

厚生省特定疾患
特発性心筋症調査研究班

平成12年度研究報告集

平成13年3月

班長 篠山重威

目 次

I	平成12年度特発性心筋症調査研究班班員名簿	1
II	総括研究報告	3
	京都大学医学研究科循環病態学 篠山 重威	
III	班員分担別研究報告	
	Gq 依存性アゴニストによる心筋細胞肥大におけるカベオリン-3 の役割	9
	久留米大学医学部第三内科 今泉 勉	
	レシピエント細胞の心移植後動脈硬化症への関与に関する研究	13
	東京大学大学院医学系研究科循環器内科 永井 良三	
	心筋症ハムスターの心臓における endothelin (ET)-1 の役割の 分子レベルでの解明のための、ハムスター ET-1 cDNA および ハムスターの ET 変換酵素 cDNA のクローニング	17
	筑波大学臨床医学系循環器内科 山口 巖	
	拡張型心筋症における Carvedilol の効果の検討 —心機能に対する効果と電氣的不均一性に対する効果との関連—	19
	筑波大学臨床医学系循環器内科 山口 巖	
	combined therapy の慢性心不全に対する効果	23
	北海道大学循環病態内科 北畠 顕	
	T細胞活性化補助シグナルの遮断による 実験的自己免疫性心筋炎の治療効果の検討	26
	北海道大学循環病態内科 北畠 顕	
	細胞膜蛋白遺伝子欠損による心筋症の病態解明と 新しい遺伝子・薬物療法の開発	30
	東京大学医学部保健管理センター 豊岡 照彦	
	G蛋白質共役受容体アゴニストによる心筋細胞肥大に おける活性酸素の関与	34
	大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学 堀 正二	
	新しい分離梗塞心臓における TNF- α の動態と作用(免疫学的検討)	37
	山口大学医学部器官制御医科学講座 循環病態内科学 松崎 益徳	
	特発性心筋症の全国疫学調査	40
	京都大学医学研究科循環病態学 松森 昭	
	特発性拡張型心筋症と β_1 アドレナリン受容体 Arg389Gly 遺伝子多型の臨床的意義の検討	61
	神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 横山 光宏	
	拡張型心筋症の発症, 進展における遺伝子多型性の関与についての検討	66
	神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 横山 光宏	
	In Vivo 成人心筋細胞アポトーシスモデルの開発 —成人心筋細胞アポトーシスの超微形態の特異性—	72
	岐阜大学医学部第二内科 藤原 久義	
	ビデオ顕微鏡ならびに電子顕微鏡による培養成人心筋細胞 アポトーシスの動態解析と超微形態観察	76
	岐阜大学医学部第二内科 藤原 久義	

実験的自己免疫性心筋炎における心筋ミオシン特異的T細胞株の樹立と解析	81
北里大学医学部内科学 和泉 徹	
閉塞性肥大型心筋症に対するペースメーカー療法の慢性効果	85
大阪医科大学第三内科 北浦 泰	
肥大型心筋症におけるジギタリス様物質の存在と意義	88
大阪医科大学第三内科 北浦 泰	
抗 HCV 陽性心筋症における HLA 遺伝子領域の疾患感受性因子の検索	91
東海大学医学部分子生命科学系 猪子 英俊	
特発性心筋症における自己免疫機序	
— β 1 アドレナリン受容体第2細胞外ループの役割	94
慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科 小川 聡	
心筋細胞におけるプロテインキナーゼN (PKN)の細胞内シグナル伝達について	98
東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所内科 川名 正敏	
心筋特異的ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素スモールサブユニット(hHS-M21)	
の発見とその機能解析	102
東京医科歯科大学難治疾患研究所 木村 彰方	
三世代にわたり臨床経過を観察し得た心ファブリー病の一家系	108
島根医科大学第四内科 島田 俊夫	
C型肝炎ウイルスタンパク質による細胞増殖の制御	116
京都大学ウイルス研究所 下遠野邦忠	
実験的ラットウイルス性心筋炎に関する基礎的研究	119
東京慈恵会医科大学青戸病院内科 武田 信彬	
心筋症の病因となるミトコンドリア遺伝子変異の選択的除去	121
岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部 田中 雅嗣	
タコツボ型心筋症の本邦報告例ならびにアンケート調査集計の検討	124
順天堂大学循環器内科 河合 祥雄	
心筋組織リモデリングにおける間質の動態と生物機能	127
青梅市立総合病院循環器科(東京医科歯科大学医学部第二内科) 廣江 道昭	
実験的自己免疫性心筋炎におけるテネイシンCの発現についての研究	132
青梅市立総合病院循環器科(東京医科歯科大学医学部第二内科) 廣江 道昭	
心エコー図上肥大型心筋症と診断された英国人男性患者連続181例	
における Fabry 病の検出	136
鹿児島大学医学部内科学第一講座 鄭 忠和	
温熱療法は心不全により低下した血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)	
の発現を改善する：心筋症ハムスターを用いた検討	140
鹿児島大学医学部内科学第一講座 鄭 忠和	
心筋症患者における血中可溶性 gp130 の臨床的意義の検討	144
大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座 瀧原 圭子	
不整脈源性右室心筋症の発症においてアポトーシスによる	
心筋細胞死が関与する可能性についての病理学的検討	147
国立循環器病センター臨床検査部病理 由谷 親夫	
右室異形成を呈した乳児剖検例における N-カドヘリンの分布異常について	153
国立循環器病センター臨床検査部病理 由谷 親夫	
拡張型心筋症に対する心臓移植実施例の検討	158
国立循環器病センター心臓血管外科 北村惣一郎	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表	163

I 平成12年度特発性心筋症
調査研究班班員名簿

特発性心筋症調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名	備 考
主任研究者	篠山 重威	京都大学医学研究科循環病態学講座	教授	
分担研究者	今泉 勉	久留米大学医学部第三内科	教授	
	永井 良三	東京大学医学系研究科器官病態内科学	教授	
	山口 巖	筑波大学医学部臨床医学系内科	教授	
	北畠 顕	北海道大学医学部循環器内科	教授	
	豊岡 照彦	東京大学医学部第二内科	教授	
	堀 正二	大阪大学医学系研究科病態情報内科学	教授	
	松崎 益徳	山口大学医学部第二内科	教授	
	松森 昭	京都大学医学研究科循環病態学講座	助教授	
	横山 光宏	神戸大学医学部第一内科	教授	
	藤原 久義	岐阜大学医学部第二内科	教授	
	和泉 徹	北里大学医学部内科学(Ⅱ)	教授	
	北浦 泰	大阪医科大学第三内科	教授	
研究協力者	猪子 英俊	東海大学医学部 分子生命科学系分子生命科学2	教授	
	小川 聡	慶応義塾大学医学部内科	教授	
	川名 正俊	東京女子医科大学附属 日本心臓血圧研究所循環器内科	講師	
	木村 彰方	東京医科歯科大学 難治疾患研究所成人疾患部門	教授	
	島田 俊夫	鳥根医科大学第四内科	講師	
	下遠野邦忠	京都大学ウイルス研究所	教授	
	武田 信彬	東京慈恵会医科大学青戸病院内科	助教授	
	田中 雅嗣	岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部	部長	
	河合 祥雄	順天堂大学医学部循環器科	講師	
	廣江 道昭	青梅市立総合病院循環器科	部長	
	鄭 忠和	鹿児島大学医学部第一内科	教授	
	瀧原 圭子	大阪大学医学部第三内科	講師	
	油谷 親夫	国立循環器病センター病理部	部長	
	北村惣一郎	国立循環器病センター	副院長	
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	松森 昭	京都大学医学研究科循環病態学講座 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54 TEL (075)751-3185 FAX (075)752-0856	助教授	

Ⅱ 総括研究報告

特発性心筋症研究班

班長 篠山重威

京都大学医学研究科循環病態学

【研究目標】

原因不明の心疾患，特発性心筋症には大別して主に左室心筋の異常な肥大を来す肥大型心筋症と心室の拡張と収縮力の低下を特徴とする拡張型心筋症に分けられる。前者の約半数には家族性がみられ，常染色体優生遺伝様式を示しその約20%に心筋 β -ミオシン重鎖遺伝子の点突然変異が存在することが明らかにされたが，過半数の症例において遺伝子異常は明らかにされていない。又遺伝子異常がどのようなメカニズムで病態を形成するののかも不明である。一方，発病後5年間に半数が死亡するという予後不良の拡張型心筋症の発症には環境因子，特にウイルス感染の関与が示唆されているが，その病因はほとんど明らかにされていない。又，末期の拡張

型心筋症患者に対して左室部分切除術(バテイスタ手術)が施行されているが，これら外科的療法の長期予後は未確定である。本研究班では，ウイルス感染から拡張型心筋症への進展における局所液性因子，免疫学的因子やアポトーシスの役割解明を目指し，更に免疫遺伝学的因子の解析を試みた。又，肥大型及び拡張型心筋症において更に新しい遺伝子変異の検出を試みるとともに，遺伝子異常と病態形成との関連を明らかにすることを旨とした。外科的治療法に関して，左室部分切除術に於いては本邦での現状を把握し，又，予後を規定する因子の一つとして切除心筋の形態学的，ウイルス学的検討を行った。心移植に関しては拒絶反応の機序解明を目指した。

III 班員分擔別研究報告

Gq 依存性アゴニストによる心筋細胞肥大 におけるカベオリン-3の役割

古賀章正 岡直樹 菊池俊夫
中浦宏幸 加藤誠也 今泉勉

久留米大学医学部第三内科

【研究要旨】

カベオラは、細胞内シグナリングや compartmentation に関与する細胞膜特殊ドメインである。カベオリン-3は、筋細胞におけるカベオラの主要構成蛋白であり、足場蛋白としてカベオラ内の細胞内情報伝達物質の活性制御を行うと推測されている。本検討では、カベオリン-3を新生児ラット培養心筋細胞に過剰発現させ、心筋細胞肥大形成に与える影響を検討した。カベオリン-3の過剰発現により、Gq 依存性アゴニストである phenylephrine および endothelin-1 による心筋細胞肥大は有意に抑制され、同時に sarcomeric reorganization も著明に抑制した。カベオリン-3は、心筋細胞肥大のシグナリングを抑制的に制御する可能性が推測された。

【研究目的】

カベオラは細胞膜に存在する逆オメガ型の構造物であり、コレステロールとスフィンゴリピッドに富む特殊ドメインである¹⁾。このドメインは、細胞内情報伝達、細胞膜を介す物質輸送、Ca²⁺ メオスターシス、細胞内コレステロール・レベルの調節などに関与すると考えられているが、その機能は未だ充分解明されていない。カベオリンは、カベオラの主要構成蛋白であり、その構築や機能に必要不可欠と考えられている。筋組織ではカベオリン-3が主に発現しており、カベオリン-3の変異は常染色体優性遺伝形式の肢帯型筋ジストロフィーを引き起こすことが判明している²⁾。

我々は、これまでに phenylephrine による肥大心筋細胞においてカベオリン-3が up-regulate されることを報告した。しかしなが

ら、心筋細胞肥大におけるカベオリン-3の役割は未だ不明である。そこで今回の検討では、アデノウイルスを用いて、培養心筋細胞にカベオリン-3を過剰発現させることにより、心筋細胞肥大におけるカベオリン-3の役割を検討した。

【研究方法】

1) 組換えアデノウイルスの作製および培養心筋細胞への遺伝子導入

ヒト・カベオリン-3 cDNA は、RT-PCR によりヒト左室心筋から得て、PCR で5'末端に myc epitope tag を付加した後、Mizoguchi と Kay の方法でカベオリン-3発現アデノウイルス (Ad. Cav-3) を作製した。また、同様に Lac Z 発現アデノウイルス (Ad. LacZ) も作製し、コントロールウイルスとして用いた。ウイルス力価は、plaque assay で決定した。モデルは、生後1-3日の wistar rat より得たラット培養心筋細胞を用い、肥大刺激としては、Gq 依存性アゴニストである phenylephrine 及び endothelin-1 を用いた。培養後48時間でウイルスを感染させ、12時間後にアゴニスト刺激を行い、さらに36時間後に実験に用いた。

2) 心筋細胞肥大の評価

心筋細胞肥大は、³H] leucine 取り込み率と細胞面積計測により評価した。

3) ウェスタンブロット、免疫染色および sarcomeric reorganization の評価

ウェスタンブロットは、アイソフォーム特異的モノクローナル抗カベオリン-3抗体 (Transduction Laboratories) および抗 Myc 抗体 (Sigma) を用いて行った。免疫染色は、上記の抗体と phalloidin で二重染色した後、共焦点顕微鏡で観察し、カベオリン-3の細胞内局在と

心筋肥大に伴う actin filament の reorganization を評価した。

【結果】

まず、作製した組換えアデノウイルスを感染させた際の cell viability を MTS assay にて評価した。図1のように、500MOIまでの感染では、両ウイルスとも cell viability に有意な影響は与えなかった。図2A左にカベオリン-3、右に myc のウエスタンブロットを示す。カベオリン-3のウエスタンブロットにおいて、非感染心筋細胞では約 20kD の内因性カベオリン-3のみ認められたが、Ad.Cav-3 の 50MOI 以上の感染では、20kD のバンドが軽度増大するとともに約 25kD のバンドが出現していた。カベオリン-3をほとんど発現していない COS 細胞でも、Ad.Cav-3 感染により両方のバンドが出現することから、25kD の蛋白は myc epitope tag を持つ組換えカベオリン-3であり、20kD の蛋白は、カベオリン-3自体の開始コドンから生じた splice variant と考えられた。Myc 抗体では、25kD のバンドのみ観察された。ウイルス感染後(100MOI)の time course の検討では、組換えカベオリン-3の発現は、24時後に検出され48時間後に最大となった(図2B)。これらの結果から、以降の実験では、ウイルス量は 100MOI とし、計48時間の感染時間で行った。

心筋細胞へ phenylephrine または endothelin-1 を添加すると、既報のように光顕上細胞サイズが増大し肥大が形成された。Ad.LacZ 感染は肥大形成に影響を与えなかったが、Ad.Cav-3 感染により細胞サイズ増大の抑制がみられた。心筋細胞肥大を定量評価するため、leucine 取り込み率と細胞面積を計測したところ、Ad.LacZ 感染細胞の leucine 取り込み率は、コントロールに比し phenylephrine で 2.7 ± 0.5 倍、endothelin-1 では 3.2 ± 0.4 倍増大していたが、Ad.Cav-3 感染細胞では Ad.LacZ 感染細胞に比し、phenylephrine では $33 \pm 7\%$ 、endothelin-1 では $29 \pm 9\%$ の肥大形成抑制を認めた(図3)。細胞面積も同様に約 40% の肥大抑制を示した(図3)。

次に、免疫染色により、カベオリン-3の細胞内分布の変化を検討した(図4)。Ad.LacZ、

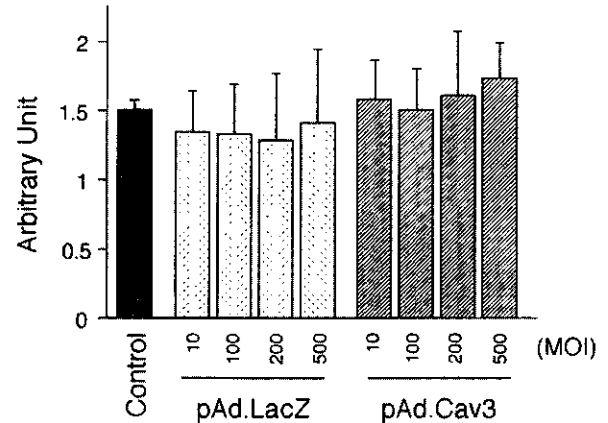


図1 アデノウイルス感染の cell viability に与える影響

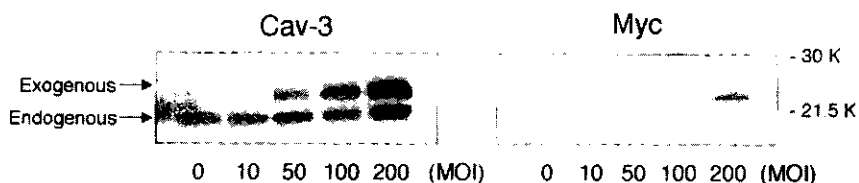
MTS assay により、心筋細胞の viability を評価した。

Ad.Cav-3 感染細胞ともにカベオリン-3は細胞全体に点状に分布し、Myc 染色による組換えカベオリン-3もほぼ同様であった。これは、組換えカベオリン-3にも内因性のものと同様の細胞内局在が起きていることを示しており、この細胞内分布はアゴニスト刺激でも変化しなかった。最後に、心筋肥大に伴う sarcomeric reorganization に与える影響について、actin に特異的に結合する phalloidin を用いて検討した。非感染の細胞や Ad.LacZ 感染細胞では、phenylephrine, endothelin-1 刺激で著明な reorganization を認めたが、Ad.Cav3 感染細胞では reorganization は抑制されていた。

【考察】

心筋細胞肥大は、進展ストレス、ホルモン、成長因子、サイトカインなどさまざまな細胞外刺激により出現する。今回検討した Gq 依存性アゴニストは、主要な肥大刺激の1つであり、特異的レセプターと結合した後、Gq を介して多様な down stream effector を活性化する。Gqにより、主として①protein kinase C (PKC)、②Ras や Rac を介す MAP kinase 系、③細胞内 Ca^{2+} の上昇を介す calcineurin、の各系が活性化され、相互に作用しながら核内にシグナルが伝達されると推測されている。これらのコンポーネントのうち Gq, PKC, Ras, Raf, ERK は、カベオラへの局在が報告されており¹⁾、カベオリン結合モチーフを介してカベオリン-3と結合することにより活性制御を受けることが示

A. Dose - Dependent Expression of Recombinant Cav-3 by Ad.Cav-3



B. Time - Dependent Expression of Recombinant Cav-3 by Ad.Cav-3

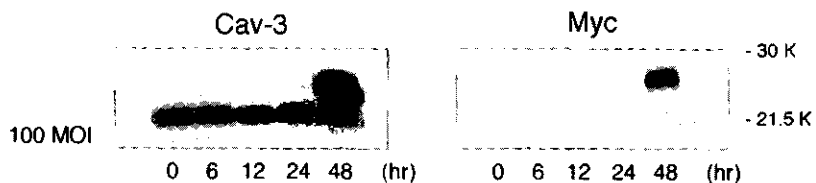


図2 内因性およびアデノウイルスを介したカベオリン-3の過剰発現
抗カベオリン-3および抗 myc 抗体によるウエスタンブロットを示す。

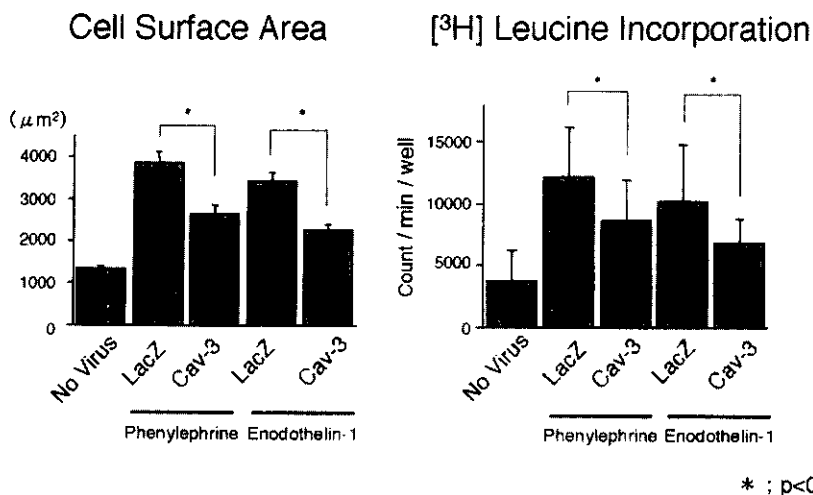


図3 カベオリン-3の過剰発現が心筋細胞肥大に与える影響
細胞面積計測と³H Leucine 取り込み率をグラフに示す。

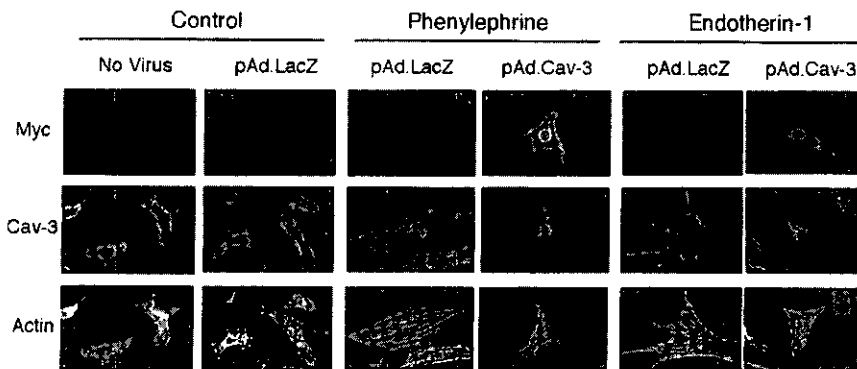


図4 カベオリン-3の細胞内分布と、カベオリン-3過剰発現がアゴニストによる sarcomeric reorganization に与える影響
抗カベオリン-3および抗 myc 抗体と phalloidin による二重染色を示す。

x400

されている³⁻⁵⁾。従って、カベオリン-3の過剰発現による肥大抑制機序は、カベオラに起始するシグナル伝達系の抑制であることが推測できる。もう1つの可能性としては、細胞内Ca²⁺の関与が考えられる。カベオラは、Na⁺-Ca²⁺ exchanger, membrane bound Ca²⁺ ATPaseなどを豊富に含むことから、細胞内Ca²⁺の制御に関与すると考えられている。さらに、最近心筋細胞においてL型Ca²⁺ channelからのCa²⁺流入がCa²⁺-induced Ca²⁺ releaseを引き起こす際、カベオラが促進的に働くことが報告されていることから⁶⁾、カベオリン-3の過剰発現により細胞内Ca²⁺制御に変化を来して肥大が抑制された可能性もある。

Schnitzerらの報告では、G蛋白の中でもGqαは、Giα, Gsα, Gβγに比し、よりカベオラへの集中度が高いことが示されており⁷⁾、主としてカベオラでは、Gqαのシグナルを制御している可能性がある。しかしながら、カベオリン-3の関与が、Gq依存性アゴニストによる心筋肥大のみか、あるいは心筋肥大の形成に普遍的であるかは不明であり、今後の検討を要する。また、我々が以前報告したα₁-アドレナリン刺激による心筋細胞肥大におけるカベオリン-3の増大は、今回の検討から過剰な肥大を抑制する制御機構であるという仮説が立てられるが、その証明のためには、今後カベオリン-3ノックアウトマウスやカベオリン-3変異マウスなどを用いた検討が必要と考えられる。

【結 論】

カベオリン-3の過剰発現は、phenylephrine及びendothelin-1による心筋細胞肥大を有意に抑制するとともに、肥大に伴う心筋細胞のsarcomeric reorganizationも同時に抑制した。従って、カベオリン-3は心筋細胞肥大のシグナリングを抑制的に制御する可能性が推測された。

【参考文献】

- 1) Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, et al: Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7289-7304.
- 2) Minetti C, Sotgia F, Bruno C, et al: Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 18: 365-368.
- 3) Li S, Okamoto T, Chun M, et al: Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 1995; 270: 15693-15701.
- 4) Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, et al: Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem* 1997; 272: 33416-33421.
- 5) Engelman JA, Chu C, Lin A, et al: Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett* 1998; 428: 205-211.
- 6) Lohn M, Furstenau M, Sagach V, et al: Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ Res* 2000; 87: 1034-1039.
- 7) Oh P, Schnitzer JE: Segregation of Heterotrimeric G Proteins in Cell Surface Microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 685-698.

レシピエント細胞の心移植後動脈硬化症 への関与に関する研究

佐田 政隆 永井 良三
東京大学大学院医学系研究科循環器内科

【研究要旨】

心移植後動脈硬化症は慢性期における予後の主要規定因子であるが、その病因、治療法は明らかでない。グラフト血管病変の成因を検討するため、野生型マウスと LacZ マウス(全身に LacZ を発現するマウス)との間で異所性心臓移植を行った。移植後 4 週目にグラフト冠動脈に平滑筋細胞を中心とする内膜肥厚を認めた。LacZ マウスの心臓が野生型マウスに移植された場合は、中膜細胞は LacZ を発現していたが、新生内膜細胞の大部分は陰性であった。逆に野生型マウスの心臓が LacZ マウスに移植された場合は、中膜細胞は LacZ 陰性であったが、新生内膜の大部分は LacZ 陽性細胞より構成されていた。性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y 染色体をマーカーとして同様の現象が確認された。レシピエントの骨髄由来細胞が移植後動脈硬化症に寄与することが明らかとなった。「平滑筋前駆細胞」の定着や分化に関する研究は移植後動脈硬化症の病態生理解明と治療法の開発に貢献すると期待される。

【研究目的】

欧米では、重症心疾患の治療として心臓移植が広く行われている。新規免疫抑制剤の開発により急性拒絶のコントロールは飛躍的に改善されたが¹⁾、「移植後動脈硬化」と呼ばれる原因不明の血管病変が生じ、再移植や死亡の原因となり長期予後を制限する。移植後動脈硬化症の原因は不明であり、治療法は確立していない。通常の粥状動脈硬化症と異なり、同種心移植後の長期生存者の病変は瀰漫性で求心性であり、脂質の蓄積が少ない。

閉塞性血管病変では、血管内腔に新生内膜が

形成され、その増殖によって管腔は狭小化する。この内膜の大部分は平滑筋細胞から構成されており、中膜の平滑筋細胞が遊走し増殖したものであると考えられてきた²⁾。そして、その中膜平滑筋細胞の脱分化、遊走、増殖を制御する遺伝子治療、薬物療法が考案されてきた。

本研究では、マーカー遺伝子 LacZ を発現するマウスと野生型マウスとの間で異所性心臓移植を行い、移植後動脈硬化を形成する細胞の起源について検討した。

【研究方法】

マウス異所性心臓移植

全身に LacZ 遺伝子を発現するマウス ROSA 26 マウス (C57BL/6 x 129S background), (Stock number 002072)³⁾ は米国ジャクソン研究所から購入した。他の野生型マウスは日本 SLC (静岡) から購入した。全ての実験手技は東京大学の「動物実験に関する指針」に沿い、米国国立衛生院の実験動物の取り扱いに関する指針に従った。

7-9週令の ROSA26 マウス (H-2^b) と野生型 C3H/HeN マウス (H-2^k) との間の異所性心臓移植は(それぞれをドナーもしくはレシピエントとして n=7) 以前報告された方法で行った⁴⁾。

さらには、7-9週令の雌の BALB/c (H-2^d) マウスから雄の C3H/HeJ (H-2^k) マウスへの心臓移植を行った。急性拒絶の予防のため、すべてのレシピエントに FK506 を投与した (0.3mg/kg/日の腹腔内連日投与)。

Xgal 染色と免疫染色

LacZ マウスを用いた移植後 28 日目にレシピエントマウスは過剰量のペントバルビタールによって安楽死させた。その後、移植心を 4% の

パラフォルムアルデヒドによって灌流固定し、X-gal 染色液 (PBS 中に 1mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside), 2mM MgCl₂, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP40 を含有) を用いて 37°C で一昼夜染色した。その後パラフィンに包埋し、切片 (5 μ m) にヘマトキシリン染色を施行した。免疫染色は以前報告した方法で行った⁵⁾。

In situ hybridization

性不一致の同種心グラフトを術後28日目に採取した。凍結切片 (10 μ m) をビオチン化標識した Y 染色体プローブ (AGL, Melbourne, FL) でハイブリダイゼーションした。プローブの分布はアルカリフォスファターゼを抱合したストレプトアビジンとベクターレッドを用いて可視化した。

【結果】

LacZ 陽性細胞を感知するために X-gal 染色法の感受性と特異性を調べるため、LacZ マウスと野生型マウスの大動脈と脾臓を採取し、X-gal 染色を施行した。LacZ マウスではいたる細胞が LacZ 陽性であったが (図 1A)³⁾、野生型では陽性細胞は認められなかった。

移植後28日目に心グラフトを採取し X-gal で染色を行った。野生型の心臓が LacZ マウスに移植された場合は LacZ 陽性の細胞が浸潤していた。一方逆の組み合わせでは、LacZ 陰性細胞が LacZ 陽性心に浸潤していた (図 1B)。

心外膜大冠動脈と小さな分枝の内腔は新生内膜の増殖によって狭小化していた (図 2)。野生型心臓が LacZ マウスに移植された場合は、中膜は LacZ 陰性であったが新生内膜の大部分は LacZ 陽性であった (図 2, 表 1)。一方、LacZ マウスの心臓が野生型に移植された場合には、中膜細胞は LacZ 陽性であったが、多くの新生内膜細胞は LacZ 陰性であった。

切片の免疫染色を施行したところ、中膜と新生内膜の殆どが平滑筋型 α アクチン陽性細胞であった (図 3A)。マクロファージは外膜に認められたが、新生内膜には認められなかった。T 細胞は血管壁には検出されなかった。このような病理像は野生型マウスを用いた移植臓器の病

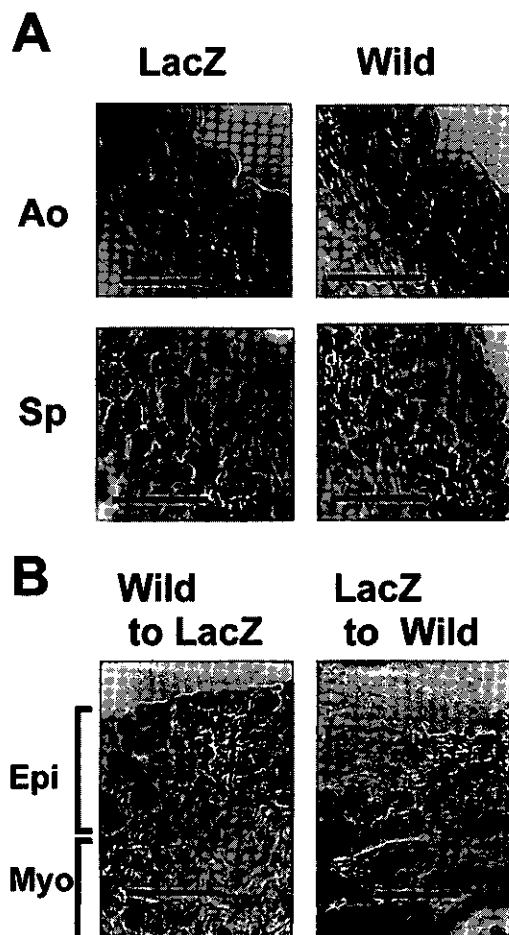


図 1 X-gal を用いた LacZ 陽性細胞の検出法の感度と特異性

- A. LacZ マウス (LacZ) と野生型 C3H マウス (Wild) から胸部大動脈 (Ao) と脾臓 (Sp) を摘出し X-gal で染色した。スケールバーは 25 μ m。
- B. LacZ マウスと野生型マウスとの間で心移植を行い 4 週間後に X-gal で染色した。宿主由来の炎症細胞が心外膜に浸潤している。

変と同等であった (図 3B)¹⁾。

さらに、野生型の雌から雄への心臓移植を行い、レシピエント由来の細胞を Y 染色体をマーカーとして検出した。大部分の新生内膜がレシピエント由来であった (図 3C)。

【考察】

近年の幹細胞科学の進歩により、骨髄には各種の系統の細胞に分化しうる万能細胞が存在することが明らかになった^{6,7)}。本研究の結果によると、血中には平滑筋前駆細胞が存在しており、グラフト内皮に接着し平滑筋に分化し増殖することにより新生内膜を形成すると考えられる。昨年、Flk1-陽性の胎児型幹 (ES) 細胞から、

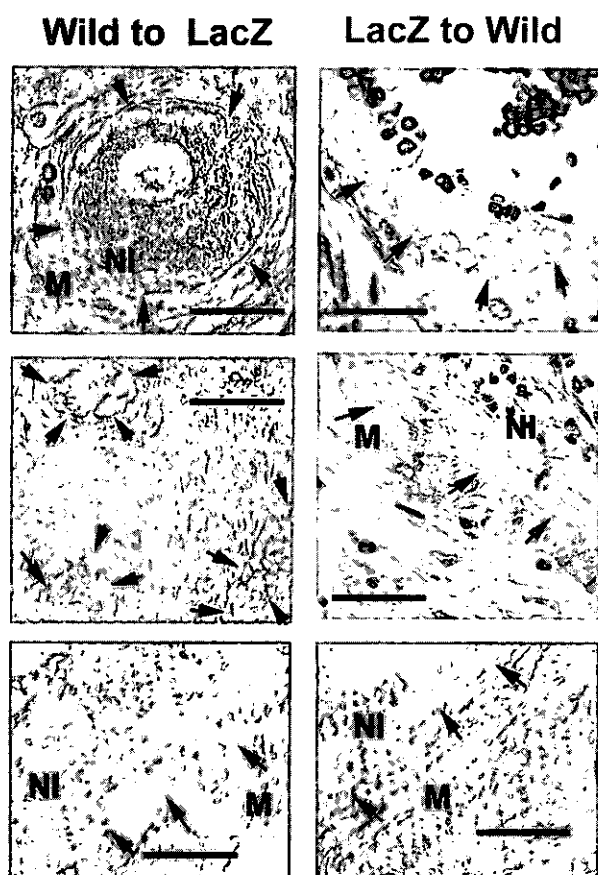


図2 レシピエント由来細胞による新生内膜

A. 野生型マウスから LacZ マウスへの移植では(Wild to LacZ), 冠動脈硬化病変は主としてレシピエント由来の LacZ細胞で構成されていた. 逆にLacZ マウスから野生型マウスに移植を行った場合は(LacZ to wild), 新生内膜の大部分は LacZ陰性細胞で構成されていた. 矢印は内弾性板を示す. Epi, 心外膜; Myo, 心筋; M, 中膜; NI, 新生内膜. スケールバー, 25 μ m.

表1 移植後動脈硬化病変での LacZ 陽性細胞の割合

	Wild to LacZ	LacZ to Wild
内膜	86.2 \pm 3.2%	2.3 \pm 1.1%
中膜	10.2 \pm 6.2%	65.3 \pm 12.4%

野生型 C3H マウスから LacZ マウス(Wild to LacZ)もしくは LacZ マウスから野生型 C3H マウスへ(LacZ to Wild)の7心移植を行った. 個々の心グラフトから中規模の冠動脈を10個選出し, 中膜もしくは新生内膜での LacZ 陽性細胞の割合を算出した. 結果は平均値 \pm S.E. M として報告した.

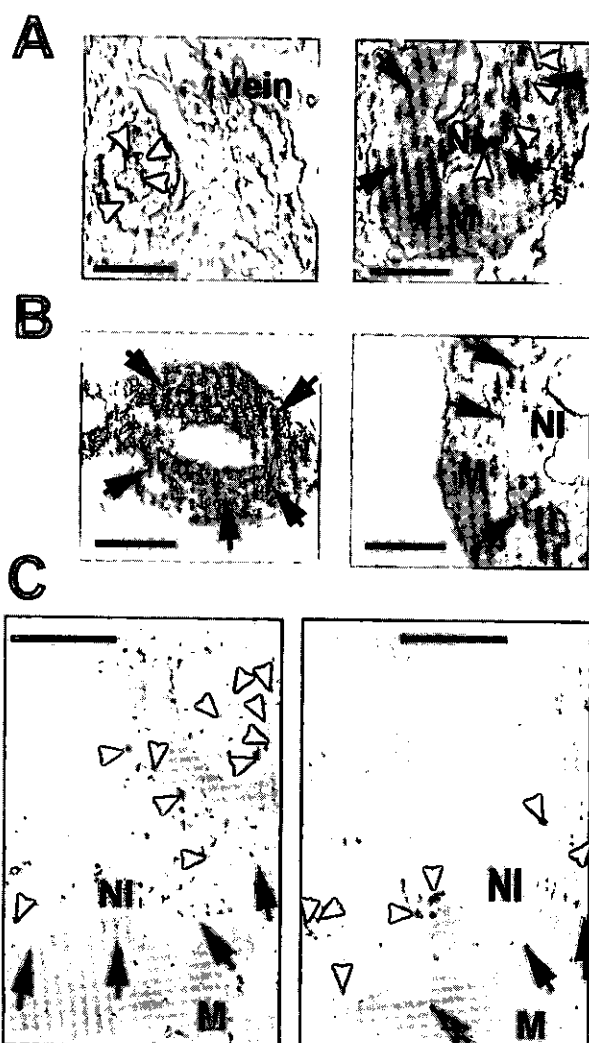


図3 植後動脈硬化病変の性状

A&B. 新生内膜は平滑筋細胞から構成される.

野生型マウスから LacZ マウスへの移植心(A), もしくは野生型 C3Hマウスから LacZ マウスへの移植心(B)を採取し, 連続切片に対して α -平滑筋型アクチンで免疫染色を行った. 白い矢印は LacZ と平滑筋型アクチン両方に陽性の新生内膜を指す. 黒い矢印は内弾性板を示す. スケールバー, 12.5 μ m.

C. Y染色体に対する In situ hybridation. 雌の BALB/c mouse から雄の C3H マウスへの移植心を術後4週に凍結した. 切片をビオチン化抗マウス Y染色体プローブとハイブリダイゼーションを行った. 白い矢印は Y染色体陽性の核を示す. 黒い矢印は内弾性板を示す. スケールバー, 25 μ m; NI, 新生内; M, 中膜.

内皮細胞と平滑筋細胞の両方が分化し血管構造を再構築することが報告された⁸⁾。共通の血管前駆細胞というべき未分化細胞が血中に存在し動脈硬化病変に関与しているのかもしれない⁹⁾。

最近、筆者らの結果を追試する動物実験が見られている¹⁰⁻¹³⁾。同様な機序がヒトの血管病変でどの程度関与しているか現在検討中である。また、血中のどのような分画の細胞が病変形成に関与するのか、平滑筋細胞への分化と増殖がどのような分子機序で制御されているのかについて研究を進展させている。

【結 論】

移植後動脈硬化病変の新生内膜は、レシピエント由来の平滑筋前駆細胞がグラフトに定着して増殖することで生じることが明らかとなった。本研究の成果は、移植後動脈硬化症の病態生理に新しい視点を与えると同時に、レシピエント由来の平滑筋前駆細胞の動員、定着、分化、増殖を標的とした新しい治療法の開発に貢献すると期待される。

【参考文献】

- 1) Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplantation Proceedings* 1987; 19: 19-25.
- 2) Ross R. Genetically modified mice as models of transplant atherosclerosis. *Nature Med.* 1996; 2: 527-528.
- 3) Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA bgeo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 3789-3794.
- 4) Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation* 1973; 16: 343-350.
- 5) Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiyama S, et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32: 2097-2104.
- 6) McKay R. Stem cells-hype and hope. *Nature* 2000; 406: 361-364.
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
- 8) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92-96.
- 9) Carmeliet P. One cell, two fates. *Nature* 2000; 408: 43-45.
- 10) Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, et al. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation* 1995; 60: 414-424.
- 11) Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001; 7: 738-741.
- 12) Hillebrands JL, Klatter FA, van Den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1411-1422.
- 13) Hillebrands J, B.M. vdH, Klatter FA, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Recipient origin of neointimal vascular smooth muscle cells in cardiac allografts with transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 1183-1192.

心筋症ハムスターの心臓における endothelin(ET)-1 の役割の 分子レベルでの解明のための、ハムスター ET-1 cDNA およびハムスターの ET 変換酵素 cDNA のクローニング

宮内 卓 小林 勉 酒井 俊
飯田 啓治 横田 倫子 山口 巖

筑波大学臨床医学系循環器内科

後藤 勝年

筑波大学基礎医学系薬理

【研究要旨】

心筋症の進展・悪化に心臓における ET-1 系の活性化の関与が示唆されている。心筋症ハムスターと ET-1 との関連を分子レベルで詳細に検討するため、本研究にて、ハムスターの ET-1 cDNA のクローニングおよびハムスターの ET 変換酵素(ET converting enzyme: 以下 ECE と略す)の cDNA をクローニングした。

【目的】

心筋細胞および血管内皮は、endothelin (ET)-1 を産生する。我々は、ET 受容体遮断薬が、心筋梗塞による心不全ラットや心筋症による心不全ハムスター(Bio14.6 ハムスター)の生存率や血行動態の改善に有効であることを報告した。これらの所見は、心筋症の進展・悪化に ET-1 が関与することを示唆する。心筋症ハムスターと ET-1 との関連を分子レベルで詳細に検討するため、本研究にて、ハムスターの ET-1 cDNA のクローニングおよびハムスターの ET 変換酵素(ET converting enzyme: 以下 ECE と略す)の cDNA をクローニングした。

【方法】

(1)ハムスター ET-1 cDNA のクローニング

マウス ET-1 cDNA 塩基配列に基づく PCR プライマーでの low-stringency PCR を行い、ハムスター ET-1 の partial cDNA を増幅し、部分塩基配列を決定した。さらに得られた塩基配列情報をもとに gene-specific primer を作

成し、それを用いた rapid amplification of cDNA ends (RACE)法によりハムスター ET-1 cDNA 全長の塩基配列を決定した。

(1)RNA 抽出

正常ハムスター F1b の心臓より total RNA を ISOGEN を用いて抽出した。DNase I 処理および ISOGEN による再抽出により、混入した genomic DNA を除去した。

(2)逆転写反応および PCR によるハムスター ET-1 cDNA の増幅

得られた total RNA を鋳型に、First-strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)を用い逆転写反応を行った。得られた cDNA は 10 倍に希釈し、PCR の鋳型として用いた。PCR は PCR thermal cycler (TP-3000, TaKaRa)を用いて行った。マウス ET-1 cDNA の塩基配列に基づき作成された DNA オリゴマーをプライマーとして PCR を行い、ハムスター ET-1 cDNA の増幅を行った。得られた増幅産物を plasmid pCRII (TA cloning; Invitrogen)にサブクローニングした後、その塩基配列を決定した。塩基配列には dye-terminator kit (Applied Biosystems)を用い ABI PRISM 377 DNA sequencer (ABI)にて行った。

(3)ハムスター ET-1 cDNA 遺伝子の RACE

ハムスター ET-1 cDNA の全塩基配列を決定するために rapid amplification of cDNA ends (RACE)を行った。RACE には Mara-

thon RACE Kit (Clontech)を用いた。ハムスター心臓から抽出した total RNA から, Oligotex-dT (TaKaRa)を用いて poly (A)+RNA を精製した。得られた poly (A)+RNA 1 μ g から double-strand cDNA を合成し, さらに5'末端と3'末端にアダプタ DNA を ligate した。得られた cDNA を鋳型にして, partial cDNA の増幅に用いたマウス ET-1 cDNA anti-sense primer と, Marathon RACE Kit に同梱の general adapter primer 1 (AP1)を用い, ハムスター ET-1 cDNA の5'末端を増幅した。さらに, その増幅産物を鋳型にして, ハムスター ET-1 cDNA の塩基配列を基に作成したハムスター ET-1 partial cDNA の塩基配列を基に作成したハムスター ET-1 anti-sense primer と Kit に同梱の general adapter primer 2 (AP2)を用い, nested PCR を行った。得られた増幅産物は plasmid pCR II に subcloning し, その塩基配列を決定した。ハムスター ET-1 cDNA の3'末端の増幅は, partial cDNA の増幅に用いたマウス ET-1 cDNA sense primer と, Kit に同梱の AP1 primer を用いた。その増幅産物を鋳型にして, ハムスター ET-1 partial cDNA の塩基配列を基に作成したハムスター ET-1 sense primer と AP2 primer を用い, nested PCR を行った。得られた増幅産物は plasmid pCR II に subcloning し, その塩基配列を決定した。

(II)ハムスター ECE-1 cDNA のクローニング

ラット ECE-1 cDNA 塩基配列に基づく PCR プライマーでの low-stringency PCR を行い, ハムスター ECE-1 の partial cDNA を増幅し, 部分塩基配列を決定した。さらに得られた塩基配列情報をもとに gene-specific primer を作成し, それを用いた rapid amplification of cDNA ends (RACE)法によりハムスター ECE-1 cDNA 全長の塩基配列を決定した。具体的な方法は(I)ハムスター ET-1 cDNA のクローニングに準じた。正常ハムスター F1b の肺より total RNA を抽出し, ラット ECE-1

cDNA 塩基配列に基づく PCR プライマーを最初に用いた点が, ハムスター ET-1 cDNA をクローニングした場合と異なる。

【結果と考察】

得られたハムスター ET-1 cDNA 配列は 606 bp の open reading frame を含み, 202アミノ酸塩基の蛋白をコードしていた。得られた塩基配列は coding region, non-coding region とともに他の哺乳動物の ET-1 cDNA 配列に対してよく保存されていた。ハムスター ET-1 塩基配列は, ラット, マウス, ブタ, ヒトに対して, それぞれ 83%, 83%, 70%, 72% の相同性を有していた。3'非翻訳領域には, 典型的な polyadenylation signal 配列である "AATAAA" が存在した。また3'非翻訳領域には, 他種の ET-1 cDNA 同様に, "ATTTA" モチーフと, 多数の ATn モチーフが存在していた。"ATTTA" や "ATn" といった配列は, 一過性の発現を示すサイトカイン, 成長因子などでも認められ, 選択的な mRNA の不安定化に関与していると考えられており, ハムスターにおいても, このメカニズムによる発現調節機構が存在する可能性が考えられた。また, ECE-1 については, ヒトやラットにおいて alternative splicing によって生じる5'端領域の塩基配列が異なる ECE-1 α および ECE-1 β の2種が存在する。本研究にて, RACE 法を用いた検討によって, ハムスターにおいても, 同様に2つの cDNA がクローニングされた。ハムスターの ECE-1 α および ECE-1 β の cDNA はそれぞれ 754アミノ酸塩基, 758アミノ酸残基をコードしていた。また, ECE-1 α は house keeping な機能を持つことが示唆された。

【総括】

ハムスターの ET-1 cDNA 全長と ECE-1 cDNA 全長をクローニングした。これらの知見は, 心筋症ハムスターの不全心筋における ET-1 の役割の分子レベルでの解明に大きく寄与することが期待される。

拡張型心筋症における Carvedilol の効果の検討

— 心機能に対する効果と電気的不均一性に対する効果との関連 —

西 功 飯田 啓治 河野 了
山田 さつき 増見 智子 山口 巖
筑波大学臨床医学系循環器内科

【研究要旨】

拡張型心筋症において β 遮断薬(carvedilol)療法は死亡率を減少させることなどから治療の主流となりつつある。死亡率の減少には左室機能の改善だけでなく、突然死の減少も関連していると思われ、carvedilolにより拡張型心筋症患者の電気生理学的な特性も改善していることが推測される。本研究の目的は、拡張型心筋症においてcarvedilolによる心筋の再分極過程の不均一性の指標とみなされているQT dispersionの変化を測定し、左室機能の変化との関連を検討することにある。洞調律の拡張型心筋症患者14例(平均年齢 57 ± 14 歳, 男性7例, NYHA心機能分類II~III)を対象とした。脚ブロック, 持続性心室頻拍を認めた例およびジギタリス, Ia・Ic・III群の抗不整脈薬の投与例は除外した。Carvedilol投与前後にそれぞれ心電図と心エコー図を記録した。心電図の諸指標の測定解析は、臨床所見などを伏せた状態で、1人の循環器内科医により行われ、また、QTcはBazettの式を用いて補正した。心エコー図より左室駆出率(EF)を求め、carvedilol投与前後におけるEFの変化分(投与後EF-前EF)を ΔEF とし、 $\Delta EF \geq 10\%$ を反応良好群(7例)、 $\Delta EF < 10\%$ を反応不良群(7例)とした。治療前の年齢, 性別, NYHA心機能分類, 収縮期血圧, 左室拡張終期径, EF, carvedilol維持量および観察期間は両群間において有意な差を認めなかった。また、治療前の心電図の諸指標(最大QT, 最小QT, QT dispersion, 最大QTc, 最小QTc, QTc dispersion, RR間隔)についても両群間に有意な差を認めなかつ

た。反応良好群では、QTc dispersionは短縮し、有意な改善を認めたが [$0.078 \pm 0.021 \text{sec} \rightarrow 0.055 \pm 0.025 \text{sec}$ ($p < 0.05$)], 反応不良群では変化を認めなかった ($0.058 \pm 0.023 \text{sec} \rightarrow 0.059 \pm 0.023 \text{sec}$)。Carvedilol投与による左室収縮機能の改善は心筋の再分極過程の不均一性の改善を伴うことが示唆された。

【研究目的】

拡張型心筋症において β 遮断薬(carvedilol)療法は死亡率を減少させることなどから治療の主流となりつつある。死亡率の減少は左室機能の改善だけでなく、突然死の減少にも関連していると思われ¹⁾、carvedilolにより拡張型心筋症患者の電気生理学的な特性も改善していることが推測される。

QT間隔のばらつき(QT dispersion)は、心筋の再分極過程の不均一性の指標として有用であるとも言われている。この不均一な心筋の再分極過程自体が不整脈の機能的器質であるので、QT dispersionが大きい症例はリエントリーによる不整脈を起こしやすいと考えられている。

本研究では、拡張型心筋症においてcarvedilolによる心筋の再分極過程の不均一性の指標であるQT dispersionの変化を測定し、左室機能の変化との関連を検討した。

【研究方法】

洞調律の拡張型心筋症患者14例(平均年齢 57 ± 14 歳, 男性7例, NYHA心機能分類II~III)を対象とし、carvedilol投与前後にそれぞれ心電図と心エコー図を記録した。持続性心室頻拍を認めた例、QTの計測に影響を与える脚ブロック例およびジギタリス, Ia・Ic・III群の

抗不整脈薬の投与例は除外した。Carvedilol は1~5mg/日から開始し、約2カ月間で20~30mg/日に増量し、維持量とした。心電図の諸指標の測定解析は、臨床所見などを伏せた状態で、1人の循環器内科医により行われた。T波の下行脚(陰性T波では上行脚)の最大勾配の接線を延長して基線と交わる点をT波の終末点と定義した。QT間隔は用手計測にて行った。QTcはBazettの式を用いて補正した。心エコー図より左室駆出率(EF)を求め、carvedilol投与前後におけるEFの変化分(投与後EF-前EF)を ΔEF とし、 $\Delta EF \geq 10\%$ を反応良好群(7例)、 $\Delta EF < 10\%$ を反応不良群(7例)とした。

検査値は平均値 $\pm 1SD$ で示した。統計学的検定には、t検定、Fisherの直接確率計算法、 χ^2 検定を用い、危険率0.05未満を有意とした。

【結果】

Carvedilol治療開始前の各群の患者背景を表1, 2に示す。反応良好群と反応不良群の間に年齢、性別、NYHA心機能分類、carvedilol維持量、観察期間、収縮期血圧、左室拡張終期径、左室収縮終期径およびEFに有意な差はなかった。また、治療前の心電図の諸指標(最大QT, 最小QT, QT dispersion, 最大QTc, 最小QTc, QTc dispersion, RR間隔)においても両群間に有意な差を認めなかった(表3)。しかしながら、carvedilol療法前のQT dispersionおよびQTc dispersionは、反応不良群と比較し、反応良好群で大である傾向にあった(それぞれ $p=0.083$, $p=0.104$)。反応良好群では、carvedilol療法によりQTc dispersionは 0.078 ± 0.021 secから 0.055 ± 0.025 secに有意に短縮し、QT dispersionは 0.073 ± 0.022 secから 0.053 ± 0.024 secに短縮する傾向($p=0.056$)にあったが、反応不良群ではQTc dispersion, QT dispersionのいずれにも明らかな変化を認めなかった。

【考察】

拡張型心筋症患者のQT dispersionが β 遮断薬療法により短縮したとの報告はあるが^{2,3)}、どのような症例にそれが認められるかについては明らかにはされていない。Carvedilolによ

表1 対象

	反応良好群	反応不良群	p value
年齢(歳)	53 \pm 18	62 \pm 9	NS
性別(男/女)	4/3	3/4	NS
NYHA(II/III)	6/1	5/2	NS
Carvedilol維持量(mg)	21 \pm 4	20 \pm 0	NS
観察期間(月)	9 \pm 3	8 \pm 2	NS

mean \pm SD

る拡張型心筋症患者における死亡率の減少はポンプ失調(左室収縮機能不全)の改善だけではなく、突然死の減少も関連していると考えられる¹⁾。その一方でcarvedilolの抗不整脈効果が左室駆出率の改善に伴い認められたとの報告⁴⁾もあり、carvedilolにより拡張型心筋症患者の電気生理学的な特性も併せて改善していることが推測される。

本研究では、carvedilolの投与により左室収縮機能が比較的明らかに改善した患者において、心筋の再分極過程の不均一性の指標であるQTc dispersionが短縮したが、左室収縮機能が改善しなかった患者では、QTc dispersionの変化は認められなかった。反応不良群では、左室拡大や左室収縮機能は、反応良好群と同程度であったが、carvedilol療法前のQT dispersionは少ない傾向にあり、心筋再分極過程は比較的均一であったと考えられた。反応不良群では、carvedilol療法前に既に線維化や変性が左室全体にほぼ均一に生じていたため、心筋再分極過程は比較的均一であったと推察された。さらにこの心筋組織の広範な変化が不可逆的であるためにcarvedilolにより左室収縮力とQTc dispersionの改善が少ないものと考えられる。一方、反応良好群では、反応不良群と比べcarvedilol療法前のQT dispersionが大きい傾向があり、心筋再分極過程は不均一であった。このことから、生存してはいても収縮には関与していない心筋が心臓内により多く混在していることが推察され、従ってcarvedilol療法により左室収縮機能が改善し、QTc dispersionも短縮したと考えられた。

QT dispersionは心血管死亡を予測する因子であるとの報告がある⁵⁾。Galiner Mら⁶⁾とFuら⁷⁾もQT dispersionあるいはこれとほぼ