

平成13年度第2回特発性心筋症班会議・報告書

拡張型心筋症患者における心筋内遺伝子発現の検討

分担研究者 山口 巖 筑波大学臨床医学系内科

研究要旨

不全心筋における多彩な mRNA の発現を包括的に調査するために、拡張型心筋症患者に機械的補助循環療法を導入する際に左室心尖部より採取した左室心筋ブロックを試料とし、oligonucleotide array 法を用いて検討を行った。GAPDH の発現は不全心筋と正常心筋で差はなく、今回用いた oligonucleotide array 法には非特異的結合は少ないものと考えられた。正常心筋と比較して不全心筋では 168 種類の mRNA の発現が増加しており、そのうちの 57 種類は正常心筋にはなく、不全心筋にのみ認められるものであった。一方、不全心筋で正常心筋よりも減少していた mRNA は 372 種類あり、そのうち 161 種類の遺伝子発現が欠失していた。重症心不全を発症した拡張型心筋症患者の心筋では多彩な mRNA の発現の変化が認められた。このことから拡張型心筋症の病因および病態には極めて多彩な遺伝子が関与しているものと考えられる。拡張型心筋症あるいは重症心不全で特異的に発現される遺伝子を同定するため、今後さらに多くの症例で同様の解析を重ねる予定である。

筑波大学臨床医学系内科

河野 了, 飯田 啓治, 西 功, 増見 智子, 美崎 昌子, 文蔵 優子,

渡辺 重行, 山口 巖

筑波大学臨床医学系外科

軸屋 智昭, 榊原 謙

エーザイ (株) シーズ研究所

黒光 淳郎, 長洲 毅志

A. 研究目的

心不全は種々の負荷に対する適応反応の破綻による心筋の機能不全状態と理解されている。この心負荷に対する適応反応の分子生物学的機序について、近年、不全心筋における収縮蛋白, エネルギー代謝, カルシウムハンドリング, 心筋細胞膜 β 受容体, 間質など多彩な要素について精力的な研究が行われている。欧米では心移植で得られたヒトの心筋をこれらの解析に用いて報告がされているが、本邦では、実験モデル動物の他、患者の心筋生検により得られたごく少量の試料を用いて検討されていることが多い。このような従来の研究法の欠点を補うべく、我々は比較的多量の不全心筋を得るために、成人の拡張型心筋症患者に対して機械的補助循環療法を導入する際に得られた左室心筋ブロックを試料とすることを計画した。さらに、不全心筋における多彩な mRNA の発現を包括的に調査することを目的として、oligonucleotide array 法を採用し、重症心不全を呈する拡張型心筋症患者における心筋内遺伝子発現の検討を行った。

B. 方法

1. 症例

今回、解析を行った症例は 37 歳の男性である。平成11年8月頃から労作時呼吸困難、全身倦怠感を自覚するようになった。前医にて完全房室ブロック、うっ血性心不全と診断され、ペースメーカー植込み術を施行した後に、更なる精査・治療を目的に筑波大学附属病院に転院した。入院時身体所見にて III 音を聴取。VDD ペースメーカーによる調律であった。胸部レントゲン写真上 CTR は 50%であったが、心エコー法では左室拡張終期径 77 mm, 駆出分画 36%であり、左室拡大と収縮力低下を認めた。経過およびその他の検査所見などから、特発性拡張型心筋症と診断し、入院後、enarapril と flosemide に加え、 β 遮断薬の導入を開始した。carvedilol を 2.5 mg から開始し、7.5 mg まで漸増した頃から全身倦怠感と労作時呼吸困難が増強し、NYHA IV となったため、ホスホジエステラーゼ阻害薬 (miralinone), 強心薬 (colforsin daropate) とカテコールアミン (dopamine, dobutamine) の点滴静注を開始した。2月11日、発熱を契機に心原性ショックを合併したため LABP の挿入を行ったが、それでもなお肺毛細管楔入圧 22 mmHg, 心係数 1.6 ml/min/m² であり Forrester IV が継続するため、PCPS 導入の後に体外設置型ゼオン製サック型人工心臓装着手術を行った。術中、脱血用人工血管を挿入する際に左室心尖部から心筋を全層にわたり一塊として採取し、直ちに液体窒素により-80℃で凍結保存した。

2. oligonucleotide array 法による遺伝子解析

後日、得られた左室心筋試料をホモジネートした後に total RNA を抽出し調整を行った。得られた total RNA 5 μ g から SuperScript Choice System (Life Technologies 社) と T7 RNA polymerase promoter sequence (Amersham 社) で cDNA を作成した。次にこれをテンプレートとして biotinyl 化 UTP, CTP の混在下に Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics) で転写を行い、Biotin 標識 cRNA を作成、精製し、これを Affymetrix 社製の HuFL GeneChip を用いてハイブリダイゼーションした。次にこれを洗浄し、streptavidin-phycoerythrin で染色した後に同社の Affymetrix GeneChip analysis software (version 4.0) でスキャン及び解析を行った。今回は前述の症例から得られた不全心筋の他に、Invitrogen 社から購入した正常心筋を同様の方法で解析し、これを正常対照として比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「筑波大学医の倫理特別委員会」の審査を経て行った。

C 研究結果

1. oligonucleotide array 法の妥当性の検討

初めにマイクロアレイ法の妥当性を判定するため、2種類のハウスキーピング遺伝子すなわち β -Actin とグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の mRNA の発現について検討した (Figure 1)。5' および 3' 末端, 中間部のいずれに対してのプローブも正常心筋と不全心筋で大きな差はなかった。この結果から今回用いた oligonucleotide array 法には非特異的反応は少なく、他の mRNA についても比較検討が可能であると考えられた。

2. 正常心筋と不全心筋における mRNA の発現

本研究で HuFL GeneChip により検討を行った 7129 種類の遺伝子のうち、発現が認め

られたmRNAの総数は正常心筋で2903種類、不全心筋で2708種類であった (Figure 2)。そのうち正常心筋と不全心筋の両方の組織で共通して発現していた mRNA は 2380種類であった。一方、正常心筋でのみ認められ不全心筋では発現がなかった mRNA は 523種類であった。逆に、不全心筋でのみ認められ正常心筋では発現がなかった mRNA は 328種類であった。正常心筋と比較して不全心筋で発現量が減少していた mRNA は 372種類であった。逆に、正常心筋よりも不全心筋で増加していた mRNA は 168種類あることが判明した。

D. 考察

正常心筋と比較して不全心筋で発現の変化が認められた mRNA の例を表1に示す。増加した遺伝子は Insulin like growth factor, IL-6, TNF, TGF などのサイトカイン系, ANP, BNP など液性因子に関与する mRNA が多く、これらの物質が心不全の悪化と循環動態の適応に関与しているとする従来の報告と一致しているものと考えられる。一方、減少を示した遺伝子は ubiquinone, adenylate cyclase, pyruvate dehydrogenase kinase, ミトコンドリア系などエネルギー産生系の mRNA が多いと思われた。ただし、本研究で検討した不全心筋は1症例のみのものであるため、正常心筋と比較して増減が認められた個々の mRNA の動態について一般化して論じることは困難である。Yang らは拡張型心筋症と虚血性心筋症の2症例の心筋をマクロアレイ法を用いて解析し報告している

(Circulation. 2000;102:3046)。それによると、(1) 細胞骨格, 筋線維系の遺伝子 (striated muscle LIM protein-1, myomesin, nonsarcomeric myosin regulatory light chain-2, β -actin)、(2) 心筋蛋白の代謝分解蛋白 (α 1-antichymotrypsin, ubiquitin, gelsolin)、(3) エネルギー代謝系 (ATP synthase a-subunit, succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, aldose reductase, TIM17 preprotein translocase)、(4) 蛋白合成系 (elongation factor-2, eukaryotic initiation factor-4AII, and transcription factor homologue-HBZ17)、(5) genes encoding stress proteins (α B-crystallin, μ -crystallin) など 19 種類の mRNA に正常心筋と比較して増減を認めたと述べているが、今回の解析結果と動態が一致する遺伝子は ANP の mRNA の増加のみであった。これらの mRNA の発現は心不全の重症度や原因、あるいは使用する薬剤などの外的要因により複雑に変化することが考えられ、そのために解析結果が一致していないことも推測される。そのような要素を排除するためには、今後さらに多数例の不全心筋に解析を加え、複数次元解析を行う必要がある。

【結論】

重症心不全を発症した拡張型心筋症患者の心筋では多彩な mRNA 発現の変化が認められ、拡張型心筋症の病因および病態には極めて多くの遺伝子が関与しているものと考えられた。拡張型心筋症あるいは重症心不全で特異的に発現される遺伝子を同定するためには、今後さらに多くの症例で同様の解析を重ねる必要がある。

【研究発表】

Keiji Iida, Isao Nishi, Tomoko Masumi, Satoru Kawano, Iwao Yamaguchi, Expression of mitochondrial DNA is increased in a failing heart of a patient with dilated cardiomyopathy. 第66回日本循環器学会学術集会総会, 2002年, 京都

Keiji Iida, Isao Nishi, Tomoko Masumi, Satoru Kawano, Iwao Yamaguchi, The first report in Japan on analysis of messenger RNA in a failing heart of a patient with dilated cardiomyopathy by high-density oligonucleotide arrays. 第66回日本循環器学会学術集会総会, 2002年, 京都

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（特発性心筋症調査研究班）

分担 研究報告書

分担研究者氏名：北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学・教授 北島 顕

研究要旨 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。

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後及び予後に関わる因子と年代毎の変遷を明らかにするため、疫学的解析を行った。

B. 研究方法

当科で、1983 年から 1990 年にかけて、1991 年から 2000 年にかけて、それぞれ新規に登録された拡張型心筋症患者の予後解析を行い、1974 年から 1982 年に当科を含めた全国 17 施設で厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班に登録された症例とも比較検討を行った。

C. 研究成果

登録症例数はそれぞれ、82 例、100 例、318 例、平均観察期間は 47 ヶ月、84 ヶ月、40 ヶ月、死亡患者数は 15 例、21 例、169 例、年間死亡率は 4.7%、3.0%、13.4%であった。予後と関連因子との関連を検討した。各年代毎に受診時重症度は低く、ACE 阻害薬または β 遮断薬の使用頻度が 35%、73%、3.6%と高くなり、予後とも対応した。

D. 考察

年代により、拡張型心筋症患者の予後は改善されている。早期の診断と薬物治療の進歩が生命予後へも影響することが示唆された。

E. 結論

拡張型心筋症患者の予後はしだいに改善されている。その寄与因子として、ACE 阻害薬と β 遮断薬の投与が貢献している。

G 研究発表

1. 論文発表

渡邊 正司、岡本 洋、北島 顕

心筋症の疫学—欧米との比較を中心にして—

病理と臨床 18 (6) : 508-515、2000

岡本 洋、渡邊 正司、北島 顕

拡張型心筋症 「経過と予後」

目で見える循環器病シリーズ 14 「心筋症」

松森 昭編集 第 4 章 5 148-153

2000 年 11 月 1 日初版、(株)メデイカルビュー社

学会発表

岡本 洋、渡邊 正司、北島 顕

拡張型心筋症の予後の変遷

日循北海道地方会、2000 年 10 月 21 日、札幌

拡張型心筋症の生命予後とその変遷

清水紀宏、岡本 洋、渡邊 正司、菅原

武、松井 裕、千葉 知、賈楠、秋野正

敏、北島 顕、平成 13 年度第 1 回心筋

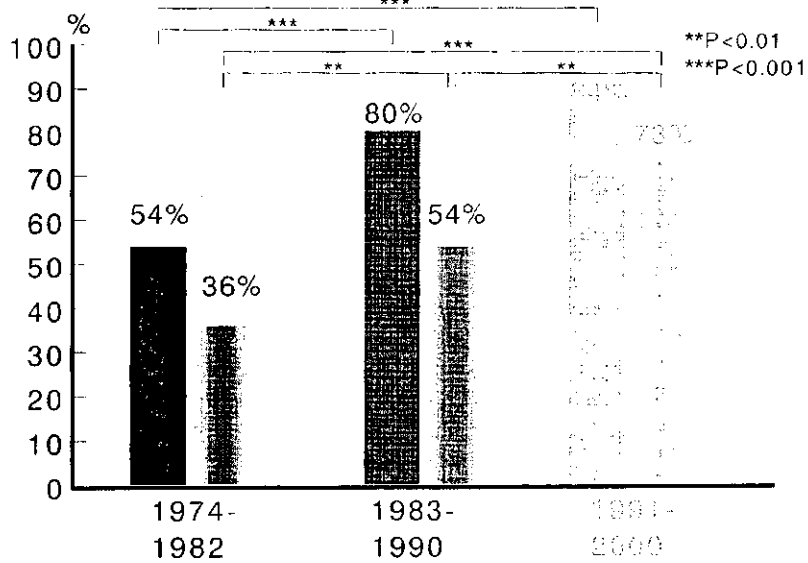
症班会議、2001 年 11 月、京都

拡張型心筋症患者の生命予後

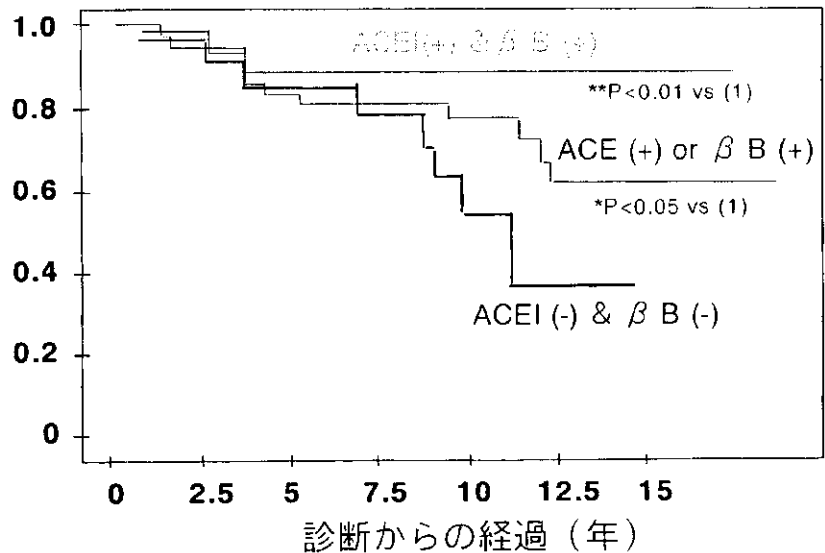
	登録患者数	平均観察期間	死亡患者数	年間死亡率	ACE阻害薬or β遮断薬の使用頻度
(1)	374例	40ヶ月	169例	13.4%	3.6%
(2)	82例	47ヶ月	15例	4.7%	35%
(3)	100例	84ヶ月	21例	5.0%	73%

(1) 1983年厚生省特発性心筋症調査研究班報告
 全国15施設でのアンケート調査 (1974-1982年)
 (2) 北海道大学循環器内科における調査 (1983-1990年)
 (3) 北海道大学循環器内科における調査 (1991-2000年)

拡張型心筋症患者の5年及び10年生存率



薬物治療の生存率へ与える影響



厚生科学研究費補助金（特発性心筋症調査・研究班事業）

分担研究報告書（平成13年分）

カテコラミン負荷による心不全進展病態に関する研究

分担研究者 豊岡 照彦 東京大学医学部・器官病態内科、保健センター

研究要旨

重症心不全の治療にβ受容体作動薬を用いると患者の予後は使わなかった場合よりも更に悪化する、catecholamine toxicity 現象が起こる。逆に近年は重症心不全の治療にβ受容体遮断薬を用いるが、その機序を解明する目的で本年は既に筆者らが先天性 DCM で認めたジストロフィン関連蛋白複合体(DRP)の分解の有無を検討した。特異抗体による免疫組織学、および Western blotting の結果、ジストロフィンはイソプロテリノール負荷の 8-24 時間後にその中央部分の rod domain で限定加水分解され、細胞膜から細胞質に translocation した。一方の DRP 中のδ-サカグリカンは位置も分子量も全く変わらなかった。さらに、上記ジストロフィンの変性を起こした細胞は TUNEL 陽性に染まり、apoptosis を示した。以上から DRP の崩壊は先天性、後天性を問わず心筋に起こり、心筋に筋ジストロフィー様の変性を来して、心不全に至る共通の病態を示唆する。

A. 研究目的

拡張型心筋症も含め、重症心不全の治療にβ受容体作動薬を用いると一過性に心機能は改善しても受容体は down regulation して無効となるだけでなく、患者の予後は使わなかった場合よりも更に悪化する、catecholamine toxicity 現象が起こる。この経験に基付き近年は carvedilol、metoprolol を始めとするβ受容体遮断薬を用いて、患者の予後が改善している。今回はその機序を細胞レベルから解明し、今後の治療戦略を開発する事を目的とした。

既に筆者らは先天性の DCM により心不全に至る T0-2 ヘルパーでジストロフィン関連蛋白複合体(DRP)が著明に減少して、病態と深く関連する事を報告した(Sakamoto *et al.*, *PNAS*, 1997; Kawada *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999)。本稿ではジストロフィンとその関連蛋白複合体(DRP、図1)に焦点を絞り、検討する。

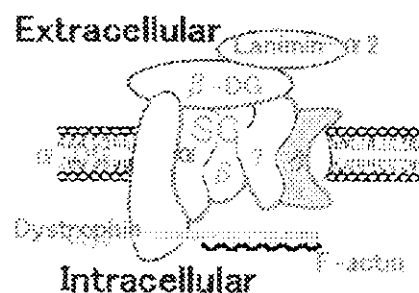


図 1. ジストロフィン関連糖蛋白(DRP)複合体の構造予想図および筆者らが同定したδ-SG 遺伝子の変異により DCM を来す部位 (Sakamoto *et al.*, *PNAS*, 1997)。SG, sarcoglycan; DG, dystroglycan。

筋細胞は収縮期のミオシンとアクチンの滑りあいの結果、張力を発生するが、この時細胞膜は膨隆する。特に心筋は収縮・弛緩を生涯繰り返す必要からその細胞膜は骨格筋以上に強靭さが要求される。既にジストロフィン遺伝子の異常が Duchenne や Becker 型の筋ジストロ

症と約半数が DCM を起こす。筆者らは「各種の先天性および後天性の原因により筋ジストロフィー様の病態が心筋細胞特異的に発生して、重症心不全を来す」と作業仮説を立てた。

B. 研究方法

現在、論文を投稿中のため、概略のみ記載させて頂く。雄、Wistar 系ラットに大量の β 受容体作動薬、イソプロテロロール(10mg/kg)を腹腔内投与した。投与後、心筋の変性過程を追うために、8-24 時間にわたり、経時的に心を摘出し、蛋白分解過程を、ジストロフィンと DRP を構成する α 、 β 、 γ と δ の4種のサロコグリカン(SG)に注目した。また必要な場合は細胞膜の安定性を *in vivo* で確認するために、正常の細胞膜を透過しない Evans blue をイソプロテロロール投与 24 時間前に静注した。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いに当たり、学内の倫理規定に従い、可能な限り苦痛を与えないように配慮し、必要と認めた場合は適宜、ネブラル麻酔により沈静化させた。

C. 研究結果

イソプロテロロール負荷後の心筋病変

投与後 6-8 時間後から心内膜直下を中心に心筋の壊死像が認められ、この部位に一致してジストロフィンが細胞膜から細胞質に移行し、所謂 translocation を認めた。この時、連続切片を作成して α 、 β 、 γ と δ の4種のSGを免疫染色を観察した結果、 α 、 β 、 γ SG の濃度や局在の変化した細胞はジストロフィンの translocation した細胞と一致した。これと対照的に δ -SG は全く移行が認められなかった(図2、左下)。

更に注目すべき点として、このジストロフィンが translocation した部位と一致して心筋細胞が TUNEL で陽性に染まり(図2、右下)、心筋変性、translocation と apoptosis が一致していた。

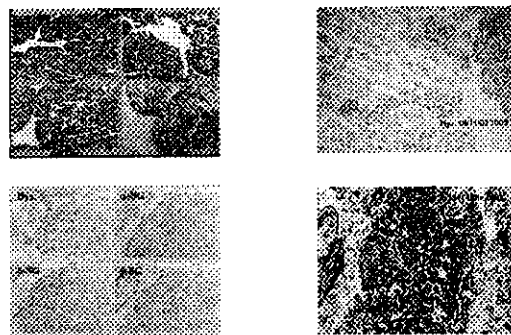


図2. イソプロテロロール負荷による心筋障害(図左上) ジストロフィンと α 、 β 、 γ SG の translocation (図左下)。上記蛋白と比較して δ -SG の translocation は特に認められず(図左下)、また TUNEL による apoptosis を起こした細胞は上記変性を示した細胞と一致した。

(b) ジストロフィンの fragmentation

上記の translocation を更に詳細に検討する目的で Western blotting を行った結果、非常に興味ある事にジストロフィンの特異抗体により、80-400kDa 周辺に分解断片が明瞭に認められ、加水分解による限定分解を認めた。しかし、 δ -SG は全く分子量も変化しなかった(図3左)。

ジストロフィンの加水分解は、その rod domain に対する特異抗体で明瞭に染まり、N-terminal と C-terminal に対する抗体は主に 50kDa のバンドが選択的に染まり(図3左)、上記の分解は長いジストロフィン蛋白の中央に位置する rod domain が選択的に分解される事が示された(図3右)。

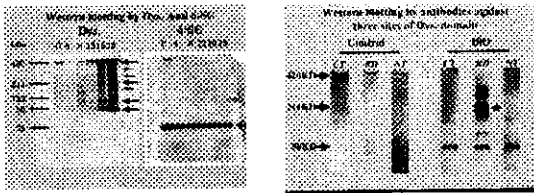


図 3. イプテリール投与ジストロフィ rod domain の限定加水分解(左)。対照的に δ -SG は全く分解を受けない(右)。

D. 考察

先天性 DCM の原因について既に我々は心筋細胞膜の異常を指摘してきた(Toyooka *et al.*, *Circulation* 1997)。ヒト DCM 症例で心筋アクチン,ジストロフィン,ジストロフィン関連蛋白の SG およびテスミンの遺伝子異常が報告され,筆者等は心筋症自然発症ハスターの原因が δ -SG の遺伝子欠損であることを示した(Sakamoto *et al.*, *PNAS*, 1997)。同じ δ -SG の遺伝子変異はヒトでも DCM を呈し,心移植に至った数家系が報告され, δ -SG の欠損による重症心不全はヒトにも共通した病態である。

心筋症には Coxsackie B2 virus を中心にした感染性心筋炎の終末像が含まれると予想されたが,実際これを支持する結果が報告された。他のウイルスと同様に Coxsackie B2 virus は protease domain を有し,この遺伝子産物は *in vitro* でも *in vivo* でも選択的にジストロフィンを切断する。

また上記モデルの中で,初期に HCM を呈し末期に DCM に至る BIO 14.6 系では δ -以外の SG は一部残留している。一方初期から DCM を呈する TO-2 系では δ -の他に全 SG も発現していなかった。これらの結果は全 SG が完備している場合には正常機能を有

し, δ -SG の遺伝子欠損しても他の SG が残存している間は HCM を示し,代償不能の拡張相では全 SG が消失する病態を示唆する(Kawada *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999)。各 SG の発現と代謝過程を解明する事は今後の課題である。

E. 結論

上記の結果からジストロフィン,これと複合体を形成する DRP の障害により心筋症や,これと類似した重症心不全が先天的にもまた後天的にも起こる事が示された。その機序として幾つかの蛋白分解酵素の関与が考えられるが,その解明には未だ多くの検討を要する。また,この責任蛋白分解酵素を薬物または遺伝子治療により抑制可能であれば当研究室で成功した遺伝子補充療法(Kawada *et al.*, *PNAS*, 2002)と同様大きな治療戦略と考える。

今回の研究は班長の篠山京大前教授,国立循環器病研究所,真崎知生前所長初め多くの方々のご協力を頂き,完成させる事ができた。ここに深謝申し上げる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Wang Y, Chen J, Wang Y, Taylor CW, Hirata Y, Hagiwara H, Mikoshiba K, Toyooka T, *et al.* Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate IP₃ receptors in IP₃-induced Ca²⁺ release, capacitative Ca²⁺ entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 88; 202-209, 2001.

2. Kawada T, Sakamoto A, Nakazawa M, Urabe M, Masuda F, Hemmi C, Wang Y, Shin WS, Nakatsuru Y, Sato H, Ozawa K, Toyo-oka T. Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 284;431-435, 2001.
3. Kawada T, Nakazawa M, Sakamoto A, Urabe M, Wang Y, Shin WS, Sato H, Monahan J, Ozawa K, and Toyo-oka T. Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV vector-mediated somatic gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 99; 901-906, 2002.
4. 豊岡照彦. 心不全治療のガイドライン, 治療学 34; 658-63, 2000.

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

分担研究者 堀正二 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学教授

研究要旨

前年度、G 蛋白質共役受容体 (GPCR) アゴニストによる心筋細胞肥大に活性酸素種を介した NF- κ B の活性化が必要であることを報告した。今年度は、GPCR アゴニストによる活性酸素種依存性心筋肥大において、活性酸素種により活性化され、アポトーシスに関わっていることが知られている MAPKKK、ASK1 (apoptosis signal regulating kinase) の関与を検討した。GPCR アゴニストにより ASK1 は活性酸素依存性に活性化された。ASK1 ドミナントネガティブ体は GPCR アゴニストによる NF- κ B の活性化および心筋細胞肥大を抑制した。ASK1 の恒常活性体は NF- κ B の活性化および心筋細胞肥大を惹起した。ASK1 の恒常活性体による心筋細胞肥大は I κ B α 分解抵抗性変異体による NF- κ B の抑制により阻害された。従って、GPCR アゴニストによる心筋細胞肥大には活性酸素種依存性 ASK1 の活性化が NF- κ B を介して関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

心肥大は、圧・容量負荷、アンジオテンシン II、エンドセリンやカテコラミンなどを含む神経体液性因子やサイトカインなどで生じることが知られているが、その機序については十分に明らかにされていない。近年、心筋肥大に活性酸素種が深く関わっていることが明らかにされている。我々は G 蛋白質共役受容体 (GPCR) アゴニスト (アンジオテンシン II、エンドセリン-1、フェニレフリン) による心筋細胞の肥大に活性酸素種を介した NF- κ B の活性化が必要であることを報告した。今回、GPCR アゴニストによる心筋肥大において、活性酸素種により活性化され、アポトーシスに関わっていることが知られている MAPKKK、ASK1 (apoptosis signal regulating kinase) の関与を検討した。

B. 研究方法

酵素法を用いてラット新生仔心筋細胞を単離した。NF- κ B 活性化は、 κ B 依存性ルシフェラーゼ活性および抗 I κ B α 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した I κ B α の分解を指標とした。心筋細胞肥大はファロイジン染色下の細胞面積の測定とサルコメア形成の評価、³Hロイシンの細胞内取り込み、肥大の分子マーカーである ANF の免疫染色をもって評価した。アデノウイルスベクターはアゴニスト刺激 24 時間前に、心筋細胞に感染させた。ASK1 活性は MKK6 を基質とした *in vitro* kinase assay により測定した。

C. 研究結果

まず ASK1 がアンジオテンシン II、エンドセリン、フェニレフリンといった GPCR アゴニストによって活性化されるかどうか検討した。図 1 に示すように ASK1 は GPCR アゴニストにより 5-10 分でピークとなる活性化が認められた。また容量依存性の活性化も認められた。この活性化が活性酸素を介するかどうかを検討するため、ASK1 活性化に対する抗酸化剤 *n*-acetyl cysteine の効果を検討した。ASK1 活性化は *n*-acetyl cysteine で抑制された (図 2)。

次に ASK1 の活性化が NF- κ B 活性化につながるかどうか検討した。図 3 に示すように ASK1 の恒常活性体アデノウイルス AdASK- Δ N の心筋細胞への感染により κ B 依存性ルシフェラーゼ活性の増大並びに I κ B α の分解が生じた。さらに GPCR アゴニストによる NF- κ B の活性化が ASK1 を介しているかどうか検討した。ASK1 のドミナントネガティブ体のアデノウイルス AdASK(KM) を心筋に感染させておくと GPCR アゴニストによる NF- κ B の活性化は著明に抑制された。

AdASK- Δ N は細胞面積の増大、サルコメアの形成亢進、ANF の産生、 $[^3\text{H}]$ ロイシンの取り込み亢進を惹起した (図 4)。一方 AdASK(KM) の感染により GPCR アゴニストによる肥大反応が抑制された。AdASK- Δ N による心筋細胞肥大は AdI κ B α 32/36A を共感染することにより抑制された。

D. 考察

ASK1 はアポトーシスに関わっていることが知られている MAPKKK である。細胞内ではチオレドキシシンと複合体を形成し活性酸素種によりチオレドキシシンが酸化されると活性化されることが知られている。本研究では、ASK1 が GPCR アゴニストによって活性酸素依存性に活性化されることおよび心筋細胞の肥大に NF- κ B の活性化を介して関与していることを明らかにした。心肥大は一般にはストレス適応反応であり、その適応破綻が心不全であると考えられている。従って ASK1 はストレス適応にも働いていることが明らかとなり、細胞死にも大きな働きをしていることと考えると心肥大から心不全へのトランジションに役割を果たしている可能性が考えられる。

E. 結論

アンジオテンシン II、エンドセリン-1、フェニレフリンによる心筋細胞の肥大に大きな役割を果たしていると考えられる NF- κ B の活性化には ASK1 が関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shinichi Hirotsu, Kinya Otsu, Kazuhiko Nishida, Yoshiharu Higuchi, Takashi Morita, Hiroyuki Nakayama, Osamu Yamaguchi, Toshiaki Mano, Yasushi Matsumura, Hikaru Ueno, Michihiko Tada, Masatsugu Hori. Involvement of NF- κ B and ASK1 in G-Protein Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy (2002) *Circulation*. 105:509-515.
- 2) Yoshiharu Higuchi, Kinya Otsu, Kazuhiko Nishida, Shinichi Hirotsu, Hiroyuki Nakayama, Osamu Yamaguchi, Yasushi Matsumura, Hikaru Ueno, Michihiko Tada, and Masatsugu Hori : Involvement of Reactive Oxygen Species-mediated NF- κ B Activation in TNF- α -induced Cardiomyocyte Hypertrophy (2002) *J Mol Cell Cardiol*. 34, 233-240.
- 3) Moto-o Date, Takashi Morita, Nobushige Yamashita, Kazuhiko Nishida, Osamu Yamaguchi, Yoshiharu Higuchi, Shinichi Hirotsu, Yasushi Matsumura, Masatsugu Hori, Michihiko Tada, and Kinya Otsu : The Antioxidant N-2-Mercaptopropionyl Glycine Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in *in vivo* Murine Pressure-Overload Model. (2002) *J Am Coll Cardiol*. 39:907-912.

2. 学会発表

- 1) Shinichi Hirotsu, Kinya Otsu, Yoshiharu Higuchi, Kazuhiko Nishida, Takashi Morita, Hiroyuki Nakayama, Osamu Yamaguchi, Kazunori Kashiwase, Shungo Hikoso, Toshihiro Takeda, Toshiaki Mano, Yasushi Matsumura, Hikaru Ueno, Michihiko Tada, Masatsugu Hori. Involvement of ASK1 in G-Protein Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiac Hypertrophy. 第66回日本循環器病学会、平成14年4月24-26日
- 2) Takashi Morita, Nobushige Yamashita, Kazuhiko Nishida, Moto-o Date, Osamu Yamaguchi, Yoshiharu Higuchi, Shinichi Hirotsu, Yasushi Matsumura, Michihiko Tada, and Kinya Otsu, Masatsugu Hori : The Antioxidant N-2-Mercaptopropionyl Glycine Attenuates Left Ventricular Hypertrophy in *in vivo* Murine Pressure-Overload Model. 第66回日本循環器病学会、平成14年4月24-26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

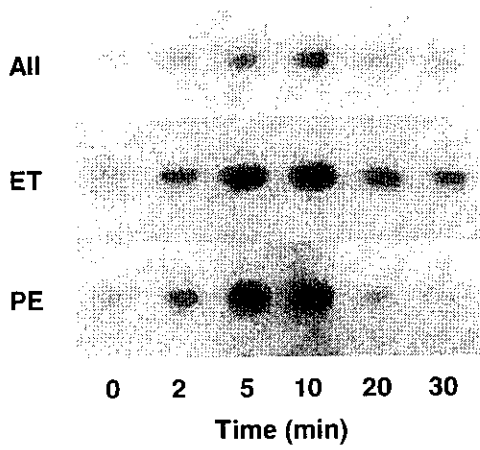


図1) GPCR アゴニストによる ASK1 活性化

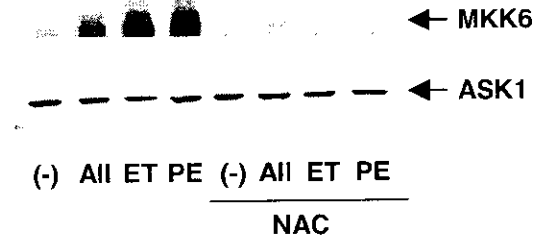


図2) 抗酸化剤の ASK1 活性化に対する効果

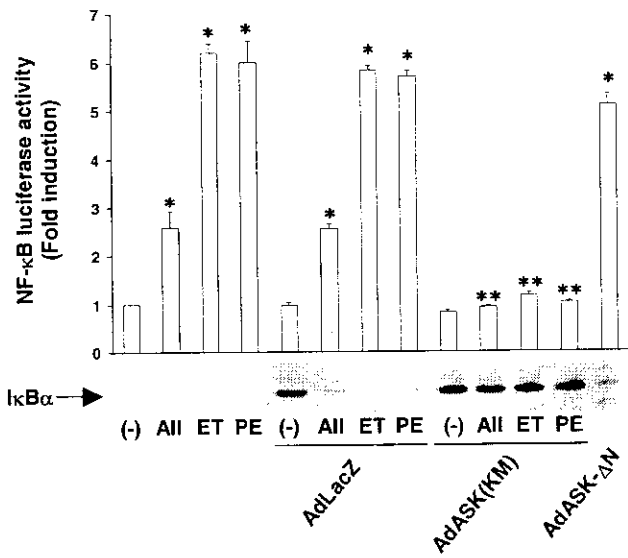


図3) NF-κB の活性化における ASK1 の関与

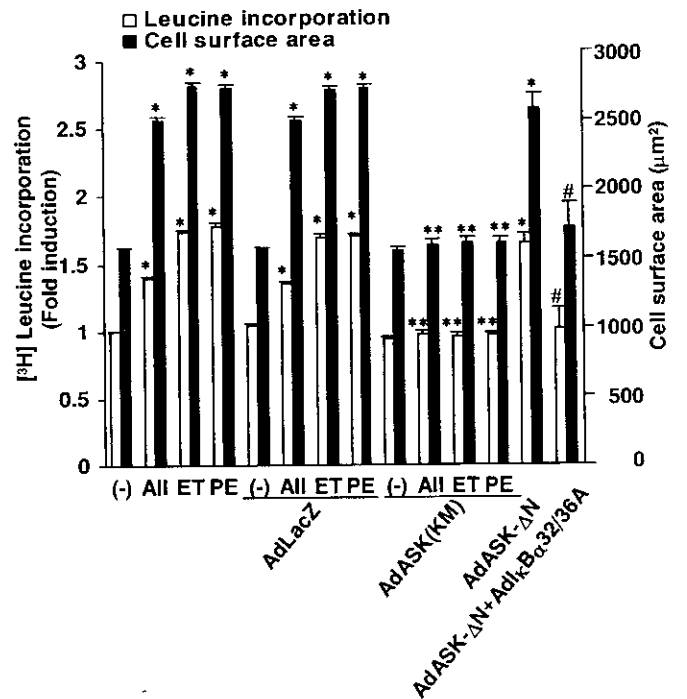


図4) GPCR アゴニストによる心筋細胞肥大における ASK1 の関与

厚生科学研究費補助金
(特発性心筋症調査研究班)
平成13年度研究報告書

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
分担研究者：松崎益徳 山口大学医学部器
官制御医科学講座循環病態内科学教授

【研究要旨】

DCMの病因を考えるうえで、ウイルス性心筋炎の進展や慢性化がDCMの発症の成因となっているか否かは未だ明らかではない。我々はマウスウイルス性心筋炎慢性期において、炎症が終焉した時期に、同種同量のCoxsackie virus B3(以下CVB3)を再接種することにより、再感染が成立し、著明な心拡大を来すことを報告し、ウイルス再感染がDCMの発症に関与している可能性を示唆している(Nakamura H. et al, *Jpn Circ J.* 1999)。さらに、再感染後8週間経過観察を行ったところ、正常群と比較し、再感染群では有意に死亡率の増加が認められた。48週目の心筋組織は、病理組織学的には心筋組織線維化率の増加が認められ、炎症細胞浸潤は少数であることから、心不全による死亡の可能性が示唆され、本モデルは成人発症型DCMに類似したモデルと考えられた。今回、本モデルにおいて、心拡大と血清中の中和抗体価に相関関係がある点に注目し、心拡大に関わるCVB3関連自己抗体の同定を試みた。免疫学的解析から、抗心筋自己抗体は血清IgM分画に属し、対応抗原は心筋細胞膜表面に存在することが予想された。また抗心筋自己抗体は複数存在する可能性が示唆され、DCMの発症にウイルス再感染により惹起された自己抗体産生系が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

既報のモデルにおいて、心拡大と血清中

の中和抗体価に相関関係がある点に注目し、心拡大を来す機序について抗体産生の観点から免疫学的解析を行い、慢性心筋炎からDCMへの発症機序を検討することを目的とした。

B. 研究方法

生後3週齢のA/JマウスにCVB3を感染させウイルス性心筋炎を作成した。40週齢目に再び同種同量のCVB3を接種し再感染を成立させた(再感群)。再感染後2週間で心臓を摘出し、血清中和抗体価の測定、蛍光免疫染色、免疫電子顕微鏡、Western blotting、二次元電気泳動による免疫学的解析を行い抗心筋自己抗体の同定を試みた。

C. 研究結果

再感染群(48W)の死亡率は正常群と比し有意に低下していた($p < 0.05$) (図1)。左室腔は拡大し、心エコー上有意な%FSの低下がみられた。

ウイルス初感染後の中和抗体価の測定結果では、初感染後急性期にCVB3の抗体価は上昇し、比較的長期間に高値を持続したのち徐々に低下、40Wでは最も低値を示していた(図2)。既報の通り40WのCVB3再感染では有意な心拡大と中和抗体価の上昇を認めたが、途中10、20、30Wではウイルス再感染は成立しなかった。興味深いことに、この40Wの再感染の際にCVB3を熱処理した不活化ウイルスを用いても中和抗体価の有意な再上昇と炎症性サイトカインの増加が観察された(図3)。心筋組織の免疫学的解析では、再感染群(42W)の心筋細胞組織表面及び間質組織にIgMの沈着が認められ(直接法)、さらに免疫電子顕微鏡でも確認された。再感染群(42W)の血清と正常心筋から抽出したlysateを反応させてWestern blottingを行ったところ、45-kDの抗原に反応している新たな抗体が認められ(間接法)(図4)、さらに二次元電気泳動法

にて、この抗体は複数存在する可能性が示唆された。また、心筋を細胞膜分画と細胞質分画に分離し同様の解析を行ったところ、細胞膜分画において同様のバンドが検出された。

D. 考察

ウイルス初感染後の中和抗体価の持続はウイルス再感染に対して防御的に働いていると考えられた。しかし一旦再感染が成立してしまうと、逆にこの抗体の一部は抗心筋作用を有し心筋組織に対し攻撃的に働いていると考えられた。またこの抗心筋自己抗体は複数存在しており、対応抗原は心筋細胞膜に存在していると考えられた。

不活化ウイルスの実験結果からも、ウイルスに対する抗原認知能力は初感染後40週と長時間経過しているにもかかわらず個体内の免疫系にメモリーされ維持されていると考えられた。

E. 結論

DCMの発症にはウイルス再感染により惹起された抗心筋自己抗体の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Induction of Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in the Recipient Heart Following Donor Heart Myocardial Infarction: New Insights into the Pathological Role of Tumor Necrosis Factor- α .

Hiroshi Nakamura, Seiji Umemoto, George Naik, Gordon Moe, Fayze Dawood, Satoko Takata, Peter Liu, Masunori Matsuzaki.

(Circulation submitting)

2. 学会発表

発表者名：中村浩士、高田智子、松崎益徳
 発表演題：分離リモデリング心臓モデルにおけるTNF- α の誘導と作用

学会名：第96回山口大学医学会総会

開催地：宇部（平成13年7月）

【発表雑誌】山口医学 2001；50：S662.

発表者名：中村浩士、高田智子、松崎益徳
 発表演題：ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける自己抗体産生系の検討

学会名：日本心臓病学会

開催地：広島（平成13年9月）

【発表雑誌】*Journal of Cardiology* 2001；38：S368.

発表者名：高田智子、中村浩士、三浦俊郎、松崎益徳、加藤智啓、西岡久寿樹

発表演題：ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける自己抗体の検討

学会名：第23回心筋生検研究会

開催地：相模原（平成13年11月）

【発表雑誌】循環器科 2002；51：S190.

発表者名：高田智子、中村浩士、加藤智啓、西岡久寿樹、松崎益徳

発表演題：ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける抗心筋抗体の検討

学会名：第97回山口大学医学会総会

開催地：宇部（平成14年2月）

【発表雑誌】山口医学 2001；50：S825.

発表者名：中村浩士、高田智子、加藤智啓、西岡久寿樹、松崎益徳

発表演題：ウイルス性心筋炎再感染モデルにおける抗心筋抗体の検討

学会名：第46回日本リウマチ学会総会

開催地：神戸（平成14年2月）

【発表雑誌】リウマチ 2002；42：S447.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 米国特許申請 (10/141608)

An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug and regenerative medicine.

2) 日本特許出願 (2001-2224)

広範囲心筋梗塞モデル動物及びその作成方法並びにそのモデルを用いて行う薬物のスクリーニング方法。

3. その他 ; 研究成果の刊行

著者氏名 ; 高田智子、中村浩士、松崎益徳
著書タイトル ; 劇症型心筋炎の病態生理
書籍全体の編集者名 ; 和泉徹
書籍名 ; 劇症型心筋炎の臨床
出版社名 ; 医学書院
出版年 ; 平成14年3月
ページ ; P37-44

特発性心筋症調査研究班

13 年度研究報告書

C 型肝炎ウイルス心筋症の臨床像

京都大学循環病態学

佐藤幸人、松森昭

連絡先

京都市左京区聖護院川原町 54

京都大学大学院医学研究科循環病態学

佐藤幸人、松森昭

Yukihito Sato, Akira Matsumori

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate

School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku,

Kyoto, Japan

TEL: 075-751-3189

E-mail: cardioys@kuhp.kyoto-u.ac.jp

研究目的

C型肝炎ウイルスはフラビウイルスに属するRNAウイルスであるが、肝炎以外の肝外症状をしばしば生じる。筆者らはこれまで拡張型心筋症、肥大型心筋症におけるC型肝炎ウイルスの感染を報告し、C型肝炎ウイルスは心筋症の病態形成に深くかかわっていると思われた[1-7]。また最近我々は拡張型心筋症患者の約20%は血中心筋トロポニンTが持続高値を示し、経過中微小心筋障害が生じていることを報告した[8-10]。心筋症患者の予後を根本的に改善するためには血中心筋トロポニンTを有効に低下させる治療法を検討する必要があると考えている。本稿ではC型肝炎抗体陽性心筋症患者の臨床像について報告したのち、血中心筋トロポニンTを指標とした治療について述べる。

研究方法

1990年から2001年まで当院にて診療を行った384例の心筋症患者を対象とした。

研究結果

36例が血中HCV抗体陽性であった。(拡張型心筋症191例中19例、肥大型心筋症113例中16例。)心エコー所見では左室駆出率低下と左室拡大のある拡張型心筋症(DCM)様所見を19例に認め(うち4例は左室壁

肥大を伴い左室拡大、駆出率低下がみられた)、左室拡大、左室駆出率低下を認めず壁肥大を示す肥大型心筋症(HCM)様像を 16 例(うち心尖部肥大型心筋症(APH)5 例)に、その他右室拡大 1 例を認めた。30 例に心筋生検を行い 14 例で PCR 法にて HCV RNA(+)鎖が陽性であり、うち 5 例は HCV RNA(-)鎖も陽性であった(表 1)。また 17 例で血中心筋トロポニン T(TnT)を測定したが、10 例が観察開始時 0.02 ng/ml 以上であり、微小心筋障害が生じていることが示唆された(0.15 ± 0.12 ng/ml, n=10)。うち 3 例は TnT が持続的に高値を示し、心不全症状の悪化により 1 例が再入院し、2 例が死亡した。さらに、TnT 高値患者 3 例にインターフェロンを投与し、投与期間に一致して TnT の低下を認めた。血中心筋トロポニン T を指標として治療を行った代表的症例を呈示する。

症例を提示する。65 才女性。1995 年より当院通院中であつた。Dopamine, dobutamine, furosemide, spironolactone, digoxin, angiotensin converting enzyme inhibitor, beta blocker などの種々の心不全治療にもかかわらず 3 年間 TnT は 0.11 ng/ml 以上の持続高値を示し心エコーにて左室拡張終期径(LVDd)は 60 から 69mm へ、左室駆出率(LVEF)は 49 から 29%へ悪化した。