

実験的自己免疫性心筋炎ラットに対する セリバスタチンの効果

丸山誠太郎・加藤 公則・小玉 誠
西川 尚・渡辺 律雄・林 学
吉田 剛・埴 晴雄・相澤 義房

新潟大学大学院医歯学総合研究科
器官制御医学講座循環器学分野

中川 理

新潟大学大学院医歯学総合研究科
内部環境医学講座内分泌・代謝学分野

三井田 孝

新潟大学大学院医歯学総合研究科
予防医療学分野検査診断学教室

仲澤 幹雄

新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻
基礎生体情報学

The Effects of Cerivastatin upon the Experimental Autoimmune Myocarditis

Seitaro MARUYAMA, Kiminori KATO, Makoto KODAMA,
Takashi SAIGAWA, Ritsuo WATANABE,
Manabu HAYASHI, Tsuyoshi YOSHIDA,
Haruo HANAWA and Yoshifusa AIZAWA

*Division of Cardiology, Department of Cardiovascular and Vital Control,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University, Niigata, Japan*

Reprint requests to: Seitaro MARUYAMA
Division of Cardiology
Department of Cardiovascular and Vital Control
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-754 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先： 〒 951-8510 新潟市旭町通り 1-754
新潟大学大学院医歯学総合研究科器官制御医学講座
循環器学分野 丸山誠太郎

Osamu NAKAGAWA

*Division of Endocrinology and Metabolism,
Department of Biological Function and Medical Control,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University, Niigata, Japan*

Takashi MIIDA

*Laboratory Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University, Niigata, Japan*

Mikio NAKAZAWA

*Department of Basic Bioinformation,
School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
Niigata University, Niigata, Japan*

要 約

ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 α (PPAR α) は、脂肪酸の酸化調節に関与している。さらに PPAR α は炎症反応の調節因子でもあり、近年 HMG-CoA 阻害薬であるセリバスタチンには PPAR α 活性化作用があることが示された。PPAR α 活性化薬は炎症性疾患のコントロールに用い得る可能性がある。

実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) は、ヒト巨細胞性心筋炎および心筋炎後の拡張型心筋症の動物モデルである。そこで EAM における PPAR α の役割を検討した。ラットを心筋ミオシンで感作した直後から、セリバスタチンを 4 週間にわたって連日経口投与した。体重に対する心室重量の比は、コントロール群およびセリバスタチン投与群で有意差は認められなかった。対照群とセリバスタチンを投与した群では、血清のシアル酸および LDL-コレステロールは有意な変化を認めなかった。一方、セリバスタチンを投与しても左室機能の有意な改善は認められなかった。

セリバスタチンによる PPAR α の活性化では、心筋炎の進展に対して抑制効果は認められなかった。

キーワード：実験的自己免疫性心筋炎ラット，セリバスタチン，ルイスラット，ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 α

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is a regulator of the oxidation of fatty acids, and PPAR α also modulates inflammation. Recently it was demonstrated that, cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, had PPAR α stimulating action.

Experimental autoimmune myocarditis (EAM) in rats is an animal model of human giant cell myocarditis and postmyocarditis dilated cardiomyopathy. We investigated the role of cerivastatin on EAM.

Cerivastatin was administered to rats with EAM for 3 or 4 weeks, starting immediately after immunization with cardiac myosin. There was little reductions in the ratio of ventricular weight to body weight. The area of inflammatory lesions were equal compared with controls. Control rats showed a deterioration of cardiac function, which was not improved by cerivastatin.

Our results demonstrated that cerivastatin was unable to prevent the progression of EAM.

Key words: Experimental autoimmune myocarditis (EAM), Cerivastatin, Lewis rat, Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)

序 論

実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) は、心筋ミオシンを感作することによってマウスとラットに生じさせることができる。ラットの EAM はヒト巨細胞型心筋炎の動物モデルである¹⁾。ラットの足底にミオシンを注射した後、2 週間で重症心筋炎が発症する。第 19 日目にピークに達し、第 25 日目から第 40 日目にかけて徐々に心筋炎は軽快し、その後は拡張型心筋症様の病態を呈する (図 1)。EAM における炎症過程は液性免疫性反応よりも、細胞性免疫反応によって誘導されると考えられている²⁾。また心筋炎ラットは急性期に重篤なうっ血性心不全を呈することから、心筋のエネルギー代謝が障害されていることも考えられ、EAM の臨床経過は脂肪酸代謝の改善によって影響を受けると考えられる。

ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPARs) は、脂質代謝を調節する因子として知られており、現在まで 3 種類のサブタイプが確認されている。PPAR α は心臓、肝臓、腎臓、褐色脂肪組織、胃粘膜などに発現しており、脂肪酸酸化を調節する³⁾。さらに、PPAR α はロイコトリエン B4 のクリアランスをコントロールして炎症反応を修飾することが報告されている⁴⁾。また PPAR α 欠損マウスでは炎症刺激に対する反応が遅延してみられることが報告されており⁵⁾、したがって PPAR α は炎症反応においても重要な核内調節因子であると考えられる。我々は PPAR α 刺激薬であるフェノフィブレートが実験的自己免疫心筋炎の急性期病態を部分的に改善し得ることを示した⁶⁾。一方近年、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において HMG-CoA 阻害薬が PPAR α を介して抗炎症作用を示したとの報告⁷⁾ があり、fibrate 系の抗高脂血症薬だけでなく statin 系の抗高脂血症薬にも、直接的

な抗炎症作用があることが示唆される。

以上より、我々はセリバスタチンが EAM の炎症を抑えるか、さらに EAM の心機能を改善するかどうかを検討した。

材料と方法

動物

12 週齢の雄性ルイスラットをチャールズリバー・ジャパン (株) から購入し、すべてのラットにおいて既報⁸⁾ の通り、ブタ心室筋を抗原として感作を行った。すなわちブタ心筋ミオシンと完全フロインドアジュバント [Mycobacterium tuberculosis H37Pa (Difco, Detroit, USA)] を等量混ぜて最終濃度 5 mg/ml の懸濁液を調整し、第 0 日にラットの右足底にその懸濁液を約 0.125ml 皮下注射し感作後ラットを 3 群に分けた。セリバスタチン低濃度群 (L) (n = 16) と高濃度群 (H) (n = 16) に分け、おのおの生理食塩水に溶解したセリバスタチン 5mg/kg, 20mg/kg を毎日経口投与した。一方、コントロール群 (C) (n = 16) は生理食塩水のみを同様に経口投与した。

血行動態評価

第 21 日および第 28 日にラットを 2% ハロセンで麻酔し、右大腿動脈にカテーテルを挿入し平均血圧 (mean BP) を測定した。中心静脈圧 (CVP) は、右外頸静脈から上大静脈にカテーテルを挿入して測定した。これらのカテーテル (PE-50) は、Statham P50 の圧トランスデューサー (Statham P50; Gould Statham, Oxnard, CA, USA) と増幅器 (Nihon-Kohden, Tokyo, Japan) に接続して記録した。左室内圧 (LVP) と左室拡張末期圧 (LVEDP) は、先端トランスデューサー付きカテーテル (Millar SPR 249; Millar Inst., Houston, TX, USA) を右総頸動脈から左室に挿入して測定

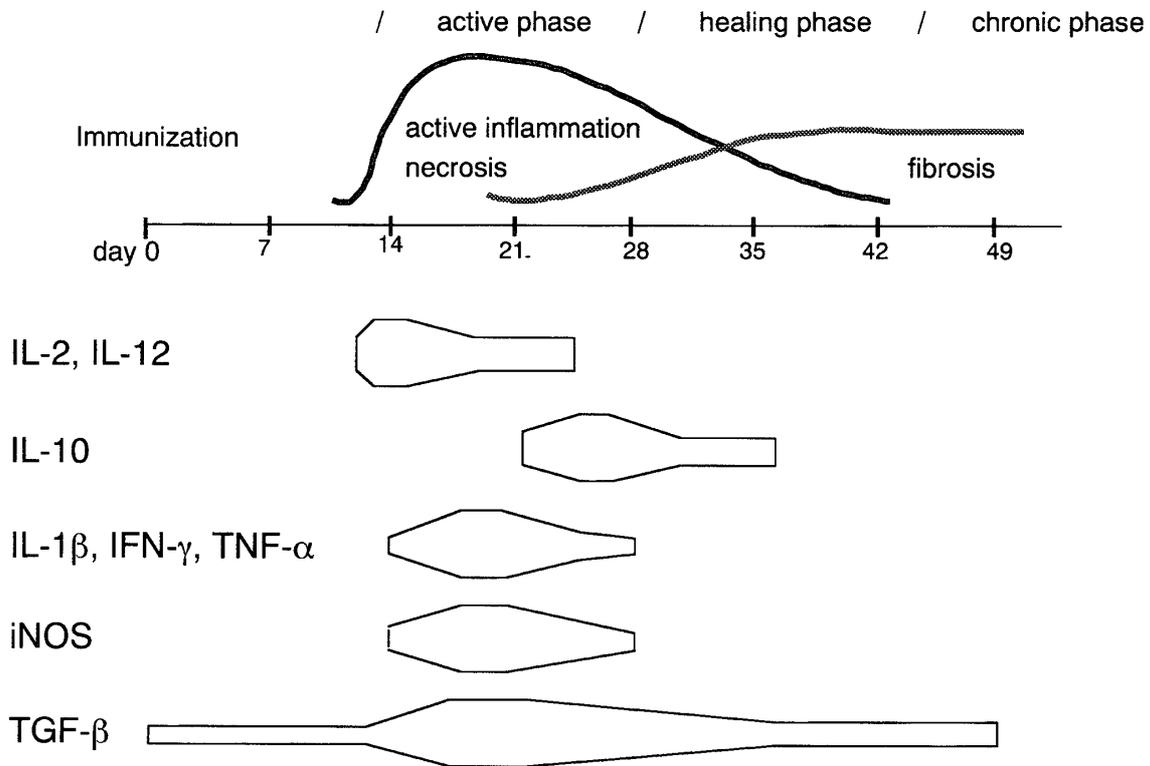


図1 Clinical course of experimental autoimmune myocarditis (EAM).

した. $dP/dt \max$ と $dP/dt \min$ は別の増幅器 (NEC San-ei, Tokyo, Japan) で測定した. カテーテル挿入終了後, 麻酔の副作用を最小限に抑えるためにハロセン濃度を 0.5 % に下げてから 20 分間安定化させた後に, 上記の血行動態を測定した. また心拍数 (HR) は心電図から計算した.

病理組織

血行動態測定後, 心臓を取り出した. 心室から心房を除去して重量を測定し, これを心室重量 (VW) とした. その後, 心室を輪切りにして, 10 % のホルマリン水溶液で固定し, パラフィン包埋し Hematoxylin-eosin 染色と Azan-Mallory 染色を行った. また心筋断面積に対して, eosin 好性の部分の面積を求めて残存心筋面積の比率を算出した.

血清のシアル酸と血清 LDL コレステロールの測定

血清のシアル酸は, neuraminidase/NANA-aldose アッセイ (酵素法)⁹⁾ で定量し, 血清の LDL コレステロールは直接法¹⁰⁾ で測定した.

統計解析

データはすべて, 平均値±標準誤差 (S.E.) で表記した. 2 群間の検定では Student's paired-t 検定を用い, $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した.

結 果

一般所見

コントロール群に比べてセリバスタチン群では, 体重は約 7 % 増加し, 心室重量は約 14 % 低下していたが有意差はなかった (表 1). また心体重比でみると, セリバスタチン群はコントロール群に比べて, 有意に 17 % 低下していた. 各群間で, 血清の LDL コレステロール (LDL-C) に有意差はなかった. また, シアル酸は血清学的炎症反応の指標¹¹⁾ と考えられているが, セリバスタチン群ではコントロール群に比べて, 血清のシアル酸の濃度に有意差はなかった.

表1 General findings

	3C (n=8)	3L (n=8)	3H (n=8)	4C (n=8)	4L (n=8)	4H (n=8)	
BW [g]	311.3±4.7	302.8±2.9	304.3±8.5	327.0±8.9	322.5±5.6	315.5±5.3	NS
HW [g]	1.13±0.03	1.26±0.06	1.05±0.03	1.19±0.05	1.30±0.07	1.14±0.04	NS
HW/BW [mg/g]	3.64±0.08	4.16±0.21	3.49±0.18	3.68±0.23	4.04±0.24	3.60±0.12	*
LDL-C [g/dl]	5.18±0.76	6.48±0.34	5.79±0.63	4.65±0.31	5.56±0.60	4.71±0.18	NS
Sialic acid [mg/dl]	52.7±0.7	55.6±2.1	52.2±1.8	50.3±1.5	51.3±2.0	44.8±1.2	*

BW: body weight, HW: heart weight

3C: control rat at 3 week, 4C: control rat at 4 week

3L: Cerivastatin 0.5mg/kg treated rats during 3 weeks, 3H: Cerivastatin 2.0mg/kg treated rats during 3 weeks

4L: Cerivastatin 0.5mg/kg treated rats during 3 weeks, 4H: Cerivastatin 2.0mg/kg treated rats during 3 weeks

The ratio of heart weight to body weight (HW/BW [mg/g]) is calculated by [HW/BW ×1000]

Values are mean±SE. NS: not significant. *: P<0.05 between 3C and 3L

表2 Haemodynamic findings at 3 weeks¹

	3C (n=8)	3L (n=8)	3H (n=8)	
CVP [mmHg]	3.1±0.8	2.7±0.7	3.1±0.8	NS
BP [mmHg]	81.6±3.7	79.9±3.8	84.7±4.7	NS
LVP [mmHg]	91.1±3.3	88.0±3.4	94.3±4.0	NS
EDP [mmHg]	13.5±1.7	9.5±1.0	8.2±1.2	*
dP/dt max [mmHg/sec]	3658±269	3482±258	3902±268	NS
dP/dt min [mmHg/sec]	3613±217	3616±259	4224±281	NS
HR [beats/min]	351±19	331±11	340±12	NS

3C: control rat at 3 week

3L: Cerivastatin 0.5mg/kg treated rats during 3 weeks

3H: Cerivastatin 2.0mg/kg treated rats during 3 weeks

CVP: central vein pressure, BP: blood pressure, LVP: left ventricular pressure

EDP: end-diastolic pressure, HR: heart rate, NS: not significant

*: p<0.05 between group 3C and group 3H

血行動態

表2および表3に血行動態の結果を示す。セリバスタチン群では、LVPとHRが増加する傾向がみられたが有意差は認められなかった。LVEDPに関して3週目のControl群とHigh dose群の間に有意差(13.5±1.7mmHg vs 8.2±1.2mmHg; p<0.05)が認められたが、そのほかの指標において有意差は認められなかった。

病理組織

病理組織の典型例を図2に示す。心筋断面積に

対する残存心筋の比を算出したところ図3に示すように、一部に有意差が認められたものの、病理組織学的にはセリバスタチン投与の有効性は確認されなかった。

考案

PPAR α 刺激薬の抗炎症効果は、動脈硬化領域ではよく検討されているが、他の炎症モデルでは報告が少ない。本研究において、実験的自己免疫性

表 3 Haemodynamic findings at 4 weeks'

		4C (n=8)	4L (n=8)	4H (n=8)	
CVP	[mmHg]	1.1±0.5	2.0±0.7	1.0±0.5	NS
BP	[mmHg]	84.3±5.3	83.1±3.5	90.7±3.3	NS
LVP	[mmHg]	93.9±4.9	95.8±2.8	98.5±2.8	NS
EDP	[mmHg]	8.6±1.4	11.3±1.8	9.1±1.3	NS
dP/dt max	[mmHg/sec]	4228±284	4126±164	4350±233	NS
dP/dt min	[mmHg/sec]	4374±337	4406±134	4654±250	NS
HR	[beats/min]	347±10	334±11	355±12	NS

4C: control rat at 4 week

4L: Cerivastatin 0.5mg/kg treated rats during 4 weeks

4H: Cerivastatin 2.0mg/kg treated rats during 4 weeks

CVP: central vein pressure, BP: blood pressure, LVP: left ventricular pressure

EDP: end-diastolic pressure, HR: heart rate, NS: not significant

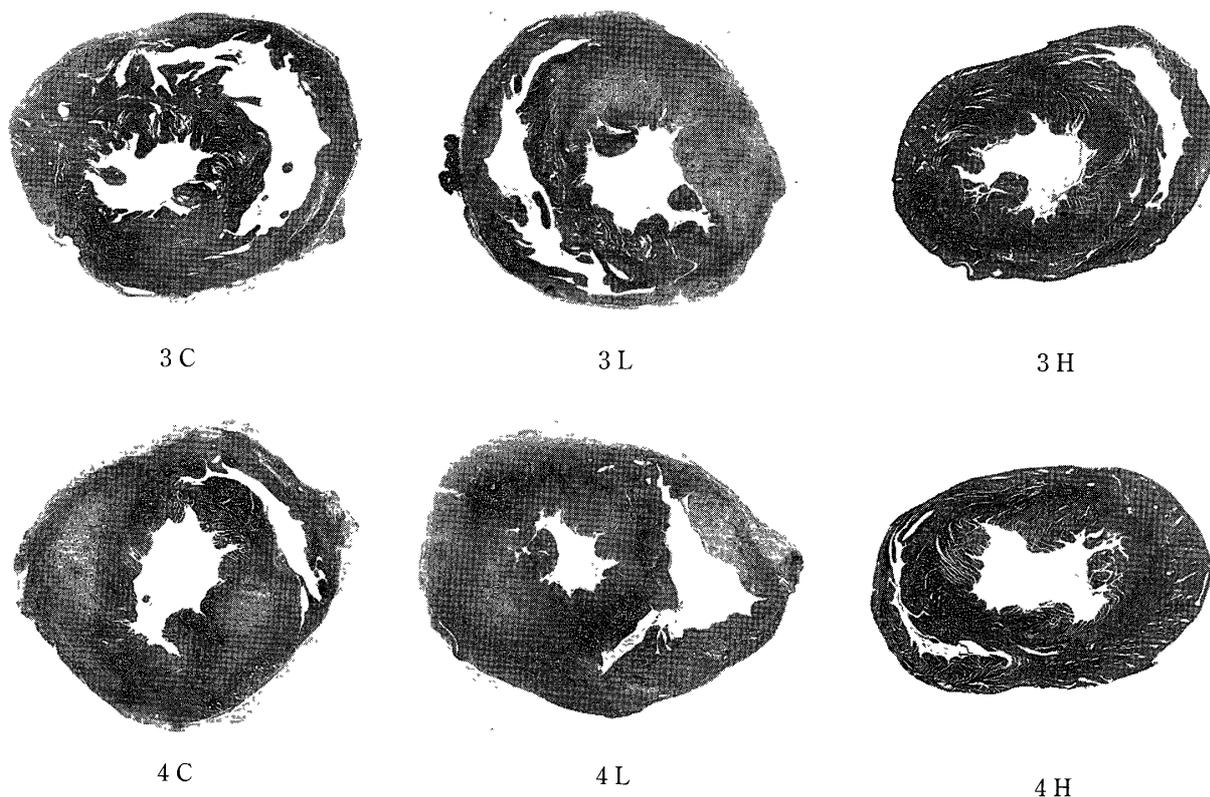


図 2 Histopathologic findings in specimens obtained from the midportion of the left ventricle of the heart (Azan-Mallory stain).

(3C) Control rat at 3 weeks. (4C) Control rat at 4 weeks. (3L) Low dose treated by cerivastatin during 3 weeks. (3H) High dose treated by cerivastatin during 3 weeks. (4L) Low dose treated by cerivastatin during 4 weeks. (4H) High dose treated by cerivastatin during 4 weeks.

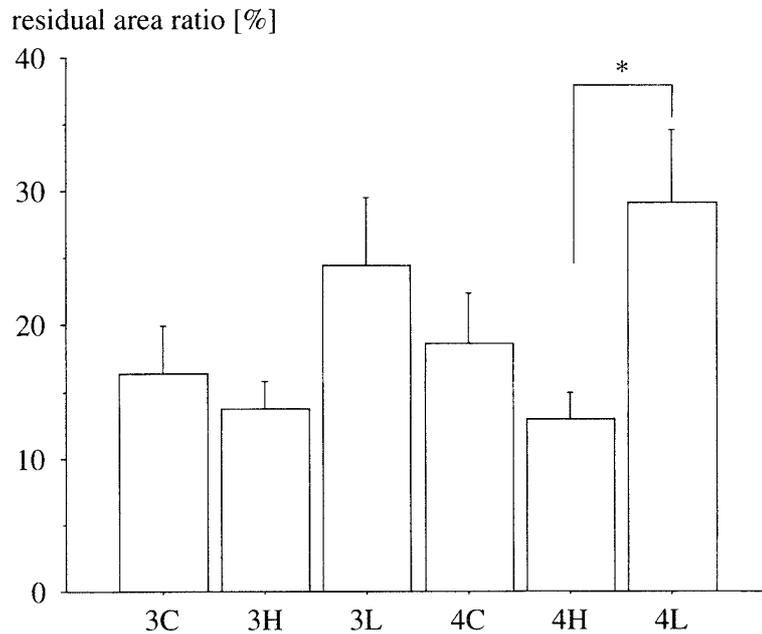


図3 Residual intact area of myocardium

(3C) Control rat at 3 weeks. (4C) Control rat at 4 weeks. (3L) Low dose treated by cerivastatin during 3 weeks. (3H) High dose treated by cerivastatin during 3 weeks. (4L) Low dose treated by cerivastatin during 4 weeks. (4H) High dose treated by cerivastatin during 4 weeks $p < 0.05$

心筋炎における PPAR α 刺激作用を有する HMG-CoA 阻害薬の役割を調べた。セリバスタチンは心体重比を変化させず、また病理組織も改善しなかった。また血行動態の指標に対する効果はみられなかった。すなわち PPAR α の役割はこの心筋炎モデルでは部分的と推測される。血清のシアル酸の測定値から、血清学的にもセリバスタチンは炎症状態を改善させなかったと考えられた。

PPAR α の活性化は心臓局所の β 酸化を活性化することによって、心臓の代謝を改善し心機能が改善する可能性もあることを当初予想したが、血清の LDL コレステロールには有意差は認められなかった。これはこのモデルラットが高脂血症ではないことに起因すると考えられる。一方、近年うっ血性心不全の患者においては、総コレステロールが高いほど有利であるという仮説¹²⁾ が報告されており、今回の実験で低用量群 (L 群) で、有意差はないものの血行動態が増悪する傾向を示しているのは、この仮説を支持する可能性がある。

心筋炎の治療法は未だ確立されていない。なぜ

なら、心筋炎発症の原因として、さまざまな原因、すなわち、ウイルス感染・アレルギー・自己免疫反応・中毒などが挙げられるからである。また心筋炎の急性期において、多くの患者がうっ血性心不全や不整脈などの原因で命を落とすことが知られている。心筋炎による患者の死亡率は依然として高いが、この急性期を凌いだ患者では、心筋の炎症は自然に消退することが知られている¹³⁾。したがって、心筋炎の治療には3つの治療戦略があると考えられる。第1にはその病因であるが、残念ながら各々の患者で心筋炎の病因を十分に同定することは困難である。第2の戦略は、急性期における心機能と血行動態を維持することである。数多くの炎症性サイトカインが心機能抑制に関与することが報告されている。第3には、心室のリモデリングを抑制することである。しかし本研究からは、自己免疫心筋炎の発症抑制と急性期病態の改善に関して、セリバスタチンでは不充分であることが明らかとなった。

結 語

PPAR α の活性化作用を有する HMG-CoA 阻害薬であるセリバスタチンは実験的自己免疫性心筋炎においては、心筋炎の発症を抑制できず、急性期の血行動態に対する効果も認めない。

謝 辞

本研究を行うにあたって、セリバスタチンをバイエル薬品株式会社より提供を頂きました。厚く深謝致します。

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, Matsumoto Y and Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 85: 1918-1926 1992.
- 3) Issemann I and Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650 1990.
- 4) Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ and Wahli W: The PPAR alpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384: 39-43 1996.
- 5) Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebreton M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J and Tedgui A: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR alpha but not by PPAR gamma activators. *Nature* 393: 790-793 1998.
- 6) Maruyama S, Kato K, Kodama M, Hirono S, Fuse K, Nakagawa O, Nakazawa M, Miida T, Yamamoto T, Watanabe K and Aizawa Y: Fenofibrate, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activator, Suppresses Experimental Autoimmune Myocarditis by Stimulating the Interleukin-10 Pathway in Rats. *J Athroscler Thromb* 9: 18-22 2002.
- 7) Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S, Nakajima T, Hokari S, Komoda T and Katayama S: Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary endothelial cells. *Life Sci* 67: 863-876 2000.
- 8) Inomata T, Hanawa H, Miyanishi T, Yajima E, Nakayama S, Maita T, Kodama M, Izumi T, Shibata A and Abo T: Localization of porcine cardiac myosin epitopes that induce experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 76: 726-733 1995.
- 9) Sugahara K, Sugimoto K, Nomura O and Usui T: Enzymatic assay of serum sialic acid. *Clin Chim Acta* 108: 493-498 1980.
- 10) Okada M, Matsui H, Ito Y, Fujiwara A and Inano K: Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method. *J Lab Clin Med* 132: 195-201 1998.
- 11) Sillanauke P, Ponnio M and Jaaskelainen IP: Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 29: 413-425 1999.
- 12) Rauchhaus M, Coats AJ and Anker SD: The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet* 356: 930-933 2000.
- 13) 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.

(平成 14 年 4 月 22 日受付)