

# ラット自己免疫性心筋炎モデル心内における エンドセリン-1の発現

矢嶋紀幸 鈴木淳一\* 北林 浩 磯部光章

信州大学医学部第1内科学教室

## Expression of Endothelin-1 in the Inflamed Myocardium of an Experimental Autoimmune Myocarditis Rat Model

Noriyuki YAJIMA, Jun-ichi SUZUKI, Hiroshi KITABAYASHI and Mitsuaki ISOBE

Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Myocarditis is a potentially lethal inflammatory disease in humans. In this disease, large amounts of cytokines are released from inflammatory cells, which then stimulate endothelial cells to secrete endothelin-1 (ET-1). ET-1 has been isolated from endothelial cells and is a key mediator in several cardiovascular diseases. However, the immunological effects of ET-1 in myocarditis have not been reported. To investigate the roles of ET-1 expression in myocarditis, immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect ET-1 in rat hearts with experimental autoimmune myocarditis (EAM). The EAM rat hearts were harvested at days 7, 14, 21 and 28 (n=12). For the control study, hearts from rats without immunization were also harvested at day 28 (n=5). Immunohistochemically, ET-1 was faintly expressed in unimmunized hearts. In EAM hearts, ET-1 expression was enhanced in the endothelial cells of small vasculatures in the myocardium at days 7 and 14. ET-1 was observed prior to interstitial cell infiltration and myocardial damage. However, ET-1 expression was decreased in the myocardium at days 21 and 28. Using RT-PCR, a single band corresponding to ET-1 was detected in unimmunized and EAM samples on days 7 to 28. In this study, ET-1 was enhanced in the early phase of EAM, and decreased in the chronic phase. ET-1 may therefore play a critical role in the early stage of EAM inflammation and may have diagnostic value in clinical myocarditis. *Shinshu Med J* 47: 389-391, 1999

(Received for publication January 18, 1999; accepted in revised form May 13, 1999)

**Key words** : myocarditis, endothelin

心筋炎, エンドセリン

### I 緒 言

心筋炎は時に致死的となる疾患のひとつである<sup>1)</sup>。心筋炎においては心筋内に浸潤した炎症細胞より多種類のサイトカインが放出され、血管内皮細胞を活性化する。エンドセリン (endothelin: ET)-1は強力な血管収縮物質として血管内皮細胞より単離され、多くの心血管疾患において多様な役割を演じていることが解

明されている<sup>2,3)</sup>。しかし、心筋炎におけるET-1の発現については臨床例、動物実験モデルを通じて報告がない。我々はラット自己免疫性心筋炎モデルを用いて、免疫染色とreverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)によって心筋炎におけるET-1の発現を検討した。

### II 方 法

7週齢のルイスラット(雄, 200~250g, 日本チャールズリバー, 東京)に既報の方法に従って精製プタ

\* 別刷請求先: 鈴木 淳一 〒390-8621  
松本市旭3-1-1 信州大学医学部第1内科

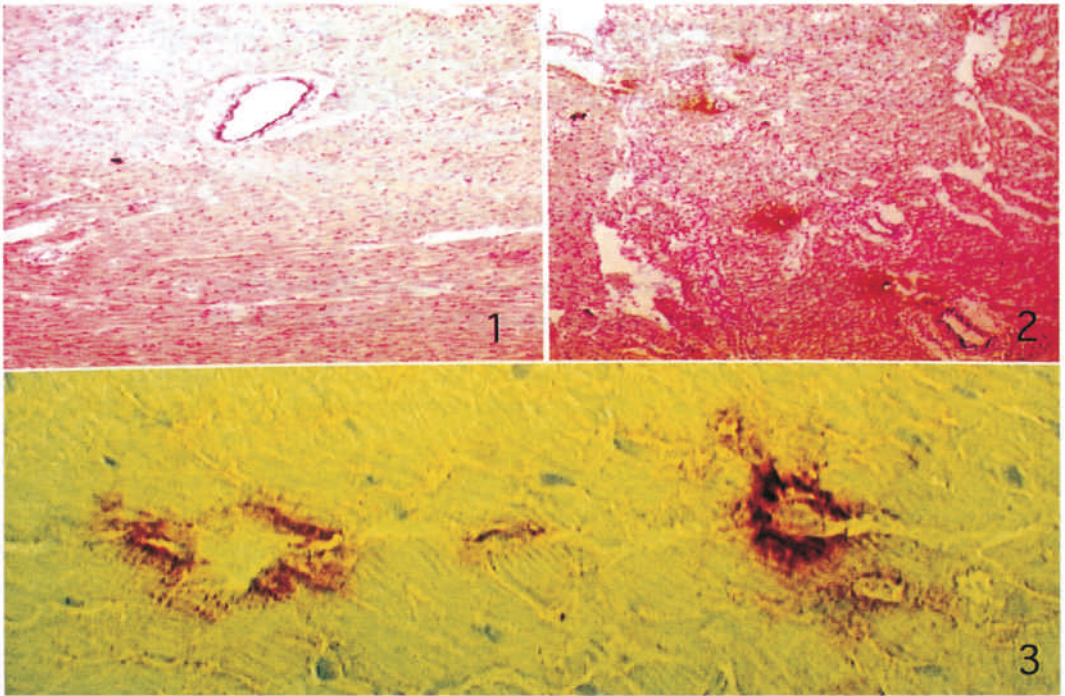


図1 免疫染色によるラット心臓内における ET-1発現の代表的結果

左上(1)パネルの正常心ではほとんど ET-1発現はみられないのに対し、右上(2)の免疫後第14日目の自己免疫性心筋炎の心臓ではその発現増強が観察される。下(3)の自己免疫性心筋炎の免疫後第14日目の心臓ではその発現増強が小血管で観察される。(倍率：1, 2 ×100；3 ×400)

心筋ミオシン (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を投与し自己免疫性心筋炎モデルを作成した<sup>4)</sup>。ラットの麻酔には抱水クロラル (3.6%w/v, 1cc/100g 体重, 和光純薬, 大阪) を用いた。無免疫のラットを陰性コントロールモデルとして用いた (n=5)。ミオシン投与後 7(n=3), 14(n=3), 21(n=3), 28(n=3) 日にラットより心臓および脾臓を摘出した。心臓は心室最大径部で短軸に2分割し, 一方からはヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と免疫染色のために凍結切片 (6-8 μm) を作成し, 他方からは RT-PCR のために Isogen (日本ジーン, 東京) により RNA を抽出した。脾臓は凍結切片を作成した。免疫染色は一次抗体に抗ラット ET-1抗体 (IBL, 富岡) を用い, 二次抗体としてビオチン化抗免疫グロブリン抗体を用いた。さらに Vectastain ABC kit (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA) を用いて発色した。統計学的検討のために, 心室最大径部分の短軸切片を用い, その標本内の全染色陽性有核細胞数を計測し, 各群間で比較検討した。免疫染色のコントロールとして, 一次抗体

を反応させない連続切片を用いた。RT-PCR 法は抽出した RNA を用い, 既報のプライマーと温度サイクル (35サイクル) を採用して実施した<sup>5)</sup>。

### III 結 果

無免疫のラット心では ET-1の発現は極めて微弱であった。自己免疫性心筋炎モデルの心臓では, ET-1発現は血管内皮細胞に発現し, その強度は14日を頂点に増強した。この ET-1発現は免疫細胞の浸潤や心筋細胞の破壊に先行して観察された。しかし, ET-1発現は第21日と第28日では減弱傾向となった (図1, 2)。ET-1の発現部位は主に毛細血管内皮細胞であり, 中膜の発達している動脈の内皮細胞では ET-1発現は増強しなかった。コントロールモデルである無免疫ラットの心臓では ET-1の発現は極めて微弱であり, また, いずれのラットの脾臓においても ET-1の発現は認められなかった。一次抗体を反応させない免疫染色のコントロールでは, いずれの切片も発色しなかった。RT-PCR法による観察では, ET-1転写が免疫ラット

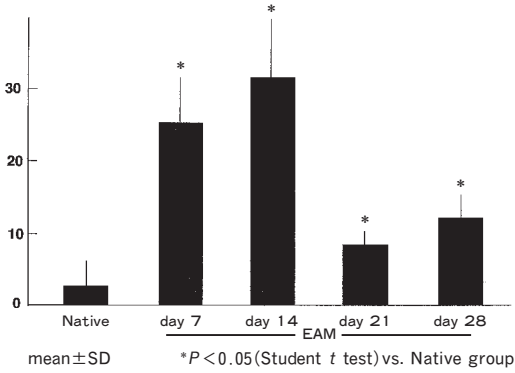


図2 ラット心臓内(心室最大径部分)のET-1陽性細胞の数(正常心, 免疫後7日から28日の心臓)

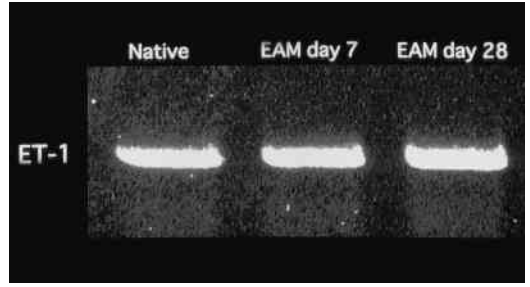


図3 RT-PCRによるET-1転写発現の結果  
正常心も自己免疫性心筋炎免疫後7日と28日でET-1転写発現を確認できたが, 発現強度の差異を各群間で確認できなかった。

の心臓で確認されたが, コントロールである無免疫ラットの心臓でも同様に観察され, その発現強度の差異を本方法では明らかにできなかった(図3)。

#### IV 考 察

本論文で, 我々はET-1の発現が自己免疫性心筋炎でも増強していることを明らかにした。心血管系の多くの論文がET-1を血管収縮と血管攣縮に関連した疾患との関係で報告しているが<sup>1)</sup>, 炎症に関連した報告は少ない。心筋炎においては免疫反応や炎症の観点から血管内皮の活性化が病勢の進行に重要な役割を演じている。我々の結果において, 心筋炎ではET-1が毛細血管内皮細胞で増強しており, その進展とET-1の発現に経時的な差異があることを示している。免疫後28日までのどの時期においてもET-1陽性細胞は無免疫ラットのそれに比し有意に増加していた。経時的観察ではET-1は免疫後早期に発現が増強し, 炎症の進展とともに減弱することから, 炎症の初期段階におい

て重要な役割を演じている可能性が示唆された。RT-PCR法にてET-1の転写を確認することはできたが, 各群間における発現程度の差異を本研究では確認できなかった。これはおそらくRT-PCR法の定量性の限界を示すものと考えられ, さらに異なった方法を用いた検討が必要になると思われた。

#### V 結 語

以上の結果より, ET-1は自己免疫性心筋炎において, 特に炎症初期に重要な役割を演じていることが示唆され, その発現を確認することは心筋炎の早期診断の一助になることが推察された。

#### VI 謝 辞

今回の自主研究演習に際して, 親切にご指導いただいた信州大学第1内科の第1および第3研究室の諸先生方, 実験手技を指導して下さいた大池みどりさん, 塩原理恵さんに感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa M, Matsuzaki M, Mohammed MU, Nakazawa H, Kasajima T, Marumo F: Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation* 95: 489-496, 1997
- 2) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988
- 3) Parris RJ, Webb DJ: The endothelin system in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Vasc Med* 2: 31-43, 1997
- 4) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 85: 1918-1926, 1992
- 5) Broun LA, Nunez DJ, Brookes CI, Wilkins MR: Selective increase in endothelin-1 and endothelin A receptor subtype in the hypertrophied myocardium of the aorto-venacaval fistula rat. *Cardiovasc Res* 29: 768-774, 1995

(H 11. 1. 18 受稿; H 11. 5. 13 受理)