

DCM患者の各抗体陽性率は、間接蛍光抗体法40%、イムノブロット法38%、抗 β 1受容体抗体39%、抗ムスカリンM2受容体抗体42%、抗Na-K-ATPase抗体30%であった。健常者の各抗体陽性率は、間接蛍光抗体法6%、イムノブロット法4%、抗 β 1受容体抗体6%、抗ムスカリンM2受容体抗体8%、抗Na-K-ATPase抗体2%であった(図1)。いずれかの方法で陽性を示した症例はDCM患者では85%、健常者では14%であった。少なくとも4種類の方法で陽性であった症例はDCM患者で13%、健常者で0%であった(図2)。間接蛍光抗体法陽性患者は陰性患者に比べて、高齢であった(61 ± 19 vs. 53 ± 16 , $p < 0.05$)。イムノブロット法陽性患者は陰性患者に比べて、非持続性心室頻拍を高頻度に認めた(63% vs. 34% , $p < 0.05$)。抗 β 1受容体抗体陽性患者においても非持続性心室頻拍を高頻度に認めた(63% vs. 34% , $p < 0.05$)。ムスカリンM2受容体抗体陽性患者では慢性心房細動を高頻度に認めた(41% vs. 23% , $p < 0.05$)。Na-K-ATPase自己抗体陽性患者においても非持続性心室頻拍が高率であった(81% vs. 29% , $p < 0.05$)。NYHA心機能分類、左室内径、左房径、駆出率、血漿ノルエピネフリン濃度や心房利尿ホルモン濃度にいずれも差はなかった。イムノブロット法、抗 β 1受容体抗体、抗Na-K-ATPase抗体ともに陽性を示した患者においては、93%に非持続性心室頻拍を認めた。これらの内、2方法において陽性を示した患者においては54%に非持続性心室頻拍を認めた。1方法のみで陽性であった患者においては50%に同不整脈を認めた(図3)。

【総括】

- 1.DCM患者を対象とし、間接蛍光抗体法、イムノブロット法、ELISA法による β 1アドレナリン受容体抗体、抗ムスカリンM2受容体抗体、抗Na-K-ATPase抗体を測定した。
- 2.85%の患者において、いずれかの方法で自己抗体が検出された。
- 3.イムノブロット法陽性患者、抗 β 1受容体抗体陽性患者、抗Na-K-ATPase抗体陽性患者においては非持続性心室頻拍を高率に認めた。
- 4.抗ムスカリンM2受容体抗体陽性患者では心房細動合併が高率であった。
- 5.複数の方法を駆使することにより、ほとんどのDCM患者に抗心筋自己抗体が検出され、検出された抗心筋自己抗体の種類によってある程度臨床的特徴を予測することが可能と思われた。

【参考文献】

1. Baba A, Yoshikawa T, Chino M, Murayama A, Mitani K, Nakagawa S, Fujii I, Shimada M, Akaishi M, Iwanaga S, Asakura Y, Fukuda K, Mitamura H, Ogawa S: Characterization of anti-myocardial autoantibodies in Japanese patients with dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 2001;65:867-73
2. Smith SC, Allen PM: Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* 1991;147:2141-7
3. Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Mitamura H, Ogawa S: Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:418-24
4. Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Takahashi T, Ogawa S: Autoimmunity against the second extracellular loop of β 1-adrenergic receptors induces β -adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 2001;88:578-86

5. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV, Stangl V, Merkel K, Pohl M, Docke WD, Morgera S, Neumayer HH, Wernicke KD, Wallukat G, Stangl K, Baumann G: Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1590-8

【研究発表】

1.論文発表

Ogawa S, Yoshikawa T: Autoantibodies: emerging upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1761-3

Baba A, Yoshikawa T, Chino M, Murayama A, Mitani K, Nakagawa S, Fujii I, Shimada M, Akaishi M, Iwanaga S, Asakura Y, Fukuda K, Mitamura H, Ogawa S: Characterization of anti-myocardial autoantibodies in Japanese patients with dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 2001;65:867-73

2.学会発表

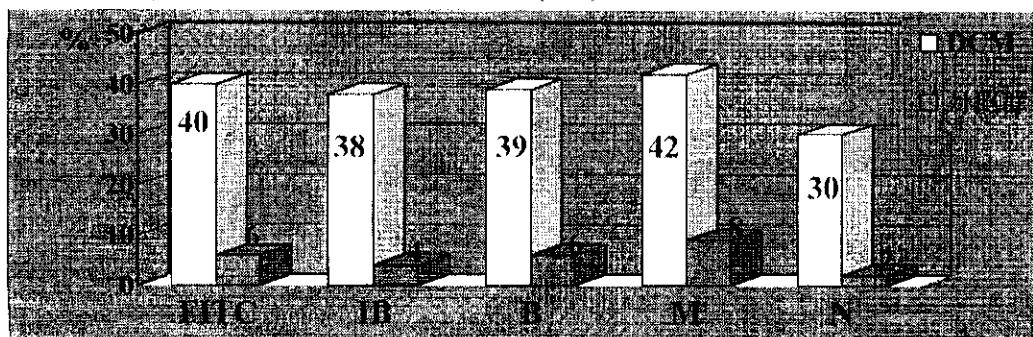
馬場彰泰、吉川勉、岩田道圭、小川聡 : Antigen-specific effect of autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase in immunized cardiomyopathic rabbits. 第66回日本循環器学会2002年4月

馬場彰泰、吉川勉、村山晃、三谷和彦、中川晋、藤井効、伊藤清治、赤石誠、三田村秀雄、小川聡 : Autoantibodies as new substrates of paroxysmal atrial fibrillation in patients with congestive heart failure. 第49回日本心臓病学会2001年9月

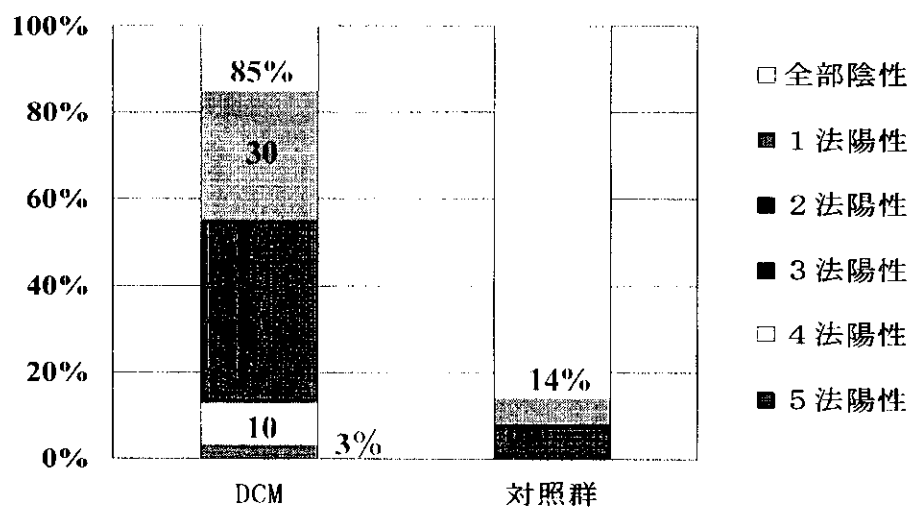
吉川勉、岩田道圭、馬場彰泰、安斎俊久、小川聡 : 特発性心筋症における自己免疫機序- β 1 アドレナリン受容体第二細胞外ループの役割 第49回日本心臓病学会パネルディスカッション2001年9月

【各自己抗体の陽性率】

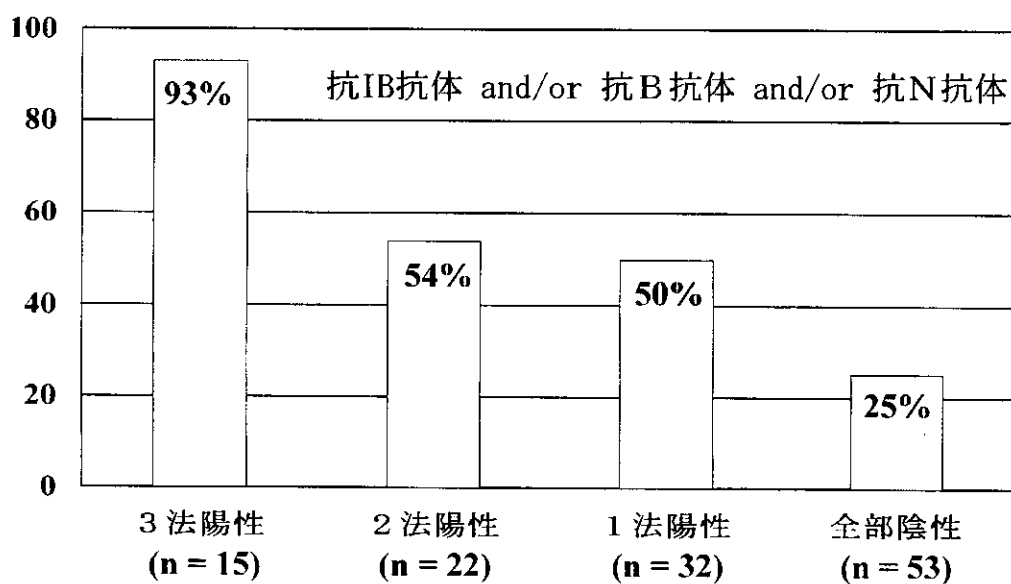
- 1) 間接蛍光抗体法による抗心筋抗体 (FITC)
- 2) Immunoblotting法による抗心筋抗体 (IB)
- 3) 抗 β 1-受容体抗体 (B)
- 4) 抗M2-受容体抗体 (M)
- 5) 抗Na-K-ATPase抗体 (N)



【全自己抗体の陽性率】



【非持続性心室頻拍合併率と自己抗体】



厚生労働省特定疾患
特発性心筋症調査研究班
平成 13 年度分担研究報告書

Del-1 の心血管系構築に関する研究

分担研究者 川名 正敏¹、
日台 智明²、笠貫 宏¹

所属 東京女子医科大学循環器内科¹、
日本大学医学部先進医学研究センター²

研究要旨 胎児血管内皮細胞で発現する del-1 の過剰発現マウスを作成して、心血管系構築に関する作用を検討した。Del-1 過剰発現マウスでは、心臓で心室内腔の肉柱の凹凸が平滑になり壁肥厚が認められた。このほか、腸管血管が成熟した樹枝状の血管構築を示さず、血管形成過程でのリモデリング異常が認められた。del-1 は心血管系の発生においてその形態形成に関与すると思われる。

緒言

胎生期における血管新生の主な様式には二通りあることが知られている。一つは angiogenesis であり、もう一つは vasculogenesis と呼ばれている。Vasculogenesis においては、血管内皮細胞が網目状の新生血管叢を形成した後、それらが再構築 remodeling を受け、成熟した血管へと形態を変える。胎生期での vasculogenesis における remodeling の機序はまだ明らかになっていないが、近年いくつかの情報伝達系が注目されている。Angiopoietin とその受容体である tek のノックアウトマウスでは remodeling が起こらない。また stromal cell derived factor -1 (SDF-1) とその受容体の CXCR4 の遺伝子ターゲティングにより腸間膜動脈の remodeling に異常が起こることが観察されている。

我々はレポーター遺伝子 (lac-Z 遺伝子) の random insertion による enhancer trap 法を利用し、胎児血管内皮細胞で発現する新しい遺伝子 "del-1" をクローニングした。この del-1 の cDNA は 480 アミノ酸残基からなり、5' 末端にはシグナルペプチドを認め、N 末端の 3 つの上皮細胞増殖因子 (EGF) 繰り返し配列と C 末端の 2 つの discoidin 様ドメインから構成される新しい蛋白であった。さらに 2 番目の EGF 配列の中にインテグリン結合配列 (RGD) が認められた。

In situ hybridization では心内膜、血管内皮細胞に強い del-1 mRNA の発現が見られ、抗 del-1 抗体を作製し免疫組織染色では、血管では内皮細胞下に、心臓では心内膜下層に del-1 が検出された。即ち del-1 は胎生期に内皮細胞で産生されたのち分泌されて細胞外基質に存在することが明らかになった。

血島由来の未分化内皮細胞の cell line である yolk sac cell (YS cell) を用いて in vitro での機能解析を行ったところ、del-1 は内皮から分泌された後に細胞外基質に存在して、RGD 配列を介して内皮細胞膜上の integrin $\alpha V\beta 3$ と結合して細胞内に情報を伝達する蛋白質と考えられる。

目的

今回我々は、del-1 が integrin を介して心血管構築に関与するのではないかと仮説を立て、それを証明するために del-1 の過剰発現マウスを作製し、心血管系の観察を行った。

方法

宮崎氏より供与された pCAGGS の EcoRI 部位に del-1 の cDNA を挿入して作製した DNA を C57/B6 マウス受精卵に打ち込み、ファウンダーマウスを得た。ファウンダーマウスの尾よりゲノム DNA を調整し、サザンブロット法にてトランスジェニックマウスを選択し、野生型 C57/B6 マウスと交配して F1 マウスを作製した。トランスジェニックな F1 マウスの臓器より RNA を調整し、ノーザンブロット法にて導入遺伝子の発現を確認した。得られたトランスジェニックマウスを解剖し、肉眼のおよび顕微鏡的観察を加えた。

結果

6 系統のトランスジェニックマウスを得た。全ての変異型マウスは外見上は野生型と差異がなく、正常に発育し、繁殖した。6 系統のうち 2 系統の解析を終えた。2 系統とも同様な表現型の異常を呈した。

心臓

心臓では外観に明らかな異常を認めなかったが、心腔内を観察すると左室右室ともに内腔の肉柱の凹凸が平滑になり、壁肥厚が認められた。特に右室では肉柱の癒合や壁の肥厚も認められた。本表現型の形成機序として、肉柱部に限局しない心筋細胞の均一な増殖がおこることが予想された(図1)。

腸間膜血管

腸間膜の動静脈に分枝形態の異常を認めた。野生型では腸間膜の血管は図2のように腸間膜の中ほどで分岐する。しかし、del-1 強制発現マウスでは腸間膜内で分岐する血管が腸管よりになっているか、あるいは全く認められなかった。また血管は全体に野生型より細かった。他の主要血管に異常は認められなかった。

考察

del-1 は胎児心内膜と血管内皮細胞に発現している。また、血管内皮細胞をゲル上で培養すると網目状の血管様構造を作るが、del-1 の強制発現により網目を形成する枝が切れてより粗い目を形作るようになる。このようなデータから del-1 が内皮細胞に作用して心臓血管系の形態形成に何らかの役割を果たすことが予測されていた。さらに我々は内因性の del-1 が心内膜より分泌された後、心筋層に沈着して存在することを報告している。そのことより、del-1 の標的細胞には血管内皮細胞だけでなく、心筋細胞も含まれる可能性があった。今回のトランスジェニックマウスの解析により、del-1 強制発現マウスでは心臓内腔において肉柱の形態に異常が生じることが明らかになった。変異型マウスでは野生型に比して肉柱の発育が悪く、平滑な心臓内面をしていた。右室では平坦な壁の肥厚が観察されたため、本表現型の形成機序として、肉柱部に限局しない心筋細胞の均一な増殖がおこることが予想された。今後は胎児、新生児マウスの心筋細胞の増殖を解析する予定である。

腸間膜血管の形成は、原始的な血管叢が再構築されることにより完成させる、いわゆる vasculogenesis の経過を取る。この再構築の過程では、腸管に平行方向の枝の大部分が消失することにより、垂直方向の幹とその分枝が残さ

れる。Del-1 強制発現マウスでは血管分枝の減少が観察され再構築の異常昂進が起こっていると考えられた。この表現型は、del-1 を強制発現させた内皮細胞を、ゲル上で培養し、血管様の構造物を作らせた場合に起こる現象に酷似している。Del-1 が発生過程で内皮細胞に作用して血管網の再構築に関与している可能性が高い。今後は異常血管の形成過程を、胎児で観察することで del-1 の機能を明らかにして行く予定である。

結論

del-1 は心血管系の発生においてその形態形成に関与すると思われた。

文献

- 1) Chiaki Hidai, Thomas Zupancic, Kalyani Penta, Adel Mikhail, Masatoshi Kawana, Elena E. Quertermous, Yoshikazu Aoka, Masafumi Fukagawa, Yasuhisa Matsui, Doros Platika, Robert Auerbach, Brigid L.M. Hogan, Ralph Snodgrass, Thomas Quertermous: Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the alpha v beta 3 integrin receptor; GENES & DEVELOPMENT 12: 21-33, 1998
- 2) Penta K, Varner JA, Liaw L, Hidai C, Schatzman R, Quertermous T: Del-1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3; J Biol Chem 1999 Apr 16;274(16):11101-9

凡例

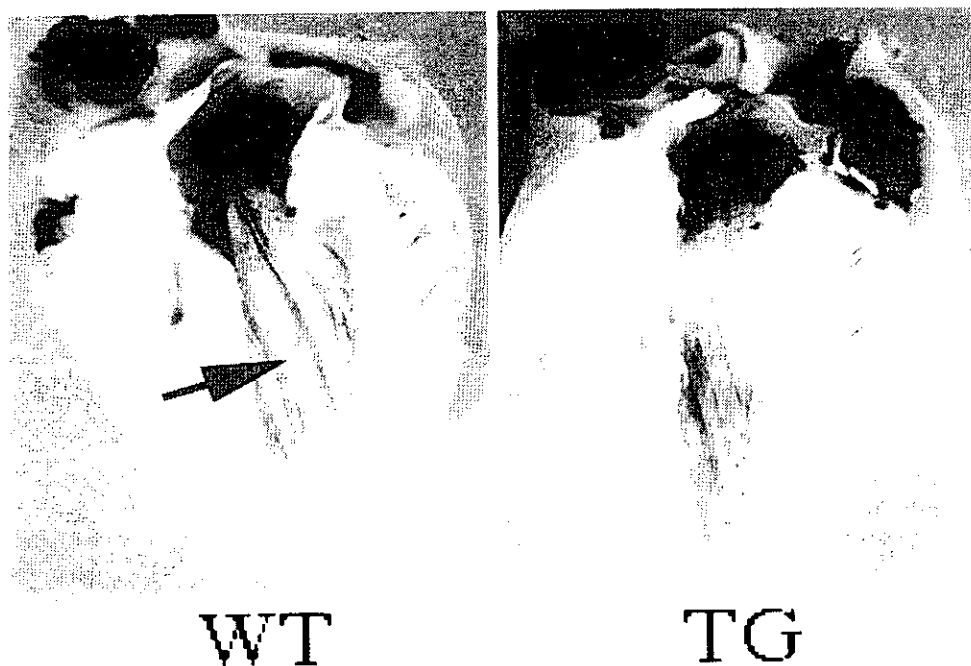


図1

図1 Del-1 過剰発現マウスにおける心室壁肥厚と形態変化
WT: wild type, TG: transgenic mouse

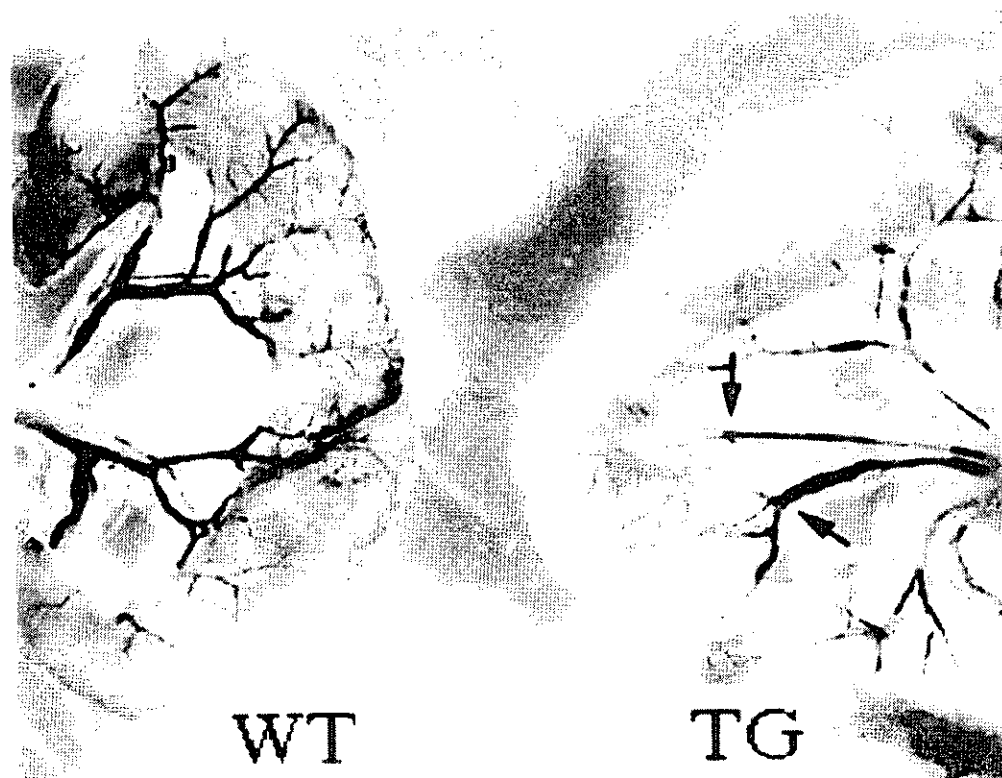


図2

図2 Del-1 過剰発現マウスにおける腸間膜血管構築の変化
WT: wild type, TG: transgenic mouse

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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
（特発性心筋症調査研究班共同研究報告）

分担研究者 木村彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所教授）

研究要旨：肥大型心筋症（HCM）では、現在までに少なくとも10種類の原因遺伝子が判明しており、そのいずれに変異が生じてもHCMの原因となる。しかしながら、どの遺伝子に変異があるかによってHCMの臨床像や生存予後が異なっていることが最近次第に明らかになって来た。そこで、これまでの解析で遺伝子変異が存在することが既に判明している症例についての臨床病態に関するアンケート調査を行った。その結果、ミオシン重鎖変異例に比べて、トロポニンT変異例では、肥大の程度は軽いが臨床予後は不良であること、ミオシン結合タンパク変異例では、生存予後は比較的良好であるものの心機能の経年変化はトロポニンT変異例と同様に低下傾向が強いことが判明した。

A. 研究目的

肥大型心筋症（HCM）では常染色体性優性遺伝形式にしたがう家族歴を認めることから、多発家系を対象とした連鎖解析や候補遺伝子アプローチが行われ、現在までに少なくとも10種類の原因遺伝子が判明している。これらの遺伝子はいずれも心筋サルコメアの構成要素ないし2帯構成要素をコードしており、そのいずれに変異が生じてもHCMの原因となる。しかしながら、これまでの解析で、日本人でも欧米人でも、どの遺伝子にいかなる変異があるかによってHCMの臨床像や生存予後が異なっていることが報告されている。我々は1986よりわが国におけるHCM患者、家系より血液検体を収集し、その遺伝子変異について検討して来た。特発性心筋症調査研究班を中心として、このような全国レベルでの共同研究を展開することで、これまでに多数の変異を同定している。そこで本研究では、遺伝子変異に起因するHCMの臨床像と予後を明らかにするために、これまでの解析で遺伝子変異が判明していた症例につい

ての、臨床病態に関するアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1986年から1998年までの間に、心筋症調査研究班班員および研究協力者の所属する施設およびその関連施設を中心にこれまで共同研究を行って来た臨床施設より収集された血液検体を用いての解析で、既に遺伝子変異が同定されていた患者を対象とした。

共同研究施設の共同研究者に調査票を送付し、匿名化した臨床情報（後述）を収集した。平成14年度中に返送された調査票を元に臨床像、臨床予後を集計、検討した。

調査項目は、性、発症時年齢、診断時年齢、最終受診時年齢、HCM家族歴、突然死の家族歴、臨床症状（失神、胸痛、骨格筋症状、神経症状、呼吸困難などの有無）、診断時（ないし最前）および最新の臨床検査所見（CTR, IVST, PWT, LVDd, LVDs, LAD, EF, %FS, SAMおよび心尖部肥大の有無）、血液検査所見（クレアチニン、CPK, ANP, BNP）と心不全重症

度 (NYHA)、心筋生検所見、心電図所見と不整脈合併の有無、治療薬投与、合併症の有無、転帰 (改善、不変、悪化、死亡など) であった。

(倫理面への配慮)

本研究の対象は既に遺伝子変異が判明した症例であるが、アンケート調査では個人を特定できる情報は全て省き、遺伝子解析研究で用いている匿名化 ID コードを用いての臨床情報の収集を行った。なお、このような遺伝子解析研究に関連した研究計画については、東京医科歯科大学難治疾患研究所の倫理審査委員会による承認 (平成 13 年 1 月 18 日付け) を受けている。

C. 研究結果

これまでに、心筋 β ミオシン重鎖遺伝子 (MYH7) に 27 種、心筋トロポニン T 遺伝子 (TNNT2) に 7 種、心筋ミオシン結合タンパク C 遺伝子 (MYBPC3) に 13 種、心筋トロポニン I 遺伝子に 5 種、タイチン遺伝子に 2 種、 α トロポミオシン遺伝子、ミオシン必須軽鎖遺伝子、ミオシン調節軽鎖遺伝子のそれぞれに 1 種ずつの合計 57 種類の疾患関連変異をわが国の症例に同定した。なお、心筋 α アクチン遺伝子変異は見出されていないが、PRKAG2 遺伝子はこれまでに解析していないため対象外である。

病因変異が同定されている 236 名について調査票を送付したが、平成 14 年 3 月 31 日までに回収された調査票は 118 名分 (回収率 50.0%) であった。今回の調査対象には 10 年以上前の症例が多く、継続して受診していない (死亡など) ため、臨床像や予後の調査が困難であったものと考えられる。なお、臨床像が回収された変異の種類は合計 33 種であった。

病因変異の頻度が高い MYH7, TNNT2, MYBPC3 については、各々 30 例以上について臨床像が判明したため、それらについて解

析を行った。その他の遺伝子に病因変異のある症例は数が少ないため、今回の報告では解析から除外した。表 1 に示すように、症例間での年齢や検査所見値にかなりの幅があるが、発症 (推定) 年齢の平均値は、MYH7 例が 33.2 歳、TNNT2 例が 35.3 歳、MYBPC3 例が 39.5 歳となり、MYBPC3 例が比較的高齢で発症していることが確認された。一方、診断時年齢に着目すると、MYH7 例が 36.5 歳、TNNT2 例が 41.2 歳、MYBPC3 例が 39.7 歳であることから、TNNT2 例は診断が遅れる傾向にあった。

回収されたエコー所見データをまとめると、心室中隔 (IVS) の平均最大厚 (mm) は、MYH7 例 (平均年齢 41.5 歳) で 19.3、TNNT2 例 (平均年齢 45.8 歳) で 15.9、MYBPC3 例 (平均年齢 44.3 歳) で 18.0 となり、TNNT2 例で心肥大の程度が軽いことが示された。一方、平均 LVDd (mm) は MYH7 例で 44.0、TNNT2 例で 49.7、MYBPC3 例で 44.2 となり、平均 %FS は MYH7 例で 37.7、TNNT2 例で 30.3、MYBPC3 例で 35.7 であり、TNNT2 例は収縮障害を合併する傾向にあることが判明した。なお、平均 LAD (mm) は MYH7 例で 40.8、TNNT2 例で 40.6、MYBPC3 例で 38.7 と、大きな違いはなかった。このような原因遺伝子ごとの臨床像の違いは、最前エコーと最新エコーの所見にも顕われており、TNNT2 例は心肥大は軽い、収縮障害を合併しやすいことがわかった。

心肥大や収縮障害の程度などは年齢に依存して異なり、またその変化の程度も年齢に依存する可能性がある。そこで個々の症例から得られたデータをまとめて年齢との関連で解析した。図 1 には、横軸に年齢、縦軸に %FS をプロットしたものを示す。図 1 の下段には変異ごとに色を変えたプロットをしめすが、同一遺伝子で同一変異の場合のバリエーションは、変異間のバリエーションと同程

度であった。全体をまとめてプロットし、%FSの変化度を年齢との関連式で表すと、MYH7例は $47 - 2 \times \text{年齢}/e$ 、TNNT2例は $44 - 3 \times \text{年齢}/e$ 、MYBPC3例は $50 - 3 \times \text{年齢}/e$ となった。このことは、TNNT2例は診断時の時点で既に%FSが低いことと同時に、その年齢変化もMYH7例より大きい（急速に進む）ことを示す。さらに、MYBPC3例は、比較的%FSは高いが、その変化の程度はTNNT2例と同様に比較的早く進むことを示す。

今回の調査票の回答では、平均観察年数はMYH7例が10年、TNNT2例が11.2年、MYBPC3例が7.7年であったが、特にTNNT2例は、悪化40.0%、死亡26.7%と臨床予後が不良であることが示された。また、MYBPC3変異例は比較的生存予後は良好であるものの、26.8%は心機能が悪化していることが明らかとなった。特に、MYBPC3変異例は平均観察年数が7.7年と短いにも関わらず死亡と悪化を合わせた割合は34.1%であり、これは平均観察年数が10年のMYH7変異例（死亡と悪化が36.6%）とほぼ同程度であった。また、HCMの年間死亡率はおおよそ0.5%程度であるとされていたが、今回の調査での年間死亡率は、MYH7例で約1.5%、TNNT2例で約2.5%、MYBPC3例で約1%であり、サルコメア変異が判明している例、特にTNNT2例は予後不良であった。

D. 考察

サルコメア変異が特定されたHCM症例について、過去に遡った臨床経過とのアンケート調査を行った。調査票の回収率が約50%の時点でまとめたデータであるが、これまでに少数例の解析から示唆されていたように、MYH7例やMYBPC3例は心肥大がやや強いこと、これに比してTNNT2例は心肥大の程度は軽い、収縮障害を合併し、臨床予後、生存予後ともに不良であることが示された。さらに本研究で初めて明らかになったこととして、

(1) TNNT2例は診断年齢が遅く、診断された時点で既に%FS低下やLVd増大がある（収縮障害を来している）こと、(2) MYBPC3例では生存予後はそれほど不良でないものの、TNNT2例と同程度の経過で%FSの低下が生じ、心機能悪化の年間発生率はMYH7例よりもむしろ高いことが明らかになった。

MYBPC3変異例を含め、サルコメア構成要素に遺伝子変異が同定された症例では、これまでにHCM全体として推定されていた年間死亡率の2-5倍であることが本研究で明らかになった。このことは、同じHCMの病態を呈していても、サルコメア変異例は、より病態が重症でありまた心不全発症率や死亡率も高いことを示している。また、どのサルコメアに変異があるかによって、臨床経過が異なることが示された。すなわち、遺伝子解析によってHCMの病因を明らかにすることは、その症例の臨床経過を予測する上で重要な情報を与えることになる。

E. 結論

サルコメア構成要素（ミオシン重鎖、トロポニンT、ミオシン結合タンパク）に変異のある肥大型心筋症症例は、病態が重症であり、心不全発症率や死亡率も高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kimura A, Itoh-Satoh M, Hayashi T, Takahashi M, Arimura T: Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy in Asian populations. *J Cardiol.* 37: S139-S146, 2001.

2) Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Ueda K, Hohta S, Nouchi T, Takahashi M, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A: Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 291: 385-393, 2002.

3) Kimura A, Hayashi T, Itoh-Satoh M, Arimura T, Lee WH, Lee SY, Park JE: Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy: Identification of novel disease genes for hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *In* Proceedings of ICCHF, Klumer Academic Publishers, Boston, in press

4) Kimura A, Itoh-Satoh M, Hayashi T, Takahashi M, Arimura T, Yasunami M, Lee SY, Hwang TH, Lee WH, Park JE: Mutational profiles and molecular etiologies of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy in Asian populations. *In* Cardiovascular Remodeling and Failure (ISHR2001), Klumer Academic Publishers, Boston, in press

2. 学会発表

1) Kimura A: Molecular etiologies of idiopathic cardiomyopathy in the Orientals. 17th World Congress of International Society for Heart Research. Manitoba, Canada, July 6-11, 2001.

2) Kimura A: Overview for molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy and related disorders. 4th Cardiovascular Genomics symposium. Seoul, Korea, October 26, 2001

3) Arimura T, Hayashi T, Shibutani M, Hirose M, Kimura A: Identification and functional analysis of novel disease genes for hypertrophic or dilated cardiomyopathy. 4th Cardiovascular Genomics symposium. Seoul, Korea, October 26, 2001

4) 木村彰方: 家族性特発性心筋症の遺伝子解析、シンポジウム、単因子性遺伝病、第46回日本人類遺伝学会大会、大宮、平成13

表1 心筋症予後調査対象人数

a) 特発性心筋症調査研究班関連施設

施設	班員、研究者氏名	調査対象人数
久留米大・三内	岡直樹、古賀義則、今泉勉	118
神戸大・一内	河合一哉？、横山光宏	24
群大・二内	長谷川昭	9
山口大・三内	中村浩、松崎益徳	5
京大・三内	松森昭、篠山重威	2
大阪医大・三内	寺崎文夫、河村慧四郎、北浦修？	2
医歯大・二内	伊藤宏、廣江道昭	1
順天堂・浦安病院	？？、河合	1
東大・二内	豊岡照彦	1

b) 上記以外の共同研究施設

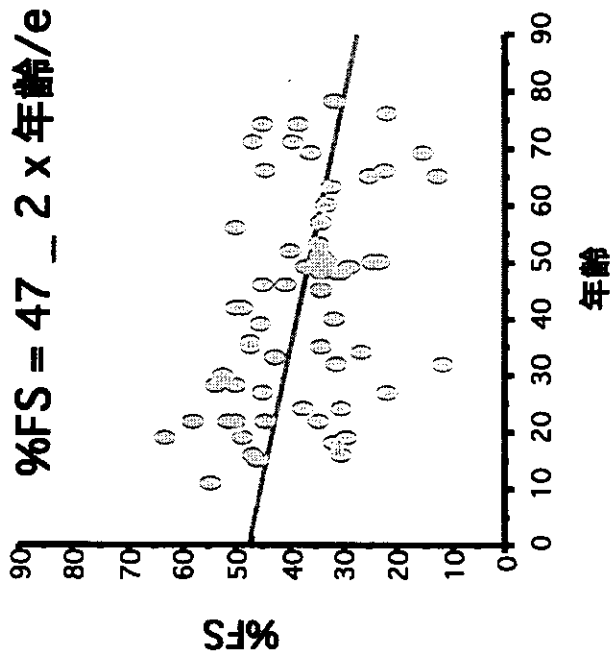
施設		調査対象人数
高知医大・老年病	北岡章、土居義典	28
半蔵門病院・内科	坂本二哉	9
国立甲府内科	布田伸二（現、東京女子医大）	6
済生会京都府病院・循内		4
国際医セ・循内	岡崎修	4
都老人医センター	中原賢一、大川真一郎（現、東京女子医大）	4
いわき共立内科	蛭田？	3
山形大・一内	八巻道雄？	3
杏雲堂病院内科	高杢？	2
医歯大・三内	小林靖、沼野藤夫	2
岩手医大・二内	中居？	2
防衛医大・一内	大鈴文夫？	2
名大・環医研	外山淳二	2
京都府立医大・二内	松尾あき子	1
東京医大・二内	？？	1

表2 肥大型心筋症の病態および予後調査結果

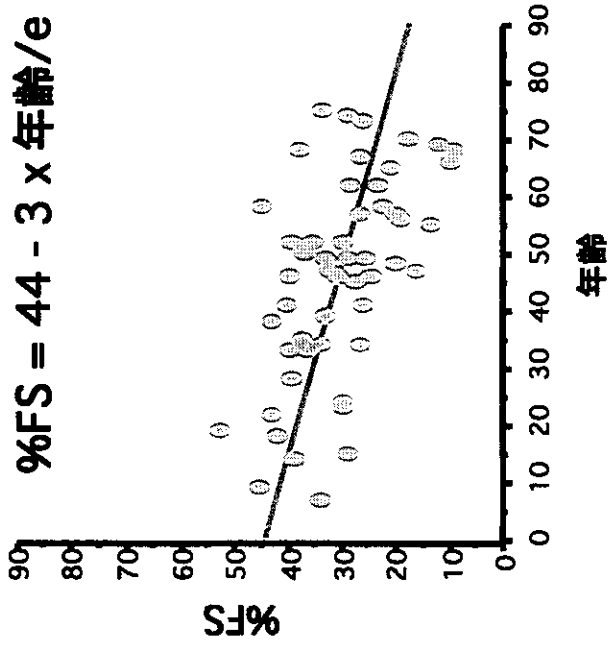
	MYH7	TNNT2	MYBPC3
有効回答数	30//41	26//30	11//41
回答変異数	16	5	9
診断年齢	36.5±18.7	41.2±17.6	39.7±15.8
発症年齢	33.2±18.3	35.3±16.4	39.5±16.2
性(M:F)	(16:25)	(17:13)	(21:20)
CTR%	52.5±7.6	52.2±7.7	52.9±5.7
エコー所見			
年齢(歳)	41.5±19.9	45.8±17.8	44.3±16.5
IVS(mm)	19.3±7.6	15.9±5.0	18.0±5.7
PW(mm)	11.1±2.6	10.3±2.0	11.0±3.0
LVDd(mm)	44.0±8.4	49.7±9.9	44.2±8.2
%FS	37.7±11.1	30.3±9.1	35.7±11.1
LA(mm)	40.8±9.4	40.6±10.3	38.7±7.9
最前エコー所見			
年齢(歳)	42.7±18.8	41.2±17.0	40.4±15.3
IVS(mm)	20.2±7.1	16.4±4.8	17.3±5.9
PW(mm)	11.6±2.8	10.5±4.8	11.1±3.2
LVDd(mm)	41.2±7.3	49.3±10.5	41.7±6.5
%FS	40.4±10.0	30.5±8.9	37.3±11.1
LA(mm)	36.9±7.1	37.8±9.8	36.4±6.3
最新エコー所見			
年齢(歳)	47.1±19.7	51.6±17.6	49.6±16.8
IVS(mm)	18.5±8.2	15.3±5.3	19.0±5.6
PW(mm)	10.5±2.2	10.0±2.1	11.0±2.8
LVDd(mm)	46.8±8.6	50.3±9.3	47.5±9.2
%FS	35.0±11.8	30.1±10.7	33.6±11.1
LA(mm)	44.9±9.7	43.8±10.2	41.7±8.8
臨床予後			
観察期間(年)	10.0±8.0	11.2±5.7	7.7±6.2
1. 治癒	0	0	0
2. 改善	0	1(3.3%)	0
3. 不変	22(53.6%)	7(23.3%)	25(61.0%)
4. 悪化	9(21.9%)	12(40%)	11(26.8%)
5. 死亡	6(14.6%)	8(26.7%)	3(7.3%)
6. 不明	4(9.7%)	2(6.7%)	2(4.9%)
7. 悪化+死亡	15(36.6%)	20(66.7%)	14(34.1%)
死因内訳(%)			
心不全死	2(33.3%)	4(50.0%)	1(33.3%)
不整脈、突然死	3(50.0%)	3(37.5%)	0(0%)
脳血管障害	0(0%)	1(12.5%)	1(33.3%)
その他、詳細不明	1(16.7%)	0(0%)	1(33.3%)

図1 サルコメア遺伝子変異に起因するHCM症例群における%FSの経年変化

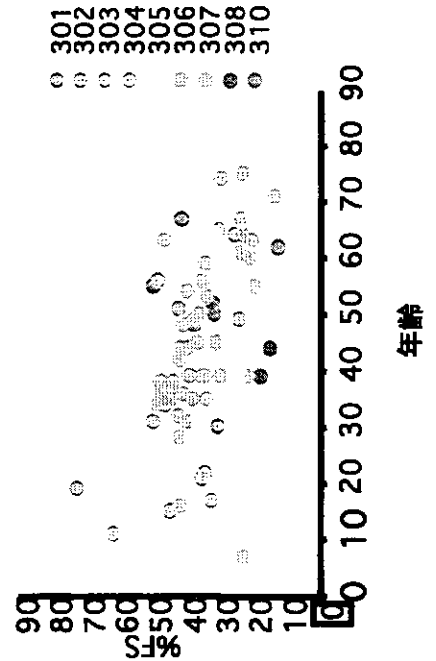
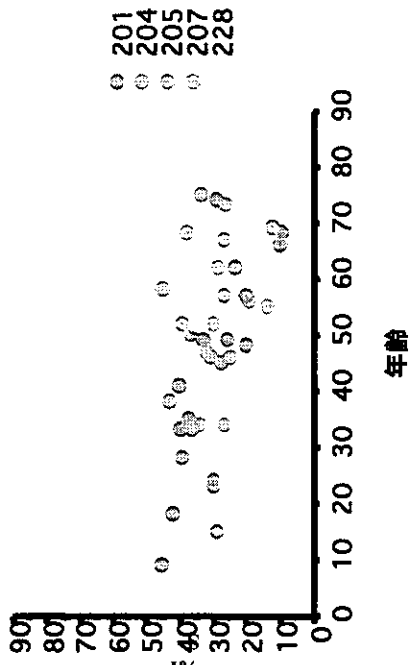
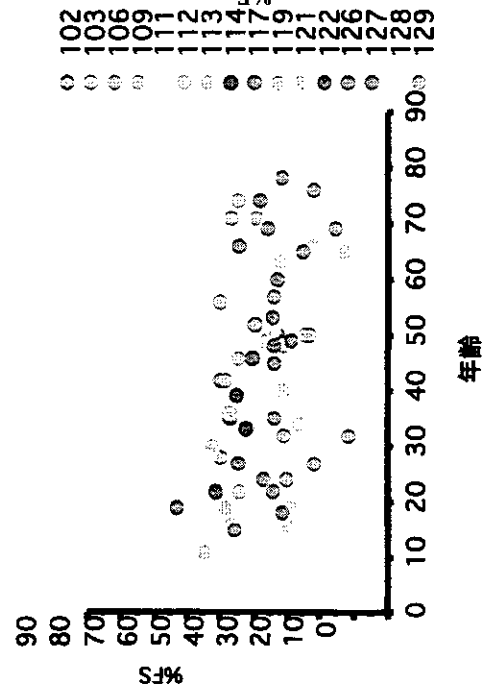
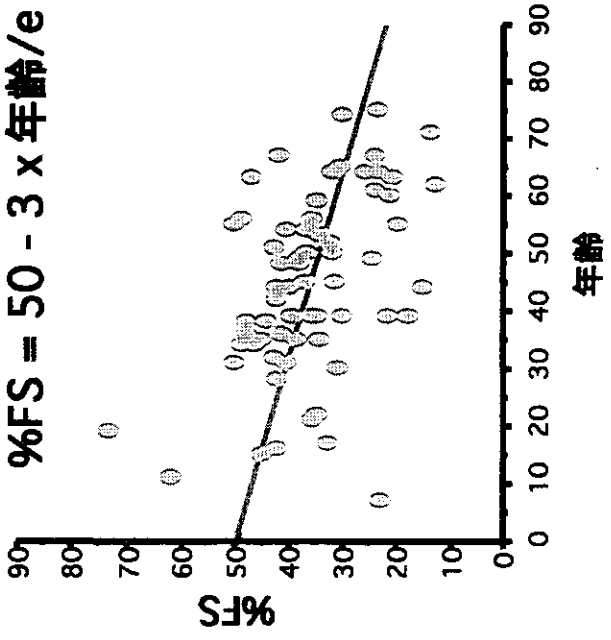
MYH7



TNNT2



MYBPC3



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

島田俊夫 島根医科大学第四内科

公受伸之 平野能文 大畑修三 島根医科大学第四内科

松森昭 京都大学大学院医学研究科循環病態学

篠山 重威 浜松労災病院

島根県出雲市塩冶町89-1 島根医科大学第四内科循環器内科
0853-20-2206

(研究要旨)

近年、C型肝炎ウイルスが心筋炎あるいは心筋症の原因の一つとなっている可能性が報告されている。本研究は慢性C型肝炎患者における心筋障害及びインターフェロンによる影響を検討するために行った。慢性C型肝炎に対するインターフェロン療法の目的に入院した33名を対象とし脂肪肝患者10名をコントロールとした。心電図、心エコー、²⁰¹Tlおよび^{123I}-BMIPP心筋シンチを施行した。SPECT画像は17領域、4段階スコア（0：正常、3：高度集積低下）で半定量評価し、その総和を重症度スコア（severity score）として比較した。副作用なくインターフェロン療法を終了した24名を、ウイルス学的に3群に分類した(sustained response:SR 9名, end-of treatment: ETR 8名, nonresponse: NR 7名)。心機能には肝炎群と脂肪肝群に有意差はなかったが、いずれの核種のseverity scoreも肝炎群で有意に高値であった。インターフェロン投与前の2核種のseverity scoreには有意な相関関係を認めた。血清BNP濃度が高値であった6例中4例にインターフェロン後に低下を認めたが心エコーの指標は変化しなかった。インターフェロン前後でseverity scoreが有意に低下したのはSR群と血清HCV-RNA低値群であった。さらに心疾患精査のため心臓カテーテル検査、心筋生検を施行し得た11例を検討した。生検組織からは明らかな心筋炎の所見は認めなかった。心筋よりHCV-RNAを検出した疾患はさまざまであった。拡張型心筋症1例において、心筋シンチの集積低下と心臓MRI上Gd造影効果の一致を認め、その有用性が示唆された。正常心機能慢性C型肝炎患者の一部に心筋シンチで検出される心筋障害が存在し、インターフェロン投与により改善する事が示唆された。

(はじめに)

C型肝炎ウイルスは輸血後肝炎の主原因として知られている(1)。C型肝炎ウイルスの最も特徴的な性質はその高頻度に見られる持続感染であり、肝硬変、肝臓癌の発生率も高い(2)。また、肝外病変としてmixed cryoglobulinemia(3)、a sicca-like syndrome(4)、membranous proliferative glomerulonephritis(5)、polymyositis(6)、myopathy(7)を合併することが報告されている。これらの肝外病変の原因は、C型肝炎ウイルスの直接作用あるいは免疫学的機序によるものが考えられている。

共同研究者の松森はC型肝炎ウイルスに感染している拡張型心筋症患者においてC型肝炎ウイルスが心筋で増殖していることをPCRを用いて証明し、心筋炎ならびに心筋症の発症における重要性を指摘した(8)。心筋炎は臨床的に無症状のものから突然死に至るものまでさまざまである。C型肝炎患者においても肝炎の兆候がなくウイルス血症が持続する症例があり(9)、何らかの心合併症を来す可能性も推測される。しかし慢性C型肝炎患者における潜在する心筋障害やインターフェロンの効果に関する検討は少ない。

心筋炎の診断において、心電図、心エコー、心筋逸脱酵素等の古典的な検査が必ずしも有効でない症例が存在する事は知られている。我々は、過去の報告においてタリウム心筋シンチグラムを用い検討した。201Tl心筋シンチグラムは冠動脈疾患の診断に有用であるばかりでなく、心筋炎(10)ならびにそれに伴う潜在する心機能障害の検出にも有用であることが報告されている(11)。一方¹²³I-β-methyl-p-iodophenyl pentadecanoic acid (BMIPP)は、心筋脂肪酸代謝をSPECTで評価する核種として近年臨床応用されており(12)、心筋症にもその有用性が期待されている。

本研究の目的は正常心機能C型肝炎ウイルスによる心筋障害とそれに及ぼすインターフェロンの効果を201Tlおよび¹²³I-BMIPP心筋SPECTと血清BNP濃度を用い検討する事である。一方心疾患の精査のために心臓カテーテル検査を受けた慢性C型肝炎患者においては、心筋HCV-RNA及びRI、MRI所見を検討する。

(対象・方法)

対象は活動性慢性C型肝炎にてインターフェロン治療を受ける目的で入院した患者33名（男性15名、女性18名、年齢 53 ± 10 歳）である。全例肝生検で肝炎の診断を行った。HCV-RNA genotypeは1B：28名、2A：13名、2B：1名であった。性、年齢のマッチした脂肪肝患者10例を対照とした（男性6名、女性4名、年齢 55 ± 13 歳）。虚血性心疾患、弁膜症等の器質的心疾患は負荷心電図、心エコーにて除外した。また糖尿病、アルコール多飲歴、薬物常習歴のある患者も除外した。

また心疾患の精査目的で心臓カテーテル検査・心筋生検を施行し得た慢性C型肝炎患者11名においては、心筋HCV-RNA及びRI、MRI所見を検討した。インターフェロンは肝臓専門医により投与された。投与期間は原則として6ヶ月間、種類は α ：11名、 $\beta \rightarrow \alpha$ ：20名、 β ：2名であった。33名中9名は副作用のためインターフェロン治療の中止を余儀なくされた。治療後のウイルスの同定にはAmplicor qualitative assayを用い、以下のようにインターフェロンの効果判定を行った。sustained response (SR)群はインターフェロン投与終了24週後も血清よりウイルスが同定されないもの、end-of-treatment response (ETR)群はインターフェロン投与終了時にはウイルスが同定されなかったがその後24週の観察期間中に再度同定されるようになったもの、nonresponse (NR)群はインターフェロン投与終了時にもウイルスが同定されているものとした。

心筋SPECTは ^{201}Tl と ^{123}I -BMIPPの2核種を用い、インターフェロン投与前、投与終了時に撮像した。撮像方法、SPECT画像の判定量的スコアリングおよびその総和である重症度スコアは既報に従った (Figure 1)。スコアリングは2名の独立した循環器専門医で行われ、異なる場合は協議の上決定した (interobserver variability ($y = 0.86x$, $r = 0.93$)、intraobserver variability ($y = 0.96x$, $r = 0.97$))。

数値データは平均値 \pm SDで表示した。インターフェロン投与前後のALT、BNPの比較にはpaired t test、2核種の重症度スコアの相関にはSpearman's rank correlation coefficient (r_s)、重症度スコアの2群間比較にはMann-Whitney non-parametric test、インターフェロン投与前後の重症度スコアの比較にはWilcoxon signed-rank test、血清HCV RNAの3群間比較にはANOVA (Fisher's least-significant difference test) を用い検討した。p < 0.05を統計的有意とした。

(結果)

対照群と慢性C型肝炎群の比較

対照群と慢性C型肝炎群の肝機能、心エコー指標、シンチ重症度スコアをTable 1に示す。血清ALT濃度は肝炎群で有意に高値であった。左室拡張末期径 (LVDd)、左室駆出率 (EF) には有意差はなかった。201Tlおよび123I-BMIPPのいずれの核種の重症度スコアも肝炎群において有意に高値であった。

慢性C型肝炎群におけるインターフェロン投与前の検討

インターフェロン投与前の201Tlおよび123I-BMIPPの重症度スコアの間には有意な相関関係が認められた (Figure 2)。血清BNP濃度は20pg/ml以上を高値とし、BNPを測定し得た肝炎群20例中8例に高値を認めた。BNP高値群と正常群の間にいずれの核種の重症度スコアも有意差を認めなかった (Figure 3)。

慢性C型肝炎群におけるインターフェロン投与前後の比較

インターフェロン投与前後でBNPを測定し得た13例中投与前に高値であったのは6例であるが、そのうち4例に投与後に低下を認めた (Figure 3)。インターフェロンの肝炎に対する効果はSR9例、ETR8例、NR7例であった。これらのグループ別にインターフェロン前後の変化を検討した (Table 2、3)。201Tlの重症度スコアはSR群においてのみ有意に低下し、123I-BMIPPの重症度スコアも同様の傾向であった。血清ALT濃度はETR群において有意に低下したが、SR群も同様の傾向であった。LVDd及びEFには有意な変化は認めなかった。投与前の血清HCV-RNA量はSR群において低い傾向を示した。血清HCV-RNA量が 5×10^5 copies/ml以上を高値とし検討した (Table 4)。HCV-RNA低値群においてのみいずれの核種の重症度スコアも有意に低下した。

症例提示 (Figure 4)

61歳女性。HCV genotypeは1B。血清HCV-RNAは450k copies/ml。インターフェロン投与を6ヶ月行った。HCV-RNAは投与開始1ヶ月後に陰性化し、SR群である。心臓カテーテル検査では心内血行動態は正常、LVEF 70%、壁運動異常無し、冠攣縮負荷試験陰性、血清BNPは91.4pg/mlからインターフェロン投与後には

23.0pg/mlに低下した。シンチ重症度スコアは²⁰¹Tlは7から2、¹²³I-BMIPPは15から2にほぼ正常化した。

心筋生検を施行し得た心疾患患者

心疾患精査のために心臓カテーテル検査を施行した慢性C型肝炎患者11例の内訳をTable 5に示す。心筋生検組織からHCV-RNA (+) 鎖のみ検出したのは6例でHCM1例、HOCM2例、VSA2例、AV block1例であった。(+) 鎖 (-) 鎖いずれも検出したのはAF1例のみであった。心筋生検組織では炎症細胞の浸潤は全例認めなかった。心臓MRIを施行した症例は3例のみであったが1例(症例3)においてガドリニウム造影効果を認め、心筋トロポニンTは0.03ng/mlと軽度高値を示した(Figure 5)。心筋シンチは、²⁰¹Tl、¹²³I-BMIPPいずれも、下壁から後壁、心尖部にかけて高度の集積低下を示し、重症度スコアは²⁰¹Tlが10、¹²³I-BMIPPが9であり、MRIでは同部の心内膜側にガドリニウム造影効果を認めた。左室心筋生検組織では、心筋細胞の肥大、径の大小不同、軽度の分岐異常、及び間質の線維化、浮腫を認めるが、炎症細胞の浸潤は認められなかった。心筋組織よりHCV-RNAは検出されなかった。

(考案)

拡張型心筋症は左室あるいは両心室の拡張及び収縮障害により特徴づけられる(13)。拡張型心筋症の成因としていくつかの因子が取り上げられている。ウイルス心筋炎は拡張型心筋症の主要因の一つと見なされている(13)。その中でもその病因ならびに予後の観点からエンテロウイルスの役割の重要性に関して多くの議論がなされてきた(14)。最近の報告では拡張型心筋症患者の心筋中のエンテロウイルスの検出率が低いことが指摘されており(15、16)、その病因としての臨床的意義は明確ではない。

松森らは血清の抗HCV抗体陽性率が虚血性心疾患より拡張型心筋症患者でより高率であったと報告している(16.7% vs. 2.5%) (8)。かれらは心筋組織中にHCV (+) 鎖及び (-) 鎖を同定することで心筋組織中のウイルスの増殖を証明し、拡張型心筋症の病因としての重要性を指摘した。さらに肥大型心筋症においても本ウイルスの重要性をも指摘している(17~19)。一方で、拡張型心筋症と虚血性心疾患患者との間

に血清HCV抗体陽性率は同等であったとの報告もあり(20、21)、HCVに伴う心筋症、心筋炎の発生率は国、地域、集団により異なる可能性も示唆している。HCV感染に伴う肝外病変としての心筋病変の存在について明らかにするためにさらなる研究が求められている。

われわれはそのために今回明らかな心機能障害を認めない、慢性C型肝炎患者における心筋の状態を²⁰¹Tl、^{123I}-BMIPP心筋シンチを用いて核医学的に検討した。

²⁰¹Tl心筋シンチは冠動脈疾患の診断、治療効果判定に臨床的に広く応用されている。一方、subclinicalな心筋炎や心筋炎による潜在する心機能障害の検出に有用であるとの報告もある(22)。中川らは小児の無症候性心筋炎の診断に有用であると報告し(23)、また、Schachneらは運動負荷試験正常の心筋炎患者での有用性について報告している(10)。これらの報告から、ウイルスに感染している無症候性患者で心電図、心機能、運動耐用能の正常である症例の中に、心筋障害が潜在している可能性がありその検出に²⁰¹Tl心筋シンチが有用であることが示唆される。²⁰¹TlはNa-K-ATPase systemにより心筋細胞に取り込まれ、血流イメージとして利用されているが、その集積低下はウイルス感染に伴う部分的な心筋細胞膜機能障害や微小血管炎によるものかもしれない(10)。

^{123I}-BMIPPは心筋の脂肪酸代謝をSPECTで評価するために開発された長鎖脂肪酸製剤である。^{123I}-BMIPPの集積は細胞膜での摂取、細胞内輸送と脂質プールへの貯蔵、ミトコンドリア機能、ATP産生能を反映すると言われており、血流のみならずさまざまな心筋障害に影響をうける可能性がある。現在、虚血性心疾患及び心筋症の病態把握、予後との関連に利用されているが(12、24~26)、心筋炎での検討は少なく、HCV感染における検討はまだ見られない。

本研究では慢性C型肝炎患者において、心電図、心エコー、心筋逸脱酵素等古典的な診断方法では異常を認めなかった。しかしながら、²⁰¹Tl及び^{123I}-BMIPPの集積は対照群より有意に低下しており、両者には有意な相関関係を認めた。またインターフェロン投与は、SR群およびETR群において、あるいは低HCV-RNA群においてその低下を改善した。BNPも一部の症例で高値を示し、インターフェロン投与により改善している。本研究では心筋組織内のHCVの存在については不明であり、血清ALT濃度、心エコー指標との関連は認めなかったが、これらの結果は一部の慢性C型患者の心筋