

インフォームドコンセントを行い、1998年8月最大600万単位/dayのインターフェロンβ点滴投与をおこなった。全身倦怠感のため12日間で治療脱落したが、HCVウイルス量が低下するのに平行してTnTは初めて低下し、インターフェロン中止後再びTnTは前値にまで上昇した(図1)[11]。

考察

C型肝炎心筋症の診断

C型肝炎ウイルスによる慢性肝炎の診断は、血中HCV抗体、血中HCV RNA、肝酵素の上昇、肝生検による組織所見を総合して行われる[12]。前述のように我々は(肝疾患における肝酵素が肝障害を反映するのと同様に)、心疾患では血中心筋トロポニンTが心筋障害を反映することを報告した[8-10]。そこでC型肝炎心筋症の診断は血中HCV抗体、血中HCV RNA、血中心筋トロポニンT、心筋生検を総合して判定するようにしている。しかし、個々の検査はいずれもC型肝炎ウイルスと心筋症の因果関係を直接証明するものではない。その証明は血中HCVウイルス量と心臓の治療指標が平行して変化することによりなされると思われる。C型肝炎ウイルスによる慢性肝炎の治療指標は血中HCV RNAと肝酵素が用いられているが[12]、C型肝炎心筋症の指標には

血中 HCV RNA と血中心筋トロポニン T を用いている。

C 型肝炎心筋症の治療

以前より当教室ではウイルス性心筋炎に ACE 阻害薬、 β 遮断薬、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬などの慢性心不全の治療薬やインターフェロンが有効であることを動物実験で示してきた。また、C 型慢性肝炎の治療にはインターフェロンが用いられている。従って、C 型肝炎心筋症にはまず一般的な慢性心不全の治療を行い、それでも心疾患の治療指標が改善しない場合はインターフェロンの適応と考えている。本稿で紹介した症例のように、血中 HCV RNA 量と心筋トロポニン T が平行して変化することは、この症例が C 型肝炎による心筋障害であることを強く支持していると思われる。

今後、血中 HCV RNA と心筋トロポニン T を指標として、C 型肝炎心筋症患者の早期発見につとめ、インターフェロンの投与量、投与期間についても詳細に検討したい。

文献

1. Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associates with hepatitis C virus infection. *Circulation* 1995;92:2519-2525.
2. Matsumori A, Matoba Y, Nishio R, et al. Detection of hepatitis C virus RNA from the heart of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:678-682.
3. Matsumori A, Ohashi N, Hasegawa K, Sasayama S, Eto T, Imaizumi et al. Hepatitis C virus infection and heart diseases. A multicenter study in Japan. *Jpn Circ J* 1998;62:389-391.
4. Matsumori A, Yutani C, Ikeda Y, et al. Hepatitis C virus from the hearts of patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Lab Invest* 2000;80:1137-1142.
5. Matsumori A. Hepatitis C virus and cardiomyopathy. *Intern Med* 2001;40:78-79.
6. Matsumori A. Clinical practice of hepatitis: myocardial disease, nephritis, and vasculitis associated with hepatitis virus. *Intern Med* 2001;40:182-184.
7. Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of cardiomyopathies in Japan. Results from nationwide surveys. *Circ J* 2002;66:323-336.
8. Sato Y, Kataoka K, Matsumori A, Sasayama S, Yamada T, Ito H, Takatsu Y. Measuring serum aminoterminal tyte III procollagen peptide, 7S domain of type IV collagen, and cardiac troponin T in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and secondary cardiomyopathy. *Heart* 1997;78:505-508.
9. Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Kataoka K, Sasayama S, Matsumori A, Takatsu Y. Serum concentration of cardiac troponin T in patients with cardiomyopathy. A possible mechanism of acute heart failure. *Heart* 1998;80:209-210.
10. Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Kataoka K, Ito H, Matsumori A, Sasayama S, Takatsu Y. Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin T in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation*: 2001;103:369-374.
11. Sato Y, Takatsu Y, Yamada T, et al. Interferon treatment for dilated cardiomyopathy and striated myopathy associated with hepatitis C virus infection based on serial measurements of serum concentrations of cardiac troponin T. *Jpn Circ J* 2000;64:321-324.

12. Booth JCL, O'Grady JO, Neuberger J, et al. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. Gut 2001;49(Suppl I):i1-21.

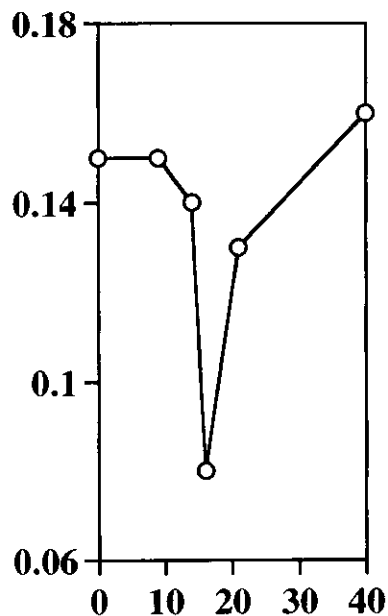
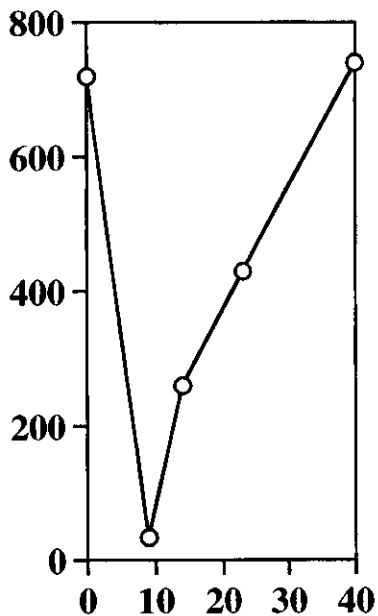
表 1

	HCV positive strand	HCV negative strand
拡張型心筋症 (n=19)	7/19	2/16
肥大型心筋症 (n=16)	6/10	2/7
右室拡大 (n=1)	1/1	1/1

Figure 1

HCV RNA
10³ copy/ml

TnT
ng/ml



days after the beginning of interferon therapy

図 1

C型肝炎ウイルスが原因として疑われた拡張型心筋症におけるインターフェロンの効果。インターフェロンβの点滴投与をおこない、HCV ウイルス量が低下するのに平行してTnTは初めて低下し、インターフェロン中止後再びウイルス量とTnTは前値にまで上昇した。

特発性心筋症調査研究班 平成 13 年度研究報告書・1

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

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

宮本宣友、志賀宣之、高井栄治、
岩井愛雄、清水政克、川合宏哉、
横山光宏神戸大学大学院医学系研究科総合診療医学
兵庫県立姫路循環器病センター循環器科秋田 穂東
宝田 明

【研究要旨】

拡張型心筋症 (DCM) の中にジストロフィンやアクチンといった細胞骨格蛋白の遺伝子異常が原因となるものがあることが明らかにされてきたが、われわれの過去の検討から、それらの DCM 全体に占める割合は低いと考えられる。最近になり、細胞骨格蛋白のデスミン遺伝子異常が原因となる DCM 家系が報告された。そこで、日本人の DCM 患者のデスミン遺伝子の解析を行い、DCM 患者全体に占めるデスミン遺伝子変異の頻度を明らかにするとともに、変異を有する患者の臨床的特徴の検討を行った。日本人の DCM 患者 265 例 (孤発例 217 例、家族例 48 例) を対象として、デスミン遺伝子の以前報告された遺伝子異常 (Ile451Met) を含む領域を、PCR-SSCP-sequence 法を用いて解析した。その結果、3 例において Ile451Met 変異が検出され (1%)、うち 1 例の右室心筋生検標本で、心筋細胞内に特徴的な desmin-positive deposit が認められた。デスミン遺伝子変異をもつ 3 例はいずれも男性で、明らかな家族歴はなく、骨格筋異常を示唆する症状や筋電図異常も認めなかった。また、孤発例 217 例の平均と比較すると診断年齢は若く、診断時の左室収縮能は低い傾向にあった。心機能の経年的な変化には一定の傾向はみられなかった。われわれの検討した 265 例の DCM 患者群において、デスミン遺伝子 Ile451Met 変異を伴う症例を認めたが、その頻度は低く、変異を有する症例は孤発例全体と比較すると診断時年齢が若く、収縮能が低い傾向にあった。

A. 研究目的

拡張型心筋症 (DCM) は心不全の主要な原因疾患であるが、その病因には未だ不明な点が多いのが現状である。症例の集積、病因の検索および臨床的特徴の検討は、将来的に DCM の診断と治療の進展に寄与する可能性もあり、様々な検討が行われている。

近年、DCM の中にジストロフィンやアクチンといった細胞骨格蛋白の遺伝子異常が原因となるものがあることが明らかにされてきたが、われわれの過去の検討から、それらの DCM 全体に占める割合は低いと考えられる^{1,2)}。最近になり、細胞骨格蛋白のデスミン遺伝子異常が原因となる DCM 家系が Li らにより報告された³⁾。そこで、日本人の DCM 患者のデスミン遺伝子の解析を行い、DCM 患者全体に占めるデスミン遺伝子変異の頻度を明らかにするとともに、変異

を有する患者の臨床的特徴の検討を行った。

B. 研究方法

1995年6月から1999年2月にかけて神戸大学医学部付属病院および兵庫県立姫路循環器病センターに入院した日本人のDCM患者265例（孤発例217例、家族例48例）の末梢血より抽出したgenomic DNAを用い、デスミン遺伝子の以前報告された遺伝子異常(Ile451Met)を含む領域をPCR法で増幅後、SSCP法でスクリーニングし泳動異常を示したものについてsequence法を用いて解析し変異を同定した。

変異の認められた症例の中で同意の得られた1例に関しては、心筋生検標本を用いhematoxylin-eosin染色、Elastica-Masson染色および抗デスミン抗体(D33, Dako)を用いて免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

採血およびgenomic DNAを用いてのデスミン遺伝子解析については、全患者に対して書面で同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

SSCP法で3例に泳動異常を認め、sequence法を用いて解析したところ、3例ともにIle451Met変異が検出された(1.1%) (Table 1)。変異をもつ3例はいずれも男性で、明らかな家族歴はなく、骨格筋異常を示唆する症状や筋電図異常も認めなかった。また、孤発例217例の平均と比較すると診断年齢は若く、診断時の左室収縮能は低い傾向にあった(Figure 1)。心機能の経年的な変化には一定の傾向はみられなかった(Figure 2)。右室心筋生検標本では、心筋細胞内に特徴的なdesmin-positive depositが認められた(Figure 3)。

D. 考察

今回われわれの検討した265例のDCM患者群において、デスミン遺伝子Ile451Met変異を伴う症例は3例(1.1%)であり、最近のヨーロッパでの63例を対象とした検討⁴⁾では同変異は検出されなかったことから、同変異がDCMの原因に占める割合は低いと考えられる。

今回デスミン遺伝子変異を伴った3例は、Liらの報告した症例と同様に明らかな骨格筋病変を伴わず、いずれも男性例であった。一方、明らかな心筋病変を伴わず骨格筋病変をきたした同変異を有する2症例の報告があるが、いずれも女性例であった⁵⁾。これらの結果から、同変異を伴う症例の表現形に性差が関連している可能性も考えられる。

従来 of 拡張型心筋症の臨床的特徴を家族例と孤発例に分けて検討した報告で、家族例でより診断年齢が若く、左室収縮能が高く、ST-T異常の頻度が高く、房室伝導障害の頻度が高いという傾向が示されている。われわれの検討例において、デスミン遺伝子変異を有する3例は孤発例の平均に比して、診断年齢が若く、左室収縮能は低かった。また、ST-T変化は2例にみられ、房室伝導障害は認めなかった。また、家族例と比較しても左室収縮能は低かった。家族例の中には、

遺伝子異常を病因として持つ例が含まれると考えられ、今回の検討例では認めなかったがLiらの報告のようにデスミン遺伝子変異を原因としてもつものも家族例に含まれる。家族例の中でも左室収縮能が低い群の病因の一部をデスミン遺伝子変異が占めている可能性が考えられる。さらに今回の3症例のように明らかな家族歴を有さず左室収縮能の低い症例の中に、デスミン遺伝子変異を病因とするものが含まれることが示唆される。

当然のことながら今回の少数例の検討のみでデスミン遺伝子変異を病因とする DCM 患者の臨床的特徴を決定づけることはできない。さらなる症例数の集積により、より詳細な検討をすることが求められる。

E. 結論

われわれの検討した 265 例の DCM 患者群において、デスミン遺伝子 Ile451Met 変異を伴う症例を認めたが、その頻度は低かった。変異を有する症例は、孤発例全体と比較すると診断時年齢が若く、収縮能が低い傾向にあった。

【参考文献】

- 1) Shiga N, Matsuo M, Yokoyama M, Yokota Y. Study on mutations affecting the muscle promoter/first exon of the dystrophin gene in 92 Japanese dilated cardiomyopathy patients. *Am J Med Genet* 1998; 79: 226-7.
- 2) Takai E, Akita H, Shiga N, Kanazawa K, Yamada S, Terashima M *et al.* Mutational analysis of the cardiac actin gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 1999; 86: 325-7.
- 3) Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA *et al.* Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 100: 461-4.
- 4) Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmaurd M, Bouchier C *et al.* Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a european population of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2000; 21:1872-6.
- 5) Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 770-80.

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyamoto Y, Akita H, Shiga N, Takai E, Iwai C, Mizutani K, Kawai H, Takarada A,

Yokoyama M. Frequency and clinical characteristics of dilated cardiomyopathy caused by desmin gene mutation in a Japanese population. *European Heart Journal* 2001;22:2284-2289.

2. 学会発表

MUTATION ANALYSIS OF DESMIN GENE IN IN DILATED CARDIOMYOPATHY IN JAPANESE. 宮本 宣友、秋田穂束、志賀宣之、寺島正浩、松田康章、高井榮治、岩井愛雄、川合宏哉、横山光 宏、宝田明. 第4回日本心不全学会学術集会 (2000年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

Table 1 Characteristics in patients with the desmin mutation (Ile451Met) and sporadic/familial DCM

	Case 1	Case 2	Case 3	Sporadic DCM	Familial DCM
Patients				(n=217)	(n=48)
Age at diagnosis (years)	38	55	52	55.6 ± 12.6	51.7 ± 13.8
Sex (male/female)	male	male	male	169/48	38/10
Skeletal involvement	(-)	(-)	(-)		
Family history	(-)	(-)	(-)		
Echocardiogram				(n=217)	(n=48)
LVDd (mm)	61	71	67	63.2 ± 7.2	62.2 ± 7.7
LVDs (mm)	53	65	61	52.5 ± 8.7	51.5 ± 8.9
%FS (%)	13	8	9	17.3 ± 6.4	17.6 ± 6.1
Left ventriculogram				(n=133)	(n=33)
LVEDVI (ml/m ²)	106	159	146	142.9 ± 44.0	145.0 ± 46.4
LVESVI (ml/m ²)	73	123	116	98.2 ± 42.0	99.0 ± 43.1
EF (%)	30	23	21	32.8 ± 11.0	32.3 ± 11.2

Data of sporadic and familial DCM cases are expressed as mean ± SD.

LVDd=left ventricular end-diastolic dimension; LVDs=left ventricular end-systolic dimension; %FS=fractional shortening; LVEDVI=left ventricular end-diastolic volume index; LVESVI=left ventricular end-systolic volume index; EF=ejection fraction.

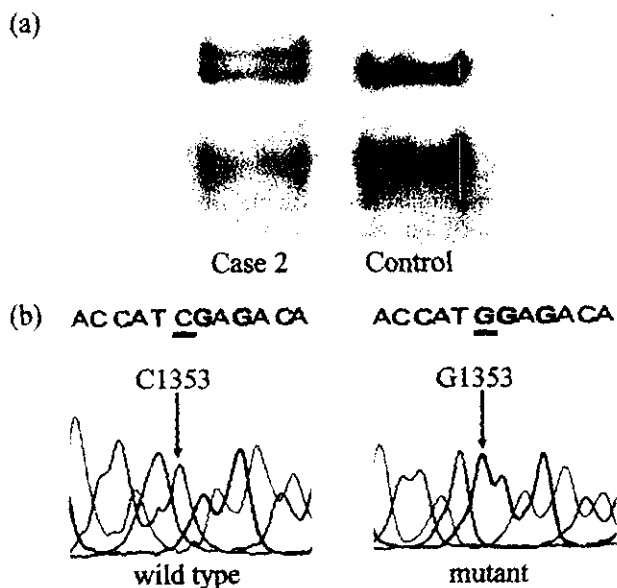


Figure 1 Mutational analysis of the exon 8 and its flank regions of the desmin gene. (a) Single-strand conformation polymorphism (SSCP). The migration pattern in case 2 was different from that in control. (b) Sequence analysis of cloned DNA. The different migration pattern by SSCP corresponded to the heterozygote of the missense mutation, C1353G.

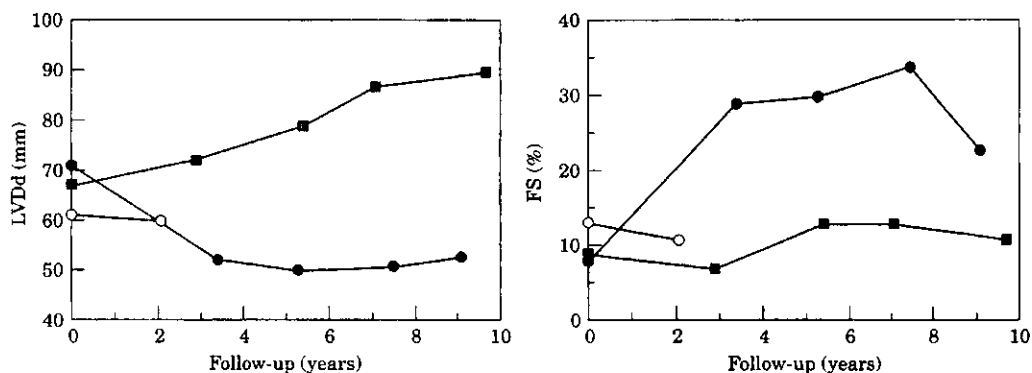


Figure 2 Changes of cardiac function evaluated by echocardiogram at long-term follow-up. Cardiac function was unchanged in case 1 (○), remarkably improved in case 2 (●) and remarkably exacerbated in case 3 (■). LVDd=left ventricular end-diastolic dimension; FS=fractional shortening.

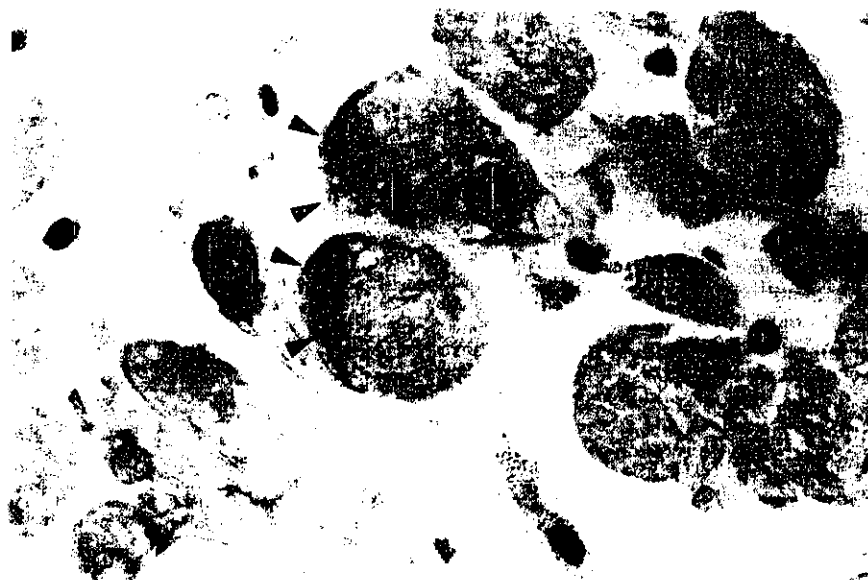


Figure 3 Transverse cross section of a cardiac biopsy specimen from a patient with desmin mutation (case 1, ×1000). Desmin reactive deposits (arrow heads) were observed on staining with antibodies against desmin (D33, Dako).

特発性心筋症調査研究班 平成13年度研究報告書・2

特発性拡張型心筋症患者の心臓交感神経機能と β 1アドレナリン受容体 Arg389Gly 遺伝子多型との関連性

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

岩井愛雄、志賀宣之、高井栄治、
宮本宣友、清水政克、藤原 征、
川合宏哉、横山光宏

神戸大学大学院医学系研究科総合臨床医学
兵庫県立姫路循環器病センター循環器科

秋田穂東
山田慎一郎、宝田 明、梶谷定志

【研究要旨】

特発性拡張型心筋症 (DCM) 患者では β アドレナリン受容体 (AR) を介した交感神経系の異常が認められる。 β 1AR の Arg389Gly (C1165G) 遺伝子多型において、Arg389 (CC) のアデニル酸シクラーゼ活性は Gly389 (GG) に比し約3倍高い。また、交感神経イメージングである ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィーは、DCM 患者の予後予測、さらに β 遮断薬療法の有効性の予知にも有用とされている。そこで、54例のDCM患者を対象とし、RFLP法により遺伝子解析を行い、 β 1AR Arg389Gly 遺伝子多型とMIBG心筋シンチグラフィーを用いて評価した交感神経機能との関連性について検討した。Arg389であるA群とArg389GlyおよびGly389であるB群に分類したところ初期像および後期像心臓・縦隔比は2群間で差を認めなかったが、洗い出し率はA群48.4 \pm 2.2%、B群38.3 \pm 3.6%とA群で有意に亢進しており ($p=0.02$)、Arg389Gly 遺伝子多型がDCM患者の心臓交感神経機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

交感神経イメージングである ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィーは、特発性拡張型心筋症 (DCM) 患者の予後予測、さらに β 遮断薬療法の有効性の予知にも有用とされている。最近になって、 β 1アドレナリン受容体 (β 1AR) 遺伝子多型が数箇所存在することが判明し 1) 2)、その1つの Arg389Gly (C1165G) は *in vitro* での機能解析で、Arg389 (CC) のアゴニスト刺激によるアデニル酸シクラーゼ活性が Gly389 (GG) に比べ約3倍高いことが明らかになった 3)。そこで我々はDCM患者においてArg389がより高度な心臓交感神経障害を受けているのではないかと仮説を立て、 β 1AR Arg389Gly 遺伝子多型とMIBG心筋シンチグラフィーを用いて評価した交感神経機能との関連性について明らかにするため検討を行った。

B. 研究方法

【対象】

1995年12月から2001年1月にかけて神戸大学医学部附属病院および兵庫県立姫路循環器

病センターにて DCM と診断され精査加療目的で入院し、MIBG 心筋シンチグラフィーを施行した 54 例（男性 40 例、平均年齢 57 才、平均左室駆出率 31%）。全症例に対して心エコー、心臓カテーテル検査（冠動脈造影、左室造影、右心カテーテル）を施行した。

【方法】

1. 遺伝子解析

Maqbool らが報告した方法に基づいて行った¹⁾。簡述すると、全血より genomic DNA を抽出し、制限酵素 Bcg I による RFLP 法を用いて、DCM 患者群および対照群の $\beta 1$ AR Arg389Gly 遺伝子多型を決定した。全症例を genotype が Arg389(CC)である A 群(36 例)と Arg389Gly(CG)および Gly389(GG)である B 群(18 例)の 2 群に分類した。

2. 患者背景

臨床背景として年齢、性別、血中ノルエピネフリン濃度、心エコー、心臓カテーテル検査所見および内服薬（入院時）を検討した。

3. ¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィー

交感神経機能に関しては、薬剤(¹²³I-MIBG 111MBq)静注後 15 分の初期像心臓・縦隔比(H/M)、静注後 4 時間の後期像 H/M、および初期・後期像から得られる洗い出し率(WR)を評価した。

(図 1)

4. 統計学的検討

各数値は平均±標準誤差で示した。統計処理は 2 群間の genotype の比較、性別、内服薬の有無については χ^2 検定、年齢、左室駆出率、H/M、WR などの 2 群間の数値比較は Student unpaired t 検定を用いて行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差の判定とした。

C. 研究結果

【患者背景および心機能】

年齢、性別、血中ノルエピネフリン濃度、左室拡張末期径、左室内径短縮率、左室拡張末期容積係数、左室駆出率、ACE 阻害薬および β 遮断薬の服薬の有無に関して検討したが、両群間に差を認めなかった。(表 1)

【心臓交感神経機能】

初期像および後期像 H/M は 2 群間で差を認めなかった(初期像 H/M; A 群 2.04 ± 0.06 , B 群 2.13 ± 0.06 。後期像 H/M; A 群 1.82 ± 0.06 , B 群 2.01 ± 0.08 .)。WR は A 群 $48.4 \pm 2.2\%$ 、B 群 $38.3 \pm 3.6\%$ と A 群で有意に亢進していた ($p=0.02$)。両群間で左室駆出率には差を認めなかった (A 群 $31.6 \pm 1.9\%$ 、B 群 $31.1 \pm 2.4\%$)。(図 2)、(図 3)

D. 考察

DCM 患者では、心筋における $\beta 1$ アドレナリン受容体(AR)の downregulation をはじめ著明なアドレナリン交感神経系の異常が認められ⁴⁾、また、心不全患者に対する β 遮断薬療法が、心機能および予後を改善し、特に心室性不整脈による突然死を予防することは周知の事実である

5)。

β 1AR 遺伝子多型は数箇所存在しているが 2)、その一つの Arg389Gly (C1165G) は第 7 番目細胞膜貫通部位 (helix VII) と細胞内の C 末端間の、G 蛋白との結合およびシグナル伝達に重要な役割を担う場所に位置している。In vitro で機能解析も行われており、Arg389 (CC) のアデニル酸シクラーゼ活性が Gly389 (GG) に比べ著明に高いことが明らかになった 3)。この遺伝子多型について、Tesson らが DCM を対象疾患として欧州において行ったケース・コントロール研究では、genotype、allele 頻度に関して疾患群および対照群間で差を認めず、また疾患群の心機能も genotype、allele 間に差を認めなかったことから 6)、DCM の原因遺伝子であることは否定的であるが、昨年度の班会議で我々は本遺伝子多型に関して、Arg389homozygote (CC) が DCM 患者の心室頻拍 (VT) の発生に関して、独立した危険因子であることを報告した 7)。DCM における VT の合併例では非合併例と比較し MIBG 心筋シンチグラフィの後期像の欠損が高度であることが報告されており、局所的な心筋障害とその周辺部交感神経障害の存在が VT の発生に関与していると考えられている。

今回我々は、VT 発生率の高い Arg389 (CC) 群において交感神経のオーバードライブがかかり、MIBG 心筋シンチグラフィにおいて後期像 H/M の低下および WR の亢進が認められるものと仮説をたてた。

年齢、性別、左室拡張末期径、左室内径短縮率、左室拡張末期容積係数、ACE 阻害薬および β 遮断薬の服薬の有無に関しては 2 群間に差を認めなかった。また両群間で左室駆出率には差を認めず (A 群 $31.6 \pm 1.9\%$ 、B 群 $31.1 \pm 2.4\%$)、Tesson らの報告と一致している 6)。心不全患者において血中ノルエピネフリン濃度と H/M に強い負の相関があることが報告されている。本研究では症例数が少ないこともあり血中ノルエピネフリン濃度に関して 2 群間に統計学的有意差は認めなかったものの、Arg389 (CC) 群で高い傾向がみられた (A 群 $0.51 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ 、B 群 $0.39 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$)。

心臓交感神経機能に関しては初期像 H/M については 2 群間で差を認めなかったが (A 群 2.04、B 群 2.13)、後期像 H/M は Arg389 (CC) 群で低下傾向が見られ (A 群 2.04、B 群 2.13、 $p=0.06$)、WR は同群で有意に亢進しており (A 群 $48.4 \pm 2.2\%$ 、B 群 $38.3 \pm 3.6\%$ 、 $p=0.02$)、我々の仮説に合致する結果が得られた。

どのような機序で本遺伝子多型が Arg389 (CC) 群における後期像 H/M の低下、WR の亢進に関与しているのかは不明であるが、 β 1AR Arg389Gly 遺伝子多型が心拍数の上昇や、心筋の収縮作用に対して心筋に必要なノルエピネフリン量を制御している可能性が考えられる。また圧受容体を介したフィードバック機構に影響を及ぼしている可能性もあるが、推測の域をでない。いずれにしても心機能に差のない 2 群間で心臓交感神経機能に違いを認めていることより、 β 1AR Arg389Gly 遺伝子多型が心機能とは別の機序を介して交感神経機能に影響を与えているものと考えられる。

今後の課題として、さらに多数の DCM 患者群で検討すること、さらに虚血性心疾患患者における β 1AR 遺伝子多型と心臓交感神経機能の関連性を検討することなどが挙げられる。

E. 結論

$\beta 1$ アドレナリン受容体 Arg389Gly 遺伝子多型が DCM 患者の心臓交感神経機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Maqbool A, Hall AS, Ball SG, Balmforth AJ. Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay. *Lancet* 1999;353:897.
- 2) Podlowski S, Wenzel K, Luther HP, Muller J, Bramlage P, Baumann G, Felix SB, Speer A, Hetzer R, Kopke K, Hoehe MR, Wallukat G. Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med*. 2000;78:87-93.
- 3) Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1999;274:12670-12674.
- 4) Bristow MR, Anderson FL, Port JD, Skerl L, Hershberger RE, Larrabee P, O'Connell JB, Renlund DG, Volkman K, Murray J. Difference in beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991;84:1024-1039.
- 5) CIBIS-II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999;353:9-13.
- 6) Tesson F, Charron P, Peuchmaurd M, Nicaud V, Cambien F, Tiret L, Poirier O, Desnos M, Jullieres Y, Amouyel P, Roizes G, Dorent R, Schwartz K, Komajda M. Characterization of a unique genetic variant in the beta1-adrenoceptor gene and elevation of its role in idiopathic dilated cardiomyopathy. *CARDIGENE Group. J Mol Cell Cardiol*. 1999;5:1025-1032.
- 7) Iwai C, Akita H, Shiga N, Takai E, Miyamoto Y, Shimizu M, Kawai H, Takarada A, Kajiya T, Yokoyama M. A suppressive effect of Gly389 allele of the $\beta 1$ -adrenergic receptor gene on ventricular tachycardia in dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 2002;66:723-728.

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 学会発表

American Heart Association

The 1st Asia Pacific Scientific Forum
USA

April 2002, Honolulu, Hawaii,

American College of Cardiology

The 51st Annual Scientific Session

March 2002, Atlanta, Georgia,

USA

日本循環器学会

第 66 回日本循環器学会総会・学術集会

2002 年 4 月, 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

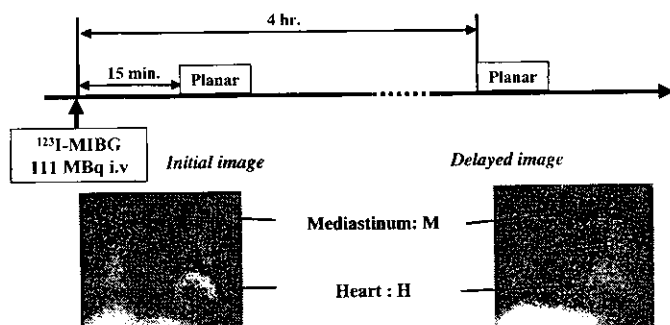
特記事項なし。

表 1. Characteristics of DCM patients according to genotype

	Arg/Arg (n=36)	Arg/Gly + Gly/Gly (n=18)	p value
Age*(years)	56.6±1.8	57.4±2.8	NS
Sex (male/female)	26/10	14/4	NS
Clinical indices			
Norepinephrine (ng/ml)	0.51±0.06	0.39±0.11	NS
LVDd (mm)	64±1	64±1	NS
%FS (%)	15±1	17±1	NS
LVEDVI (ml/m ²)	136±8	138±10	NS
LVEF (%)	32±2	31±2	NS
Concomitant medications			
ACE inhibitors, n (%)	23(68)	15 (83)	NS
β-Blockers, n (%)	6(18)	1 (6)	NS

*Age is presented as mean ± SEM. The value refers to the age at the first admission, not the current age.

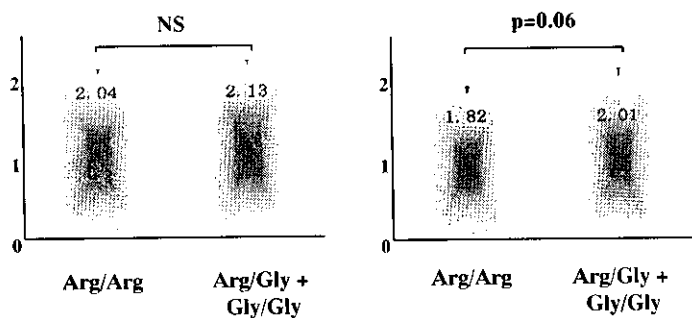
図 1. ¹²³I-MIBG Imaging Protocol



$$\text{Washout Rate (\%)} = \frac{(iH - iM) - (dH - dM)}{(iH - iM)} \times 100$$

(i; initial d; delayed)

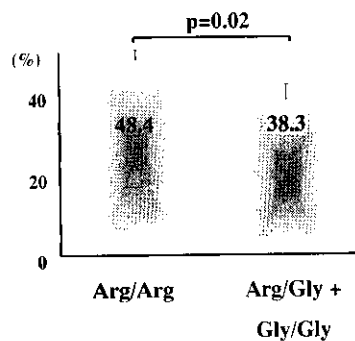
図 2



初期像H/M

後期像H/M

図 3



Washout rate

—平成13年度研究報告書—

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—

岐阜大学医学部第二内科

竹村元三・青山琢磨・丸山留美・香田雅彦・早川健司・川瀬幸典
湊口信也・藤原久義

同循環器再生医学講座

高橋知之・小財健一郎

【研究要旨】

最近われわれは培養心筋細胞のアポトーシスはFas刺激単独では誘導されないが、転写阻害剤であるactinomycin D (AD)を少量同時投与することにより誘導されることを報告した。しかしながら、その分子機構は解明されていない。今回、われわれは「Fas単独刺激は心筋細胞においてアポトーシス促進過程を活性化するのみならず、同時にその過程の一部を不活化しており、その不活化はADにより解除される。」という仮説をたて、心筋細胞におけるFas下流の分子機構の解明を試みた。新生児マウスより単離培養した心筋細胞に対し、アゴニスト抗Fas抗体 (FA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)によるFas刺激をAD (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下で行ったところ(FA+AD)、Fasの過剰発現、Fas下流のシグナル伝達経路のうち"alternate pathway"に位置するc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化、Baxの過剰発現、caspase-3の活性化、Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD)の不活化（すなわちCADの活性化）、そしてDNA断片化ならびにアポトーシスの形態が観察された。FA単独ないしAD単独では上記の変化はみとめられなかった。一方、FA単独刺激により、JNKを含むMitogen-activated protein kinases (MAPKs)を不活化するmitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) mRNAの過剰発現がみとめられた。このMKP-1 mRNA過剰発現はFA+ADあるいはAD単独では生じなかった。MKP-1に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドで前処理した心筋細胞はFA単独刺激によりアポトーシスに陥った。これに対し、JNK1に対するアンチセンスで前処理した心筋細胞はFA+AD刺激によってもアポトーシスに陥らなかった。一方、FA+AD処理によりFas下流の"Classic pathway"に位置するCaspase-8の活性化はみられず、またp38 MAPKやextracellular signal-regulated kinase (ERK)の活性化もみとめられなかった。以上より、1) FA+ADによる心筋細胞のアポトーシスはJNK, Bax, Caspase-3, CADを介するalternate pathwayに依存し、これにはFasの過剰発現というポジティブフィードバック機構も含まれる。2) Fas刺激にてMKP-1が過剰発現しJNKの過剰な活性化を抑制する。これがFas単独刺激では心筋細胞のアポトーシスがおこらない理由と考えられた。

【研究目的】

Fas/Fasリガンド系は種々の細胞においてアポトーシスを誘導する。しかしながらある種の細胞においては、Fas刺激単独ではアポトーシスは誘導されない。この場合、actinomycin Dなどの転写阻害剤あるいはcycloheximideなどの蛋白合成阻害剤を少量、同時投与することによりアポトーシスが誘導される。われわれは培養心筋細胞がこの範疇に属する細胞であることを報告した(1-3)。

現在、本現象の分子機構は未だ解明されていない。そこでわれわれは以下の仮説を立てた。「Fas刺激はアポトーシス促進シグナル伝達を活性化する一方で、同時にその一部を抑制している。その抑制はactinomycin D等の転写阻害剤により解除され、アポトーシスが実行される。」本研究では培養心筋細胞におけるFas刺激の下流のシグナル伝達の解明を試みた。

【研究方法】

新生児マウス(BALB/C)より単離、5%FBS含有MEMにて培養した心筋細胞に対し、vehicle (PBS)、アゴニスト抗Fas抗体 (FA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pharmingen)単独、actinomycin D (AD, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma)単独、あるいは両者の併用 (FA+AD)にて、刺激した。細胞死はトリパンブルーによる色素排除法で判定した。アポトーシス関連蛋白、すなわち extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)ならびにそれぞれのリン酸化蛋白 (p-ERK, p-Jun, p-p38 MAPK)、およびcaspase-8の蛋白発現レベルの定量化をWestern blot法で行ない、Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1)のmRNAの定量をNorthern blot法で行った。さらにJNK1, MKP-1のantisense oligonucleotide(AS)で前処理した心筋細胞に対しFas刺激を行い、細胞死を判定した。

【研究結果】

心筋細胞において抗Fas抗体単独ではJunのリン酸化はみられず、すなわちc-Jun N-terminal kinase (JNK)活性化はみとめられなかったが、AD存在下(FA+AD)では刺激後30分後よりJNK活性化がみられた(図1)。ADのかわりにフォスファターゼ阻害剤 vanadateを用いた場合でもJNK活性化がみられた。一方、いずれの刺激によってもERK, p38 MAPKのリン酸化はみとめられなかった。

次にMAPKsを脱リン酸化により不活化するMKP-1の発現を調べた。図2に示すように、抗Fas抗体単独刺激により、心筋細胞においてMKP-1のmRNAは時間依存性に増加した。ところが、ADの同時処理によりこの増加は抑制された。

次にASを用い、MKP-1ならびにJNKの機能を抑制し、Fas刺激に対する感受性の変化を調べた。心筋細胞をMKP-1のASで前処理すると、Fas単独刺激で心筋細胞死がみられ、その程度はASの用量に依存していた(図3)。逆に、JNK1のASで前処理すると、FA+AD刺激によっても心筋細胞死がおこりにくくなり、その程度はASへの用量依存を示した(図3)。

Western blot法で培養心筋細胞にcaspase-8のバンドが確認されたが、その活性型の発現はいずれの刺激によっても見られなかった。

【考察】

Fas刺激の下流には”classic pathway”と”alternate pathway”の2つの異なるシグナル伝達経路がいくつかの細胞種で確認されているが(4,5)、心筋細胞においては不明である。Classic pathwayではFas刺激後、Fas-associated death domain (FADD)を介してcaspase-8の活性化がおこる。活性型caspase-8は直接あるいはミトコンドリアcytochrome c依存性にcaspase-3を活性化する。今回の結果では、caspase-8の活性化はみとめられず、したがってFas刺激による心筋細胞アポトーシスはclassic pathwayに依存しないと考えられる。Kosekiらはアポトーシス阻害作用を有するapoptosis repressor with the caspase recruitment domain (ARC)が骨格筋ならびに心筋に特異的に発現していることを報告した(6)。ARCはFADDとcaspase-8の結合を競合的に阻害し、caspase-8の活性化を抑制する。本研究におけるcaspase-8の非活性化はARCに関連した現象である可能性がある。

Alternate pathwayではまずFas結合蛋白DaxxがFasに結合する(5)。DaxxはMAPK kinaseであるapoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1)を活性化し、JNKならびにp38 MAPK経路を活性化する(4,5)。JNK, p38MAPKはAP-1などの転写因子を活性化してアポトーシス誘導の方向へ作用すると考えられている(7)。図4に培養心筋細胞におけるFas刺激下流のシグナル伝達の仮説を呈示する。われわれは本研究ならびに以前の研究にて、FA+AD刺激は心筋細胞では、JNK活性化、Bax蛋白の上昇、caspase-3活性化、最終的にDNA断片化とアポトーシス形態を誘導することを明らかにした。すなわち、心筋細胞のFA+AD刺激によるアポトーシスのシグナル伝達経路はJNK活性化を含むalternate pathwayであることが示された。

これらの現象はFA単独あるいはAD単独刺激ではおこらなかった。一方、JNKを不活化するMKP-1のmRNAレベルの上昇がFA単独刺激にて見られ、この上昇はADの同時処理(FA+AD)にて抑制された。MKP-1のASにより心筋細胞を前処理すると(すなわちMKP-1の機能をブロックすると)、その細胞はFA単独刺激だけで細胞死が誘導されるようになり、逆に、JNK1のASにて心筋細胞を前処理すると(すなわちJNK1の機能をブロックすると)、細胞はFA+ADで刺激されても死ななくなった。したがってFA単独刺激で心筋細胞においてアポトーシスが誘導されないのは、FAによりJNKを不活化するMKP-1が過剰発現されるからと推察される。そしてADはこのMKP-1過剰発現を抑制することにより、FA+AD刺激で心筋細胞のアポトーシスが実行される。

【結論】

- 1)培養心筋細胞のFas誘導性アポトーシスのシグナル伝達経路はJNK活性化を含むalternate pathwayである。
- 2)Fas刺激単独で心筋細胞においてアポトーシスが誘導されないのは、Fas刺激によりJNKを不活化するMKP-1が過剰発現されるためであり、ADはこのMKP-1過剰発現を抑制する。

【参考文献】

1. Takemura G, Kato S, Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi S, Fukuda K, Fujiwara T, Fujiwara H. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *J Pathol.* 2001; 193: 546-556.
2. Maruyama R, Takemura G, Aoyama T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Qiu X, Ohno Y, Minatoguchi S, Miyata K, Fujiwara T, Fujiwara H. Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy -Beating and rate are associated with the apoptotic process. *Am J Pathol.* 2001; 159: 683-691.
3. 青山琢磨、竹村元三、早川健司、香田雅彦、川瀬幸典、丸山留美、湊口信也、藤原久義、藤原兌子。Fas誘導性新生児マウス心筋細胞アポトーシスにおけるアポトーシス関連因子の発現。厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班平成11年度研究報告集p.53-56, 2000
4. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; 275: 90-94.
5. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997; 89: 1067-1076.
6. Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 5156-5160.
7. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331.

図1

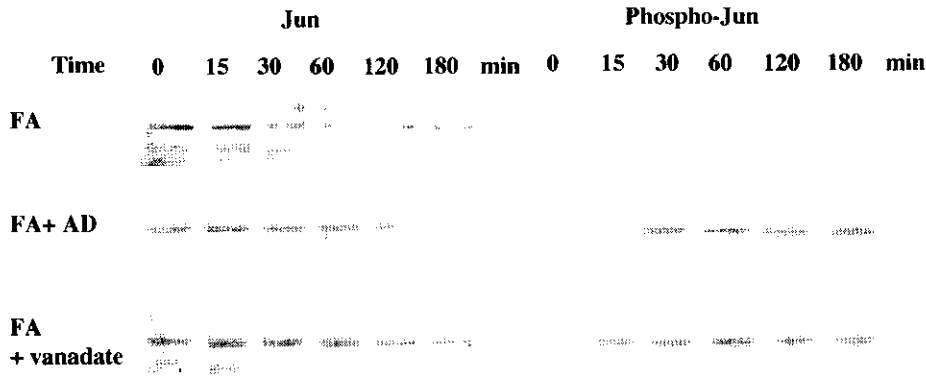


図1 Fas刺激による心筋細胞におけるJunのリン酸化。Western blot法にてFas刺激単独ではリン酸化されたJun (p-Jun)、すなわちJNKの活性化は見られないが、ADあるいはvanadateの同時投与によりp-Junのバンドが出現する。

図2

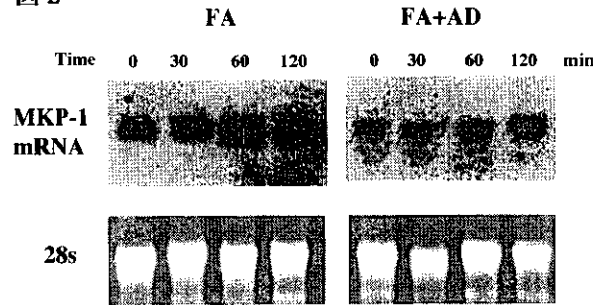


図2 Fas単独刺激による心筋細胞におけるMKP-1 mRNAの過剰発現 (Northern blot法)。これはADの同時処理(FA+AD)により抑制される。

図3

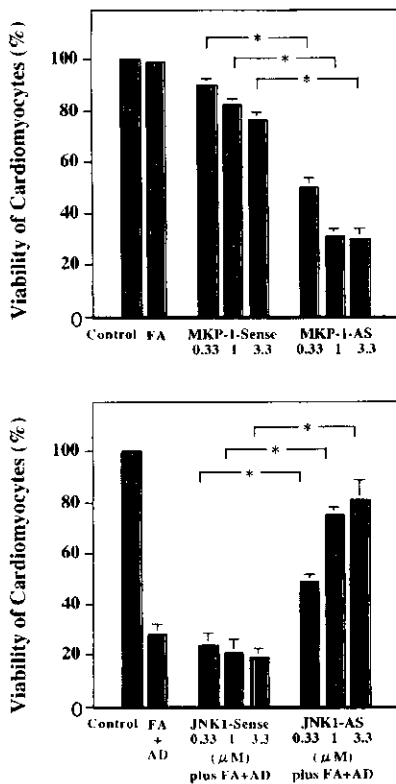


図3 MKP-1, JNK1のantisense oligonucleotide前処置による心筋細胞のFas感受性の変化。心筋細胞をMKP-1のASで前処理すると、Fas単独刺激で心筋細胞死がみられ、その程度はASの用量に依存した。逆に、JNK1のASで前処理すると、FA+AD刺激によっても心筋細胞死が少なくなり、その程度はASへの用量依存を示した。

図4

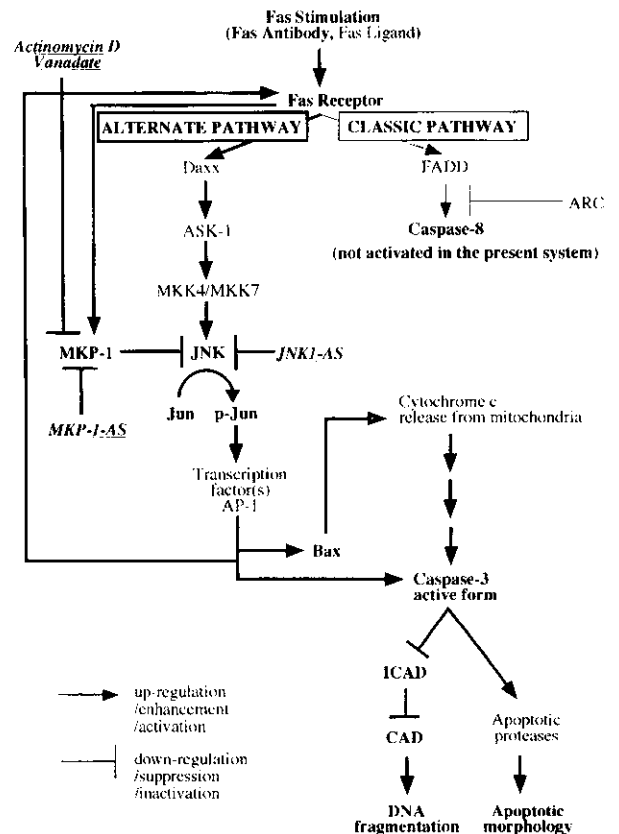


図4 本実験より推察される培養心筋細胞におけるFas刺激のシグナル伝達。

—平成13年度研究報告書—

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

操 裕 荒井正純 陳 学海

呂 伝江 王 寧元 香田雅彦

竹村元三 湊口信也 藤原久義

岐阜大学医学部第2内科

高橋知之 小財健一郎

岐阜大学医学部循環器再生医科学講座

藤原兌子

京都女子大学家政学部食物栄養学科

【研究要旨】

これまでにマウスの非再灌流梗塞心やラットのcryoinjuryモデル心に対して、直接心筋注入による骨髄細胞移植が血管新生及び心筋細胞再生を導き、心機能改善をもたらすことが報告された¹⁻²⁾。また、非再灌流梗塞心モデルマウスに対して、同種間で経静脈的に注