

図4

り PKC ではなく PKN がリン酸化され、budding yeast の *pkc1* と同様に、MAP キナーゼが PKN により活性化されるという仮説を立て検討した。この研究結果より、70% の低浸透圧刺激により PKN が速やかにリン酸化され、活性化された PKN は MEK-1 を介して Elk-1 の転写活性の増加を促進させることが示唆された。

さらに、PKN の N 末端側に直接結合して PKN のリン酸化を制御している低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA も 70% の低浸透圧刺激により有意に活性化された。しかし、低浸透圧刺激が RhoA を直接刺激して活性化させたのか、チロシンキナーゼなどの他の蛋白酵素などを介して RhoA を活性化するのかわかり不明であり、今後の検討が必要である。

また、活性化された PKN が MAP キナーゼ

のうち MEK-1-ERK1/2(Elk-1)を活性化させることは明らかにされたが、PKN がその他の MAP キナーゼである JNK や p38 に関与しているかについては明らかにされていないため、今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

#### 【結論】

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。

#### 【参考文献】

- 1) Mellor, H., Parker, P.J. (1998) *Biochem J.* 332, 281-292
- 2) Davenport, K., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, DE., Gustin, MC. (1995) *J Biol Chem.* 270, 30157-30161
- 3) Sadoshima, J., Qiu, Z., Morgan, J.P., and Izumo, S. (1996) *EMBO J* 15, 5535-5546
- 4) Oishi, K., Mukai, H., Shibata, H., Takahashi, M., and Ono, Y. (1999) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 261, 808-814
- 5) Aoki, H., Izumo, S., and Sadoshima, J. (1998) *Circ Res.* 81, 666-676

## 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

木村 彰方 有村 卓朗

東京医歯大・難研・分子病態

### 【研究要旨】

心筋特異的に発現する新規遺伝子群を単離する過程で、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素(PP1M)スモールサブユニット様遺伝子(hHS-M21)を同定した。平滑筋においては、PP1Mのスモールサブユニット(sm-M20)は筋収縮のCa感受性を亢進する機能を有することが報告されているため、hHS-M21のゲノム構造を決定するとともに、筋収縮におけるhHS-M21の機能解析を行った。その結果、①hHS-M21は筋型PP1M ラージサブユニットと同一の遺伝子(MYPT2)によってコードされる、②hHS-M21はMYPT2の第13イントロン内の心筋特異的プロモーターより転写される、③hHS-M21には、alternative splicingのためC末側が異なる2つのアイソフォームが存在する、④hHS-M21は平滑筋および心筋において筋収縮のCa感受性を亢進する、⑤この亢進作用はhHS-M21のN末側1/3領域によって担われる、⑥hHS-M21はMYPT2には結合せず、平滑筋型PP1Mのラージサブユニット(MYPT1)のC末側に結合する、⑦hHS-M21のMYPT1への結合ドメインはCa感受性亢進ドメインに一致することが判明した。すなわち、hHS-M21は心筋特異的に発現する新たな筋収縮制御分子であることを解明した。

### 【研究目的】

肥大型心筋症は原因不明の心肥大を呈する疾患と定義されていたが、最近の分子遺伝学的解析により、患者の約半数にはサルコメア収縮を司る分子群のいずれかに変異が見出されることが判明している<sup>1,2)</sup>。サルコメア収縮要素の異常がいかなる機構で心肥大をもたらすかについ

ては不明な点が多いが、変異ミオシン、変異トロポニンTなどの機能解析が行われており、変異サルコメアによる共通機能変化は筋収縮におけるCa感受性の亢進、すなわち正常サルコメアよりも低いCa濃度下で筋収縮が生じることであろうと考えられる。一方、正常な心筋収縮におけるCa感受性収縮制御機構は主にトロポニン複合体に依存すると考えられているが、最近ミオシン軽鎖のリン酸化亢進と心肥大との関連が示された<sup>3)</sup>。心筋におけるミオシン軽鎖のリン酸化はMLCキナーゼ(MLCK)やRhoAキナーゼによって行われていることが知られているが、脱リン酸化機構は不明であった。

我々は心筋特異的に発現する心筋遺伝子の単離・解析を進めている<sup>4)</sup>が、その過程でミオシン軽鎖脱リン酸化酵素(PP1M)のスモールサブユニット様の構造を持つ遺伝子(hHS-M21)を同定した。平滑筋ではPP1Mのスモールサブユニット(M20)によって筋収縮のCa感受性が亢進することが知られている<sup>5)</sup>ため、hHS-M21は心筋におけるミオシン軽鎖脱リン酸化を介した筋収縮の制御に関わる分子であることが示唆される。そこで本研究では、hHS-M21の構造を解析するとともに、その筋収縮における機能解明を行うことを目的とした。

### 【研究方法】

1. HHS-M21cDNAの単離と構造解析：心筋と骨格筋との間で作製したnormalized subtraction PCR cDNA libraryよりランダムに1,024クローンをシーケンスした。データベースに該当しない配列のうち、2回異常同じクローンが得られたものを中心にRT-PCRで発現の組織特異性を検討した<sup>4)</sup>。その結果、心筋

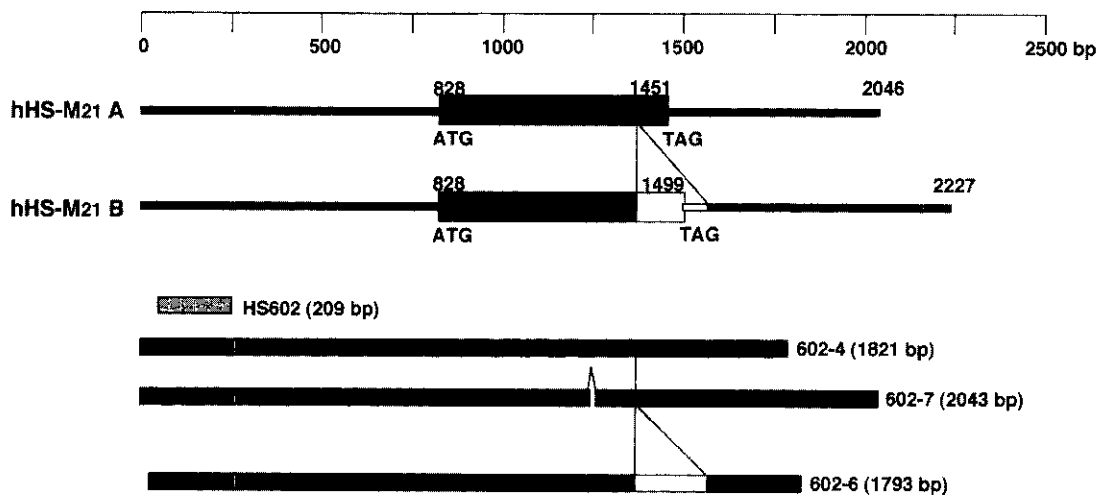


図1 心筋 cDNA library から得られた hHS-M21 cDNA クロンの構造  
2 種の主なアイソフォームの構造を模式的に示す。下段には alternative splicing による 3 種のアイソフォームの構造と、プローブとした HS602 クロンの対応領域を示す。

特異的に発現することが確認された cDNA について、ヒト心筋 cDNA library より全長 cDNA を単離し、そのシーケンスを決定した。

2. hHS-M21 ゲノム構造の決定：hHS-M21 cDNA をプローブとしてヒトゲノム DNA library よりゲノム DNA クロンを単離し、その構造を決定した。また hHS-M21 が筋型 PP1M ラージサブユニット (MYPT2) と同一遺伝子によってコードされることが示唆されたため、LA-PCR を用いて MYPT2 遺伝子断片を増幅し、その配列を決定した。

3. hHS-M21 の機能解析：hHS-M21 全長および種々の部分欠失体を His-tag 融合蛋白として大腸菌内で発現させ、Ni-Resin で粗精製後に HPLC を用いて精製した。精製 hHS-M21 リコンビナント蛋白を用いて、ブタ腎動脈スキンドファイバーおよびラット心筋細胞スキンド標本について、筋収縮の Ca 感受性への影響を検討した。

4. hHS-M21 と MYPT1 および MYPT2 との結合解析：PP1M のラージサブユニットである平滑筋型 MYPT1 および骨格筋型 MYPT2 について、前・中・後の 1/3 ずつに分割したリコンビナント蛋白を flag 融合蛋白として大腸菌に発現させた。この大腸菌抽出物を SDS-PAGE 後 PVDF 膜にトランスファーした後に、種々の hHS-M21 リコンビナント蛋白と結合させ、抗 His-tag 抗体によって hHS-M21 を検出

することで、hHS-M21 と MYPT1 あるいは MYPT2 との結合性を検討した (Far-Western 解析)。

#### 【研究結果と考察】

##### 1. hHS-M21 の同定

心筋特異的に発現することを確認した cDNA 断片 (HS 602) をプローブとしてヒト心筋 cDNA library より単離した cDNA は、alternative splicing によると考えられる 3 種のアイソフォームに分類された (図 1) が、このうち主要なものは 3' 側の 181bp の挿入の有無のみが異なる 2 種であった。シーケンスの結果、これらはトリ PP1M の平滑筋型スモールサブユニット (sm-M20) と高い相同性 (76.8%) を有すること、トリ PP1M 平滑筋型ラージサブユニット (MYPT1) と部分的相同性 (50.9%) を有すること、心筋特異的に発現すること、コードする蛋白の大きさが約 21kD になることから、この遺伝子を hHS-M21 と命名した。さらに全長 hHS-M21cDNA を用いてデータベースを検索したところ、これは PP1M の骨格筋型ラージサブユニット (MYPT2) の 3' 末側配列と同一の配列を有していた。但し hHS-M21cDNA の 5' 末の 355bp は MYPT2cDNA には存在しないため、これらは同一遺伝子の産物であるが、プロモーターが異なるのではないかと推定された。

##### 2. hHS-M21 のゲノム構造の解析

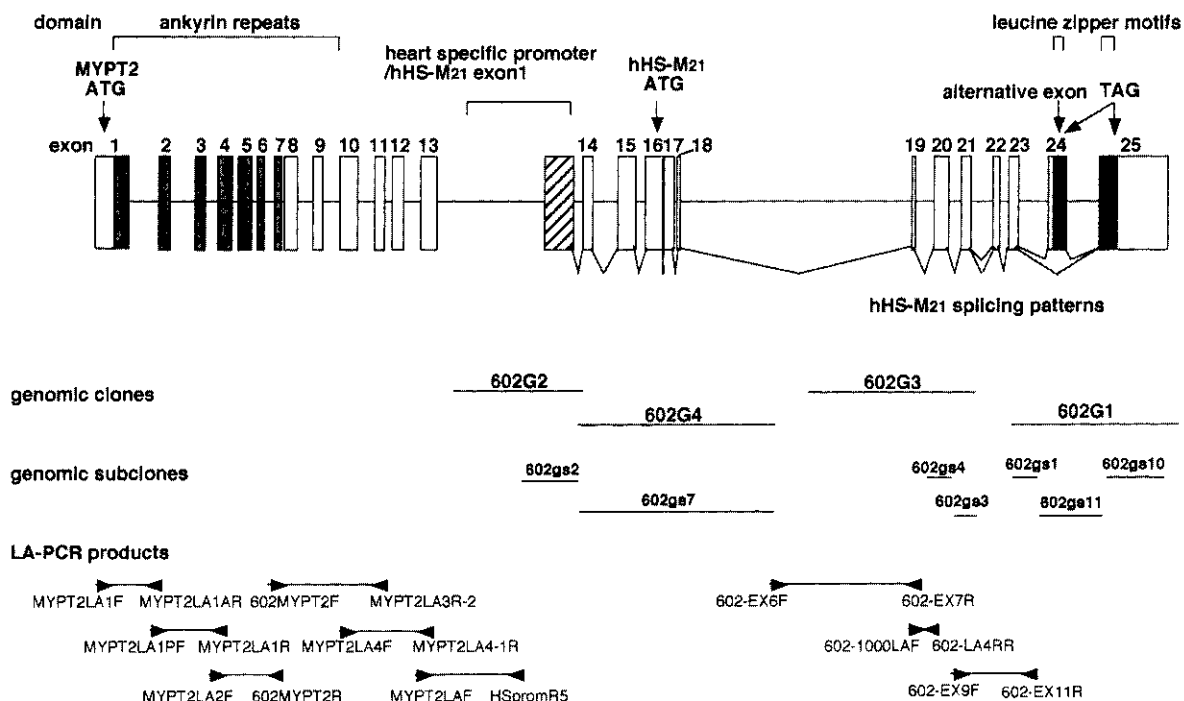


図2 MYPT2およびhHS-M21のゲノム構造

MYPT2ゲノム遺伝子をゲノムDNA libraryからクローン化あるいはLA-PCRによって増幅し、その構造を決定した。上段にはゲノム構造を示すが、MYPT2とhHS-M21は異なるプロモーターからの転写産物である。

hHS-M21とMYPT2とは同じゲノム遺伝子の転写産物であることが示唆されたため、ゲノムDNAライブラリーよりのゲノムクローンの単離およびLA-PCRによるゲノム遺伝子の増幅を行い、エクソン-イントロン構造を決定した(図2)。その結果、MYPT2は全25エクソンで構成されること、hHS-M21はMYPT2の第13イントロン内の心筋特異的プロモーターからの転写産物であること(hHS-M21の第1エクソンがMYPT2の第13イントロン内に存在した)、MYPT2の第14~25エクソンがhHS-M21の第2~13エクソンに対応すること、hHS-M21の主な2アイソフォームはMYPT2第24エクソンのalternative splicingによることなどが確認された。このような遺伝子の使いまわし機構はMLCキナーゼでも知られており、生物ゲノム機能の多様性を示すものである。

### 3. hHS-M21の機能解析

hHS-M21は平滑筋型PP1Mスモールサブユニット(sm-M20)と類似した構造をとる。Sm-M20の機能は最近報告されている<sup>5)</sup>が、ブタ腎動脈スキンド標本を用いた系において、平滑筋収縮のCa感受性を亢進する。またこの亢

進作用はM20のN末側1/2によって担われると報告されている<sup>5)</sup>。そこで我々は、hHS-M21について、種々の領域を含むリコンビナント蛋白を作製した(図3A)。ついで、ブタ腎動脈(図3B)およびラット心筋(図3C)のスキンド標本を用いた筋収縮のCa感受性解析を行った。その結果、hHS-M21の2つの主アイソフォーム(hHS-M21 AおよびB)のいずれともpCa-tension curveの左方偏位、すなわちCa感受性の亢進を来たした。またhHS-M21のC末側のロイシンジッパー構造を欠失したリコンビナント蛋白を用いても同様の結果が得られた。以上より、hHS-M21は筋収縮のCa感受性亢進機能を有すると考えられた。

### 4. hHS-M21とMYPT1の結合性解析

sm-M20による平滑筋収縮Ca感受性亢進作用機序は、sm-M20がPP1Mラージサブユニット(MYPT1)に結合し、その機能を抑制することでPP1M全体の脱リン酸化活性が低下し、その結果としてリン酸化MLCが相対的に増加し、このため筋収縮力が増強するとされている。前記のように、hHS-M21による筋収縮のCa感受性亢進が観察されたが、この作用が

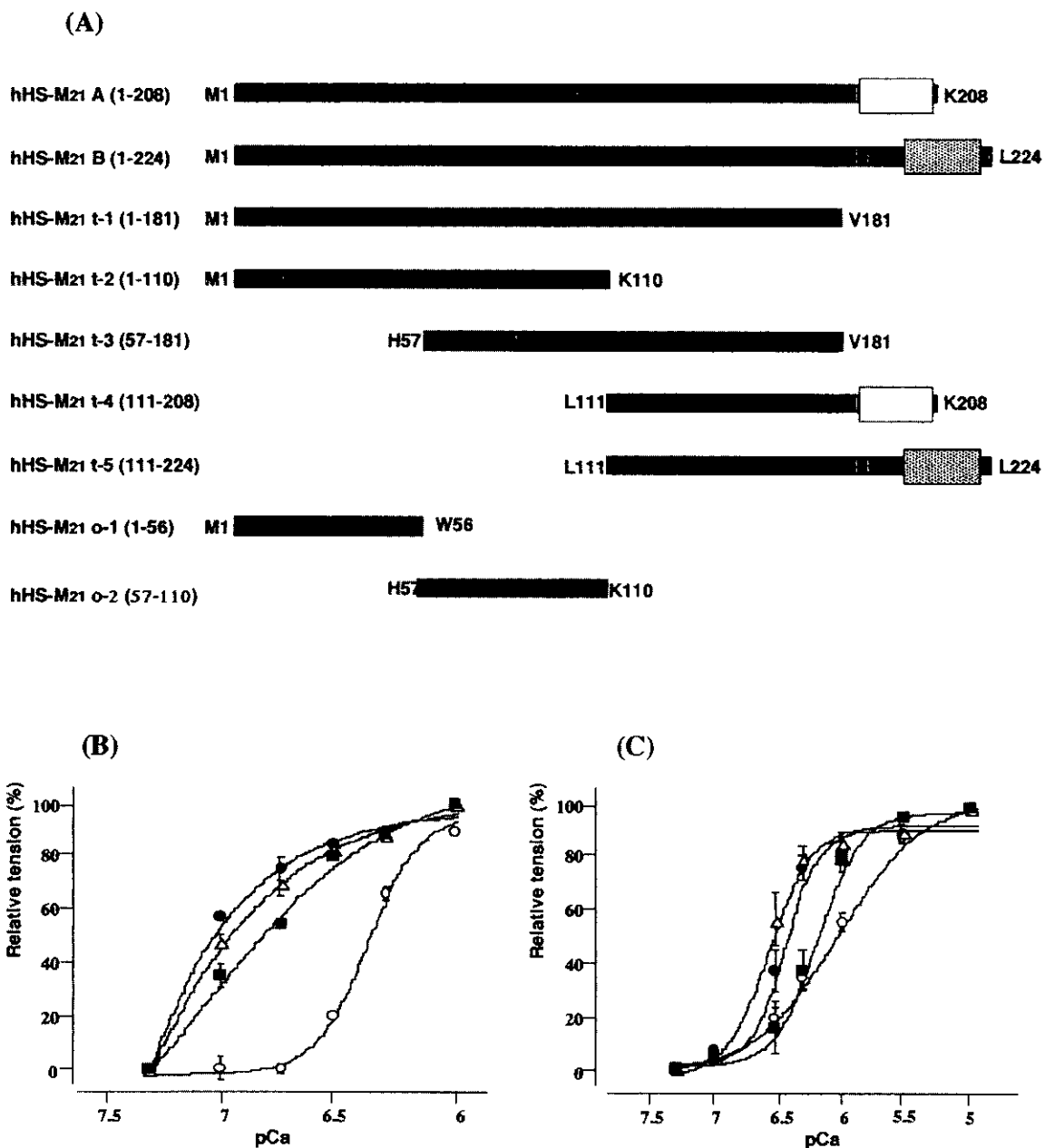


図3 hHS-M21 の機能解析

hHS-M21 について、種々のリコンビナント蛋白を His-tag 融合蛋白として作製した(A)。これを用いて、ブタ腎動脈スキンド標本(B)およびラット心筋細胞スキンド標本(C)について、筋収縮における Ca 濃度の影響(pCa-tension relationship curve)を検討した。

MYPT1 あるいは MYPT2 のいずれへの結合によるのかが不明であるため、Far-Western 解析を行った。その結果、図4に示すように、hHS-M21 は MYPT1 とは結合するが、MYPT2 とは結合しないこと、この結合は hHS-M21 の N 末側 56 アミノ酸部分のみで充分なことが判明した。さらにブタ腎動脈を用いて収縮制御を検討したところ、MYPT1 に結合する hHS-M21 リコンビナント蛋白は、いずれも Ca 感受性

を亢進させることが観察された。すなわち、hHS-M21 は MYPT1 に結合することで筋収縮の Ca 感受性を亢進させると考えられた。このことは、心筋特異的に発現する hHS-M21 が平滑筋においても Ca 感受性亢進作用を示したことをよく説明する。

さらに種々の組織における MYPT1 と MYPT2 の相対的発現量を RT-PCR 解析によって検討したところ、骨格筋では MYPT2 が

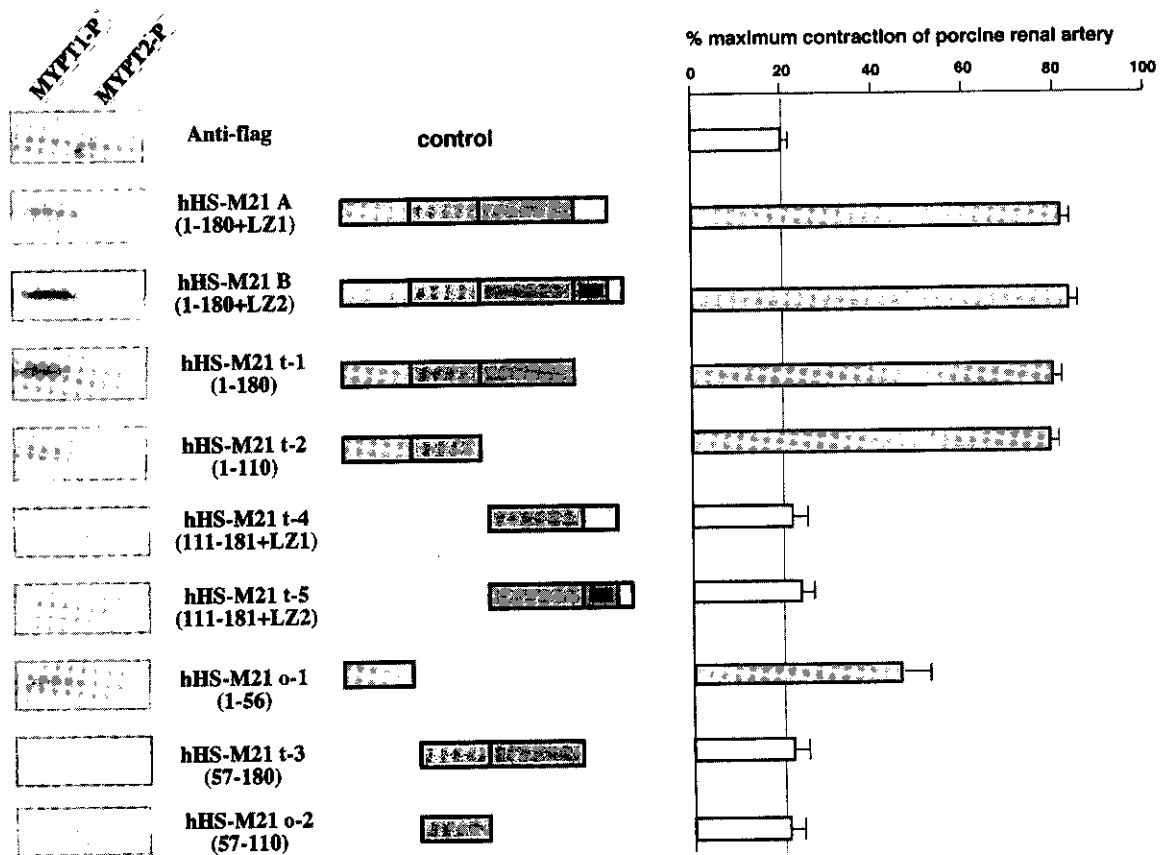


図4 hHS-M21の機能ドメイン解析  
 MYPT1およびMYPT2のリコンビナント蛋白を作製し、SDS-PAGE後にPDVF膜にプロットした。ついで種々のhHS-M21蛋白と作用させた後に洗浄し、抗His-tag抗体を用いてhHS-M21蛋白を検出した(左)。中央はhHS-M21リコンビナント蛋白の模式図であり、右にこれらによる筋収縮増強作用をブタ腎動脈スキンド標本で測定した結果を示す。

主体、股ではMYPT1が主体であるがMYPT2もかなり発現する、子宮や腸などではMYPT1が主体、そして心臓ではMYPT2が多いがMYPT1もかなり発現すること、などが判明した。以上の結果は、hHS-M21がMYPT1との結合を介して心筋収縮のCa感受性を制御する新たな分子であることを示す。これまで心筋の収縮制御においてはトロポニン複合体を介するCa感受性制御が主体であると考えられていたが、本研究によってミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化を介するCa感受性制御機構が存在することが明らかになった。

極めて興味深いことにMLCのリン酸化増強と心肥大との関連が最近示唆されている<sup>3)</sup>が、我々の発見したhHS-M21は、その発現が亢進するとMLCのリン酸化を増強すると考えられる。そこでhHS-M21遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(M21-TGM)を作製した。

これまでに得られた3系統のM21-TGMのうち1系統のファウンダーは明らかな心肥大を来たし突然死した。残る2系統についての解析を現在進行中であるが、いずれにおいても心肥大が観察されているため、これらのM21-TGMは、高血圧を含めた収縮制御機構変化による心肥大および肥大型心筋症のモデルマウスとなると考えられる。

【結論】

心筋収縮のCa感受性亢進は、肥大型心筋症における変異タンパクによる収縮機能変化の共通所見であり、また種々の心肥大シグナルが加わった際の収縮機能変化でもあるが、我々は心筋特異的に発現する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)を発見し、これが心筋収縮のCa感受性を亢進する作用を有することを解明した。

**【参考論文】**

- 1) Kimura A: Molecular genetic aspects of hypertrophic cardiomyopathy in the Oriental. In *The Hypertrophied Heart* (Takeda N, Nagano M, Dhalla NS eds.), pp333-343, Kulmer Academic Publishers, Boston, 2000.
- 2) Kimura A, Ito-Satoh M, Hayashi T, Takahashi M, Arimura T: Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy in the Oriental populations. *J. Cardiol.* 2001, in press
- 3) Aoki H, Sadoshima J, Izumo S: Myosin light chain Kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat. Med.* 6: 183-188, 2000.
- 4) Arimura T, Nakamura T, Hiroi S, Satoh M, Takahashi M, Ohbuchi N, Ueda K, Nouchi T, Yamaguchi N, Akai J, Matsu-mori A, Sasazuki S, Kimura A: Characterization of the human nebulin gene: a polymorphism in an actin-binding motif is associated with non familial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum. Genet.* 107: 440-451, 2000.
- 5) Zhou Y, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H: The exogenously added small subunit of smooth muscle myosin phosphatase increases Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractive apparatus in the permeabilized porcine renal artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254: 158-163, 1999.

## 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

島田俊夫 井上慎一 村上陽  
加藤晴美 公受伸之 石橋豊

島根医科大学第四内科・循環器科

並河徹

同中央臨床検査部

松森昭 篠山重威

京都大学大学院医学研究科循環病態学

### 【要旨】

心ファブリー病はファブリー病の比較的新しい概念であるが、未だ必ずしも独立した概念とは言いがたい。心ファブリー病は古典的ファブリー病よりも頻度的が高いといわれている。しかしながら、心ファブリー病のヘテロ接合体は臨床的には無症状または症状が極軽微なため高齢になるまで診断することが難しい。今回我々は心臓に局限した症状を呈した心ファブリー病の1家系を経験したので若干の考察を加え報告する。今回の研究対象の中心は心ファブリー病のヘミ接合体1人と3人のヘテロ接合体の姉妹である。ヘミ接合体は3人のヘテロ接合体の姉妹の末妹の息子である。この息子が今回の研究の発端者で46歳時に増悪する呼吸困難、起坐呼吸を訴え当院を受診した。心エコー図にて高度の左室肥大が認め、精査目的で心臓カテーテル検査が行われた。心筋生検の光顕像および電顕像からファブリー病が疑われ、白血球の $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの活性の低下から心ファブリー病と確定診断した。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子検索の結果エクソン2の2点での点変異が認められた。症例2は症例1の母であるが肥大型心筋症として治療されていた。突然の失神発作のために当院を受診し、精査の結果心筋生検にて症例1と同様の所見を認め、心ファブリー病と診断した。遺伝子の検索の結果も同様の結果を示した。他の2人のヘテロ接合体の姉妹は肥大型心筋症または肥大型心筋症の拡張相と診断されていた。3姉妹の次女

は生前に行われていた心筋生検組織の見直しにて心ファブリー病と診断された。長女は心筋生検は未施行であったが臨床経過から心ファブリー病と診断した。長女、次女はペースメーカー植え込み後、数年の経過で心不全にてすでに死亡していた。症例1のヘミ接合体の3人の娘は全てヘテロ接合体であるので父方の祖母および祖母の姉達と同様の臨床経過をたどる可能性が高いため遺伝子カウンセリングを含めた治療法についての検討が必要と考えられる。心ファブリー病のヘテロ接合体は高齢になるまで臨床症状が通常無症状か軽微であるので執拗な検索が早期発見のためには必要である。今回の遺伝子変異は古典的ファブリー病ですでに報告されており、2点での点変異以外に表現型を規定する要因が他に存在する可能性を示唆した。根本的治療は遺伝子治療につきるが技術的に未だ確立されておらず、当面はceramide trihexosideの合成阻害剤による治療、移植治療も視野に入れて治療法を確立すべきと考える。

### 【はじめに】

古典的ファブリー病はライソゾームの $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの遺伝的異常により発生する伴性劣性遺伝疾患である<sup>1,2)</sup>。古典的ファブリー病は殆ど $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示さず、初発症状は小児期または成人期に起こり、四肢の遠位部のacroparesthesia、角膜混濁、angiokeratoma、発汗低下、進行的腎、心、中枢神経系の血管障害を特徴としている<sup>2)</sup>。古典的フ



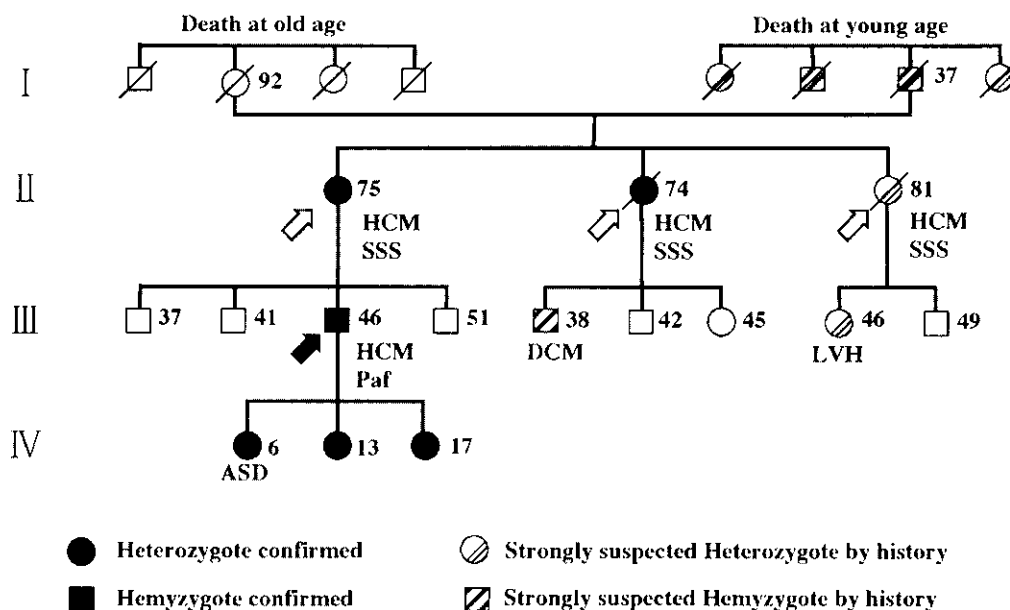


図1 今回の対象症例の家系図を示している。黒の矢印は発端者を示す。ヘテロ接合体の3姉妹は白の矢印で示している。□は男性を、○は女性を示す。黒塗りはファブリ病の確定診断のついた症例を示す。しろ四角はファブリが否定されたメンバーを示す。斜線は状況証拠からファブリ病が強く疑われる症例を示す。

ファブリ病の心病変は糖脂質の進行する蓄積で発症し、主に心筋、弁膜の線維芽細胞に ceramide trihexoside が蓄積し、その結果として肥大型心筋症類似の病態、拡張型心筋症類似の病態、不整脈、僧帽弁閉鎖不全症を生じる<sup>4,5)</sup>。最も一般的死亡原因は血液透析、腎移植の普及する以前は腎不全であった。この種類の治療がなされたとしても、多彩な症状が ceramide trihexoside のゆっくりではあるが進行的蓄積のために発生する。これに反して、心ファブリ病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの残存活性を有しており、通常は無症状か、軽度の症状を呈すにとどまる<sup>5)</sup>。ヘミ接合体の患者は原因不明の心肥大の10%に認められる。ヘテロ接合体の患者は通常は無症状であるか、あっても極軽微な症状を示すにとどまっている<sup>5,7)</sup>。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの残存活性を有するヘミ接合体の患者では晩発性の進行する心筋症が報告されている<sup>5)</sup>。心ファブリのヘテロ接合体の患者の転帰に関しては目下のところ不明であり、心病変は臨床的に明らかでないことが多い。心ファブリ病の突然変異は全てミスセンス変異を示すが、しかし古典的ファブリでは変異が多岐にわたる<sup>9)</sup>。石井等は心ファブリ病の病因として $\alpha$ -ガ

ラクトシダーゼA遺伝子の6番目のエクソンの上流の領域の点変異が密接に関連していると報告した<sup>10)</sup>。同一家系にヘテロ接合体の3姉妹と1人のヘミ接合体の心ファブリ病の患者を認め、その臨床経過が酷似している興味ある心ファブリの一家系を経験したので $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの遺伝子解析の結果を含めて報告する。

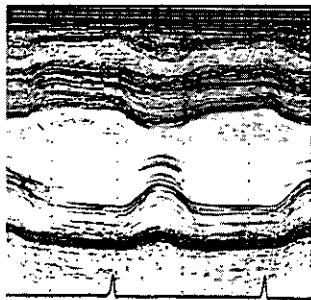
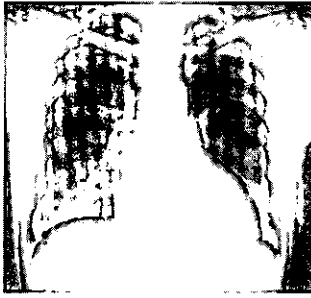
#### 【対象と方法】

同一家系内に見いだされたヘテロ接合体の3姉妹と末妹の息子のヘミ接合体の4人がこの研究の主たる対象となった。これら4人の患者のプロフィールを順序に従い提示する。また、図1にその家系図を示す。

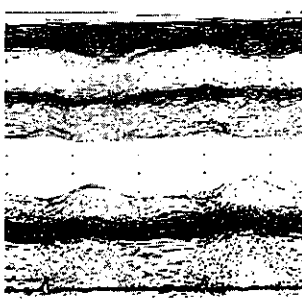
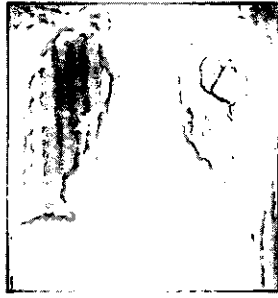
#### 【症例1】

発端者は46歳の男性で3週間に渡り、持続する動悸を主訴として当院を受診した。この動悸は運動と無関係に起こった。近医を受診し、心電図から心房細動と診断された。44歳の時、高血圧、軽度の大動脈弁閉鎖不全症を指摘された。この時、精査を勧められたが46歳になるまで入院精査を拒否していた。父および3人の兄弟には異常は認められなかった。しかしながら、母親(3姉妹の末妹)は5年前から肥大型心筋症の診断を受けている。血圧140/70mmHg、心拍

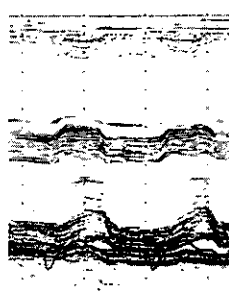
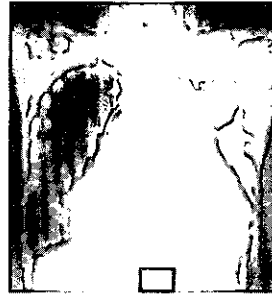
## 症例 1



## 症例 2



## 症例 3



## 症例 4

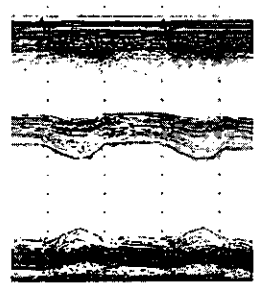


図2 上段は左から症例1～4の胸部レ線を示す。症例2～4は同結節不全症候群のためにペースメーカー植え込み術が行われている。下段は同症例の心エコー図を示す。左室肥大、右室肥大が認められる。

数64整/分。傍胸骨左縁に3度の拡張期雑音を聴取。スリットランプによる眼の検査では角膜混濁は認められなかった。Angiokeratoma, hypoidrosis は認められず acroparesthesia に関しては擬陽性であった。血清クレアチニン1.01mg/dl, 検尿にて尿蛋白陰性。胸部レ線上は胸水なく、心胸郭比57%であった(図2上段)。入院時心電図はII, III, aVF, V4-V6の誘導で陰性T波を認めた。心エコー図は瀰漫性の著明な左室肥大(壁厚20mm)を示した(図2下段)。超音波ドプラー法により中等度の大動脈弁閉鎖不全の存在が指摘された。虚血性心疾患、心筋症の精査目的で心臓カテーテル検査が施行された。心臓カテーテル検査の結果、肺動脈楔入圧13mmHg, 左室拡張末期圧18mmHgと軽度の上昇を認めた。冠動脈造影上は有意狭窄は認められなかった。左室の心内膜下心筋生検組織の光顕所見は心筋肥大と心筋細胞内の空砲化を示した(図3上段)。同組織の電顕組織所見はミエリン様層状構造物の細胞内蓄積を示した(図3下段)。白血球の $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性は2.6nMOL/mgP/h(正常範囲49.8~116.4nMOL/mgP/h)と著明に低下していた。

以上の結果を包括的に判断して心ファブリ病と診断した。

## 【症例2】

症例2は75歳の女性で、失神のため当院へ紹介された。5年前、某病院で僧帽弁閉鎖不全、心肥大の診断を受けていた。入院前日、近医を受診し、アダム・ストークス症候群と診断された。翌日、精査治療目的で入院となった。この患者は症例1の母親(3人姉妹の末妹)である。彼女の母親は92歳まで生きた。母方の親族は全て長寿であった。彼女の父親は37歳の若さで突然死をしている。父の兄、2人の姉妹ともに夭折している。入院時、意識清明、血圧160/80mmHg, 脈拍66整。心尖部に2度の逆流性収縮期雑音を聴取。心胸郭比は71%と拡大していたが肺うっ血は認めなかった(図2上段)。入院時心電図にてII, III, aVF, V1-6で陰性T波を認めた。血清クレアチニンは0.69mg/dl, 尿蛋白陰性。白血球の $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性は53.2nMOL/mgP/h(正常範囲49.8~116.4nMOL/mgP/h)と正常の下限であった。スリットランプによる眼の検査では角膜混濁は認められず、angiokeratoma, hypoidrosis,

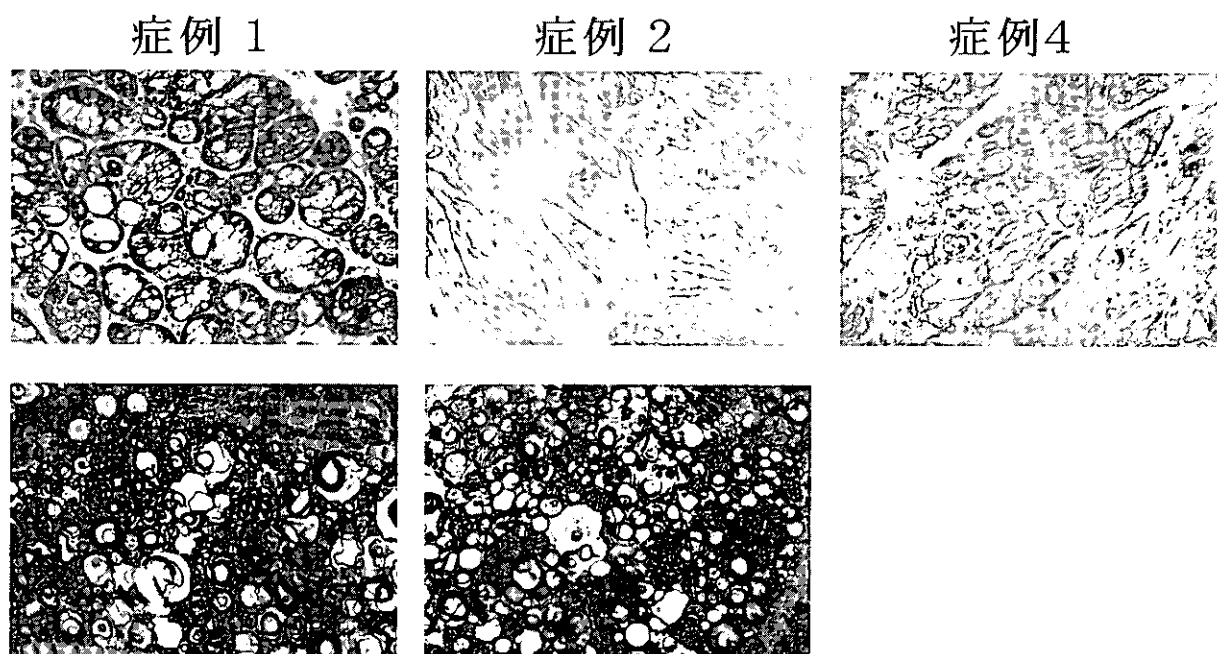


図3 上段は光顕像，下段は電顕像を示している。上段左から症例1, 2, 4のそれぞれの光顕像を示している。心筋内に多数の空胞を認める。下段は左から症例1, 2の電顕像を示している。ライソゾーム内にミエリン様層状構造物を認める。

acroparesthesia も陰性であった。心エコー図上、顕著な左室肥大を認め、拡張末期の心室中隔、左室後壁の壁厚はそれぞれ20.17mmと肥大を認めた(図2下段)。超音波ドプラー法により中等度の大動脈弁閉鎖不全が認められた。虚血性心疾患を除外する目的で心臓カテーテル検査を行い、冠動脈に有意狭窄はなく、肺動脈圧楔入圧、左室拡張末期圧それぞれ10.8mmHgであった。心拍出量は2.81L/min/m<sup>2</sup>、左室造影はほぼ正常の壁運動を示し、駆出分画は57%であった。左室心内膜心筋生検の組織像は電顕、光顕所見ともに息子とほぼ同様の所見でファブリ病と診断した(図3)。電気生理学的検査の結果、洞結節不全症候群と診断し、失神の既往歴もあるためペースメーカーの植え込み術を行った。術後、症状の改善を確認の上、退院となった。

#### 【症例3】

症例3は姉妹の長女で75歳の時、労作時の呼吸困難を主訴に某市立病院に入院した。70歳以来、某病院で心筋症として診断を受け、利尿剤等による薬物治療を受けていた。75歳の時、心不全増悪し呼吸困難となり同病院に入院した。心電図は脈拍数20で極度の徐脈を示し、心エコー図では著しい心肥大が認められた。心室中隔、

左室後壁ともに拡張末期において18mmの壁厚を示した(図2下段)。心臓カテーテルにて肺動脈楔入圧26mmHg、駆出分画は左室造影上44%であった。心内膜心筋生検は患者が拒否したため施行できなかった。高度の徐脈に対してペースメーカーの植え込み術が行われた。症状軽快し、退院した。しかしながら、81歳時、再度呼吸困難増悪し同病院に入院したが治療の介もなく心不全にて死亡した。この際的心エコー図にて重篤な三尖弁閉鎖不全と駆出分画の低下(29%)が認められた。

#### 【症例4】

症例4は3姉妹の真ん中で、呼吸困難の増悪にて当院を受診した。4年前に別の病院で心房細動、肥大型心筋症の診断を受け治療中であった。四肢のacroesthesia, hypohidrosisは自覚していなかった。子供は息子2人、娘1人である。次男は拡張型心筋症の診断を受けているが、残りの2人の娘は今までのところ健康である。入院時心電図は心拍数20/分、心房細動であり、血圧は112/70mmHgであった。両肺底部に湿性ラ音、心尖部でⅢ音聴取。胸部レ線は軽度の肺うっ血を示し、心胸郭比は76%と拡大していた(図2上段)。心電図は心房細動、完全右脚ブロックを示した。血清クレアチニン濃

表1 Primers and PCR conditions used in sequencing of the GLA gene

Exon	primers		anneal. temp/ MgCl <sub>2</sub>	product size (bps)
	Upper	Lower		
1	AACCGTCCCAGTTGCCAGAG	TCCCCAAACACACCCAAACA	60°C/1.5mM	385
2	GGGTTTTTAGGGCGGGAATA	GCCTCGGCCTCCCAAAGTGT	55°C/1.5mM	515
3	TTCTCTCTTTCTGCTACCTC	GCTCAGCTACCATGGCCTCA	55°C/1.5mM	309
4	TAGCCCCAGCTGGAAATTCA	CTTGGTTTCCTTTGTTGTCA	60°C/1.5mM	220
5	AAGTGCCTCCTTTAAACTGT	TGTCAAATAGGAAACAAGC	55°C/1.5mM	301
6	AGGATGCTGTGGAAAGTGGT	TAGTAACATCAAGAGCAAGG	60°C/1.5mM	394
7	AATGAATGCCAAACTAACAG	AGCTTTTAAAGTGAATGGAG	55°C/1.5mM	424

度は1.20mg/dlで尿蛋白は陰性であった。心エコー図は左室肥大を示した。左室拡張末期の心室中隔壁厚は17mm、左室後壁厚は13mmであった(図2下段)。心臓カテーテルの結果、肺動脈楔入圧15mmHg、肺動脈圧は25/15mmHgであった。心内膜心筋生検は症例1、2とほぼ同様の光顕所見を示した(図3)。徐脈治療目的でペースメーカー植え込み術が施行され、症状改善して退院した。2年後心不全が悪化し某病院に入院し治療を受けたが心不全の悪化にて死亡した。

#### 【 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子のシーケンス解析】

遺伝子解析のためのDNAは市販のDNA用キットを用いて抽出した。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子は表1のプライマーを用いて増幅した。PCRの条件は94°C/15secの35サイクルで行った。Microcom YM-100 (Mililipore, Bedford, MA, USA)を用いて純化後にdye terminator サイクル・シーケンス用キットおよびABI Prism 310 遺伝子解析装置 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用してPCR生成物の解析を行なった。PCR増幅に使用されたと同じプライマーをシーケンスの際にも用いた。症例1及び2について遺伝子解析を行い、同一の2点変異を両症例の性染色体の $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子のエクソン2にGlu 66 Gln, Arg 112 Cysの遺伝子変異を認めた(図4)。

#### 【結果および考察】

これまで古典的ファブリ病ではすでに報告されている $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子のエクソン2の2点変異を証明することができた心フ

ァブリ病の1家系を経験したので3世代にわたる家系調査、臨床経過の結果を含め報告した(図1)。よく認められる心血管症状は冠動脈疾患、伝導障害、左室肥大、弁膜症および心不全である。最近、数症例の心ファブリ病に関する報告が散見される<sup>6,8,11)</sup>。これらの報告の多くは男性のヘミ接合体のみを対象として報告している。しかしながら、この病気を有する女性のヘテロ接合体は無症状か、あっても症状は極軽微であるために、これまで報告は殆どなされていないのが現況である。症例2, 3, 4の母親は妹1人と兄、弟をそれぞれ1人ずつ持っていた。彼らは全て長寿であった。しかし、これと反対に彼女達の父親は弟1人、姉妹をそれぞれ1人ずつ持っていた。彼らは全て夭折していた。ファブリ病の家族歴が濃厚で父親が37歳という若さで死亡していることから、彼女らの父親がファブリ病のヘミ接合体患者であった可能性は極めて高い。この事実から、間違いなくこの3姉妹は(彼の娘達)すべてがファブリ病のヘテロ接合体患者と考えられる。症例3に関しては心内膜心筋生検が未施行で確定診断は下せないが状況証拠から心ファブリ病のヘテロ接合体と考えられる。症例3は娘1人、息子2人で、彼女の38歳の次男はすでに数年前から拡張型心筋症と診断され治療中であり、心不全の悪化のため仕事を止めざるをえない状況になっている。以上の状況から、心ファブリのヘミ接合体の可能性が濃厚であるが精査を拒否しているために診断確定には至っていない。娘は2人とも目下はとくに異常を認めていない。症例4は息子1人、娘1人おり、娘は心肥大の存在を指摘されている。彼女も精査を拒否しており確定診断に至ってい

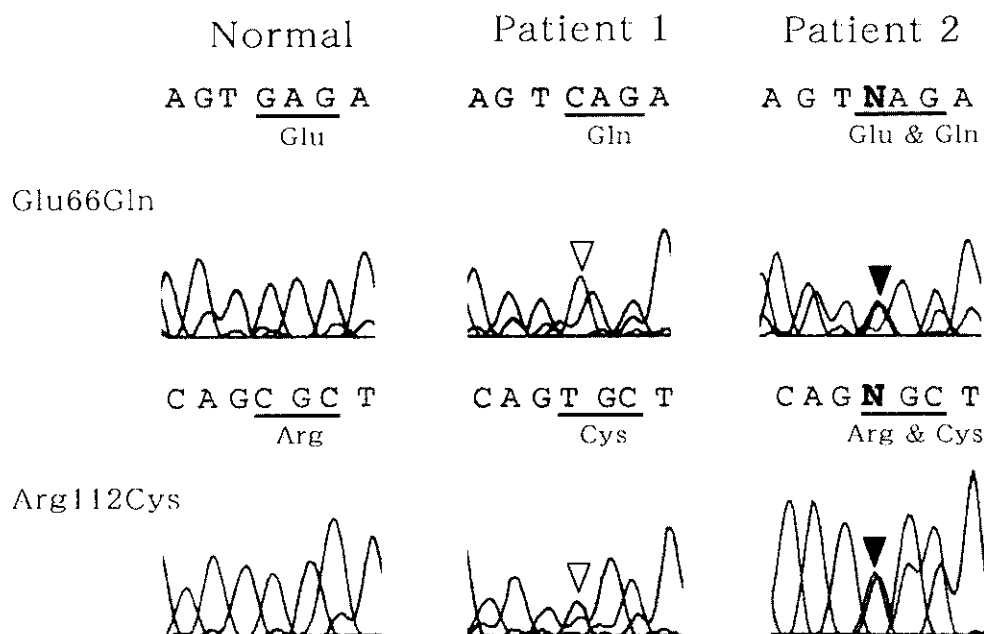


図4 シークエンサーによる遺伝子解析結果を示している。は $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子のエクソン2領域にG-to-CおよびC-to-Tの点変異を認める。この変異に結果コドン66のGlnのGluへの置換、コドン112のCysのArgへの置換が認められた。向かって左から正常者、症例1(心ファブリ病のヘミ接合体)、症例2(心ファブリ病のヘテロ接合体、症例1の母親)を示している。

ないが状況的には心ファブリ病のヘテロ接合体の可能性が高い。症例1は症例2の次男であり、心ファブリ病のヘテロ接合体の娘を3人持っている。この3人の娘達もこのままなら祖母と同様の転帰をとる可能性が高いと思われる。今回の対象の中心となっている3姉妹は加齢につれて著しい心肥大、高度な徐脈を来した。3姉妹全員が洞結節不全症候群による高度な徐脈に対してペースメーカー植え込み術を受けており、僧帽弁閉鎖不全、三尖弁閉鎖不全を併発していた。Ceramide trihexosideの心筋、弁のライソゾーム内への蓄積によると推察している。すでに死亡した症例3、4は僧帽弁閉鎖不全、三尖弁閉鎖不全に対して手術が必要であったかもしれないが高齢でもあり手術は見送られていた。心ファブリ病においてはヘテロ接合体は臨床症状に乏しく高齢になるまで症状が軽微なため発見が難しいこと、血液検査による好中球 $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの活性も正常範囲にとどまることが多いことを念頭に置くことが診断のためのキーポイントである。心ファブリ病のヘミ接合体を見つけたら注意深くヘテロ接合体を検索することが病根絶のためにも重要となる。症

例3、4は生前には確定診断がなされていなかったことからその発見の難しさが伺われる。早期発症の古典的ファブリ病の患者は $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性を通常持たないが、一部の患者では検知しうる $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性を有すると報告されている<sup>6,8)</sup>。晩発性の心筋症を特徴とするヘミ接合体のある者は $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの残存活性を有していると報告されている。2点変異は過去に古典的ファブリ病ですでに報告されている<sup>8)</sup>。この事実はファブリ病の表現型は必ずしも遺伝子変異によってのみ規定されるものでなく他の遺伝子を含む多くの要因により影響されるのかもしれない。ヘテロ接合体は対のx染色体有しており、一方の染色体は欠陥遺伝子をもっており、他方の染色体は正常遺伝子を持っている。x染色体上のいずれの遺伝子(父方由来、母方由来)が活性化されるかは胎生期の細胞分裂時に決定される。この現象はライオニゼーションと呼んでいる<sup>12)</sup>。x染色体に関連した遺伝子の再活性化が加齢とともに起こることはすでに報告されている<sup>13)</sup>。加齢とともにDNA 5-methyldeoxycytidine残基の明らかな喪失は遺伝子の発現を障害し、

動物の肉体的衰えを招いていると理解される。加齢に伴いファブリ病のヘテロ接合体は症状を顕わすようになる。DNA 5-methyldeoxycytidine 残基の明らかな喪失は、なぜファブリ病のヘテロ接合体が加齢とともに症状を示すようになるのかを説明する一つの理由になるかもしれない。いくつかの *in vivo* 酵素置き換え治療に関する試験的研究は、循環している蓄積物質濃度の減少を可能にするか否かを決定するために試みられてきた<sup>15,16</sup>。酵素活性を有する正常血漿がファブリ病のヘミ接合体に投与された。その効果は肝正検により確認された。しかしながら、この種の治療効果は半減期が短いために一時的なものでしかない。胎児の肝臓移植が欠損酵素を補う目的でこれまで3人のヘミ接合体に対して行われた<sup>17</sup>。移植後、血清および好中球の $\alpha$ -ガラクトシダーゼA活性は変化しなかったが尿中、血清中の基質のレベルはわずかに減少し、患者の自覚症状は改善した。この種の治療に関しては結論は長期の結果を待たねばならないと思われる。ファブリ病の根本治療は遺伝子治療によるが確立するのに時間がかかるため、ceramide trihexosideの合成酵素の阻害剤の使用も治療手段として考えられもう一つのシナリオではと思われる。

結論としては、心ファブリ病は古典的ファブリ病が原則として殆ど酵素活性を持たないのとは異なり低いながら酵素活性を有している。しかしながら、ファブリ病の表現型は必ずしも $\alpha$ -ガラクトシダーゼAの点変異によってのみ決定されるのではなくて、他の遺伝子を含む要因により決定されている可能性が高い。無症状な心ファブリ病のヘテロ接合体は加齢に伴う遺伝子の機能低下によりその病態がより鮮明になってくる。ヘテロ接合体の早期診断のためには組織診断、遺伝子診断を含む総合的な検査を考慮することが重要になるとと思われる。

#### 【参考文献】

- 1) Opitz JM, Stiles FC, Wise D, et al. The genetics of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry's disease), and its linkage with Xg(a) locus. *Am. J Hum Genet* 17: 325-342, 1965
- 2) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. 1995. A-Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7<sup>th</sup> edition. C. R. Scriver, A.L. Beaudet and WS Sly editors. McGraw-Hill. New York, USA. 2741-2784
- 3) Burda CD, Winder PR. Angiokeratoma corporis diffusum universale (Fabry's disease) in female. *Am J Med* 1967; 42: 293-301
- 4) Eng CM, Ashley GA, Burgert TS, et al. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol Med* 1997; 3: 174-182.
- 5) Broadbent JC, Edwards WD, Gordon H, et al. Fabry cardiomyopathy in the female confirmed by endomyocardial biopsy. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 623-628.
- 6) Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1995; 333: 288-293
- 7) Rodriguez FH, Hoffman EO, Ordinario AT, Baliga M. Fabry's disease in a heterozygous woman. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 1099: 89-91
- 8) Nagao Y, Nakashima H, Fukuhara Y, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry disease with high residual activity of alpha-galactosidase A. *Clin Genet* 1991; 39: 233-237
- 9) Okumiya T, Kawamura O, Itoh K, et al. Novel missense mutation (M72V) of alpha-galactosidase gene and its expression product in an atypical Fabry hemizygote. *Hum Mutat* 1998; Suppl 1: S213-6.
- 10) Ishii S, Sakuraba H, Suzuki Y. Point mu-

- tations in the upstream region of the alpha-galactosidase A gene exon 6 in an atypical variant of Fabry disease. *Hum Genet* 1992; 89: 29-32.
- 11) von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, et al. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* 1991; 324: 395-9.
  - 12) Lyon M. Gene Action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 1961; 190: 372-373
  - 13) Wareham KA, Lyon MF, Glenister PH, Williams ED. Age related reactivation of an X-linked gene. *Nature* 1987; 327: 725-727
  - 14) Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Gemomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987; 262: 9948-9951
  - 15) Brady RO, Tallmann JF, Johnson WG, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: use of purified ceramide trihexosidase in Fabry's disease. *N Engl J Med* 1973; 275: 289: 9-14
  - 16) Schiffmann R, Knopp J, Austin H, et al. Efficacy and safety of enzyme replacement therapy in Fabry's disease demonstrated by double-blind placebo-controlled trial. *Am J Hum Genet* 2000; 67 (suppl 2): 38
  - 17) Touraine JL, Malik MC, Perrot H, Maire I, Revillard JP, Grosshans E, Traeger J: Fabry's disease: Two patients improved by fetal liver cells. *Nouv Presse Med* 1979; 8: 1499-1503

## C型肝炎ウイルスタンパク質による細胞増殖の制御

下 遠 野 邦 忠

京都大学ウイルス研究所

### 【研究要旨】

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎のみならず心筋症発症の危険因子である可能性が指摘されている。HCVは肝疾患以外に免疫異常も引き起こす。心筋症発症には従って免疫機構の修飾の可能性、およびウイルスの複製そのものが直接関与する可能性考えられる。本研究ではウイルスのタンパク質の機能の中でも特に細胞の増殖を修飾する点をさらに解明することを目指した。特にウイルスコアタンパク質を中心に解析し、一部は他のウイルスタンパク質であるNS5Aについても解析した。

### 【研究目的】

HCV感染により、細胞の増殖がどのように変化するかを調べる事を目的とする。HCV感染による慢性肝炎は、高頻度で肝発がんを引き起こす。その際に、HCVが発がんにどのように関与しているかは、不明な点が多い。同様にHCV感染における心筋症の発症の分子機序も不明である。考えられる機構の一つとして、感染細胞を免疫機構で排除し、傷害を与えることにより引き起こされる組織の機能不全、あるいは、HCVのタンパク質が直接疾患に積極的に関与している可能性が考えられる。これらの点が明らかになれば、疾患の発症に対する対策も可能になり得ると期待される。一方では、HCV感染細胞は傷害性に死滅するのか、あるいは感染を持続し得るのかについても対策を考える上では重要であり、疾患発症機構の解明にも役立つと考えられる。特に、ウイルスがコードしているコアタンパク質が細胞の増殖をどのように制御しているかに焦点をあてて解析し、他のウイルスタンパク質についても解析を行った。

### 【研究方法】

(1)HCV構造蛋白質によるアポトーシスの制御

コアタンパク質を発現する細胞を作成し、それを用いて細胞のアポトーシスへ及ぼす効果を解析する。また、その機序を明らかにする。

(2)HCVコア蛋白質による細胞増殖促進効果  
コアタンパク質には細胞の増殖を正に制御する働きがあることを明らかにしてきた。コアタンパク質を発現する細胞を用いて、その機序についての解析を行う。

(3)HCVコアタンパク質によるNF-kB活性化

HCVコアタンパク質をN-端およびC-端から短くし、得られた変異タンパク質を発現させた細胞におけるNF-kBの活性化を解析する。活性測定はNF-kBプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドを用いて、ルシフェラーゼ活性を測定して求める。さらに種々のコアタンパク質の変異を作成し、コアによるNF-kB活性化の分子機構を明らかにする。

### 【結果と考察】

(1)これまでに他のグループの研究報告から、コア蛋白質は細胞のアポトーシスを抑制したり、感受性を高めたりすると言われている。我々は、コアを産生する培養細胞、HepG2、を用いて、Fas依存的なアポトーシスに及ぼすコア蛋白質の効果調べた。その結果、コアがFas依存的なアポトーシスを抑制する事を明らかにした。その際に、転写因子の一つであるNFkB活性が増強している事を明らかにした。NFkB活性はコア単独あるいは抗Fas抗体で処理した細胞では少しの増強しか観察されないが、コアを発現している細胞を抗Fas抗体で処理すると活性が促進される。その際に、NFkB活性を抑制するとアポトーシスの抑制がかからなくなる。従って、HCVに感染した肝細胞に対してFas/FasLによるアポトーシスを負に制御するが、その際に、NFkBの活性化が重要で



ある可能性が考えられた。

(2)HCV コアタンパク質が細胞の増殖を正に制御するという報告はこれまでに幾つかの研究グループが報告している。それらの主なものは、ラット胎児繊維芽細胞をトランスフォームするというものであるが、別のグループは否定的な報告をしている。我々は、コアタンパク質を持つ細胞増殖効果を明らかにする目的で、実験を行い以下の成果を得た。HCV 蛋白質をクローン化された Balb/3T3 に導入し、細胞の増殖効果を調べた。本細胞株は接触増殖が阻止される性質を持つと同時に、活性化 H-Ras と c-myc 遺伝子を共発現させると、足場非依存的な増殖をする性質を持つ。この細胞に、活性化 Ras と同時にコア蛋白質を発現させると、細胞は血清無添加状態に於いても、増殖活性を示した。コア単独あるいは、活性化 H-Ras 単独ではこのような効果はみられない。この細胞にコアを産生する遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを加え、コア蛋白質の産生を抑制させると細胞の増殖特性は失われた。従って、コアを発現するプラスミドが細胞染色体へ組み込まれた結果引き起こされた細胞の増殖促進ではないことが明らかである。この細胞に於いては、EGF などの増殖因子により Ras-Raf1 の経路で転写活性化される遺伝子の活性化がみられる。この遺伝子の活性化は、コア単独を発現させた細胞を EGF 処理した場合、コアと活性化 H-Ras を同時に産生させた細胞でも同じようにみられることから、コア蛋白質が Ras-Raf1 の経路に作用し、細胞の増殖促進に働いていると考えられる。

(3)コアタンパク質の C-端を約40アミノ酸欠失させると NF-kB の活性化機能がなくなった。この状態のコアタンパク質の細胞内局在は細胞質から核内に変化した。コアタンパク質の C 端側に活性化に必要な配列がある可能性、および C 端側の欠失によりコアタンパク質の細胞内局在が変化したために活性化できなくなった可能性が考えられる。このことを調べるために、C 端から40アミノ酸残基を除いたコアタンパク質の細胞内局在を変化させ、そのものについて NF-kB の活性化を調べた。コアタンパク質を

核内から細胞質へ移行するようにした場合、NF-kB の活性が幾分回復した。細胞質の小胞体膜に局在するようにしたものでは、本来のコアタンパク質と同じ程度の活性化能を回復した。このことにより、コアタンパク質は細胞内の局在の違いにより NF-kB の活性化に影響を与えることが分かった。特に小胞体膜に局在させることにより、もともと同じ程度に活性化能が回復したことは、小胞体膜上におけるコアの働きが NF-kB の活性化に寄与していることを示す。現在この詳細な機構を解析するためにコアタンパク質と相互作用する細胞側の因子の解析を行っている。

これらの結果は、断片的であるが、HCV 感染が細胞に対して種々の経路からの増殖制御を行っている事を示唆している。さらには、HCV 感染による肝炎状態においてウイルス蛋白質が細胞増殖の性質を変化させる結果、肝炎という疾患に質的な変化をもたらしている可能性が考えられる。

#### 【結 論】

HCV 感染が心筋症を発症する際に、ウイルスタンパク質が直接作用する可能性が考えられる。コアタンパク質について主に解析を行ったが、その他の HCV タンパク質も細胞の増殖を制御している可能性が考えられる。これらの作用が総合的に作用して、疾患が発症する可能性が考えられるが、今後は実験動物系の開発を行いこの可能性を調べる必要がある。

#### 【参考文献】

- 1) Forns X, Bukh J., The molecular biology of hepatitis C virus. Genotypes and quasispecies. Clin Liver Dis. 1999, 3: 693-716
- 2) Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, Kawai S, Sasayama S., Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. Lab Invest. 2000, 80: 1137-1142.
- 3) Matsumori A., Hepatitis C virus and cardiomyopathy. Herz. 2000, 25: 249-254.
- 4) Tanaka H, Tsukuma H, Yamano H,

- Okubo Y, Inoue A, Kasahara A, Hayashi N., Hepatitis C virus 1b(II) infection and development of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. *J Epidemiol.* 1998, 8: 244-249.
- 5) Matsumori A, Matoba Y, Nishio R, Shioi T, Ono K, Sasayama S., Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy., *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 222: 678-682.

## 実験的ラットウイルス性心筋炎に関する基礎的研究

武田 信 彬 武田 淳 史

東京慈恵会医科大学青戸病院内科

佐藤 成 大

岩手医科大学細菌学

### 【要 旨】

ラットにウイルス性慢性心筋炎を生じさせることができるかを検討した。生後1～2日のSD, Wistar, Fisher ラット各9匹にCoxsackie B3 virus (CVB3) (106 PFU)を腹腔内投与した群, 同数の対照群(Control)を4～6ヶ月飼育し, 病理組織学的観察とウイルスゲノムの検索を行った。光顕による病理組織学的観察, CD4, CD8, MHC class I, MHC class II のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検索, rapid in situ hybridization 法によるCVB3ウイルスゲノム検索を行った。病理組織学的には心臓の心内膜直下に線維化がみられるのみで心筋細胞の脱落, 同部の置換性線維症は見られなかった。CVB3ウイルスゲノム検索ではすべてのラットで陰性であった。また, 免疫組織化学的検索では, 対照群と比較して, CD4, CD8 陽性細胞が数個単位で集簇しているのが散見された。MHC class I は対照群と同様ほとんど陰性であったが, class II はCVB3投与群でわずかに陽性を示した。結局, CVB3投与後数ヶ月の時点ではあきらかな心筋炎の持続は認められなかった。

### 【目 的】

心筋炎と心筋症の関連検索のためこれまでウイルス性心筋炎モデル動物を使用して研究が行われてきた。特にマウスやハムスターを用いたコクサッキー B3 ウイルス(CVB3)感染心筋炎では, しばしばヒト同様の心臓への後遺症的变化を残すことが広く知られている。一方, ラットにおいてはウイルス感染に強い抵抗性を有するため, 心筋炎モデルとしては用いられて来なかったという経緯がある。しかし, ラットは免

疫組織学的にヒトと共通抗原を有することから, ラットでの実験的ウイルス性心筋炎の発症が成功するとヒトでの研究にもフィードバックすることができる。そこで本研究の目的はラットにウイルス性慢性心筋炎を実験的に発症させ得るかということである。

### 【方 法】

生後1～2日のSD, Wistar, Fisher ラット各9匹にCoxsackie B3 virus (CVB3) (106 PFU)腹腔内投与群と, 同数の対照群(Control)を4～6ヶ月飼育し, その後ペントバルビタール麻酔下で心臓を摘出して以下の実験を行った。

#### 1. 組織学的観察

ホルマリン固定を行った心臓から5 $\mu$ mの厚さの切片を作り, Masson trichrome 染色を行い, 光顕にて観察。

#### 2. 心筋組織内細胞浸潤の検索

4 $\mu$ mの凍結切片にて抗CD4, 抗CD8, 抗MHC class I, class II モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。

#### 3. 心筋内ウイルスゲノムの検出

従来のin situ hybridization に比べて短時間かつ安定性のあるビオチン標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたrapid in situ hybridization を用いて検索を行った。心臓をホルマリン固定後, パラフィン包埋した組織から厚さ3 $\mu$ mの切片を作製し, ウイルスゲノムの検索を行った。

### 【結果と考察】

組織学的検索ではCVB3投与群は心内膜直下に線維化がみられるのみで, ヒトで観察される散在性の心筋細胞脱落, 同部における置換性

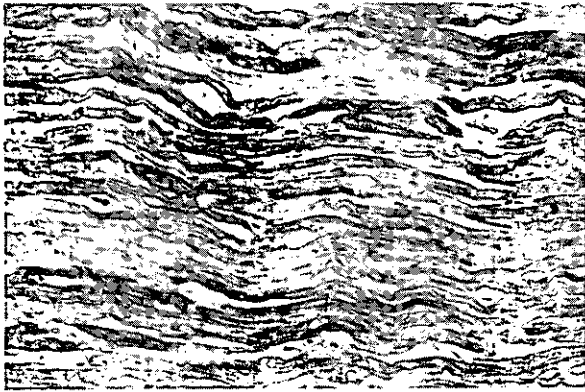


図1



図3



図2

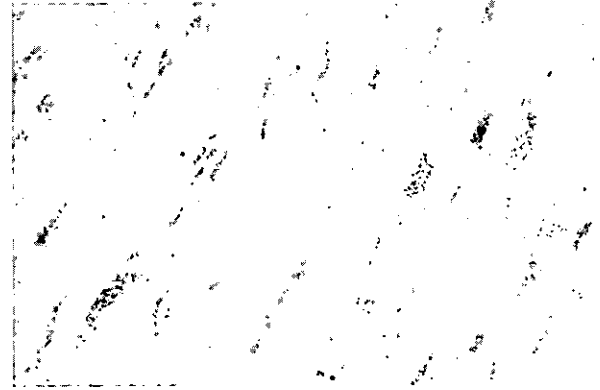


図4

線維症の存在は認められなかった(図1: Control, 図2: CVB3投与群, 400倍). 免疫組織学的検索では対照群と比較してCD4, CD8陽性細胞が数個単位で集簇しているのが散見された(図3: CD8陽性...CVB3投与群, 図4: CD8陰性...Control). MHC class Iは対照群同様ほとんど陰性であったが, class IIはCVB3投与群でわずかに陽性を示した. CVB3投与後2週間以内の急性期では光顕による組織学的観察では明らかな変化がないものの, ウイルスゲノムは心筋内に陽性であったことに比べると, 今回の結果は慢性的変化は乏しいことを示している. ウイルス接種量, 他のウイルスの追加接種など工夫が必要と思われる.

#### 【結論】

ラットに対するCVB3腹腔内接種後数ヶ月(慢性期)の観察ではあきらかな心筋炎の持続は認められなかった.

#### 【参考文献】

1) Takeda A, Sakata A, Takeda N: Detec-

tion of hepatitis C virus RNA in the hearts of patients with hepatogenic cardiomyopathy. *Moll Cell Biochem* 195: 257-261, 1999.

- 2) 武田淳史, 四方千裕, 田中康之, 林裕作, 武田信彬: Rapid in situ hybridization法による急性心筋炎心筋組織内ウイルスゲノムの検索. 厚生省特定疾患—特発性心筋症調査研究班—平成10年度研究報告集, 95-99, 1999
- 3) 武田淳史, 林裕作, 田中康之, 四方千裕, 武田信彬: Rapid in situ hybridization法による特発性心筋炎症例の心筋組織内ウイルスゲノム検索. 厚生省特定疾患—特発性心筋症調査研究班—平成10年度研究報告集, 100-103, 1999
- 4) 武田淳史: 核酸検出のためのin situ hybridization法. 続心臓代謝実験法, 六法出版, 東京, 1998: 498-504.