

厚生労働省特定疾患

特発性心筋症調査研究班

平成13年度研究報告集

平成14年3月

班長 篠山重威

# 目 次

I	平成13年度突発性心筋症調査研究班班員名簿	1
II	総括研究報告	3
	浜松労災病院院長 篠山 重威	
III	班員分担別研究報告	
	心筋細胞のアポトーシスにおけるカベオラの関与に関する研究	9
	久留米大学医学部第三内科主任教授 今泉 勉	
	心血管リモデリングに関わる転写因子ならびに細胞の起源に関する研究	13
	東京大学大学院医学研究科循環器内科 永井 良三	
	心筋症・心筋梗塞などによる不全心筋におけるエンドセリン 発現増大の分子メカニズム：心筋エネルギー代謝異常の関与	17
	筑波大学臨床医学系内科 山口 巖	
	拡張型心筋症患者における心筋内遺伝子発現の検討	21
	筑波大学臨床医学系内科 山口 巖	
	拡張型心筋症における薬物療法の効果を年代毎の予後解析により明らかにした。	25
	北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学 北島 顕	
	カテコラミン負荷による心不全進展病態に関する研究	27
	東京大学医学部・器官病態内科、保険センター 豊岡 照彦	
	G蛋白質共役受容体アゴニストによる心筋細胞肥大における ASK1の関与に関する研究	31
	大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学 堀 正二	
	ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける抗心筋自己抗体に関する研究	35
	山口大学医学部器官制御医科学講座循環病態内科学 松崎 益徳	
	C型肝炎ウイルス心筋症の臨床像	38
	京都大学循環病態学 松森 昭	
	拡張型心筋症患者におけるデスミン遺伝子の解析と臨床的特徴の検討	45
	神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 横山 光宏	
	特発性拡張型心筋症患者の心臓交感神経機能と $\beta$ 1アドレナリン受容体 Arg389Gly 遺伝子多型との関連性	50
	神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 横山 光宏	
	心筋細胞のFas誘導性アポトーシスに対する抵抗性のメカニズム —MKP-1過剰発現によるJNK活性化の抑制—	55
	岐阜大学医学部第二内科 藤原 久義	
	ウサギ虚血・再灌流梗塞心への自家骨髄細胞静注法による心筋再生の試み	60
	岐阜大学医学部第二内科 藤原 久義	
	心筋細胞のFas誘導性アポトーシスに対する抵抗性のメカニズム —MKP-1過剰発現によるJNK活性化の抑制—	68
	岐阜大学医学部第二内科 藤原 久義	
	心筋炎惹起性T細胞移入による実験的持続活動性心筋炎の解析	73
	北里大学内科学II 和泉 徹	
	SCIDマウスを用いたラット自己免疫性心筋炎惹起性T細胞株の異種間細胞移入	80
	北里大学医学部内科学II 和泉 徹	

心臓サルコイドーシス患者心筋における 1 型ヘルパー T 細胞関連 サイトカインの発現に関する研究 .....	86
大阪医科大学第三内科 北浦 泰	
肥大型心筋症患者における CD36 欠損症と心筋 BMIPP シンチグラムに関する研究 .....	90
大阪医科大学第三内科 北浦 泰	
C 型肝炎ウイルスに起因する心筋症の疾患感受性領域の同定に関する研究 .....	95
東海大学医学部分子生命科学系 猪子 英俊	
拡張型心筋症患者の抗心筋自己抗体に関する研究 .....	100
慶應義塾大学医学部内科学 小川 聡	
Del-1 の心血管系構築に関する研究 .....	104
東京女子医科大学循環器内科 川名 正敏	
サルコメア変異に起因する肥大型心筋症の臨床病態と予後に関する研究 .....	107
東京医科歯科大学難治疾患研究所教授 木村 彰方	
C 型肝炎ウイルスによる潜在する心筋障害とそれに及ぼすインターフェロンの効果 .....	114
鳥根医科大学第四内科 島田 俊夫	
C 型肝炎ウイルス蛋白質による細胞増殖制御に関する研究 .....	129
京都大学ウイルス研究所 下遠野邦忠	
実験的ラットウイルス性心筋炎に関する研究 .....	131
東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部 武田 信彬	
特発性心筋症におけるチトクローム <i>b</i> 多型の解析 .....	133
岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部 田中 雅嗣	
タコツボ型心筋障害心筋炎症説の検討 .....	137
順天堂大学循環器内科 河合 祥雄	
心筋組織リモデリングにおけるテネインファミリーの意義 ー心筋疾患の診断と治療への応用 .....	143
国立国際医療センター 廣江 道昭	
家族性肥大型心筋症の病因となる心筋ミオシン結合蛋白 ー C 遺伝子変異の日本人における特徴 .....	148
鹿児島大学医学部第一内科 鄭 忠和	
心 Fabry 病の 5 剖検例 .....	154
鹿児島大学医学部第一内科 鄭 忠和	
心筋リモデリングにおける IL-6 ファミリーサイトカインの役割に関する研究 .....	164
大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座 瀧原 圭子	
家族性心筋症における N-カドヘリンの分布異常について .....	170
国立循環器病センター臨床検査部病理 由谷 親夫	
拡張型心筋症に対する心臓移植実施例の検討に関する研究 .....	174
国立循環器病センター 北村惣一郎	
IV 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	179

I 平成13年度突発性心筋症  
調査研究班班員名簿

## 特発性心筋症調査研究班

区分	氏名	所属	職名	備考
主任研究者	篠山重威	浜松労災病院	院長	
分担研究者	今泉 勉 永井良三 山口 巖 北島 顕 豊岡照彦 堀 正二 松崎益徳 松森 昭 横山光宏 藤原久義 和泉 徹 北浦 泰	久留米大学医学部第三内科 東京大学医学系研究科器官病態内科学 筑波大学医学部臨床医学系内科 北海道大学医学部循環器内科 東京大学医学部第二内科 大阪大学医学系研究科病態情報内科学 山口大学医学部第二内科 京都大学医学研究科循環病態学 神戸大学医学部第一内科 岐阜大学医学部第二内科 北里大学医学部内科学 (II) 大阪医科大学第三内科	教授 教授 教授 教授 教授 教授 教授 助教授 教授 教授 教授 教授	
研究協力者	猪子英俊 小川聡 川名正敏 木村彰方 島田俊夫 下遠野邦忠 武田信彬 田中雅嗣 河合祥雄 廣江道昭 鄭 忠和 瀧原圭子 由谷親夫 北村惣一郎	東海大学医学部分子生命科学系分子生命科学 2 慶應義塾大学医学部内科 東京女子医科大学付属日本心臓血圧研究所循環器内科 東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患研究部門 島根医科大学第四内科 京都大学ウイルス研究所 東京慈恵会医科大学青戸病院内科 岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部 順天堂大学医学部循環器科 国立国際医療センター 鹿児島大学医学部第一内科 大阪大学医学部第三内科 国立循環器病センター臨床検査部病理 国立循環器病センター	教授 教授 講師 教授 講師 教授 助教授 部長 講師 部長 教授 講師 部長 院長	
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	松森 昭	京都大学医学研究科循環病態学講座 〒606-8507京都市左京区聖護院川原町54 電話 (075) 751-3185 FAX (075) 752-0856	助教授	

## Ⅱ 総括研究報告

## 特発性心筋症調査研究班

班長 篠山重威  
浜松労災病院 院長

### 総括研究報告

#### 【研究目標】

原因不明の心疾患、特発性心筋症には大別して主に左室心筋の異常な肥大を来す肥大型心筋症と心室の拡張と収縮力の低下を特徴とする拡張型心筋症に分けられる。前者の約半数には家族性がみられ、常染色体優生遺伝様式を示しその約20%に心筋 $\beta$ -ミオシン重鎖遺伝子の点突然変異が存在することが明らかにされたが、過半数の症例において遺伝子異常は明らかにされていない。又遺伝子異常がどのようなメカニズムで病態を形成するののかも不明である。一方、発病後5年間に半数が死亡するという予後不良の拡張型心筋症の発症には環境因子、特にウイルス感染の関与が示唆されているが、その病因はほとんど明らかにされていない。又、末期の拡張型心筋症患者に対して左室部分切除術（バティスタ手術）が施行されているが、これら外科的療法の長期予後は未確定である。本研究班では、ウイルス感染から拡張型心筋症への進展における局所液性因子、免疫学的因子やアポトーシスの役割解明を目指し、更に免疫遺伝学的因子の解析を試みた。又、肥大型及び拡張型心筋症において更に新しい遺伝子変異の検出を試みるとともに、遺伝子異常と病態形成との関連を明らかにすることを目指した。外科的治療法に関して、左室部分切除術に於いては本邦での現状を把握し、又、予後を規定する因子の一つとして切除心筋の形態学的、ウイルス学的検討を行った。心移植に関しては拒絶反応の機序解明を目指した。

### Ⅲ 班員分擔別研究報告



厚生科学研究費補助金（特発性心筋症調査研究事業）

分担研究、研究報告書

心筋細胞のアポトーシスにおけるカベオラの関与に関する研究

（主任又は分担）研究者 今泉 勉 久留米大学医学部第三内科主任教授

## 研究要旨

Ω型の細胞膜ドメインであるカベオラは、アポトーシスに関与すると報告されているが、未だ不明な部分が多い。そこで低酸素による心筋細胞のアポトーシスにカベオラが関与するか否かを検討した。培養心筋細胞に低酸素負荷を行うとアポトーシスが出現するとともに、電顕上カベオラ数が増加していた。低酸素下の心筋細胞にカベオラの機能を抑制するfilipinを添加すると、TUNEL陽性細胞は減少し同時にカベオラ数の増加も抑制した。これらの結果から、カベオラは低酸素負荷によるアポトーシスに促進的に寄与すると推測された。この仮説を証明するために、アデノウイルスを用いて心筋細胞にカベオリン-3を過剰発現させ、カベオラ数を増加させた際のアポトーシスの変化について検討した。低酸素下の心筋細胞にカベオリン-3発現アデノウイルス（Ad.Cav-3）を感染させると、TUNEL陽性細胞は有意に増加し、PI3 kinaseとAktの活性は抑制された。これらの結果から、カベオラはPI3 kinase-Akt系を抑制することにより、アポトーシスに促進的に作用する可能性が示唆された。

## A. 研究目的

カベオラは、細胞膜に存在する約100nmのΩ型小器官である。このドメインは他の膜部位と比べてコレステロールとスフィンゴリピッドに富み、リン脂質が少ないという特殊な脂質構成を持つ。カベオラの特徴的な形態を形成しているのはカベオリンであり、カベオラの機能と密接な関連がある。カベオリンには4つのアイソフォームが存在し、心筋細胞ではカベオリン-3（Cav-3）が主に発現している。カベオラには多様なシグナリング物質が高濃度に含まれており、細胞内シグナルの制御機構として機能すると考えられている。アポトーシスにもカベオラが関与するという報告があるが、反論もあり未だ結論は得られていない。今回の検討は、低酸素における心筋細胞のアポトーシスで心筋カベオラとCav-3が果たす役割の解明を目的とした。そのためにまず、カベオラの形成や機能を阻害するfilipinが心筋細胞のアポトーシスに与える影響を検討した。次にCav-3を過剰発現させることによりカベオラ数を増大させた際、心筋細胞のアポトーシスに与える影響を与えるかを検討した。

## B. 研究方法

### 1 実験プロトコール

モデルは新生児ラット培養心筋細胞を用い、アポトーシスは低酸素負荷（O<sub>2</sub>; 1%）により誘導した。以下の2つのプロトコールを用いた。

#### ①Filipinによるカベオラ機能の抑制がアポトーシスに与える影響の検討

Filipinを低酸素負荷と同時に添加し、24時間培養した。

#### ②アデノウイルスを用いてCav-3を過剰発現させた際のアポトーシスへの影響の検討

ヒト・Cav-3 (Ad.Cav3)またはLac Z発現アデノウイルス (Ad. LacZ)をそれぞれ50 MOI感染させ、感染24時間後に上記の酸素条件とし12時間培養した。

## 2 実験方法

TUNEL染色はIn situ cell death detection kit (Roche)で行い、DNA ladderingは常法で行った。カベオラの変化は透過電顕で観察した。PI3-kinase Assayは抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降分画を用いて、TLC法で行った。Aktのリン酸化は抗Akt 抗体と抗リン酸化チロシン473 Akt抗体を用いたウエスタン・ブロッティングで評価した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は、当施設の倫理基準に従った。

## C. 研究結果

Filipinはコレステロール結合性抗生剤であり、細胞に添加すると細胞内コレステロールのキレートによりカベオラが破壊されることが示されている。まずfilipinを心筋細胞に添加した際のカベオラ数の変化を走査電顕で観察した。常酸素下で培養した心筋細胞では豊富にカベオラが観察され、filipinの添加により有意にカベオラ数が減少した(図1)。意外なことに低酸素負荷した細胞ではカベオラ数が有意に増加していたが、この増加はfilipinの添加により常酸素下レベルとなった。

次に低酸素によるアポトーシスにfilipinが与える影響を検討した。図2に示すように、低酸素下の細胞ではDNA ladderingが出現し、TUNEL染色陽性細胞が著明に増加した。Filipinを添加するとDNA ladderingは抑制され、それと共にTUNEL陽性率は低下した。

これらの結果は、filipin添加が心筋細胞において抗アポトーシスの働くことを意味し、カベオラ数がfilipinの添加により減少することを考慮すると、カベオラがアポトーシスに対し促進的に働く可能性が示唆された。しかしながら、filipinの作用は非特異的と推測され明確な結論は得られない。この仮説を証明するために、アデノウイルスを用いて心筋細胞にCav-3を過剰発現させ、カベオラ数を増加させた際のアポトーシスの変化について検討した。低酸素下の心筋細胞にAd.Cav-3を感染させると、TUNEL陽性細胞は有意に増加したが、コントロールのAd.LacZ感染では影響を与えなかった(図3)。これは上記の仮説を支持する結果であるが、カベオラやCav-3がどのようにアポトーシスに関与するかは不明であった。カベオリンは、in vitroで多様なkinaseに対して抑制的に働く。そこで我々はsurvival pathwayの1つでありカベオラとの関連が報告されているPI-3 kinase-Akt系に着目し、両者の活性をカベオラおよびCav-3が抑制的に制御する可能性を推測した。PI-3 kinase活性とAktのリン酸化を検討したところ、図4に示すように両者ともAd.Cav-3の感染により抑制された。従って、カベオラとCav-3はPI-3 kinase-Akt系を抑制することによりアポトーシスに関与している可能性が示唆された。

## D. 考察

カベオラとアポトーシスとの関連については、以下の如く報告がある。まずトランスフォームしたHEK293細胞にカベオリン-1を発現させると、増殖が抑制されアポトーシスが誘導される。また、TNF $\alpha$ 誘導性アポトーシスのシグナルはカベオラに起始すると報告されている。さらにPI-3 kinaseに対して抑制作用を有すセラミドは、カベオラに高濃度に存在することが知られているが、セラミドによるPI-3 kinaseの抑制効果はアンチセンス・カベオリン-1により阻止されることが示されている。しかしながら、カベオリンがアポトーシスに対し抑制的に働くとの報告もあり、はっきりした結論は得られていない。今回の検討により、心筋細胞ではカベオラとCav-3はアポトーシスに対し促進的に働くことが示された。

アポトーシスは、生存シグナルと細胞死シグナルのバランスに依存すると考えられており、低酸素による

心筋細胞のアポトーシスも例外ではない。今回の検討では、Cav-3を過剰発現させるとPI-3 kinaseの活性やAktのリン酸化が抑制され、カベオラのアポトーシスへの関与は生存シグナル抑制を介す可能性が示唆された。PI-3 kinase-Akt系の抑制は、Cav-3の著明な発現亢進により細胞内の蛋白構成が変化し、結果として非特異的な活性抑制が起こっている可能性も考えうる。しかし我々は、同じ系へのAd.Cav-3の感染では、endothelin-1によるJNKのリン酸化に影響を与えないことを確認しており、PI-3 kinase-Akt系の抑制効果は特異的と推測している。

Lisantiらは、アンチセンス・カベオリン-1を発現させた細胞では、アポトーシスに対する感受性が低下するが、その細胞でPI3-kinaseを阻止するとアポトーシスに対する感受性が回復することを報告している。これは、カベオリン-1がPI-3 kinaseを抑制的に制御している可能性を示唆しており、アイソフォームの違いはあるものの我々の結果を支持する。彼らは、カベオリン-1を発現させた細胞では容易にcaspase-3が活性化されるとも報告しており、Cav-3の発現でもプロアポトティックな因子の変化が起こっている可能性も示唆された。

## E. 結論

カベオラとCav-3はPI3 kinase-Akt系を抑制することにより、アポトーシスに促進的に作用する可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kuwahara F et al.: Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39:46-50,2002

Kuwahara F et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106:130-5.

### 2. 学会発表

Kikuchi T et al: Caveolae play role in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. The American Heart Association, The 74th Scientific Sessions, USA, 2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

研究協力者 岡 直樹、菊池俊夫、甲斐久史、桑原史隆

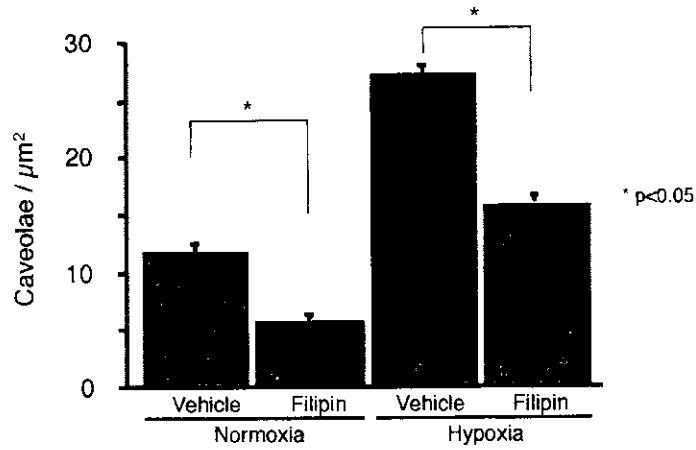


図1 心筋細胞のカベオラ数に低酸素およびfilipin添加が与える影響

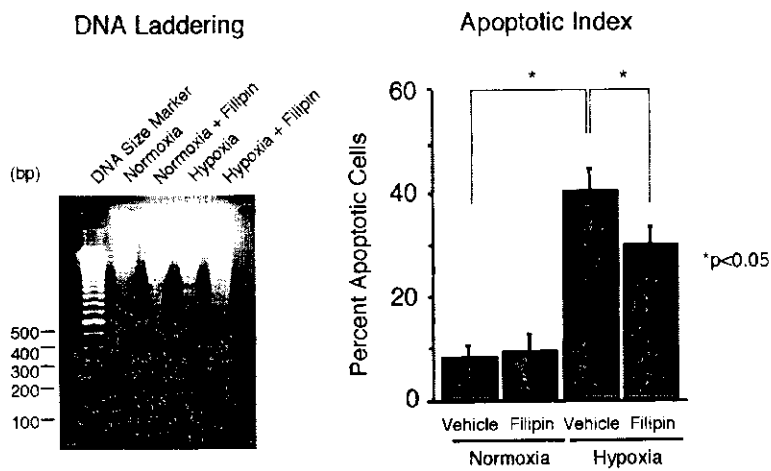


図2 心筋細胞のアポトーシスに低酸素およびfilipin添加が与える影響

- A. DNA laddering
- B. TUNEL陽性細胞率

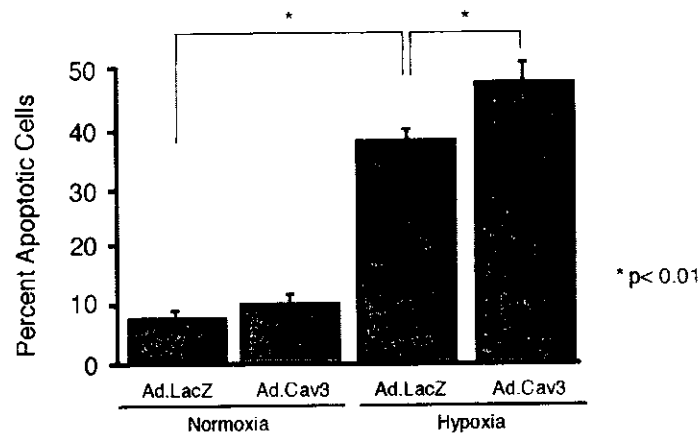


図3 カベオリン-3過剰発現が心筋細胞のアポトーシスに与える影響

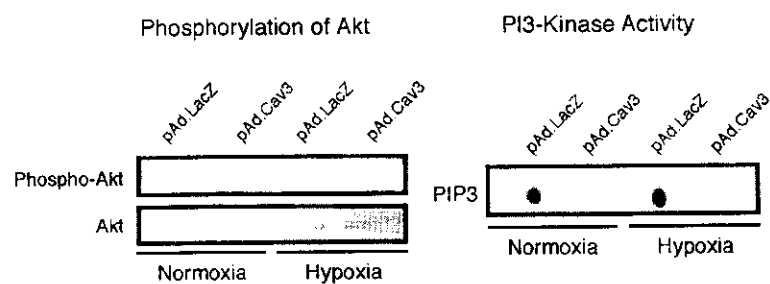


図4 カベオリン-3過剰発現がPI-3 kinaseおよびAkt活性に与える影響

別紙 1

厚生科学研究費補助金（特発性心筋症調査研究事業）  
分担研究報告書

心血管リモデリングに関わる転写因子ならびに細胞の起源に関する研究

分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学研究科（循環器内科）教授

心血管系は負荷に応答して3次元構造を変換する。その過程で線維化や臓器肥大をきたし、最終的には心不全や血管障害にいたる。このような臓器モデリングにいかなる遺伝子転写因子が関わるかは不明である。

本研究では血管障害時に増殖する内膜平滑筋で発現する転写因子 KLF5/BTEB2 の心血管病態形成における意義を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成した。その結果、ホモマウスは胎生早期に死亡したが、ヘテロマウスは、異物周囲の血管新生と肉芽形成反応、アンジオテンシン II 負荷による心肥大と心筋線維化が著明に減弱していた。またヘテロマウスでは PDGF-A の発現が選択的に低下していた。このことは、アンジオテンシン II→MAPキナーゼ→PDGF-A という軸が心血管リモデリングの形成に重要であることを示している。今後新しい心血管保護法として、KLF5/BTEB2 を抑制する薬物の開発が期待される。

永井良三  
東京大学大学院医学研究科・循環器内科、  
教授  
新藤隆行  
東京大学大学院医学研究科・循環器内科、  
助手

#### A. 研究目的

心血管細胞は常に変動する外的ストレスにさらされ、遺伝子発現や細胞の性質を変化させている。心血管リモデリングはストレスに対する生体の適応現象とも考えられるが、同時に病態進展と密接に結びついている。心臓リモデリングは、心筋梗塞後心拡大や高血圧による心肥大等で認められるが、過度に進むと逆に心機能を悪化させる。血管リモデリングは、細胞増殖、細胞遊走、細胞外マトリックスの産生分解などの過程を含む血管壁の構造の変化であり、動脈硬化症、PTCA 後再狭窄等で認められる。これらの機序については細胞内シグナルに注目した研究が主として行われてきたが、遺伝子転写制御機構は解明されていない。我々は、心血管系リモデリングの分子機構に関し、特に血管平滑筋細胞の活性化に関連する転写因子 KLF5/BTEB2 を単離同定した。KLF5/BTEB2 は、血管傷害に応答して新生内膜を形成する平滑筋細胞

に強い発現を認める。In vitro の検討では KLF5/BTEB2 は胎児型ミオシン重鎖遺伝子等の発現を亢進させる転写因子であることが検討されており、ストレス応答としての心血管リモデリングの転写調節を制御している因子である可能性が考えられる。

本研究では、KLF5/BTEB2 遺伝子ノックアウトマウスを新たに樹立し、転写因子 KLF5/BTEB2 の心血管リモデリング応答における意義を実際に生体レベルで解明する。

#### B. 研究方法

##### (1) KLF5/BTEB2 ノックアウトマウスの樹立

KLF5/BTEB2 ノックアウトマウスの作成にあたっては、エクソン 2-3 をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。Southern blot 法にて germ line transmission を示す 2 ラインを確認し以後の解析に用いた。

##### (2) KLF5/BTEB2 遺伝子変異が心血管形態に及ぼす影響の検討

KLF5/BTEB2 遺伝子変異マウスにおける心血管

系の形態変化を検討する。次に観血的血圧測定、薬剤投与により血圧反応特性の変化を検討する。更に大動脈リング標本を用いて、各種薬剤に対する血管反応特性を検討する。

### (3) KLF5/BTEB2 遺伝子変異マウスを用いた心血管病態モデルの作成

KLF5/BTEB2 遺伝子変異マウスにおいて、血管炎モデル、血管内膜剥離モデルなどの血管傷害モデルを作成し、血管のリモデリング応答について検討する。更に大腿動脈結紮による下肢虚血モデル、腫瘍移植モデルなどにおける血管新生能を、laser doppler 法による血流の計測や組織内の毛細血管密度により評価する。次に血管障害を示す他の高血圧、糖尿病、高脂血症動物との交配により各病態モデルを作成し、KLF5/BTEB2 遺伝子変異の影響を検討する。

心臓のリモデリング応答については、アンジオテンシン II (AngII) 持続投与モデル、大動脈狭窄モデルなどにおける心筋細胞肥大、心線維化を検討する。

### (4) KLF5/BTEB2 の下流に位置する因子の検討

KLF5/BTEB2 の転写制御の target gene として予測される各種の growth factor の発現の変化を KLF5/BTEB2 遺伝子変異マウスにおいて検討する。変化の見られる遺伝子について reporter assay を行い、KLF5/BTEB2 の転写活性を検討する。更に、クロマチン構造を保ったゲノム DNA のプロモーター部分への KLF5/BTEB2 の結合を chromatin immunoprecipitation assay により検討する。

### (5) KLF5/BTEB2 の転写活性調節因子のスクリーニングと治療効果の検討

KLF5/BTEB2 の転写活性を特異的に変化させる化合物のスクリーニングを行う。こうした化合物を実際に遺伝子欠損マウスに投与し、表現型、特に病態モデルにおける反応性を変化させ得るか検討し、心血管病治療薬としての可能性を探る。

## C. 研究結果

### (1) KLF5/BTEB2 ノックアウトマウスの樹立

ホモ接合体は発生早期に致死であった。ヘテロ接合体 (KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>) は、野生型と比較して有意に体重減少を認める他は外見上異常が認められなかった。

### (2) KLF5/BTEB2 遺伝子変異が心血管形態に及ぼす影響の検討

KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>の大動脈は、野生型と比較して大動脈壁が薄く外膜の発達不良を認めた。胸部大動脈を摘出し、大動脈リング標本において薬剤による反応を検討したところ、12 ヶ月齢の加齢マウスにおいては、アセチルコリン、アドレノメデュリンに対する血管弛緩反応、エンドセリン-1、Ang II に対する血管収縮反応とも野生型に比べ低下していた。

### (3) KLF5/BTEB2 遺伝子変異マウスを用いた心血管病態モデルの作成

大腿動脈内膜剥離血管傷害モデルでは KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>マウスにおいて、新生内膜肥厚が有意に抑制されていた (図 1)。また、大腿動脈カフ傷害モデルでは、KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>において、炎症に伴う線維性組織の増殖、新生内膜形成、外膜における反応性微小血管の形成が低下していた。更に、下肢動脈結紮モデルで血流回復を測定したところ、KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>では血流回復の遅延が認められ、KLF5/BTEB2 が虚血に伴う血管新生に関与している可能性が示された。

次に心リモデリングの検討として、持続的 Ang II 負荷実験を行ったところ、野生型では心筋細胞の肥大と間質の線維化、冠動脈周囲の線維化が認められたが、KLF5/BTEB2<sup>+/-</sup>マウスでは、いずれの反応も著明に低下していた (図 2, 3)。

### (4) KLF5/BTEB2 の下流に位置する因子の検討

KLF5/BTEB2 <sup>+/-</sup>では、PDGF-A 発現が野生型の半

分程度まで低下していた。Ang II 刺激した培養心線維芽細胞では、KLF5/BTEB2 の誘導に続いて PDGF-A 発現亢進が確認された。更に KLF5/BTEB2 +/- では、PDGF-A ノックアウトマウスと同様の消化管形態異常が見られた。クロマチン構造を保ったゲノム DNA への KLF5/BTEB2 の結合を ChIP assay で検討したところ、Ang II 刺激下において KLF5/BTEB2 は PDGF-A プロモータに結合することが示された。

#### (5) KLF5/BTEB2 の転写活性調節因子のスクリーニングと治療効果の検討

KLF5/BTEB2 の転写活性を亢進させる化合物のスクリーニングを行い、KLF5/BTEB2 +/- に投与したところ、傷害血管のリモデリング亢進が確認された。

#### D. 考察

以上の結果は KLF5/BTEB2 が、臓器傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての肉芽形成、線維化、血管新生、ひいては臓器リモデリングを制御している重要な転写因子であることを示している。更に KLF5 の転写活性を調節する薬剤によって、心血管リモデリングを制御する新たな治療法の可能性が示唆された。

#### E. 結論

本研究では、遺伝子改変マウスを用いた検討から、KLF5/BTEB2 の傷害応答としての心血管リモデリングにおける役割を検討を進めた。

今後、疾患モデルを作成すると共に、他の高血圧、糖尿病、高脂血症モデル動物との交配により病態モデルを作成し、各遺伝子の欠損の影響を解析する予定である。KLF5/BTEB2 を中心とした転写制御の分子機構の理解が、心血管系リモデリングを制御する新たな治療法の可能性を開くものと期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Krppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling  
Shindo T et al., Nature Medicine 2002 Aug

##### 2. 学会発表

2002年4月24日 札幌

第66回日本循環器病学会

IKLF/BTEB2, a zinc finger transcription factor, plays central roles in cardiovascular remodeling in vivo.

2002年4月25日 札幌

第66回日本循環器病学会

Critical roles of IKLF/BTEB2 in vascular remodeling proved by gene targeting.

2002年4月25日 札幌

第66回日本循環器病学会

Transcriptional regulation of angiogenesis in vivo.

2002年4月26日 札幌

第66回日本循環器病学会

A Kruppel-like transcription factor IKLF/BTEB2 activates the PDGF promoter in response to angiotensin II in cardiovascular remodeling.

2002年5月14日 軽井沢

XII th International Vascular Biology Meeting  
Kruppel-like transcription factor BTEB2 is a regulator of cardiovascular remodeling.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

图 1

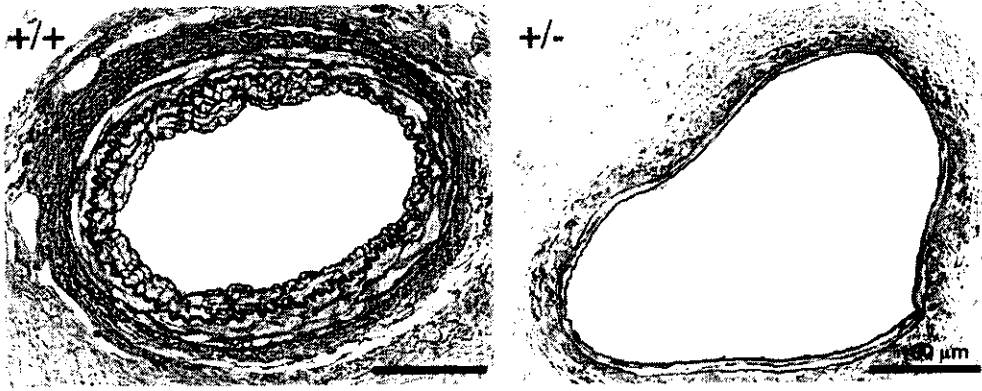


图 2

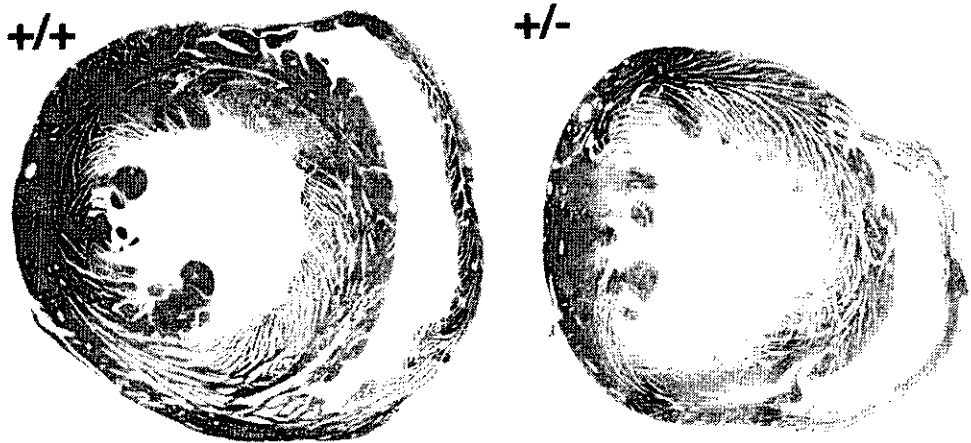
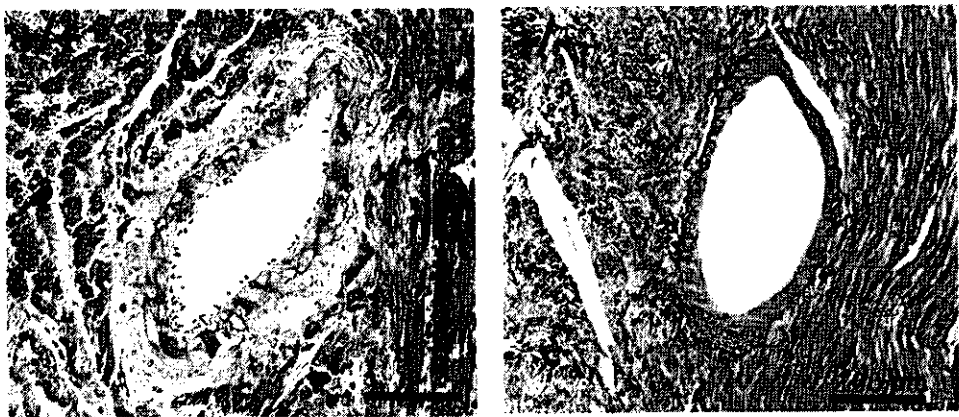


图 3





## 平成13年度第1回特発性心筋症班会議・報告書

心筋症・心筋梗塞などによる不全心筋におけるエンドセリン発現増大の分子メカニズム：  
心筋エネルギー代謝異常の関与

分担研究者 山口 巖 筑波大学臨床医学系内科

### 研究要旨

エンドセリン (ET)-1遺伝子の上流には、転写因子であるhypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ の認識配列が存在する。ET-1とHIF-1 $\alpha$ に関する知見として、不全心筋におけるET-1遺伝子の著明な発現増大は、不全心筋に見られるミトコンドリアの機能障害に伴うエネルギー不足がその原因として寄与し、その際、転写因子であるHIF-1 $\alpha$ の発現増大を介して、ET-1遺伝子の発現が増大することが示唆された。すなわち、エネルギー不足状態にある不全心筋では、その不足を補うために嫌気性代謝を司る酵素群の遺伝子を増大させるHIF-1 $\alpha$ が代償として誘導されるが、HIF-1 $\alpha$ はET-1遺伝子発現増大作用も有するため、誘導されたET-1が不全心筋の悪化・破綻を進行させてしまうことが示唆された。

筑波大学臨床医学系内科

宮内 卓, 柿沼由彦, 村越伸行, 酒井 俊, 飯田啓治, 河野 了, 山口 巖

筑波大学基礎医学系薬理

後藤勝年

### A. 研究目的

急性の心筋梗塞患者では、健常者と比較して血中エンドセリン濃度の著明な上昇が報告されている<sup>1)</sup>。我々は冠動脈結紮により作製した心不全ラットの心臓におけるendothelin-1(ET-1)の産生について検討して結果、ET-1の増加およびET-1 mRNAの著明な発現<sup>2)</sup>が認められた。

エンドセリンは心肥大作用、arrhythmogenic作用、強心作用など心機能の障害作用を示すことが知られているが<sup>3)</sup>、エンドセリン受容体遮断薬(BQ-123)の長期投与により心不全ラットの生存率は著明な改善を示したことから<sup>2)</sup>、心不全悪化におけるET-1の関与は明らかである。本稿では、心不全の分子メカニズムにおけるET-1の役割について報告する。

### B. 方法と結果

(I) 心筋遺伝子に対するエンドセリン受容体拮抗薬の作用

エンドセリン受容体拮抗薬は不全心筋を分子レベルから改善するのか、心不全において発現の変化する各種心筋遺伝子に対するエンドセリン拮抗薬の改善効果について検討を行った。

エンドセリン受容体拮抗薬の長期投与により、心不全で著明に増加した左室でのANPのmRNAの発現は抑制され、分子レベルでの不全心筋の改善が示唆された<sup>4)</sup>。同様に、不全心筋において著明に増加したCa<sup>2+</sup> handling蛋白である ryanodin receptorの mRNA, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase mRNAのいずれも抑制し、エンドセリン受容体拮抗薬は血行動態の改善のみならず、分子レベルでの不全心筋の改善作用が判明した<sup>4)</sup>。また、エンドセリン受容体拮抗薬とアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬の併用効果について心不全ハムスターで検討した結果、各薬剤の単独投与よりも生存率の著明な改善が認められている。

## (II) ET-1遺伝子の発現・増大の機序

心不全における ET-1遺伝子(mRNA)の発現・増大の調節機序について検討した。ET-1の mRNAを上昇させる因子としてはアンジオテンシンII, バゾプレシン等があり、低下させる因子としてはANP, BNPがあげられ、ANP, BNPの心保護効果には直接作用のほか、エンドセリンの低下を介した効果が推測される<sup>3)</sup>。

ヒトの心不全ではどのような機序がみられるのか、心臓核医学検査で使用されるBMIPP心筋シンチの観察から、心不全患者は健常者と比較してBMIPP取り込みの低下が認められ、心臓における脂肪酸の低下が示唆された。心臓は脂肪酸の代謝によりエネルギーを得ており、心不全では脂肪酸の代謝障害が生じて糖代謝によってエネルギーを代償的に得るようになるが、このエネルギーの変換がエンドセリンの上昇をもたらすと推測された。

正常心筋のエネルギー供給は、主に脂肪酸のβ酸化に依存する。一方、細胞がエネルギー不足になると転写因子であるhypoxia-inducible factor (HIF) -1αが誘導され、解糖系によるATP産生(すなわち嫌気性代謝)を司る一連の酵素群の遺伝子を誘導することが知られている。ET-1遺伝子の上流にはHIF-1αの認識配列が存在する。そこで、我々は心臓における脂肪酸のβ酸化の障害、同時に生じる解糖系の活性化がET-1 mRNA発現を誘発するという機序の仮説を立て、転写因子HIF-1αとの関連について検討を行った<sup>5)</sup>。

心筋エネルギー代謝不全でのミトコンドリアの電子伝達系では、Complex I, II, III, IVへとエネルギーが伝達されるが、Complex Iの機能を阻害するrotenoneの投与により、グルコースの消費量の上昇とともにET-1 mRNA, HIF-1 mRNAの上昇が認められた<sup>5)</sup>。同様に、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するコバルトクロライド(CoCl<sub>2</sub>)の投与により、ミトコンドリア機能の低下とともにグルコース濃度の増大が認められ、この状況下ではHIF-1 mRNA, ET-1 mRNAの著明な上昇、および心筋障害を受けた分子マーカーであるANP mRNAの著明な上昇が認められた<sup>5)</sup>。

ルシフェラーゼアッセイにより、ET-1遺伝子5'の上流域の-385bpにHIF-1αの認識配列が認められたが、ここにHIF-1αが結合することによってET-1が上昇するか検討を行った<sup>5)</sup>。

HIF-1αを発現したベクターの導入によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められ、ET-1 mRNAの発現が著明に上昇した。ゲルシフトアッセイによる検討でも、HIF-1αのET-1遺伝子5'の上流域の-385bpへの結合が認められ、この結合によりET-1への転写活性が亢

進することが明らかとなった<sup>5)</sup>。

### (III) 心不全の進展に伴うHIF-1 $\alpha$ , ET-1 mRNAの上昇

HIF-1 $\alpha$ は心不全の進展とともにどのような発現をするのか、心筋梗塞のラットを用い*in vivo*の検討を行った。対照群のSham手術群に対して、心筋梗塞ラットではET-1 mRNA, HIF-1 mRNAともに進行性の上昇が認められた<sup>5)</sup>。心筋症ハムスターの検討においても、同様に心不全の進展に伴うHIF-1 $\alpha$ , ET-1 mRNAの進行性の上昇のデータが得られた<sup>5)</sup>。

培養心筋細胞を用いた実験でも、対照のvehicle投与群に対してCoCl<sub>2</sub>投与により、ミトコンドリアにおける電子伝達系の機能が阻害され、ET-1 mRNAの著明な発現の増加が認められた。これに対して、HIF-1 $\alpha$ のアンチセンス導入によりET-1 mRNAの発現は著明に抑制された<sup>5)</sup>。すなわち、エネルギー代謝障害によって惹起されるET-1の発現の上昇は、転写因子のHIF-1 $\alpha$ を介した機序が存在することが明らかとなった。

CoCl<sub>2</sub>投与の心機能に及ぼす影響について*in vivo*で検討を行った結果では、対照に対しCoCl<sub>2</sub>を3週間投与したラットでは収縮力の低下が生じ、さらに左室拡張末期径の増大が認められた。

## C. 考察と結論

HIF-1 $\alpha$ とET-1に関する総括としては、不全心筋におけるET-1遺伝子の著明な発現増大は、不全心筋に見られるミトコンドリアの機能障害に伴うエネルギー不足がその原因として寄与し、その際、転写因子であるHIF-1 $\alpha$ の発現増大を介して、ET-1遺伝子の発現が増大することが示唆された。

すなわち、エネルギー不足状態にある不全心筋では、その不足を補うために嫌気性代謝を司る酵素群の遺伝子を増大させるHIF-1 $\alpha$ が代償として誘導されるが、HIF-1 $\alpha$ はET-1遺伝子発現増大作用も有するため、誘導されたET-1が不全心筋の悪化・破綻を進行させてしまうことが示唆された。

心不全のとき、心臓における脂肪酸の $\beta$ 酸化の障害によるエネルギー代謝不全により、転写因子のHIF-1 $\alpha$ の増大が起こる。これによって、解糖系酵素遺伝子の増大(adaptation)、およびET-1の遺伝子の増大(maladaptation)を引き起こす。Maladaptationは心不全を悪化させると考えられるが、この経路の遮断により、エネルギー代謝は代償されながら心不全の進行の予防が可能ながことがアンチセンスによる検討で明らかとなった。

## D. 文献

- 1) Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, et al : Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; 2:53-54
- 2) Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, et al : Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384:353-355
- 3) Miyauchi T, Masaki T : Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 391-415

- 4) Sakai S, Miyauchi T, Yamaguchi I: Long-term endothelin receptor antagonist administration improves alteration in expression of various cardiac genes in failing myocardium of rats with heart failure. *Circulation* 2000 ; 101: 2849-2853
- 5) Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, et al : Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 2001 ; 103: 2387-2394