

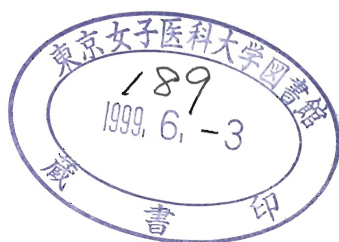
心筋虚血および心筋炎の心筋傷害における一酸化窒素の役割

研究課題番号 08670828

平成8年度～平成10年度科学研究費補助金

基盤研究(C)(2)

研究成果報告書



平成11年3月

研究代表者 西川俊郎

(東京女子医科大学医学部助教授)



はしがき

心筋虚血や心筋炎における心筋傷害のメカニズムは多岐にわたると考えられている。心筋虚血では、変性心筋に対する顆粒球の酵素による消化処理、リンパ球やマクロファージによる異物認識、サイトカイン産生、貪食などが、心筋炎では、顆粒球リンパ球の異物抗原傷害作用、炎症性サイトカインの産生、マクロファージの貪食、フリーラジカルによる異物の消去などが考えられているが、最近、マクロファージや血管壁から産生される一酸化窒素 (NO) がこれらの組織傷害に関与することが推測されている。NOは本来、炎症の場で種々の生体反応を制御し、生体組織に有利に働くわけであるが、ある条件下では、逆に組織傷害性に働く可能性があるとされている。しかし、心筋虚血や心筋炎の心筋傷害に際してNOがどの様に関与しているかは詳細は不明である。本研究ではこれらの点につき検討を行なったが、その結果、心筋炎や心筋虚血ではNOが多量に産生される時期があること、この時期に一致して心筋傷害が顕著となりマクロファージや心筋細胞においてNO合成酵素(iNOS)の発現がみられること、フリーラジカルの産生も著明に増加すること、傷害部位にnitrotyrosineが証明され、傷害にperoxynitriteが関与している可能性が考えられることなどが示された。さらにiNOSの拮抗薬を心筋炎ラットに加えると心筋組織のNOの産生量が減少し、心筋傷害が減弱することが確認された。この結果、心筋炎や心筋虚血における心筋傷害には過量に発生するNOが密接に関与していることが示され、今後これらの疾患の治療に関する研究を行なう上に、極めて有用な結果が得られたと考えられた。

研究組織

研究代表者： 西川俊郎 （東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者： 笠島 武 （東京女子医科大学医学部教授）

研究分担者： 増田昭博 （東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者： 安藤明子 （東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者： 池田郁雄 （東京女子医科大学医学部助手）

研究経費

平成 8 年度	9 0 0 千円
平成 9 年度	6 0 0 千円
平成 1 0 年度	6 0 0 千円
計	2 1 0 0 千円

(1) 学会誌等

1. Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Takashi Shimojo, Kazuyo Takeda, Takeshi Kasajima, Kazuo Momma: Hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome. *Acta Paediatr Jpn* 38:91-98, 1996
2. Jun-ichi Suzuki, Mitsuaki Isobe, Msanori Aikawa, Motohiro Kawaguchi, Ichiro Shiojima, Naoto Kobayashi, Akihiro Tojo, Toru Suzuki, Kenjiro Kimura, Toshio Nishikawa, Tatsuo Sakai, Morie Sekiguchi, Yoshio Yazaki, Ryoza Nagai: Nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chain expression in rejected cardiac allografts - a study in rat and monkey models. *Circulation* 94(5): 1118-1124, 1996
3. Jun Amano, Michiaki Hiroe, Yoshiko Ohta, Shigeru Ishiyama, Toshio Nishikawa, Hiroyuki Tanaka, Makoto Sunamori, Akio Suzuki, Masayuki Miyasaka, Fumiaki Marumo: Uptake of indium-111-anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody in the allografted rat lung during acute rejection. *J Heart Lung Transplant* 15(10):1027-1033, 1996
4. 西川俊郎：小児の心筋炎。こども医療センター医学誌 25(2):94-99, 1996
5. 西川俊郎：心筋症の概念。小児内科 28(12):1715-1718, 1996
6. Shigeru Ishiyama, Michiaki Hiroe, Toshio Nishikawa, Shinji Abe, Hiroshi Ito, Takashi Shimojo, Sakae Ozasa, Katsutoshi Yamakawa, Masunori Matsuzaki, Minhaz U Mohammed, Hiroe Nakazawa, Ikuo Ikeda, Takeshi Kasajima, Fumiaki Marumo: Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation* 95(2):489- 496, 1997
7. T. Nishikawa, S. Ishiyama, K. Takeda, T. Kasajima, S. Abe, T. Shimojo, H. Ito, M. Hiroe: Programmed cell death (apoptosis) in the myocardium with acute myocarditis. *Microscopy Microanalysis* 3(suppl 2):63-64, 1997
8. Ikuo Ikeda, Takeshi Kasajima, Shigeru Ishiyama, Takashi Shimojo, Yasuyoshi Takeo, Toshio Nishikawa, Shingo Kameoka, Michiaki Hiroe, Atsushi Mitsunaga: Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterology*, 92(8):1339-1341, 1997

9. Jun Amano, Shigeru Ishiyama, Toshio Nishikawa, Hiroyuki Tanaka, Ryozo Nagai, Fumiaki Marumo, Michiaki Hiroe: Proliferation of smooth muscle cells in acute allograft vascular rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113(1):19-25, 1997
10. 廣江道昭、石山茂、永田まこと、西川俊郎、豊崎哲也：心筋炎・心筋症とアポトーシス。血管と内皮 7(4):364-369, 1997
11. Takashi Shimojo, Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Ikuo Kasajima, Fumiaki Marumo, Michiaki Hiroe: Participation of nitric oxide and peroxynitrite in the development of myocardial tissue damage in acute myocardial infarction. *Cardiovascular Pathol* 7(1):25-30, 1998
12. Yoshinori Seko, Naoyuki Takahashi, Shigeru Ishiyama, Toshio Nishikawa, Takeshi Kasajima, Michiaki Hiroe, Shin Suzuki, Sugao Ishiwata, Sachio Kawai, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, Ko Okumura, Yoshio Yazaki: Expression of costimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD40 in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Circulation* 97:637-639, 1998

(2) 口頭発表

1. 西川俊郎、石山茂、下條隆、笠島武、中澤誠、門間和夫、康井制洋、岩堀晃、廣江道昭：心筋炎の心筋傷害における一酸化窒素(NO)の役割。第32回日本小児循環器学会。1996年7月4日
2. 西川俊郎、石山茂、笠島武、森保彦、中澤誠、門間和夫、迫村泰成、仁木清美、大西哲：小児期の不整脈源性右室心筋症の右室心筋生検組織所見。第5回関東小児心筋疾患研究会。1996年10月19日
3. Michiaki Hiroe, Shigeru Ishiyama, Toshio Nishikawa, Takashi Shimojo, Shinji Abe, Mimi Tamamori, Hiroshi Ito, Takeshi Kasajima, Fumiaki Marumo: Apoptotic cell death in acute fulminant myocarditis with the Fas/Fas ligand system. 69th American Heart Association. 1996年11月12日
4. 石山茂、西川俊郎、笠島武、下條隆、安部慎治、玉盛三美、伊藤宏、廣江道昭、丸茂文昭：心筋炎の心筋傷害におけるapoptosisの関与について-自己免疫性心筋炎ラットを用いての経時的検討。第18回心筋生検研究会「ワークショップ」1996年11月30日

5. Shinichiro Imamura, Toshio Nishikawa, Atsuyoshi Takao, Rumiko Matsuoka: Hyper-oxygen tension leads to apoptosis in the smooth muscle of the ductus arteriosus. 61th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society. 1997年4月1日
6. 石山茂、西川俊郎、笠島武、下條隆、安部慎治、伊藤宏、廣江道昭、丸茂文昭：心筋炎の心筋傷害におけるapoptosisの関与について-実験的心筋炎ラットによる経時的検討。第61回日本循環器学会。1997年4月1日
7. 今中-吉田恭子、石山茂、下條隆、廣江道昭、西川俊郎、太田淑子：心筋梗塞後組織リモデリングにおけるtenascin-Cの役割。第61回日本循環器学会。1997年4月2日
8. 今中-吉田恭子、吉田利通、石山茂、下條隆、廣江道昭、西川俊郎、太田淑子、坂倉照好：心筋梗塞後組織remodelingにおけるtenascin-Cの役割。第86回日本病理学会 1997年6月5日
9. 石山茂、西川俊郎、笠島武、永田まこと、迫村泰成、廣江道昭：Arrhythmogenic right ventricular dysplasia(ARVD)の心筋障害におけるapoptosisの関与について。第86回日本病理学会 1997年6月5日
10. 西川俊郎、石山茂、笠島武、中澤誠、門間和夫、仁木清美、迫村泰成、永田まこと、廣江道昭：小児の不整脈源性右室心筋症の右室心筋組織像-とくに心筋傷害とapoptosisとの関連について。第33回日本小児循環器学会。1997年7月11日
11. Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Kazuyo Takeda, Takeshi Kasajima, Shinji Abe, Takashi Shimojo, Hiroshi Ito, Michiaki Hiroe: Programmed cell death (apoptosis) in the myocardium with acute myo-carditis. Annual Meeting of Microscopy Society and Histochemical Society. 1997年8月12日
12. Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Takeshi Kasajima, Makoto Nakazawa, Kazuo Momma, Yasunari Sakomura, Seiyo Yasui, Akira Iwahori, Yukichi Tanaka, Michiaki Hiroe: Role of nitric oxide in the myocardium injury and myocardial contractility impairment in pediatric patients with acute myocarditis. The 4th International Symposium on Cardiomyopathy & Myocarditis. 1997年9月30日
13. Shigeru Ishiyama, Toshio Nishikawa, Takeshi Kasajima, Takashi Shimojo, Michiaki Hiroe, Fumiaki Marumo: Apoptosis via Fas/Fas ligand system of cardiomyocytes in human acute myocarditis. The 4th International Symposium on Cardiomyopathy & Myocarditis. 1997年9月30日

14. Yasunari Sakomura, Toshinobu Horie, Hiroaki Nagao, Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama: Histopathological study of RV biopsy samples in progressive systemic sclerosis: significance of basal lamina layering in capillaries. The 4th International Symposium on Cardiomyopathy & Myocarditis. 1997年10月1日
15. Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Takeshi Kasajima, Yasuhiko Mori, Makoto Nakazawa, Kazuo Momma, Kiyomi Niki, Yasunari Sakomura, Makoto Nagata, Michiaki Hiroe: Endomyocardial biopsy aspects of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy in children. The 4th International Symposium on Cardiomyopathy & Myocarditis. 1997年10月2日
16. 西川俊郎、石山茂、笠島武、野々山真樹、川合明彦、八田光弘、小柳仁、迫村泰成、笠貫宏：心臓移植における急性拒絶反応の臨床病理学的検討。第19回心筋生検研究会「ワークショップ」1997年11月
17. 石山茂、西川俊郎、笠島武、永田まこと、廣江道昭、下條隆、伊藤宏、丸茂文昭：肥大型心筋症から拡張相へ移行する際のapoptosisの関与。第19回心筋生検研究会「ワークショップ」1997年11月
18. Shin-ichiro Imamura, Toshio Nishikawa, Atsuyoshi Takao, Rumiko Matsuoka: Apoptotic cell death starts at longitudinally oriented smooth muscle in the inner layer of the ductus arteriosus after birth. 61th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society. 1998年3月
19. 石山茂、西川俊郎、笠島武、廣江道昭、下條隆、安部慎治、伊藤宏、丸茂文昭、永田まこと：実験的心筋炎ラットの心筋障害におけるFas-Fas ligand系を介するapoptosisの関与-抗Fas抗体による心筋障害の抑制。第62回日本循環器学会 1998年3月
20. 石山茂、西川俊郎、笠島武：肥大型心筋症から拡張相への移行にapoptosisの関与はあるか？。 第87回日本病理学会総会 1998年4月15日
21. Toshio Nishikawa, Shigeru Ishiyama, Takashi Shimojo, Michiaki Hiroe, Kyko Imanaka, Yasunari Sakomura, Takeshi Kasajima: Role of nitric oxide and apoptosis in the myocardial tissue damage in acute myocardial infarction. Experimental Biology '98. 1998年4月19日

22. 今中-吉田恭子、吉田利通、坂倉照好、廣江道昭、石山茂、西川俊郎、豊崎哲也：
抗テネイシンC抗体を用いた心筋病変活動性評価の試み。第20回心筋生検研究会。
1998年10月23日
23. 石山茂、西川俊郎、笠島武、廣江道昭、下條隆、丸茂文昭、永田まこと、迫村泰成：
高血圧性心疾患の心筋病変形成におけるapoptosisの関与。第20回心筋生検研究会。
1998年10月23日
24. 花井りつ子、迫村泰成、笠貫宏、西川俊郎、石山茂、堀江俊伸：Argyrophilic
nucleolar organizer region (AgNOR)は心筋症の評価に有用か。第20回心筋生検研究
会。1998年10月23日

(3) 著書

1. 西川俊郎、石山茂、山内康熙、廣江道昭、門間和夫：遺伝性心筋疾患。日本臨床
別冊（循環器症候群）pp.22-28, 1996年11月
2. 西川俊郎、宮沢要一郎：心筋症。臨床発達心臓病学 pp.674-684 中外医学社。
1997年11月
3. 西川俊郎：原発性心内膜線維弾性症。臨床発達心臓病学 pp.686-692 中外医学社。
1997年11月
4. 西川俊郎、迫村泰成：ARVC。臨床発達心臓病学 pp.404-405 中外医学社。1997
年11月
5. Shinichiro Imamura, Hisanao Sakurai, Yoshiyuki Furutani, Toshio Nishikawa,
Hiroaki Nagao, Atsuyoshi Takao, Rumiko Matsuoka: Hyperoxygen tension
leads to apoptosis in the smooth muscle of the ductus arteriosus. In:
Proceedings of the Second World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac
Surgery. pp.574-577, Futura Publishing Co., New York, 1998年

研究成果

本研究では、ラットに実験的心筋炎（自己免疫性）を起こさせて、得られた心筋病変およびラット冠動脈を実験的に結紮して得られた心筋虚血-梗塞病変について、NOの発生、iNOSの発現、サイトカインとの関連、フリーラジカルの発生などについて免疫組織化学、組織化学、northernblot、in situ hybridizationなどの方法により検討を行なった。

1. 心筋炎ラット心筋組織では心筋炎病変の進展にともない、心腔内血液中や心筋組織中のTNF α 、IL-1 β 量の増加、NO量の増加およびcGMP量の増加がみられ、マクロファージや心筋細胞にiNOSの強い発現が認められた。心筋組織中のiNOS-mRNA量はこの時期に著明に増加し、また、in situ hybridizationではiNOS-mRNAの発現がマクロファージや血管内皮、炎症部位の心筋細胞に強く認められた。また、心筋炎ラット灌流心についてchemiluminescence法により活性酸素産生量を調べると、対照に比べて有意に高い値が認められ、さらに、セリウム法により活性酸素の組織内分布を検討すると、炎症部位の心筋細胞周囲に活性酸素陽性反応が認められた。また、炎症部位の心筋組織では、nitrotyrosineが陽性反応を示し、NOと活性酸素の反応により生じたperoxynitriteが心筋傷害に関与していることが示唆された。
2. 心筋炎の心筋傷害に対するNOの関与についてさらに確認するためにiNOS拮抗薬である、aminoguanidine(AG)を心筋炎ラットに投与すると、AG投与群では心筋組織中のNO量は有意に少なく、組織学的にも炎症は軽減され、明らかに心筋炎が減弱することが確認された。すなわち、心筋炎の心筋組織傷害にはNOが重要な働きをしていることが示された。
3. 心筋梗塞を起こさせたラットで検討を行なうとやはり心筋組織中のNO量の増加がみられ、梗塞部位のマクロファージや梗塞周辺部の心筋組織におけるiNOSの強い発現が認められた。同部位では、nitrotyrosineが免疫組織学的に証明され、組織傷害にperoxynitriteの関与が示唆された。

この研究の内容とその関連した内容について既に発表された論文を以下に提示する。