

マウス移植心冠動脈における 単球遊走因子の発現

町田 水穂¹⁾ 鈴木 淳一^{1)*} 高橋 濟¹⁾天野 純²⁾ 磯部 光章¹⁾

1) 信州大学医学部第1内科学教室

2) 信州大学医学部第2外科学教室

Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Coronary Arteries of Murine Cardiac Allografts

Mizuho MACHIDA¹⁾, Jun-ichi SUZUKI¹⁾, Wataru TAKAHASHI¹⁾Jun AMANO²⁾ and Mitsuaki ISOBE¹⁾1) *Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine*2) *Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine*

Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is known to be critical in activating T lymphocytes, mast cells, and other cells. Recent studies show that MCP-1 plays pivotal roles in several inflammatory conditions including the acute phase of cardiac allograft rejection. However, the pathophysiological roles of MCP-1 in the neointimal formation of chronically rejected heart grafts remain unclear. To clarify the roles of MCP-1 in such allografts, we performed immunohistochemistry to detect MCP-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 using a murine cardiac allograft transplantation model (DBA/2 hearts to B10. D2 recipient mice). Transplanted cardiac allografts were harvested at days 14 (n=5) and 60 (n=5). For the control study, isografts were used (n=5). Allografts harvested at day 14 demonstrated no arterial intimal thickening, while severe intimal thickening was observed in allografts harvested at day 60. MCP-1 and VCAM-1 were observed in the vascular endothelium of rejected cardiac allografts at days 14 and 60, but were not observed in isografts. The expression of MCP-1 in the arteries was enhanced at day 14, but was decreased at day 60. However, VCAM-1 expression was increased at day 60. These results indicate that the expression of MCP-1 was enhanced prior to the development of intimal thickening and VCAM-1 expression. MCP-1 may play pivotal roles in neointimal formation in the early phase of chronic rejection in cardiac allografts. *Shinshu Med J* 47 : 401-404, 1999

(Received for publication January 18, 1999; accepted in revised form May 26, 1999)

Key words : heart transplantation, chronic rejection, coronary neointimal formation, monocyte chemoattractant protein

心臓移植, 慢性拒絶, 冠動脈肥厚内膜形成, 単球遊走因子

I 緒 言

単球遊走因子 (monocyte chemoattractant protein: MCP)-1は免疫担当細胞, 特にT細胞の活性化

に重要な役割を演じており, 心臓移植においては急性拒絶の早期に発現することが知られている¹⁾。一方, 慢性拒絶と言われる移植心の冠動脈病変は, 病理学的には内膜の肥厚が特徴であり, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1の発現がその進展に重要である。しかし, この冠動脈肥厚内膜の進展における

* 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

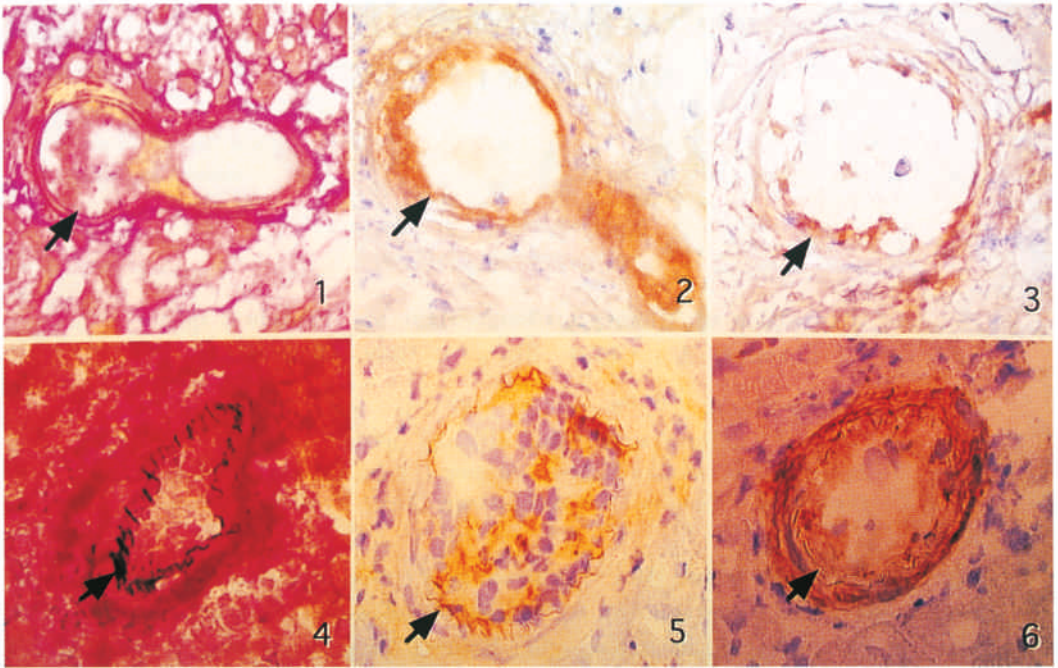


図1 免疫染色による移植心内冠動脈のMCP-1とVCAM-1発現の結果

免疫染色による移植心内冠動脈のMCP-1とVCAM-1の発現の代表的結果を示す。(左 EvG；中央 MCP-1；右 VCAM-1)。上段の移植後14日では内膜肥厚は軽微であるがMCP-1の発現がVCAM-1に比して増強している。下段の移植後60日では強い内膜肥厚に伴ってVCAM-1の発現は増強しているがMCP-1の発現は減弱している。矢印は内弾性板を示す。(×200)

MCP-1の役割は十分に解明されていない。この肥厚内膜形成におけるMCP-1の役割を明らかにするため、我々はマウス心臓移植モデルを用いてMCP-1とVCAM-1の移植心内冠動脈における発現を検討した。

II 方 法

DBA/2マウスとB10D2マウス(オス、5～8週齢、日本SLC、東京)を用いた。DBA/2マウスの心臓をB10D2マウスの腹部に異所性に移植しアログラフトとした。このマウスの組み合わせでは慢性拒絶状態を惹起させるのに免疫抑制剤は不要である³⁾。コントロールとしてDBA/2マウスの心臓をDBA/2マウスの腹部に移植し、イソグラフトとした。マウス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。アログラフトは移植後14日(n=6)と60日(n=6)に摘出し、イソグラフトも同様に術後14日(n=2)と60日(n=2)に摘出した。6～8 μmに薄切した摘出心の凍結切片を作成し、ヘマト

キシリン-エオジン(HE)染色とエラスチカヴァンギーソン(EvG)染色を実施した。冠動脈の内膜肥厚の程度は既報の方法に従い半定量的にスコア化(0～3)した。免疫染色は一次抗体として市販の抗マウスMCP-1抗体(PharMingen, San Diego, CA)と当教室でハイブリドーマより作成した抗マウスVCAM-1抗体(MK/2)を用い、二次抗体として各々に適合する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、既報に従いその強度を0から3で半定量的に計測し、統計学的に解析した³⁾。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。

III 結 果

すべての移植心は摘出されるまで拍動を続けた。摘出されたアログラフトから作成されたHE染色とEvG染色による検討では、移植後14日には軽微な心

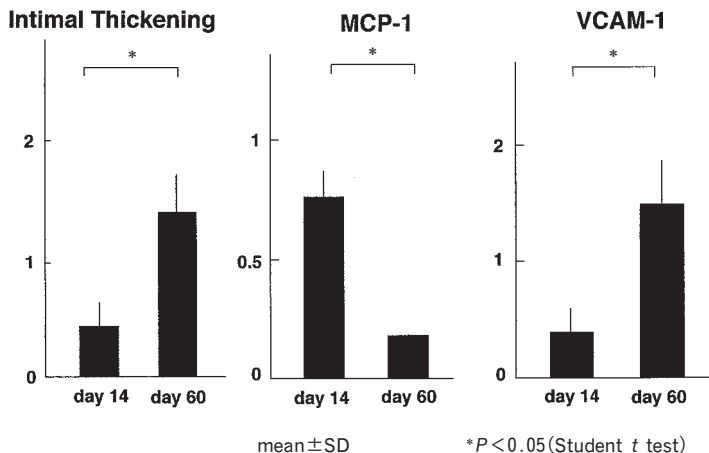


図2 冠動脈内膜肥厚, MCP-1, VCAM-1の定量結果
冠動脈内膜肥厚, MCP-1, VCAM-1発現のそれぞれのスコアを用いた統計学的検討では, アログラフトの移植後14日と60日の間でそれぞれのスコアに有意差が認められた。

筋間質内の細胞浸潤と冠動脈内膜肥厚が観察され, 同60日には激しい細胞浸潤と心筋細胞の破壊, 中等度の内膜肥厚が観察された。免疫染色による検討では, 移植後14日では増強された MCP-1の発現と微弱な VCAM-1の発現が移植心冠動脈の内膜で認められたのに対し, 同60日では MCP-1の発現は減弱し, VCAM-1の発現が肥厚内膜で増強していた (図1)。イソグラフトでは細胞浸潤と動脈内膜肥厚は観察されず, VCAM-1と MCP-1の発現も極めて微弱であった。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。

冠動脈内膜肥厚, MCP-1, VCAM-1発現のそれぞれのスコアを用いた統計学的検討では, アログラフトの移植後14日と60日の間でそれぞれのスコアに有意差が認められた (図2)。

IV 考 察

MCP-1は炎症の早期に発現し, その進展を促進させる作用を有するポリペプチドである。最近の研究で MCP-1は生体内での細胞傷害や炎症に広く関わっていることが明らかになった⁹⁾。Russell らは心臓移植に

おいて MCP-1が急性拒絶の初期段階に心筋間質に発現していることから, 細胞浸潤や心筋傷害等の進展に極めて重要な役割を演じていると報告している¹⁾。しかし, 移植心の冠動脈病変に関連した MCP-1発現の報告は本稿が初めてである。我々の結果では, MCP-1は内膜肥厚が進展する以前の術後14日には強く発現し, 内膜肥厚が完成した術後60日には減弱していた。これは VCAM-1の経時的発現変化とは異なっており, MCP-1の発現が肥厚内膜形成の初期段階である血管炎との関連を強く示唆する所見であると考えられた。

V 結 語

以上の結果から, MCP-1は移植心の冠動脈肥厚内膜形成においても, 重要な役割を演じてい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) Russell ME, Adams DH, Wyner LR: Early and persistent induction of monocyte chemoattractant protein 1 in rat cardiac allografts. Proc Natl Acad Sci USA 90: 6086-6090, 1993
- 2) Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A: Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. Science 255: 1125-1127, 1992
- 3) Suzuki J, Isobe M, Yamazaki S, Horie S, Okubo S, Sekiguchi M: Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with short-term blockade of ICAM-1 and LFA-1 in a heterotopic murine model of cardiac transplantation. J Heart Lung Transplant 16: 1141-1148, 1997

- 4) Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Aoki M, Horie S, Okubo Y, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Sekiguchi M: Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nature Med* 3: 900-903, 1997
- 5) Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2: 198-204, 1996

(H 11. 1. 18 受稿; H 11. 5. 26 受理)
