

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590836

研究課題名（和文） 抗心筋膜受容体による心筋傷害：抗体吸着療法の開発と創薬の試み

研究課題名（英文） Myocardial injury due to anti-receptor autoimmunity:Development of Immunoabsorption therapy and drug delivery

研究代表者

松井 忍 (MATSUI SHINOBU)

金沢医科大学・付置研究所・教授

研究者番号：00064600

研究成果の概要： $\beta$  1 受容体抗体に対する選択的自己抗体吸着体を用い、実験的自己免疫性心筋症家兎に対する吸着実験を行った。その結果、吸着実験3ヶ月後には心肥大ならびに心拡大の改善と心機能の回復を認め、自己抗体吸着療法の有効性が確認された。また、抗 $\beta$  1 受容体抗体による心筋障害の発症メカニズムとしては、抗 $\beta$  1 抗体による細胞障害はオートファジーによる可能性が高いこと、および、抗体自体が直接心筋細胞にはたらくためでないことが明らかとなった。これらの研究に関連して、 $\beta$  1 および M2 受容体に対するモノクローナル抗体を作成し、診断薬や治療薬としての可能性を検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：拡張型心筋症、心筋膜受容体、自己抗体、抗体吸着療法

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究成果：拡張型心筋症は極めて予後不良の心疾患であり、心臓移植の対象疾患のひとつに挙げられている。本症の原因としてウイルス感染、遺伝的素因など種々の機序が想定されているが今だ充分解明されていない。我々は拡張型心筋症患者血清中に高頻度（35-40%）に $\beta$  1 および/あるいは

はムスカリン2受容体の第2細胞外ループに対する自己抗体が存在すること、患者血清から精製されたこれら自己抗体がそれぞれの受容体に結合しアゴニスト作用を示すこと、および、 $\beta$  1 および/あるいはムスカリン2受容体の第2細胞外ループに一致するアミノ酸配列を有する合成ペプチドにて1年間家兎を免疫することにより実験的自

自己免疫性心筋症が発症することを明らかにした。これらの合成ペプチドで免疫された家兎のリンパ球および/あるいは IgG 投与により SCID マウスに心筋症が移入されることを証明した。これらの成績は拡張型心筋症の一部（35-40%）が心筋膜受容体に対する自己免疫疾患であることを強く支持する。

本研究に関連する国内外の研究動向および位置づけ：拡張型心筋症の発症・進展因子として心筋膜受容体に対する自己免疫機序を想定して検討をすすめているグループは我々を含めて5グループ（金沢医科大学、慶応大学、スウェーデンの Göteborg 大学、ならびに、ドイツの Max-Delbruck Center of Molecular Medicine と Wuerzburg 大学）である。基礎研究は、現在、Göteborg 大学および Max-Delbruck Center において自己抗体の精製および機能解析など in/vitro での検討を中心に行われている。In/vivo の研究に関しては我々のグループと慶応大学のグループ、Wuerzburg 大学で行われている。一方、臨床的に拡張型心筋症を対象に自己抗体吸着療法を試みているグループにはドイツの二つのグループ(Dorfffel WV et al., Muller J et al.)と慶応大学がある。彼等は重症拡張型心筋症患者を対象に自己抗体吸着療法を試み良好な成績を得ている。但し、彼等は特定の自己抗体を取り除くのではなく、IgG)全体を除去しているため、細胞性免疫の亢進、易感染性などの欠点を有する。我々の現在試みている方法は抗β1および抗ムスカリン2受容体抗体のみを選択的に取り除くため、彼等の方法に見られるような欠点がなく、長期間かつ繰り返しの吸着療法が可能と考えている。一方、抗心筋膜受容体抗体を治療薬、検査薬、診断薬として開発を検討しているグループは、現在のところ、我々以外には見当

たらない

## 2. 研究の目的

今までに得られた臨床研究成績ならびに動物実験成績に基づき、難治性疾患である拡張型心筋症に対する選択的抗心筋膜受容体抗体吸着療法をはじめとする自己免疫機序に対する新しい治療戦略の構築、抗心筋膜受容体抗体による心筋傷害発症メカニズムの解明、ならびに、抗心筋膜受容体抗体の生理特性を利用した新しい診断薬や治療薬の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 実験的自己免疫性心筋症家兎を用いての選択的β1受容体抗体吸着療法の有用性の検討

- ① β1受容体の第2細胞外ループのアミノ酸配列に一致する合成ペプチドを用いて毎月一回、8ヶ月間家兎を免疫し、実験的自己免疫性心筋症を作成する。
- ② 心筋症作成後、選択的抗β1受容体吸着体を用いて、120分間一回の体外循環による吸着療法を実施する。
- ③ 吸着療法3ヶ月後に心エコー法による心動態、心形態評価、ならびに、生化学的、病理学的評価をおこなう。

(2) 抗β1受容体抗体の細胞レベル下での障害機序の解明：初代培養ラット心筋細胞による研究

- ① β1受容体第2細胞外ループに一致する合成ペプチドで免疫した家兎血清ならびに拡張型心筋症患者血清から、同ペプチドの固定化吸着体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより同受容体に対する特異的抗体を精製する。

- ② 新生児ラット心臓の心室部位より持続的に拍動する心筋細胞を培養し、出来るだけ長期（1ヶ月以上）に維持する条件を検討する。
- ③ 心筋細胞の培養系に上記1)の血清または精製抗体を添加して拍動数の変化を調べると共に長期効果としての細胞障害を観察する。
- ④ 心筋細胞の障害としてオートファジーの可能性が考えられるので、電顕標本による観察やオートファゴゾーム特異たんぱく質（LC3）に対する抗体を用いたWestern blottingや免疫組織化学的手法にて確認する。
- ⑤ 上記③、④の心筋細胞障害と拡張型心筋症患者ならびに合成ペプチド免疫した実験的自己免疫性心筋症の心臓病理標本との比較で、このような培養系が病態モデルとなりうるか否かを検討する。

(3) 抗β1ならびに抗ムスカリン2受容体抗体の診断薬ならびに治療薬としての有用性の検討：心筋膜受容体に対するマウスモノクローナル抗体の開発

- ① 心筋膜に存在するβ1受容体ならびにムスカリン2受容体の第2細胞外ループに一致する合成ペプチドでマウスを免疫し、定法どおりにモノクローナル抗体を産生する多種のハイブリドーマをクローニングする。
- ② 上記(2)の心筋培養系を用いて抗原への強い結合特異性および生理活性のあるマウスモノクローナル抗体をスクリーニングする。
- ③ 培養心筋細胞またはヒトあるいは動物の病理標本を用いてβ1受容

体ならびにムスカリン2受容体を免疫組織化学的にこれらのモノクローナル抗体を一次抗体として検出できるか否かを検討する（診断薬への応用）。

#### 4. 研究成果

(1) 実験的自己免疫性心筋症家兎を用いての選択的抗β1受容体抗体吸着療法の有用性の検討

予備実験では、新たに開発した抗β1受容体抗体に対する選択的吸着体は一回の吸着実験（120分間）で約50%の抗体の吸着が可能との成績を得た。この吸着体を用い、8ヶ月間β1ペプチド免疫にて作成した実験的自己免疫性心筋症家兎を用い、選択的自己抗体吸着実験を施行した。8ヶ月の免疫家兎心臓は心エコー図で、左室内腔拡大、心筋重量増大、左室駆出率低下し、拡張型心筋症に似た心形態・動態を呈した。一回の120分間の体外循環による吸着実験で抗β1受容体抗体は約35%吸着された。吸着実験3ヶ月後には有意な心筋重量の減少と左室内腔の縮小と左室駆出率の改善をみた。この結果は、抗心筋膜受容体抗体吸着療法が拡張型心筋症の治療法として有用であることを示唆した。

(2) 抗β1受容体抗体の細胞レベル下での障害機序の解明：初代培養ラット心筋細胞による研究

培養ラット新生児心筋細胞培養液中に免疫家兎血清を2日毎に添加することにより初期には心筋細胞拍動数増加が見られたが、数日後には逆に減少した。血清添加後数日後には光顕にて培養細胞質に多数の液胞が、電顕にて同様の2重膜や内部に細胞構造体を含んだ液胞が多数認められた。また、Oil Red-O染色にてこれらの培養心筋細胞質

に多数の脂肪滴がみられた。ウエスタン・ブロッティングにより、免疫家兎血清を添加された培養心筋細胞にはオートファジー特有の LC3-II たんぱく質の増加がみとめられた。一方、培養細胞数は免疫家兎血清添加数日後には減少し、かつ、死細胞の割合が増加した。この変化は、精製された抗 $\beta$  1 抗体やイソプロテレノールでは誘発されなかった。また、免疫家兎血清をチャーコール処理することにより、免疫血清による液胞や脂肪滴の出現ならびに培養細胞死は抑制された。以上の成績は抗 $\beta$  1 受容体抗体による細胞障害はオートファジーによる可能性が高いこと、および、抗体自体が直接心筋細胞にはたらくためでない可能性が示された。

(3) 抗 $\beta$  1 ならびに抗ムスカリン 2 受容体抗体の診断薬ならびに治療薬としての有用性の検討：心筋膜受容体に対するマウスモノクローナル抗体の開発

$\beta$  1 受容体ならびにムスカリン 2 受容体の第 2 細胞外ループに一致する合成ペプチドを抗原として得られたモノクローナル抗体を産生する多数のマウスハイブリドーマ株から有用な抗体を産生する株を選択した。

これら各モノクローナル抗体はそれぞれのペプチドを固定した E L I S A により特異性が確認された。また、これら各モノクローナル抗体を用いた A B C 法による免疫染色で、培養ラット心筋細胞、培養ラット・グリオーマ細胞、ヒト心房および心室組織において、 $\beta$  1 およびムスカリン 2 受容体を検出することが出来た。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Wu JL, Matsui S, Zong ZP, Nishikawa K, Sun BG, Katsuda S, Fu M. Amlioration of myocarditis by statin through inhibiting

cross-talk between antigen presenting cells and lymphocytes in rats. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 25; 501-506,2008 査読有

② Nagao A, Zhao X, Takegami T, Nakagawa H, Matsui S, Matsunaga T, Ishigaki Y. Multiple shRNA expression in a single plasmid vector improved RNAi against the XPA gene. Biochemical and Biophysical Research Communications 370;301-305, 2008 査読有

③ Zong ZP, Matsui S, Han TF, Katsuda S, Fu ML. Involvement of thymus in amiodaron-treated autoimmune myocarditis in rats. International Journal of Cardiology 125;122-129, 2008 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 松井 忍 拡張型心筋症に対する抗心筋膜受容体抗体吸着療法 第 28 回日本アフェレンス学会 2007 年 11 月 久留米

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 忍 (MATSUI SHINOBU)

金沢医科大学・付置研究所・教授

研究者番号：00064600

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

勝田 省吾 (KATSUDA SYOUGO)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40110613

長尾 嘉信 (NAGAO YOSHINOBU)

金沢医科大学・付置研究所・准教授

研究者番号：90131028

