

図1 心筋ミオシンの分子構造とT細胞エピトープ(心筋炎惹起ペプチド)の存在部位

出した後、増殖用培養液(complete medium + 10% Con A 培養上清 + 10% ウマ血清)内で培養を継続した。培養細胞が静止期に入った5-7日後、各抗原と照射(5000rad)済自家胸腺細胞とともに培養T細胞を再刺激用培養液内で再刺激した。その後は同様に細胞増殖をはかり、これらの過程を必要細胞数が得られるまで繰り返した。

抗原特異性試験 96穴U底プレートを用い、 3×10^4 /well のT細胞、 1×10^7 /well の照射済自家胸腺細胞、および抗原として前述の whole myosin, KO1, CM2 (細胞樹立時と同最終濃度)および PPD (10 μ g/ml), Con A (2.5 μ g/ml)を 200 μ l/well の再刺激用培養液内で48時間反応させた。0.5 μ Ci/well の ³H-サイミジンを加え18時間後に回収し放射活性を測定した。

細胞移入 再刺激直後のT細胞 $5 \times 10^6 - 3 \times 10^7$ /匹をナイーブな5週令 Lewis ラットの尾静脈より静注投与し、21日後に屠殺した。屠殺後心臓は肉眼的観察を行なった後、ホルマリン固定させ、ヘマトキシリン・エオジン染色にて顕微鏡学的検索を行なった。

RT-PCR ISOGEN (Nippongene)を用いてTリンパ球細胞株からRNAを抽出し、oligo dT と SuperScript reverse transcriptase

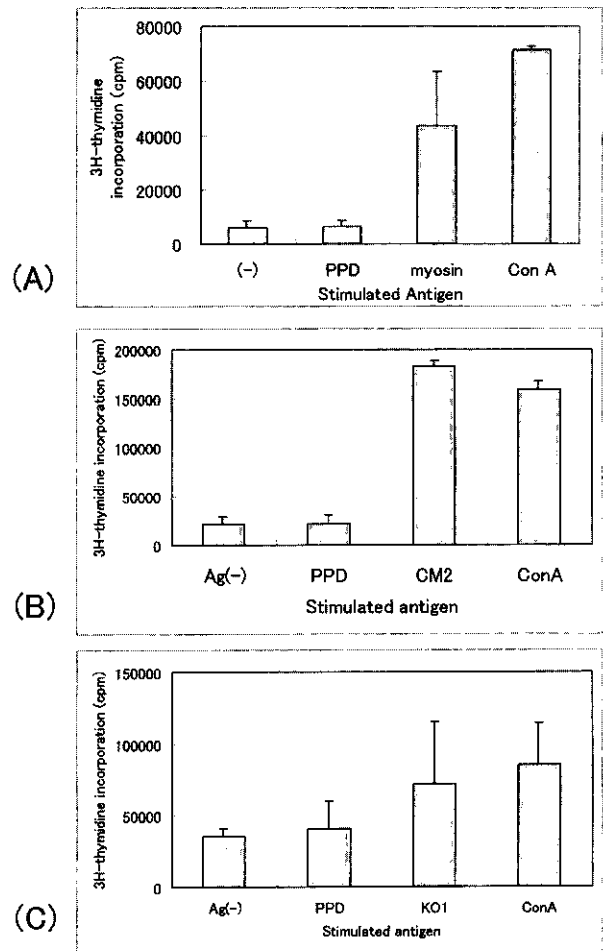


図2 各細胞株の抗原特異性試験
 (A) whole myosin 刺激下細胞株 (ICCL4)
 (B) CM2 刺激下細胞株 (ICCL4)
 (C) KO1 刺激下細胞株 (NKKL1)

表 1

細胞株名	刺激抗原	移入細胞数 (/ラット)	屠 殺 日	心筋炎数 /免疫総数	平均心筋炎 スコア*
TMML4	wholemyosin	5×10^7	21	0/4	0
ICCL3	CM2	5×10^6	21	2/2	2
		1×10^7	21	2/2	3.5
		3×10^7	21	1/1	4
ICCL4	CM2	5×10^6	21	2/2	2.5
		3×10^7	21	1/1	4
		1×10^7	7	2/2	2.5
			14	2/2	3
			21	4/4	2.8
NKKL1	KO1	3×10^7	21	0/3	0
NKKL2	KO1	3×10^7	21	0/2	0

* 心筋炎スコア

0: 炎症巣を認めず; 1: 斑状の炎症巣が1ヶ所のみ; 2: 炎症巣が2ヶ所以上あるが心臓全周の1/3未満; 3: 炎症巣が心臓全周の1/3以上2/3未満; 4: 炎症巣が心臓全周の2/3以上

(GIBCO)を用い、cDNAへ逆転写させた。次にGoldらの報告⁵⁾に基づくT細胞受容体V β 鎖プライマーを用いて、Taq polymerase (TaKaRa)にてPCRを施行した(94°C, 45秒+58°C, 1分+72°C, 1分; 30サイクル)。

【結果と考察】

各抗原刺激下で複数の細胞増殖が認められたが、そのうち抗原特異性試験にて特異性が証明された細胞株はwhole myosinおよびCM2刺激によるものだけであり、KO1特異的細胞株は得られなかった(図2)。KO1能動免疫による心筋炎惹起にはT細胞とB細胞の協調が必要である可能性が指摘されており(河野ら、未発表)、in vitro下でT細胞の抗原認識が困難である何らかの原因が存在することが想定された。次に、これらの細胞移入による心筋炎惹起能を検討したところ、CM2特異的細胞株で容易に心筋炎が惹起されたが、whole myosin特異的細胞株では心筋炎は認められなかった(表1)。今回樹立されたwhole myosin特異的細胞株はCM2およびKO1刺激に反応を示さず(データ未提示)、心筋炎惹起能を有さないミオシン内T細胞エピトープを認識していることが考えられた。CM2特異的細胞株移入による心筋炎は投与7日目にはすでに高度な炎症巣を形成し、少なくとも21日目まで全例に高度な炎症を持続させた。組織所見はwhole myosinの能動免

疫による自己免疫性心筋炎のそれに類似しており、単核球と多核球からなる高度な細胞浸潤と心筋細胞の融解像を認めたが、巨細胞の出現は稀であった(図3)。フローサイトメトリー法による細胞表面抗原の検索ではCD3⁺、CD4⁺、CD8⁻であった。また、ELISA法による培養上清中サイトカイン検索ではIFN- γ の著明な産生を認めたがIL-4産生はなく、以上よりTh1型CD4陽性T細胞と考えられた(データ未提示)。さらにRT-PCR法によりT細胞受容体 β 鎖レパートリを検討したが、実験的アレルギー性脳脊髄炎で見られるようなT細胞レパートリの偏向性は示されなかった(図4)。したがって、T細胞における3分子複合体を介する抗原認識機構の詳細な解析には、今回得られたbulk cultureによる細胞株からのクローニングを今後進めていく必要があると思われる。

【結 論】

心筋炎惹起能を有する心筋ミオシン内エピトープ特異的T細胞株の樹立に成功した。

【参考文献】

- 1) Kodama M, et al.: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clin Immunol Immunopathol 57: 250-262, 1990.

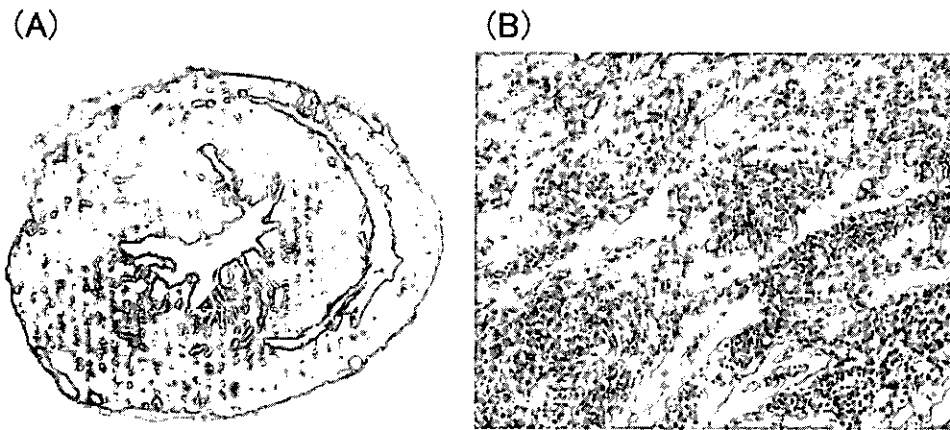


図3 CM2 特異的T細胞株の細胞移入による自己免疫性心筋炎の組織像
(ヘマトキシリン・エオジン染色, (A): ×1; (B): ×200)

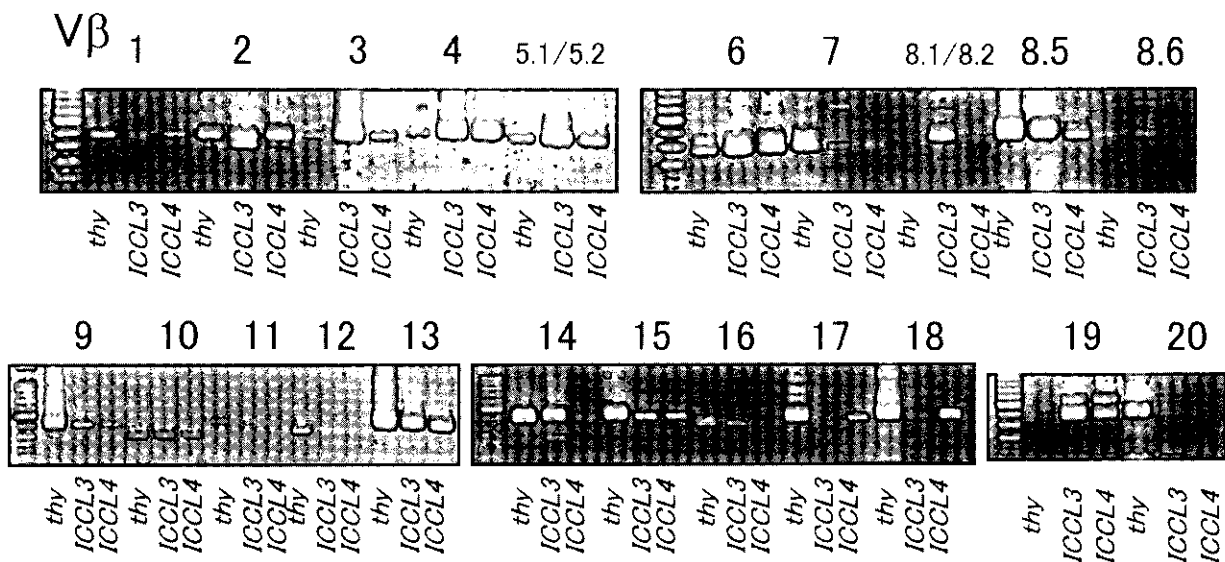


図4 RT-PCR 法によるT細胞受容体β鎖レパートリ
(thy: 自家胸腺細胞; ICCL3, ICCL4: CM2 特異的T細胞株)

- 2) Neu N, et al.: Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* 139: 3630-3636, 1987.
- 3) Kohno K, et al. Advantage of recombinant technology for the identification of cardiac myosin epitope of severe autoimmunemyocarditis in Lewis rats. *Jpn Heart J* 41: 67-77, 2000.
- 4) Wegmann KW, et al. Identification of

- myocardiogenic peptides derived from cardiac myosin capable of inducing experimental allergic myocarditis in Lewis rats. *J Immunol* 153: 892-900, 1994.
- 5) Gold DP, et al.: Characterization of the immune response to a secondary encephalitogenic epitope of basic protein in Lewis rats. *J Immunol* 148: 1712-1717, 1992.

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

酒井 泰彦 諏訪 道博 伊藤 隆英

戸梶 泰伸 北浦 泰

大阪医科大学第3内科

【要旨】

閉塞性肥大型心筋症において、失神などの症状が薬物治療で消失しない11症例にDDDペースメーカーを植え込んだ。植え込み後 prospective に2年間、症状、左室流出路圧較差、心室中隔壁厚などを観察した。失神は全例で1カ月以内に消失し、左室流出路圧較差は植え込み前の平均99mmHgから1週後に21mmHgへと減少、2年後も25mmHgと効果が持続した。また、心室中隔壁厚は術前の平均18.7mmから2年後に16.6mmへ減少傾向を示した。しかし、一部に圧較差の減少が不十分であったり、再び増加する症例もみられた。閉塞性肥大型心筋症で、失神などの症状を有し薬剤治療抵抗性の場合、DDDペーシングは有効な治療法と考えられる。

【目的】

近年、閉塞性肥大型心筋症に対するペースメーカー療法が試みられているが、その適応に関しては未だ議論があり、長期予後は明らかにされていない。そこで、当科で閉塞性肥大型心筋症患者においてペースメーカーを植え込んだ症例を長期追跡し、その慢性効果について検討した。

【対象と方法】

閉塞性肥大型心筋症患者で、失神発作をきたし、薬剤治療で症状が消失しないためDDDペースメーカー植え込み術を受けた連続11症例(表1)。男性7例、女性4例。ペースメーカー植え込み時の年齢は21~69歳(平均54±13歳)。全例に失神発作の既往があり、NYHAの心機能分類は2度~3度。術前の心臓カテテル検査では50~180mmHgの左室流出路圧較差を認め、心エコーにおける心室中隔壁厚は13~

29mmであった。

DDDペースメーカーの植え込みには、右心耳と右室心尖部への経静脈的心内膜電極を用い、ペーシング条件をDDIモードとし、AV delayは左室流出路圧較差が最小となるようドップラー心エコーを用いて設定した。

ペースメーカー植え込み後、症状およびドップラー心エコーにより計測した流出路圧較差、心室中隔壁厚などについて、植え込み1週間後、6カ月後、1年後、2年後に観察し、植え込み前に得られた各所見と比較してペーシングによる効果を検討した。

【結果】

ペースメーカー植え込み後1カ月以内に、全例で失神発作や労作性呼吸困難などの自覚症状が消失した。左室流出路圧較差は、植え込み前の99±56mmHgから1週間後には21±13mmHg ($p<0.003$)、半年後21±14mmHg ($p<0.01$)、1年後23±15mmHg ($p<0.001$)、2年後には25±26mmHg ($p<0.003$)と減少し(図1)、植え込み前に観察された僧帽弁の収縮期前方運動(SAM)も全症例で消失あるいは軽減した。心室中隔壁厚は、植え込み前の18.7±4.5mmから半年後に17.5±4.8mm ($p<0.05$)、1年後で16.0±2.2mm ($p<0.05$)、2年後には16.6±4.5mm ($p<0.1$)へと減少または減少傾向を認めた(図2)。しかし、11例中2例では、ペースメーカー植え込み後も30~40mmHgの左室流出路圧較差が残存し、このうち1例では2年後に圧較差が再び90mmHgに増大した(図3)。

【考察】

1970年前後から、閉塞性肥大型心筋症患者において、右室ペーシングにより左室流出路圧較

表1 対象患者の術前検査成績

症例	年齢	性別	NYHA	RA	PC	LV	Ao	PG	CI
1	51	M	2	4	8	200/13	132/75	68	2.70
2	56	M	2	1	3	200/10	110/85	90	3.65
3	21	M	2	4	10	161/18	106/62	55	2.81
4	58	F	3	3	7	275/7	170/75	105	3.89
5	41	M	2	9	14	170/20	118/70	52	3.60
6	69	F	2	5	12	208/11	164/87	44	3.92
7	52	M	3	0	8	190/18	114/64	76	3.52
8	50	M	2	2	6	305/9	125/82	180	4.24
9	58	F	2	6	15	330/18	180/90	150	2.23
10	66	M	3	2	6	275/4	120/75	155	2.27
11	59	F	2	4	19	230/28	110/70	120	2.02

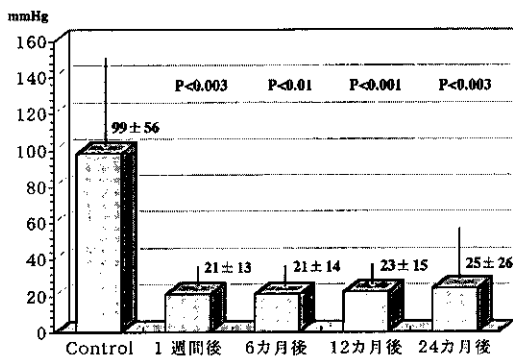


図1 左室流出路圧較差

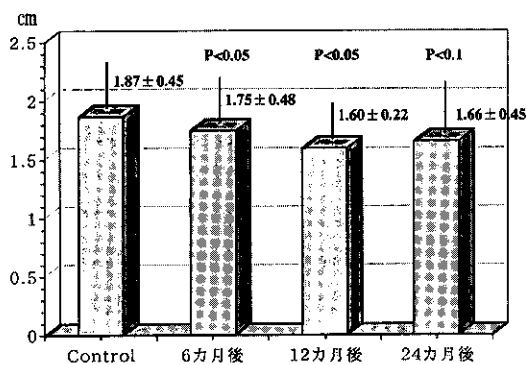


図2 心室中隔壁厚

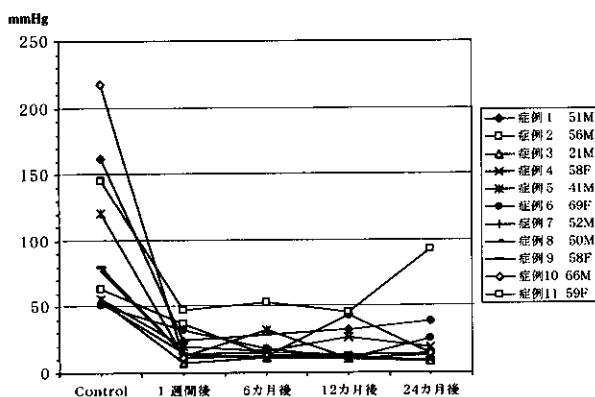


図3 左室流出路圧較差の推移

差が減少することが知られていたが、当時はDDDペースメーカーが無く、これが臨床的治療に応用されることはなかった。1984年に初めて閉塞性肥大型心筋症に対する房室順次ペーシングによる治療が提唱され¹⁾、これ以後、閉塞性肥大型心筋症に対しペースメーカーを植え込むことで症状や病状が改善したという報告²⁻⁵⁾が相次ぐようになった。その中には、ペースメーカー療法により心肥大が退縮したという報告^{4,5)}もあり、従来の治療とは若干異なるものとして注目を集めている。ペースメーカー療法による左室流出路圧較差減少の機序に関しては、右室ペーシングにより左室側の収縮に遅れが生じ、心室中隔が奇異性運動をきたして左室流出路狭窄が軽減するためと考えられている³⁾。しかし、治療効果発現の機序に関しては不明な点も多く、長期効果に関する報告は少ない。我々の研究では、ペースメーカーを植え込んだ全例に、症状の改善と左室流出路圧較差の減少を認めており、その効果は植え込み後2年を経過しても殆どの症例で持続していることが確認された。さらに、ペースメーカー植え込み半年後より心室中隔壁厚の減少やその傾向を認めており、長期ペーシングは収縮様式の変化による圧較差の減少のみならず、肥大心筋を退縮させる可能性のあることも示唆された。

一方、閉塞性肥大型心筋症に対するペーシングの治療効果を疑問視する報告もあり、ペーシングにより左室流出路圧較差は減少するが、症状の改善はプラセボ効果であるなどと言ってい

る^{6,7)}。しかしながら、我々の結果をでは、症状の改善は圧較差の有意な減少を伴っており、プラセボ効果とする考えには否定的で、薬剤治療により失神発作が消失しない閉塞性肥大型心筋症患者には試みるべき治療法と考えられた。実際、double blind studyの結果症状の改善がプラセボ効果でないことを確認した報告⁸⁾もある。閉塞性肥大型心筋症に対するペースメーカー療法は、現段階では確立したものとはいえないが、殆どの症例で、失神などの自覚症状の消失や改善と左室流出路圧較差軽減を、長期にわたってもたらすことは明らかである。今後、左室拡張障害におよぼす影響や生命予後などを含めた更に長期の更に長期の慢性効果の検討が必要と考えられる。

【総括】

薬剤治療抵抗性の閉塞性肥大型心筋症に対して、DDD ペーシングは有効な治療法と考えられる。しかし、本法の確立のためにはなお慎重な検討が必要である。

【参考文献】

- 1) Duch HJ, Hutshenreiter W, Pankau H, et al: Vorhofsynchrone Ventrikelstimulation mit Verkürzter AV Verzögerungszeit als Therapieprinzip der Hypertrophischen Obstruktiven Kardiomyopathie. *Z Gesamte Int Med*, 39: 437, 1984
- 2) McDonald K, McWilliams E, O'Keefe B: Functional assessment of patients treated with permanent dual chamber pacing as a primary treatment for hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 9: 893, 1988
- 3) Jeanrenaud X, Goy JJ, Kappenberger L: Effects of dual-chamber pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet*, 339: 1318, 1992
- 4) Fananapazir L, Epstein ND, Curiel RV: Long-term results of dual-chamber (DDD) pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: Evidence for progressive symptomatic and hemodynamic improvement and reduction of left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 90: 2731, 1994
- 5) Sakai Y, Kawakami Y, Hirota Y, et al: Dual-chamber pacing in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: A comparison of acute and chronic effects. *Jpn Circ J*, 63: 971, 1999
- 6) Nishimura RA, Trusty JM, Hayes DL, et al: Dual-chamber pacing for hypertrophic cardiomyopathy: A randomized, double-blind, crossover trial. *J Am Coll Cardiol*, 29: 435, 1997
- 7) Linde C, Gadler F, Kappenberger L, et al: Placebo effect of pacemaker implantation in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 83: 903, 1999
- 8) Gadler F, Linde C, Daubert C, et al: Significant improvement of quality of life following atrio-ventricular synchronous pacing in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Data from 1 year follow-up. PIC study group. *Eur Heart J*, 20: 1044, 1999

肥大型心筋症におけるジギタリス様物質の存在と意義

林 哲也 東 口 治 弘 下 村 裕 章
 神 崎 裕 美 子 岡 部 眞 浮 村 聡
 寺 崎 文 生 出 口 寛 文 北 浦 泰

大阪医科大学第三内科

【研究要旨】

非閉塞性肥大型心筋症(HNCM)および閉塞性肥大型心筋症(HOCM)患者計40例において、ジギタリス様物質(DLIS)の末梢血血漿中濃度を測定し、心肥大を有する高血圧性心疾患(HHD)患者40例および正常対照者40例と比較した。また、肥大型心筋症患者の生検心筋標本について抗ジゴキシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により局在を検索し、血行動態指標と比較した。血漿 DLIS 値 0.2ng/ml 以上の陽性頻度は正常対照 0%, HHD 7.5%, HNCM 22.2%, HOCM 38.4% で、肥大型心筋症患者に高かった。免疫組織学的検索では、DLIS が心筋細胞の形質膜や介在板、Z 帯に局在した。また、DLIS 陽性例において左房径と左室拡張終期圧が有意に増加、心係数は低下していた。以上より、血漿や心筋 DLIS の存在は左室の圧負荷ならびに容量負荷と正相関を示し、肥大型心筋症における心室リモデリングに関与している可能性がある。

【研究目的】

ジギタリス様物質(digitalis-like immunoreactive substances: DLIS)は、抗ジゴキシン抗体と交叉反応を示す物質である¹⁾。DLIS は endogenous digitalis-like factors (EDLF)とも称され^{2,3)}、もともと生体に存在する物質で Na⁺-K⁺-ATPase を阻害し、血圧・体液量調節系への作用を有すると考えられている。DLIS は高血圧⁴⁾、心不全⁵⁾、腎不全⁶⁾の患者、さらに妊婦や胎児・新生児⁷⁾の血漿中に存在することが知られている。また、DLIS は漢方薬などによる外的摂取により出現する場合もある。DLIS の化学構造は、現在のところウアバイン

と極めて相同性の高い物質であると考えられているが、その詳細は不明である⁸⁾。

我々は、肥大型心筋症(HCM)患者の血漿ならびに心筋内に DLIS が存在することを初めて報告した⁹⁾。肥大型心筋症(HCM)は家族性に発症し遺伝子変異が認められる症例があるが原因不明のものも多く、経過中に拡張相へ移行したり、心不全をきたす症例がある。本研究は HCM における DLIS の存在と意義を明らかにするために、HCM ならびに高血圧性心疾患(HHD)患者血漿における DLIS について検索を行った。また HCM 患者の生検心筋標本を用いて、心筋 DLIS の局在を明確にすると共に血行動態指標との関連性について検討した。さらに、動物実験として心筋梗塞を作成し、心室リモデリングにおける DLIS の役割についても検討した。

【研究方法】

対象患者

ジギタリス製剤や生薬の投与を受けていない肥大型心筋症(HCM)患者40名(平均年齢55.3±9.1, HNCM; 27例, HOCM; 13例), 高血圧性心疾患(HHD)患者40名(平均年齢57.3±11.6)ならびに対照として健常成人40名(平均年齢48.6±6.3)において Abbot 社 TDX システムを用いて末梢血血漿 DLIS を測定した。なお、本システムにおける検出限界値を考慮し、測定値 0.2ng/ml 以上を血中 DLIS 陽性と定義した。免疫組織化学

上記 HCM 患者40名の右室心筋生検標本において、抗ジゴキシンモノクローナル抗体(MAB 515, Chemicon 社)を用いた免疫組織化学的検索を光顕は ABC 法、電顕はイムノゴールド法

により既報の如く行った^{10,11)}。対照にはジギタリス製剤非投与で心機能正常の不整脈患者10例(平均年齢 56.4 ± 7.2)の右室生検心筋を用いた。免疫染色光顕標本については、3人の検者がそれぞれ染色性を0~+3に半定量評価し、その平均値と血行動態指標とを比較した。

また、動物実験としてSDラット(10週令, 雄, $n=5$)の前下降枝を結紮, 2週後の心筋標本について同様に抗ジゴキシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。

【結果と考察】

血漿 DLIS は対照群では検出されなかった。HHD 患者では40例中3例(7.5%)に 0.2ng/ml 以上の陽性例を認めた。HCM 患者では40例中11例(27.5%)が陽性で、うち HNCM は6例, HOCM は5例であった。血行動態との比較では、HCM 患者における血漿 DLIS 陽性症例の左房径($4.8 \pm 0.7\text{cm}$)が陰性例($4.1 \pm 0.5\text{cm}$)に比較して大きかった($p < 0.05$)。また、左室拡張終期圧(LVedp)は陽性例で上昇する傾向を示したのに対し(17.1 ± 9.6 vs. 11.8 ± 4.8 mmHg, $p=0.06$)、心係数は陽性例で低下傾向を認めた(2.71 ± 0.78 vs. $2.94 \pm 0.54\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$, $p=0.08$)(図3)。

免疫組織化学

対照群では全例において、心筋 DLIS 陽性所見は認めなかった。これに対し、HNCM では血漿 DLIS 陽性症例の67%, HOCM では75%に心筋 DLIS を認めた(図1)。免疫電顕にて DLIS は心筋細胞膜や介在板に局在が確認された。さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察により、DLIS は心筋細胞内の核周辺にも存在することが明らかとなった(図2)。これは心筋細胞膜にて $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ を阻害した DLIS が、心筋細胞内に取り込まれた像であると考えられるが、DLIS が心筋細胞内にて産生されることも否定できない。

免疫染色標本の半定量結果と血行動態指標との比較検討にて、心筋 DLIS は LVedp ならびに心筋線維化率(Fibrosis)と正相関した(図3)。Fibrosis は LVedp や心筋細胞の錯綜配列の程度(Disarray)と正相関したが、左室短縮率(FS)とは負の相関であった。

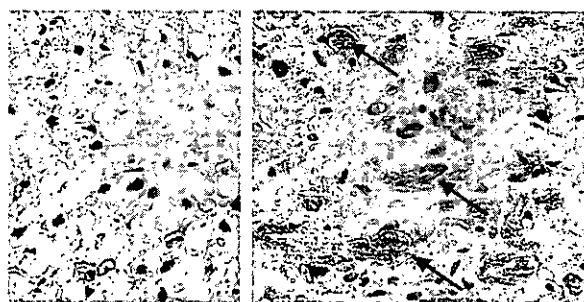


図1 肥大型心筋症患者の右室生検心筋標本における抗ジゴキシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学。Negative control(左)では心筋 DLIS は認めないが、血漿 DLIS 陽性患者の約70%の心筋に DLIS が認められた(右、矢印)。

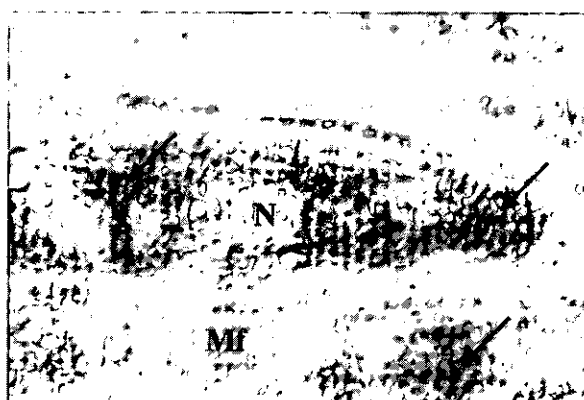


図2 肥大型心筋症患者の右室生検心筋標本における免疫組織化学。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、心筋 DLIS は核周辺に局在している(矢印)。N: 核, Mf: 筋原線維

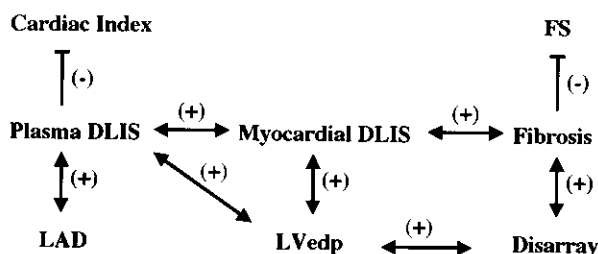


図3 血漿ならびに心筋 DLIS と血行動態指標、生検心筋所見との関連模式図。(+)は正相関、(-)は負相関を示す。LAD: 左房径, LVedp: 左室拡張終期圧, FS: 左室短縮率

動物実験では、心筋梗塞巣周辺の心筋細胞に DLIS を認めたのに対し、左室後壁の正常心筋には認めなかった。今後、左室縮小形成術や左室瘤切除術などの切除心筋を用いた検討が参考になる¹²⁾。

以上の結果より、心筋 DLIS は左室圧負荷および容量負荷に対して二次的に増加し、心筋梗塞などによる線維化に関連して左室リモデリングにおいて何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

【結論】

肥大型心筋症患者の血漿ならびに心筋内に DLIS が高頻度に存在することが明らかとなった。また、DLIS は左室の圧負荷ならびに容量負荷と正相関を示し、肥大型心筋症における心室リモデリングに関与している可能性がある。

【参考文献】

- 1) Gruber KA, Whitaker JM, Buckalew VM Jr. Endogeneous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. *Nature* 283: 743-745, 1980.
- 2) Delva P, Devynck MA, Degan M, Pernollet MG, Carraroli M, Capra C, Steele A, Lechi A. Plasma levels of an endogenous Na⁺-K⁺-pump inhibitor in relation to hemodynamic data in cardiopathic patients. *Clin Sci* 81: 23-29, 1991.
- 3) Goto A, Yamada K, Yagi N, Yoshioka M, Sugimoto T. Physiology and pharmacology of endogeneous digitalis-like factors. *Pharmacol Rev* 44: 377-399, 1992.
- 4) Yamada K, Goto A, Nagoshi H, Hui C, Omata M. Role of brain ouabain-like compound in central nervous system-mediated natriuresis in rat. *Hypertension* 23: 1027-1031, 1994.
- 5) Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogeneous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86: 420-425, 1992.
- 6) Graves SW, Brown B, Valdes R. Jr. An endogenous digoxin-like substance in patients with renal impairment. *Ann Int Med* 99: 604-608, 1983.
- 7) Seccombe DW, Pudek MR, Humphries KH, Matthewson B. A study into the nature and organ source of digoxin-like immunoreactive substance(s) in the perinatal period. *Bio Neonate* 56: 136-146, 1989.
- 8) Hamlyn JM. Discovery of endogeneous ouabain; A new mammalian hormone. In: Bamberg E, Schoner W, eds. *The Sodium Pump*. New York, Springer: 722-731, 1994.
- 9) Hayashi T, Ijiri Y, Toko H, Shimomura H, Okabe M, Terasaki F, Kitaura Y, Kawamura K. Increased digitalis-like immunoreactive substances in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 21: 296-305, 2000.
- 10) Hayashi T, James TN, Buckingham DC. Ultrastructure and immunohistochemistry of the coronary chemoreceptor in human and canine hearts. *Am Heart J* 129: 946-959, 1995.
- 11) Shimomura H, Hayashi T, Terasaki F, Hirota Y, Kitaura Y, Kawamura K. In situ localization of digoxin in hearts under digitalization: an ultrastructural and immunohistochemical study in humans and rats. *Cell Vision* 3: 364-369, 1996.
- 12) Hayashi T, Nomura Y, Ijiri Y, Shimomura H, Horimoto H, Terasaki F, Kitaura Y. Digitalis-like immunoreactive substances in myocardial remodeling. In: Lewis BS, Halon DA, Flugelman MY, Touboul P, eds. *Coronary Artery Disease: Prevention to Intervention*. Bologna, Monduzzi Editore: 203-208, 2000.

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

猪子 英俊 成瀬 妙子 中島 舞子

吉川 枝里

東海大学医学部分子生命科学系

太田 正穂 勝山 善彦

信州大学医学部法医学

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所

松森 昭 篠山 重威

京都大学医学研究科循環病態

【研究要旨】

これまでの抗 HCV 抗体陽性の拡張型 (DCM), 肥大型 (HCM) 心筋症患者における結果では, DCM が HLA-A*1101 に有意な増加を認め, 一方, HCM では HLA-DQB1*0303, -DRB1*0901 の有意な増加, -A24 の有意な減少が認められた。

今回, HLA クラス III 領域に存在する TNF α (tumor necrosis factor α) 遺伝子についてプロモーター領域 1055bp の塩基配列多型解析, ならびに TNF 遺伝子周辺のマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行った。その結果, 抗 HCV 抗体陽性の DCM, HCM と TNF 遺伝子周辺の特定のマイクロサテライト多型との間に有為な相関が認められた。しかし, TNF 遺伝子プロモーター領域多型とは相関を示さなかったことから, TNF 遺伝子自身が第一義的に疾患発症に関与する可能性は低く, HLA の HCV に対する抗原提示能の心筋障害への関与が考えられた。

【研究目的】

ヒト第 6 染色体の短腕部上の約 4,000kb に及ぶ領域に存在するヒト白血球抗原 (human leukocyte antigens: HLA) 遺伝子は, 自己と非自己の識別という免疫システムにおける重要

な役割を担い免疫応答に深く関わっている。また, ヒト遺伝子の中でも特に高度な遺伝的多型性を有することで知られている。抗原多型性は, 遺伝子を構成している塩基配列の違いによりに集団中に保存され, 多型部位は構成されるアミノ酸の違いとして反映される。この多型が個体差として特定の抗原由来ペプチドの結合を可能にし, 抗原提示を行っている。それゆえ HLA 遺伝子群は, 100種以上の疾患に関与しているといわれており, 疾患感受性解析の際の有力な遺伝マーカーともなっている。

松森ら^{1,2)}は, 拡張型 (dilated cardiomyopathy: DCM) および肥大型心筋症 (hypertrophic cardiomyopathy: HCM) 患者に, 有意に高頻度で HCV 感染者を認め, 心筋症の発症機序に HCV が関与する可能性を示唆した。HCV と HLA の関係については, HCV 感染の成立と特定の HLA 型の間に関関は認められない。しかし HCV 感染者の肝炎発症に HLA クラス II 遺伝子の多型性が関与していることが報告されており, 心筋症における HCV 感染についても, HLA との関係が疑われる。これまで我々は, HCV 抗体陽性の DCM, HCM 患者例について HLA 遺伝子型タイピングを行い, DCM では HLA-A11 ($p < 0.009$), HCM では HLA-DQB1

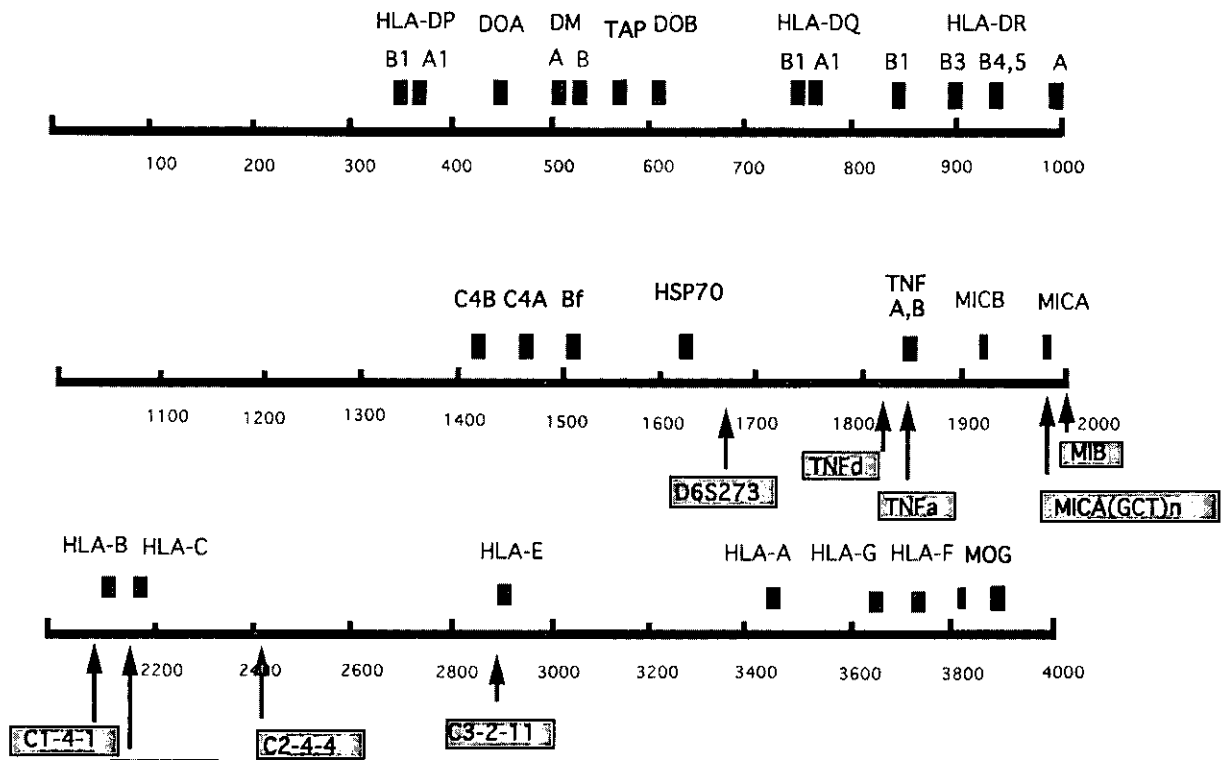


図1 今回の解析に用いた多型マイクロサテライトマーカー

*0303 ($p < 0.002$) が患者群に有意に増加していることを見出し、HLA 遺伝子多型が HCV 抗体陽性心筋症の発症に関与していることを報告してきた。しかし、HLA 遺伝子領域には、クラス III 領域に存在する TNF α (tumor necrosis factor α) 遺伝子をはじめとして既知、未知の疾患感受性遺伝子が多数存在することが知られている。

そこで今回は、TNF 遺伝子の多型解析、並びに TNF 遺伝子周辺に存在するマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析をおこない、HLA 遺伝子領域における疾患感受性因子の検索を行った。

【研究方法】

抗 HCV 抗体陽性の DCM 患者 17 例、HCM 患者 29 例の末梢血より抽出した DNA を用いた。TNF α 遺伝子多型は、プロモーター領域 1055 bp を PCR にて増幅後、直接塩基配列を決定し、-1031, -863, -1857, -308, -238 番の塩基配列多型を検出した。多型マイクロサテライトマーカーによる解析は、TNF 遺伝子から HLA クラス I 遺伝子周辺に設定した D6S273, TNFd, TNFa, MICA, MIB, C1-4-1, C1-2-

-5, C2-4-4, C3-2-11 の 9 種を用いて (図 1)、それぞれの領域に特異的な蛍光プライマーセットを用いて PCR にて増幅後、繰り返し配列数の違いにより多型を検出した。これらを一般集団での結果と比較し、統計学的有意差の検討を行った。

【結果と考察】

松森らは、HCV 感染を考慮しない (この頃 HCV は未同定) HCM と HLA の関係についても、すでに HLA-DR4 が疾患感受性因子であることを報告しており³⁾、HLA 遺伝子多型が心筋症の発症に関与していることを示唆しているが、我々が行った HCV 抗体陽性心筋症についても、HLA 遺伝子の発症への関与が強く疑われる結果を得ている。しかし、HLA クラス III 領域には、TNF α 遺伝子が存在しており、TNF α は培養心筋の肥大をきたすことが報告されている。さらに、我々の心サルコイドーシスの解析においても TNFA 遺伝子多型との相関が認められており、心肥大への関与が疑われた。

そこで今回、TNF α 遺伝子についてプロモーター領域 1055bp の塩基配列多型解析を行っ

表1 DCMにおいて有意差の認められたマイクロサテライトマーカー

marker	allele	patient		control		R.R.	X2	P	Pc
		positive	negative	positive	negative				
D6S273	126	6	6	37	211	5.70	10.205	0.0014	0.0070
TNFd	134	4	9	161	87	0.24	6.195	0.0128	0.0640
C3-2-11	211	5	7	38	210	4.01	5.754	0.0164	0.0822
MICA	194	5	7	46	201	3.12	3.842	0.0499	0.2498

表2 HCMにおいて有意差の認められたマイクロサテライトマーカー

marker	allele	patient		control		R.R.	X2	P	Pc
		positive	negative	positive	negative				
TNFA	97	12	13	65	183	2.60	5.325	0.0210	0.1050
TNFd	121	2	23	1	247	17.55	12.059	0.0005	0.0257
MIB	348	7	19	24	224	3.44	6.975	0.0082	0.0413
C1-2-5	206	5	20	20	228	2.99	3.889	0.0486	0.2430

た。また、HLA 遺伝子領域内には、HLA 以外の既知、未知の遺伝子が多数存在することから、TNF 遺伝子から HLA クラス I 領域周辺のマイクロサテライトマーカーを用いた相関解析を行った。

その結果、抗HCV抗体陽性 DCM, HCM とともに現在報告されている 5ヶ所のプロモーター領域多型部位では、特定の塩基配列との相関を示さず、多型マイクロサテライトマーカーでの解析結果は、DCM では D6S273 ($p < 0.0014$, $Pc < 0.007$), HCM では TNFd ($p < 0.0005$, $Pc < 0.026$), MIB ($p < 0.0082$, $Pc < 0.041$) との間に関連が認められた(表 1, 2)。

これらの結果は、TNF 遺伝子自身が第一義的に疾患発症に関与する可能性が低いことを示唆しており、HLA の HCV に対する抗原提示能の心筋障害への関与が考えられた。さらに抗HCV抗体陽性 DCM, HCM においては、マイクロサテライトマーカーを用いた解析においても、相関を示した領域が異なっており、HLA 遺伝子での解析同様異なる発症機序を呈することが示唆された。しかしながら今後は、多型マイクロサテライトマーカーでのさらに詳細な解析に向けて、例数を増やし検討を行う必要がある。

【結論】

抗HCV抗体陽性の DCM, HCM と TNF 遺伝子周辺の特定のマイクロサテライト多型との間に有意な相関が認められた。しかし、TNF 遺伝子プロモーター領域多型とは相関を示さなかったことから、TNF 遺伝子自身が第一義的に疾患発症に関与する可能性は低く、HLA の HCV に対する抗原提示能の心筋障害への関与が考えられた。

【参考文献】

- 1) Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S: Dilated cardiomyopathy associated with hepatitis C virus infection. *Circulation* 92: 2519-2525, 1995.
- 2) Matsumori A et al.: Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Comm* 222: 678-682, 1996.
- 3) Matsumori A, et al.: HLA-DR4 antigen linkage in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Am heart J* 101: 14-16, 1981.

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

吉川 勉 岩田 道圭 馬場 彰 泰
安斎 俊久 小川 聡
慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

【研究要旨】

β 1 アドレナリン受容体第2細胞外ループに相当するペプチドで家兎を3-6ヶ月間にわたって免疫し(β 群), β 遮断薬ピソプロロール同時投与(β +biso群)による影響を検討した. 免疫開始後3ヶ月では β 群で受容体のアンカップリングを認めたが, β +biso群ではアンカップリングを認めなかった. β 群ではGタンパク質磷酸化酵素タイプ5 (GRK5)の増加を認めた. 病理組織学的検討では β 群と β +biso群共に炎症細胞浸潤を認めた. 6ヶ月後には求心性左室肥大と拡張障害を呈し, 病理組織像では心筋細胞肥大, 配列の乱れと間質の線維化を認めた. β 1受容体数は減少し, GRK5のみならず, 抑制性Gタンパク質も増加した. β +biso群ではこれらの変化を認めなかった.

【目的】

拡張型心筋症(DCM)患者の3-4割に β 1アドレナリン受容体に対する自己抗体が検出される. 同自己抗体はアゴニスト様作用を有し, その作用は β 遮断薬ピソプロロールにより抑制される¹⁾. われわれはDCM患者において本自己抗体の存在は心室頻拍と突然死の予測因子となることを明らかにした²⁾. 本受容体第2細胞外ループに一致するペプチドで家兎を6ヶ月間免疫すると, 求心性左室肥大と β アドレナリン受容体のアンカップリングをきたすことを観察した³⁾. 本現象が炎症による非特異的な変化なのか, あるいは受容体を介する特異的な変化なのかについて明らかにするために, 免疫開始後早期の変化と β 遮断薬同時投与の効果につき検討した.

【方法】

β 1受容体第2細胞外ループに相当するペプ

チド(β 群, $n=13$)あるいは生理食塩水(CTL群, $n=13$)にアジュバントを添加し, 日本白色種家兎に3-6ヶ月間投与した(各群で3ヶ月が $n=5$, 6ヶ月が $n=8$). さらに10羽において同ペプチドで免疫し, 同時に β 遮断薬ピソプロロール2mg/kg/dayを連日投与した(β +biso群, 3ヶ月: $n=5$, 6ヶ月: $n=5$). 免疫終了後に心エコー図検査を行い, 左室内径と壁厚を計測した. 血行動態を観察後心臓を摘出し, 心重量を測定した. 乳頭筋レベルでの切片を作成し, ホルマリン固定, パラフィン抱埋後にhematoxylin & eosin染色組織標本を作製した. 左室壁および内腔の面積を画像解析法を用いて計測した. 組織標本の光学顕微鏡による観察を行った.

一部の心筋を用いて β 受容体シグナル伝達系の解析を行った^{4,5)}. すなわち, 6.25-200pMの¹²⁵I-iodocyanopindolol (ICYP)を用いたradioligand binding assayにより最大結合部位数と解離定数を求めた. 50pMのICYPを用いたcompetition assayにより, 高親和性結合部位の比率を算出した. 30 μ Mのguanylylimido-diphosphate (Gpp(NH)p)の添加により受容体とGタンパク質のカップリングを観察した. ICYPと 10^{-10} - 10^{-8} MのCGP20712Aのcompetition assayにより β 1・ β 2受容体の比率を算出した. 左室心筋から採取した膜粗分画を用いて, 非刺激時, 10^{-5} Mイソプロテレノールあるいは 10^{-5} M Gpp(NH)p刺激下のサイクリックAMP産生能を測定することによりアデニル・シクラーゼ(AC)活性を評価した. 心筋細胞膜分画および細胞質分画を用いて, ウェスタン・ブロット法により刺激性Gタンパク質,

表1 3ヶ月後における血行動態と形態学的変化

	CTL 群	β 群	β +biso 群
左室拡張末期径(mm)	10.0 \pm 0.7	9.4 \pm 0.4	9.9 \pm 0.5
心室中隔壁厚(mm)	2.3 \pm 0.2	2.6 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3
左室後壁厚(mm)	2.3 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2	2.6 \pm 0.2
左室拡張末期圧(mmHg)	3.0 \pm 0.9	5.0 \pm 1.8	4.8 \pm 1.7
心拍出量(ml/min/m ²)	161 \pm 10	155 \pm 10	142 \pm 10
-dp/dt(mmHg/s)	3200 \pm 260	3120 \pm 150	3000 \pm 210
左室重量(g/kg)	1.51 \pm 0.04	1.61 \pm 0.05	1.58 \pm 0.02
右室重量(g/kg)	0.48 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03	0.46 \pm 0.02
左室横断面積(mm ²)	125 \pm 6	125 \pm 6	120 \pm 7
左室壁面積(mm ²)	93 \pm 5	98 \pm 5	92 \pm 6
左室内腔面積(mm ²)	31 \pm 3	26 \pm 5	28 \pm 2
壁面積/横断面積比(%)	74 \pm 2	79 \pm 4	76 \pm 1
単位心筋あたりの横断面積(mm ²)	203 \pm 15	227 \pm 15	218 \pm 13

表2 6ヶ月後の血行動態と形態学的変化

	CTL 群	β 群	β +biso 群
左室拡張末期径(mm)	11.8 \pm 0.4	10.4 \pm 0.4*	10.9 \pm 0.4
心室中隔壁厚(mm)	2.7 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2*	3.0 \pm 0.2
左室後壁厚(mm)	2.6 \pm 0.2	3.4 \pm 0.2*	3.3 \pm 0.3
左室拡張末期圧(mmHg)	4.5 \pm 1.1	8.4 \pm 1.1*	6.2 \pm 1.1
心拍出量(ml/min/m ²)	147 \pm 8	120 \pm 8*	132 \pm 6
-dp/dt(mmHg/s)	3550 \pm 194	3062 \pm 157*	3320 \pm 136
左室重量(g/kg)	1.42 \pm 0.02	1.54 \pm 0.04*	1.48 \pm 0.04
右室重量(g/kg)	0.45 \pm 0.01	0.41 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02
左室横断面積(mm ²)	158 \pm 13	164 \pm 11	157 \pm 7
左室壁面積(mm ²)	116 \pm 8	138 \pm 6*	127 \pm 8
左室内腔面積(mm ²)	43 \pm 6	26 \pm 5*	31 \pm 4
壁面積/横断面積比(%)	74 \pm 2	85 \pm 2*	80 \pm 3
単位心筋あたりの横断面積(mm ²)	251 \pm 14	338 \pm 26*	281 \pm 24

* CTL に対して p<0.05.

抑制性Gタンパク質, GRK2 および GRK5 の蛋白レベルを測定した.

【結果】

3ヶ月後においては血行動態および形態学的所見に3群間で差を認めなかった(表1). 病理組織所見では β 群と β +biso群で軽度の炎症性細胞浸潤を認めた. 6ヶ月後においては β 群はCTL群に比べて, 左室拡張末期径は小さく, 心室中隔壁厚および左室後壁厚の増加を認めた. β 群はCTL群に比べて, 左室拡張末期圧は高値で, 最小dp/dtと心拍出量は低値であった. β 群では左室重量は大であったが, 右室重量には差を認めなかった. β 群では左室横断面積に

差はなかったが, 壁面積は大で, 内腔面積は小であった. 左室壁面積・横断面積比は β 群で大であった. β +biso群ではCTL群に比べて, これらの指標に差はなかった(表2). 病理組織像では β 群で心筋細胞肥大, 配列の乱れ, 間質の線維化を認めたが, β +biso群ではこのような変化はなかった. 心筋細胞あたりの横断面積は β 群ではCTL群に比べて大であり, β +biso群ではCTL群と差はなかった.

血漿ノルエピネフリン値および心筋内ノルエピネフリン値にはどの時期においても3群間で差はなかった. 3ヶ月後においては β 群はCTL群に比べて, β アドレナリン受容体数や

表3 3ヶ月後における β アドレナリン受容体シグナル伝達系の変化

	CTL 群	β 群	β +biso 群
% β 1(%)	88.0 \pm 1.3	86.7 \pm 1.3	88.8 \pm 0.9
β 1-AR(fmole/mg protein)	25.9 \pm 0.8	25.1 \pm 1.0	26.6 \pm 0.7
高親和性結合部位(%)	70.4 \pm 5.5	18.8 \pm 6.6*	58.4 \pm 11.6
Ki(nM)	91 \pm 19	133 \pm 24	118 \pm 14
Ki+Gpp(NH)p(nM)	249 \pm 41	241 \pm 19	260 \pm 22
AC 活性(pmol/mg protein)			
非刺激下	67 \pm 3	63 \pm 4	65 \pm 6
イソプロテレノール	147 \pm 2	118 \pm 3*	145 \pm 13
Gpp(NH)p	241 \pm 17	213 \pm 10	227 \pm 19

% β 1: β 1 受容体の比率, β 1-AR: β 1 受容体数, Ki: Gpp(NH)p 非存在下の解離定数, Ki+Gpp(NH)p: Gpp(NH)p 存在下の解離定数, * CTL 群に対して $p < 0.05$.

表4 6ヶ月後における β アドレナリン受容体シグナル伝達系の変化

	CTL 群	β 群	β +biso 群
% β 1(%)	89.4 \pm 1.4	82.8 \pm 1.7*	89.4 \pm 0.5
β 1-AR(fmole/mg protein)	24.2 \pm 1.6	19.0 \pm 1.9*	22.9 \pm 1.2
高親和性結合部位(%)	62.6 \pm 5.1	10.1 \pm 2.5*	48.5 \pm 10.4
Ki(nM)	117 \pm 14	195 \pm 19*	14 \pm 15
Ki+Gpp(NH)p(nM)	258 \pm 24	253 \pm 28	251 \pm 32
AC 活性(pmol/mg protein)			
非刺激下	74 \pm 4	58 \pm 3*	64 \pm 5
イソプロテレノール	153 \pm 9	79 \pm 19*	142 \pm 6
Gpp(NH)p	251 \pm 28	164 \pm 10*	199 \pm 23

% β 1: β 1 受容体の比率, β 1-AR: β 1 受容体数, Ki: Gpp(NH)p 非存在下の解離定数, Ki+Gpp(NH)p: Gpp(NH)p 存在下の解離定数, * CTL 群に対して $p < 0.05$.

解離定数に差はなかったが、高親和性結合部位の比率は少であった。イソプロテレノール刺激に対する AC 活性は β 群で低値であったが、Gpp(NH)p 刺激に対する AC 活性には差はなかった。 β +biso 群では CTL 群に比べて、これらの指標に差はなかった(表3)。6ヶ月後においては高親和性結合部位の比率に加えて、 β 1 アドレナリン受容体数も CTL 群に比べて β 群で低値であった。解離定数は β 群で高値であった。AC 活性は非刺激時、イソプロテレノールおよび Gpp(NH)p 刺激時ともに低値であった。 β +biso 群では CTL 群に比べて、全て差はなかった(表4)。

GRK2 のタンパクレベルは3ヶ月後・6ヶ月後ともに3群間で差はなかった。GRK5 は3ヶ月後において、 β 群の細胞膜分画で増加した。細胞質分画では両群間で差はなかった。6ヶ月後においても GRK5 は β 群で高値であっ

たが、 β +biso 群と CTL 群ではいずれの時期でも差はなかった(図1)。抑制性Gタンパク質は3ヶ月後においては3群間で差はなかったが、6ヶ月後においては β 群で高値であった。 β +biso 群と CTL 群では差はなかった(図2)。

【総括】

1. β 1 アドレナリン受容体第2細胞外ループに一致するペプチドで家兎を6ヶ月間にわたって免疫した。
2. 3ヶ月後においては軽度の炎症性細胞浸潤をきたしたのみで、明らかな形態学的変化を認めなかった。 β アドレナリン受容体にアンカッピングを認め、その背景として GRK5 の増加を認めた。
3. 6ヶ月後においては拡張障害を主徴とする求心性左室肥大を呈した。 β 1 受容体数は減少し、さらに強いアンカッピングを認めた。GRK5 のみならず、抑制性Gタンパク質も増

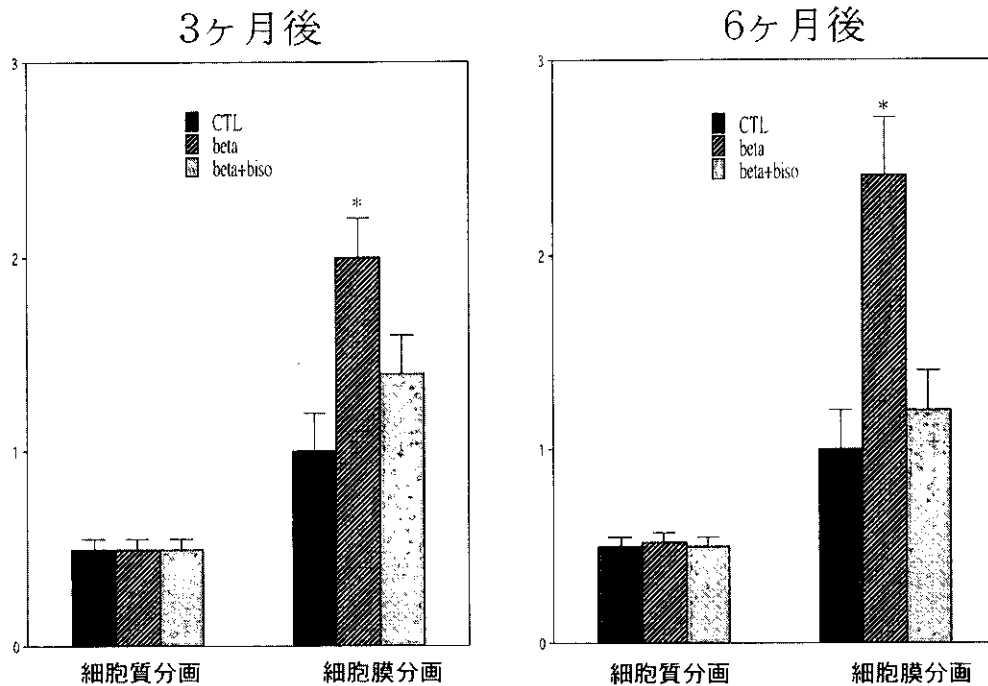


図1 各群における GRK5 蛋白レベル

* CTL 群に対して $p < 0.05$

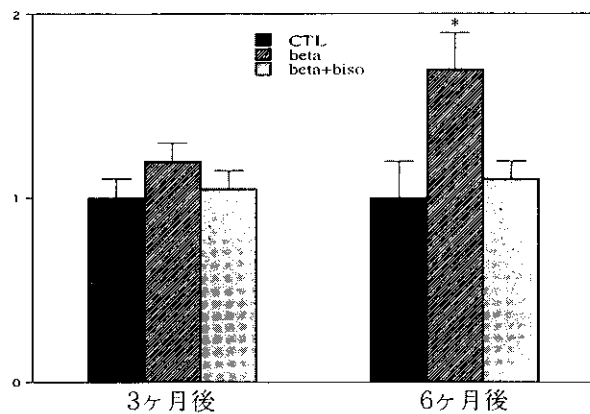


図2 各群における抑制性Gタンパク質レベル

* CTL 群に対して $p < 0.05$

加した。

4. β アドレナリン受容体シグナル伝達の変化と心筋肥大は β 遮断薬ピソプロロールの投与によって予防された。

【参考文献】

- 1) Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebcke J: Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89: 2860-7
- 2) Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S: Autoantibodies against the second extracellular loop of the β_1 -adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 418-24
- 3) Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S: Autoimmunity against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors induces β -adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 2001; 88: 578-86
- 4) Yoshikawa T, Handa S, Suzuki M, Nagami K: Abnormalities in sympathetic neuronal regulation are localized to failing myocardium in rabbit heart. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 210-215
- 5) Anzai T, Yoshikawa T, Baba A, Nishimura H, Shiraki H, Nagami K, Suzuki M, Wainai Y, Ogawa S: Myocardial sympathetic denervation prevents chamber-specific alteration of β -adrenergic transmembrane signaling in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1314-22

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

梶本 克也 川名 正敏 萩原 誠久
笠貫 宏

東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所内科

【研究要旨】

〔背景・目的〕 プロテインキナーゼN (PKN) は、プロテインキナーゼC (PKC) の触媒ドメインと高い相同性(約70%)を有するセリン/スレオニンキナーゼとしてクローニングされたものであるが、その制御ドメインはPKCとかなり異なっている。このため、PKNの生理機能についてはこれまで十分明らかにされていない。今回我々は、低浸透圧というメカニカルストレスにより心筋細胞内のPKNがリン酸化されるか否かを検討した。

〔方法〕 新生児ラット培養心室筋細胞に70%の低浸透圧の刺激を5-120分加えて、PKNおよびPKNに結合してリン酸化させるとされているRhoAの活性化を認めるか否かを、peptide kinase assay・subcellular fractionationなどを用いて検討した。さらに活性型PKNが、種々の肥大刺激による細胞内シグナル伝達機構に関与しているMAPキナーゼ(特にERK1/2)のリン酸化に関与しているか否かを検討するために、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

〔結果〕 新生児ラット培養心室筋細胞に70%の低浸透圧の刺激を加えたところ、低浸透圧刺激後15分以内にPKNのリン酸化活性を認め始め、刺激後60分にて約2倍のリン酸化活性の増加を認めた。RhoAにおいては、低浸透圧刺激後30分で約3倍の活性化の増加を認めた。次に、活性型PKNによるElk1などの転写因子活性の有無についてルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、活性型PKNによりElk1は2.8倍の転写活性増加を認めた。

〔結語〕 新生児ラット培養心室筋細胞において、

PKNは低浸透圧刺激により有意に活性化されることが明らかにされた。また活性化されたPKNはElk-1の転写活性を有意に増加させたため、PKNはMAPキナーゼ(特にERK)を介して心筋細胞の肥大に関与している可能性があることが示唆された。

【研究目的】

蛋白質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼN (PKN) は、プロテインキナーゼC (PKC) の触媒ドメインと高い相同性(約70%)を有するセリン/スレオニンキナーゼとしてクローニングされたものであるが、その制御ドメインはPKCとかなり異なっている¹⁾。このため、PKNの生理機能についてはこれまで十分明らかにされていない。最近 budding yeast において pkc1 が低浸透圧などのストレスによりリン酸化され MAP キナーゼが活性化されることが報告されている²⁾。哺乳類において低浸透圧ストレスは PKC を全くリン酸化しなかったこと³⁾、および PKN の制御ドメインは pkc1 と高い相同性を有することから(図1)、今回我々は低浸透圧というメカニカルストレスにより budding yeast の pkc1 と同様に心筋細胞内の PKN がリン酸化され、MAP キナーゼが活性化されるという仮説を立て以下の研究を検討した。

【研究方法】

新生児ラット培養心室筋細胞に70%の低浸透圧の刺激を5分から120分加えて、まずPKNのリン酸化の有無をSDS-PAGEにおけるelectrophoretic mobility shiftにより検討した。さらに、PKNの活性化を定量的に測定するために、PKC- δ をsubstrateとしてpeptide

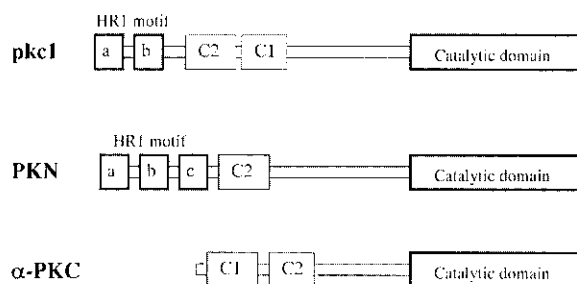
Domain structure of *pkc1*, PKN and PKC

図1

kinase assay を用いて検討した⁴⁾。

次に PKN に直接結合してリン酸化させるとされている RhoA が、70% の低浸透圧の刺激により活性化を示すか否かを subcellular fractionation を用いて検討した⁵⁾。

さらに活性化された PKN が種々の肥大刺激による細胞内シグナル伝達機構に関与している MAP キナーゼ(特に ERK1/2)や atrial natriuretic factor (ANF) の発現に関与しているか否かを検討するために、活性型 PKN による Elk-1 の転写活性の有無についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。

【結果】

新生児ラット培養心室筋細胞に 70% の低浸透圧の刺激を加えたところ、低浸透圧刺激後 15 分以内に SDS-PAGE における electrophoretic mobility shift を認めはじめた。低浸透圧刺激後 120 分経過しても PKN のリン酸化活性の増加を認めた(図 2 上)。さらに、PKN の活性化を定量的に測定するために、PKC- δ を substrate として peptide kinase assay を用いて検討したところ、低浸透圧刺激後 5 分以内から PKN の活性化を認めはじめ 60 分にて約 2 倍の活性化の増加を認めた(図 2 下)。以上の結果より心筋細胞において低浸透圧刺激により PKN はリン酸化されることが示唆された。

次に PKN に直接結合してリン酸化させるとされている低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA が、70% 低浸透圧の刺激により活性化を示すか否かを subcellular fractionation を用いて検討した。低浸透圧刺激前は RhoA のほとんど大部分は Soluble fraction として認められたが、

低浸透圧刺激 5 分後には RhoA を Particulate fraction として認められるようになり刺激後 30 分で約 2.6 倍の RhoA の活性化増加を認めた(図 3)。以上の結果より、低浸透圧の刺激により低分子量 GTP 結合蛋白質である RhoA が活性化され、活性化された RhoA は PKN に結合して PKN をリン酸化させることが示唆された。

次に、低浸透圧というメカニカルストレスにより心筋細胞内でリン酸化された PKN が budding yeast の *pkc1* と同様に MAP キナーゼを活性化するか否かを検討するために、活性型 PKN(CA-PKN)による Elk-1 の転写因子活性の有無についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。CA-PKN により Elk-1 の転写活性は約 2.8 倍の増加を示した。これは、野生型 PKN(WT-PKN)に 70% の低浸透圧刺激を加えた場合の Elk-1 の活性増加とはほぼ同等であった。さらに、この CA-PKN による Elk-1 の活性増加が MEK1 を介しているかを検討するために dominant-negative mutants of MEK1(DN-MEK1)を用いて評価した。DN-MEK1 により CA-PKN による Elk-1 の活性増加は有意に抑制されたことから、リン酸化された PKN は MEK1 を介して Elk-1 の転写活性を促進させることが示唆された(図 4)。

【考察】

蛋白質リン酸化酵素である PKN は、PKC の触媒ドメインと高い相同性を有するセリン/スレオニンキナーゼであるが、その制御ドメインは PKC とかなり異なっているため、PKN の心筋細胞における生理機能については十分明らかにされていない。最近 Davenport らは、budding yeast において低浸透圧などのストレスにより *pkc1* がリン酸化され、活性化された *pkc1* が MAP キナーゼを活性化することを報告している。我々は、哺乳類における低浸透圧ストレスは MAP キナーゼを活性化させるが、PKC はこの MAP キナーゼを活性化に関与していないことを報告した。さらに、*pkc1* の制御ドメインは PKC の制御ドメインとかなり異なっているが、PKN とは高い相同性を有することが明らかにされた(図 1)。このため、哺乳類では低浸透圧というメカニカルストレスによ

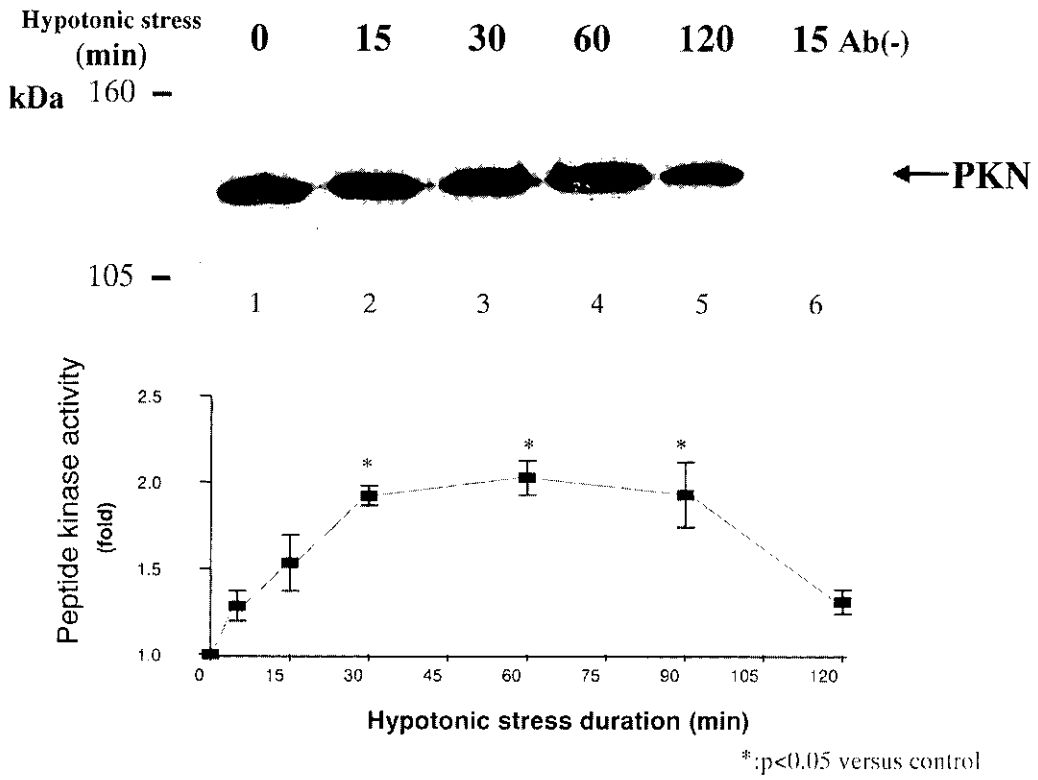


图 2

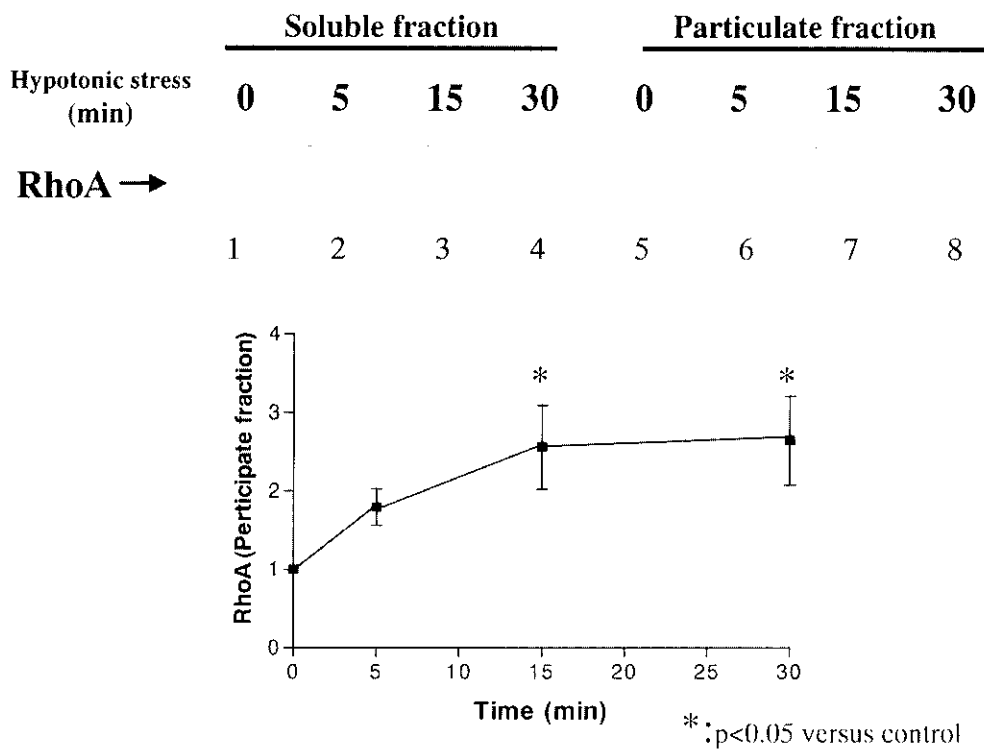


图 3