

心筋症の病因となるミトコンドリア遺伝子変異の選択的除去

田中 雅嗣

岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部

【研究要旨】

ミトコンドリア心筋症患者の組織・細胞においては、変異型 mtDNA と野生型 mtDNA が共存している(ヘテロプラスミー)。変異型 mtDNA の割合が一定の閾値を越えた場合にミトコンドリア機能異常がもたらされる。従って、変異型 mtDNA のみを選択的に破壊・減少させ、野生型 mtDNA を細胞内で優位に立たせれば、完全な遺伝子治療法となる。本研究では、変異型 mtDNA のみを切断する制限酵素をミトコンドリア移行シグナルとの融合タンパクとして細胞質内で合成させ、ミトコンドリア内へ選択的に運び入れた。ミトコンドリア病患者より採取された線維芽細胞を骨肉腫由来の mtDNA を欠如した細胞と細胞質融合させ、8993T→G 変異を有するサイブリッドを確立した。制限酵素 SmaI とミトコンドリア移行シグナルペプチド cDNA の融合遺伝子の構築するために、まず制限酵素 SmaI 遺伝子をセラチアの DNA から PCR 増幅しクローン化した。酵母の cytochrome c oxidase の第 4 サブユニットの移行シグナル(pCoxIV)の遺伝子に制限酵素 SmaI 遺伝子を結合した。この融合遺伝子をベクターに挿入し発現プラスミドを得た。SmaI 遺伝子発現により変異型 mtDNA を排除するために、8993T→G 変異を有するサイブリッドに pCox-SmaI 融合遺伝子を陽電荷リポソーム法を用いて導入した。その結果、変異型 mtDNA が選択的に破壊され、少量の野生型 mtDNA が残存した。3 週間培養を継続することにより、野生型 mtDNA 量が正常レベルまでに回復した。変異型 mtDNA の破壊によってミトコンドリア膜電位が一時的に低下したが 3 週間で回復し、同時に細胞内 ATP レベルの正常化が観察された。変異型 mtDNA を選択的に排除する遺伝子治療法が確立された。

【研究目的】

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の点変異あるいは再配置は、多様な疾患の重要な病因である。現在のところ、mtDNA 変異を有する患者に対する有効な治療法はない。

Holt らは mtDNA のヘテロプラスミーを伴うミトコンドリア病を報告した。この NARP 病は Mt8993T→G によって惹起される。これらはミトコンドリアの ATP 合成酵素の a サブユニットにアミノ酸置換 Leu156Arg をもたらず。これらの変異は Leigh 氏病の患者でも検出される。疾患が顕在化するためには、変異型 mtDNA のレベルがある閾値を越える必要がある。ヘテロプラスミーが存在し、かつ、これらの変異が劣性を示すので、変異型 mtDNA を選択的に破壊し、野生型 mtDNA だけを増殖させることによって患者を治療することが可能である。

制限酵素はそれぞれの標的配列に対して高い特異性を示すので、我々はその特異性をミトコンドリア病の遺伝子治療へ利用しようとした。ここに、我々はミトコンドリアを標的とした制限酵素が変異型 mtDNA を特異的に破壊し、それによって野生型 mtDNA の増殖を促すことができることを提示する。

【研究方法】

1) 8993変異を有するサイブリッドの構築：Leigh 脳症の患者より採取された線維芽細胞を骨肉腫由来の mtDNA を欠如した細胞(ρ^0 206)と細胞質融合させ、8993T→G 変異を有する不死化細胞系 NARP3-1(変異型 98%)および NARP3-2(変異型 60%)を確立した。

2) 制限酵素 SmaI とミトコンドリア移行シグナルペプチド cDNA の融合遺伝子の構築：制限酵素 SmaI 遺伝子を *Serratia marcescens* の菌株の DNA から PCR 増幅しクローン化した。

酵母の cytochrome c oxidase の第 4 サブユニットの移行シグナル(pCoxIV)の遺伝子に制限酵素 SmaI 遺伝子を recombinant PCR 法を用いて結合した。この融合遺伝子を SV40 プロモーターを持つベクター(pMACSK^{II})に挿入し発現プラスミドを得た(pMACSK^{II}-pCoxIV-SmaI)。同様に制限酵素 EcoRI をミトコンドリアに送り込むプラスミド pMACSK^{II}-pCoxIV-EcoRI を構築した。

3) SmaI 遺伝子の発現と変異型 mtDNA の排除：8993T→G 変異を有するサイブリッド NARP3-1 に pCox-SmaI 融合遺伝子を陽電荷リポソーム法を用いて導入した。

【研究結果】

我々は、最初にサイブリッド細胞株 NARP3-1 を確立した。このために、Leigh 病患者の線維芽細胞のミトコンドリアを、mtDNA を有しない骨肉腫細胞株に細胞質融合によって導入した。サイブリッド NARP3-1 は変異型 mtDNA の割合が高かった(約 98%)。サイブリッド NARP3-1 の ATP 含量は野生型 mtDNA を有する 143B 細胞の ATP 含量の 70% であった。サイブリッド NARP3-1 のミトコンドリア膜電位は 143B 細胞よりも顕著に低かった(69%)。

SmaI をミトコンドリアに送り届けるために、我々は SmaI 遺伝子をシグナルペプチドを規定する塩基配列と融合し、この融合遺伝子を哺乳類発現ベクターに挿入した。サイブリッド NARP3-1 に融合遺伝子を含むプラスミドを用いて遺伝子導入を行うと、変異型 mtDNA が完全に排除され、痕跡程度の野生型 mtDNA のみが検出された。この段階で、遺伝子導入されたサイブリッド NARP3-1 は ρ^0 細胞に類似していた。すなわち、サイブリッド NARP3-1 は低いミトコンドリア膜電位を示した。これは野生型 mtDNA の欠乏のためである。変異型 mtDNA の割合が低いサイブリッド NARP3-2 に遺伝子導入を行った場合には、サイブリッド NARP3-1 に遺伝子導入を行った時に観察されたミトコンドリア膜電位の一過性低下を経過せずに、膜電位の上昇が観察された。

野生型 mtDNA が変異型 mtDNA の破壊の

後に増殖するかどうかを調べるために、我々は遺伝子導入されたサイブリッド NARP3-1 の培養を 3 週間続けた。その結果、野生型 mtDNA は第 23 日までに顕著に増殖した。この野生型 mtDNA の増殖は、ミトコンドリア膜電位と細胞の ATP 含量の正常化を伴っていた。融合遺伝子を挿入していない対照プラスミド pMACSK^{II} を用いた場合には、変異型/野生型 mtDNA の割合、ATP レベル、ミトコンドリア膜電位に有意な変化は観察されなかった。

Mt8993T→G 変異は F_0F_1 -ATPase のプロトン輸送活性のみに影響を与えるので、サイブリッド NARP3-1 細胞は呼吸鎖の異常を示さない。この呼吸鎖はミトコンドリア膜電位の形成に主要な役割を果たしているものである。サイブリッド NARP3-1 の場合には、遺伝子導入によって変異型 mtDNA が急速に排除されるのに伴ってミトコンドリア膜電位が顕著に低下した。これとは対照的に、同じプラスミドを生体電気穿孔に用いた場合には、その効果はハムスターの骨格筋においては穏やかであった。遺伝子導入の 1 ヶ月後にチトクローム c 酸化酵素活性のわずかな低下を検出できたのみであった。これはおそらく、骨格筋におけるこの酵素のサブユニットの代謝回転が緩徐であるためと推定された。

【考 察】

変異型 mtDNA を特異的に認識する制限酵素をミトコンドリアに送り込むという手法は、ミトコンドリア病の遺伝子治療に向けた全く新しい戦略である。この戦略の特長は、制限酵素の一過性発現によって変異型 mtDNA の排除を十分に達成できる点である。ひとたび変異型 mtDNA が排除されると、野生型 mtDNA が細胞内の主要な集団となり、その結果ミトコンドリアゲノムが変異型から野生型に完全に転換される。

我々は、ミトコンドリアに運び込まれた外来性エクソヌクレアーゼが核 DNA に毒性を示さないことを確認した。この現象は、ミトコンドリアのマトリックスあるいは膜間腔に存在する内在性エクソヌクレアーゼあるいはプロテアーゼが、ある種の病的な条件下以外では核 DNA

あるいは細胞の蛋白質を攻撃しないという事実に関連しているであろう。

プラスミド DNA を注入し生体電気穿孔法を行えば、変異型 mtDNA を骨格筋から排除することができ、これによって、高乳酸血症のような全身的代謝異常を改善することができると期待される。骨格筋における代謝の正常化によって神経症状が改善される可能性がある。今後、ウイルスベクターの利用など、より効率の良い方法と組み合わせ、心筋への遺伝子導入を試みたい。

【結 論】

以上の実験によって、変異型 mtDNA を選

択的に排除する遺伝子治療法の基礎が確立された。

【参考文献】

- 1) Holt, I. J., et al. *Am J Hum Genet* 46, 428-3 (1990).
- 2) Sakuta, R. et al. *Ann Neurol* 32, 597-8 (1992).
- 3) Trounce, I., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8334-8 (1994).
- 4) Obayashi, T. et al. *Am Heart J* 124, 1263-69 (1992).

タコツボ型心筋症の本邦報告例 ならびにアンケート調査集計の検討

河合 祥雄 鈴木 宏昌 代田 浩之
順天堂大学循環器内科

【研究要旨】

タコツボ心筋症報告127施設に緊急冠状動脈造影もしくは急性心筋梗塞疑い症例中の本病態の頻度に関し、全国諸施設にアンケート調査を行い、抄録例を加えて分析した。53施設より回答があり(回答率42%)、重複症例を除外し、把握しえたタコツボ心筋症例総数は466例。性比は1:7と女性優位、平均年齢は男性68.0歳、女性69.2歳で、女性で僅かに高齢。頻度は急性心筋梗塞疑いまたは緊急冠状動脈造影症例の0.3%から6.25%(平均2.3+/-1.7%)を占めた。誘因記載例中、精神的ストレスの関与は男性15%(2/13名)に対し女性44%(28/63名)と女性優位で、逆に手術・挿管などの身体的苦痛を伴う侵襲は男性優位(7/13名対20/63名)であった。緊急冠状動脈造影施行例の男性優位を考慮すると、女性緊急造影例での頻度は少なくとも3%以上と想定された。精神的ストレスの性比が初めて確認された。

【背景】

「タコツボ心筋(症)」¹⁾として報告されている、ST上昇を伴う心尖部を中心とした広範な左室壁運動一過性低下症例では、心基部の過収縮を伴うことがその特徴をなす。タコツボ心筋症は未だ十分には知られていない病態であり、本疾患に関する論文、総説は数えるほどしかなく²⁻⁴⁾、しかも、欧米では僅かしか報告がない。循環器科専門施設では決して稀な病態ではないが、各施設での最頻値は5例であり、症例数も限られる。タコツボ心筋症の多数例に基づく、頻度、性比を含めた臨床的検討はない。

【目的】

タコツボ心筋症(Ampulla-type Cardiomyopathy)⁵⁾の臨床病態を明らかにすることを目的

とした。

【対象と方法】

日本循環器学会誌やその他の雑誌の抄録、症例報告、研究論文よりタコツボ心筋症と思われる症例を抽出し、検討した。

加えて、2000年8月中旬に学会報告をした全施設に、本症例の症例数、性別、年齢ならびに緊急冠状動脈造影もしくは急性心筋梗塞疑い症例中における本病態の頻度に関するアンケートを郵送し、その回答を検討した。

【結果】

127施設から ampulla-type cardiomyopathy の報告があった。アンケートは53施設より回収された(回収率42%)。症例数の最多施設は60 cases 山田赤十字病院循環器科で、男性10名、女性50名の計60例であった。次いで広島市民病院内科の28例、自治医科大学付属大宮医療センター循環器科の11例、広島市立安佐市民病院循環器科の11例が続いた。

学会症例報告例との重複症例を除外し、現時点で把握できたタコツボ心筋症例総数は466例であった。男女比は記載457症例では男性55例;女性402例で、性比は1:7と女性優位であった。平均年齢は男性68.0+/-9.3歳(33例)、女性69.2+/-11.3歳(205名)で、女性で僅かに高齢であった。

実数提示施設に限定した頻度(有病率)は急性心筋梗塞疑いまたは緊急冠状動脈造影症例の0.3%から6.25%(平均2.3+/-1.7%)を占めた。粗平均は1.3%であった(表)。

タコツボ心筋症の誘因を記載してある症例中、夫、息子、姉の突然死、家庭内トラブル(娘の過食症、息子の借金)、高度な疲労、パニック、強盗に殺すと脅される、同僚との口論、不安神

表 Ampulla-type cardiomyopathy の頻度

1/ 300	(0.3 %)	大垣市民病院循環器科
1/ 180	(0.6 %)	北信総合病院循環器内科
1/ 140	(0.7 %)	奈良県立医大第1内科
11/1085	(1.0 %)	自治医科大学附属大宮医療センター循環器科
1/ 90	(1.1 %)	大阪府立中河内救命救急センター
5/ 450	(1.1 %)	日本医科大学第一内科
28/2500	(1.1 %)	広島市民病院内科
3/ 247	(1.1 %)	武蔵野赤十字病院循環器科
3/ 200	(1.5 %)	聖マリアンナ医科大学循環器内科
3/ 184	(1.6 %)	愛媛県立今治病院循環器科
4/ 217	(1.8 %)	国立神戸病院内科
11/ 577	(1.9 %)	広島市立安佐市民病院循環器科
1/ 36	(2.8 %)	金沢大学医学部第二内科
2/ 61	(3.0 %)	横浜市立港湾病院内科
6/ 171	(3.5 %)	亀田総合病院循環器科
5/ 200	(3.5 %)	国際親善総合病院循環器内科
3/ 70	(4.3 %)	東大病院 老年病科・循環器科
1/ 18	(5.6 %)	近江八幡市民病院内科
3/ 48	(6.25%)	和泉市立病院内科
93/6774	(1.3 %)	
Mean 2.3%		

経症，自殺企図(溺水)などの精神的ストレスの関与は男性 15%(2/13名)に対し女性 44%(28/63名)と女性優位であった。

逆に腹部手術，内視鏡，気管支鏡，挿管，事故での頸を絞められる，気胸など，身体的苦痛を伴う侵襲は男性 54%(7/13名)，女性 32%(20/63名)と男性に多い傾向を認めた。

その他に誘因・基礎疾患として，カテコラミン， β 刺激薬投与 5 例；uillain-Barr 症候群症候群に合併した症例報告⁶⁾が 3 例存在した。

女性緊急冠状動脈造影施行例でのタコツボ心筋症の頻度

タコツボ心筋症男性患者数を m ，女性患者数を f とし，緊急冠状動脈造影施行男性患者数を M ，女性患者数を F とすると，タコツボ心筋症の男女比 A は m/f ，タコツボ心筋症の緊急冠状動脈造影施行患者中の頻度： B は $(m+f)/(M+F)$ と表される。緊急冠状動脈造影施行患者中の男女比 x は M/F と表され，女性緊急冠状動脈造影施行例でのタコツボ心筋症の頻度 (y) は $y=B/(A+1) \cdot (x+1)$ の， x の一次関数として表すことができる(図)。

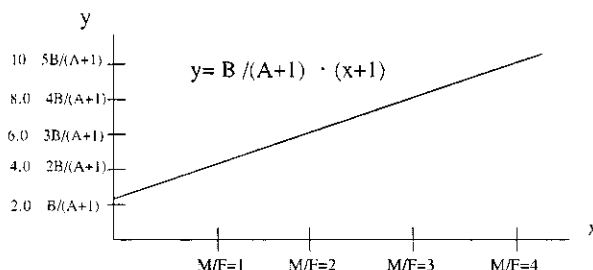


図 女性緊急冠状動脈造影施行例でのタコツボ心筋症の頻度の推定式

緊急冠状動脈造影施行患者中の男女比が健康人の性比と同じく 1 と仮定した場合には，女性緊急冠状動脈造影施行例でのタコツボ心筋症の頻度は 3% を超え，通常の施設での緊急冠状動脈造影施行患者における男性優位(本院では 4:1 以上)を考慮すると，緊急冠状動脈造影施行女性患者中のタコツボ心筋症の頻度は 3% の数倍に当たると推定された。

【考察】

基礎病態で，カテコラミン⁷⁾， β 刺激薬使用，Guillain-Barr 症候群の存在は，発症における心臓神経の異常を推定させる⁴⁾。しかしながら，心尖部のバルーン状 asynergy と心室基部の

hypercontractile state などの左心室収縮異常は心臓神経分布に合致しない⁴⁾。従って、心尖部心筋細胞の β adrenergic 受容体の高密度、adrenergic 刺激に対する反応性の強さ⁸⁾を考慮する必要があると考えられる。

正確な諸外国との比較ができていないために、本症が本当に本邦特異的であるかは不明であるが、最近、米国から一過性の左心室流出路狭窄を呈する「虚血性心臓病」⁹⁾「急性心筋梗塞」¹⁰⁾の症例が報告されている。これらは、いずれも高齢女性であること、情動ストレス負荷後の発症であること、心筋障害が軽微であることなど、本邦のタコツボ心筋症との類似点があるので、果たして真の虚血性心臓病であるかどうかは今後再検されるべきである。

【総括】

緊急冠状動脈造影施行例の男性優位を考慮すると、女性緊急造影例でのたこつぼ心筋症の頻度は3%の数倍に当たると想定される。

本症発症の契機としての精神的ストレスで、女性症例における mental stress, 男性症例における physical stress の優位が確認された。

【参考文献】

- 1) 佐藤光, 立石博信, 内田俊明ほか: 多枝 spasm により特異な左室造影「ツボ型」を示した stunned myocardium. 「臨床から見た心筋細胞障害: 虚血から心不全まで」児玉和久, 土師一夫, 堀章二編集, 科学評論社, 東京, 1990, p56-64.
- 2) 石原正治, 佐藤 光, 立石博信ほか: たこつぼ型心筋症. 呼と循 45: 879-885, 1997.
- 3) 土手慶吾, 満田廣樹, 二宮正則, 奥原種臣: たこつぼ型心筋症 別冊日本臨床 領域別症候群14 循環器疾患Ⅲ: 166-169, 平成8年11月.
- 4) 河合祥雄: たこつぼ型心筋障害, またはたこつぼ(Ampulla or Amphora)心筋症—本邦学会報告例の検討—呼吸と循環 48: 1237-1248, 2000
- 5) Kawai S, Suzuki H, Yamaguchi H, et al.: Ampulla cardiomyopathy (“takotubo” cardiomyopathy) —reversible left ventricular dysfunction—. Jpn Circulation J 64(2): 156-159, 2000.
- 6) Iga k, Himura Y, Izumi C, et al.: Reversible left ventricular dysfunction associated with Guillain-Barre syndrome —An expression of catecholamine cardiotoxicity?— Jpn Circ J 59: 236-240, 1995.
- 7) Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G IV: Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. Circulation 85: 790-804, 1992.
- 8) Mori H, Ishikawa S, Kojima S, et al.: Increased responsiveness of left ventricular apical myocardium to adrenergic stimuli. Cardiovasc Res 27: 192-198, 1993.
- 9) Villareal RP, Achari A, Wilansky S, Wilson JM: Anteroapical stunning and left ventricular outflow tract obstruction. Mayo Clin Proc 76: 79-83, 2001.
- 10) Armstrong WF, Marcovitz PA: Dynamic left ventricular outflow tract obstruction as a complication of acute myocardial infarction. Am Heart J 131: 827-830, 1996.

心筋組織リモデリングにおける間質の動態と生物機能

吉田(今中)恭子 吉田利通 鈴木宏昌

三重大学医学部病理

廣江道昭

青梅市立総合病院(東京医科歯科大学医学部第二内科)

【はじめに】

我々は、以前、マウスモデルを使い心筋炎から線維症に進展する初期段階で、間質に膠原線維が形成されるのに先行して、細胞外蛋白の一つテネイシンCが一過性に発現、沈着することを明らかにした。心筋線維化進展におけるテネイシンCの役割を明らかにするために、テネイシンCノックアウトマウスを使って置換型線維化巣のモデルとして心筋梗塞モデルを作成すると、野生型と大差なく治癒過程は進行するようには見えたが、詳細に検討すると筋線維芽細胞の出現が有意に遅れ拮抗的スプライシングを受けない部分にその強い活性があることが明らかになった。従って、テネイシンCは、心筋の間質細胞に作用して筋線維芽細胞への分化を促進し、その後の線維化進展を制御する可能性が示唆された。

【研究目的】

テネイシン-C(TNC)は、細胞外基質蛋白の一つテネイシンファミリーに属し、胎児の形態形成、癌、創傷治癒など組織リモデリングに関係して、限られた場所に一過性に発現する^{1,2)}。一般に、抗接着因子、細胞遊走の促進因子として知られているが、いくつかのスプライシングバリエーションが存在し、複数のレセプター結合部位をもち、さらに、細胞により発現しているレセプターが異なるため、細胞の種類や分化度によっては接着を促進したり、遊走を抑制するなど逆の作用を示したり、細胞増殖やMMPの誘導など、相反するいくつかの機能をもつことが知られている。循環器病研究領域では、今まであまり注目されていなかったが、最近、我々はPTCA後再狭窄過程の初期病変でTNCが

重要な役割を演じる可能性を報告した³⁾。心臓では、TNCは発生のきわめて早い重要な時期に、すなわちa)心臓形成予定領域中胚葉から心筋細胞への分化、b)心内膜床の形成、c)流出路のルーピング、d)横中隔間葉細胞から冠動脈前駆細胞の遊走にともなって一過性に発現し、正常成体には発現しない⁴⁾。しかし、心筋炎、心筋梗塞など種々の病態で再び発現する⁵⁻⁹⁾。例えば、ウイルス性および自己免疫性心筋炎マウスモデルでは、心筋炎からいわゆる線維症に進展する過程で、成熟した膠原線維が沈着し線維化巣を形成するのに先行してTNCが一過性に発現し、線維化病変進展の初期段階に関わる可能性が示唆される⁸⁾。また、ラット心筋梗塞モデルでは、TNCは梗塞後急性期に、梗塞巣と残存心筋の境界部位に局限して発現するという、きわめて特異的な発現様式を示し、心筋構築改変におけるTNCの重要な役割を示唆する⁹⁾。

本研究では、心筋組織リモデリングでのTNCの役割を明らかにするために、TNCノックアウトマウスを用いて、最も単純な心筋細胞障害、線維化/リモデリングの例である心筋梗塞モデルを作成し、組織修復過程を特に、組織修復時に出現する筋線維芽細胞に着目して正常と対比した。筋線維芽細胞は、 α -smooth muscle actinを発現するなど平滑筋と線維芽細胞の中間の性格をもち、癒傷収縮に貢献し、しばしばTNCを産生することが知られている。次に、TNCの細胞に対する分子機能を直接検討するために、心臓由来の培養細胞に、精製TNC蛋白を作用させ、 α -smooth muscle actin発現レベルに対する影響を評価した。さ

らに、大腸菌に TNC 分子のいくつかのドメインを発現させたりコンビナント蛋白を作成し、その作用ドメインの決定を試みた。

【方法】

(1)抗TNCモノクローナル抗体の作成法

TNC ノックアウトマウス¹⁰⁾とのバッククロスにより、Balb/c 系のコンジェニック TNC 遺伝子欠失マウスを作成し、精製ヒトグリオーマ TNC で免疫。脾細胞を SP2/0 ミエローマ細胞と癒合せモノクローナル抗体を作成した。実験には、ヒト、ラット、マウス、ニワトリ TNC を認識する抗体クローン 4F10 を用いた。

(2)ノックアウトマウスをもちいた TNC の心筋リモデリングにおける役割の解析

生後 8 週令の Balb/c 系の雄、正常マウスと TNC 遺伝子欠失マウス腹腔から経横隔膜的に心筋壁の一部を電気メスによって電気凝固壊死させ、組織修復過程を心筋梗塞後の組織再構築のモデルとした。傷害後 1, 3, 5, 7, 14, 21, 42 日目にマウスを犠牲剖検、心臓を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで 4°C, 16 時間固定し、パラフィンブロックを作製した。犠牲剖検の 30 分前に BrdU を腹腔内投与し(20mg/kg), S 期の細胞を標識した。標本は 4micrometer の厚さに薄切し、HE, 抗 BrdU 抗体, 抗 smooth muscle actin 抗体, および抗 TNC 抗体を用いて免疫組織化学により、細胞増殖, 筋線維芽細胞の出現を検討した。また、それに先立って、野生型マウスについて、抗 TNC 抗体, digoxigenin 標識 TNC cRNA プローブを用いて、in situ hybridization を行い、および TNC 産生細胞の同定と分子局在の経時的变化を検討した。また、抗 smooth muscle actin 抗体と抗 TNC 抗体の二重染色をおこない筋線維芽細胞と TNC の時間的空間的位置関係を検討した。

(3)心臓線維芽細胞に対する TNC の作用

TN-C の心臓間質細胞に対する直接作用を検討するため、8 週令のマウス心臓からコラゲナーゼを用いて、線維芽細胞を分離培養した。一般に線維芽細胞細胞は、培養系で TN-C を産生するため、実験には、TN-C ノックアウトマウス由来の細胞を用いた。0.1% 牛胎児血清を

含む DMEM 培地で 48 時間培養した後、ヒトグリオーマ U251 MG の培養上清から精製した TN-C を加え、24 時間後に固定。蛍光抗体法により、a-smooth muscle actin を特異的抗体をもちい、またすべてのアイソフォームのアクチンを rhodamine-phalloidin 二重染色し、a-smooth-muscle actin 陽性率を検討した。また、培養液中に BrdU を加え 2 時間後に固定、酵素抗体法により、とりこみ陽性率を検討した。

【結果および考察】

(1)正常マウスにおける治癒機転と TNC の発現様式

免疫組織化学的検討で、TNC は、傷害後 6 時間から、壊死部位と正常部位との境界領域に出現、7 日目ごろから発現は減少し、14 日目には消失とラット冠動脈結紮モデルと同様な発現様式を示した。さらに、in situ hybridization によって産生細胞は間質の線維芽細胞で、心筋細胞は TNC を産生しないことが確認された。また、同一切片上で in situ hybridization と免疫染色の二重ラベリングを行うことにより、癌間質にみられるように、癒痕巣にみられる a-smooth-muscle actin 陽性細胞、すなわち筋線維芽細胞の一部は、TNC を産生するが、筋線維芽細胞と TNC 産生細胞は完全に一致しないこと、また、二重免疫組織化学により、TNC の沈着は、筋線維芽細胞の出現に先行し、また、筋線維芽細胞は、TNC の沈着部位に出現することから、TNC が筋線維芽細胞の制御に関わる可能性が示唆された。

(2)TNC遺伝子欠失マウスにおける治癒機転

TNC ノックアウトマウスには明らかな表現型の差はないとされている¹⁰⁾。これは、他の多くの重要な遺伝子のノックアウトマウスにもみられ、重要な遺伝子は複数の代償機構をもつという、いわゆる生物学的 redundancy で説明されてきた。しかし、最近、一見正常に見えるそれらの遺伝子改変動物にある種の負荷をかける、すなわち何らかの疾患モデルを作成して注意深く検討すると、野生型のものと比べると明らかな差が見られることがあることが明らかになってきた。

今回、我々の検討した TNC ノックアウトマ

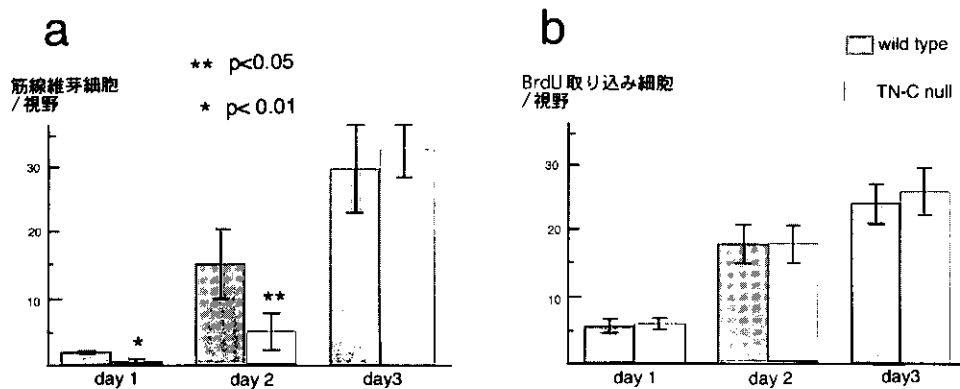


図1 TN-C ノックアウトマウスの心筋組織修復における筋線維芽細胞出現(a)と間質細胞増殖(b)

ウスにおける心筋創傷治癒機転では、組織形態学的に正常マウスとの明らかな差はみられず、残存心筋の肥大の程度にも有意な差は認められなかった。しかし、詳細に検討すると、ノックアウトでは、筋線維芽細胞の出現が有意に遅れることが明らかになった。すなわち、正常マウスでは心筋障害後、1日目、正常部位と障害部位の境界領域に、 α -smooth muscle actin 陽性の筋線維芽細胞が出現し、2日目、3日目に次第に多くの細胞が壊死組織中に遊走していくのがみられた。TN-C ノックアウトマウスでも、同様の筋線維芽細胞出現の経時的变化がみられたが、単位面積あたりの α -smooth muscle actin 陽性細胞の数は、正常マウスと比べて、2日目では有意に少なかった(図1)。

(3)培養細胞心臓線維芽細胞に対する TN-C の作用

TNC は培養線維芽細胞に作用し、 α -smooth-muscle actin 発現を促進した(図2)。すなわち、培養液中に TNC を含まないコントロールでは、 $64.6 \pm 4.8\%$ の細胞が α -smooth-muscle actin 陽性であるのに対し、TN-C 5, 10, 20 micro g/ml を加えたものでは、それぞれ $71.6 \pm 3.4\%$, $77.0 \pm 1.9\%$ ($p < 0.05$),

$81.0 \pm 4.3\%$ ($p < 0.01$) と陽性率は濃度依存性に有意に上昇した。しかし、BrdU 取り込み陽性率に対する影響は見られず、TN-C は、筋線維芽細胞を増殖させるのではなく、間質の線維芽細胞から筋線維芽細胞への初期分化誘導を行っていると考えられた。次に、TNC 分子のどの部位にその作用があるかを決定するために、TN-C 分子のいくつかのドメインを大腸菌に発現させてリコンビナント蛋白を作成し、同様に培養液に加えると、 α -smooth-muscle actin 発現レベルを上昇させる作用は数ヶ所にみられたが、ファイブロネクチン type III repeat の選択的スプライシングを受けない部分に特に強い活性があることが明らかになった(図3)。この部位には、各種インテグリン結合部位があり、TNC の情報は、インテグリンを介して細胞内に伝達され、 α -smooth-muscle actin の発現を促進する可能性が考えられた。

筋線維芽細胞は、全身の種々の組織の創傷治癒時に出現し、collagen を産生するとともに、それ自身がよく発達した収縮装置をもって強い収縮力を発生させることにより、癒痕治癒に大きな役割を果たすと考えられてい、肝臓の Ito 細胞などは筋線維芽細胞の一種と考えられているが、一般には、正常組織ではあまり見られず、組織障害時、TGF β やファイブロネクチンなど種々の刺激を受けて、間質細胞から分化すると考えられている。本研究で示したように、TNC は明かに、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化促進能をもつ。ただし、 α -smooth-muscle actin 陽性 15% 程度増加させるが、線

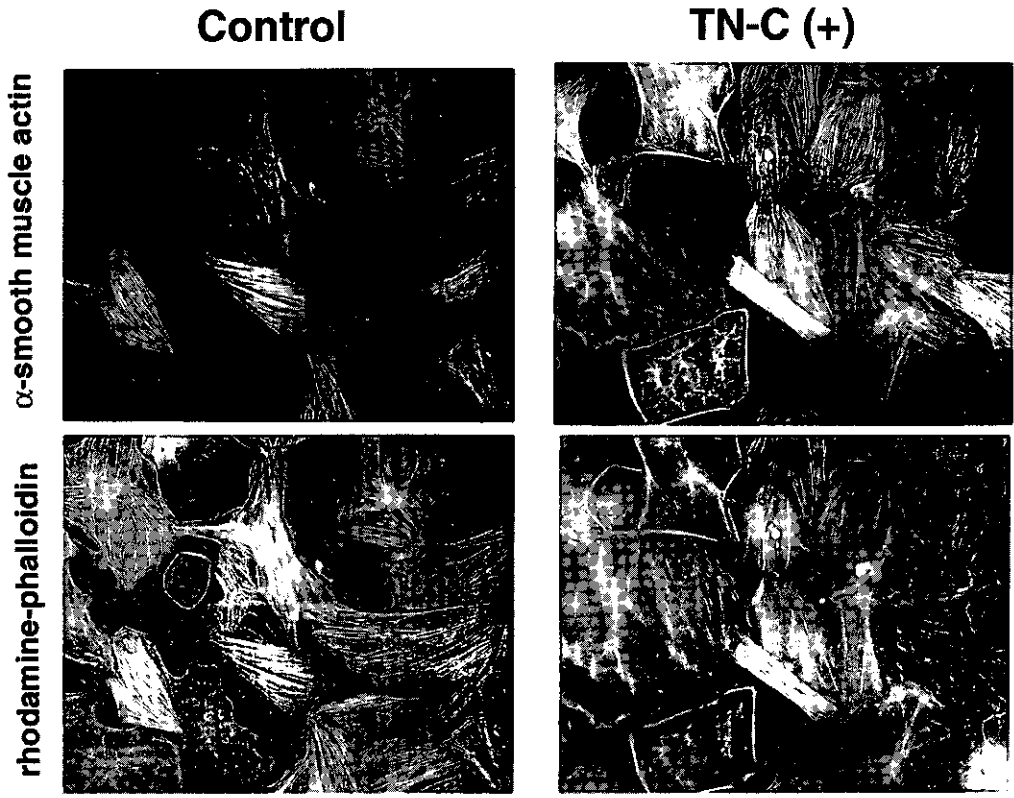


図2 培養線維芽細胞の α -smooth muscle actin 発現に対する TNC の影響

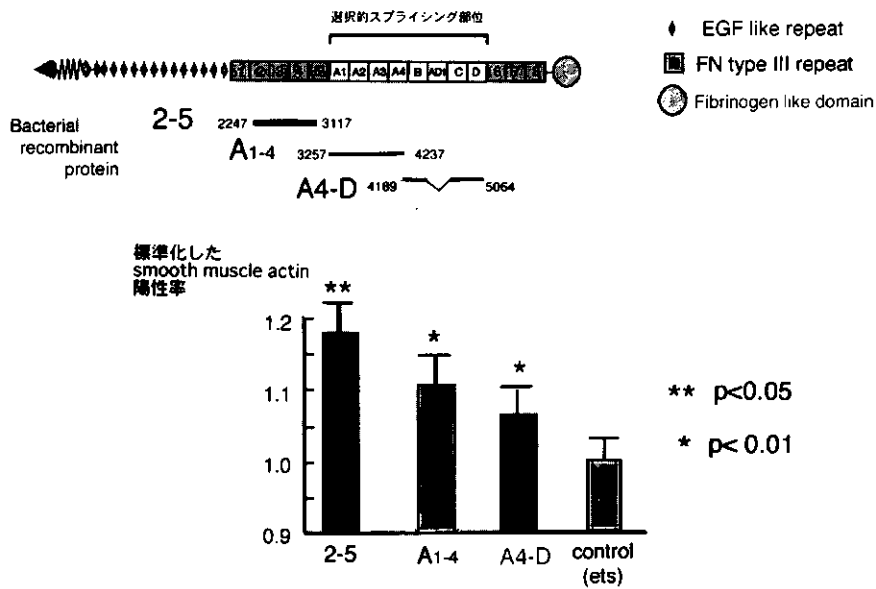


図3 ヒト TNC の遺伝子構造と α -smooth muscle actin 発現促進作用をもつ部位

維芽細胞は培養系で、TNC がなくても約 60% の細胞が α -smooth-muscle を発現し、TNC が唯一の制御因子ではないと思われる。しかしながら、ノックアウトマウスを用いた結果から、実際、生体内で、心筋障害後の組織修復後、早期の筋線維芽細胞の動態を制御する主な因子として働いていると考えられた。置換型線維化巣形

成過程の初期に、TNC が間質の residential fibroblast から myofibroblast への分化誘導を行っていることがあきらかになった。生体内では明らかになんらかの代償機構は存在するが、組織中の TNC の量をコントロールすることにより、線維化という病態をコラーゲン線維が形成される前の初期段階で制御できる可能性が示

峻される。

【参考文献】

- 1) Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5: 869-76
- 2) 吉田(今中)恭子, 坂倉照好. テネイシンと形態形成 *細胞*1997; 29: 58-61
- 3) Imanaka-Yoshida, K., Matsuura, R., Isaka, N., Nakano, T., Sakakura, T., and Yoshida, T. Serial extracellular matrix changes in neointimal lesions of human coronary artery after percutaneous transluminal coronary angioplasty: Clinical significance of early tenascin-C expression. *Virchows Archive* (in press)
- 4) Imanaka-Yoshida, K, and Sakakura T. Possible roles of the tenascin family during early heart development. In: Clark, E.B., Nakazawa, M., Takao, A., eds. *Ethiology and morphogenesis of congenital heart disease: Twenty years of progress in genetics and developmental biology.* New York; Futura Publishing Co.; 2000: 185-187.
- 5) Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Sakakura T. Possible role of the tenascin family during heart development and myocardial tissue remodeling. In: Takeda N, Nagano M, Dhalla NS, eds. *The Hypertrophied Heart.* Boston: Kluwer Academic publisher.; 2000: 123-129
- 6) Tamura A, Kusachi S, Nogami K, Yamaniishi A, Kajikawa Y, Hirohata S, Tsuji T. Tenascin expression in endomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margins of fibrotic lesions. *Heart* 1996; 75: 291-294.
- 7) Willems IE, Arends JW, Daemen MJ. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *J. Pathol.* 1996; 179: 321-325.
- 8) Toyozaki, T., Hiroe, M., Yoshida, T., Imanaka-Yoshida, K. Tenascin-C can be a marker for disease activity of myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: A105
- 9) Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Shimojo, T., Ohta, Y., Sakakura, T., Yoshida, T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest* 2001 (in press)
- 10) Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S. Mice develop normally without tenascin. *Gene Dev.* 1992; 6: 1821-31

実験的自己免疫性心筋炎における テネインCの発現についての研究

豊崎 哲也 大和田 英美
千葉大学医学部肺癌研究施設病理研究部門

廣江 道昭
青梅市立総合病院循環器科(東京医科歯科大学医学部第二内科)

吉田(今中)恭子 吉田 利通
三重大学医学部病理学第一講座

【はじめに】

テネインファミリーは細胞外基質蛋白の一つで、哺乳動物ではテネイン-C, テネイン-R, テネイン-X が知られている¹⁾。最初に発見されたテネイン-C(TNC)の最も特徴的な性質の一つは、胎児、癌、創傷治癒などで細胞遊走、運動、増殖にともなって、限られた場所に一過性に発現するということであり^{1,2)}、この、組織構築改変においてTNCの果たす重要な役割が想像される。さらに、この特異的な発現様式は、逆にTNCが、疾患活動性を反映する可能性も示唆し、間質性肺炎やIgA腎症の予後判定因子として用いる試みがなされている^{3,4)}。

心臓では、発生のごく初期に発現し、正常成体では発現はほとんどみられず⁵⁾、疾患特異性はないが、様々な病的状態で再発現する。例えば、ラット心筋梗塞モデルでは、梗塞後、5-6時間以内に、梗塞巣と健常部の境界領域に局限して発現し、1週間以内に炎症細胞浸潤の消退と癒着治癒の進展とともに消失する⁶⁾。正常心筋では発現せず、梗塞後急性期に限られた場所に発現するという事実は、TNCを心筋病変活動性のマーカーとして用いることができる可能性を強く示唆する。本研究では、マウス自己免疫性心筋炎のモデルを用いて、心筋炎の進展とTNCの発現との関連を明らかにし、さらに、心筋炎患者から経時的に得られた心筋生検組織におけるTNCの発現レベルを免疫組織化学的

に検討し、TNCが心筋炎の活動性を反映し、心筋炎患者の疾患活動性の評価に用いられるかどうか検討した。

【方法】

ブタ心筋ミオシン(Sigma Chemical Co)を Freund's complete adjuvant (Sigma Chemical Co)と混和し、A/Jマウスに感作して自己免疫性心筋炎を作製した。対照として Freund's complete adjuvantのみを投与したマウス(コントロール群)を用いた。感作後14, 21, 70, 100日目にマウスを屠殺して心臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで4°C、16時間固定して、パラフィンブロックを作成した。さらに、感作後14, 16, 21日目の心筋炎マウスおよびコントロールマウスの心臓を摘出し、液体窒素で急速に凍結した後にRT-PCR、ウエスタンブロット用に保存した。エバンスブルーをPBSで溶解し(10mg/dl)、フィルターにかけて滅菌した後に、マウスに静注した。24時間後にマウスを屠殺して心臓を摘出した。パラフィンブロックから連続切片を作成し、H-E染色、Sirius Red染色、免疫染色を行って、TNCの発現と活動性炎症や線維化の程度を比較検討した。免疫組織染色は、切片を脱パラして0.4%ペプシンで処理した後に、ウサギポリクローナル抗TN-C抗体と4°C、オーバーナイトで反応させ、LSAB法(Scytek)を用いて行った⁷⁾。画像解析装置CAS200を用いてH-E染色標本における活動性炎症部位、免疫組織染色

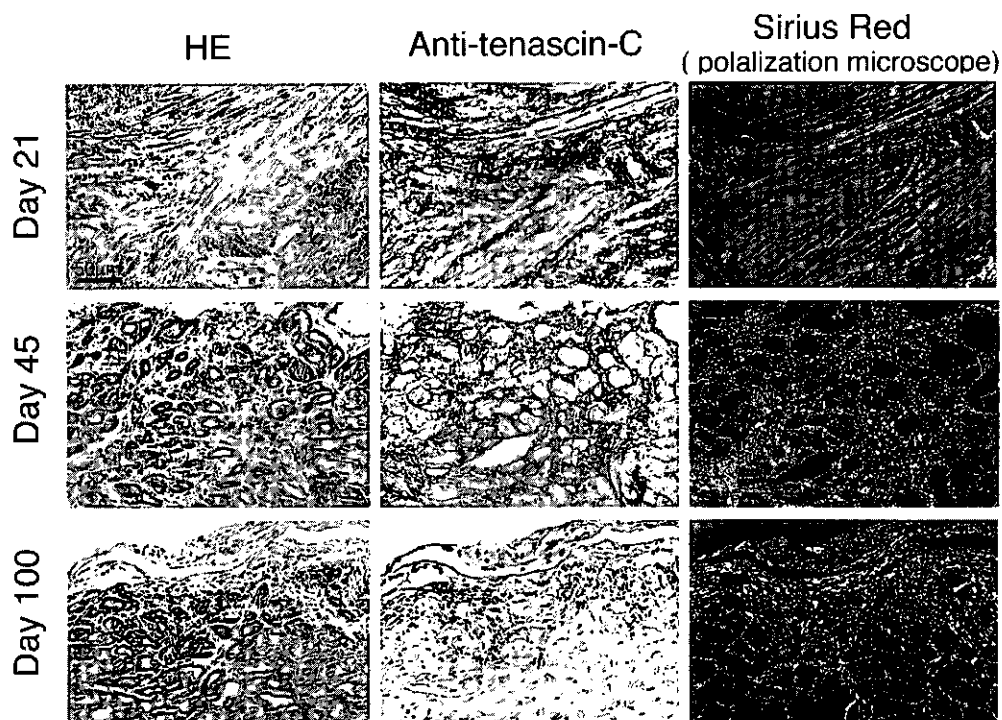


図1 マウス自己免疫性心筋炎における組織所見, TNC発現, 間質膠原線維の経時的変化

における TN-C 発現部位を計測し, 心臓横断面に対する面積比で表した. 凍結保存した心筋組織から ISOGEN (Nippon Gene) を用いて RNA を抽出した. TN-C mRNA の発現を検討するため, 逆転写酵素を用いて cDNA を作成して PCR 法により目的の遺伝子を増幅した. 増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて確認した. さらに, TNC の産生細胞を同定するために, TNC mRNA に対するジゴキニゲニン標識 cRNA プローブを用いてパラフィン切片上で in situ hybridization (ISH) を行った⁶⁾. 凍結心筋組織からタンパクを抽出して, SDS-PAGE にかけて, 抗 TNC 抗体と反応させた後に, ECL system (Amersham) を用いて TN-C タンパクを検出した. 心筋炎患者から経時的に生検組織の得られた 8 例のパラフィンブロックから連続切片を作成し, H-E 染色, TNC に対する免疫染色を行い, Dallas criteria に基づく組織所見, 臨床像と対比した.

【結果】

我々の用いたマウス自己免疫性心筋炎モデルでは初回ミオシン注射後 14 日目ごろから, focal な炎症細胞浸潤と myocytolysis がみられ始めた. 炎症は 21-28 日後に最も強く, びま

んな性の強い炎症細胞浸潤と心筋細胞壊死がみられ, 徐々に消退しながら 70 日頃まで持続した. 心筋脱落部位は, はじめ, 粗な結合織で置き換えられ, 30 日後頃から, 間質に膠原線維の形成がみられ, 最終的にはよく発達した膠原線維からなる癒痕組織に置き換えられた. 炎症の急性期, 変性, 壊死に陥った心筋細胞の周囲の間質に, 膠原線維の形成に先行して, 免疫組織化学的に, TNC の強い沈着がみられた(図 1). ウエスタンブロットで, 正常心筋からはわずかに 210kDa のバンドが認められるのみであったが, 心筋炎活動期の組織には 210kDa と 240kDa の二つのアイソフォームが検出された. TNC の発現は炎症所見が認められるかぎり持続し, 治癒期の癒痕組織からは消失した. 画像解析により定量評価を行うと, 感作後 14 日, 21 日, 70 日, 100 日の活動性炎症部位は, それぞれ $0.49 \pm 0.53\%$, $8.54 \pm 3.81\%$, $0.32 \pm 0.21\%$, $0.02 \pm 0.04\%$ で, TN-C 発現部位は $0. \pm 0.53\%$, $5.91 \pm 1.46\%$, $0.2 \pm 0.13\%$, $0.06 \pm 0.08\%$ で, TNC の沈着と炎症の程度は強い正の相関を示した ($r=0.972$, $p<0.0001$). In situ hybridization 法により, TNC の産生細胞は, 心筋細胞ではなく, 間質の線維芽細胞であることが明

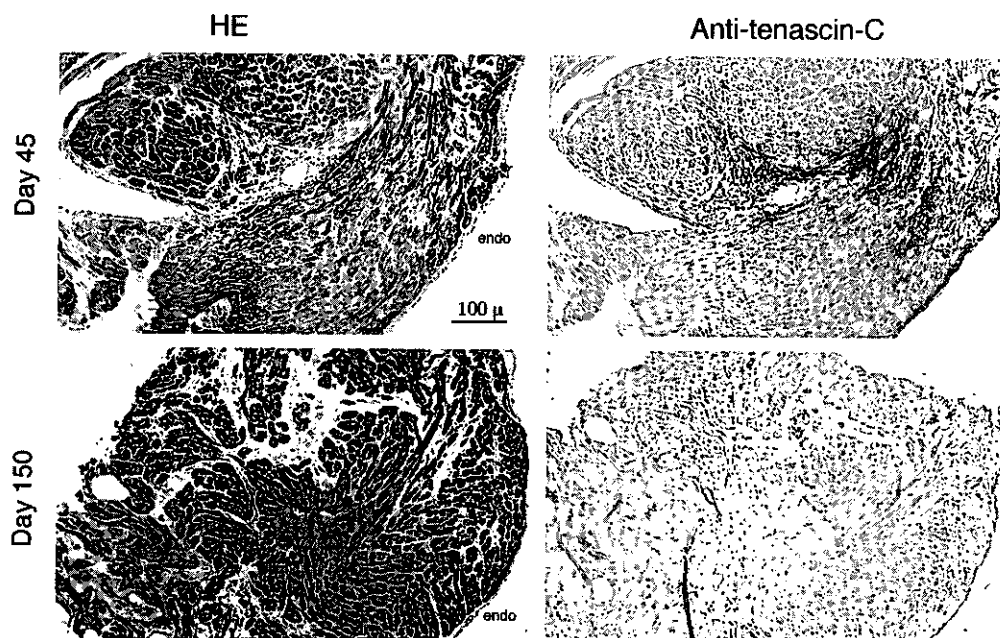


図2 心筋炎患者から得られた生検組織における TNC 発現の経時的変化

らかになった。また、興味深いことに、心筋炎発の極めて早い時期から TNC の発現が亢進していることを、RT-PCR だけでなく、免疫組織化学的に確認することができた。すなわち、組織学的に心筋炎の所見がまだ明らかでない時期、すでに間質にエバンスブルーで標識される膜障害を起こした早期の障害心筋細胞周囲に TNC の沈着がみられ、TNC が早期心筋細胞障害の鋭敏なマーカーになりうることを示唆された。

さらに、いろいろな時期の心筋炎患者から得られた生検組織で、マウスモデルと同様、心筋炎活動期の組織には、免疫組織化学的に、TNC の強い発現がみられ、healingstage には低下、healed stage の癒痕組織には発現はみられず(図2)、臨床的に心筋炎患者の疾患活動性の指標として応用可能であると考えられた。

【総括】

TNC は心筋炎活動的に心筋内に障害心筋傍に特異的に一過性に発現し、発現レベルは炎症の程度と強い相関を示す。特に、心筋細胞障害後、極めて早い時期から、発現が亢進する。したがって、テネイシンCは心筋炎患者の予後判定に有用なだけでなく、心筋細胞障害や間質病変活動性の鋭敏かつ特異的なマーカーとして、心筋炎・心筋症の病態解明にも役立つものと思

われる。

【参考文献】

- 1) Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5: 869-76
- 2) Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Person CA, Sakakura T. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 1986; 53: 383-390. Hasegawa K, Yoshida T, Matsumoto K, Katsuta K, Waga S, Sakakura T. Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 431-437.
- 3) Masaki T, Yorioka N, Taniguchi Y, Oda H, and Yamakido M. Tenascin expression may reflect the activity and chronicity of human IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1998; 50: 205-13.
- 4) Kaarteenaho-Wiik R, Tani T, Sormunen R, Soini Y, Virtanen I, and Paakko P. Tenascin immunoreactivity as a prognostic marker in usual interstitial pneu-

- monia. *Am J Res Critical Care Med.* 1996; 154: 511-8.
- 5) Imanaka-Yoshida, K, and Sakakura T. Possible roles of the tenascin family during early heart development. In: Clark, E.B., Nakazawa, M., Takao, A., eds. *Ethiology and morphogenesis of congenital heart disease: Twenty years of progress in genetics and developmental biology.* New York: Futura Publishing Co.; 2000: 185-187.
- 6) Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Nishikawa, T., Ishiyama, S., Shimojo, T., Ohta, Y., Sakakura, T., Yoshida, T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest* 2001(in press)
- 7) Hasegawa K, Yoshida T, Matsumoto K, Katsuta K, Waga S, Sakakura T. Differential expression of tenascin-C and tenascin-X in human astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 431-437.

心エコー図上肥大型心筋症と診断された英国人男性患者 連続181例における Fabry 病の検出

竹中俊宏 寺口博幸大 鄭 忠和

鹿児島大学医学部第一内科

【要旨】

【目的】我々は、鹿児島県において左室肥大を呈する男性患者の3.0%に心症状、特に左室肥大のみを主症状とする非典型的な Fabry 病(心 Fabry 病)が存在することを報告した。海外での左室肥大を呈する男性患者における Fabry 病の頻度は不明である。本研究の目的は、肥大型心筋症と診断された英国人男性患者における Fabry 病の頻度を検討することである。

【方法】英国 St. George's Hospital において肥大型心筋症の診断で加療中の連続181名の男性患者を対象とした。全例に血漿 α -galactosidase A (α -gal A) 活性測定を施行し、 α -gal A 活性低値を示すものを Fabry 病と診断した。Fabry 病と診断された症例では心エコー図所見を評価し、臨床所見として典型的 Fabry 病で認める被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁の有無を検討した。

【結果】181例中5例(2.8%)で血漿 α -gal A 活性が 0.3-1.3 nmol/hr/ml と低値を示し、Fabry 病と診断した。残る176例の活性値は、平均 7.2 ± 2.5 nmol/hr/ml (3.7-25.4 nmol/hr/ml) であった。Fabry 病と診断された5例の年齢は平均 50 ± 17 歳(23-64歳)で、血縁関係は認めなかった。心エコー図で5例ともに左室肥大を認め(最大左室壁厚 14-25mm)、1例は非対称性中隔肥大を呈していた。4例で左房拡大(左房径 40mm 以上)を認めたが、左室拡張末期径は全例で正常範囲(40-53mm)であった。左室内径短縮率は全例で正常(30-56%)であった。5例ともに被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁は認めず、全例が心 Fabry 病であると診断した。

【結論】肥大型心筋症と診断された英国人男性

患者の2.8%に心 Fabry 病が検出された。心 Fabry 病は、肥大型心筋症と診断されている男性患者の中に人種を越えて数%以上の頻度で存在することが示唆された。

【緒言】

Fabry 病は、リソソーム加水分解酵素の一つである α -galactosidase A (α -gal A) の遺伝的欠損により生ずる X 染色体劣性のスフィンゴ糖脂質代謝異常症である¹⁾。典型的 Fabry 病男性患者では、 α -gal A 活性欠損により血管の内皮細胞や平滑筋細胞をはじめ、全身の臓器、特に皮膚、神経系、眼、腎臓、心臓などの各種の細胞のリソソームにスフィンゴ糖脂質、特に ceramidetrihexoside が進行性に蓄積する。このため幼少時から被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁などの症状が出現、さらに年齢が進むと腎臓、脳、心臓の障害を生じて死亡する。心臓の障害については、左室肥大、弁膜症、不整脈を含む心電図異常などが数多く報告されている¹⁾。

これに対し最近、心障害、特に左室肥大を主症状とし、被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁などの症状を欠く非典型的 Fabry 病男性患者が報告されている²⁻⁷⁾。我々は鹿児島県において、左室肥大を呈する男性患者連続230例に血漿 α -gal A 活性測定を行い、7例(3.0%)に血漿 α -gal A 活性の明らかな低値を認め、Fabry 病と診断したことを告した⁸⁾。この7例は全例、典型的 Fabry 病で認める被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁などの症状を欠く、心障害、特に左室肥大を主症状とする非典型的 Fabry 病であった。そこで、このような Fabry 病を心 Fabry 病と命名し、新たな疾患概念として提唱した^{8,9)}。

一方、海外での左室肥大を呈する男性患者における Fabry 病の頻度は未だ不明である。本研究の目的は、肥大型心筋症と診断された英国人男性患者における Fabry 病の頻度を検討することである。

【方法】

英国 London の St. George's Hospital において心エコー図上肥大型心筋症の診断で加療中の連続181例の男性患者を対象とした。

鹿児島に検体を送っていただき、全例に血漿 α -gal A 活性測定を施行した。その結果、 α -gal A 活性低値を示すものを Fabry 病と診断した。 α -gal A 活性の測定は、Mayes らの方法に準じた¹⁰⁾。Fabry 病と診断された症例では被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁など、典型的 Fabry 病で認める症状の有無および心エコー図所見を評価し、心 Fabry 病の診断を行った。

【結果】

181例の血漿 α -gal A 活性を図1に示す。181例中5例(2.8%)で血漿 α -gal A 活性が平均 $0.7 \pm 0.4 \text{ nmol/hr/ml}$ と明らかな低値を示し、これら5例を Fabry 病と診断した。残る176例の活性値は、平均 $7.2 \pm 2.5 \text{ nmol/hr/ml}$ (3.7-25.4 nmol/hr/ml) であった。

Fabry 病と診断された5例の臨床所見を表1に示す。年齢は23-64歳で、血縁関係は認めなかった。5例の血漿 α -gal A 活性は、0.3-1.3 nmol/hr/ml と低値で、全例に最大左室壁厚14-25mmの左室肥大を認めた。5例ともに、高血圧、蛋白尿、脳血管障害の既往は認めなかった。さらに、被角血管腫、四肢末端痛、低汗症、角膜混濁など、典型的 Fabry 病の症状も認めなかったことから、全例を心 Fabry 病と診断した。

5例の心エコー図所見を表2に示す。5例ともに心室中隔壁厚14-25mm、左室後壁壁厚13-21mmの左室肥大を認め、症例3は非対称性中隔肥大を呈していた。全例で左室拡張末期径は40-53mmと正常範囲で、左室内径短縮率も30-56%と正常であったが、症例4を除く4例で左房径40mm以上の左房拡大を認めた。

鹿児島県の正常対照群および左室肥大群⁸⁾、

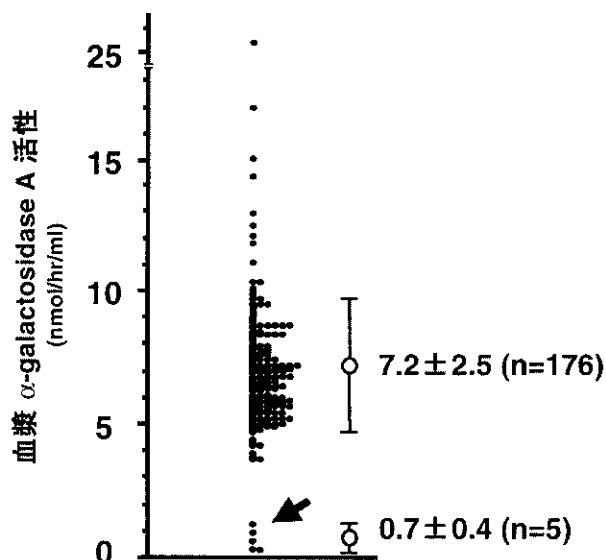


図1 肥大型心筋症と診断された英国人男性患者181例の血漿 α -galactosidase A 活性

さらに本研究での英国の肥大型心筋症群の血漿 α -gal A 活性の分布を図2に示す。血漿 α -gal A 活性は3群ではほぼ同様の分布を示していた。

鹿児島県で検出された心 Fabry 病⁸⁾および本研究で検出された英国の心 Fabry 病の心エコー図所見の比較を表3に示す。両群の左室壁厚、左室拡張末期径、左室内径短縮率および左房径に差は認めなかった。

【考察】

我々は、本研究において Fabry 病の検出のために血漿 α -gal A 活性を測定したが、この方法は男性 Fabry 病患者(hemizygote)の診断上信頼できる方法である^{1,10)}。Fabry 病を疑った場合、心筋生検などの組織診断を施行する前に血漿 α -gal A 活性を測定することは、臨床においてより簡便であり、有用な方法である。

心 Fabry 病の頻度に関し、鹿児島県の左室肥大群では3.0%であったが、左室肥大の230例中93例は肥大型心筋症と診断されており、この93例中6例すなわち6.5%が心 Fabry 病であった⁸⁾。本研究では、英国で肥大型心筋症と診断されていた181例中5例、2.8%に心 Fabry 病が検出された。さらに、最近ドイツのグループから、心筋生検を行った肥大型心筋症患者250例中21例(8.4%)に Fabry 病が検出されたとの報告もなされている¹¹⁾。以上より、心 Fabry 病は、肥大型心筋症と診断されてい

表1 Fabry病5例の臨床所見

症 例	1	2	3	4	5
年齢(歳)	45	56	64	23	63
血漿 α -gal A (nmo/hr/ml)	0.3	0.3	0.7	1.0	1.3
最大左室壁厚	25	21	19	14	18
高血症	—	—	—	—	—
蛋白尿	—	—	—	—	—
脳血管障害	—	—	—	—	—
被角血管腫	—	—	—	—	—
四肢末端痛	—	—	—	—	—
低汗症	—	—	—	—	—
角膜混濁	—	—	—	—	—

表2 心 Fabry病5例の心エコー図所見

症 例	1	2	3	4	5
年齢(歳)	45	56	64	23	63
左室壁厚					
心室中隔(mm)	25	21	19	14	18
後壁(mm)	21	20	14	13	15
左室拡張末期径(mm)	50	50	40	53	46
左室収縮末期径(mm)	30	33	28	36	20
左室内径短縮率(%)	40	34	30	32	56
左房径(mm)	49	46	47	39	40

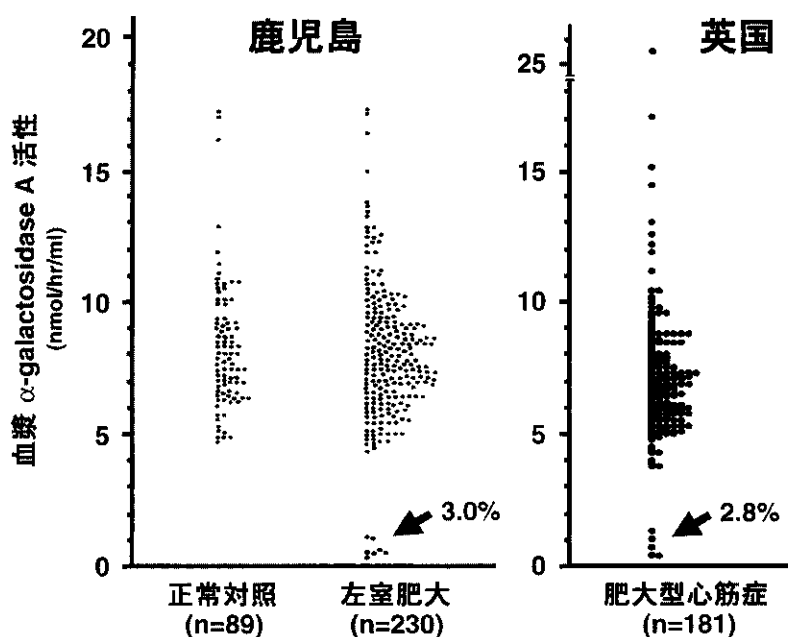
図2 鹿児島県の正常対照群, 左室肥大群および本研究での英国の肥大型心筋症群の血漿 α -galactosidase A 活性の分布

表3 鹿児島県および英国の心 Fabry 病：
心エコー図所見の比較

	鹿児島県 (n=7)	英国 (n=5)	
年齢(歳)	65±6	50±17	n. s.
左室壁厚			
心室中隔(mm)	17±3	19±4	n. s.
後壁(mm)	16±3	16±4	n. s.
左室拡張末期径(mm)	53±4	48±5	n. s.
左室内径短縮率(%)	28±7	38±11	n. s.
左房径(mm)	41±6	44±4	n. s.

る患者の中に人種を越えて数%以上の頻度で存在することが示唆された。臨床的に原因が明らかでない左室肥大症例では、Fabry 病を鑑別診断に挙げることが重要と思われる。

【結 論】

肥大型心筋症と診断されていた英国人男性患者の 2.8% に心 Fabry 病が検出された。心 Fabry 病は、肥大型心筋症と診断されている男性患者の中に人種を越えて数%以上の頻度で存在する。

【参考文献】

- Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 2741-84.
- Elleder M, Bradova V, Smid F, et al. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease: report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. Virchow Arch A Pathol Anat Histopathol 1990; 417: 449-55.
- Ogawa K, Sugamata K, Funamoto N, et al. Restricted accumulation of globotriaosylceramide in the hearts of atypical cases of Fabry's disease. Hum Pathol 1990; 21: 1067-73.
- Nagao Y, Nakashima H, Fukuhara Y, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry disease with high residual activity of α -galactosidase A. Clin Genet 1991; 39: 233-7.
- 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.
- 山本一博, 田内 潤, 鍵谷俊文, ほか. 心筋病変のみを呈した62歳 Fabry 病の1例. 心臓 1989; 21: 326-30.
- 絹川弘一郎, 横山泰仁, 富安 斉, ほか. 洞不全症候群を合併した Fabry 病の1例. 心臓 1993; 25: 539-43.
- 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: 288-93.
- Yoshitama T, Nakao S, Takenaka T, et al. Molecular genetic, biochemical, and clinical studies in three families with cardiac Fabry's disease. Am J Cardiol 2001; 87: 71-5.
- Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, et al. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's diseases. Clin Chim Acta 1981; 112: 247-51.
- Beer G, Gietzen F, Hort W, et al. The incidence of concealed myocardial storage disease detected by endomyocardial catheter biopsy in patients with hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy. Eur Heart J 2000; 21: suppl 424. Abstract.

温熱療法は心不全により低下した血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現を改善する： 心筋症ハムスターを用いた検討

池田 義之 枇榔 貞利 鴨川 泰之
吉福 士郎 江藤 英行 折原 弘治
木原 貴士 皆越 眞一 鄭 忠和

鹿児島大学医学部内科学第一講座

【研究要旨】

慢性心不全患者では、末梢血管の収縮による末梢血管抵抗の増大から心後負荷が増加し、運動耐用能の低下などの臨床症状を発現させる^{1,2)}。そのため、慢性心不全に対する治療にはアンギオテンシン変換酵素阻害薬などの血管拡張薬が有用な治療法として確立されている³⁾。我々は慢性心不全に対する非薬物療法として温熱療法を提唱し、これまでその有用性を報告してきた^{4,5)}。慢性心不全患者に、乾式遠赤外線サウナ室を用いた60℃のサウナ浴15分間と、出浴後30分間の保温による温熱療法を施行すると、心臓に対する前・後負荷は持続的に軽減する。その結果、心内圧の低下、心拡大の縮小、心拍出量の増加、心機能の改善が得られる。そこで我々は、この温熱療法の効果発現機序に関する検討を行った。心不全では血管内皮機能は低下している⁶⁻⁸⁾。温熱療法による血管内皮機能に及ぼす効果を臨床的に検討し、2週間の温熱療法は、慢性心不全患者の血管内皮機能を改善することを明らかにした⁹⁾。この血管内皮機能の改善は、慢性心不全患者に対する温熱療法の効果発現機序に関与していることが示唆される。これまで慢性心不全における血管内皮機能低下の機序として、血管内皮における内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現低下が報告されている^{10,11)}。心不全では心拍出量の低下により、末梢血管での血流量は低下し、血流によって生じるshear stressが低下する。このshear stressは血管内皮における一酸化窒素(NO)の

産生酵素であるeNOSの発現を増強することから^{12,13)}、shear stressの低下は、血管内皮におけるNOの産生低下をきたしていると考えられる。したがって、心拍出量を増加させ末梢血管での血流を増加させる温熱療法は、血管内皮におけるeNOSの発現を亢進させることで血管内皮機能を改善させることが示唆される。今回、正常ハムスターに4週間の温熱療法を施行し、eNOSの発現の亢進を証明することができた。

【研究目的】

温熱療法による血管内皮機能の改善の機序を解明するため、温熱療法によるeNOSの発現を検討すること。

【研究方法】

まず、正常ハムスターに対し、39℃15分間のサウナ浴とその後30℃20分間の保温を行う温熱療法を一日一回連続4週間施行した(n=8)。コントロール群は、サウナのスイッチの入っていない室温のサウナ室に一日一回35分間入られる処置を行った(n=8)。血行動態の検討として、Millar catheter microtransducerを用いて大動脈圧・心拍数を測定し、深部体温は直腸温にて計測した。また、4週間の温熱療法終了翌日に両群の大動脈・総頸動脈・冠動脈を摘出し、免疫組織化学染色及び、Western Blot法にてeNOSの発現量を比較検討した。更に、心不全(拡張型心筋症)モデル動物であるTO2ハムスターに対しても、同様の手法にてeNOS発現の検討を行った。