

	みつま わたる
氏 名	三間 渉
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第215号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis (自己免疫性心筋炎ラットにおけるエリスロポエチン製剤の心保護効果)
論文審査委員	主査 教授 林 純 一 副査 教授 相 澤 義 房 副査 教授 樋 口 宗 史

#### 博士論文の要旨

エリスロポエチンは赤血球造血を促すホルモンとして知られているが、近年抗アポトーシス効果や抗炎症効果、血管新生促進効果など多面的効果があることが判明してきている。脳神経系をはじめとしてその多面的作用における研究が進んでいるが、いまだその詳細な作用機序は不明である。エリスロポエチンはそのレセプターであるエリスロポエチンレセプターと結合することによって生理活性を示す。心臓にもエリスロポエチンレセプターが存在することが判明し、虚血・再灌流傷害モデルラットや虚血性心疾患後の心不全モデルラットにおいてエリスロポエチンの心保護効果が報告されている。一方自己免疫性心筋炎ラットは臨床における予後不良疾患の劇症型心筋炎の一病理像である巨細胞性心筋炎と組織像が類似しており、その発症、進展、寛解にヘルパーT細胞のバランスが関与していると考えられている。そのバランスには様々なサイトカイン、ケモカインの関与していることが我々のグループのこれまでの研究で判明しており、心筋炎の進展にはアポトーシスを始めとする心リモデリングが関与することも報告されてきている。今回我々はエリスロポエチンの抗炎症効果、抗アポトーシス効果に注目し自己免疫性心筋炎ラットを使用しエリスロポエチンの心筋炎発生、進展における効果を検討した。

7週齢のレイスラットをブタ心臓から精製した心筋ミオシンで感作し心筋炎を発症させ、コントロール群 (n=10) とエリスロポエチン (500U/kg 連日腹腔内注射 n=10) 群に分けた。感作後炎症極期と考えられる22日目で心エコー、観血的血行動態評価を行った後に解剖を行い、心筋組織、血液サンプルを採取後、組織学的、生化学的に評価した。経過中にコントロール群で2匹、エリスロポエチン群で1匹心筋炎にて死亡しそれぞれ8匹、9匹で評価を行った。コントロール群に比し、エリスロポエチン群では心エコー図による心機能は有意に良好(%FS  $48 \pm 3.2\%$  vs  $33.4 \pm 2.5\%$ ;  $P < 0.01$ )であり、肉眼的にも心臓の炎症の程度は軽度であった。Azan-Mallory染色における心筋炎組織の面積の定量評価も治療群で有意に減少していた ( $26.6 \pm 4.1\%$  vs  $40.5 \pm 4.1\%$ ;  $P < 0.01$ )。心体重比や観血

的な血行動態測定は両群ともに差は認められなかったが、コントロール群では明らかに心嚢水が貯留していた。血液検査ではヘモグロビン値がエリスロポエチン治療群で有意に高く ( $13.4 \pm 0.4 \text{ g/dl}$  vs  $19.2 \pm 0.2 \text{ g/dl}$ ,  $P < 0.01$ )、白血球値が治療群で有意に低値であった ( $16.9 \pm 0.9 \times 10^3 / \mu\text{l}$  vs  $13.9 \pm 0.8 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ,  $P < 0.05$ )。RT-PCR 法を用いた心筋組織の mRNA の発現における検討においても IL-6、TNF- $\alpha$  の発現が治療群において有意に減少しており ( $P < 0.05$ ) MCP-1 の発現も減少傾向にあった ( $P < 0.10$ )。しかし IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の発現には有意差は認めなかった。TUNEL 法を用いた組織学的検索においてもエリスロポエチンは心筋細胞のアポトーシスを有意に抑制していた。一方エリスロポエチンレセプターの免疫組織染色では正常ラットに比べ心筋炎ラットにおいて心筋細胞が濃染していた。

以上の結果よりエリスロポエチン治療により、ラット自己免疫性心筋炎の進展を抑制した。炎症性サイトカインの発現は抑制したものの、自己免疫性心筋炎の進展にかかわるヘルパーT細胞のバランスについては今回の検討では明らかにできなかった。またエリスロポエチンレセプターの発現は組織学的には心筋細胞で、浸潤している炎症細胞には認められず、この結果からはアポトーシスの抑制による作用で自己免疫性の心筋炎の進展を抑えたとも考えられた。エリスロポエチン治療群では有意なヘモグロビン値の上昇がありこれによる組織への酸素供給能の影響を除外できなかった。よって今回の結果のメカニズムはエリスロポエチンの直接的な作用として抗炎症、抗アポトーシス効果、間接的には造血による酸素供給能の改善がそれぞれ部分的に関与していると考えられた。現在カルバミルエリスロポエチンやアシアロエリスロポエチンなどの造血作用を示さないエリスロポエチン製剤が開発されてきており、これらを使用した研究が今後の課題になってくると思われる。エリスロポエチンは現在臨床において腎性貧血の治療として広く使用されており、われわれの結果は炎症性心疾患における効果だけでなく、エリスロポエチンの多面的作用の臨床応用にも有益な結果と考えられた。

#### (論文審査の要旨)

エリスロポエチン (EPO) は赤血球造血を促すホルモンとして知られているが、近年多面的作用があることが判明してきている。我々は EPO の抗炎症、抗アポトーシス効果に注目し自己免疫性心筋炎ラットを使用し EPO の心筋炎発生、進展における効果を検討した。

7 週齢のルイスラットをミオシンで感作しコントロール群 ( $n=8$ ) と EPO 群 ( $500 \text{ U/kg}$  連日腹腔内注射  $n=9$ ) に分けた。感作後 22 日で評価を行った。EPO 群では心エコー図による心機能は有意に良好 (%FS  $48 \pm 3.2\%$  vs  $33.4 \pm 2.5\%$ ;  $p < 0.01$ ) であり、心筋炎組織の面積も有意に減少していた ( $26.6 \pm 4.1\%$  vs  $40.5 \pm 4.1\%$ ;  $p < 0.01$ )。RT-PCR 法を用いた心筋組織の mRNA の発現における検討においても IL-6、TNF- $\alpha$  の発現が治療群で有意に減少していた。TUNEL 法を用いた組織学的検索においても EPO は心筋細胞のアポトーシスを抑制していた。一方 EPO レセプターの免疫組織染色では正常ラットに比べ心筋炎ラットにおいて強く染まっていた。

EPO はラット自己免疫性心筋炎の進展を、炎症の制御とアポトーシスの抑制により行っていると考えられた。EPO は現在腎性貧血の治療として広く臨床の場で使用されているがその多面的作用は臨床的に有益な結果をもたらすと考えられた。

以上の知見を明らかにした点に学位論文として価値を認める。