群, N=8). 第 1 日から第 20 日まで投与を行い, 第 21 日に屠殺し評価を行った. 全例について心体重比および実験①と同じくカテーテルを挿入し, mAP, CVP, LVEDP, dp/dt max, dp/dt min を測定した.

実験①, ②ともに二群間で各パラメーターの比較をした. また血行動態の各パラメーターと心体重比の相関も検討した. 表値は平均±標準誤差で表し, 群間比較は対応のない t 検定を用いて行い, $p < 0.05$ を統計学的有意とした. 相関分析は単回分析を用いて行った.

結 果

1. 心体重比

実験①では SLPI 群の心体重比はコントロール群に比して有意に低下を認めた (SLPI 群; $4.75 \pm 0.12\text{mg/g}$ 対コントロール群; $5.44 \pm 0.18\text{mg/g}$, $p < 0.01$). 実験②では 1/2SLPI 群と PBS 群に明らかな差は認められなかった (1/2SLPI 群; $5.59 \pm 0.16\text{mg/g}$ 対 PBS 群; $5.57 \pm 0.26\text{mg/g}$, n.s.) (図 1 A).

2. 血行動態パラメーター

カテーテルによる血行動態の計測では, 実験①, ②ともにそれぞれの 2 群間で明らかな差は認められなかった. しかし, 実験①では SLPI 群がコントロール群に比して良好な傾向を示した. 実験①では逆に, 1/2SLPI 群は PBS 群に比較して悪化傾向を示し, 平均血圧に関しては, SLPI 群が PBS 群に比べ有意に低値であった (1/2SLPI 群; $53.5 \pm 4.7\text{mmHg}$ 対 PBS 群; $67.4 \pm 2.3\text{mmHg}$, $p < 0.05$) (表 1).

3. 病理組織による心筋壊死・線維化評価

実験①の Azan-Mallory 染色組織標本を用い心筋壊死・線維化面積を全体の面積に対するパーセンテージとして表し (面積率), SLPI 群とコントロール群の比較を行った (図 1 B). SLPI 群の壊

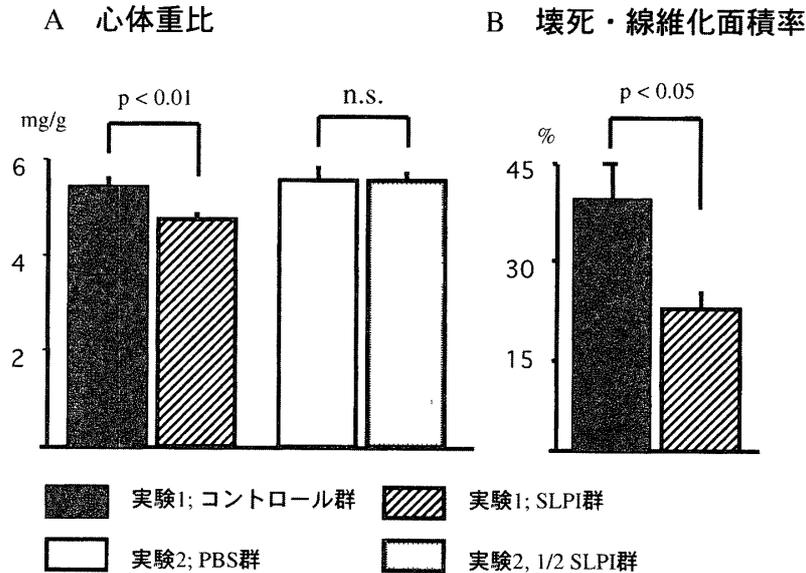


図1 心体重比, 面積率の比較

心体重比は実験①ではコントロールに比してSLPI群が有意に低値であったが, 実験②には明らかな差を認めなかった (A). 壊死・線維化面積率はSLPI群がコントロールに比して有意に低値であった (B).

表1 血行動態パラメーター

	実験1		実験2	
	コントロール群	SLPI群	PBS群	1/2 SLPI群
CVP (mmHg)	5.2 ± 0.6	4.1 ± 0.5	7.7 ± 0.8	7.7 ± 1.3
mAP (mmHg)	61 ± 5	68 ± 2	67 ± 2	53 ± 5 *
LVEDP (mmHg)	13 ± 2	10 ± 1	16 ± 2	15 ± 2
+ dp/dt max (mmHg/sec)	2717 ± 252	3350 ± 162	3043 ± 141	2424 ± 371
- dp/dt min (mmHg/sec)	2736 ± 332	3092 ± 96	2674 ± 200	2216 ± 342

数値はすべて平均±標準誤差. CVP; 中心静脈圧, mAP; 平均血圧, LVEDP; 左室拡張末期圧, dp/dt max; 収縮期圧最大上昇速度, dp/dt min; 拡張期最大圧下降速度

*p < 0.05 (実験2; PBS群に対する検定)

死・線維化面積はコントロールに比して有意に低下を認めた (SLPI群; 22.3 ± 2.6 %対コントロール群; 39.7 ± 16.8 %, p < 0.05).

4. 各パラメーター間の相関

実験①では心体重比と面積率, 血行動態パラメーターのあいだにはLVEDPを除き, 良好な相関が認められた (図2). 実験②では心体重比と血行動態パラメーターの相関分析を行ったが, 相関は認められなかった.

考 察

EAMはT細胞を介した炎症性疾患であり, 活性化T細胞の輸注による疾患転移が可能であることが知られている¹⁶⁾. 病変部に浸潤する炎症細胞の主体はマクロファージとCD4+T細胞で, CD8+T細胞とB細胞は殆ど認められない¹⁷⁾. SLPIは広範囲のセリンプロテアーゼ群を抑制するが, これらプロテアーゼ群は好中球やマクロフ

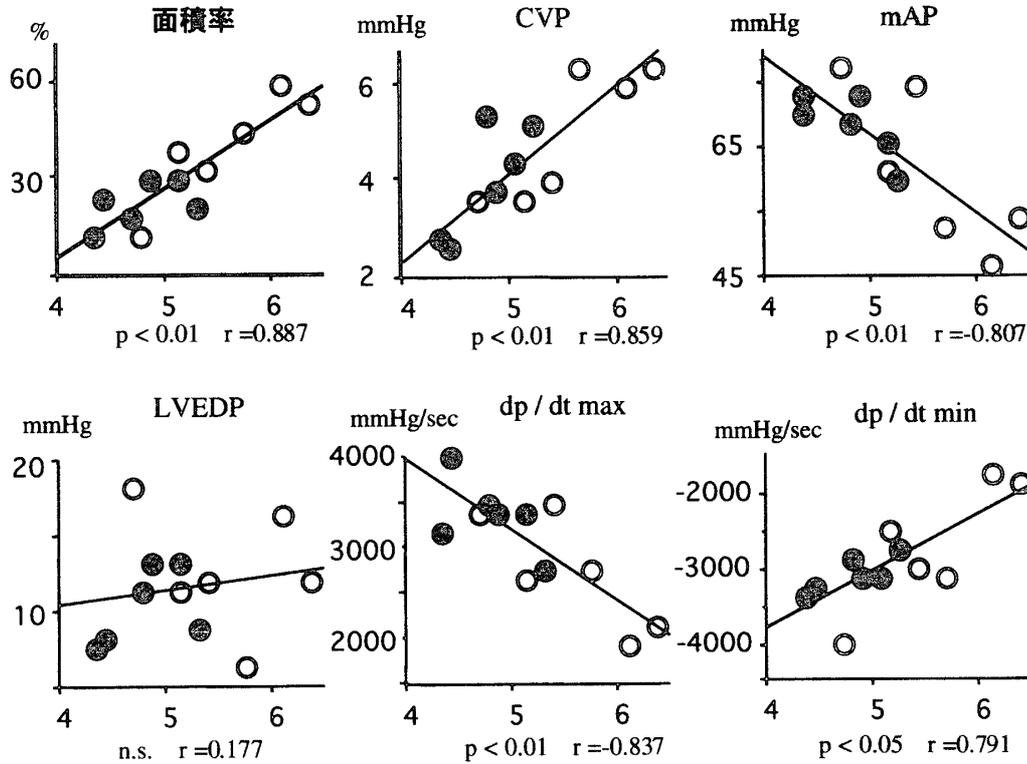


図2 実験①における心体重比と各パラメーターの相関

実験①では LVEDP を除き、心体重比と各パラメーターは良好な相関を認めた。横軸はすべて心体重比 (mg/g)。
r ; 相関係数, ○ ; コントロール群, ● ; SLPI 群

ァージより放出される。セリンプロテアーゼは細胞外マトリックス破壊をもたらす。基底膜はエラスチンより構成されセリンプロテアーゼの標的物質の一つである。基底膜の破壊は透過性の亢進をもたらす。結果として炎症細胞の浸潤を容易とする。脳心筋炎ウイルスを用いたウイルス性心筋炎モデルでは、合成エラストラーゼインヒビターや SLPI の相同物質であるエラフィンによる炎症の抑制効果が報告されている⁸⁾⁹⁾。SLPI も同様な機序による抗炎症効果が期待される。

今回の実験系では実験①については、心体重比、壊死・線維化面積率では SLPI-IgG1Fc 融合遺伝子による治療効果が得られた。血行動態では有意差はないものの、治療群で改善傾向を認め、各パラメーターと心体重比との間に良好な相関を認めた。カテーテル評価は全体の半数に限られるため有意差を示すに至らなかったと考えられる。一方、

実験②では 1/2SLPI 腹腔内投与では治療効果が得られず、平均血圧は治療群が有意に低値であった。しかし、心体重比と他のパラメーターには相関を認めず、明らかな効果はなかったと考えられる。

実験①と②では、1) SLPI に対する持続的暴露と間欠的暴露の差、2) ラット遺伝子とヒト遺伝子由来リコンビナント蛋白の差、3) 二量体とカルボキシ端半量体の差、4) 前者は IgG1Fc 融合物質であることなどがあげられる。2) についてはヒト 1/2SLPI がラットエラストラーゼを抑制することは既に確認されており、3) についてはプロテアーゼ抑制効果の主体はカルボキシ端であることから、両実験結果に差を生じた原因としては否定的である。アミノ端は抗ウイルスおよび細菌作用が報告されているが、今回の実験で用いたのは自己免疫機序の心筋炎でありこれらの関与は小さ

いと思われる。4) に関して、ガンマグロブリン大量投与による EAM の治療効果が報告されており¹⁸⁾、大量ガンマグロブリンによる樹状細胞の Fc レセプターのプロックが機序として考えられている。しかし、今回用いた筋肉内遺伝子導入で得られる目的物質の血中濃度は最大で 10 ~ 20ng/ml であり、生体本来が有するラット IgG 濃度はおよそ 15mg/ml であることから、その影響は否定的でと考えられる。1) については、SLPI は半減期が約 30 分と短く、不安定物質とされており¹²⁾、投与形態の違いが大きく影響したものと推測される。腹腔内埋め込み浸透圧ポンプによる持続投与方法も可能性があるが、3 週にわたる体内留置下では SLPI が変性する可能性が高いことから、工夫を要すものと思われる。従って遺伝子導入による治療が SLPI のデリバリーシステムとして優れていると考えられる。

SLPI はアミノ端側が抗ウイルス、細菌作用を有すると考えられており¹¹⁾¹²⁾、ヒト心筋炎ではその抗炎症効果期待した臨床使用の可能性はある。今後、さらなる研究がなされることが期待される。

結 論

SLPI は EAM に対して炎症抑制効果が期待できる。しかし、半減期が短く持続投与が必要と考えられた。

謝 辞

本研究にあたり、大阪大学大学院の宮崎純一教授にプラスミドベクターを、帝人株式会社より 1/2SLPI の供与を受けました。新潟大学大学院腎臓病・リウマチ分野、丸山弘樹助手に遺伝子導入の技術指導を頂きました。新潟大学保健学科、仲澤幹雄教授にカテーテル測定のお協力を頂きました。研究全般にわたり、当科の埴晴雄助手、小玉 誠助教授に御指導頂きました。また当科の相澤義房教授に論文執筆にあたり御高閲を頂きました。ここに深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Feldman AM and McNamara D: Myocarditis. *N Engl J Med* 343: 1388 - 1398 2000.
- 2) 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.
- 3) Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T and Imai S: Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ Res* 80: 11 - 20 1997.
- 4) Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R and Aizawa Y: Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 86: 275 - 280 2000.
- 5) Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TG, Emerson S, Wallin R, Davda R and Davidson A: Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 15: 1559 - 1563 1990.
- 6) Cohen JR, Mandell C and Wise L: Characterization of human aortic elastase found in patients with abdominal aortic aneurysms. *Surg Gynecol Obstet* 165: 301 - 304 1987.
- 7) Barolet AW, Nili N, Cheema A, Robinson R, Natarajan MK, O'Blenes S, Li J, Eskandarian MR, Sparkes J, Rabinovitch M and Strauss BH: Arterial elastase activity after balloon angioplasty and effects of elafin, an elastase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1269 - 1274 2001.
- 8) Lee JK, Zaidi SH, Liu P, Dawood F, Cheah AY, Wen WH, Saiki Y and Rabinovitch M: A serine elastase inhibitor reduces inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally - induced murine myocarditis. *Nat Med* 4: 1383 - 1391 1998.
- 9) Zaidi SH, Hui CC, Cheah AY, You XM, Husain M

- and Rabinovitch M: Targeted overexpression of elafin protects mice against cardiac dysfunction and mortality following viral myocarditis. *J Clin Invest* 103: 1211 - 1219 1999.
- 10) Zaidi SH, You XM, Ciura S, Husain M and Rabinovitch M: Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation* 105: 516 - 521 2002.
- 11) Hiemstra PS: Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans* 30: 116 - 120 2002.
- 12) Schalkwijk J, Wiedow O and Hirose S: The trap - pin gene family: proteins defined by an N - terminal transglutaminase substrate domain and a C - terminal four - disulphide core. *Biochem J* 340: 569 - 577 1999.
- 13) Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR and Wahl SM: Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall - induced arthritis. *J Exp Med* 190: 535 - 542 1999.
- 14) Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y, Imazeki I, Ishikawa Y, Ataka K, Hasegawa S, Ito Y, Higuchi N, Kazama JJ, Gejyo F and Miyazaki JI: Continuous erythropoietin delivery by muscle - targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Hum Gene Ther* 11: 429 - 437 2000.
- 15) Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, Fuse K, Ito M, Hirono S, Tanabe N, Hanawa H, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 130: 1489 - 1495 2000.
- 16) Kodama M, Matsumoto Y and Fujiwara M: In vivo lymphocyte - mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 85: 1918 - 1926 1992.
- 17) 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.
- 18) Shioji K, Kishimoto C and Sasayama S: Fc receptor - mediated inhibitory effect of immunoglobulin therapy on autoimmune giant cell myocarditis: concomitant suppression of the expression of dendritic cells. *Circ Res* 89: 540 - 546 2001.

(平成14年12月19日受付)