

図5 心筋炎惹起性 T 細胞免疫における $\beta 2$ 受容体シグナルの関与
 A,B,C: 心筋炎惹起性 T 細胞免疫に対する $\beta 2$ 受容体の関与
 D: 心筋炎惹起性 T 細胞免疫における, 細胞内 cAMP の関与
 T: 心筋炎惹起性 T 細胞, APC: 抗原提示細胞, Con A: mitogen, CM 2: 抗原. IFN: Interferon, IL: Interleukin. A,B,C: *p<0.01 対 ICI 118,551 0 mol/L. #p<0.01, ##p<0.05 対 ICI 118,551 および Formoterol 0 mol/L. D: *p<0.01 対 Denopamine. 黒円: Denopamine, 白円: Formoterol

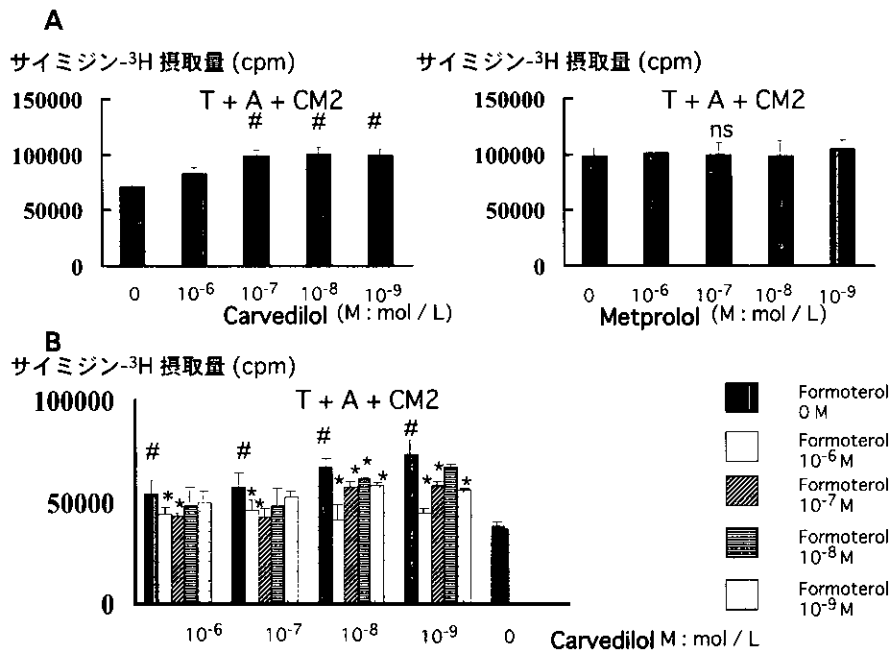


図6 Carvedilol の心筋炎惹起性 T 細胞免疫に対する効果
 T: 心筋炎惹起性 T 細胞, APC: 抗原提示細胞, CM2: 抗原.
 *p<0.01 対 Formoterol 0 mol/L. #p<0.01 対 Formoterol および Carvedilol 0 mol/L

研究発表

学会発表

1. 第6回日本心不全学会（2002,9月）西井基継，猪又孝元，竹端均，竹内一郎，中野浩成，
小坂橋俊美，和泉徹

異種間リンパ球移植による心病変の検討

小川 聡

慶應義塾大学医学部内科学呼吸循環

研究要旨

Na-K-ATPase あるいはアジュバントのみで免疫したラットから脾細胞を採取し、重症複合型免疫不全症マウスの腹腔内へ接種した。Na-K-ATPase 免疫群では対照群に比べて、心体重比、心室内腔面積比はいずれも高値であった。免疫群では心臓内に炎症性細胞浸潤を認めた。左室拡張末期径・収縮末期径はいずれも免疫群において高値であった。40 日間における生存率は免疫群で低率であった (0/10 vs. 5/10, $p<0.01$)。Na-K-ATPase を標的抗原とする自己免疫機序は拡張型心筋症様病態を惹起することが明らかとなった。

研究目的

われわれは、細胞膜 Na-K-ATPase ポンプに対する自己抗体を有する拡張型心筋症患者の末梢血リンパ球を、自己の B 細胞・T 細胞機能が欠如した重症複合型免疫不全症 (SCID) マウスへ移植することで、心肥大が生じることを報告した。本研究は、拡張型心筋症の成因における自己免疫異常の意義を明らかにするため、異種間リンパ球移植によって生じる心病変について明らかにすることを目的とした。

研究方法（倫理面への配慮）

Wistar ラットを対象として細胞膜 Na-K-ATPase 1 mg にアジュバントを添加し、二週間間隔で計 2 回免疫した (実薬群 $n=60$)。対照群にはアジュバントのみを同様に投与した ($n=60$)。脾リンパ球を精製し、各々 2.5×10^7 個を、各 60 匹の 6-8 週令 SCID マウス (CB-17/lcr-scid Jcl) の腹腔内へ移植した。移植後の生存率を各群 10 匹ずつで観察した。残各 50 匹ずつは、移植後 1 週間ごとに生存例 5 匹ずつを無作為に開胸した。開胸前体重、心重量、肝重量、脾重量を測定した。心臓は HE 染色を行い、左室・右室内腔を各断面面積比で比較した。またマウス血清中の抗 Na-K-ATPase ラット IgG レベルを測定した。移植 8 週後に各群 5 匹ずつ心エコー検査を行い、左室内径を測定した。

研究結果

移植後 1 週間以内の死亡は全 120 匹で皆無であった。生存率は、移植 20 日後で対照群 10/10、免疫群 7/10、移植 40 日後で対照群 5/10、免疫群 0/10 であり、有意差を認めた ($p<0.01$)。体重は

移植後に減少したが、両群間に有意差はなかった。肝体重比、脾体重比は両群で差を認めなかったが、心体重比 (mg/g) は免疫群で高値であった (6.41 ± 0.78 vs. 5.82 ± 0.55 , $p<0.05$)。心臓 HE 染色では、免疫群でのみ心室筋に炎症性細胞浸潤が観察された。心室壁厚に差はなかったが、左室・右室ともに内腔面積比は免疫群で高値であった ($p<0.01$)。抗 Na-K-ATPase ラット IgG レベルは、免疫群でのみ移植 1~8 週後まで、持続的に上昇していた。移植 8 週後の左室拡張末期径 (mm) は対照群 2.8 ± 0.1 、免疫群 3.1 ± 0.1 ($p<0.01$)、左室収縮末期径 (mm) は対照群 1.5 ± 0.1 、免疫群 1.7 ± 0.1 ($p<0.03$) であった。

考察

本研究では、Na-K-ATPase を介する自己免疫機序は拡張型心筋症類似の心病変を惹起することが明らかとなった。実際に拡張型心筋症患者において本自己抗体が 26% に検出されることをわれわれは既に明らかにしている (Baba A, et al: J Am Coll Cardiol 2002; 40: 1153-9)。In vitro おける検討で、本自己抗体はブタ脳 Na-K-ATPase 活性を低下させること、 α サブユニットをエピトープとすること、ウアバイン結合部位の親和性を低下させることなどが判明した。本自己抗体は細胞膜 Na-K-ATPase 活性を低下させることにより、細胞内カルシウム過負荷を惹起することが予測される。この現象は心筋炎罹患後の遷延性心筋傷害と致死的心室性不整脈の発生素地となる。

結論

細胞膜 Na-K-ATPase ポンプを標的抗原とするラット脾細胞は、レシピエントとなった SCID マウ

スに心筋炎病変を惹起した。移植8週後には拡張型心筋症類似の心病変が生じることが明らかとなった。

研究発表

論文発表

1. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S : Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase : possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy J Am Coll Cardiol 2002 ; 40 : 1153-9
2. 吉川 勉, 馬場彰泰, 安齊俊久 : 免疫学的アプローチによる心不全治療 呼と循 2002 ; 50 : 999-1006
3. 馬場彰泰, 吉川 勉, 茅野真男, 村山 晃, 三谷和彦, 中川 晋, 藤井 効, 島田 恵, 小山卓史, 赤石 誠, 三田村秀雄, 小川 聡 : うっ血性心不全患者における発作性心房細動の新しい upstream としての自己抗体 J Cardiol 2002 : 40 : 217-23

学会発表

1. Baba A, Yoshikawa T, Shimada M, Akaishi M, Ogawa S : Autoantibodies : new upstream targets of paroxysmal atrial fibrillation in patients with congestive heart failure. Eur Soc Cardiol 2002
2. 福田有希子, 馬場彰泰, 吉川 勉, 藤井 効, 三田村秀雄, 小川 聡 : 慢性孤発性心房細動患者における抗心筋自己抗体 第50回日本心臓病学会 2002年9月
3. Baba A, Yoshikawa T, Nagasawa T, Shimada M, Akaishi M, Tsuchimoto K, Ogawa S : Induction of cardiac hypertrophy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. 6th Japanese Heart Failure Society Meeting 2002/10
4. Fukuda Y, Baba A, Yoshikawa T, Iwata M, Akaishi M, Mitamura H, Ogawa S : Anti-myocardial autoantibodies are found in patients with chronic lone atrial fibrillation. 75th American Heart Association Meeting 2002/11

心不全の重症化機構—遺伝子治療結果を参考にして—

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

心筋症ハムスターにおけるジストロフィンの組織学，病態生理学及び生化学的な経時変化を観察した結果，DCMの重症化に伴い，ジストロフィンは崩壊し，細胞膜から解離して細胞質に移行し，断片化した。この一連の心筋細胞特異的に起きた筋ジストロフィー様の変性が心不全の重症化の原因である事が示唆された。また，このジストロフィンの変性は原因遺伝子の補充療法により改善される事が示された。

研究目的

ヒト拡張型心筋症（DCM）と類似の病態を示すTO-2系ハムスター（TO-2）は疾患モデルとして有用であり，ジストロフィン関連蛋白複合体（dystrophin-related protein；DRP）の1つ， δ -sarcoglycan（SG）遺伝子が欠損している事を我々は同定した（Sakamoto *et al.*, *PNAS*, 1997）。同じ δ -SG遺伝子変異によりヒトでもDCMを起こし，この中の1例は心臓移植を行っている（Tsubata *et al.*, *JCI*, 2000）。従って δ -SG遺伝子変異はヒトにも共通した疾患である。DRPは筋細胞膜の収縮時の過剰な膨隆を抑制し，その安定性を保つ。TO-2ハムスターでは δ -SG遺伝子の欠損がDCMの原因であるにもかかわらず（Kawada *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999；Kawada *et al.*, *BBRC*, 2001），幼若期には心不全症状は認められず，動物の成長に伴って症状が悪化していく理由は解明されていない。我々は δ -SG遺伝子欠損によりジストロフィンが徐々に崩壊し，筋ジストロフィー様の病変が心筋特異的に発生した結果，心不全が進展すると考えた。この仮説を検証するために，TO-2ハムスターを用いて経時的に心機能を測定し，同時にジストロフィンの組織学的及び生化学的な変化を観察した。

研究方法（倫理面への配慮）

正常対照のF1Bハムスター（F1B）とTO-2の両心カテーテルにより心行動態を測定する。心筋細胞をFITCでラベルしたジストロフィン抗体およびローダミンでラベルした δ -SG抗体を用いて蛍光免疫2重染色標本作製し，心筋でジストロフィンのWestern blottingを行なって各蛋白の局在と分解を観測する。*in situ*にて細胞膜透過性を検

討するためにハムスターにエヴァンスブルー（EB）を静注後に心臓を摘出する。細胞膜が正常ならば，EBは膜を通過しないが，透過性が増すとEBは細胞内に流入し，蛍光を発する。ジストロフィン抗体とEBを二重蛍光観察により，蛋白発現と膜透過性を同時に検出する。

遺伝子治療のために，5週令のTO-2を開胸し，心筋細胞に正常 δ -SG遺伝子を組み込んだ組換えアデノ随伴ウィルスベクターを*in vivo*にて導入した。なお実験に当たり，動物への薬剤投与と遺伝子治療は全身麻酔下に行い，動物の苦痛を極力排除した。

研究結果

F1B心筋はジストロフィン抗体により細胞膜は緑に， δ -SG抗体で赤く染色され，各蛋白の発現が認められた。一方，TO-2ハムスターでは細胞膜にジストロフィンの存在は認められるが， δ -SGは全く発現していなかった。生後5週のTO-2心筋細胞ではジストロフィンは細胞膜にのみ発現し，細胞質にはEBによる蛍光は認められず，膜透過性は正常であった。しかし生後25週では一部の心筋細胞でジストロフィンは細胞膜のみならず細胞質にも認められ，ジストロフィンが膜から細胞質にトランスロケーションしたことが示された。これと一致した細胞はEBを取り込み，膜透過性が亢進していた。二像を重ねた結果トランスロケーションした部位と膜透過性の亢進した部位は完全に一致した。40週齢ではジストロフィンがトランスロケーションした細胞が更に増加し，その細胞はEBが取り込み膜透過性の亢進した細胞数が増加した。

Western blottingの結果，F1Bの心筋は抗ジストロフィン抗体で430kD付近に単一バンドを認めた。5週のTO-2ではF1Bと同様の blotting像が得られ，ジストロフィンは保たれていたが，25

週令では 90, 70, 60kD 付近に新たなバンドが出現し、ジストロフィンが断片化していた。40 週齢ではジストロフィンのバンドは著明に薄くなり、反対に断片化したバンドが増加した。

血行動態を測定した結果、15 週の TO-2 では F1B に比べ、左室内圧が低下し、左室圧最大微分値および左室圧最小微分値が悪化し、左室拡張終期圧および中心静脈圧が著明に上昇し、ヒトの拡張型心筋症と類似の収縮能の低下と鬱血性心不全を呈した。F1B では週令に伴い心行動態に著変が無く、TO-2 では週令に伴い心不全が重症化した。この結果は週令に伴い心不全の進展とジストロフィンの崩壊、膜の脆弱化が一致して起きる事を示している。

δ -SG 遺伝子を導入した TO-2 は 35 週後（生後 40 週令）まで全例生存したが、レポーター遺伝子のみ導入した群では徐々に死亡例が増加した。遺伝子治療により生命予後が著明に改善した。実験終了時に心行動態を測定した結果、 δ -SG 遺伝子導入群では悪化していた心機能が改善し、遺伝子治療の効果が明確に認められた (Kawada *et al.*, *PNAS*, 2002)。遺伝子治療を行なった TO-2 の心筋では細胞膜に δ -SG 遺伝子が発現し、ジストロフィンは細胞膜にのみ発現していた。しかし δ -SG 遺伝子が発

現していない細胞ではジストロフィンが細胞膜から細胞質内にトランスロケーションしていた。

考察

従来 TO-2 ハムスターでは δ -SG 遺伝子の欠損が DCM の原因であり、ジストロフィンは異常無いと考えられていたが、心筋症ハムスターにおいても DCM が重症化するに伴い、ジストロフィンが細胞膜より解離し、細胞質へ遊離し、断片化する事が示された。これらの結果は「DCM の重症化は δ -SG 遺伝子の欠損ではなく、ジストロフィンの崩壊による筋ジストロフィー様の変性が心筋細胞特異的に起きる」とする我々の仮説を支持する。

結論

心筋症ハムスターにおけるジストロフィンの組織学的及び生化学的な経時変化を観察した結果、DCM の重症化に伴い、ジストロフィンは崩壊して細胞膜から解離して細胞質に移行し、断片化した。この一連の心筋細胞に起きた筋ジストロフィー様の変性が心不全の重症化の原因である事が示唆された。またジストロフィンの変性は原因遺伝子の補充療法により改善される事が示された。

研究発表

論文発表

1. Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, *et al.* Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 99 ; 901-906, 2002.
2. Toyo-oka T, Kawada T, Xi H, Nakazawa M. *et al.* Gene therapy prevents disruption of dystrophin-related proteins in a model of hereditary dilated cardiomyopathy in hamsters. *Heart, Lung & Circulation* 11 ; 174-181, 2002.
3. Terasawa K, Nakajima T, Iida H, Iwasawa K, *et al.* Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell : modulation by lysophosphatidyl- choline. *Circulation* 106 ; 311-319, 2002.
4. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Haebara T, Negoro H, Toyo-oka T. The relationship between changes in normal-range systolic blood pressure and cognitive function in middle-aged healthy women. *Hypertens Res.* 25 ; 565-569, 2002.
5. Negoro H, Shin WS, Hakamada- Taguchi R, *et al.* Endogenous prostaglandin D2 synthesis reduces an increase in plasminogen activator inhibitor-1 following interleukin stimulation in bovine endothelial cells. *J.Hypertens.* 20 ; 1347-1354, 2002.
6. Tsuji T, Suzuki J, Shimamoto R, *et al.* Vector analysis of the wall shear rate at the human aortoiliac bifurcation using cine MR velocity mapping. *Am.J.Roentgenol.* 178 ; 995-999, 2002.

学会発表

1. Kawada T, Nakata J, Nakazawa M, Koshimizu M, Hemmi C, Fukuda S, Takeo S &

- Toyo-oka T. Disruption of dystrophin and dystrophin-related proteins is a trigger of advanced heart failure of both hereditary and acquired origins. XXIV Annual Congress of the European Society of Cardiology (Berlin) 2002.
2. Toyo-oka T, Sago N, Hemmi C, Hirata A, Tezuka A, Nakata J, Kawada T & Nakazawa M. Paradoxical Amelioration of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure by NOS Inhibitor, L-NAME. American Heart Association, Scientific Sessions (Chicago) 2002.
 3. Kawada T, Nakazawa M, Takeo S & Toyo-oka T. Symposium “Cardiac hypertrophy and heart failure” Assessment of novel paradigm for the development of advanced heart failure. 第19回国際心臓研究学会日本部会（山形）2002.
 4. Nakata J, Kawada T, Nakazawa M, Hemmi C, Iwasawa K, Hikiji H, Takato T & Toyo-oka T. Progressive degradation of dystrophin in hamster hearts with dilated cardiomyopath. 第19回国際心臓研究学会日本部会（山形）2002.
 5. Toyo-oka T, Xi H, Kawada T, Nakazawa M, Koshimizu M & Takeo S. Symposium “Genetic analysis of cardiomyopathies and heart failure” A Novel Paradigm for the Development of Advanced Heart Failure-Disruption of dystrophin-related proteome and its gene/pharmaceutical treatments-International Congress on Cardiomyopathies and Heart Failure.（京都）2002.
 6. 河田登美枝, 奚航, 仲澤幹雄, 小清水美希, 竹尾聡, 豊岡照彦. シンポジウム（基礎）1 「循環器フィジオーム：遺伝子，分子から機能へ」ジストロフィン関連蛋白の脱落による心不全の重症化とその遺伝子及び薬物療法. 第66回日本循環器学会（札幌）2002.
 7. 河田登美枝, 仲澤幹雄, 辺見智恵子, 中田樹海, 福田覚, 佐藤博, 豊岡照彦. 遺伝子治療による心筋微細構造の改善-拡張型心筋症ハムスターによる検討-第75回薬理学会年会（熊本）2002.

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得；心筋症の遺伝子治療，米国および国内特許出願中

心肥大シグナルにおける HB-EGF の役割

堀 正二

大阪大学大学院医学研究科病態情報内科学

研究要旨

われわれはこれまで、上皮増殖因子のひとつであるヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様増殖因子 (HB-EGF) がアンジオテンシンやカテコラミンなどの 7 回膜貫通型受容体リガンドによる心肥大に重要な働きをすることを報告してきた。今回は HB-EGF の遺伝子欠損マウスを作成し生体内での HB-EGF の役割を検討した。

研究要旨

HB-EGF の遺伝子欠損マウスを作成し、生体内での HB-EGF の心筋組織における役割を検討する。

研究方法 (倫理面への配慮)

全身において HB-EGF を欠損するマウスを相同組み換え法を用いて作成した。

(倫理面への配慮)

ある遺伝子を欠損しているマウスを作成することはその遺伝子の機能を直接解析するうえで最も有効な方法の一つであり多くの遺伝子で試みられ生物学の理解と進歩に大きく貢献してきた。動物の飼育、実験操作、処分においては大阪大学医学部動物実験施設の指針に基づき動物愛護の観点から慎重におこなった。

研究結果

HB-EGF 欠損マウスは、生後 3-5 ヶ月の早期に死亡した。このマウスは野生型のマウスと比較すると生後 4 週ごろより心内腔が拡大し、壁運動の低下

が見られ、徐々に心不全に陥ることが明らかとなった。

考察

HB-EGF の欠損マウスが心筋不全により早期に死亡したことにより、HB-EGF の心筋代謝における重要性が示唆された。HB-EGF の受容体の欠損マウスでも同様の表現型がみられることが報告されており、その心筋におけるシグナルの重要性は明らかである。ヒトにおいても抗がん剤として使用された HB-EGF 受容体の抗体が副作用として心不全をきたすことが知られており、ヒトにおいてもその重要性が示唆される。今後はこのマウスを使用し、さらに HB-EGF の心不全の病態形成における役割を検討する。

結論

HB-EGF の欠損マウスは心不全をきたし早期に死亡する。そのシグナルは心筋の代謝に必須であることが示唆された。

研究発表

論文発表

1. HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 in press.

学会発表

1. 第 19 回国際心臓研究学会日本部会総会
シンポジウム: Role of HB-EGF in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

拡張型心筋症に対する遺伝子治療の検討

松崎 益徳

山口大学医学部循環病態内科学

研究要旨

BIO14.6心筋症ハムスターは家族性拡張型心筋症に起因する慢性心不全のモデルであり、その原因遺伝子は細胞膜に存在する δ サルコグリカン遺伝子の欠損であることが知られている。近年、我々は正常の δ サルコグリカンの遺伝子導入により心筋症初期の心機能低下を予防できることを報告した。一方で、临床上多くの拡張型心筋症は原因の特定が困難であり、また、心機能がすでに低下した時点で発見されることが多い。そこで我々は筋小胞体のカルシウムポンプ機能を抑制しているホスホランパンの働きを抑制する（筋小胞体カルシウムポンプ活性をあげる）遺伝子導入が、すでに進行した心筋症において心不全の進行を抑制できるかどうか検討し、心不全の進行を劇的に遅らせることができることを証明した。

研究目的

筋小胞体のカルシウムポンプ機能を抑制しているホスホランパンの働きを抑制する遺伝子導入がすでに進行しつつある心不全の働きを抑制するかどうか検討する。

研究方法（倫理面への配慮）

すべての実験手技、プロトコールは動物実験委員会をへて審査され、妥当と判断された。具体的には、ホスホランパンのPKAリン酸化部位（ser16）をグルタミン酸に置換し、偽リン酸化変異体を作成し、遺伝子組み換えアデノ随伴ウイルスに組み込んだ。高効率遺伝子導入法を用いて心筋症ハムスターの6週—12週齢に変異ホスホランパンを発現させる遺伝子導入を行った。またin vivo 遺伝子導入の効率はマーカー遺伝子であるLacZの発現を定量的に評価した。遺伝子導入後1.3.7ヶ月後に心機能解析、並びに生化学的、組織化学的検討を行った。

研究結果

LacZ 遺伝子は75%以上の心筋に均一かつ高効率に導入され、7ヶ月間の時間経過に伴う有意な発現の減弱はみられなかった。偽リン酸化ホスホランパ

ン変異体を導入した群では、対照群に比べ、30-50%の左室駆出分画の増加、50%以上の収縮性（maximum dP/dt）、拡張性（minimum dP/dt）の改善、筋小胞体のカルシウム取り込み能の増加、さらには細胞障害部位の減少、心筋間質線維化の有意な抑制が遺伝子導入後1-7ヶ月間の長期にわたって認められた。

考察

家族性心筋症の動物モデルである、BIO14.6心筋症ハムスターは細胞膜構成蛋白である、 δ サルコグリカンの以上に起因した心筋症、心不全モデルであるが、欠損蛋白の補充ではなく、筋肉のカルシウムハンドリングを改善させる遺伝子導入が、心不全の進行を劇的に遅らせることが出来たという報告は、世界で初めてである。

結論

遺伝的な心筋症においても筋小胞体カルシウムハンドリングの異常が心不全の進行に重要な役割を果たしており、ホスホランパン変異体によるカルシウムハンドリングの改善は心不全の遺伝子治療として極めて有効である可能性が示唆された。

研究発表

論文発表

1. Hoshijima M and Ikeda Y et al., Nat Med 8 : 864-871, 2002 (Ikeda Yは山口大学循環病態内科学所属)

学会発表

1. 第 75 回米国内臓病学会学術集会
Nakamura H, Umemoto S, Takata S, Matsuzaki M
Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart following donor heart myocardial infarction : New insights into the pathological role of TNF from a novel heterotopic cardiac transplantation-coronary ligation model.
(Circulation 2002, Vol 106, Supplement II 267)
2. 第 46 回日本リウマチ学会総会
中村浩士, 高田智子, 加藤智啓, 西岡久寿樹, 松崎益徳
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
(リウマチ 2002 Vol.42, No.2, 447)
3. 第 80 回日本循環器学会中国四国地方会
中村浩士, 高田智子, 松崎益徳
分離心筋梗塞モデルを用いた梗塞後における組織 Angiotensin II と TNF- α の空間分布の検討
(Circulation Journal 2002 Vol.66 Supplement III 1097)
4. 第 80 回日本循環器学会中国四国地方会
高田智子, 中村浩士, 松崎益徳
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
(Circulation Journal 2002 Vol.66 Supplement III 1097)

知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

特許取得

1. Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida.
An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine.
(米国特許出願: 10/141608)
2. 特願 2001-011866 (平成 13 年 01 月 19 日出願)
中村浩士, 松崎益徳, 吉田 勉, 山口 TLO
「広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法」

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

松森 昭

京都大学大学院医学研究科循環病態学

研究要旨

EMC ウイルスによるウイルス性心筋炎モデルマウスを用い、左室圧容積関係から急性期における心機能変化を経時的に検討した。当研究により急性期のウイルス性心筋炎の血行動態上の変化が詳細に解明された。当研究は心筋炎による心不全の治療を考える上で有益であると考えられる。

研究目的

EMC ウイルスによるウイルス性心筋炎モデルマウスを用い、左室圧容積関係から急性期における心機能変化を経時的に検討した。

研究方法（倫理面への配慮）

4週齢のDBA/2マウスにEMCウイルスを接種した（感染群）。接種日および接種後第1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14日に、右頸動脈よりMillar社製1.4 Fr.コンビネーションカテーテルを挿入し、左室圧および左室容積を同時測定した。対照として同日齢の非感染マウス（非感染群）を測定し、各群比較検討した。

当研究は京都大学動物実験規約に則り行われており、倫理面での問題はないものと考えられる。

研究結果

第1日において、左室収縮能の上昇と左室拡張末期圧（EDP）を伴う左室コンプライアンスの低下と拡張機能障害が認められた。一回拍出量係数（SI）、駆出率（EF）、心係数（CI）は非感染群と比較して有意に上昇した（ $p < 0.05$ ）。第4日から収縮能の低下が認められ、第7日には心不全が最も悪化した。第7日、感染群において拡張末期容積（EDV）、EDPおよび拡張末期圧容積関係（EDPVR）は有

意に上昇し、CI、EF、収縮末期圧（ESI）および収縮末期圧容積関係（ESPVR）は有意に低下した。心拍数は両群で有意な差は認められなかった。第9日から心不全の改善が認められたか、第14日までESPVR、ESPおよびEFは感染群において有意な低下が認められ、EDVとEDPは有意な上昇が認められた。

考察

急性期のウイルス性心筋炎の血行動態上の変化は3つの病期からなるものと考えられる。すなわち、心機能亢進期（第1日から第3日）、低下期（第4日から第8日）、回復期（第9日から第14日）である。

結論

これらの血行動態解析は、急性期のウイルス性心筋炎の病態生理の解明に新たな知見を与え、心筋炎による心不全の治療を考える上で有益であることが示唆される。

健康危険情報

ウイルス性心筋炎により著明なうっ血性心不全を来すことが動物モデルを使った血行動態解析により実証された。ウイルス感染時には心筋炎による心不全に十分注意する必要があると思われる。

研究発表

論文発表

1. Nishio R., S. Sasayama, and A. Matsumori. Left Ventricular Pressure-Volume Relationship in a Murine Model of Congestive Heart Failure due to Acute Viral Myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40: 1506-1514. 2002.

学会発表

1. Nishio R., S. Sasayama, and A. Matsumori. Left Ventricular Pressure-Volume

Relationship in a Murine Model of Congestive Heart Failure due to Acute Viral Myocarditis. International Symposium on CardioVascular Remodeling and Function, Osaka, Japan, Poster Presentation-a47, 2002.

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

特許取得

1. 特許出願済み 出願番号：特願 2001-200975, 発明者：京都大学助手 西尾亮介, 同助教授 松森昭 出願人：関西 TLO

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

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

研究要旨

多くの動物実験により、心筋梗塞後の癒痕心筋への細胞移植療法の有効性が報告されており、とくに骨格筋芽細胞自家移植については、すでに臨床試験が欧米にて始まっている。しかしこれらの対象となっているのはいずれも虚血が原因の不全心であり、非虚血性不全心に対する細胞移植療法の有効性についての検討はほとんどなされていない。

今回我々は、高血圧性心不全モデルである Dahl 食塩感受性ラットに対する骨格筋芽細胞自家移植の有効性について検討した。さらに移植する骨格筋芽細胞に心筋保護、心筋細胞肥大作用を有する Cardiotrophin-1 (CT-1) の遺伝子を導入することにより、細胞移植と遺伝子治療のコンビネーションセラピーの有効性についても検討した。

Dahl ラットにおける肥大心から不全心への移行において、骨格筋芽細胞自家移植は、心室腔の拡大、心収縮力の低下を抑制した。CT-1 遺伝子を過剰発現した骨格筋芽細胞の移植は、さらに心縮力低下、心腔拡大を抑制し、心不全を軽減した。また CT-1 遺伝子導入に伴い、心筋細胞肥大が認められた。本研究は重症心不全に対する新しい治療法の開発に重要な意義を持つと考えられる。

研究目的

近年本邦においても重症心不全患者が増加しており、その有効な治療法の開発は急務である。心不全治療において、不全心の機能回復は最も重要な治療戦略であり、従来の薬剤療法や機械的心筋保護法に加えて、近年、細胞移植療法が注目されている。これまでに様々な細胞種の移植が試みられているが、とくに骨格筋芽細胞自家移植については多くの動物実験データを元に、すでに臨床試験が欧米にて始まっている。しかし対象となっている不全心はいずれも虚血が原因となっており、非虚血性心不全に対する細胞移植療法の有効性についての検討はほとんどなされていない。

Dahl 食塩感受性ラットは高食塩食負荷により代償性心肥大を呈した後、心腔の拡大・心収縮能の低下を伴う心不全へ移行する。本研究においては、同リモデリングに対する自家骨格筋芽細胞移植療法の有効性を検討した。また移植細胞に *ex vivo* にて任意の遺伝子を導入した後に細胞移植を行う手法は、新たな治療法になる可能性を有すると考えられる。そのため、本研究において、心筋に対し肥大の促進とともに細胞保護的作用を有する Cardiotrophin-1 (CT-1) の遺伝子を、レトロウィルスを用いて骨格筋芽細胞に遺伝子導入を行い、その細胞を Dahl 食塩感受性ラットモデルの心臓に移植した場合の効果

についても検討した。

研究方法（倫理面への配慮）

Dahl 食塩感受性高血圧ラットに 6 週齢より 8% 高食塩食を負荷した。7 から 8 週齢において、ペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔後に下肢骨格筋を採取し、骨格筋芽細胞の単離、培養を行った。一方、Cardiotrophin-1 (CT-1) 遺伝子導入のため、同遺伝子を組み込んだレトロウィルスを骨格筋芽細胞に 2 回感染させた。同心性心肥大を呈する 11 週齢において人工呼吸下で開胸の後、心臓左室自由壁に直接ツベルクリン針を用い、 10^6 個の自家骨格筋芽細胞 (MB 群)、および CT-1 遺伝子導入した自家骨格筋芽細胞 (MB+CT 群) を、それぞれ移植した。Sham 群には細胞移植の代わりに PBS を注入した。その後、うっ血性心不全を呈する 15-17 週齢に至るまで高食塩負荷のまま飼育した。

心不全進展抑制効果について、代償性心肥大期と 15 および 17 週齢 (移植 4 及び 6 週間後) に心エコーにより心機能を評価した。また血行動態評価のために左室内圧を経横隔膜アプローチにより測定し、 $dP/dt \max$ および左室拡張末期圧をもとめた。さらに心臓の凍結標本の作製を行い、免疫組織学的に移植した細胞の定着の有無と CT-1 発現の程度を評価した。また心筋細胞横断面積についても組織学的に解析した。

なお、本実験計画は神戸大学医学部動物実験委員会において、その実験目的、実験方法などが検証され、倫理面より問題がないと判定され、実験に着手した。

研究結果

17週齢において、移植した骨格筋芽細胞は心筋内に生着しており、明らかな炎症細胞浸潤や、癒痕形跡は認められなかった。

心エコー法による検討にて、17週齢においてSham群では、11週齢と比べ左室拡張末期径(LVDd)の拡大およびfractional shortening(%FS)の低下を認めた。これに対し、MB群では有意に心機能の保持が認められ、さらにMB+CT群では、MB群に比べ心機能保持の程度がより効率的であった(LVDd: sham 7.1 ± 0.1 MB 6.5 ± 0.2 MB+CT 6.2 ± 0.1 mm, %FS: sham 32.1 ± 1.4 MB 38.5 ± 1.5 MB+CT 43.2 ± 0.8)。

左室圧測定より求めたdP/dt maxおよび左室拡張末期圧においても同様の結果が得られた(dP/dt; Sham群 781.1 ± 26.4 mmHg/s, MB群 1093 ± 122 mmHg/s MB+CT-1群 1849 ± 168 mmHg/s, LVEDP; Sham群 13.2 ± 6.9 mmHg, MB群 7.0 ± 3.3 mmHg MB+CT-1群 6.5 ± 1.1 mmHg)。一方、3群間において全経過を通じ、血圧、心拍数及び左室/体重量比に有意な差は認められなかった。

17週齢(移植6週後)において組織学的に検討したところ、MB+CT群では心筋内の移植した細胞においてCT-1の過剰発現が持続していることが、免疫染色により確認された。またMB+CT群では

他の2群に比べ心筋細胞の横断面積が約17%大きいことが認められた。

考察

骨格筋芽細胞移植が心不全への移行を抑制した機序については、移植細胞が宿主細胞と同期して収縮し、心筋収縮力を増強させた可能性もあるが、癒痕心筋への細胞移植の報告から推測すると、移植細胞によるGirdling作用が働き受動的にリモデリングを抑制したことが主要な機序ではないかと考えている。現在、細胞移植に伴うwall stressの低下によるAngiotensin IIやEndothelin-1などのneurohumoral factorの発現への影響について検討中である。また、MB+CT-1で心機能改善効果が増強されたのは、CT-1のパラクリン作用により、移植細胞近傍の心筋細胞の心肥大促進作用を誘導し、心室リモデリングに対し保護的に作用したことが考えられた。

結論

自家骨格筋芽細胞移植療法により、Dahl食塩感受性高血圧ラット収縮不全モデルにおいて代償性心肥大から心不全への移行が抑制されることが示された。さらにCT-1遺伝子を導入した骨格筋芽細胞を移植に用いた場合、心機能の保持作用が増強された。不全心への細胞移植療法ならびに、細胞移植と遺伝子導入のコンビネーション療法の有効性の検討は重症心不全に対する新しい治療法の開発に貢献することが期待される。

研究発表

論文発表

1. Kawashima S, Yamashita T, Miwa Y, et al. A HMG-CoA reductase inhibitor reduces stroke events in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 34 : 157-163, 2003
2. Yamashita T, Kawashima S, Miwa Y, et al. A 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase inhibitor reduces hypertensive nephrosclerosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 20 : 2465-2473, 2002
3. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 110 : 331-340, 2002
4. Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol.* 160 : 1335-1344, 2002
5. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, et al. Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via inhibition of macrophage infiltration.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22 : 969-974, 2002
6. Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, et al. Mouse coronary angiograph using synchrotron radiation microangiography. *Circulation.* 105 : E3-E4, 2002
 7. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion : synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22 : 115-120, 2002
 8. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ J* 66 : 851-856, 2002
 9. Kawai M, Kawashima S, Sakota T, et al. Ral GDP dissociation stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy. *Hypertension* 2003 (in press)
 10. Kobayashi-Satomi S, Kawashima S, Ueyama T, et al. Cardiac myocytes are recruited by bone marrow-derived cells in intact murine hearts. *Kobe J Med* 2003 (in press)

学会発表

AHA scientific session 2002, Chicago USA

○Toh R, Kawashima S, Kawai M, et al. Transplantation of Cardiotoxin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall prevents the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive rats.

○Kawai M, Kawashima S, Sakoda T, et al. Ral GDP Dissociation Stimulator (Ral-GDS) and Ral GTPase are involved in the process of myocardial hypertrophy

第6回日本心不全学会 東京

○Kawai M, Kawashima S, Sakoda T, et al. Ral GDP Dissociation Stimulator (Ral-GDS) and Ral GTPase are involved in the process of myocardial hypertrophy

第67回日本循環器学会 福岡

○Kawai M, Kawashima S, Toh R, et al. Ral GDP Dissociation Stimulator (Ral-GDS) and Ral GTPase are involved in cardiac hypertrophy

○Toh R, Kawashima S, Kawai M, et al. Transplantation of Cardiotoxin-1-expressing myoblasts to myocardium prevents the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive rats.

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

藤原 久義

岐阜大学再生応用（循環器内科学）

研究要旨

自家骨髄細胞移植によるウサギ・アドリアマイシン心筋症の治療，ならびに顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）投与による心筋症モデルハムスターの治療を試みた．両者においてコントロール群に比し左室のリモデリングならびに心不全の軽減がみられた．かつ，骨髄細胞由来と考えられる再生心筋細胞がみとめられた．自家骨髄細胞移植ならびに G-CSF による心筋細胞再生療法は心筋症に伴う心不全の治療法として有用であることが示唆された．

研究目的

自家骨髄細胞移植または顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）投与が，心不全を改善するか否かを検討すること．

研究方法（倫理面への配慮）

自家骨髄細胞移植 アドリアマイシン（1 mg/kg）を週 2 回，8 週間静注により作製したウサギのアドリアマイシン心筋症モデルを作製した．静注終了 2 週後に，腸骨から採取し蛍光色素でラベルした自家骨髄単核球分画を左室自由壁に直接注射した（n=8）．さらに 4 週間後に心機能・新組織を検討した．コントロールは PBS を同じ方法で注射した（n=7）．

G-CSF 心筋症自然発症ハムスター（UM-X7.1）の 15 週齢に G-CSF を週 5 日間連続皮下注射（10 mg/kg/day）+ 2 日間休薬という投与パターンを 16 週間続け，30 週齢で心機能，組織を評価した（n=16）．コントロールとして生食を皮下注射した（n=15）．

尚，倫理面への配慮として実験動物は，必要最小限の個体数を使用し，屠殺時には十分な麻酔を使用した．

研究結果

自家骨髄細胞移植 骨髄細胞移植群において左室収縮能ならびに拡張能の有意な改善（EF； $66 \pm 3\%$ vs $55.6 \pm 4\%$ ， $+dP/dt$ ； 1769.6 ± 90 vs 1371.6 ± 93 mmHg/sec， $-dP/dt$ ； -1278.6 ± 65 vs -1035.6 ± 77 mmHg/sec），心体重比の減少（ 1.86 ± 0.1 vs 21.6 ± 0.1 ）がみられた．免疫組織学的検討では心筋細胞マーカー myosin heavy chain 及び血管内皮細胞

マーカー CD31 を発現する骨髄由来細胞が自家骨髄細胞移植心にみとめられた

G-CSF G-CSF 治療群では有意に生存率の改善（100% vs 53%）を認め，左室収縮能の改善（EF； $43 \pm 9\%$ vs $29 \pm 11\%$ ）と，リモデリングの抑制も示した（LVEDD； 68 ± 1 vs 77 ± 3 mm，LVESD； 56 ± 1 vs 68 ± 3 mm）．左室における心筋線維化の割合も G-CSF 治療群で有意に減少していた（ $8.6 \pm 4.0\%$ vs $20 \pm 6.5\%$ ， $p < 0.01$ ）．剖検時，両群で体重の差はなかったが，心・体重比は G-CSF 投与群において有意に小さかった（ 3.6 ± 0.1 vs 4.1 ± 0.1 ）．治療群の心臓では，Zymography にて MMP-9 と MMP-2 の活性化が増加し，ウェスタンブロット法にて TNF- α の発現低下がみられた．共焦点レーザー顕微鏡において治療群では DiI でラベリングされた骨髄細胞が心筋内で確認されたがコントロール群では確認されなかった．蛍光顕微鏡ではエバンスブルー色素を取りこんだ傷害された心筋細胞が確認され，その数は治療群で抑制されていた．

考察

骨髄幹細胞が心筋細胞に分化することは以前から報告されているが（Makino *et al.* *J Clin Invest.* 1999；103：697-705，Toma *et al.* *Circulation* 2002；105：93-98），今回われわれは，共焦点レーザー顕微鏡において自家骨髄細胞移植ならびに G-CSF 治療群で DiI でラベリングされた骨髄細胞が治療後の心筋内に存在することを確認し，これらの治療が心筋細胞再生に関与していることを示した．ただし今回のプロトコルでは自家骨髄移植した骨髄細胞の心筋への導因を観察しているだけなので実際，自家骨髄細胞や G-CSF がどこまで心筋細胞再生に貢献しているか定量評価はできない．むしろ，

骨髄細胞や G-CSF の心筋へのサイトカイン効果、抗サイトカイン効果等が重要である可能性もある。すなわちこれらの治療法の作用機序は未だ不明な点が多く今後のさらなる研究が必要と考えられる。

本研究により自家骨髄移植ならびに G-CSF が難治性とされる心筋症に効果があることが明らかになり、以前より推奨されている心不全のスタンダードな治療法に加えて新たにこれら心筋再生療法が加わる可能性が示唆された。今のところ、心筋症に対して心臓移植のみが根治術であることを考慮すると、骨髄細胞移植、G-CSF が心筋症および心不全の非侵襲的治療として将来臨床応用に期待できる。

研究発表

論文発表

1. Tsuchiya M, et al. Vasopressin inhibits sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels via V1 receptors activation in the guinea pig heart. *Circ J.* 66 277-282 2002
2. Kawase Y, et al. Abundant apoptosis in nutmeg liver of cardiomyopathic hamsters - Apoptotic cell death as a possible mechanism of hepatic remodeling by congestion- *Pathol Res Pract.* 198 291-298 2002
3. Kawasaki M, et al. In vivo quantitative tissue characterization of human coronary arterial plaques by use of integrated backscatter intravascular ultrasound and comparison with angioscopic findings. *Circulation* 105 2487-2492 2002
4. Hayakawa K, et al. Sensitivity to apoptosis signal, clearance rate, and ultrastructure of Fas ligand-induced apoptosis in in vivo adult cardiac cells. *Circulation* 105 3039-3045 2002
5. Sano H, et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice. *Am J Pathol.* 161 135-143 2002
6. Aoyama T, et al. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 55 787-798 2002
7. Wang N, et al. Sheng-Mai-San is protective against post-ischemic myocardial dysfunction in rats through its opening of the mitochondrial KATP channels. *Circ J.* 66 763-768 2002
8. Shimizu Y, et al. The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit heart. *J Am Coll Cardiol.* 40 1347-1355 2002
9. Murata I, et al. Apoptotic cell loss following cell proliferation in renal glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of human type 2 diabetes. *Am J Nephrol.* 22 587-595 2002
10. Kagawa T, et al. Hydroxyl radical generation by the combination of iron and ascorbic acid is greatly attenuated but still significant in human gastric juice. *Intern Med.* 41 1213-1214 2002
11. Minatoguchi S, et al. Cross-talk among noradrenaline, adenosine and protein kinase C in the mechanisms of ischemic preconditioning in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41

結論

自家骨髄細胞移植治療ならびに G-CSF 治療は、実験的心筋症モデル、自然発症心筋症モデルにおいて、心筋細胞や血管内皮細胞を再生し、心機能を改善する。

健康危険情報

G-CSF 治療群において 1 例で脱毛がみられたが一時的なものであった。その他、生死に影響を及ぼすような合併症は認められなかった。

S39-S47 2003

12. Koda M, et al. Myocytes positive for in situ markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated : a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure. J Pathol. 199 229-236 2002

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

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

岐阜大学再生応用（循環器内科学）

藤原 兎子

京都女子大学家政学部

豊岡 照彦

東京大学医学部器官病態内科

研究要旨

【目的】心筋症ハムスターの心不全に対する顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の効果を検討する。
【方法】プロトコール①雄 UM-X7.1 心筋症ハムスターの 15 週齢に G-CSF を週 5 日間連続皮下注射（ $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）を 15 週間続け、30 週齢で評価した（ $n=16$ ）。コントロールとして生食を皮下注射した（ $n=15$ ）。プロトコール②15 週齢の UMX に両側大腿骨より骨髓穿刺を施行し DiI でラベリングした後、自家骨髓移植し同様に G-CSF を皮下注射して 2 週間後に評価した。プロトコール③15 週齢の UMX に同様に G-CSF を 2 週間皮下注射し解剖の 24 時間前にエバンスブルー色素を腹腔内注射し評価した。【結果】G-CSF 治療群では生存率の改善（100% vs. 53%, $p<0.0001$ ）を認め、心機能の悪化も抑制された（EF； $43\pm 9\%$ vs. $29\pm 11\%$, $P < 0.0001$ ）。左室における心筋線維化の割合も G-CSF 治療群で有意に減少していた（ $8.6\pm 4.0\%$ vs. $20\pm 6.5\%$, $p<0.0001$ ）。治療群の心臓では、マトリックスメタロプロテアーゼ 9（MMP-9）と MMP-2 の活性化が増加し、TNF- α の発現は抑制されていた。共焦点顕微鏡において治療群では DiI でラベリングされた細胞が心筋内で確認されたがコントロール群では確認されなかった。蛍光顕微鏡ではエバンスブルー色素を取りこんだ傷害された心筋細胞が確認されたが、その数は治療群で抑制されていた（ $0.071\pm 0.004\%$ vs. $0.754\pm 0.11\%$, $p<0.0001$ ）。【総括】G-CSF は①骨髓幹細胞動員による心筋細胞再生、②TNF- α 発現抑制、③MMP 活性化、そして④心筋細胞死抑制という少なくとも 4 つのメカニズムにより心筋症ハムスターの心機能低下を予防し、生存率を改善した。

背景と目的

心筋症ハムスター（UM-X 7.1）を実験対象とした研究としては、ACE 阻害剤、ARB 製剤をはじめとする薬物治療やウイルスを用いた遺伝子治療等が報告されている。われわれは最近、G-CSF が心筋梗塞後の左室リモデリングを軽減することを報告したが、今回は心筋症ハムスターの心不全に対する G-CSF の効果を検討した。

方法

プロトコール① 雄 UM-X7.1 心筋症ハムスター（UMX）の 15 週齢に G-CSF を週 5 日間連続皮下

注射（ $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）+ 2 日間休薬という投与パターンを 16 週間続け、30 週齢で心機能、組織を評価した（ $n=16$ ）。コントロールとして生食を皮下注射した（ $n=15$ ）。生存率を Kaplan-Meier 法にて算出し比較した。心機能に関しては、心エコーと Miller 圧カテーテルによる血行動態で評価した。心筋組織の線維化は Masson-trichrome 染色にて同定し画像解析した。マトリックスメタロプロテアーゼの活性化は Zymography にて評価した。Tumor necrosis factor- α （TNF- α ）は Western blotting 法にて評価した。

プロトコール② 15 週齢の UMX に両側大腿骨より骨髓穿刺を施行し DiI でラベリングした後、自家

骨髄移植し①と同様のパターンで G-CSF を皮下注射した。2 週間後に解剖し共焦点レーザー顕微鏡にて観察、骨髄由来の心筋細胞の存在を評価した。

プロトコール③ 15 週齢の UMX に①と同様のパターンで G-CSF を 2 週間皮下注射し解剖の 24 時間前にエバンスブルー色素を腹腔内注射し評価した。エバンスブルー色素陽性細胞は、位相差顕微鏡にて観察し定量評価した。

尚、倫理面への配慮として実験動物は、必要最小限の個体数を使用し、屠殺時には十分な麻酔を使用した。

結果

G-CSF 治療群では有意に生存率の改善 (100% vs. 53%, $p < 0.01$) を認め (図1A), 左室収縮能の改善 (EF; $43 \pm 9\%$ vs. $29 \pm 11\%$, $P < 0.01$) と, リモデリングの抑制も示した (LVEDD; 68 ± 1 mm vs. 77 ± 3 mm, LVESD; 56 ± 1 mm vs. 68 ± 3 mm, $P < 0.01$) (図1B)。

Masson-trichrome 染色で同定された左室における心筋線維化の割合も G-CSF 治療群で有意に減少していた ($8.6 \pm 4.0\%$ vs. $20 \pm 6.5\%$, $p < 0.01$) (図2 A,2B)。

剖検時、両群で体重の差はなかったが、心・体重比は G-CSF 投与群において有意に小さかった (3.6 ± 0.1 vs. 4.1 ± 0.1 , $p < 0.05$) (図2C)。

治療群の心臓では、Zymography にて MMP-9 と MMP-2 の活性化が増加し (図 3A), ウェスタンブロット法にて TNF- α の発現低下がみられた (図3B)。

共焦点レーザー顕微鏡において治療群では DiI でラベリングされた骨髄細胞が心筋内で確認されたがコントロール群では確認されなかった (図4)。

蛍光顕微鏡ではエバンスブルー色素を取りこんだ傷害された心筋細胞が確認され (図5A 矢印), その数は治療群で抑制されていた ($0.071 \pm 0.004\%$ vs. $0.754 \pm 0.11\%$, $p < 0.01$) (図5D)。

考察

本研究は G-CSF の長期投与により心筋症ハムスターにおいて、心筋の線維化および心不全が改善され、生存率が著しく向上することを明らかにした。このような効果は、G-CSF における①心筋細胞死抑制、②TNF- α 発現抑制 (抗サイトカイン作用)、③MMP 活性化 (心筋線維化抑制)、そして④骨髄幹細胞動員による心筋細胞再生、という少なくとも 4 つのメカニズムによることが推察された。

心筋細胞死が抑制されていたことは治療群で蛍光顕微鏡にてエバンスブルー色素の取り込みが抑制されていたことから証明されるが、その機序は不明である。

以前より心不全時に TNF- α の上昇していることが報告されてきた (1)。また G-CSF は TNF- α の抑制に働いていることも証明されている (2)。本研究では G-CSF 投与により心不全における TNF- α 上昇が抑制されることが明らかになった。したがって、G-CSF は抗サイトカイン作用により心機能の悪化を抑制している可能性がある。

左室リモデリングと MMP の活性化については Bio14.6 心筋症ハムスターやヒトの拡張型心筋症で報告がある (3, 4)。また G-CSF によって MMP-9 が活性化されることが報告されている (5)。今回の実験では治療群の左室における心筋線維化の割合が縮小していたことが証明され、かつ MMP-9 と MMP-2 の活性化が増加していた。これらを考慮すると G-CSF は、MMP 活性上昇を介して心筋間質の線維化の分解を促進していることが推察される。

骨髄幹細胞が心筋細胞に分化することは以前から報告されているが (6, 7)、今回われわれは、共焦点レーザー顕微鏡において治療群で DiI でラベリングされた骨髄細胞が G-CSF 治療後の心筋内に存在することを確認し、G-CSF が心筋細胞再生に関与していることを示した。ただし今回のプロトコールでは自家骨髄移植した骨髄細胞の心筋への導因を観察しているだけなので実際、G-CSF がどこまで心筋細胞再生に貢献しているか定量評価はできない。われわれの実験から G-CSF は心筋症に対して治療薬となる可能性が証明できたが、G-CSF の作用機序は未だ不明な点が多く今後のさらなる研究が必要と考えられる。

結論

本研究により G-CSF が難治性とされる心筋症に効果があることが明らかになり、以前より推奨されている心不全のスタンダードな治療法に加えて新たに G-CSF が加わる可能性が示唆された。今回用いた G-CSF は、すでに臨床で末梢造血細胞移植の幹細胞導入に使用されている方法と同様に皮下注射され安全性も既に確立されている。今のところ、心筋症に対して心臓移植のみが根治術であることを考慮すると、G-CSF が心筋症および心不全の非侵襲的治療として将来臨床応用に期待できる。