

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

岩井 愛雄 志賀 宣之 松田 康章
高井 栄治 宮本 宣友 清水 政克
川合 宏哉 横山 光宏

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

秋田 穂 束

神戸大学大学院医学系研究科総合診療医学

宝田 明

兵庫県立姫路循環器病センター循環器科

【研究要旨】

特発性拡張型心筋症(DCM)患者では β アドレナリン受容体(AR)を介した交感神経系の異常が認められる。 β_1 ARのArg389Gly(C1165G)遺伝子多型において、Arg389(CC)のアデニル酸シクラーゼ活性はGly389(GG)に比し約3倍高い。そこで、163例のDCM患者および年齢、性別を一致させた健常人157例を対象とし、RFLP法により遺伝子解析を行い、 β_1 ARArg389Gly遺伝子多型とDCM発症およびDCM患者群で心機能、心室性頻拍(VT)の発生について検討した。C allele 頻度はそれぞれ0.71, 0.70で差を認めなかった。心機能に関してもCC, CG, GGの3種類の遺伝子型の間差を認めなかった。VTに関しては、今回ホルター心電図を確認できたDCM患者133名について、心室性期外収縮3連発以上を認めるものを陽性群としたが陽性群(94例)と陰性群(39例)のC allele 頻度はそれぞれ0.76と0.54 ($p=0.001$)で、C allele がVT発生に関して危険因子として作用することが示唆された。

【はじめに】

特発性拡張型心筋症(DCM)患者では、心筋における β_1 アドレナリン受容体(AR)のdown-regulationをはじめ著明なアドレナリン交感神経系の異常が認められることが知られてい

る¹⁾。また、心不全患者に対する β 遮断薬療法は、心機能および予後を改善し、特に心室性不整脈による突然死を予防することが明らかになっている²⁾。

最近になって、 β_1 AR遺伝子多型が数箇所存在することが判明し^{3,4)}、その一つのArg389Gly(C1165G)は第7番目細胞膜貫通部位(helix VII)と細胞内のC末端間の、G蛋白との結合およびシグナル伝達に重要な役割を担う場所に位置している。In vitroでの機能解析においても、Arg389(CC)のアデニル酸シクラーゼ活性がGly389(GG)に比べ著明に高いことが明らかになった⁵⁾。この遺伝子多型について、DCMを対象疾患として欧州においてケース・コントロール研究が行われたが、genotype, allele 頻度に関して疾患群および対照群間で差を認めず、また疾患群の心機能もgenotype, allele 間に差を認めなかった⁶⁾。但し、心室性不整脈との関連性については検討されていない。

【目的】

日本人における β_1 ARArg389Gly遺伝子多型とDCM発症、心機能、および心室性頻拍(VT)の発生の関連性について検討を行うこと。

【対象】

1995年6月から1999年2月にかけて神戸大学医学部附属病院および兵庫県立姫路循環器病セ

表1 Characteristics of DCM Patients and Control Subjects

	DCM Patients (n=163)	Control Subjects (n=157)	p value
Age*(years)	51.7±1.0	52.1±1.0	NS
Sex(male/female)	125/38	127/30	NS
Arg389Gly genotype, n(%)			
CC	88(54)	74(47)	} NS
CG	54(33)	71(45)	
GG	21(13)	12(8)	
C allele frequency	0.71	0.70	NS

* Age is presented as mean±SE. For the DCM patients, the value refers to the age at onset of DCM, not the current age.

ンターにて DCM と診断され、精査加療目的で入院した163例(男性125例, 平均年齢51.7±1.0才). 全症例に対して心エコー, 心臓カテーテル検査(冠動脈造影, 左室造影, 右心カテーテル)を施行した. DCM 患者群と年齢, 性別を一致させた, 企業健診にて健常と判定された157例(男性127例, 平均年齢52.1±1.0才)を対照群とした.

【方法】

1. 遺伝子解析

Maqbool ら³⁾が報告した方法に基づいて行った. 簡述すると, 全血より genomic DNA を抽出し, 制限酵素 Bcg I による RFLP 法を用いて, DCM 患者群および対照群の β_1 ARArg389Gly 遺伝子多型を決定した.

2. 患者背景

臨床背景として年齢, 性別, 内服薬(入院時), 収縮期血圧, NYHA 心機能分類重症度, 心エコーおよび心臓カテーテル検査所見を検討した.

3. VT の有無の判定

VT に関しては, 心拍数100/分以上の心室性期外収縮3連発以上を認めるものを陽性群と定義し, 今回ホルター心電図を確認できた DCM 患者133例について検討した.

4. 統計学的検討

各数値は平均±標準誤差で示した. 統計処理は2群間の genotype, allele 頻度の比較, 性別, 内服薬の有無, NYHA 心機能分類重症度については χ^2 検定, 年齢, 収縮期血圧, 左室駆出率などの2群間の数値比較は Student unpaired t 検定を, 3群間の数値比較は ANOVA

を用いて行った. 多変量解析は, 多重ロジスティック回帰分析を行った. いずれも $p < 0.05$ を有意差の判定とした.

【結果】

1. DCM 発症との関連性

両群間で CC, CG, GG の genotype の出現度に差を認めなかった. C allele 頻度も患者群で 0.71, 対照群で 0.70 と差を認めなかった(表1).

2. 心機能との関連性

DCM 患者群において, 収縮期血圧, NYHA 心機能分類重症度, 左室拡張末期径, 左室短縮率, 左室拡張末期容積率, 左室駆出率に関して, 各 genotype 間で有意差を認めなかった(表2).

3. VT との関連性

ホルター心電図を確認できた DCM 患者133例を VT 陽性群(94例)と陰性群(33例)の2群に分類した.

(1)患者背景および心機能

年齢, 性別, 利尿剤, ジギタリス製剤, ACE 阻害薬および β 遮断薬の服薬の有無, 収縮期血圧, NYHA 心機能分類重症度, 左室拡張末期径, 左室内径短縮率, 左室拡張末期容積係数, 左室駆出率に関して検討したが, 両群間に差を認めなかった(表3・表4).

(2)genotype および C allele 頻度

VT 陽性群では CC61%, CG30%, GG9%, VT 陰性群では CC31%, CG46%, GG23% と VT 陽性群において CC 型が多く, VT 陰性群で CG 型および GG 型の出現率が高かった($p = 0.005$).

表2 Characteristics of DCM Patients According to Genotype

	CC (n=88)	CG (n=54)	GG (n=21)	p value
sBP (mmHg)	121.1±3.9	124.8±2.4	124.8±2.0	NS
NYHA class	2.1±0.2	2.0±0.1	2.2±0.1	NS
LVDd (mm)	63.7±1.4	63.6±0.8	63.6±0.8	NS
%FS (%)	16.1±1.4	16.6±0.8	16.0±0.6	NS
LVEDVI (ml/m ²)	158.8±8.2	143.6±6.2	140.8±4.7	NS
LVEF (%)	30.7±2.6	34.1±1.5	34.7±1.3	NS

表3 Characteristics of DCM Patients With or Without VT (1)

	VT+(n=94)	VT-(n=39)	p value
Age*(years)	52.9±1.3	46.5±2.2	NS
Sex (male/female)	70/24	31/8	NS
Concomitant medications, n (%)			NS
Diuretics	66(75)	22(62)	NS
Digitalis	50(53)	16(41)	NS
ACE inhibitors	41(44)	16(41)	NS
β-Blockers	19(20)	4(10)	NS

* Age is presented as mean±SE. The value refers to the age at onset of DCM, not the current age.

表4 Characteristics of DCM Patients With or Without VT (2)

	VT+(n=94)	VT-(n=39)	p value
sBP (mmHg)	123.4±1.8	124.1±2.9	NS
NYHA class	2.2±0.1	1.9±0.1	NS
LVDd (mm)	63.8±0.7	63.7±0.9	NS
%FS (%)	16.0±1.4	16.7±0.9	NS
LVEDVI (ml/m ²)	151.2±4.8	135.3±5.9	0.06
LVEF (%)	34.0±1.3	34.3±1.9	NS

また C allele 頻度は, VT 陽性群では0.76, VT 陰性群で0.54と VT 陽性群で有意に高かった(p=0.001)(表5).

(3)VT 発生の予測

Arg389homozygote(CC), 年齢≥60才, NYHA 心機能分類重症度≥Ⅲ度, 左室内径短縮率<15%, 左室拡張末期容積係数≥140ml/m², 左室駆出率<30%, 利尿剤, ジギタリス製剤, ACE 阻害薬およびβ遮断薬使用の有無を独立因子, VT の発生を従属因子とした多変量解析では, Arg389homozygote(CC)がVT の発生の独立した危険因子であることが示された(相対危険度3.65, 95% 信頼区間1.57-8.89)(表6).

【考 察】

本研究において我々は日本人 DCM 患者163例について, β₁ARArg389Gly 遺伝子多型を検討したところ genotype, allele 頻度に関して疾患群および対照群間で差を認めず, また疾患群の心機能も genotype, allele 間に差を認めなかった. また Tesson ら⁶⁾の426例の DCM 患者についての検討においても, 同様の結果が得られた. すなわち, β₁ARArg389Gly 遺伝子多型は DCM の原因, または心機能修飾遺伝子ではないことが明らかになった. C allele 頻度に関してはコーカシヤンの DCM 患者群で0.76, 対照群で0.78と比較して日本人では患者群で0.71, 対照群で0.70とやや低目であった.

表5 Prevalence of Genotypes and Allele Frequencies in DCM Patients With or Without VT

	VT+(n=94)	VT-(n=39)	p value
Arg389Gly genotype, n (%)			
CC	57(61)	12(30)	0.005
CG	28(30)	18(46)	
GG	9(9)	9(23)	
C allele frequency	0.76	0.54	0.001

表6 Multivariate Analysis: Determinant of VT

	Odds ratio*	95%CI*	p value
Arg389 homozygote (CC)	3.65	1.57- 8.89	0.003
Age \geq 60 years	1.91	0.63- 6.34	0.266
NYHA class \geq 3	1.57	0.55- 4.63	0.405
%FS $<$ 15%	1.46	0.56- 3.91	0.440
LVEDVI \geq 140ml/m ²	1.34	0.53- 3.39	0.537
LVEF $<$ 30%	0.77	0.28- 2.06	0.601
Diuretics	1.95	0.17-50.15	0.623
Digitalis	1.35	0.51- 3.62	0.540
ACE inhibitors	0.95	0.39- 2.33	0.920
β -Blockers	2.25	0.60-10.28	0.256

* Odds ratios and 95% CIs were calculated by multiple logistic regression analyses.

DCM 患者では心筋における β_1 アドレナリン受容体(AR)の down-regulation をはじめ著明なアドレナリン交感神経系の異常が認められること¹⁾, また心不全患者に対する β 遮断薬療法は, 心機能および予後を改善し, 特に心室性不整脈による突然死を予防することが明らかであること²⁾より, β_1 ARArg389Gly 遺伝子多型が DCM 患者の VT 発生に関わっている可能性を推察した。

自律神経系の活動が心室性不整脈の発生に関与することは, 心臓突然死との関連において以前より検討されてきた。交感神経機能の亢進は自動能を増強し, リエントリー回路に伝導遅延や不応期不均一性を生じ, 心室性不整脈の発生を促進する。また早期および後期脱分極によるトリガードアクティビティーを介して VT は発生する考えられている。

Arg389Gly 遺伝子多型に関しては, in vitro での機能解析において, Arg389 (CC) のアデニル酸シクラーゼ活性が Gly389 (GG) に比べ著明に高いことが判明しており⁵⁾, Arg389homo-

zygote (CC) で, VT の発生頻度が高いのではないかと予想したところ, DCM 患者の VT 陽性群では CC 型が 61% と VT 陰性群の 31% と比し有意に高く ($p=0.005$), C allele 頻度も VT 陽性群で 0.76, VT 陰性群の 0.54 と比し有意に高い ($p=0.001$) という結果が得られた。日本人の VT 陽性群の C allele 頻度とコーカシヤンの DCM 患者群および対照群における C allele 頻度がほぼ等しいことから, コーカシヤンにおける Arg389Gly 遺伝子多型と VT 発生に関する報告がないので言及はできないが, G allele が VT 発生に対して何らかの保護的に作用していると考えたほうが適切である可能性もある。

DCM 患者を対象とした β_1 AR と心室性不整脈の関連性の検討としては, Iwata ら⁷⁾ が β_1 AR の細胞外第 2 ループの β_1 AR 自己抗体の存在が VT 発生の予測因子となることを報告しているが, β_1 AR 遺伝子多型と DCM 患者の心室性不整脈の関連性については, 著者らの知る範囲内では本研究が初回報告である。

今後の課題として、さらに多数の DCM 患者群で検討すること、prospective に genotype 別に心室性不整脈に対する β 遮断薬の有用性を検討すること、さらに虚血性心疾患患者における β_1 AR 遺伝子多型と心室性不整脈発生の関連性を検討することなどが挙げられる。

【結 論】

日本人の DCM 発症および DCM 患者の心機能に関して、 β_1 AR Arg389Gly 遺伝子多型との関連性は認めなかった。

但し、DCM 群のうち、VT 陽性群においては、VT 陰性群と比較して C allele 頻度が有意に高く、Arg389homozygote (CC)は VT の発生に関して、独立した危険因子であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Bristow MR, Anderson FL, Port JD, Skerl L, Hershberger RE, Larrabee P, O'Connell JB, Renlund DG, Volkman K, Murray J. Difference in beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991; 84: 1024-1039.
- 2) CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999; 353: 9-13.
- 3) Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet* 1999; 353: 897.
- 4) Podlowski S, Wenzel K, Luther HP, Muller J, Bramlage P, Baumann G, Felix SB, Speer A, Hetzer R, Kopke K, Hoehe MR, Wallukat G. Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med*. 2000; 78: 87-93.
- 5) Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1999; 274: 12670-12674.
- 6) Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullieres Y, Amouyel P, Roizes G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and elevation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *CARDI-GENE Group. J Mol Cell Cardiol*. 1999; 5: 1025-1032.
- 7) Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 418-424.

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

宮本宣友 志賀宣之 岩井愛雄
高井栄治 清水政克 高井栄治
川合宏哉 横山光宏

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

秋田穂束

神戸大学大学院医学系研究科総合診療医学

宝田明

兵庫県立姫路循環器病センター循環器科

【研究要旨】

拡張型心筋症(DCM)の発症における遺伝子多型性の関与については，不明な点が多く，特に日本人における検討の報告は少ない．今回，我々は，DCM患者183名および正常対照群183名を対象に angiotensin-I converting enzyme (ACE) gene I/D, angiotensinogen (AGT) gene T174M と M235T, angiotensin-II type I receptor gene A-153G と A+39C, aldosterone synthase gene CYP11B2 T-334C, β_1 adrenergic receptor (β_1 AR) gene R389G, endothelin receptor type A (ETAR) gene C+1363T, matrix metalloproteinase MMP 3 5A/6A と MMP 9 C-1562T の 7 遺伝子 9 遺伝子多型性と DCM の発症との関連，ならびに重症度，長期経過中のリモデリングの進展，不整脈の発生といった表現型に及ぼす影響について検討した．DCM 患者に関しては，診断時の NYHA, 心エコー(LVDd, %FS), 左室造影(LVEDVI, LVEF), ホルター心電図(VT 発生の有無)を評価し，心エコーに関しては長期経過(6.6±0.8年, 153名)を追って遺伝子多型性の関与についての検討を行った．今回検討したいずれの遺伝子多型も，DCM と正常対照群の間で遺伝子型と allele 頻度に有意差を認めなかった．診断時の NYHA, LVDd, %FS,

LVEF においても各遺伝子多型との有意な相関は見出せなかったが，CYP11B2, ETAR, AGT 各遺伝子の多型は重症度との間に，一方，ACE, CYP11B2, ETAR 各遺伝子の多型は心室リモデリングとの間に有意な相関がみられた．

【目的】

拡張型心筋症(DCM)症例の約 20~30% が家族歴を有することから，DCM の発症に遺伝的素因の関与が考えられ，これまで，アクチン，デスミンなどの遺伝子変異が一部の DCM において，その発症の原因となることが明らかになった．一方，DCM の発症における遺伝子多型性の関与についても，多々報告されてきたが，未だ一致した見解はなく，また日本人における検討の報告も少ないのが現状である．今回，我々は心筋症，虚血性心疾患等の病態との関連がこれまでに検討されている renin-angiotensin-aldosterone system, β_1 adrenergic receptor (β_1 AR), endothelin (ET) system および matrix metalloproteinases (MMPs) の遺伝子多型性について，それらと DCM の発症との関連，ならびに重症度，長期経過中のリモデリングの進展，心室性頻拍の発生といった表現型に及ぼす影響について検討した．

【方法】

1995年6月から1999年2月にかけて神戸大学

表 1A Characteristics of Cases and Controls

	Cases	Controls	p
n	183	183	n. s.
Age (Years)	51.7±0.9	51.2±1.1	n. s.
Sex (%Male)	78	78	

表 1B The Characteristics of DCM cases

NYHA class	(mm)	2.1±0.1
LVDd	(%)(mL/m ²)	63.6±0.5
%FS	(%)	16.6±0.4
LVEDVI		142.4±3.2
LVEF		34.1±0.9

mean±SEM

医学部付属病院および兵庫県立姫路循環器病センターに入院した DCM 患者183名および年齢、性別を一致させた、企業健診にて健常と判定された正常対照群183名を対象として(表 1A)、各遺伝子型および allele 頻度を従来報告された方法に準じて決定し、発症との関連を検討した。検討した遺伝子多型は、angiotensin-I converting enzyme (ACE) gene I/D, angiotensinogen (AGT) gene T174M と M235T, angiotensin-II type I receptor gene A-153G と A+39C, aldosterone synthase gene CYP11B2 T-334C, β_1 AR gene R389G, ET receptor type A (ETAR) gene C+1363T, MMP 3 5A/6A および MMP 9 C-1562T の計 7 遺伝子 9 遺伝子多型である。今回は、遺伝子型、allele 頻度の両者でともに有意差を示したものを発症と有意な関連があるものと判定した。DCM 患者に関しては、上記 9 遺伝子多型と診断時の NYHA 心機能分類重症度、心エコー指標(LVDd, %FS), 左室造影指標(LVEDVI, LVEF), ホルター心電図(心拍数100/分以上の心室性期外収縮 3 連発以上と定義した心室性頻拍 VT の発生の有無)の結果の関連について検討した(表 1B)。さらに、心エコーに関しては、フォローアップ時の LVDd および %FS から診断時の LVDd および %FS を引いた値を Δ LVDd および Δ %FS とし、比較検討することにより、長期経過中(平均観察期間6.6±0.8年)の遺伝子多型性の心室リモデリングへの関与について153名で検討を加えた(表 2)。

結果は、平均値±標準誤差で表記した。統計処理は、遺伝子型、allele 頻度、性別および NYHA 心機能分類重症度の 2 群間の比較については χ^2 乗検定を、年齢、LVDd などの 2 群間の比較については Student unpaired t 検定を、3 群間の比較は、ANOVA を用いて行い、いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

今回検討した遺伝子多型で、DCM 患者群と正常対照群の間で遺伝子型と allele 頻度の両者に有意差を認めたものはなく、発症との関連は見出せなかった(表 3, 4)。

診断時の NYHA, LVDd, %FS および LVEF においても各遺伝子多型との有意な相関は見出せなかったが、表 5 に示した通り、CYP11B2 T-334C 多型の C allele 頻度 $f(c)$ は、LVEDVI のより大きい群(LVEDVI > 160ml/m²; $f(C) = 0.42$)で有意に高く(vs LVEDVI < 160ml/m²; $f(C) = 0.28$, $p = 0.004$), ETAR C+1363T 多型の C allele 頻度 $f(C)$ は、LVEDVI のより大きい群(LVEDVI > 160ml/m²; $f(C) = 0.72$)で有意に高かった(vs LVEDVI < 160ml/m²; $f(C) = 0.61$, $p < 0.05$)。また、AGT T174M 多型の M174 頻度 $f(M)$ が VT 発生群でより多く(VT + vs -; $f(M) = 0.12$ vs 0.03 , $p = 0.01$), β_1 AR R389G 多型の R389 頻度 $f(R)$ が VT 発生群でより多かった(VT + vs -; $0.66/0.54$, $p = 0.001$)。長期経過に及ぼす影響に関する検討(表 6)では、 Δ LVDd が、CYP11B2 T-334C 多型の CC 遺伝子型(-9.7 ± 2.3 mm)で、TC (-4.7 ± 1.0 mm, $p < 0.05$)と TT (-4.1 ± 0.9 mm, $p < 0.03$)に比して有意に大きく、ETAR C+1363T 多型の TT(-0.2 ± 2.4 mm)で、CC (-5.4 ± 1.1 mm)に比して有意に大きかった($p < 0.05$)。 Δ %FS に関しては、ACE I/D 多型の II ($9.3 \pm 1.4\%$)が DD ($3.8 \pm 2.1\%$)に比して有意に大きかった($p < 0.05$)。経過中に投与された利尿剤、ジギタリス、ACE 阻害薬、 β 遮断薬の内訳(投与率)は、各遺伝子型の間で有意差は認めなかった。

【考察】

ACE I/D 多型や ETAR C+1363T 多型との

表2 The Polymorphisms and the Severity of DCM at Diagnosis

LVEDV	mL/m ² (n)	<140 (99)	140≤ (84)	p value
CYP11B2 T-344C : f(C)		0.28	0.42	0.004
TT/TC/CC : n		52/39/8	28/41/15	0.02
(%)		(53)(39)(8)	(33)(49)(18)	
ETAR C+1363T : f(T)		0.39	37/21/8	<0.05
CC/CT/TT : n		22/42/7	(56)(32)(12)	0.004
(%)		(31)(59)(10)		

VT	+/- (n)	+ (96)	- (48)	p value
AGT T174M : f(M)		0.12	0.03	0.01
TT/TM/MM : n		74/20/2	45/3/0	<0.05
(%)		(77)(21)(2)	(94)(6)(0)	
β1AR R389G : f(G)		0.34	0.46	0.001
RR/RG/GG : n		57/28/9	12/18/9	0.005
(%)		(61)(30)(9)	(31)(46)(23)	

表3 The Polymorphisms and the Risk of DCM (1)

	Genotypes			p	Allele frequency	
	n (%)	n (%)	n (%)		f (N)	p
ACE I/D	DD	ID	II	n.s.	f (D)	n.s.
Cases	26(14.2)	103(56.3)	54(29.5)		0.42	
Controls	23(12.6)	96(52.5)	64(35.0)		0.39	
AGT T174M	TT	TM	MM	n.s.	f (M)	n.s.
Cases	151(82.5)	30(16.4)	2(1.1)		0.09	
Controls	155(84.7)	28(15.3)	0(0)		0.08	
AGT M235T	TT	TM	MM	n.s.	f (M)	n.s.
Cases	127(69.4)	52(28.4)	4(2.2)		0.16	
Controls	125(68.3)	51(27.9)	7(3.8)		0.18	
AGTR A-153T	AA	AG	GG	n.s.	f (G)	0.05
Cases	132(72.1)	50(27.3)	1(0.5)		0.14	
Controls	113(61.7)	70(38.3)	0(0)		0.19	
AGTR A+39C	AA	AC	CC	n.s.	f (C)	n.s.
Cases	143(78.1)	39(21.3)	1(0.5)		0.11	
Controls	156(85.2)	27(14.8)	0(0)		0.07	

有意な関連を示唆する過去の報告もあるが、今回の我々の検討では、いずれの遺伝子多型も DCM 発症とは相関が見られなかった。重症度との関連では、CYP11B2 T-334C 多型と診断時の左室拡張末期容積 LVEDVI との関連が認められた。同多型は、プロモーター領域にあり、C allele 群が T allele 群に比して有意に高い血漿アルドステロンレベルを示すことが報告されている。また、健常人での検討において C

allele 群での食塩摂取量が T allele 群に比して有意に高いことも報告されており、容量負荷がかかりやすいことが C allele 群での左室容積の増大につながっている可能性がある。同多型では、長期経過中の左室拡張末期内径 LVDd の変化(ΔLVDd)との相関も認められた。C allele 群で LVDd の縮小が大きく、利尿剤などの治療に対する反応性の違いを反映している可能性も考えられる。ETAR C+1363T 多型は、こ

表4 The Polymorphisms and the Risk of DCM (2)

	Genotypes			p	Allele frequency	
	n (%)	n (%)	n (%)		f (N)	p
CYP11B2 T-344C	TT	TC	CC		f (C)	
Cases	80(43.7)	80(43.7)	23(12.6)	n.s.	0.34	n.s.
Controls	82(45.6)	77(42.8)	21(11.7)		0.34	
β 1AR R389G	RR	RG	GG		f (G)	
Cases	88(54.0)	54(33.1)	21(12.9)	n.s.	0.29	n.s.
Controls	74(47.1)	71(45.2)	12(7.6)		0.30	
ET _A R C+1363T	CC	CT	TT		f (T)	
Cases	72(46.2)	68(43.6)	16(10.3)	P<0.05	0.32	n.s.
Controls	51(32.9)	89(57.4)	15(9.7)		0.38	
MMP3 5A/6A	6A/6A	5A/6A	5A/5A		f (5A)	
Cases	109(67.7)	47(29.2)	5(3.1)	n.s.	0.18	0.05
Controls	42(59.2)	26(36.6)	3(4.2)		0.23	
MMP9 C-1562T	CC	CT	TT		f (T)	
Cases	119(76.8)	33(21.3)	3(1.9)	n.s.	0.13	n.s.
Controls	51(83.6)	8(13.1)	2(3.3)		0.10	

表5 Characteristics of Patients in Long-Term Follow Up

n=153		Initial	Follow-up
LVDd	(mm)	63.3±0.5	58.4±0.8
%FS	(%)	16.8±0.5	24.0±0.6
Follow up duration		6.6±0.8 years	mean±SEM

表6 Changes in echocardiographic indices over time

Δ LVDd (mm)	Genotypes (n)			p value
CYP11B2 T-344C	TT (72)	TC (65)	CC (16)	
	-4.1±0.9	-4.7±1.0	-9.7±2.3*†	*p<0.03 vs TT †p<0.05 vs TC
ET _A R C+1363T	CC (59)	CT (63)	TT (14)	
	-5.4±1.1 [§]	-5.1±1.0	-0.2±2.4	§p<0.05 vs TT
Δ %FS (%)	Genotypes (n)			p value
ACE I/D	DD (20)	ID (88)	II (45)	
	3.8±2.1	6.8±0.9	9.3±1.4*	*p<0.05 vs DD

れまでに TT 型が CC 型に比して有意に DCM の発症リスクが高いが、心機能との相関はないとする報告があった。今回の検討では、発症との有意な関連はなく、LVDd の大きい、より重症な群で C allele 頻度が多いという結果であ

った。さらに長期経過中に関しては CC 群で LVDd の縮小が小さかった。今回の結果には人種差および対象患者数の違いが反映されている可能性があり、またその機能も明らかでないことから、同多型の機能解析と合わせて、さら

に多数での検討が必要である。

VTとの関連は、AGT T174M多型と β_1 AR R389G多型で認められた。前者は、エクソン2に位置しており、機能は現在のところ不明である。本態性高血圧との関連の報告はあるが、DCMあるいはVT発生との関連を支持する結果の報告はない。後者は、RR群がGG群の3倍のアデニル酸シクラーゼ活性をもつことが知られており、このことは今回のR389頻度がVT発生群でより多かったという結果をもたらした一因と推察される。

ACE I/D多型は、イントロン16に存在する挿入(I)/欠失(D)の多様性によるもので、虚血性心疾患をはじめとする循環器疾患との関連が多数報告されている。DCMに関しても、いくつかの検討があるが、発症や重症度に関して一致した見解はない。今回の我々の検討でも発症と重症度との有意な相関は認めなかったが、 $\Delta\%FS$ すなわち経過中の収縮能の改善度は、II群でDD群に比して有意に大きかった。II群で血漿ACEレベルがより低いこと、また、ACE阻害薬に対する反応性はII群でより高いことが示されており、ここでみられる改善度の違いも、ACE阻害薬を含む治療に対する反応性を反映している可能性がある。

以上、遺伝子多型性とDCMの発症、診断時の重症度および長期経過中の進展過程との関連について検討した。今後の課題としては、さらに多くの患者を対象としての検討、前向きな遺伝子型別の進展過程への影響の検討、遺伝子型別の治療薬の有効性の差異についての検討、遺伝子多型の相加的、相乗的作用の評価といったことが挙げられる。

【結 論】

今回検討したいずれの遺伝子多型もDCMの発症との相関は見出せなかった。一方、CYP11B2, ETAR, AGT各遺伝子の多型は重症度との間に、ACE, CYP11B2, ETAR各遺伝子の多型は心室リモデリング進展との間には有意な相関がみられた。しかし、それらの機序については不明な点が多く、さらなる検討が必要と考えられる。

【参考文献】

- 1) Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ *et al.* The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992; 326: 77-82.
- 2) Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katsu HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 186-94.
- 3) Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-2.
- 4) Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA *et al.* Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 100: 461-4.
- 5) Tiret L, Mallet C, Poirier O, *et al.* Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy. The CARDIGENE Study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 29-35.
- 6) White PC, Slusker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 1995; 21: 437-42.
- 7) Reynolds MV, Bristow MR, Bush EW, *et al.* Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-5.
- 8) Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1343-1346.
- 9) Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, *et*

- al.* Association between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass, and function. *Circulation* 1998; 97: 569-575.
- 10) Charron P, Tesson F, Poirier O, *et al.* Identification of a genetic risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy. Involvement of a polymorphism in the endothelin receptor type A gene. CARDIGENE group. *Eur Heart J* 1999; 20: 1587-91.

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 —

早川 健司 竹村 元三 香田 雅彦
川瀬 幸典 丸山 留美 藤原 久義

岐阜大学医学部第二内科

藤原 兌子

京都女子大学家政学部

【研究要旨】

In vivo において成人心筋細胞のアポトーシスの超微形態はいまだ確立されていない。心筋細胞は構造的にも機能的にもきわめて特徴的の分化を呈する細胞であるので、そのアポトーシス像も心筋細胞に特異的である可能性がある。今回、Wister rat 8 週令を用いて心臓に対して直接 soluble Fas ligand を筋肉内注射する方法を試みた。TUNEL 法によって高濃度 Fas 刺激 (soluble Fas ligand, 5 μ g/ml) 6 時間後より心筋細胞にアポトーシスが急激に起こり 12 時間後でピークとなり 48 時間後にはアポトーシス心筋細胞は完全に消失していた。高濃度 Fas 刺激群では DNA ラダー、caspase 3 の活性も伴っていたが vehicle 投与群、低濃度 Fas 刺激群では認めなかった。また高濃度 Fas 刺激による心筋細胞アポトーシスは pancaspase inhibitor によりほぼ抑制されていた。電子顕微鏡的検索ではアポトーシスに特徴的な超微形態である核クロマチンの凝集、核の断片化、細胞質の濃縮を伴った心筋細胞が見出された。一方、本アポトーシスでは早期段階での細胞膜の破綻、ドーナツ状の核クロマチンの凝集、ミトコンドリア濃縮、細胞質への脂肪滴出現など他細胞のアポトーシスにない特徴もみられた。本モデルにより in vivo における成人心筋細胞の超微形態の特異性が確かめられた。

【研究目的】

高濃度 soluble Fas Ligand を直接筋肉内に注射する事により全身投与でみられた肝細胞に

対する影響を避け^{1,2)}、in vivo 成人心筋細胞にアポトーシスの誘導を試みる。またこのモデルにより in vivo 成人心筋細胞の超微形態の存在の有無、及びその特徴を検討する。

【研究方法】

Wister rat 8 週令を麻酔下にて挿管、人工呼吸器管理を行い、開胸後、soluble Fas ligand の筋肉内直接注射を左室前壁に行い 1-, 3-, 6-, 12-, 24-, 48 時間後に屠殺した。投与薬によって以下の 5 群にわけた (vehicle (Group C), soluble Fas ligand 0.5 μ g/mL (Group F0.5), 2 μ g/mL (Group F2), 5 μ g/mL (Group F5), Fas 5 μ g/mL+caspase 阻害薬 (Boc-Asp (OMe)-fmk) 200 μ g/mL (Group BAF), (n=5, each))。屠殺後心臓は迅速に摘出し、(1)10% ホルマリン固定、(2)凍結保存、あるいは(3)2.5% グルタル・アルデヒド固定を行った。すなわち(1)10% ホルマリン固定標本は TUNEL、TUNEL 及び alpha sarcomeric actin の二重染色、Taq polymerase in situ ligation assay、(2)凍結保存標本は DNA ラダー、caspase-3 colorimetric protease assay、(3)2.5% グルタル・アルデヒド固定標本は電子顕微鏡にて分析した。

【結果】

F5 では注射野に TUNEL 陽性心筋細胞、DNA ラダーが認められた。apoptotic index は 12 時間で peak (2.0 \pm 0.02%) を認め、以後速やかに減少し 24 時間後 0.1 \pm 0.01%、さらに 48 時間後 0% となった (図 1)。しかしながら

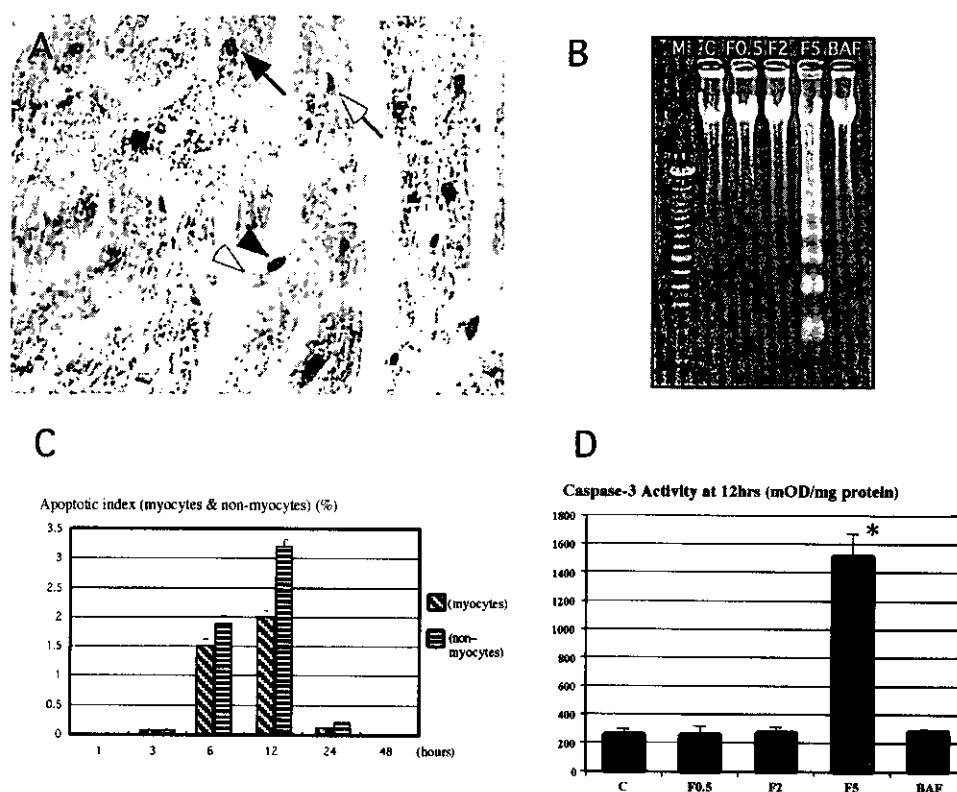


図1 (A) TUNEL 及び alpha sarcomeric actin の二重染色(×400). black arrow; TUNEL 陽性心筋細胞, black arrowhead; TUNEL 陽性間質細胞, white arrow; TUNEL 陰性心筋細胞, white arrowhead; TUNEL 陰性間質細胞が認められる。
 (B) 処置後12時間における DNA gel electrophoresis. F5 のみ clear ladder pattern が認められる. レーンMは 100 bp marker を示す。
 (C) F5 における apoptotic index (心筋細胞及び間質細胞)の経時的变化. 処置後 6 時間より急速にアポトーシスが起り, 12時間でピークとなり 48 時間で完全にアポトーシス細胞は消失している。
 (D) 処置後12時間における caspase-3 activity. F5 のみ活性が有意に上昇している。

V, F0.5, F2, BAF では TUNEL 陽性心筋細胞は極わずかであり (<0.05%), DNA ラダーも認められなかった. また F5 では caspase 3 の活性の上昇 ($1083 \pm 156 \text{ mOD/mg}$, $p < 0.01$) を認めたが, V, F0.5, F2, BAF では認めなかった(図1).

F5 では電子顕微鏡(図2)にて心筋細胞の細胞質の濃縮, 核クロマチンの凝集, 核の断片化, アポトーシス小体を捉えた. これらは他細胞にみられるアポトーシスの超微形態の特徴と一致するが, 本モデルでは 1) 高頻度の細胞膜の破綻, 2) ドーナツ状の核クロマチンの凝集, 3) ミトコンドリアの凝縮およびクリスタのねじれ, 4) 脂肪滴様構造の出現, 5) 筋原繊維の配列の乱れなど心筋細胞特有のアポトーシスの

特徴が見出された.

【考 察】

最近マウスに対して抗 Fas 抗体全身投与により心筋細胞にアポトーシスを誘導する研究が試みられたが, 肝細胞アポトーシスによる劇症肝炎が先行し, 心筋細胞にアポトーシスは誘導できないと報告された. 我々は心筋細胞の Fas 刺激に対する反応の閾値が他細胞より高いため, 通常濃度の Fas 刺激では心筋細胞にアポトーシスを誘導できないと仮定し, 通常全身投与の約10倍濃度の Fas 刺激を心筋に直接注入し, 死に到らしめることなく, 心臓にアポトーシスを誘導する事に成功した. 病的心において Fas の過剰発現³⁾, Bax/Bcl-2 ratio の増加^{4,5)}, cytochrome c のミトコンドリアからの放出⁶⁾,

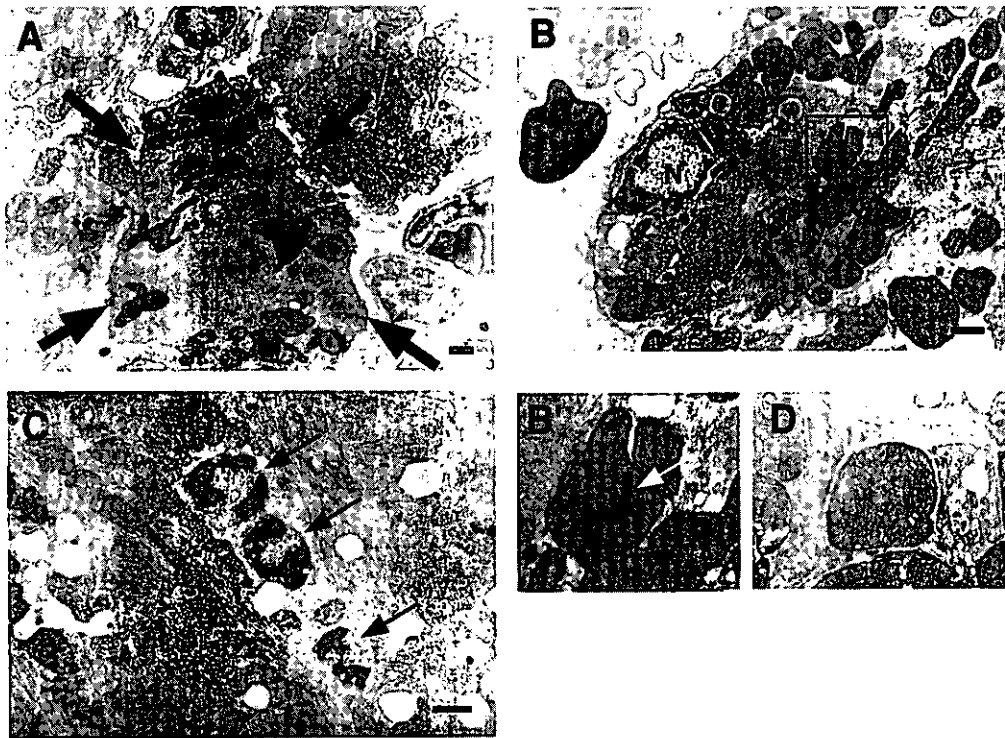


図2 Group F5における電子顕微鏡像。barは1 μ mを示す。

- (A) 細胞質の凝縮を起こした心筋細胞が認められる。筋原繊維の配列の乱れ、電子密度の増加を伴ったミトコンドリア、たくさんの脂肪滴が心筋細胞内に認められる。
- (B) 核クロマチンがドーナツ状に凝集しているアポトーシス心筋細胞。細胞質の凝縮、ミトコンドリアの電子密度の増加も伴っている。
- (B') (B)のミトコンドリアの強拡大像。ミトコンドリアの電子密度の増加、クリスタのねじれ(white arrow)が示されている。
- (C) 心筋細胞核の断片化を示す。
- (D) 心筋細胞のアポトーシス小体を示す。

DNase I の upregulation⁷⁾、DNA 断片化など多数の間接的なアポトーシスの証拠が呈示されるにも関わらず、In vivo 成人心筋細胞において、その典型的な超微形態が捉えられないのは奇妙な事である。Narula らは最近このような in vivo 成人心筋細胞の不完全なアポトーシスに対して“aborted apoptosis”なるコンセプトを提案した。このコンセプトによれば成人心筋細胞に典型的な超微形態が存在しないのは、アポトーシスの上流シグナルは活性されるにも関わらず核変化のような最終段階に移行する能力を欠くためだとしている⁸⁾。このような仮説に対して、今回我々は新たなモデルを用いて(少なくとも Fas 刺激において) in vivo 成人心筋細胞が超微形態を伴ったアポトーシスの最終段階まで到達する事を証明した。その超微形態は電子密度の増加を伴う細胞質の濃縮、核クロマ

チンの凝集、核の断片化など他の細胞で認められる古典的なアポトーシスの超微形態の特徴を備えている一方、構造的にも機能的にも高度に分化した心筋細胞に特有の形態的特徴も見出された⁹⁾。典型的なアポトーシスの超微形態像は豊富に認められるが、ある限られた時間のみ(6-12時間)に限定される。この時間帯は TUNEL, in situ ligation で確認される DNA 断片化が現れる時間帯と一致する。アポトーシス細胞は急速に消失し、48時間後には完全に消失する。今まで病的心の生検標本において心筋細胞のアポトーシスの超微形態が捉えられなかったのは以上のような急激なアポトーシス細胞の消失が原因の一つかも知れない。

【結論】

In Vivo における成人心筋細胞のアポトーシスのクリアランスは早く、かつその超微形態は

アポトーシスとして典型的であると同時に成人心筋細胞に特異的な特徴も有することが見出された。

【参考文献】

- 1) Wollert KC, Heineke J, Westermann J, Ludde M, Fiedler B, Zierhut W, Laurent D, Bauer MK, Schulze-Osthoff K, Drexler H. The cardiac Fas (Apo-1/CD 95) receptor/Fas ligand system. Relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation*. 2000; 101:1172-1178.
- 2) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 1993; 364: 806-809.
- 3) Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptosis and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996; 74: 86-107.
- 4) Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996; 94:1504-1512.
- 5) Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997; 336: 1131-41.
- 6) Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Bello BD, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 8144-8149.
- 7) Yao M, Keogh A, Spratt P, dos Remedios CG, Kiessling PC. Elevated DNase I levels in human idiopathic dilated cardiomyopathy: an indicator of apoptosis? *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28: 95-101.
- 8) Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Apoptosis and cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2000; 15: 183-188.
- 9) Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146: 3-15.

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

丸山留美 竹村元三 早川健司
香田雅彦 川瀬幸典 宇野嘉弘
湊口信也 藤原久義

岐阜大学医学部第二内科

藤原 兌子
京都女子大学家政学

【研究要旨】

培養ラット成人心筋細胞において Fas 刺激によりアポトーシスを誘導し、その動態ならびに超微形態変化をそれぞれビデオ顕微鏡による48時間連続撮影と電子顕微鏡観察により明らかにした。正常心筋細胞(rod-shape)に Fas 刺激(soluble Fas ligand $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ +actinomycin D $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$)を行ったところ、60%の細胞(Type A)では平均16時間後に遅い beating ($17\pm 3/\text{分}$)が始まり、徐々に速度を増しながら($35\pm 7/\text{分}$)、長軸方向に縮小化がおこった。うち48%の細胞(Type A1とA2)は完全な球形に縮小、beatingは消失し、buddingの出現がみられた。そのうち13%の細胞(Type A1)ではさらにアポトーシス小体形成に至ったが、35%の細胞(Type A2)は buddingの段階でとどまった。

12%(Type A3)の細胞は長軸方向への縮小後、細胞膜が破綻し beatingも消失した。その他12%の細胞は beatingを伴わず早期に細胞膜破綻がおこり oncosis像を呈し、残りの28%の細胞は最後まで beatingを伴わず形態変化がみられなかった。beating開始は心筋細胞の形態変化に先行し、かつその頻度はその後の形態変化に関連することが明らかになった。本研究により成人心筋細胞においてはじめて典型的なアポトーシスの超微形態が証明された。また、成人心筋細胞アポトーシスでは beating

が先行し、その頻度はアポトーシスの過程に重要な役割を果たしていると考えられた。

【研究目的】

一般にアポトーシスに陥る際、細胞は短時間にダイナミックな形態変化の過程を経ることが知られているが、最終分化細胞である成人心筋細胞におけるアポトーシスの過程はまだわかっていない。心筋細胞は豊富な収縮蛋白を有し収縮、弛緩を繰り返すので、このような動態の特徴がアポトーシスの過程にいかに関連するかは大変興味深いと思われる。そこで本研究では、成人心筋細胞のアポトーシスの全過程の動態的特徴をビデオ顕微鏡を用いて明らかにし、さらにアポトーシスの超微形態的特徴を観察した。

【研究方法】

7週齢の成人SDラットより単離した心室心筋細胞を常法に従って無血清培地で培養し¹⁻³⁾、actinomycin D (Wako, Osaka, Japan: $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下で soluble Fas ligand (Oncogene, Boston, MA, USA: $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$)による Fas 刺激を行った。DNAゲル電気泳動法⁴⁾ならびに TUNEL法で DNA断片化を検出し、透過型ならびに走査型電子顕微鏡により超微形態を観察した。さらにビデオ顕微鏡を用いた48時間連続撮影で正常心筋細胞の Fas 刺激後の動態を観察した。

【結果】

Fas 刺激により細胞生存率は48時間後で約

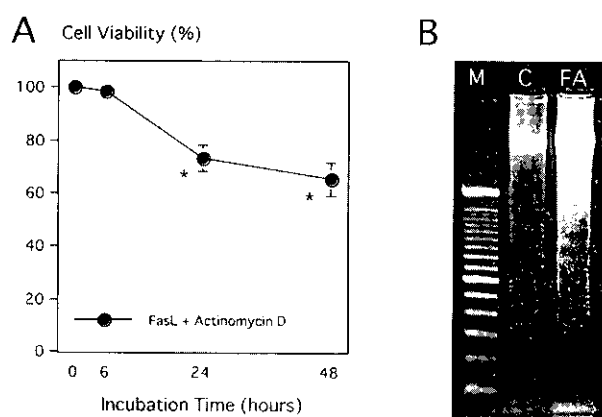


図1 A 細胞生存率(%). Fas 刺激により生存率は減少した。
 図1 B 刺激24時間後の DNA ゲル電気泳動。
 M: 100bp ladder マーカー,
 C: control,
 FA: Fas ligand + Actinomycin D,
 FA のみ ladder 像がみられた。

65% に減少した(図1A). 正常心筋細胞(rod-shape: n=60)の Fas 刺激後のビデオ顕微鏡による観察では, n=36 (60%)の細胞で平均16時間後に比較的遅い beating (17±3/分)が始まった. その後, より速い beating (35±7/分)を伴いながら長軸方向に縮小化がおこり長方形, 棍棒状, あるいは骨状に変形した(図2). そのうち n=29 (Type A1 と A2)の細胞はさらに平均3時間後平滑な表面を保ったまま球形に完全縮小した. その後 beating は消滅し, 0.6±0.2時間後 budding の出現がみられた. n=8 (Type A1: 13%)の細胞ではさらに10±4時間後アポトーシス小体形成に至ったが, n=21 (Type A2: 35%)は budding の段階でとどまった. n=7 (Type A3: 12%)の細胞は長軸方向へ縮小した後, 細胞膜が破綻し beating も消失した. Beating 頻度の最大値は Type A1 で 72±26/分と最も速く, 次いで Type A2 で 29±5/分, Type A3 で 10±2/分の順であった. すなわち beating 開始は心筋細胞の形態変化に先行し, かつその頻度はその後の形態変化に関連していた. その他 n=7 (12%)の細胞は beating を伴わず oncosis 像を呈し, 残りの n=17 (28%)の細胞は最後まで beating を伴わず形態変化もみられなかった(図3). 刺激後24時間で DNA ladder 像がみられ(図1B), TUNEL 陽性細胞率は0, 6時間では0% だった

が, 24時間では44%, 48時間では52%と有意に増加した. また電顕観察では典型的なアポトーシスの超微形態が認められた(図4). すなわち培養成人心筋細胞のアポトーシス超微形態は他の cell type と同様, 細胞質の縮小, 核クロマチンの辺縁化/凝集, 核の断片化, 細胞表面の budding もしくは blebbing の出現, アポトーシス小体形成などがあり⁵⁻⁹⁾, ほかにミトコンドリアの変化やlipid様構造物の沈着などがみられた^{10,11)}. 特にミトコンドリアの変化は特徴的であり, 電子密度の増加ならびにクリスタのねじれが観察された.

【考察】

本研究では Fas 刺激により培養成人心筋細胞に典型的アポトーシスが誘導されることを示した. その超微形態はアポトーシスとして典型的である一方, 成人心筋細胞に特有な所見(すなわち特徴的なミトコンドリア変化, lipid 様構造物)もみられた. ビデオ顕微鏡による観察で, 48時間変化のなかった細胞やオンコース細胞では beating が生じなかったのに対し, アポトーシス細胞では正常な rod-shape の状態で最初の beating がおこり, その後球形に完全縮小するまで beating が続いた. これは beating がアポトーシスの過程における初発の, かつ重要なサインであることを示唆する. Beating の発生機序としてはアポトーシス刺激に続発する細胞内 Ca イオンの増加が関与している可能性が考えられる¹²⁻¹⁵⁾.

アポトーシスの動態過程は形態変化の遂行の程度により3つのタイプに分類された. Type A1 はアポトーシス小体形成に至ったもの, Type A2 は budding 形成に至るがその後アポトーシス小体を形成せず secondary necrosis に陥ったもの, Type A3 は細胞両端のわずかな変形から secondary necrosis に陥ったものである. Type A2, A3 は A1 と異なりアポトーシスの過程から途中で脱落したとみられる.

成人心筋細胞のアポトーシスでは形態変化に先行して beating がみられ, さらに beating の頻度はアポトーシスタイプにより有意差がみられ Type A1 > A2 > A3 の順であった. アポトーシスはエネルギー依存性であり¹⁶⁾, いずれも

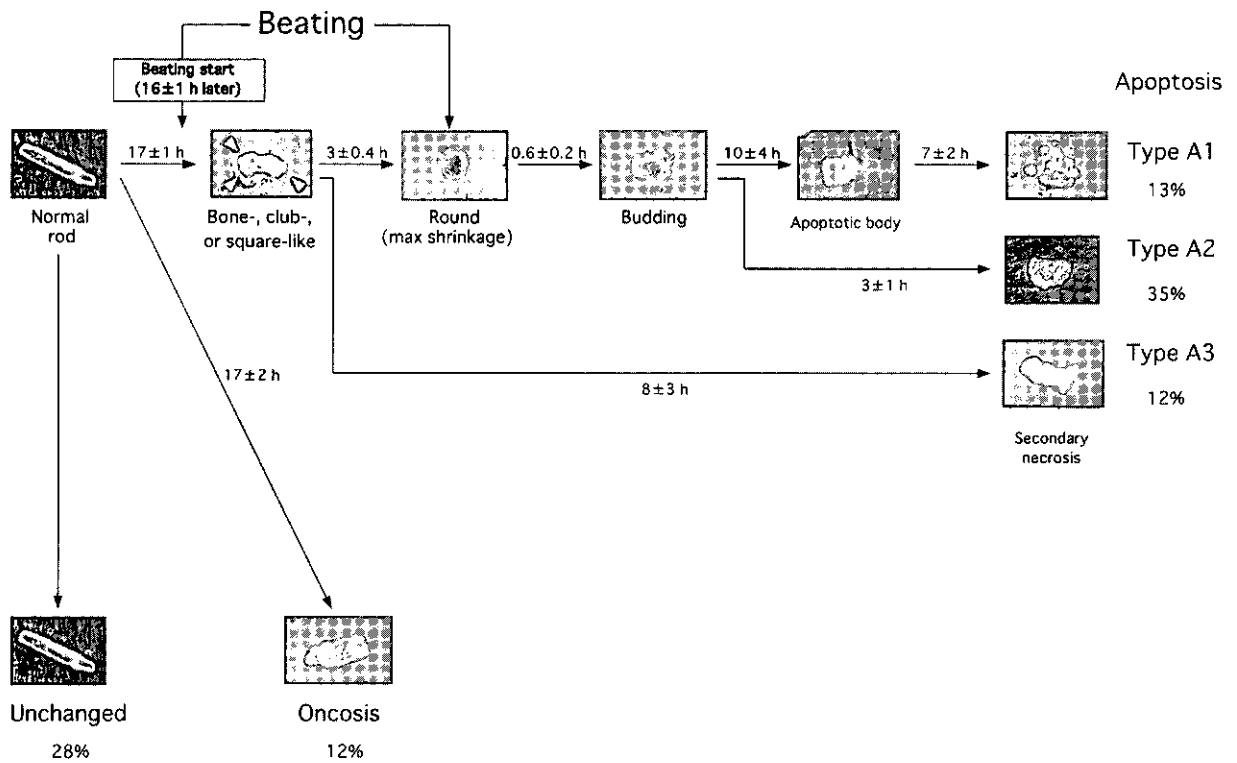


図2 培養成人心筋細胞アポトーシスの全過程。形態変化の違いによりアポトーシス細胞を3つのタイプに分類した。Type A1はアポトーシス小体形成まで遂行した細胞, Type A2は budding まで至ったもののアポトーシス小体を形成しなかった細胞, Type A3は細胞骨格の変形後 secondary necrosis に陥った細胞である。

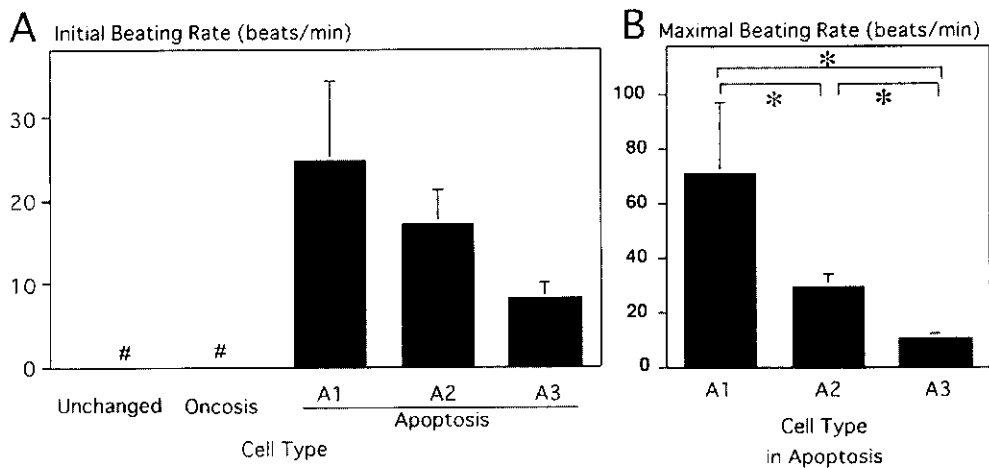


図3 タイプ別の Initial Beating Rate (A) および Maximal Beating Rate (B)。アポトーシス細胞においていずれも Type A1 の beating rate が最も速く、次いで A2, A3 の順であった。unchanged および oncosis の細胞では beating はみられなかった。

細胞がもつエネルギー状態に影響される。それゆえ多くのエネルギーをもつ細胞は速い beating をおこすことができ、細胞の縮小からアポトーシス小体形成までの間細胞膜を保ち最終段階まで遂行できるのではないかと推測された

(Type A1)。しかしエネルギーをあまりもたない細胞は速い beating をおこすことができず、またアポトーシス初期に細胞膜にダメージを受けるため途中で secondary necrosis に陥るものと考えられた (Type A2, A3)。

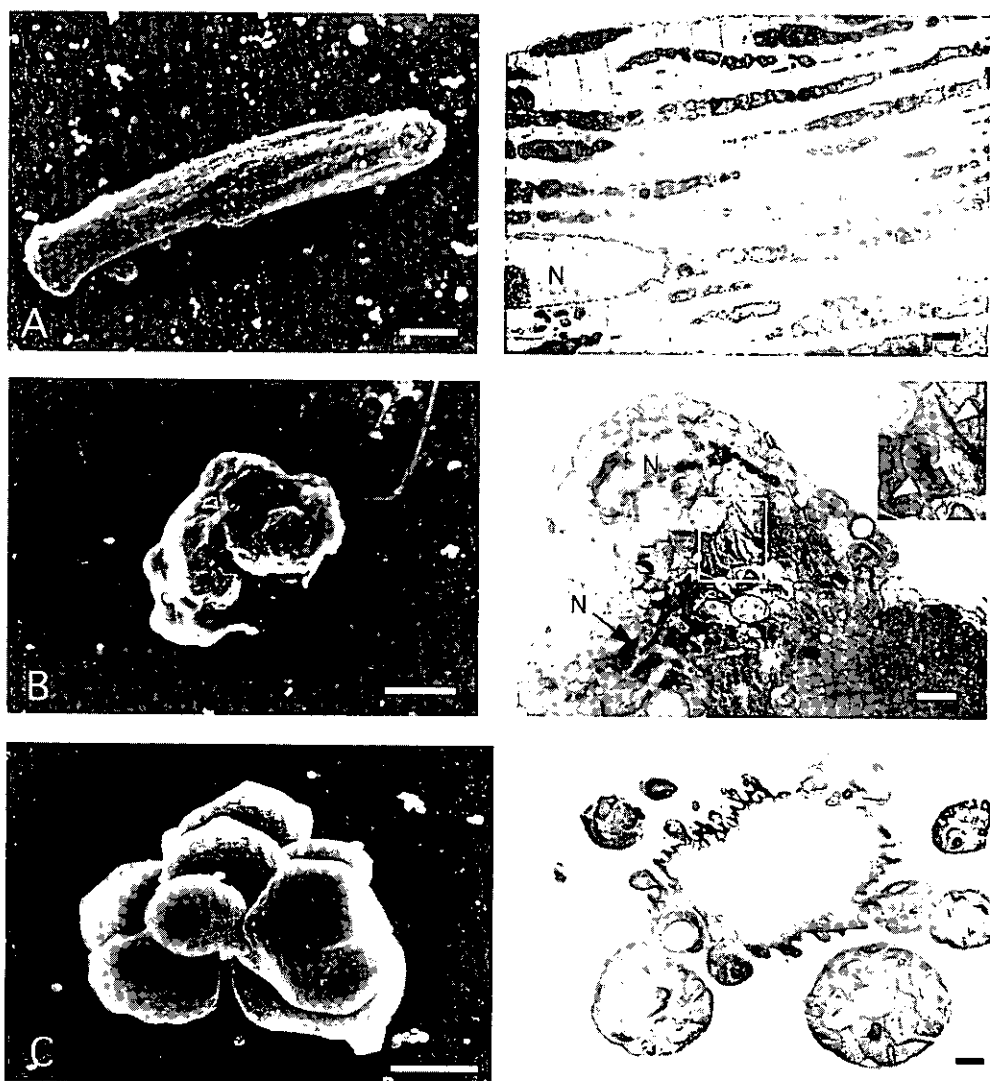


図4 走査型(左)および透過型(右)電子顕微鏡像。

Barは $10\mu\text{m}$ (左), $1\mu\text{m}$ (右)を示す。

上段A: 正常な rod-shape 細胞。

正常核(N), はっきりとした筋原線維の配列がみられる。

中段B: 細胞表面が平滑なまま maximal shrinkage した細胞。

ドーナツ状に辺縁化/凝集した核クロマチン, 断片化した核(N)や凝集したミトコンドリア(拡大部分矢印)がみられる。

下段C: 細胞が断片化したアポトシス小体。

下段C: アポトシス小体 Bars: $10\mu\text{m}$ (左), $1\mu\text{m}$ (右)

Nは核, 拡大部分矢印は変化したミトコンドリアを示す。

【結 論】

本研究でははじめて最終分化細胞である成人心筋細胞においても DNA 断片化ならびに超微形態を伴う典型的なアポトーシスが誘導されることを証明した。さらに beating とその頻度は In vitro の成人心筋細胞のアポトーシスの過程において重要な役割を果たしていると考えられた。

【参考文献】

- 1) Piper HM, Probst I, Schwartz P, et al. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1982; 14: 397-412.
- 2) Frammer BB, Mancina M, Williams ES, et al. Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat heart: Review of the literature and description of a

- method. *Life Sci.* 1983; 33: 1-18.
- 3) Khalid MA, Ashraf M. Direct detection of endogenous hydroxyl radical production in cultured adult cardiomyocytes during anoxia and reoxygenation. Is hydroxyl radical really the most damaging radical species? *Circ Res.* 1993; 72: 725-736.
 - 4) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990; 136: 593-608.
 - 5) Evan GI, Wyllie A, Gilbert C, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* 1992; 69: 119-125.
 - 6) Mills JC, Wang S, Erecinska M, et al. Use of cultured neurons and neuronal cell lines to study morphological, biochemical, and molecular changes occurring in cell death. *Methods Cell Biol.* 1995; 46: 217-242.
 - 7) Morris VL, Schmidt EE, MacDonald IC, et al. Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis.* 1997; 17: 281-296.
 - 8) Chang SH, Phelps PC, Berezsky IK, et al. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells. *Am J Pathol.* 2000; 156: 637-649.
 - 9) Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146: 3-15.
 - 10) Takemura G, Kato S, Aoyama T, et al. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *J Pathol.* 2000; (in press)
 - 11) Ganote CE, Vander Heide RS. Irreversible injury of isolated adult rat myocytes. Osmotic fragility during metabolic inhibition. *Am J Pathol.* 1988; 132: 212-222.
 - 12) Oshimi Y, Miyazaki S. Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated Ca²⁺ level. *J Immunol.* 1995; 154: 599-609.
 - 13) Khan AA, Soloski MJ, Sharp AH, et al. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Science.* 1996; 273: 503-507.
 - 14) Felzen B, Shilkrut M, Less H, et al. Fas (CD95/Apo-1)-mediated damage to ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes from perforin-deficient mice. A major role for inositol 1,4,5-triphosphate. *Circ Res.* 1998; 82: 438-450.
 - 15) Thandroyen FT, Morris AC, Hagler HK, et al. Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circ Res.* 1991; 69: 810-819.
 - 16) Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, et al. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 1996; 378: 107-110.