

ラット実験的自己免疫性心筋炎の拡張型心筋症 に進展する機序の検討

— TGF- β 1, TGF- β 受容体, 細胞外基質蛋白, Collagenase 72,
Collagenase 92 および TIMP-1 の発現について —

新潟大学医学部内科学第一教室 (主任: 相沢義房教授)

新潟大学医学部附属腎研究施設病理形態学部門 (主任: 木原 達教授)

月俣ジャイメ耕一

Expression of TGF- β 1, TGF- β Receptors, Extracellular Matrix
Proteins, Collagenase 72, Collagenase 92 and TIMP-1
in Rats with Experimental Autoimmune Myocarditis
Developing into Dilated Cardiomyopathy

Jaime Koiti TSUKIMATA

*First Department of Internal Medicine and
Department of Renal Pathology, Niigata
University School of Medicine*

*(Directors: Prof. Dr. Yoshifusa AIZAWA and
Prof. Dr. Itaru KIHARA)*

One of the most severe forms of myocarditis is giant cell myocarditis, because it has a poor prognosis with occurrence of fatal arrhythmias and it may develop into dilated cardiomyopathy (DCM) through immuno-mediated myocardial damage. Experimental autoimmune myocarditis (EAM) in rats is a model of giant cell myocarditis which resembles that of giant cell myocarditis in humans. In order to investigate the possible role of TGF- β 1 in the accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins in rats with EAM, we examined the expression of TGF- β 1, types I and II TGF- β receptors and ECM proteins (fibronectin, α 1 type I collagen, α 1 type III collagen and α 2 type IV collagen) in the heart during 60 days of the EAM course by ribonuclease protection assay and immunostaining. Furthermore we performed ribonuclease protection assay of collagenase 72, collagenase 92 and TIMP-1.

Reprint requests to: Jaime Koiti TSUKIMATA,
First Department of Internal Medicine, Niigata
University School of Medicine, Asahimachi-dori,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部内科学第一教室
月俣ジャイメ耕一

TGF- β 1 mRNA expression markedly increased on Days 16 and 21 in parallel to an increase in mRNA expression of type I and II TGF- β receptors, suggesting the interdependence of type I and II TGF- β receptors for signal transduction. Immunofluorescence microscopy showed the presence of TGF- β 1 in some macrophages but not in all infiltrating in the hearts. Type I TGF- β receptor was immunostained in the interstitium of the heart.

An increase in mRNA expression of fibronectin, type I collagen, type III collagen and type IV collagen was also observed from Day 16 to Day 42. The expression of mRNA for type I collagen and type IV collagen decreased on Day 60 whereas fibronectin and type III collagen mRNA were still elevated on Day 60 in the EAM hearts. The changes in the mRNA expression were arbitrarily comparable to the expansion of ECM deposition detected by immunofluorescence. The expression of mRNA for collagenase 72 and collagenase 92 which degrade type IV collagen, was increased in the control group, reached their peaks on Day 30 and decreased thereafter. TIMP-1 mRNA expression markedly increased on Day 16, decreased slightly on Day 21, remained unchanged on Day 30, and decreased sharply on Day 42 and 60. These results may indicate that TGF- β 1 along with TGF- β receptors play a crucial role in the expression and deposition of ECM components in EAM hearts.

Key words: TGF- β 1, TGF- β receptor, extracellular matrix proteins, giant cell autoimmune myocarditis, dilated cardiomyopathy
TGF- β 1, TGF- β 受容体, 細胞外基質蛋白, 巨細胞性心筋炎, 拡張型心筋症

はじめに

心筋炎は、心筋細胞だけではなく、間質、血管、あるいは心外膜にも炎症により傷害をきたす¹⁾。また、心筋炎は免疫を介して心筋傷害が進み、拡張型心筋症になる可能性が指摘されている²⁾。いままで、原因不明の拡張型心筋症の多くは心筋炎から発症するとの報告がなされている。一方、巨細胞性心筋炎は非常に重症な心筋炎であり、急速に進む致死性の心筋炎で、若年および中年成人にみられる。

TGF- β 1 は細胞外基質を調節する主要な因子であることが明らかになってきており、近年、心臓血管系の病理⁷⁾や疾患⁸⁾⁹⁾、あるいは移植反応¹⁰⁾¹¹⁾を論ずる時に注目されるようになってきた。培養した線維芽細胞に TGF- β 1 を加えると、fibronectin と collagen 生成が増加し、細胞外基質内でのそれらの結合を促進することが明らかにされている¹²⁾。さらに TGF- β 1 は免疫抑制作用を有し¹³⁾、心臓保護作用¹⁴⁾があることも指摘されている。

Collagen network は組織構築や心房心室の構造を保

つことに役立っている¹⁵⁾。心臓に存在する主要な collagen は type I collagen と type III collagen である。type I collagen は rigidity に関係し、一方 type III collagen は elasticity に関係すると考えられている。

今回、ラットの実験的自己免疫性巨細胞性心筋炎 (EAM) の拡張型心筋症に進展する過程における TGF- β 1 の役割を明らかにするために、TGF- β 1, type I と type II TGF- β 受容体, fibronectin, type I, type III および type IV collagen の発現を発症から治癒期までのいろいろな時期に ribonuclease protection assay にて検討した。さらに、蛍光抗体法を用い、fibronectin, type I collagen と type III collagen の細胞外基質内での出現、TGF- β 1 産生細胞および TGF- β 受容体の局在を検討した。

対象と方法

1) 動物

日本 Charles River から購入し、新潟大学医学部動物実験施設で飼育した 5～6 週齢の雄の Lewis ラットを用いた。すべての手技は、実験動物の使用と管理のガ

イドラインに準じて行った (ILAR, 1996).

2) ブタ rod cardiac myosin の精製

ブタ心室筋から既報の方法で, whole cardiac myosin を精製し¹⁷⁾, さらに, α -chymotrypsin で20°C, 16分間, 0.12 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole-HCl (pH 7.0), 1 mmol/L EDTA 中で消化した (酵素: 基質 = 1:200). 100,000 g で1時間遠心した後, そのペレットを 0.6 mol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole-HCl (pH 7.0) で溶解し, 3 倍量の冷エタノールを加えた. 9,000 g で10分遠心した後, ペレットを同様の緩衝液で溶解し, 一晚透析した. 溶液を 100,000 g で1時間遠心した後, 上清を rod cardiac myosin として用いた.

3) EAM の作成法と検体の採取法

第0日に40匹の Lewis ラットに 0.3 mg のブタ rod cardiac myosin を 10 mg/ml の *Mycobacterium tuberculosis* を含む complete Freund's adjuvant で混和後, 皮下注射して EAM 作成し, エーテル麻酔下で第16, 21, 30, 42, および60日に屠殺した. 13匹のラットは屠殺前に死亡し, 今回の検討の対象から外した. ブタ cardiac myosin を皮下注射しなかった8匹のラットをコントロールとした.

屠殺直後に体重および心臓重量/体重比を測定した. 心臓の大きさを示す数値として, 以下の3つのスケールを測定した (心尖部から前心室中隔溝を通して大動脈基

部まで, 心尖部から後心室中隔溝を通して心房心室溝まで, および左心室の心室壁を含めた短軸径).

心室筋の一部は免疫組織標本作成のため n-hexan 中で-70°C10分間急速に凍結した. また, 心室筋の別の一部は10% formalin 固定後, parafin 包埋をした. 残りの組織は小切片にして RNA 抽出に使用した.

4) RNA 抽出法

心臓の小切片は Isogen (日本ジーン社, 東京, 日本) を用いた guanidium-thiocyanate 内でホモジネート (polytron, Kinematica AG, Switzerland) および ultrasonication を行った. 総 RNA は acid-guanidinium-phenol-chloroform 変法にて抽出した.

5) Probe の調整

ラットの GAPDH, $\alpha 1$ type I collagen, $\alpha 1$ type III collagen, $\alpha 2$ type IV collagen, fibronectin および TGF- $\beta 1$ の probe は Dr. L. Feng (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) から, type I TGF- β receptor と type II TGF- β receptor はそれぞれ Dr. 宮園 (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) と Dr. 土田 (The Salk Institute, La Jolla, CA) から提供されたものを使用し, 一部を表 1 に示すベクターでサブクローニングした.

6) Ribonuclease protection assay

³²P-labeled antisense cRNA probes は in vitro 中

表 1 Preparation of GAPDH, TGF- $\beta 1$, types I and II TGF- β Receptors, Fibronectin, $\alpha 1$ Type I Collagen, $\alpha 1$ Type III Collagen, $\alpha 2$ Type IV Collagen, TIMP-1, Collagenases 72 and 92 cDNA Templates

cDNA Templates	Length (bp)	Sequence	Vector	RNA Polymerase	Accession# GenBank
GAPDH	124	664~787	pGEM 4z	SP6	M 17701
TGF- $\beta 1$	225	500~754	pGEM 4z	T7	X 52498
TGF- β RI	550	40~511	pGEM 4z	SP6	D 25540
TGF- β RII	195	1~195	pGEM 4z	T7	L 09653
FN	330	329~658	pGEM 4z	T7	L 00191
Col. I	291	113~403	pGEM 4z	T7	J 04464
Col. III	176	350~525	pGEM 3z	T7	M 21354
Col. IV	497	2802~3298	pGEM 4z	T7	J 04695
C 72	222	not performed	pGEM 4z	T7	U 30822
C 92	356	not performed	pGEM 11zf (+)	SP6	U 36476
TIMP-1	368	not performed	pGEM 4z	SP6	L 31883

TGF- $\beta 1$ indicates transforming growth factor- $\beta 1$; TGF- β RI, type I transforming growth factor- β receptor; TGF- β RII, type II transforming growth factor- β receptor; FN, fibronectin; Col. I, $\alpha 1$ type I collagen; Col. III, $\alpha 1$ type III collagen; Col. IV, $\alpha 2$ type IV collagen; C 72, Collagenase 72; C 92, Collagenase 92.

で転写生成し, template は RNase-free DNase I (Boehringer Mannheim, 東京, 日本) にて消化した. 次に 7.5 mg の $\alpha 1$ type I collagen, $\alpha 1$ type III collagen, 10 mg の fibronectin, $\alpha 2$ type IV collagen, collagenase 72, collagenase 92, TIMP-1, および 15 mg の type I, type II TGF- β receptors, TGF- $\beta 1$ の RNA サンプルを GAPDH とそれぞれの antisense cRNA (1×10^5 cpm) 中で 45°C, 一晚ハイブリダイゼーションした. RNase A にてハイブリダイゼーションしなかった probe は消化し, 未分解 probe を 6% polyacrylamide sequencing gel にて電気泳動し, X-ray film (Fuji Photo Film Co., 東京, 日本) に 80°C, 12~48時間, 露光した.

露光した film は optical scanner (Hewlett-Packard Co., Greeley, Co) にてスキャンし, band の強度を NIH Image software を用いて, コンピューター (Power Mac 9500/132, Apple computer, Inc., Cupertino, CA, USA) にて定量化した. GAPDH との比を用いることによって解析し, サンプル アプライ量の誤差を少なくし, EAM の病期による変化を比較するために平均値を求めた.

7) 組織所見

心室中部の横断を periodic acid Schiff 染色し, 光学顕微鏡にて観察した. 1-mm² ごとに 100 倍率で観察し, 炎症細胞浸潤, 心筋細胞変性, あるいは線維化のある病変の占める割合を以下のように microscopic scores として grade 分けした (0: 病変がないもの, 1: 病変が 1/3 以下のもの, 2: 病変が 1/3-2/3 のもの, 3: 病変が 2/3 以上のもの)²⁴⁾.

8) 蛍光抗体染色

新鮮凍結切片をクリオスタットにて 4 μ m の厚さに切り, スライドガラス上で 15 分間乾燥させ, 5 分間, 冷アセテートにて固定し, 10 分間風乾した.

ウサギ抗ラット fibronectin (1:100), type I collagen (1:100), type III collagen (1:40; Dr. 大嶋から提供) 抗体, TRITC-labeled phalloidin (1:1000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) でインキュベートし, さらにヤギ FITC-labeled-抗ウサギ IgG 抗体 (1:100, Medical and Biomedical Laboratories, 名古屋, 日本) にてインキュベートした. Negative control として, 正常ウサギ血清を用いた. TRITC-labeled phalloidin はフィラメントアクチンを染色するために用いられた. Fibronectin, type I collagen および type III collagen の出現は以下のように grade 分けした. 1: 免疫染色

の部位が視野の 1/6 以下の場合, 2: 免疫染色の部位が視野の 1/6-1/3 の場合, 3: 免疫染色の部位が視野の 1/3-2/3 の場合, 4: 免疫染色の部位が視野の 2/3 以上の場合.

TGF- $\beta 1$ と macrophage を二重染色するために以下の抗体を用いて行った. つまり, ウサギ抗ヒト TGF- $\beta 1$ 抗体 (これはラットの TGF- $\beta 1$ に結合するが, TGF- $\beta 2$ および TGF- $\beta 3$ には結合しない²⁵⁾. 10 μ g/ml, Promega Corp., Madison, WI) (Okargly et al., 1994) とヤギ FITC-labeled 抗ウサギ IgG (1:100, Medical and Biomedical Laboratories, Nagoya, Japan), 抗ラット monocytes/macrophages 抗体 (ED1, Dainippon Seiyaku Co., Osaka, Japan) とヤギ TRITC-labeled 抗マウス IgG (Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) である. 正常ウサギ IgG γ -globulin (10 μ g/ml) は抗 TGF- $\beta 1$ 抗体の control として用いられた.

Type I TGF- β receptor と心筋細胞を以下の抗体で二重染色した. つまり, polyclonal type I TGF- β receptor (Dr. 宮園, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden, より提供) とヤギ FITC-labeled 抗ウサギ IgG (1:100, Medical and Biomedical Laboratories, 名古屋, 日本) および TRITC-labeled phalloidin である.

9) 統計解析

データは平均±標準偏差で示し, 各群間比較は Bonferroni's 多重比較検定を行い, $p < 0.01$ を有意とした.

結 果

1) 肉眼所見

ブタ心筋ミオシンを皮下注射された Lewis ラットは第16, 21, 30日に心嚢液が貯留し, 心拡大, 心筋白色化が肉眼的に見られた. 第42, 60日目には心筋白色化, 心拡大はさらに著明となり, 拡張型心筋症様病態と考えられた.

2) mRNA Expression

各々の mRNA の検出はランダムに抽出した RNA サンプルを用いて, 5 回の実験の平均値を求めた.

TGF- $\beta 1$ の RNA expression は第16日目に増加し, 21日目にピークとなり, 30日目に減少し, 以後漸減していった (図 1A). type I と type II TGF- β receptors の RNA expression は TGF- $\beta 1$ mRNA と並行して増減していた (図 1B, 1C).

Fibronectin の mRNA は第16日目に急激に増加し, 30日までほぼ同じ状態で, 42日に明らかに減少して

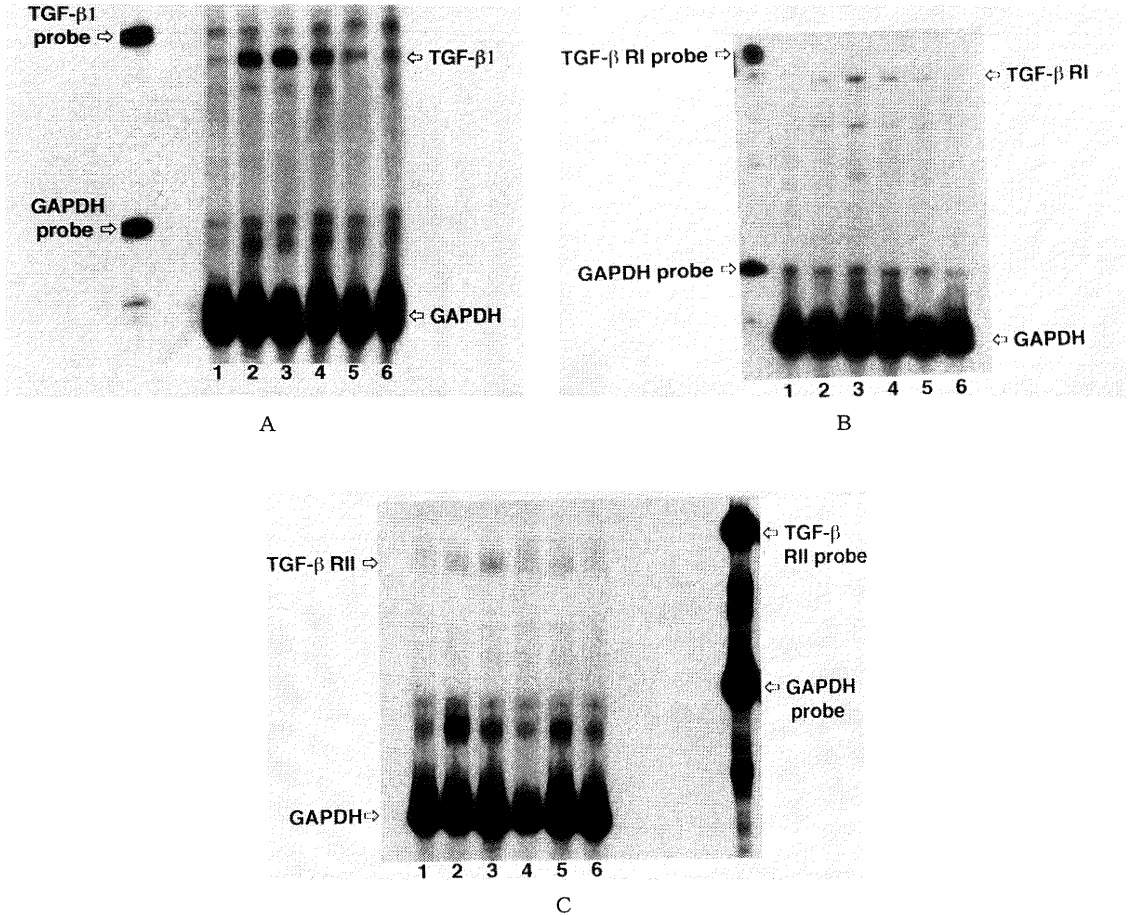


図1 EAM経過中のラット TGF-β1, type I TGF-β receptor, type II TGF-β receptor および GAPDH の antisense cRNA probe を用いた ribonuclease protection assay. Lane 1: ラット心臓第0日目, lane 2: 第16日目, lane 3: 第21日目, lane 4: 第30日目, lane 5: 第42日目, lane 6: 第60日目.
 A. 上部のバンドは TGF-β1 mRNA の expression. 下部のバンドは GAPDH の expression. TGF-β1 mRNA の expression の増加のピークは第21日目にみられた. 最も左の lane は 1×10^2 cpm の TGF-β1 および GAPDH のための cRNA probe の電気泳動.
 B. 上部のバンドは type I TGF-β receptor mRNA の expression. ピークは第21日目にみられた. 下部のバンドは GAPDH の expression. 最も左の lane は 1×10^2 cpm の type I TGF-β receptor および GAPDH のための cRNA probe の電気泳動.
 C. 上部のバンドは type II TGF-β receptor mRNA の expression. Type I TGF-β receptor mRNA の expression と並行して増加した. 最も右の Lane は 1×10^3 cpm の type II TGF-β receptor および GAPDH のための cRNA probe の電気泳動.

表2 Changes in Heart Size During the Course of EAM

Days After Immunization	n	HW/BW	Heart Size Ant (mm)	Heart Size Post (mm)	Heart Size SA (mm)
Control	8	2.64±0.11	14.92±0.33	11.08±0.37	11.42±0.42
Day 16	6	6.58±0.38*	15.33±0.61	11.93±0.45	12.13±0.57
Day 21	5	7.32±0.45*	16.64±0.81*	12.54±0.67*	12.82±0.75†
Day 30	5	5.16±0.59*	17.13±0.37*	13.14±0.51*	13.36±0.37*
Day 42	6	4.46±0.33*	17.85±0.33*	13.58±0.42*	13.88±0.48*
Day 60	5	3.54±0.19*	18.56±0.28*	13.82±0.23*	14.48±0.35*

n indicates number of rats; HW, heart weight; BW, body weight; Values are mean±SD.

* p<0.01; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

† p<0.05; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

表3 mRNA Expression Evaluated by Ratios Between TGF-β1, types I and II TGF-β Receptors, Fibronectin, Type I Collagen, Type III Collagen, Type IV Collagen and GAPDH in Different Stages of the EAM Course

Days After Immunization	TGF-β1/GAPDH	TGF-β RI/GAPDH	TGF-β RII/GAPDH	FN/GAPDH	Col. I/GAPDH	Col. III/GAPDH	Col. IV/GAPDH
Control	1.31±0.63	0.66±0.30	0.96±0.36	0.2±0.1	5.06±4.52	20.53±6.5	11.23±2.13
Day 16	8.56±1.26*	2.53±0.63*	3.1±0.53*	42.4±5.62*	74.3±5.56*	116.9±7.85*	26.9±4.26*
Day 21	11.83±1.37*	4.86±1.13*	5.33±0.85*	38.46±3.26*	73.3±4.36*	117.13±7.64*	26.9±5.12*
Day 30	4.83±0.39*	2.43±0.52*	5.06±1.06*	39.26±6.23*	78.46±4.82*	132.63±9.28*	30.03±6.15*
Day 42	1.66±0.52	2.2±0.65*	2.46±0.67*	19.7±3.26*	17.63±6.2†	71.86±6.48*	22.23±5.21*
Day 60	1.42±0.36	0.66±0.28	1.34±0.44	9.43±1.52*	8.8±4.76	50.13±5.65*	11.93±0.65

TGF-β1 indicates transforming growth factor-β1; TGF-β RI, type I transforming growth factor-β receptor; TGF-β RII, type II transforming growth factor-β receptor; FN, fibronectin; Col. I, α1 type I collagen; Col. III, α1 type III collagen; Col. IV, α2 type IV collagen

* p<0.01; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

† p<0.05; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

るが、control と比較すると60日までは有意に上昇していた (図 2A)。

α1 type I collagen の mRNA の上昇は第16日目には上昇がみられており、30日まで持続し、42日目には減少し、60日目には基に戻る (図 2B)。一方、α1 type III collagen の mRNA の expression は16日目には増加しており、30日目まで増加した状態が続き、その後減少するが、60日目まで明らかに高い状態が続いており、α1 type I collagen とは異なっていた (図 2C)。α2 type IV collagen mRNA は16日目増加し、16日目から42日目まではほとんど変わらず、60日目に元に戻っていた (図 2D)。Collagenase 72 および collagenase 92 は control 群に増加しており、EAM 群では30日目にピークを示していた。TIMP-1 mRNA の expression は control 群ではわずかに見られるのみであったが、EAM 群では16

表4 mRNA Expression Evaluated by Ratios Between Collagenase 72, Collagenase 92, TIMP-1 and GAPDH in Different Stages of the EAM Course

Days After Immunization	C 72/GAPDH	C 92/GAPDH	TIMP-1/GAPDH
Control	11.38±0.96	6.21±0.84	4.11±1.15
Day 16	18.48±1.15	17.45±2.13	51.67±5.19
Day 21	24.35±2.91	25.64±2.89	48.61±4.17
Day 30	28.26±3.13	27.9±1.75	38.36±3.14
Day 42	19.28±2.14	17.58±3.57	9.92±2.95
Day 60	13.78±1.96	9.21±1.94	8.07±2.17

C 72 indicates Collagenase 72; C 92, Collagenase 92.

* p<0.01; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

† p<0.05; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

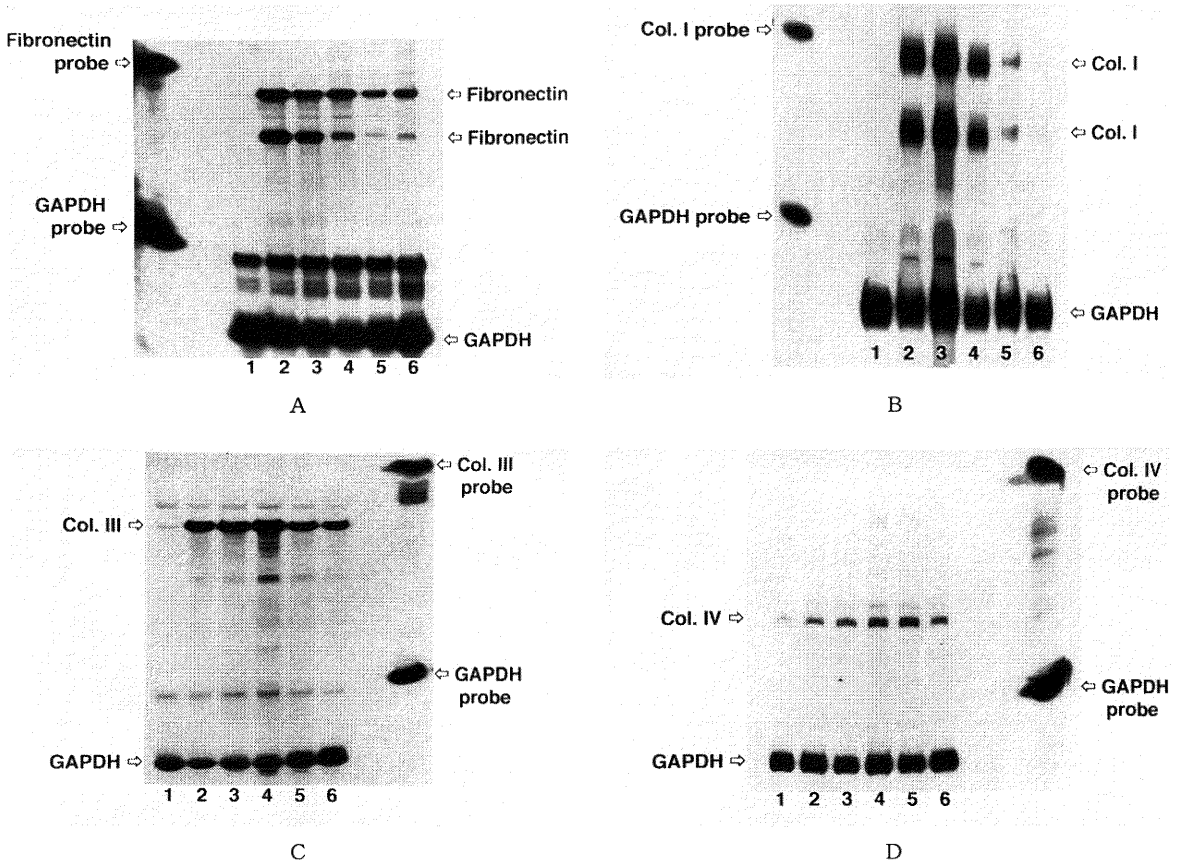


図 2 EAM 経過中のラットの fibronectin, $\alpha 1$ type I collagen, $\alpha 1$ type III collagen, $\alpha 2$ type IV collagen および GAPDH の antisense cRNA probe を用いた Ribo-nuclease protection assay. Lane 1: ラット心臓第 0 日目, lane 2: 第 16 日目, lane 3: 第 21 日目, lane 4: 第 30 日目, lane 5: 第 42 日目, lane 6: 第 60 日目。
 A. 上部の 2 つのバンドは fibronectin の mRNA の expression. 下部のバンドは GAPDH の expression. Fibronectin mRNA の expression は第 16 日目に急激に増加し, 30 日目まで持続し, その後減少がみられた. 2 つのバンドはスプライシングを示す. 最も左の lane は 3×10^2 cpm の TGF- $\beta 1$ および GAPDH のための cRNA probe の電気泳動。
 B. 上部の 2 つのバンドは $\alpha 1$ type I collagen mRNA の expression. 第 16 日目から 30 日目に増加し, 42 日目に減少がみられた. 2 つのバンドは同様にスプライシングを示す. 下部のバンドは GAPDH の expression. 最も左の lane は 1×10^2 cpm の $\alpha 1$ type I collagen および GAPDH のための cRNA probe の電気泳動。
 C. 上部のバンドは $\alpha 1$ type III collagen mRNA の expression. 第 30 日目にピークがみられる. 60 日目まで $\alpha 1$ type III collagen mRNA の expression はまだよくみられ, $\alpha 1$ type I collagen mRNA の expression とは異なっている. 最も右の Lane は 1×10^3 cpm の $\alpha 1$ type III collagen および GAPDH の mRNA のための cRNA probe の電気泳動。
 D. 上部のバンドは $\alpha 2$ type IV collagen mRNA の expression. 第 16 日目に増加し, 42 日目まで持続し, 明らかなピークを作らずに 60 日目には減少する. 下部のバンドは GAPDH の expression. 最も右の lane は 1×10^3 cpm の $\alpha 2$ type IV collagen および GAPDH の mRNA のための cRNA probe の電気泳動。

表5 Microscopic Findings and Immunofluorescence Scores of Fibronectin, Type I Collagen and Type III Collagen During EAM Course

Days After Immunization	n	Micro Scores	FN Scores	Col. I Scores	Col. III Scores
Control	8	0±0	1.06±0.08	1.05±0.08	1.08±0.09
Day 16	6	2.12±0.66*	3.35±0.73*	2.78±0.61*	2.83±0.78*
Day 21	5	2.48±0.48*	3.22±0.41*	3.05±0.53	3.16±0.49*
Day 30	5	2.17±0.42*	3.10±0.54*	3.15±0.45*	3.32±0.37*
Day 42	6	1.76±0.21*†	3.04±0.39*	2.98±0.38*	3.18±0.45*
Day 60	5	1.44±0.18*†	2.92±0.19*	2.41±0.31*	3.06±0.34*

n indicates number of rats ; micro, microscopic scores ; FN, fibronectin ; Col. I, $\alpha 1$ type I collagen ; Col. III, $\alpha 1$ type III collagen

* $p < 0.01$; control group vs rats from Days 16, 21, 30, 42 and 60.

† inflammatory cell infiltrations were almost replaced by fibrosis.

日目に劇的に増加し、21日目にわずかに減少、30日目まではほぼ同じレベルで42日目、60日目に急激に減少していた。これらの定量を表3, 4に示す。

3) 組織所見

ブタ心筋ミオシンを免疫したラットの心臓は病初期の第16日目に単核球の浸潤がみられる。単核球の浸潤は21日目にピークに達し、30日目にも依然として存在し、42日目、60日目には消失し、この頃は線維組織に置き換わっていた。これらの microscopic score を表5に示す。

蛍光抗体法による組織所見では EAM の心臓中にすべてではないが、macrophage 中に TGF- $\beta 1$ の産生を認めた(図3A, 3B)。一方 type I TGF- β receptor は正常および EAM の心臓の間質内に存在する細胞、おそらく線維芽細胞と思われる細胞に観察された(図3C, 3D)。この細胞は phalloidin は陰性で融合した形に見える細胞であった。TGF- $\beta 1$ および TGF- β receptor 陽性細胞は16日目に増加しており、mRNA の expression と同様な動態を示していた。

Control 群では間質に fibronectin, type I collagen および type III collagen が観察された(図4A, 4B, 4G)。

EAM が発症した後の16日目に fibronectin の沈着が浮腫状の間質に観察され(図4B)、それは白血球が浸潤している部位により著明に観察された。Fibronectin の集積は30日目まで強くなり、その後減少するが、control と比較すると60日目にもまだ増強していた。

一方、type I collagen と type III collagen は16日目にはあまりはっきりしないが、21日目には強くなり、30日目にはピークとなり60日目まで持続した(図3F, 3I)。16日目、21日目、30日目、42日目、60日目と phalloidin

によって染色されていた心筋細胞は fibronectin, type I および type III collagen の沈着によって置き換えられ、残存心筋に肥大を認めた(図4B, 4C, 4E, 4F, 4H, 4I)。Control 群の心筋細胞は図4A, 4D, 4G に示す。

考 案

TGF- $\beta 1$ が細胞増殖、遺伝子の expression, 接着、血管増生、ECM の産生に重要な役割を演じているとの報告はいくつかの実験研究にて指摘されている。TGF- β は主な ECM 蛋白、fibronectin, collagen の発現を増加させ、それらを基質の中に結合させる¹²⁾。潜在性の TGF- β が免疫応答の中で、活性化される過程は十分には解明されてはいないが、macrophage が潜在性および活性化 TGF- β を分泌していることは推測されている²⁶⁾。本研究によって、EAM の経過中に TGF- $\beta 1$ の mRNA の expression が ECM 蛋白の mRNA の expression と一緒に増加することが明らかになった。TGF- $\beta 1$ の蛋白がいくつかの macrophage に存在したことは、免疫応答の中でこれらの macrophage が TGF- β を産生していると考えられる。

Type I TGF- β receptor は単独では細胞表面中でリガンドと結合することはできず、type II TGF- β receptor と結合することによってリガンドを認識できる。この複合体の構造は signalling に深く関わっている²⁷⁾。Receptor II は TGF- β receptor 複合体の末端に情報を伝達する receptor I のリン酸化を起こさせる²⁸⁾。Receptor II は TGF- β の増殖抑制作用に必要なものであり、それを介しておこなわれる。一方、fibronectin 合成は receptor I を介して行われる²⁹⁾。本研

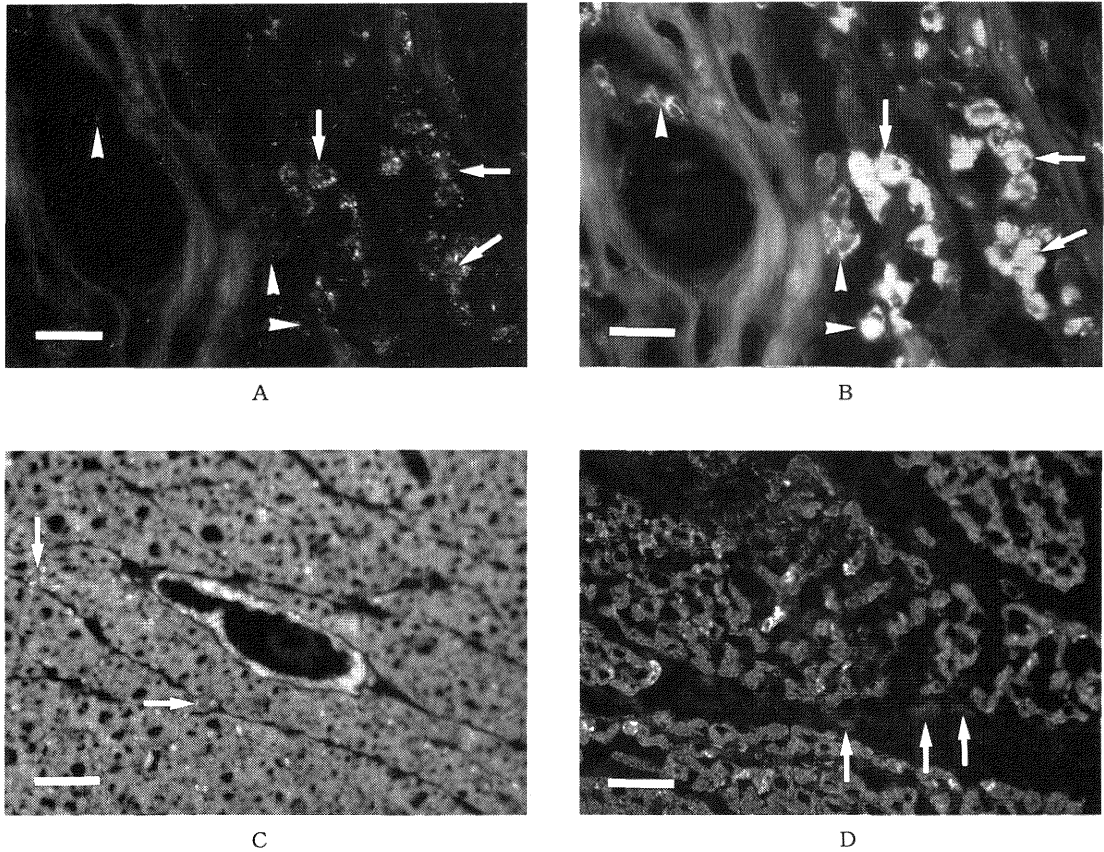


図 3 A. 第16日目の病変部位における TGF- β 1 の蛍光抗体法。円形の細胞にみられる (矢印)。TGF- β 1 は矢頭で示すこれらのすべての細胞にはみられない。線は 10 μ m。
 B. 同じ部位での切片による像では矢印で示す TGF- β 1 陽性細胞は macrophage である。いくつかの macrophage は TGF- β 1 を産生していない (矢頭)。線は 10 μ m。
 C. type I TGF- β receptor は control 群の間質の細胞内にみられた (矢印)。線は 20 μ m。
 D. type I TGF- β receptor は第16日目の EAM 心臓の間質の細胞内にみられた (矢印)。線は 20 μ m。

究で TGF- β 1 の mRNA の expression は type I と type II TGF- β receptor の増加と共に EAM の発症初期に増加することが観察された。Type I TGF- β receptor は蛍光抗体法にて心臓の間質に存在する細胞に存在したが、これらは紡錘形の細胞であり、おそらく線維芽細胞と思われる。これらの知見から、TGF- β は間質の線維芽細胞の receptor に結合して、ECM 蛋白の産生のひきがねとなり、これがラットの EAM から DCM になる過程に関与するものではないかと考えられる。

TGF- β 1 は免疫や感染において調節因子としても働

いていると考えられており、それは免疫抑制作用として働くと考えられている。TGF- β 1 のノックアウトマウスは多発性の炎症細胞反応巣と組織壊死を生じ、臓器不全と死亡に至る wasting syndrome に陥る³⁰⁾。TGF- β は実験的自己免疫疾患で保護作用を示すとされる³¹⁾³²⁾。EAM は T 細胞依存性の心筋炎であることが判明している。このモデルは多数の活性化された T 細胞が心臓や心嚢液に浸潤する。巨細胞は劇症期にみられるのみで、これらは免疫する抗原の量に関係する。TGF- β 1 は EAM の経過中に炎症反応を抑える役割を示しているのかもし

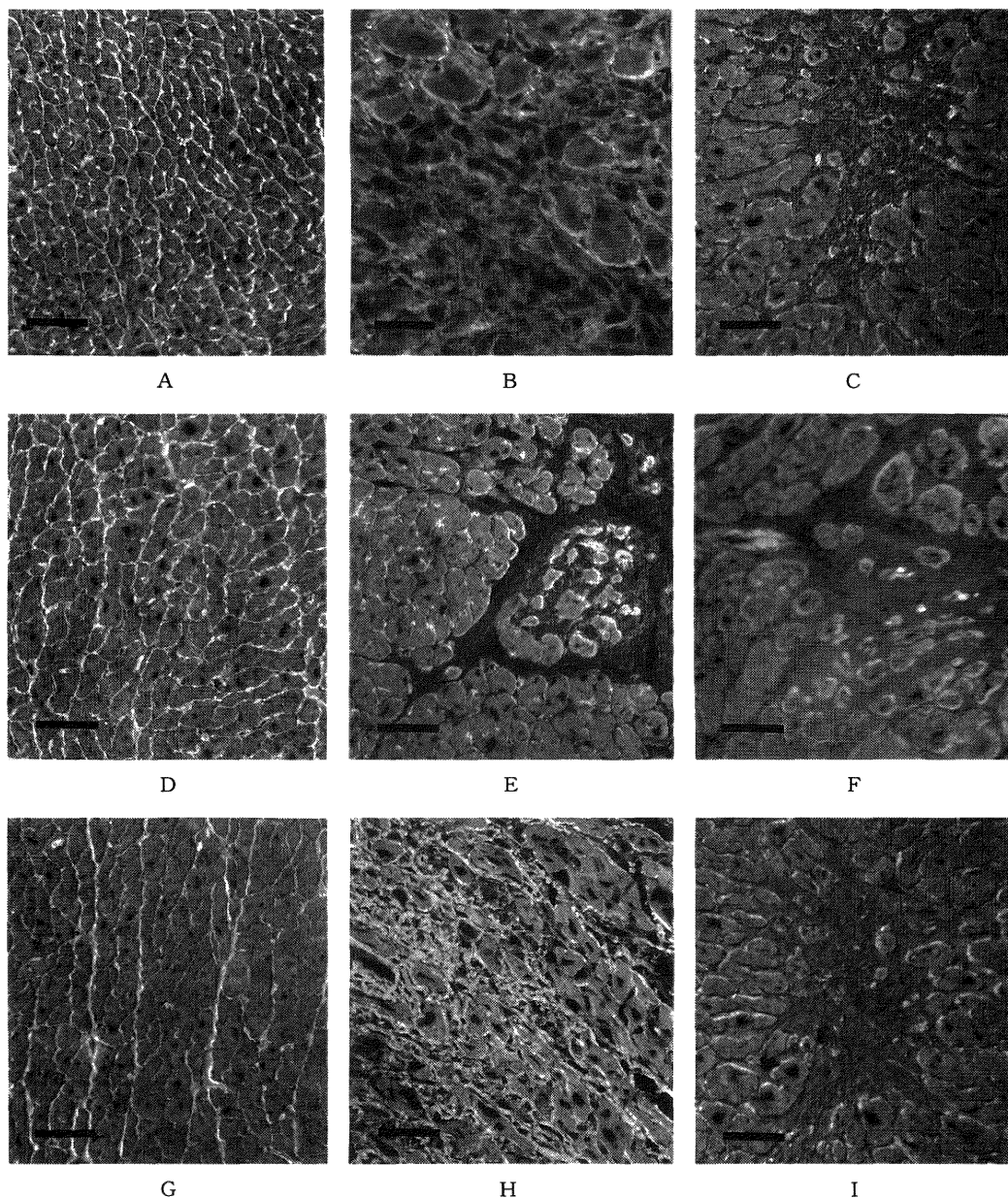


図4 A, D, G. control 群での fibronectin, type I collagen および, type III collagen の免疫染色. 緑色の所が fibronectin, type I collagen および, type III collagen を示し, 赤い部分が RITC-labeled phalloidin で染色した心筋細胞を示す. 線は 40 μm .

B, E, H. 第16日目の EAM 心臓における fibronectin, type I collagen および, type III collagen の免疫染色. Fibronectin, type I collagen および, type III collagen が増加し, それは不均一にみられる. Fibronectin, type I collagen および, type III collagen のある部分には赤で染まる心筋細胞はみられない. 心筋炎の初期に重症な心筋傷害を疑わせる. 心筋細胞肥大がみられる. 線は 40 μm .

C, F, I. 第60日目の EAM 心臓における fibronectin, type I collagen および, type III collagen の免疫染色. 心筋組織の広範な部分に心筋細胞 (赤い部分) に置き換わって fibronectin, type I collagen および, type III collagen 陽性所見がある (緑色の部分). 心筋細胞肥大がみられる. 線は 40 μm .

れない。一方 TGF- β 1 は容易に ECM 蛋白を増加させ、異常な cardiac remodeling を引き起こし、ついには DCM に進展させる可能性があり心筋組織に対して好ましくない作用が考えられる。TGF- β 1 が細胞周囲の protease 活性を抑える機序の1つに TIMP の産生を刺激している可能性が考えられる。

ECM 成分の変化が心血管病変に関わっていることはよく知られている⁸⁾³⁷⁾⁻⁴²⁾。今回の結果で type III collagen が type I collagen よりも長く出現していたことはある意味で EAM から DCM に進展する過程を説明している。なぜなら type III collagen の張力は type I collagen よりも弱いと考えられているので、変形を抑えたり、適切な支えとなるには不十分であるからである。さらに心筋線維間の横の結合が少なくなるために、心筋の減少、壁厚減少、伸展、拡張および心機能低下を引き起こし易くし、DCM への進展を説明することができる。

Fibronectin は細胞表面、ECM、および体液の中に見出される。この ECM 成分は様々な細胞によって合成され、細胞の接着を支えている。今回の結果で fibronectin は心筋炎の初期に急激に上昇し、60日目まで mRNA および蛋白レベルで持続が確認されており、おそらく fibronectin が ECM の中の type III collagen と関係していると思われる。

以上まとめると、1) TGF- β 1 の mRNA の expression は type I と type II TGF- β receptor と並行して増加し、EAM における ECM 成分の産生に重要な役割を演じていると推測された。2) このモデルにおける TGF- β 1 産生細胞は macrophage であり、type I TGF- β receptor はおそらく間質中の線維芽細胞にみられると思われた。これらから macrophage が TGF- β 1 を産生し、線維芽細胞により ECM の産生が考えられた。3) Collagenase 72 と 92 の mRNA の expression は control 群にもみられ、これが type IV collagen の産生と分解のバランスを保つのに重要であると考えられた。4) TIMP-1 の mRNA の expression は16日目に増加し、これは EAM の初期の matrix metalloproteinases (MMPs) の阻害に関わっていると考えられた。5) Type III collagen の出現の持続が type I collagen よりも長かったことは心筋炎から DCM に進展機序に重要な役割を演じていると考えられた。6) Fibronectin, type I collagen, type III collagen の組織中への沈着は mRNA の expression と相関しており、collagen network の広範な remodeling が、心筋炎後の病変を修飾している

ものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました木原 達教授、山本 格助教授、大倉裕二先生、矢尾板永信先生、川崎克俊先生、埴 晴雄先生、小玉誠先生、和泉 徹教授、柴田 昭教授、相沢義房教授、組織のスライドを作っていただきました玉木悦子さん、統計解析を御指導いただきました田辺直仁先生に心から深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Braunwald, E.: Heart disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 5th edition, W.B. Saunders, Philadelphia, 1435~1445, 1997.
- 2) Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G. and Kandolf, R.: Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89: 314~318, 1992.
- 3) Dec, G.W.Jr., Palacios, I.F., Fallon, J.T., Aretz, H.T., Mills, J., Lee, D.C.-S. and Johnson, R.A.: Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies. Clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. N. Engl. J. Med., 312: 885~890, 1985.
- 4) Humbert, P., Faivre, R., Fellman, D., Bassand, J.P. and Dupond, J.L.: Giant cell myocarditis: an autoimmune disease? Am. Heart J., 115: 485~487, 1988.
- 5) Wilson, M.S., Barth, R.F., Baker, P.B., Unverferth, D.V. and Kolibash, A.J.: Giant cell myocarditis. Am. J. Med., 79: 647~652, 1985.
- 6) Davidoff, R., Palacios, I., Southern, J., Fallon, J.T., Newell, J. and Dec, G.W.: Giant cell versus lymphocytic myocarditis. A comparison of their clinical features and long-term outcomes. Circulation, 83: 953~961, 1991.
- 7) Akhurst, R.J., Lehnert, S.A., Faissner, A. and Duffie, E.: TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. Development, 108: 645~656, 1990.

- 8) Villarreal, F.J. and Dillmann, W.H.: Cardiac hypertrophy-induced changes in messenger RNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am. J. Physiol.*, **262**: H1861~H1866, 1992.
- 9) Thompson, N.L., Bazoberry, F., Speir, E.H., Casscells, W., Ferrans, V.J., Flanders, K.C., Kondaiah, P., Geiser, A.G. and Sporn, M.B.: Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors*, **1**: 91~99, 1988.
- 10) Wallick, S.C., Figari, I.S., Morris, R.E., Levinson, A.D. and Palladino, M.A.: Immunoregulatory role of transforming growth factor β (TGF- β) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF- β 1. *J. Exp. Med.*, **172**: 1777~1784, 1990.
- 11) Waltenberger, J., Wanders, A., Fellstrom, B., Miyazono, K., Heldin, C.H. and Funa, K.: Induction of transforming growth factor-beta during cardiac allograft rejection. *J. Immunol.*, **151**: 1147~1157, 1993.
- 12) Ignatz, R.A. and Massague, J.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **261**: 4337~4345, 1986.
- 13) Ruscetti, F.W. and Palladino, M.A.: Transforming growth factor- β and the immune system. *Prog. Growth Factor Res.*, **3**: 159~175, 1991.
- 14) Lefer, A.M., Tsao, P., Aoki, N. and Palladino, M.A.Jr.: Mediation of cardioprotection by transforming growth factor- β . *Science*, **249**: 61~64, 1990.
- 15) Weber, K.T., Sun, Y., Tyagi, S.C. and Cleutjens, J.P.M.: Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **26**: 279~292, 1994.
- 16) Marjjanowski, M.M.H., Loos, C.M., Mohrschladt, M.F. and Becker, A.E.: The neonatal heart has a relatively high content of total collagen and type I collagen, a condition that may explain the less compliant state. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **23**: 1204~1208, 1994.
- 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) 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.
- 19) Kodama, M., Hanawa, H., Saeki, M., Hosono, H., Inomata, T., Suzuki, K. and Shibata, A.: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ. Res.*, **75**: 278~284, 1994.
- 20) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, **162**: 156~159, 1987.
- 21) Feng, L., Tang, W.W., Loskutoff, D.J. and Wilson, C.B.: Dysfunction of glomerular fibrinolysis in experimental antglomerular basement membrane antibody glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **3**: 1753~1764, 1993.
- 22) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Publications. 7.71~7.78, 1989.
- 23) Masters, D.B., Griggs, C.T. and Berde, C.B.: High sensitivity quantification of RNA from gels and autoradiograms with affordable optical scanning. *Biotechniques*, **12**: 902~911, 1992.
- 24) Hanawa, H., Kodama, M., Zhang, S., Izumi, T. and Shibata, A.: An immunosuppressant compound, FK-506, prevents the progression of autoimmune myocarditis in rats. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **62**: 321~326, 1992.
- 25) Okragly, A., Balwit, J.M. and Haak-Frendscho, M.: Transforming growth factor β 1 (TGF β 1): a biological paradox. *Promega Notes*, **47**: 10~14, 1994.
- 26) Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines,

- E.W., Ross, R. and Sporn, M.B.: Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Biochemistry*, **84**: 6020~6024, 1987.
- 27) **Wrana, J.L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F. and Massague, J.**: TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, **71**: 1003~1014, 1992.
- 28) **Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J.**: Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, **370**: 341~347, 1994.
- 29) **Chen, R.-H., Ebner, R. and Derynck, R.**: Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. *Science*, **260**: 1335~1338, 1993.
- 30) **Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N. and Doetschman, T.**: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, **359**: 693~699, 1992.
- 31) **Kuruvilla, A.P., Shah, R., Hochwald, G.M., Liggitt, H.D., Palladino, M.A. and Thorbecke, G.J.**: Protective effect of transforming growth factor β 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 2918~2921, 1991.
- 32) **Racke, M.K., Dhib-Jalbut, S., Cannella, B., Albert, P.S., Raine, C.S. and McFarlin, D.E.**: Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor- β 1. *J. Immunol.*, **146**: 3012~3017, 1991.
- 33) **Kodama, M. and Izumi, T.**: Experimental autoimmune myocarditis. *Acta Med. Biol.*, **39**: 1~10, 1991.
- 34) **Smith, S.C. and Allen, P.M.**: Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J. Immunol.*, **147**: 2141~2147, 1991.
- 35) **Hanawa, H., Tsuchida, M., Matsumoto, Y., Watanabe, H., Abo, T., Sekikawa, H., Kodama, M., Zhang, S., Izumi, T. and Shibata, A.**: Characterization of T cells infiltrating the heart in rats with experimental autoimmune myocarditis. Their similarity to extrathymic T cells in mice and the site of proliferation. *J. Immunol.*, **150**: 5682~5695, 1993.
- 36) **Kodama, M., Matsumoto, Y., Fujiwara, M., Zhang, S., Hanawa, H., Itoh, E., Tsuda, T., Izumi, T. and Shibata, A.**: Characteristics of giant cells and factors related to the formation of giant cells in myocarditis. *Circ. Res.*, **69**: 1042~1050, 1991.
- 37) **Marijjanowski, M.M.H., Teeling, P., Mann, J. and Becker, A.E.**: Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **25**: 1263~1272, 1995.
- 38) **Weber, K.T., Pick, R., Silver, M.A., Moe, G.W., Janicki, J.S., Zucker, I.H. and Armstrong, P.W.**: Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation*, **82**: 1387~1401, 1990.
- 39) **Weber, K.T., Janicki, J.S., Pick, R., Abrahams, C., Shroff, S.G., Bashey, R.I. and Chen, R.M.**: Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium. *Circulation*, **75**: 140~147, 1987.
- 40) **Capasso, J.M., Robinson, T.F. and Anversa, P.**: Alterations in collagen cross-linking impair myocardial contractility in the mouse heart. *Circ. Res.*, **65**: 1657~1664, 1989.
- 41) **Charney, R.H., Takahashi, S., Zhao, M., Sonnenblick, E.H. and Eng, C.**: Collagen loss in the stunned myocardium. *Circulation*, **85**: 1483~1490, 1992.
- 42) **Gunja-Smith, Z., Morales, A.R., Romanelli, R. and Woessner, J.F.Jr.**: Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am. J. Pathol.*, **148**: 1639~1648, 1996.
- 43) **Weber, K.T., Pick, R., Janicki, J.S., Gadodia, G. and Lakier, J.B.**: Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. *Am. Heart J.*, **116**: 1641~1646, 1988.

- 44) **Hynes, R.O. and Yamada, K.M.:** Fibronectins : adhesive glycoproteins of cell surface and blood.
multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Nature*, **275**: 179~184, 1978.
Biol., **95**: 369~377, 1982. (平成9年1月28日受付)
- 45) **Yamada, K.M. and Olden, K.:** Fibronectin-
-