

厚生労働科学研究研究費補助金  
厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業  
特発性心筋症に関する調査研究班

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年 3 月

主任研究者 北 島 顕

## 目次

I. 平成14年度特発性心筋症に関する調査研究班班員名簿	7
II. 総括研究報告	11
北海道大学大学院医学研究科教授	北島 顕
III. 班員分担別研究報告	
■肥大心筋細胞におけるカベオリン-3の役割の検討	
野生型とドミナントネガティブ・カベオリン-3が心筋細胞肥大にどう影響するかの検討	17
久留米大学医学部第三内科教授	今泉 勉
■自己免疫性心筋炎における $\beta 2$ 受容体シグナルの役割	23
北里大学内科学II 教授	和泉 徹
大学院生	西井 基継
講師	猪又 孝元
■異種間リンパ球移植による心病変の検討	29
慶應義塾大学医学部内科学呼吸循環教授	小川 聡
■心不全の重症化機構 遺伝子治療結果を参考にして	31
東京大学医学部器官病態内科・保健センター教授	豊岡 照彦
■心肥大シグナルにおけるHB-EGFの役割	34
大阪大学大学院医学研究科病態情報内科学教授	堀 正二
■拡張型心筋症に対する遺伝子治療の検討	35
山口大学医学部循環病態内科学教授	松崎 益徳
■ウイルス性心筋炎によるうっ血性心不全モデルマウスにおける急性期の左室圧容積関係に関する検討	37
京都大学大学院医学研究科循環病態学助教授	松森 昭
■骨格筋芽細胞移植による肥大心から不全心への移行の防止作用	39
神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学教授	横山 光宏
■自家骨髄細胞移植またはコロニー刺激因子による心不全治療に関する研究	42
岐阜大学再生応用（循環器内科学）教授	藤原 久義
■G-CSFは心筋症ハムスターにおける心筋の線維化と心不全を抑制し、生存率を改善する	45
岐阜大学再生応用（循環器内科学）	
川瀬 幸典, 竹村 元三, 李 一文, 岡田 英志	
弓削健太郎, 早川 健司, 香田 雅彦, 丸山 留美	
湊口 信也, 藤原 久義	
京都女子大学家政学部	
藤原 兌子	
東京大学医学部器官病態内科	
豊岡 照彦	

■実験的心筋症モデルにおける自家骨髄細胞移植治療の有効性の検討 .....	50
岐阜大学医学部医学研究科再生応用（循環器内科学）	
荒井 正純, 呂 伝江, 操 裕, 陳 学海	
王 寧元, 永井 洋史, 宇野 嘉弘, 川瀬 幸典	
香田 雅彦, 竹村 元三, 湊口 信也, 藤原 久義	
京都女子大学家政学部食物栄養学科	
藤原 兌子	
■炎症性サイトカインと心不全 .....	54
九州大学大学院医学研究院循環器内科学 教授 竹下 彰	
助手 久保田 徹	
■移植後動脈硬化における新生内膜細胞の起源と薬物療法に関する検討 .....	57
東京大学大学院医学系研究科循環器内科 佐田 政隆	
永井 良三	
■伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症の遺伝子異常と病理所見 .....	63
鹿児島大学第一内科主任教授 鄭 忠和	
■温熱療法は心不全に合併する不整脈を改善する .....	68
鹿児島大学医学部内科学第一講座	
木原 貴士, 福留 剛, 新里 拓郎	
増田 彰則, 枇榔 貞利, 鄭 忠和	
■拡張型心筋症における $\beta$ ブロッカー療法の局所左室機能への効果：strain rate imaging techniqueを用いた検討 .....	73
大阪市立大学大学院循環器病態内科学教授 吉川 純一	
■心臓におけるエンドセリン遺伝子の発現調節の研究 .....	74
筑波大学臨床医学系循環器内科教授	
山口 巖	
研究協力者	
宮内 卓, 酒井 俊, 入鹿山容子, 小形 岳寛	
高梨 正勝, 河野 了, 飯田 啓治, 後藤 勝年	
■高血圧性心不全における ACE 阻害薬と抗アルドステロン薬の併用効果の検討 .....	78
筑波大学臨床医学系循環器内科教授	
山口 巖	
研究協力者	
西 功, 河野 了, 美崎 昌子	
増見 智子, 飯田 啓治, 渡辺 重行	
■心臓サルコイドーシスの診断・治療・予後に関する現状と問題点 .....	83
大阪医科大学第三内科教授 北浦 泰	

■ 拡張型心筋症患者心筋からのエンテロウイルスゲノム全長の検索 .....	86
大阪医科大学第三内科 葉山ハートセンター*	
Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center**	
浮村 聡, 藤岡 重和, 寺崎 文生 出口 寛文, 北浦 泰 磯村 正*, 須磨 久善* Kyung-Soo Kim**, Steve Tracy**	
■ 拡張型心筋症における T 細胞異常 .....	90
東京女子医科大学循環器内科助教授 川名 正敏	
■ 拡張型心筋症および肥大型心筋症における Z 帯構成要素の構造変異と機能異常 .....	92
東京医科歯科大学難治疾患研究所教授 木村 彰方	
■ 高感度心筋トロポニン T による慢性血液透析患者の心筋障スクリーニングと C 型肝炎ウイルス感染と心・血管障害の関連について .....	95
島根医科大学循環器疾患治療部副部長 島田 俊夫	
■ ミトコンドリアゲノム多型の機能的多様性がエネルギー代謝に及ぼす影響 .....	99
財団法人岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部長 田中 雅嗣	
■ タコツボ型心筋障害における tenascin-C 発現 .....	101
順天堂大学医学部循環器内科助教授 河合 祥雄	
■ タコツボ心筋障害 (タコツボ心筋症) の診断の手引き案作成 .....	102
順天堂大学医学部循環器内科助教授 河合 祥雄	
■ テネイシン C を利用した心筋疾患の病態診断 .....	104
国立国際医療センター腎臓循環器科部長 廣江 道昭 三重大学医学部病理 今中一吉田 恭子, 吉田 利通 国立国際医療センター 矢崎 義雄	
■ 内因性幹細胞を用いた不全心への新しい治療方法の効果 .....	107
国立循環器病センター臨床検査部部長 由谷 親夫 (研究協力者 福原 慎也, 富田 伸司, 中谷 武嗣)	
■ 拡張型心筋症に対する $\beta$ 遮断薬による心機能改善の機序の検討 .....	109
国立循環器病センター副院長 宮武 邦夫	
■ DNA アレイと SNPs 解析による慢性心不全の病態解明 .....	110
国立循環器病センター生理機能検査部長 北風 政史	
■ 転写因子 ATF3 による心筋保護療法の開発に向けての研究 .....	111
東京医科歯科大学大学院循環制御学教授 磯部 光章	

■不全心筋に対する移植心筋組織構築のための新規組織工学的手法に関する研究 .....	114
東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長・教授	岡野 光夫
■骨髄成体幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発 .....	116
慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師	福田 恵一
■骨格筋由来細胞による拡張型心筋症に対する細胞移植治療－基礎的検討 .....	118
千葉大学循環病態医科学教授	小室 一成
■心筋症ハムスターの不全心筋における $\beta$ 受容体シグナル伝達系の変化 .....	120
東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部助教授	武田 信彬
■In vivo 肥大心筋におけるインテグリン $\beta$ 1発現の変化 .....	122
北海道大学大学院医学研究科教授	北畠 顕
■拡張型心筋症患者におけるSNPsによる $\beta$ 遮断薬レスポンス解析 .....	124
北海道大学大学院医学研究科教授	北畠 顕
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	127

I 平成14年度特発性心筋症に関する調査研究班  
班員名簿

特発性心筋症に関する調査研究班

氏名	所属	職名	
主任研究者	北島 顕	北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学	教授
分担研究者	今泉 勉	久留米大学医学部第三内科	教授
	和泉 徹	北里大学医学部内科学（Ⅱ）	教授
	小川 聡	慶應義塾大学医学部内科学呼吸循環	教授
	豊岡照彦	東京大学医学部器官病態内科・保健センター	教授
	堀 正二	大阪大学大学院医学研究科病態情報内科学	教授
	松崎益徳	山口大学医学部循環病態内科学	教授
	松森 昭	京都大学大学院医学研究科循環病態学	助教授
	横山光宏	神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学	教授
	藤原久義	岐阜大学再生応用(循環器内科学)	教授
	竹下 彰	九州大学大学院医学研究院循環器内科学	教授
	永井良三	東京大学大学院医学系研究科循環器内科	教授
	鄭 忠和	鹿児島大学医学部内科学第一講座	教授
	友池仁暢	国立循環器病センター病院	病院長
	吉川純一	大阪市立大学大学院循環器病態内科学	教授
	山口 巖	筑波大学臨床医学系循環器内科	教授
研究協力者	北浦 泰	大阪医科大学第三内科	教授
	川名正敏	東京女子医科大学循環器内科	助教授
	木村彰方	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授
	島田俊夫	島根医科大学循環器疾患治療部	副部長
	田中雅嗣	岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部	部長
	河合祥雄	順天堂大学医学部循環器内科	助教授
	廣江道昭	国立国際医療センター腎臓循環器科	部長
	由谷親夫	国立循環器病センター臨床検査部	部長
	宮武邦夫	国立循環器病センター	副院長
	北風政史	国立循環器病センター生理機能検査部	部長
	磯部光章	東京医科歯科大学大学院循環制御学	教授
	岡野光夫	東京女子医科大学先端生命医学研究所	所長・教授
	福田恵一	慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学	講師
	小室一成	千葉大学循環病態医科学	教授
	武田信彬	東京慈恵会医科大学附属青戸病院総合診療部	助教授
事務局	岡本 洋	北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学	講師

## Ⅱ 総括研究報告



## 特発性心筋症に関する調査研究班

主任研究者 北畠 顕

北海道大学大学院医学研究科 教授

### 平成 14 年度の総括

1974 年以来、本厚生労働省特定疾患特発性心筋症に関する調査研究班を中心として疫学・病因・病態・診断・治療について基礎的、臨床的検討が継続され、この領域での進歩・発展には極めて目覚ましいものがある。この間、班長の重責を務められた河合忠一、戸嶋裕徳、安田寿一、矢崎義雄、篠山重威各先生の主導的力量と成果には改めて敬服せざるを得ない。その後、細胞工学、遺伝子工学などのバイオテクノロジーやマイクロコンピューターにより制御された画像診断技術の進歩、ACE 阻害薬や $\beta$ 遮断薬をはじめとする薬物治療法の有効性が確認され、また、外科手術の進歩や心臓移植の再開により、病因・病態・診断・治療が大きく変貌しつつある。本研究班の特色・独創性は、第一に、本報告書から窺い知れるように、従来からの細胞工学、遺伝子工学による病因的解析や診断に加え、免疫学的、遺伝子解析手法を加え、さらに、治療面で、心筋再生医療の基礎的・臨床的検討を行うことにより研究面での幅を深めようとした。そのため、班員構成からも容易に理解できるように、本分野でのわが国の代表的研究者に班員となっていた。

心筋症の診断基準については、1980 年の WHO/ISFC 合同心筋症定義分類委員会の勧告を受け、1986 年本厚生省特定疾患調査研究班において「特発性心筋症診断の手引き」として作成された。しかし、診断や治療法に多くの進捗が見られ、1995 年 WHO/ISFC 合同委員会でも改訂が行われた。その後も、本研究班では、難病医学研究財団と共同で、Website の充実を図り、かつ、各都道府県での調査票の充実を介し、特発性心筋症の診断と治療について、ガイドラインを提供して来た。本研究班では、これらガイドラインを統合し、新たな診療マニュアルの作成を行うことを第 2 の目標としている。また、1998 年から本研究班と疫学研究班とが共同で行っている全国疫学調査に基づいたコホート研究を継続することにより、今後生命予後の現状などを含めた疫学的検討を進めることが第 3 の目標である。基礎・臨床・応用研究を進めることは、病態解明のみならず、新たな治療法開発の上でも、意義深く、社会へ還元するところが大きであると期待される。

### III 班員分擔別研究報告

# 肥大心筋細胞におけるカベオリン-3の役割の検討

## —野生型とドミナントネガティブ・カベオリン-3が心筋細胞肥大にどう影響するかの検討—

今泉 勉

久留米大学医学部第三内科

### 研究要旨

**【目的】**細胞膜表面の $\Omega$ 型オルガネラであるカベオラは、細胞内シグナリングのコントロールセンターである。カベオリン-3は心筋細胞のカベオラ構築に必要不可欠な蛋白であり、多様な機能を担うと推測されている。我々は、今までに肥大心筋細胞でカベオリン-3発現が亢進していることを報告したが、その発現亢進の意義は未だ不明である。そこで今回は、野生型カベオリン-3とドミナントネガティブ・カベオリン-3の過剰発現がGq依存性アゴニストによる心筋細胞肥大に与える影響について検討した。**【方法】**野生型カベオリン-3 (Ad.Cav-3)、変異カベオリン-3 (Ad.Cav-3 $\Delta$ ) および $\beta$ ガラクトシダーゼ(Ad.LacZ)をそれぞれ発現するアデノウイルスを構築した。この変異カベオリン-3は、ヒト肢帯型筋ジストロフィーの原因となると共にドミナントネガティブ変異として機能することが示されている。これらのウイルスをラット新生児培養心筋細胞に感染させ、フェニレフリン (PE) およびエンドセリン-1 (ET) に対する肥大反応に与える影響を検討した。**【結果】**非感染細胞においてPEとETは心筋細胞サイズを増大させ、 $^3\text{H}$ ロイシン取り込みを促進すると共に $\beta$ ミオシン重鎖の再発現とサルコメア再構築を起こした。Ad.LacZはこれらの肥大反応に影響を与えなかったが、Ad.Cav-3はアゴニスト誘導性の細胞サイズ増大、ロイシン取り込み率促進、 $\beta$ ミオシン重鎖の再発現、サルコメア再構築のすべての指標を抑制した。Ad.Cav-3はETによるERK1/2のリン酸化も抑制したが、JNKやp38 MAPキナーゼの活性には影響を与えなかった。Ad.Cav-3 $\Delta$ は、Ad.Cav-3とは対照的にETに対する肥大反応を増強した。さらに、Ad.Cav-3 $\Delta$ はET誘導性のERKのリン酸化を促進したが、JNKやp38 MAPキナーゼに関しては影響を与えなかった。**【総括】**これらの結果から、カベオリン-3はERKの抑制を介して肥大反応に対して抑制的に働くことが示唆された。今後、ヒト心筋でのカベオリン-3の役割を検討する予定である。

### 研究目的

細胞膜表面の $\Omega$ 型オルガネラであるカベオラは、細胞シグナリングのコントロールセンターである。カベオリン-3は心筋細胞のカベオラ構築に必要不可欠な蛋白であり、多様な機能を担うと推測されている。我々は、今までに肥大心筋細胞でカベオリン-3発現が亢進していることを報告したが、その発現亢進は心筋細胞肥大の原因か、結果か、あるいは単に付随する現象であるのかは未解決であった。そこで今回は、カベオリン-3の肥大心筋における役割を解明するために、野生型カベオリン-3とドミナントネガティブ・カベオリン-3の発現がGq依存性アゴニスト（フェニレフリン；PE、エンドセリン-1；ET）による心筋細胞肥大に与える影響について検討した。

### 研究方法（倫理面への配慮）

野生型カベオリン-3 (Ad.Cav-3)、変異カベオリン-3 (Ad.Cav-3 $\Delta$ ) および $\beta$ ガラクトシダーゼ (Ad.LacZ) をそれぞれ発現するアデノウイルスを構築した。この変異カベオリン-3は、足場ドメインにおいてスレオニン、フェニルアラニン、スレオニンの3つアミノ酸をコードする9つの核酸を欠如しており、ヒトの肢帯型筋ジストロフィーの原因となると共にドミナントネガティブ変異として機能することが示されている。これらのウイルスをラット新生児培養心筋細胞に感染させ、PEおよびETに対する肥大反応に与える影響を検討した。心筋細胞肥大は、 $^3\text{H}$ ロイシン取り込みと細胞表面積により計測した。動物実験は当大学の倫理基準に従った。

## 研究結果

### 組換えアデノウイルス構築と細胞生存率

今回構築した3つの組換えアデノウイルスに感染させた細胞の生存率をMTS assayで測定したところ、それぞれのウイルス感染と感染なしで有意な差はなく、ウイルス感染は細胞生存率に影響を与えないことがわかった。これらのウイルスによる組換え蛋白発現は、抗カベオリン-3抗体でウェスタン・ブロッティングにより検討した。心筋細胞と内因性カベオリン-3の発現がほとんどみられないCOS細胞との両者においてウイルスによる量、時間依存性の組換えカベオリン-3発現が確認できた。

### 野生型カベオリン-3過剰発現が、アゴニストに対する心筋細胞の肥大反応に与える影響の検討

今回の検討では、肥大刺激としてフェニレフリン(PE,  $\alpha_1$ アドレナリン刺激薬)とエンドセリン-1(ET)を用いた。これらのアゴニストは三量体G蛋白にカップリングした特異的レセプターに結合し、主としてGqを活性化する。Gqの活性化は心筋細胞肥大の進展に必要かつ充分であることが示されている。非感染細胞へETまたはPEを添加すると細胞表面積およびロイシン取り込みは有意に増大した。Ad.LacZの感染はこれらに影響を与えず、Ad.Cav-3は有意にPEおよびETによる細胞表面積およびロイシン取り込みを抑制した(図1A)。次にカベオリン-3の発現が病的肥大のマーカーであるサルコメア再構築と $\beta$ ミオシン重鎖( $\beta$ MHC)の再発現に与える影響を検討した。非感染細胞において、両アゴニストはPhalloidin-FITCで染色されるアクチン線維を直線状に太く変化させ、サルコメアの再構築がみられた。さらにウェスタン・ブロッティングにより $\beta$ MHCの再発現が確認された。Ad.LacZはこれらのアゴニストによる変化に影響を与えなかったが、Ad.Cav-3はサルコメア再構築、 $\beta$ MHC再発現とも有意に抑制した。

### 野生型カベオリン-3の細胞内局在の検討

次に野生型カベオリン-3の細胞内局在を検討した。非感染細胞に免疫染色を行うと、内因性カベオリン-3蛋白は細胞膜と細胞質に点状に認められた。野生型組換えカベオリン-3の細胞内局在は内因性のものと変わらず、PEやET刺激は内因性、外来性カベオリン-3とも細胞内局在を変化させなかった。

### 野生型カベオリン-3過剰発現がアゴニストによるMAPキナーゼ系活性化に与える影響の検討

次にGqから肥大に至る系で主要な働きをしてい

るMAPキナーゼ系に野生型カベオリン-3の過剰発現が与える影響を検討した。PEとETは既報の如くERK1/2とJNKのリン酸化を引き起こしたが、p38 MAPキナーゼは以前の報告とは異なりリン酸化されなかった。アゴニストによるERK1/2のリン酸化はAd.Cav-3の感染により有意に抑制されたが、JNKのリン酸化は影響を受けなかった(図1B)。従ってカベオリン-3の肥大抑制はERK1/2のリン酸化抑制を介することが示唆された。**ドミナントネガティブ・カベオリン-3が肥大反応に与える影響の検討**

ドミナントネガティブ・カベオリン-3の過剰発現がETに対する心筋細胞の肥大反応に与える影響を検討した。Ad.Cav-3 $\Delta$ は、野生型カベオリン-3の過剰発現とは反対にETによる細胞表面積(図2A)と $[^3\text{H}]$ ロイシン取り込み(図2B)を増強し、病的肥大のマーカーである $\beta$ MHCのETによる再発現を有意に亢進させた(図3A)。またAd.Cav-3がETによるサルコメア再構築を減弱したのに対し、Ad.Cav-3 $\Delta$ はこの変化にはっきりした影響を与えなかった(図3B)。Ad.Cav-3 $\Delta$ の肥大増強効果はERKのリン酸化の増強を伴っており(図4)、JNKやp38 MAP kinaseのリン酸化には影響を与えなかった。

## 考察

我々は以前 $\alpha_1$ アドレナリン刺激による肥大心筋細胞でカベオリン-3発現が増大することを報告した。しかしながら、カベオリン-3発現の増大は肥大の結果か、原因であるのか、あるいは単に不随する現象であるのかは不明であった。本研究では、心筋細胞にカベオリン-3を過剰発現させGq依存性アゴニストによる肥大反応に与える影響を検討した。その結果、野生型カベオリン-3は肥大反応を抑制し、ドミナントネガティブ・カベオリン-3は肥大反応を増強することが明らかとなった。これは、カベオリン-3が内因性の肥大抑制物質として機能することを示唆する。今回の検討では、肥大形成は細胞表面積とロイシン取り込みの2つ方法で評価し、病的肥大のマーカーとしては $\beta$ MHC発現とサルコメア再構築を検討した。Ad.Cav-3はこれらすべての変化を抑制し、肥大の抑制とともに肥大に伴う心筋細胞の質的变化も抑制すると考えられた。

Gq刺激から肥大に至る系では、MAPキナーゼが主要な役割を果たすと考えられているため、その活性を測定したところカベオリン-3の肥大抑制作用はERKの抑制を介することが示された。カベオラ

およびカベオリンと ERK の関連については以下の如く、いくつかの報告がある。まず、ERK の少なくとも一部はカベオラに局在しており、その活性はカベオリンの足場ドメインにより制御されることや、老化した細胞や臓器では、カベオリン発現の亢進と共に EGF による ERK の活性化が抑制されていることが示されており、カベオリンは ERK シグナルを制御すると推測されている。またカベオラ機能を阻害すると ERK の過剰な活性化がみられることも報告されている。これらはすべてカベオラおよびカベオリンと ERK との密接な関係を示し、我々の結果を支持するものと考えられる。

カベオリン-3 の過剰発現マウスは、Duchenne 型筋ジストロフィー様の骨格筋病変を有すことから、Ad.Cav-3 感染によるリコンビナント蛋白が細胞内蛋白構成の異常を引き起こし肥大抑制を来した可能性も考え得る。しかし、Ad.Cav-3 は JNK のリン酸化には影響を与えないことや、ドミナントネガティブ・カベオリン-3 の過剰発現では肥大反応を増強したことは、カベオリン-3 発現による肥大抑制作用は特異的現象であることが示唆される。

変異カベオリン-3 が肥大反応を増強する機序については、今回の結果のみからでは明確な結論は出せない。しかしながら、この変異カベオリン-3 は内因性の野生型カベオリン-3 の細胞内小器官への異常な蓄積を引き起こすことにより最終的に変性、分解させることが報告されていることから、本検討においても外因性の変異カベオリン-3 により内因性カベオリン-3 の分解が起これ、野生型カベオリン-3 による ERK の抑制作用が減弱することにより肥大反応を増強したことが推測される。

また、なぜ JNK のリン酸化が Ad.Cav-3 や Ad.Cav-3 $\Delta$  により影響を受けなかったかについては、以下のように推測できる。カベオリンと相互作用を有す蛋白の大部分は、カベオリン結合ドメインとよばれる部位を介してカベオリンと結合することが示されている（ $\phi$ X $\phi$ XXXX $\phi$ あるいは $\phi$ XXXX $\phi$ XX $\phi$ 。 $\phi$ は芳香族アミノ酸であるトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンのいずれかで、X は任意のアミノ酸）。我々は、現在クローニングされているすべての JNK（ラット、ヒト、マウス JNK 1-3）についてカベオリン結合ドメインの有無を調べてみたが、すべて欠如していた。この事実は、今回の検討で JNK が影響を受けなかった理由である可能性がある。

最後に細胞内カルシウムとカルシニューリンは肥大シグナルの共通経路である可能性が指摘されており、細胞内カルシウムの制御に関連する物質の多くがカベオラに局在することから、カベオリン-3 の肥大抑制作用のもう一つの機序は細胞内カルシウム依存性シグナルの抑制である可能性がある。しかしながら、この問題は今回の検討からは不明であり、今後の検討課題である。

## 結論

カベオリン-3 の過剰発現は Gq 依存性アゴニストによる ERK のリン酸化と共に肥大反応を抑制し、ドミナントネガティブ・カベオリン-3 の発現では反対に肥大反応を増強した。これらの結果から、カベオリン-3 は ERK の抑制を介して肥大反応に対して抑制的に働くと推測された。今後、ヒト心筋でのカベオリン-3 の役割を検討する予定である。

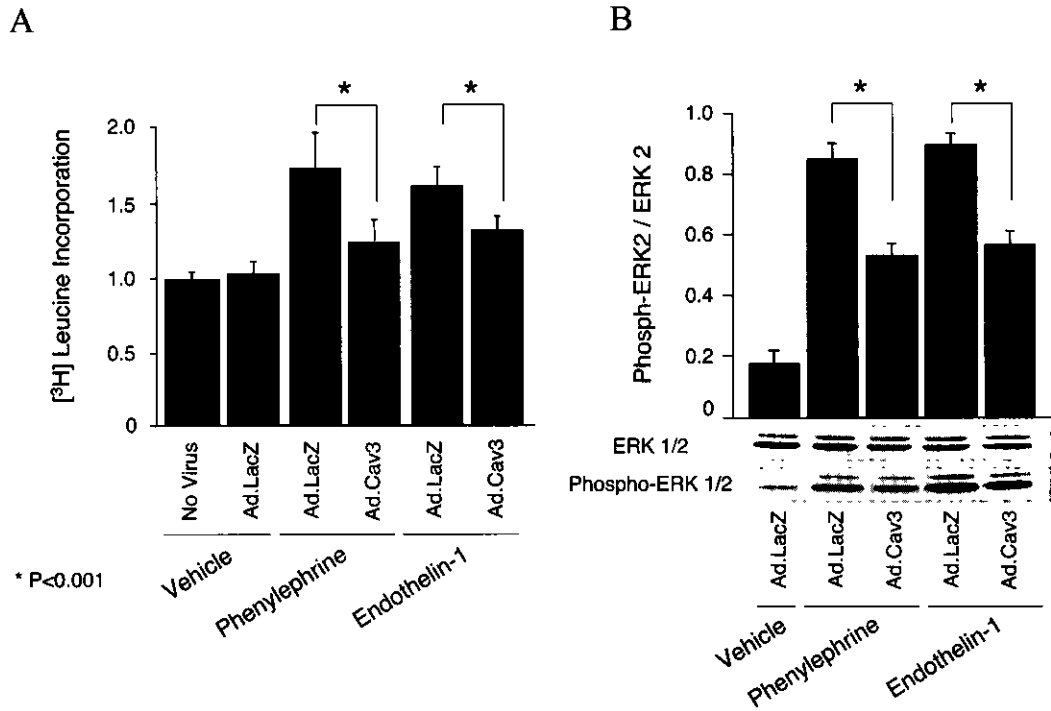


図1 野生型カベオリン-3発現がGq依存性アゴニストによる心筋細胞肥大とERKリン酸化に与える影響  
 図1A [3H]ロイシン取り込み  
 図1B ERK 1/2リン酸化

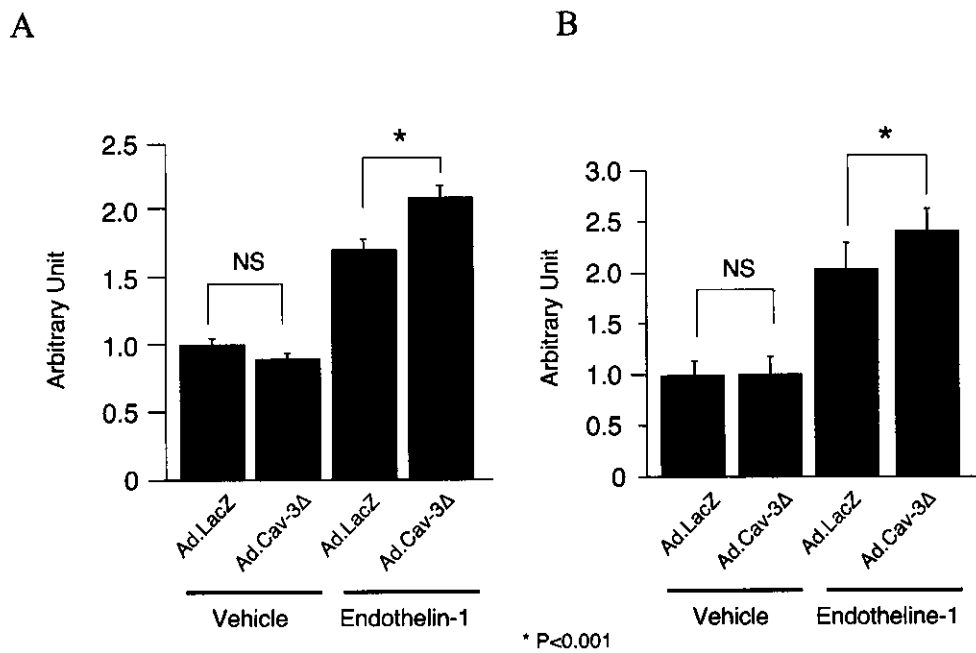


図2 ドミナントネガティブ・カベオリン-3発現がエンドセリン-1による心筋細胞肥大とERKリン酸化に与える影響  
 図2A 細胞表面積  
 図2B [3H]ロイシン取り込み

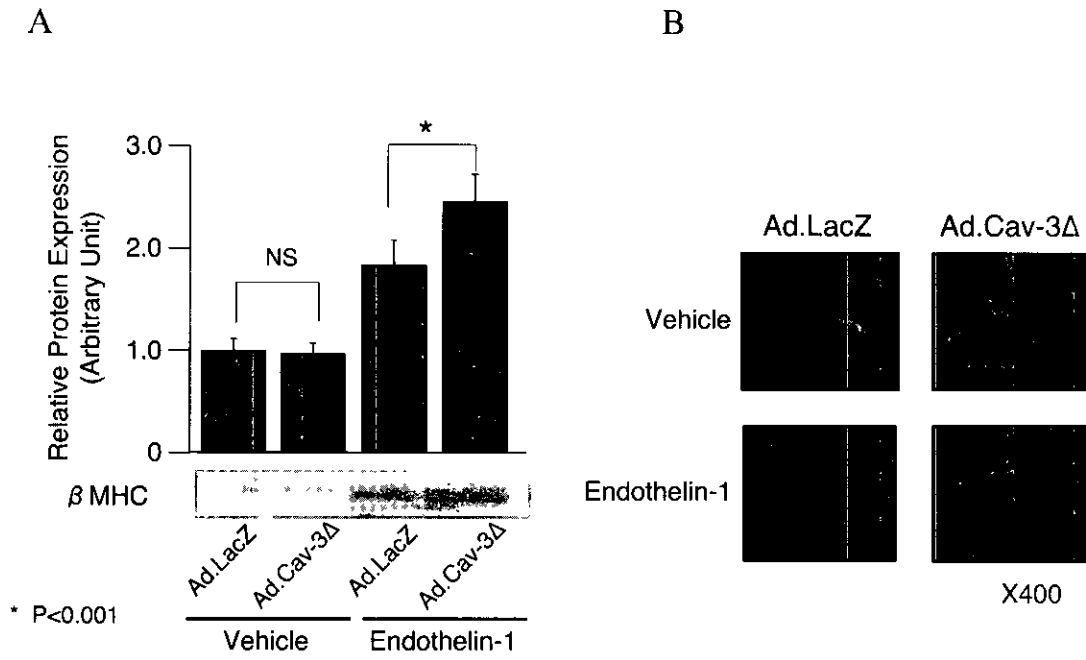


図3 ドミナントネガティブ・カベオリン-3発現がエンドセリン-1によるβMHC再発現とサルコメア再構築に与える影響  
 図3A βMHC  
 図3B 心筋細胞のPhalloidin染色

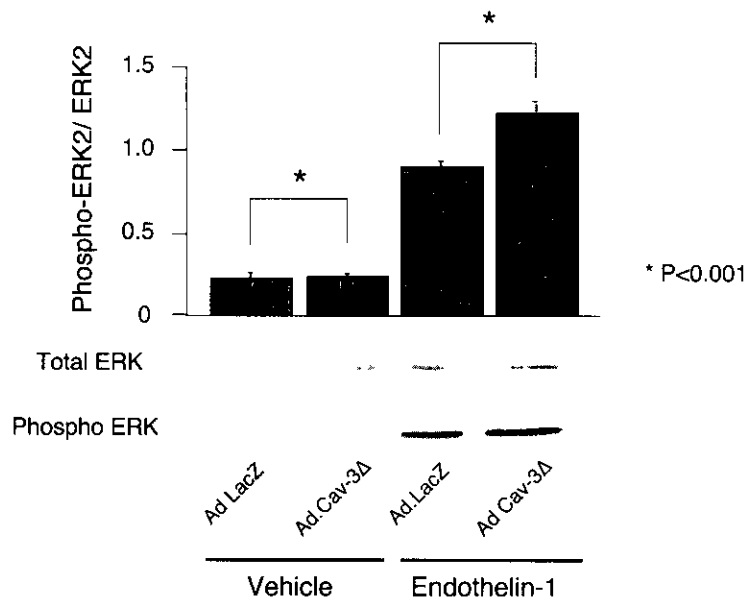


図4 ドミナントネガティブ・カベオリン-3発現がエンドセリン-1によるERKリン酸化に与える影響

## 研究発表

### 論文発表

1. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T : Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ / vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39 : 46-50,2002
2. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Niiyama H, Tahara N, Nagata T, Imaizumi T : Coexistence of hypercholesterolemia and hypertension impairs adventitial vascularization. *Hypertension* 39 : 455-459,2002
3. Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Sugaya T, Shimada T, Shintani S, Imaizumi T : Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest.*109 : 603-611,2002
4. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T : Transforming growth factor- $\beta$  function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*106 : 130-135,2002
5. Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T : Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine : Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* (in press)
6. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Niiyama H, Tahara N, Kusaba K, Takemiya K, Jalalidin A, Koga M, Nagata T, Shibata R, Imaizumi T : Roles of intercellular adhesion molecule-1 in hypertensive cardiac remodeling. *Hypertension* (in press)
7. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T : TG F- $\beta$  function blocking already effective as therapeutic strategy : Reply. *Circulation* 2003 ; 107 (in press)
8. 長田克則, 今泉 勉 : 心臓移植. 循環器疾患最新の治療 2002-2003, 篠山重威, 矢崎義雄編, 南江堂, 東京 : 294-297, 2002
9. 松本 朗, 今泉 勉 : 難治性心不全の内科治療. 入退院を繰り返す慢性心不全の臨床, 和泉徹, 麻野井英次, 小玉 誠編, 医学書院, 東京 : 79-88, 2002
10. 岡 直樹, 相賀 素, 今泉 勉 : 心筋症における excitation-contraction coupling の変化. *Annual Review 循環器* 2003, 杉下靖郎, 門間和夫, 矢崎義男, 高本眞一編, 中外医学社, 東京 : 72-76, 2003

### 学会発表

1. The American Heart Association, The 75th Scientific Sessions, Chicago, USA, November 17-20, 2002  
Koga A, Oka N, Miyazaki H, Aiga M, Kikuchi T, Kato S, Imaizumi T : Overexpression of dominant negative caveolin-3 alters hypertrophic responses to endothelin-1 in rat cardiomyocytes.
2. The American Heart Association, Scientific Conference on Advances in the Molecular and Cellular Mechanisms of Heart Failure, Snowbird, USA, August 21-25, 2002  
Miyazaki H, Oka N, Aiga M, Koga A, Kikuchi T, Imaizumi T : Gene expression profiling in pressure or volume overload myocardial hypertrophy in rats - study with DNA chip.
3. The 56th Fall Conference of the HBPR Council, Orlando, USA, September 25-28, 2002  
Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Niiyama H, Tahara N, Nagata T, Shibata R, Takemiya K, Imaizumi T : Initial role of the ICAM-1- and MCP-1-mediated macrophage infiltration in cardiac remodeling in hypertensive rats.



# 自己免疫性心筋炎における $\beta 2$ 受容体シグナルの役割

和泉 徹, 西井 基継, 猪又 孝元

北里大学内科学 II

## 研究要旨

$\beta 1$  および  $\beta 2$  受容体刺激作用を有する人工カテコラミン薬は、急性心筋炎に伴うポンプ失調に対する効果的汎用薬として広く知られている。一方、急性心筋炎において心筋細胞障害の中心的な役割を果たしている T リンパ球には、細胞膜上に  $\beta 2$  受容体が存在している。この受容体ならびにシグナル伝達を通じて心筋炎における様々の免疫応答が制御されていると考えられる。しかしながら、同受容体を介したシグナル伝達が心筋炎にどう反映されているかは今日においてもよく理解されていないのが実情である。また、ヒトでの詳細な機序解明は未だ残されているものの、実験動物モデルを用いた検索においては、ウイルス感染に引き続いて自己免疫応答が惹起されることが知られている。ヒト急性心筋炎においても、先行する感冒様症状と主症状である心症状の出現の間には、7~10 日程度の時間的間隔が存在する。つまり、心症状出現時における急性心筋炎は、感染因子の直接的な作用であるよりはむしろ免疫応答の反映であると言える。そこで、実験的自己免疫性心筋炎モデルを使って、カテコラミンによる  $\beta$  受容体シグナル伝達の自己免疫応答に対する効果を明らかにしようと以下の研究を企画した。

$\beta 2$  受容体遮断作用を有する Carvedilol, および同作用を有さない Metoprolol, さらに  $\beta 2$  受容体選択的的刺激薬である Formoterol の自己免疫性心筋炎に対する効果を *in vivo*, 並びに *in vitro* で検索した。その結果、急性心ポンプ失調に対する汎用薬 人工カテコラミン薬が有する  $\beta 2$  受容体刺激は、心筋炎惹起性 T 細胞上の  $\beta 2$  受容体-cAMP 情報伝達経路を通じて自己免疫性心筋炎を抑制することが示された。さらに、慢性心不全の追加療法として注目を集めている Carvedilol は、部分的  $\beta 2$  受容体遮断作用を介して自己免疫性心筋炎を増悪させた。

## 研究目的

急性心筋炎および拡張型心筋症に存在するであろう自己免疫応答に対する  $\beta$  受容体シグナル伝達の役割を実験的に明らかにする。

## 研究方法（倫理面への配慮）

既報のごとく、5 週齢 メス ルイスラットに、ブタ心筋ミオシンを感作することにより自己免疫性心筋炎を作成した。

検討 1:  $\beta$  遮断薬による修飾効果 心筋ミオシン感作前より、慢性心不全の追加治療薬として定評のある Metoprolol (MT) 10mg/kg と Carvedilol (CA) 20mg/kg, それにコントロールとして生理食塩水を連日腹腔内投与した。免疫 21 日目に屠殺し、肉眼的並びに組織学的に検討した。

検討 2:  $\beta 2$  刺激薬による修飾効果 MT と CA の薬理学的差異を考慮し、T 細胞上の  $\beta 2$  受容体に注目した。 $\beta 2$  受容体選択的的刺激薬である Formoterol (FM) 22.5  $\mu$ g/kg, およびコントロールとしての生理食塩水を、検討 1 と同様に、連日腹

腔内投与した。その後、病理学的検討、および心筋組織におけるサイトカイン値を測定した。さらに、 $\beta 1$  選択的的刺激薬 (Denopamine) や  $\beta 2$  選択的的刺激薬 (Formoterol) の心筋炎惹起性 T 細胞増殖能、および炎症性サイトカイン産生能、並びに受容体シグナル伝達が T 細胞内 cAMP に与える効果をサイミジン ( $^3$ H)・ELISA 法にて検討した。

尚、本研究の全ての過程において、ラットはジェチルエ-テルによる全身麻酔を施行した上で薬物投与や心筋ミオシン感作、あるいは屠殺を行った。

## 研究結果

検討 1 心筋炎重症度スコア ( $3.7 \pm 0.3$  vs  $2.7 \pm 0.3$ ,  $p < 0.01$ ) および細胞浸潤面積比率 ( $85 \pm 10$  vs  $65 \pm 22$  %,  $p < 0.05$ ) は、対照群に比し有意に CA 群において増悪していた。これに対し、MT 群と対照群では有意差が認められなかった (表 1)。さらに、心筋組織の壊死像の程度も、同様の結果であった (図 1)。また、心筋炎惹起性 T 細胞増殖能についても同様の傾向が認められた (図 6-A)。

検討 2 心筋炎の肉眼的重症度スコア ( $3.0 \pm 0.3$

vs  $1.7 \pm 0.3$ ,  $p < 0.01$ ; 表 2), および細胞浸潤面積比率 ( $74 \pm 8$  vs  $48 \pm 11$  %,  $p < 0.001$ ; 表 2) は FM 群で有意に抑制された。さらに, 心筋組織の壊死像も, 同様の結果であった (図 2)。心筋組織レベルのサイトカイン値も FM 群で有意に低値を示した (IL-12:  $1688 \pm 1071$  vs  $316 \pm 296$  pg/g, IFN  $\gamma$ :  $859 \pm 115$  vs  $579 \pm 144$  pg/g, TNF  $\alpha$ :  $2015 \pm 1243$  vs  $1110 \pm 634$  pg/g, IL-10:  $3777 \pm 1599$  vs  $1670 \pm 1550$  pg/g, IL-12/IL-10 比:  $1.19 \pm 0.58$  vs  $0.66 \pm 0.18$ ,  $p < 0.05$ ; 図 3)。一方, 心筋炎惹起性 T 細胞増殖能や炎症性サイトカイン産生能 (IL-12, IFN  $\gamma$ ) は FM により濃度依存性に抑制された (図 4)。さらに, この効果は,  $\beta 2$  選択的受容体遮断剤により完全に消去された (図 5A-C)。また, 細胞内 cAMP は FM により濃度依存性に増加した (図 5-D)。これに対し, Denopamine はこれらに影響を及ぼさなかった (図 4,5-D)。

## 考察

Formoterol は心筋炎惹起性 T 細胞上の  $\beta 2$  受容体-cAMP 情報伝達経路を介して, 炎症性サイトカインの分泌を抑制し, この結果自己免疫性心筋炎が抑制された。さらに, 興味深いことに, 慢性心不全の効果的な追加療法剤 Carvedilol は自己免疫性心筋炎を増悪させた。この説明の一つとして次のことが考えられる。ヒト T 細胞および動物 CD4T 細胞上には  $\beta 1$  受容体でなく  $\beta 2$  受容体が存在している<sup>12)</sup>。我々の結果が示した如く, Metoprolol と Carvedilol の自己免疫性心筋炎に対する違いに加えて, Formoterol の自己免疫性心筋炎に対する効果から,  $\beta 2$  受容体遮断剤の関与が挙げられる。 $\beta 2$  受容体シグナルは, 心筋組織における L 型 Ca チャネルの活性化を介して, 心収縮力を増強させる<sup>3)</sup>。これらの事実から, 急性心筋炎に伴う急性心ポンプ失調に対する効果的な汎用薬 人工カテコラミン薬が有する  $\beta 2$  受容体シグナルは, 心行動態のみならず, 心筋組織炎症の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。加えて, Carvedilol は単独で心筋炎惹起性 T 細胞の増殖を促進させ,  $\beta 2$  選択的受容体遮断剤 (ICI 118,551) もまた, 単独で心筋炎惹起性 T 細胞の IFN  $\gamma$  産生を促進させた。これらの効果は Formoterol の  $\beta 2$  受容体への競合的拮抗により完全に消去された。つまり, Carvedilol は  $\beta 2$  受容体を介して心筋炎惹起性 T 細胞免疫を賦活化させていることが示された。一方, ICI 118,551 は  $\beta 2$  受容体-Gi  $\alpha$  情報伝達経路の効率

的な作動薬である<sup>4)</sup>。さらに, Gi  $\alpha$  は免疫応答の惹起過程において重要な役割を果たしていることが知られつつある<sup>5)</sup>。これらの事実は, Carvedilol が  $\beta 1$  受容体-Gi  $\alpha$  情報伝達経路を介して直接心筋炎惹起性 T 細胞免疫を賦活化させている可能性を想起させる。

何れにせよ, この成果は自己免疫性心筋炎・心筋症における  $\beta$  遮断薬投与に注意を喚起する実験的事実であり, 臨床家にとっては拡張型心筋症の  $\beta$  遮断薬療法の効用を期待するとともにこの留意点の今後の展開に注目せざるを得ない。

## 結論

急性心筋炎に伴うポンプ失調に汎用される人工カテコラミン薬が有する  $\beta 2$  受容体刺激は,  $\beta 2$  受容体-cAMP 情報伝達経路を介して自己免疫応答を抑制する。ところが, Carvedilol は部分的  $\beta 2$  受容体遮断作用を通じて自己免疫性心筋炎を増悪させた。Carvedilol は心筋炎惹起性 T 細胞を賦活化する効果を有している。

## 参考文献

1. Borger P, Hoekstra Y, Esselink MT, Postma DS, Zaagsma J, Vellenga E and Kauffman HF.  $\beta$ -Adrenoceptor-mediated Inhibition of IFN- $\gamma$ , IL-3, and GM-CSF mRNA Accumulation in Activated Human T Lymphocytes Is Solely Mediated by the Adrenoceptor  $\beta$  Subtype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 1998; 19: 400-407.
2. Swanson MA, Lee WT, and Sanders VM. IFN- $\gamma$  Production by Th1 Cells Generated from Naive CD4<sup>+</sup> T cells Exposed to Norepinephrine. *J Immunol* 2001; 166: 232-240.
3. Zhang ZS, Cheng HJ, Ukai T, Tachibana H, Cheng CP. Enhanced cardiac L-type calcium current response to beta2-adrenergic stimulation in heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 188-196.
4. Gong H, Sun H, Koch WJ, Rau T, Eschenbagen T, Ravens U, Heubach JF, Adamson DL, Harding SE. Specific  $\beta 2$ AR Blocker ICI 118,551 Actively Decreases Contraction Through a Gi-Coupled Form of the  $\beta 2$ AR in Myocytes From Failing Human Heart. *Circulation*. 2002; 105: 2497-2503.
5. Nanki T and Lipsky PE. Stimulation of T-CELL Activation by CXCL12/Stromal Cell Derived Factor-1 Involves a G-Protein Mediated Signaling Pathway. *Cellular Immunology* 2001; 214: 145-154.

表1 Carvedilol および Metoprolol の EAM に対する効果

	肉眼的スコア	心/体重比	細胞浸潤面積比率(%)
生理食塩水 (n=13)	2.7±0.3	0.6±0.1	64.6±22.1
CA(10mg/kg) (n=13)	3.7±0.3*	0.7±0.1	84.8±9.7*
MT(20mg/kg) (n=13)	2.8±0.3**	0.6±0.1	61.9±19.3##

CA = Carvedilol, MT = Metoprolol \*p<0.01, #p<0.05 対コントロール, \*\*p<0.05, ##p<0.01 対 CA.

表2 Formoterol の EAM に対する効果

	肉眼的スコア	心/体重比	細胞浸潤面積比率(%)
生理食塩水 (n=11)	3.0±0.3	0.6±0.1	74.1±7.9
FM(22.5µg/kg) (n=11)	1.7±0.3*	0.8±0.1**	48.4±10.8*

FM = Formoterol, \*p<0.01, \*\*p<0.05 対コントロール

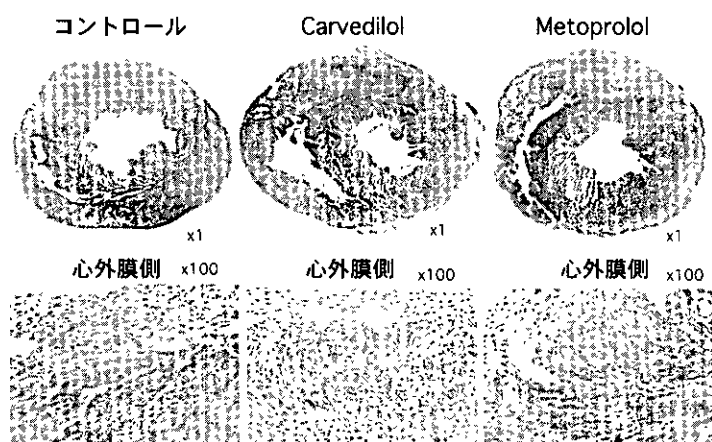


図1 ミオシン免疫 21 日目 (ヘマトキシリン・エオジン染色).

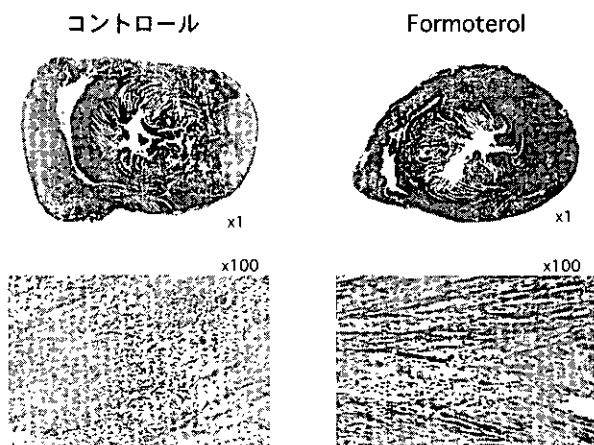


図2 ミオシン免疫 21 日目 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

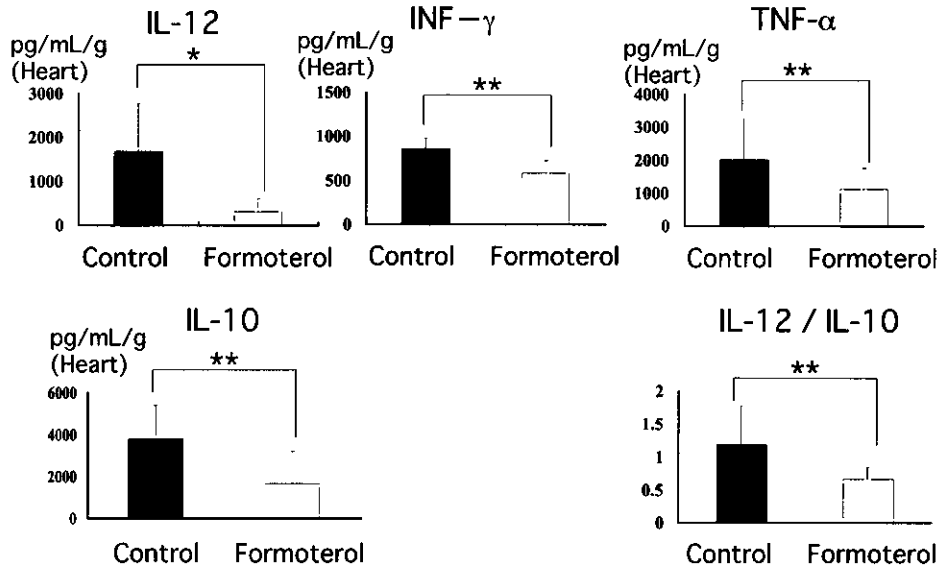


図3 心筋組織におけるサイトカイン (ミオシン免疫 21 日目)  
\*p<0.01, \*\*p<0.05 対 コントロール.

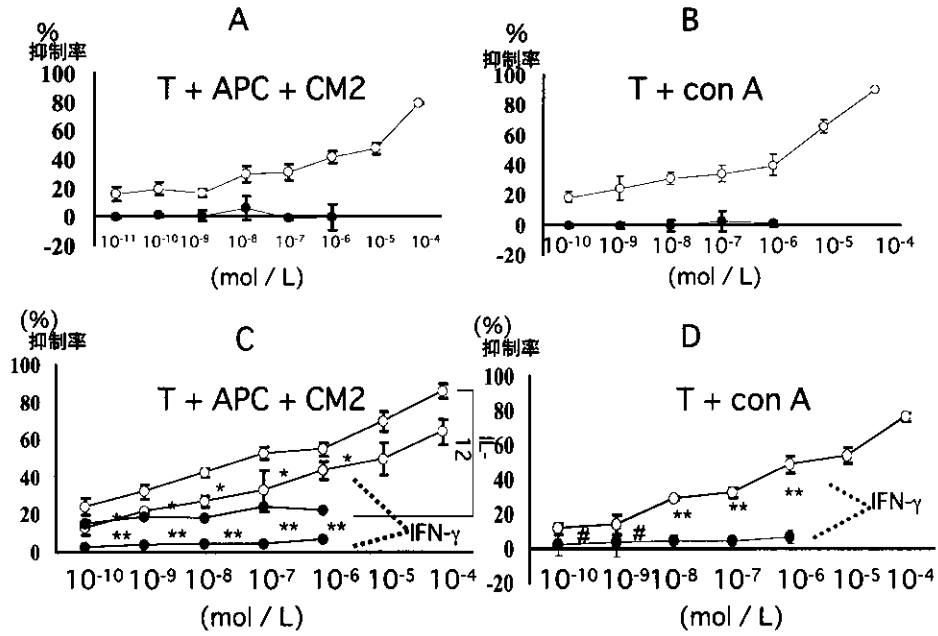


図4 心筋炎惹起性 T 細胞免疫における Formoterol の効果 A,B : 心筋炎惹起性 T 細胞増殖に対する  $\beta$  受容体シグナルの効果 (サイミジン摂取量)  
C,D : 心筋炎惹起性 T 細胞における, サイトカイン分泌に対する  $\beta$  受容体シグナルの効果 (ELISA 法)  
T : 心筋炎惹起性 T 細胞, APC : 抗原提示細胞, Con A : mitogen, CM2 : 抗原, IFN : Interferon, IL : Interleukin. \*p<0.01 (IL-12) 対 Denopamine. \*\*p<0.01, #p<0.05 (IFN- $\gamma$ ) 対 Denopamine.  
黒円 : Denopamine, 白円 : Formoterol.