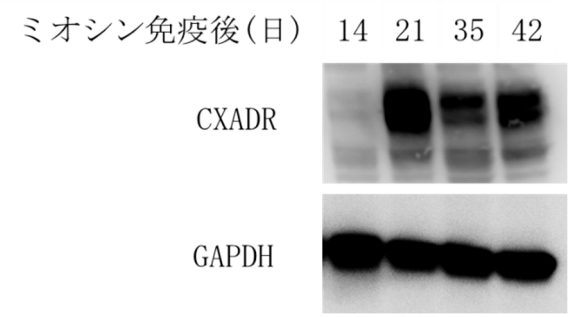
105　劇症型心筋炎の発症機序解明と治療法開発に関する研究	竹内　一郎

【目的】劇症型心筋炎は、心原性ショックを主体とした若年者に発症する致死的な疾患である。故に、その治療法の確立は世界的な課題である。心筋炎の発症機序はウイルス感染と引き続く自己免疫応答が考えられてきた。本研究では、ヒト劇症型心筋炎の臨床経過をよく反映した実験的自己免疫性心筋炎モデルを作製し、それを用いて新たな治療標的分子を明らかとすることを目的とした。

【方法】完全フロントアジュバンドと共に心筋ミオシンペプチドを 6 週齢オス Balb/c マウスに皮下注射し、経時的に心筋標本の免疫組織学的検討と共にウエスタンブロット法にて分子シグナルを検討した。

【結果】心筋ミオシン免疫後 21 日目より心筋組織において細胞浸潤を認め、その後も持続した。肉眼的に、免疫 21 日目に炎症浮腫による心室腔の狭小化が認められ、一方 42 日目より心拡大が出現した。心筋炎の発症と最も関連したウイルスの一つであるコクサッキーアデノウイルスに対する受容体（CXADR）のタンパク発現は、健常心臓組織において認められなかったが、免疫 21 日目より出現しその後も持続した。免疫染色にてその局在は心筋細胞と血管内皮に認められた。以上の結果は、劇症型心筋炎の進展と CXADR の関連性及びその治療的役割を明らかとする根拠となる。

心筋ミオシン免疫後の心臓コクサッキーアデノウイルス受容体（CXADR）発現



105. 劇症型心筋炎の発症機序解明と治療法開発に関する研究

竹内　一郎

*横浜市立大学 医学部 救急医学講座

Key words：劇症型心筋炎，自己免疫，コクサッキーアデノウイルス受容体

緒　言

劇症型心筋炎は、心原性ショックを主体とした若年者に発症する致死的な疾患である。故に、その治療法の確立は世界的な課題である。心筋炎の発症機序はウイルス感染と引き続く自己免疫応答が考えられてきた。事実、心原性ショック患者において、巨細胞性の心筋組織炎症を認める例が少なくない［1］。この免疫学的背景は自己免疫応答によって説明されてきた。我々は、心筋ミオシン免疫により、ヒト劇症型心筋炎の臨床経過をよく反映した実験的自己免疫性心筋炎モデル（EAM）を作製した。近年、心筋炎の発症機序と最も関連したウイルスの一つであるコクサッキーアデノウイルスに対する受容体（CXADR）が同定された［2］。CXADR はウイルスの心筋組織への侵入において重要な役割を果たしていることが知られており、ヒト心筋炎・心筋症患者の心臓において CXADR の発現が報告されている［3］。しかしながら、その心臓自己免疫応答における役割は不明である。本研究では、EAM を用いて劇症型心筋炎に対する治療標的としての CXADR の意義を検討した。

方　法

1. 自己免疫性心筋炎モデルの作製

完全フロントアジュバンドと心筋ミオシンペプチドをよく混和し、6 週齢オス Balb/c マウスの鼠径部に皮下注射（免疫）した。

2. 肉眼・組織学的検討

免疫後 14、21、35、および 42 日目に肉眼・組織学的検討を行った。ヘマトキシリン染色にて心筋組織細胞浸潤の重症度を、シリウスレッド染色にて繊維化を評価した。

3. ウエスタンブロット

ミオシン免疫前および免疫後 14、21、35、および 42 日目の心臓からタンパクを抽出した。各サンプル 20 μg を 10～15%ゲルへ 30 mA でローディングした。引き続いて 350 mA で PVDF メンブランへ転写した。4℃で 24 時間 CXADR 抗体（Santa Cruz Biotechnology）で反応させた。室温 1 時間で二次抗体にて反応後ルミノ・イメージアナライザー LAS3000 を用いてタンパク発現を解析した。インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。

4. 免疫染色

ミオシン免疫前および免疫後 14、21、35、および 42 日目に摘出した心臓へ 4%ホルマリンを 24 時間以上浸透させ、パラフィン固定した後、6 μm の切片を作製した。クエン酸を用いて免疫賦活化し、1%ウシ血清アルブミンにてブロッキングした後に 1：100 の CXADR 抗体にて 4℃で 24 時間反応させた。引き続いて二次抗体反応後 3,3’ - ジアミノベンジジン四塩酸塩基質で発色させた。蛍光顕微鏡・キーエンス BZ-X800 を用いて解析した。

*現在の所属：横浜市立大学 大学院医学系研究科 救急医学教室

結　果

1. 自己免疫性心筋炎

肉眼的に、心筋ミオシン免疫後 21 日目より心室腔の浮腫性狭小化と心不全指標である肺体重比の増加が認められ、一方 42 日目より心拡大が出現した（図 1）。心筋組織において免疫後 21 日目より細胞浸潤を認め、その後も持続した。さらに、免疫 42 日目にはシリウスレッド染色により全周性の繊維化を認めた（図 2）。

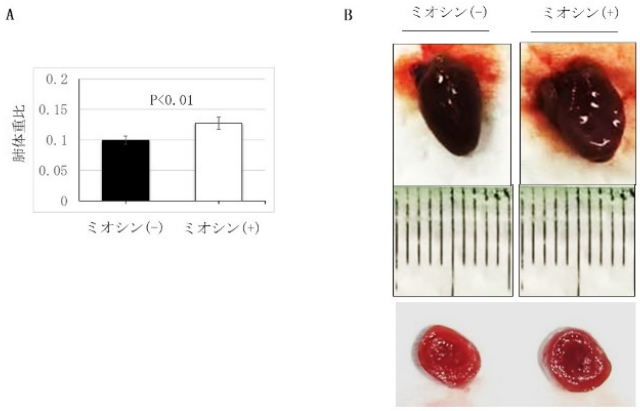


図 1. 自己免疫性心筋炎モデル

A) 肺体重比。ミオシン免疫後 21 日目の肺体重比を測定した。
P<0.01 vs. コントロール群（ミオシン免疫なし）、マン・ホイットニーの U 検定、n = 5。

B) 肉眼的所見。ミオシン免疫後 42 日目の肉眼的所見を検討した。コントロール群に比較し心拡大を認め、横断面像にて心室腔の拡大を認めた。

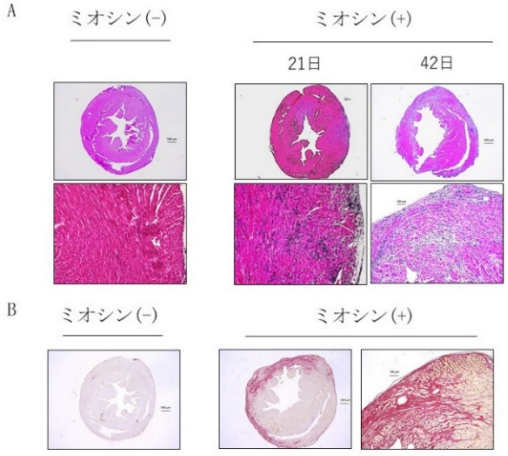


図 2. 組織学的所見

A) ミオシン免疫後 21 および 42 日目に心臓を摘出しホルマリン固定後パラフィン切片を作製した。ミオシン免疫後の心臓組織炎症持続。ヘマトキシリン・エオジン染色に組織学的検討を行った。ミオシン免疫後 21 日目より心筋細胞間質において細胞浸潤を認めた。その後、42 日目においても継続していた。

B) 心筋間質の繊維化。シリウスレッドにてコラーゲン染色を行った。ミオシン免疫 42 日目の心臓において全周性に繊維化が認められ、さらに強拡大にて著しい間質の繊維化が認められた（赤色部）。

2. 心臓コクサッキーアデノウイルス受容体（CXADR）発現

心臓より抽出したタンパクに対するウエスタンブロットにより、ミオシン免疫 21 日目よりコクサッキーアデノウイルス受容体（CXADR）のタンパク発現が認められ、その後も持続した（図 3）。免疫組織染色により CXADR の局在は炎症細胞浸潤周囲の心筋細胞および血管内皮細胞に認められた（図 4）。

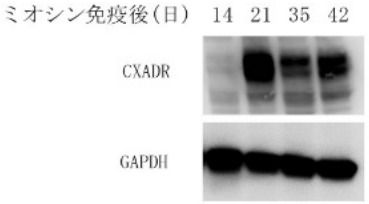


図 3. 心臓におけるコクサッキーアデノウイルス受容体（CXADR）発現

ミオシン免疫後経時的に心臓を摘出し SDS-PAGE にて CXADR タンパク発現を解析した。

免疫後 21 日目より CXADR タンパク発現が認められその後持続した。

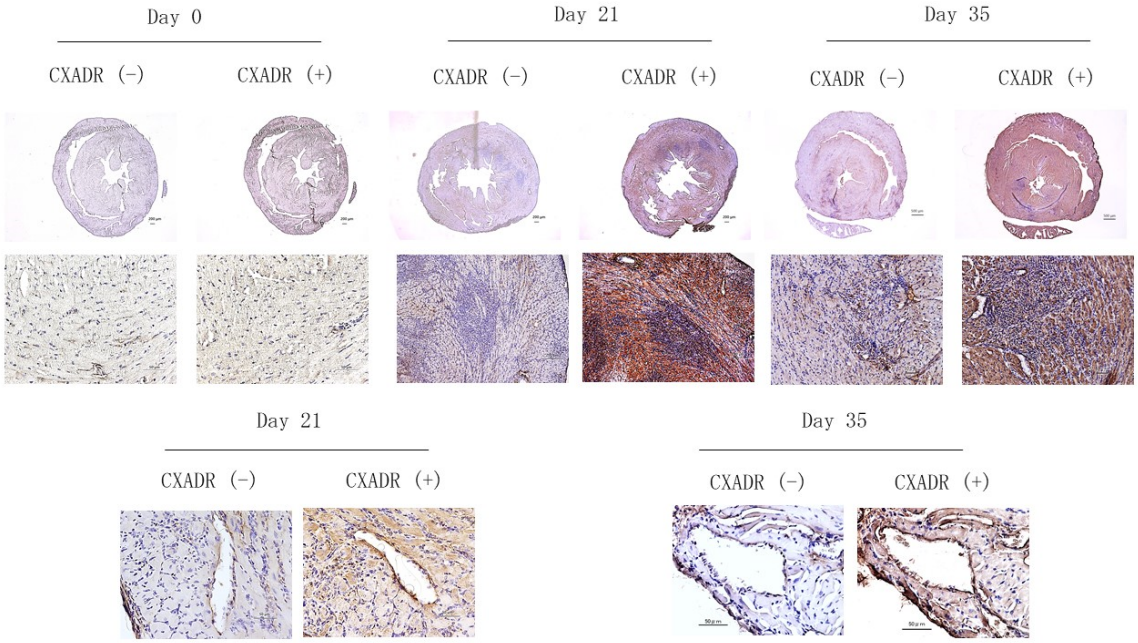


図 4. コクサッキーアデノウイルス受容体（CXADR）発現部位

ミオシン免疫前および免疫後経時的に心臓を摘出し CXADR に対する免疫染色を行った。

ミオシン免疫前において CXADR 染色はネガティブコントロールと同様に陰性であった。

ミオシン免疫 21 日目より炎症細胞浸潤領域周囲の心筋細胞において、ネガティブコントロールに比較し CXADR 発現は亢進していた。この現象は 35 日目においても認められた。加えて、血管内皮においても同様の所見が認められた。

考　察

心筋炎は心筋を主座とした炎症性疾患である。感冒症状に引き続く胸部症状を主訴にしばしば救急外来で経験される。多くが若年者であることが特徴であり、ショックを来す症例は劇症型心筋炎に分類される。その頻度は不明であるが、我々らの研究では約 20%である［4］。さらに、本邦における全国調査では、劇症型心筋炎の救命率は心原性ショックに対する体外循環導入にも関わらず 50%程度と高くない［5］。この要因として、心筋組織炎症に対する治療戦略が確立していないことが挙げられる。この問題は、心筋炎の複雑な免疫機序を反映している［6］。即ち、ウイルス感染のみならず引き続く自己免疫応答が発症進展機序として考えられてきた。したがって、治療標的として、一連の免疫過程を網羅的に制御する分子シグナルが求められてきた。本研究では、マウスへの心筋ミオシン免疫により実験的自己免疫性心筋炎モデル（EAM）を作製した。本モデルは、その病理学的特徴から、急性期心筋炎から炎症の持続と繊維化を中心とした心筋症への進展をよく反映しており、ヒト心筋炎・心筋症の機序解明に大きく貢献すると考えられる。

本研究では EAM を用いて CXADR 発現を検討した。近年、心筋炎を惹起する代表的なコクサッキーウイルスに対応する受容体、即ち CXADR の存在が内皮細胞や心筋細胞等で同定された［2］。CXADR の制御は、心筋組織へのコクサッキーウイルスの感染を抑制し、結果的に心筋炎を減弱することが示された［7］。さらに、CXADR は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、膜外、膜貫通および膜内ドメインから成る。特に、血管内皮細胞の CXADR 膜外ドメインは、抗原提示細胞や memory T 細胞および好中球を含む免疫細胞上の他の接着タンパク、例えば JAML（Junctional Adhesion Molecule-Like）と異種間分子結合を形成することで、循環免疫細胞の血管内皮への遊走・接着を誘導し、内皮細胞間ジャンクションの通過を可能とする結果、その組織浸潤を促進することが報告されている［8］。矛盾せず、CXADR 過剰発現マウスでは、コクサッキーウイルスが感染していなくても心筋組織への炎症細胞浸潤が認められた［9］。このような所見に基づいて、我々は“CXADR がウイルス感染に引き続く自然免疫から自己免疫への一連の免疫過程に関連しているのか？”という問いに至った。本研究では、この問いに対するアプローチとして EAM における CXADR の発現を解析した。我々は、心筋ミオシン免疫のみで心筋細胞および血管内皮において CXADR 発現が誘発されその後持続することを見出した。したがって、CXADR はウイルス感染と独立して自己免疫の誘発および進展と関連している可能性が考えられた。このことは、劇症型心筋炎および心筋症に対する有力な治療標的の一つとして CXADR を研究する重要な根拠となり得る。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科救急医学学研究室の西井基継である。

文　献

1） Kandolin R, Lehtonen J, Salmenkivi K, Räisänen-Sokolowski A, Lommi J, Kupari M. Diagnosis, treatment, and outcome of giant-cell myocarditis in the era of combined immunosuppression. Circ Heart Fail. 2013 Jan;6(1):15-22. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.969261. Epub 2012 Nov 13.

2） Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science. 1997 Feb 28;275(5304):1320-3. PMID: 9036860

3） Toivonen R, Mäyränpää MI, Kovanen PT, Savontaus M. Dilated cardiomyopathy alters the expression patterns of CAR and other adenoviral receptors in human heart. Histochem Cell Biol. 2010 Mar;133(3):349-57. Epub 2009 Dec 2. doi: 10.1007/s00418-009-0666-1.

4） Nishii M, Inomata T, Takehana H, Takeuchi I, Nakano H, Koitabashi T, Nakahata J, Aoyama N, Izumi T. Serum levels of interleukin-10 on admission as a prognostic predictor of human fulminant myocarditis. J Am Coll Cardiol. 2004 Sep 15;44(6):1292-7. PMID: 15364334 DOI: 10.1016/j.jacc.2004.01.055

5) Aoyama N, Izumi T, Hiramori K, Isobe M, Kawana M, Hiroe M, Hishida H, Kitaura Y, Imaizumi T; Japanese Investigators of Fulminant Myocarditis. National survey of fulminant myocarditis in Japan: therapeutic guidelines and long-term prognosis of using percutaneous cardiopulmonary support for fulminant myocarditis (special report from a scientific committee). Circ J. 2002 Feb;66(2):133-44. PMID: 11999637

6) Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. Clin Immunol Immunopathol. 1996 Sep;80(3 Pt 2):S92-9. PMID: 8811068

7) Shi Y, Chen C, Lisewski U, Wrackmeyer U, Radke M, Westermann D, Sauter M, Tschöpe C, Poller W, Klingel K, Gotthardt M. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. J Am Coll Cardiol. 2009 Apr 7;53(14):1219-26. PMID: 19341864 DOI: 10.1016/j.jacc.2008.10.064

8) Zen K1, Liu Y, McCall IC, Wu T, Lee W, Babbin BA, Nusrat A, Parkos CA. Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. Mol Biol Cell. 2005 Jun;16(6):2694-703. Epub 2005 Mar 30. PMID: 15800062 PMCID: PMC1142417 DOI: 10.1091/mbc.e05-01-0036

9) Yuen S, Smith J, Caruso L, Balan M, Opavsky MA. The coxsackie-adenovirus receptor induces an inflammatory cardiomyopathy independent of viral infection. J Mol Cell Cardiol. 2011 May;50(5):826-40. PMID: 21352828 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.011