

文献

1. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1998; 323: 236-41.
2. Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y, Lee M, Kuroki J, Niitsu H, Miura AB. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Blood* 1995; 86: 2220-2227
3. Masutomo K, Makino N, Sugano M, Miyamoto S, Hata T, Yanaga T. Extracellular matrix regulation in the development of Syrian cardiomyopathic Bio 14.6 and Bio 53.58 hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1607-1615.
4. Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTernan CF. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998; 98: 1728-1734.
5. Carstanjen D, Ulbricht N, Iacone A, Regenfus M, Salama A. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF. *Transfusion* 2002; 42: 588-596.
6. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
7. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98

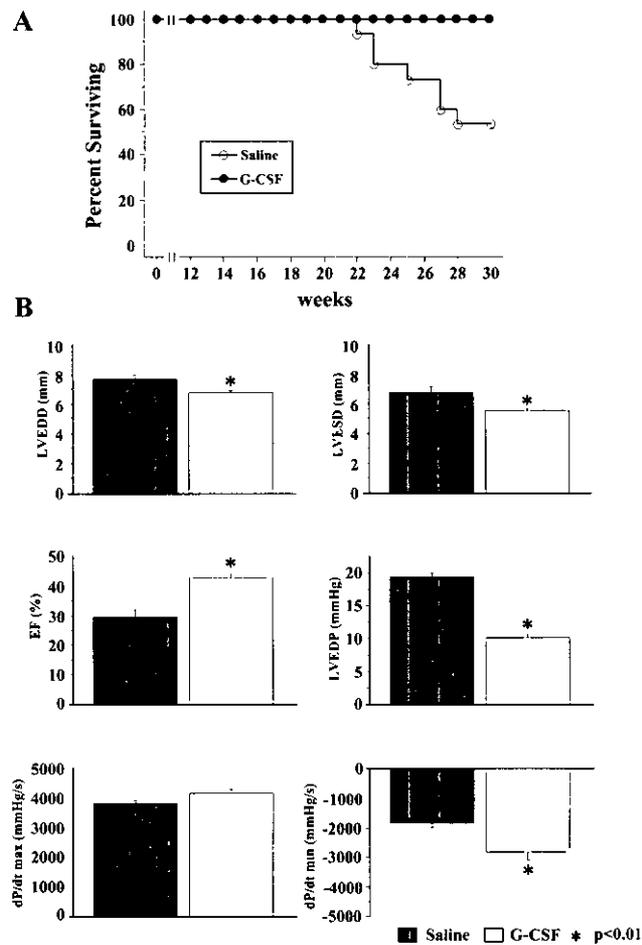
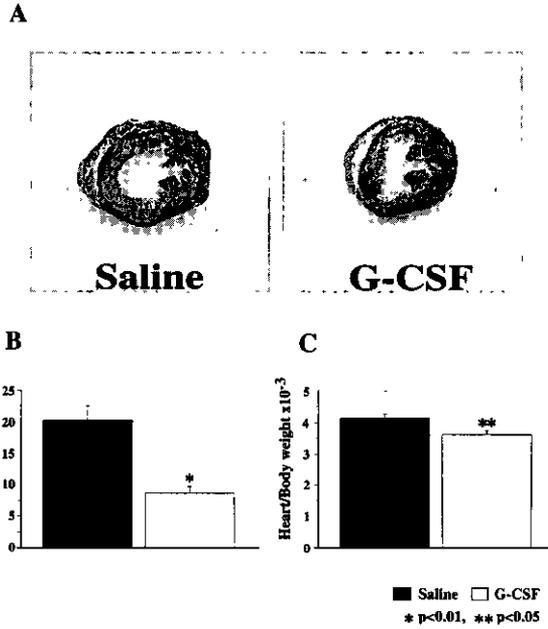
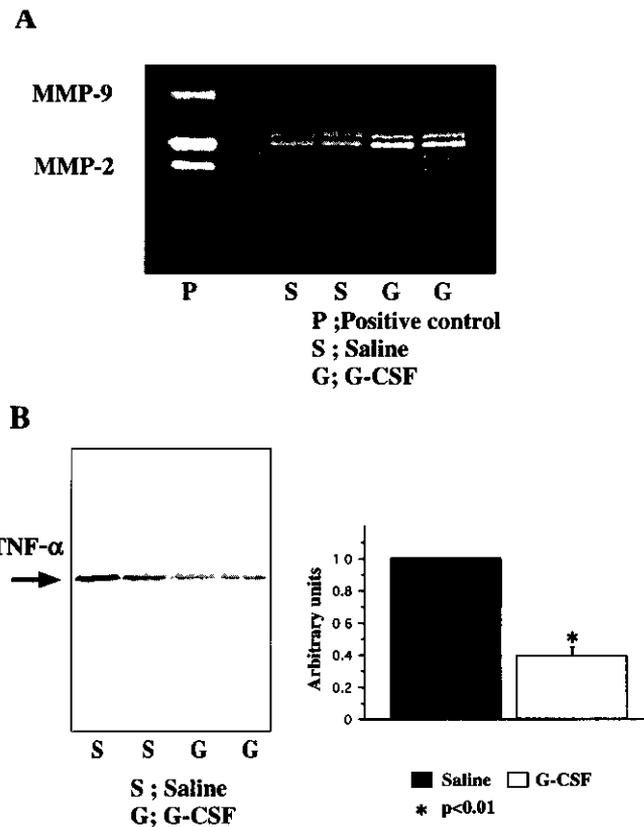


図1 A) 生存率の比較: G-CSF 治療群では有意に生存率の改善が認められた。治療群: 100%, コントロール群: 53%,  $p < 0.01$ 。  
 B) 心臓超音波検査: G-CSF 治療群では有意に左室収縮能の改善と (EF; 治療群:  $43 \pm 9\%$ , コントロール群:  $29 \pm 11\%$ ,  $P < 0.01$ ), リモデリングの抑制が認められた (LVEDD; 治療群:  $68 \pm 1\text{mm}$ , コントロール群:  $77 \pm 3\text{mm}$ , LVESD; 治療群:  $56 \pm 1\text{mm}$ , コントロール群:  $68 \pm 3\text{mm}$ ,  $P < 0.01$ )。



**図2** A) Masson-trichrome 染色：(左) コントロール (右) G-CSF 治療。  
 B) 左室における線維化の割合：心筋線維化の割合も G-CSF 治療群で有意に減少していた (治療群：8.6±4.0%, コントロール群：20±6.5%, p<0.01)。  
 C) 心・体重比：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 (治療群：3.6±0.1, コントロール群：4.1±0.1, p<0.05)。



**図3** A) ゼラチンザイモグラフィー：治療群の心臓では、ゼラチンザイモグラフィーにてマトリックスメタロプロテアーゼ9 (MMP-9) と MMP-2 の活性化が増加していた。  
 B) ウェスタンブロット法：治療群では TNF- $\alpha$  の発現は抑制されていた。

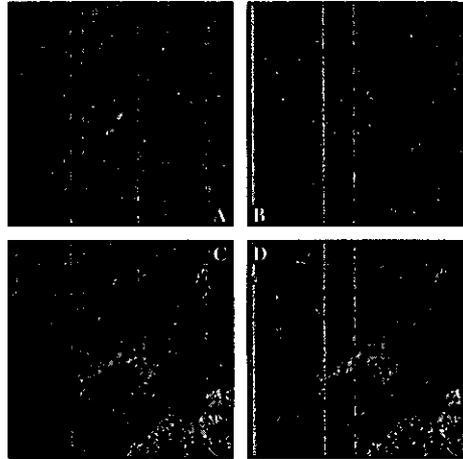


図 4 共焦点レーザー顕微鏡において治療群では DiI でラベリングされた骨髄細胞が心筋内で確認されたがコントロール群では確認されなかった。  
 A) DiI 取り込み細胞  
 B) Hoechst33482 による核染色  
 C) Troponin I による心筋細胞の染色  
 D) A) ,B) ,C) の重ね合わせ

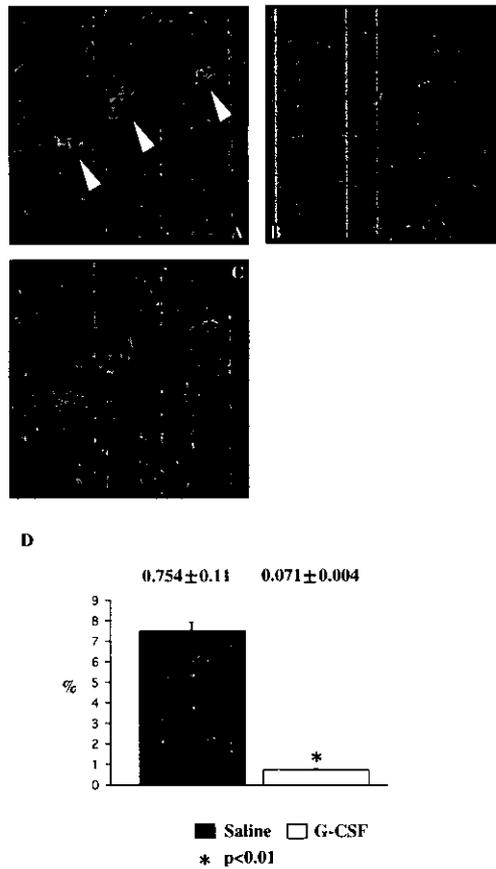


図 5 A) エバンスブルー色素を取りこんだ傷害された心筋細胞 (矢印).  
 B) Hoechst33482 による核染色  
 C) A) , B) の重ね合わせ  
 D) エバンスブルー色素を取り込んだ心筋細胞数は治療群で抑制されていた (治療群: 0.071 ± 0.004%, コントロール群: 0.754 ± 0.11%, p < 0.01).

# 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

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

岐阜大学医学部医学研究科再生応用 (循環器内科学)

藤原 兎子

京都女子大学家政学部食物栄養学科

## 研究要旨

最近の研究によって、急性心筋梗塞のモデルでは移植された自家骨髄細胞が血管や心筋を再生し心臓機能の回復に寄与することが明らかにされてきている。今回の研究において我々は、この自家骨髄細胞移植が心筋症のモデルにおいても有効な治療戦略となり得るか否かを検討した。日本白色種ウサギに doxorubicin (1mg/kg/week) を週 2 回、合計 8 週間静脈注射し心筋症モデルを作製した。doxorubicin 注射終了後 14 日目に、骨髄細胞移植群では、約 8ml の骨髄液を採取したのち単核球分画を集めこれを蛍光色素でラベルしたのち人工呼吸下に左室自由壁に約 10ヶ所直接注射した。コントロール群には、1ml の PBS を同じ方法で注射した。さらに 4 週間後、エコーにて心室壁厚や壁運動を評価したのち、心臓を摘出し Langendorff 灌流下に各種心機能を評価した。さらに、心筋細胞や血管の再生について、免疫組織染色にて検討した。Langendorff 灌流下での LV developed pressure, positive および negative dP/dt, エコーで求めた LV ejection fraction, fractional shortening は、骨髄細胞移植群においてコントロール群に比し有意に保持されていた。また、左室重量は、骨髄細胞移植群でコントロール群に比し有意に低値を示した。免疫組織学的検討では、心筋細胞のマーカーである myosin heavy chain および血管内皮細胞のマーカーである CD31 を発現する骨髄由来細胞を認めた。自家骨髄細胞移植治療は、心筋症に対しても新たな治療法となり得ることを示唆する。

## 研究目的

骨髄に存在する未分化細胞が血管内皮や心筋細胞を含む様々な組織に分化する能力を有することが明らかになった<sup>1)</sup>。このことを利用して骨髄細胞を直接移植して血管や心筋の再生を通じ機能改善をはかる試みが動物実験でなされ、急性心筋梗塞のモデルでは既に有効性が確認されている<sup>2)3)</sup>。しかし、心筋梗塞と並んで心筋細胞の脱落が重要な病態形成の要因である心筋症に対する効果は、未だ検討されていない。そこで本研究では、骨髄細胞移植が心筋症に対しても有効な治療になり得るか否かをウサギの doxorubicin 心筋症のモデルを用いて検討した。

## 研究方法

### 1. 心筋症モデルの作製

日本白色種ウサギに doxorubicin 0.5mg/kg を週 2 回、合計 8 週間静脈注射し心筋症モデルを作製した。

### 2. 骨髄細胞移植

doxorubicin 注射終了 2 週間後に両側の腸骨から骨髄液を約 8ml 採取した。この中から比重分離により単核球の分画を取り出し、蛍光色素 DiI で標識した。ウサギを無作為に骨髄細胞移植群 (n=8) とコントロール群 (n=7) に分け、人工呼吸下に開胸後、前者には骨髄単核細胞を、後者には匹敵量の PBS を左心室自由壁に約 10ヶ所直接注射した。

### 3. 左室機能およびリモデリングの解析

骨髄細胞または PBS 注射から 4 週間後に Langendorff 灌流下で種々の心機能指標を測定し

た。また、左室容積、壁運動、壁厚などは、baseline, doxorubicin 注射終了 2 週間後、および骨髓細胞または PBS 注射の 4 週間後に、エコーを用いて測定した。

#### 4. 骨髓細胞から心筋および血管細胞への分化の検討

血行動態やエコーのデータを取得したのち、左室の凍結切片を作成し、心筋細胞のマーカーである myosin heavy chain や血管内皮細胞のマーカーである CD31 を免疫組織染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

### 結果

#### 1. 左室機能およびリモデリング

骨髓細胞移植群では、コントロール群に比し、

1. 心筋細胞の変性・脱落（図 1）や線維化が軽度であった（図 2）。
2. LV developed pressure (mmHg) や positive および negative dP/dt (mmHg/sec) は、有意に高値を示した（各々、 $85 \pm 2$  vs.  $40 \pm 4$ ,  $1769 \pm 90$  vs.  $1371 \pm 93$ ,  $1278 \pm 90$  vs.  $1035 \pm 77$ ）。
3. 移植 4 週間後に、エコーで測定した LV ejection fraction (%) は有意に高値を示し ( $66 \pm 3$  vs.  $55 \pm 4$ )、左室壁厚 (mm) は有意に低値を示した ( $2.0 \pm 0.1$  vs.  $2.6 \pm 0.1$ )。
4. 体重で補正した左室重量 (g/kg) は、有意に低値を示した ( $1.8 \pm 0.1$  vs.  $2.0 \pm 0.1$ )。

#### 2. 骨髓細胞から心筋および血管細胞への分化

骨髓細胞移植後 4 週間後の免疫組織染色において、骨髓由来細胞から生じたと考えられる心筋細胞（図 3）および血管内皮細胞（図 4）の存在が確認された。

### 考察

急性心筋梗塞のモデルでは、骨髓細胞により心筋や血管内皮細胞の再生が起こることは既に報告されている<sup>2)-5)</sup>。骨髓細胞の分化の正確なメカニズムは明らかではないが、chemokine や growth factor といった何らかの液性因子が関与していると思われる。したがって、心筋梗塞と違い局所での炎症が軽度である心筋症においては、骨髓細胞移植治療の効果は、急性心筋梗塞に比べ軽度または無効であることも予測された。しかし、我々の今回の検討では、骨髓細胞移植は実験的心筋症モデルにおいても、その機能温存に十分に効果的であった。本実験では、骨髓中に存在する血管内皮や心筋細胞の前駆細胞のみを選択的に移植したのではなく、単核球の分画に

含まれる全ての種類の細胞を移植している。そのため、前駆細胞以外の細胞が産生・放出する液性因子が細胞の生着や分化を支持促進した可能性が考えられる。

さらに、こういった細胞の、前駆細胞に働きかける作用以外に、直接的な作用も十分に考慮する必要があると考えられる。骨髓細胞から心筋細胞が真に分化するか否かについては議論の別れるところであり、少なくとも造血幹細胞からの心筋細胞への分化に関しては否定的な報告もある<sup>6)</sup>。今回の実験においても、DiI でラベルされていると同時に myosin heavy chain を発現する細胞、即ち骨髓細胞から分化したと考えられる心筋細胞はきわめて稀にしか観察されず、心機能の温存を説明するには、その数はとても十分とは考えられない。今回骨髓細胞移植群で顕著であった組織学的特徴は、心筋細胞の変性・脱落の軽減と線維化の抑制である。これらか、移植された細胞に起因する液性因子の分泌を含む様々な作用によって生じ、心機能の保持に寄与したという仮説に対して今後の検討が必要と思われる。

### 結論

doxorubicin による心筋症のモデルで、自家骨髓細胞移植により左室機能を保持することが可能であった。骨髓細胞移植は、心筋症患者に対して有用な治療法となる可能性がある。

### 参考文献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275: 964-967.
2. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al., Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001; 410: 701-705
3. Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM et al., Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002; 124: 584-590.
4. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al., Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001; 107: 1395-1402.
5. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al., Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci*, 2001; 98: 10344-10349.
6. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al., Little evidence for developmental plasticity of

adult hematopoietic stem cells. *Science*, 2002 ;  
297 : 2256-2269.

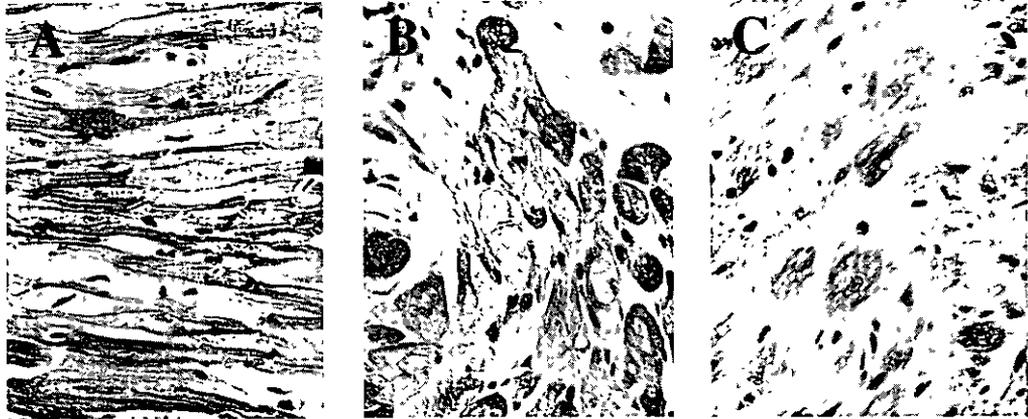


図1 doxorubicin 投与後の心筋の H-E 染色像  
心筋細胞の融解 (A), 空胞形成 (B), 脱落 (C) が広範囲に観察される。これらの形態学的変化は、骨髄細胞移植群では軽度であった。

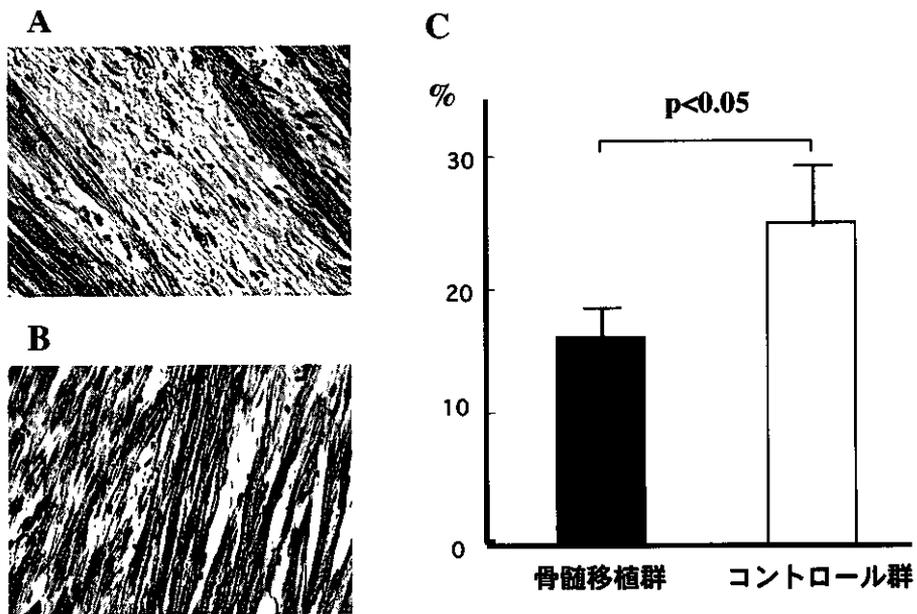


図2 Masson Trichrome 染色による fibrosis の評価  
A : コントロール群, B : 骨髄細胞移植群, C : 左室に占める fibrosis area の割合

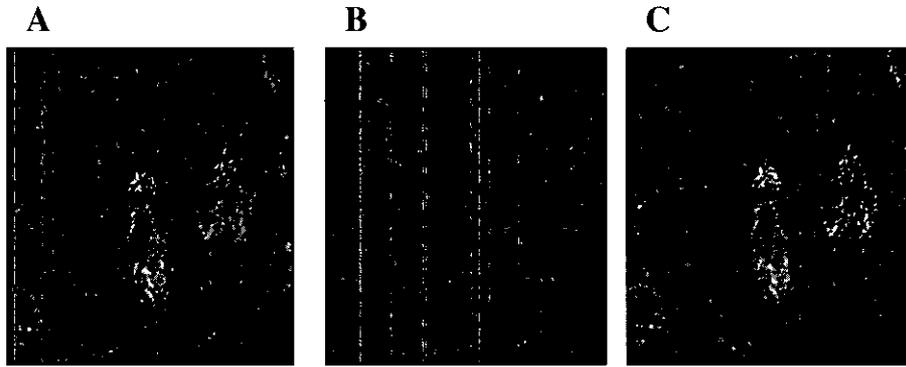


図3 骨髄細胞から分化した心筋細胞  
A : myosin heavy chain の免疫組織染色像, B : DiI, C : 両者の  
コンビネーション

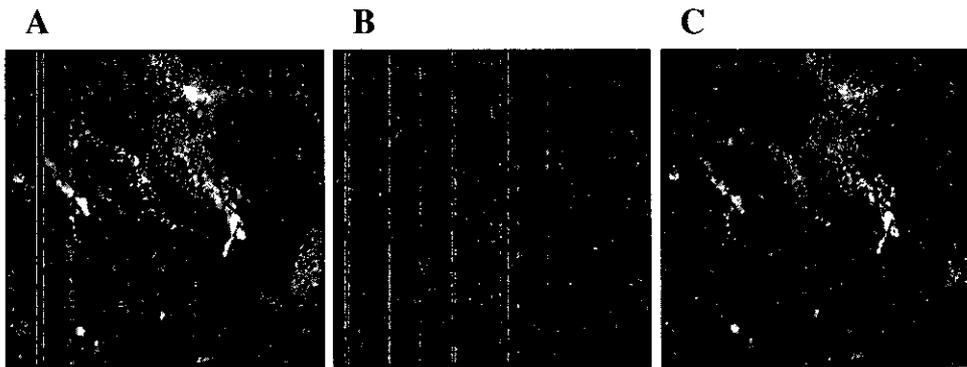


図4 骨髄細胞から分化した血管内皮細胞  
A : CD31 の免疫組織染色像, B : DiI, C : 両者のコンビネーション

# 炎症性サイトカインと心不全

竹下 彰, 久保田 徹

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

## 研究要旨

心筋特異的 TNF- $\alpha$  過剰発現マウスを用いて, 心不全の発症と進展における炎症性サイトカインと一酸化窒素, 活性酸素種の役割について検討した. TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋では誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が亢進しており, iNOS 遺伝子をノックアウトすることで  $\beta$  刺激時の収縮性が有意に改善した. しかし, 心不全の発症を阻止することはできず, 炎症性サイトカインによる心筋障害の過程において, NO 以外の経路がより重要であることが示唆された. 一方, TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋では活性酸素種の増加とミトコンドリアの破壊が認められ, 心筋における持続的な TNF- $\alpha$  の発現はミトコンドリアを障害し, 活性酸素種の産生増加を介して, 心筋傷害的に作用している可能性が示唆された.

## 研究目的

心不全の発症と進展における炎症性サイトカインの役割を明らかにし, 心不全治療の新たな標的分子を明らかにすること.

## 研究方法

久保田が開発した心筋特異的 TNF- $\alpha$  過剰発現マウスを用いて以下の実験を行い, 野生型マウスと比較検討した. 本研究は, 九州大学総長および医学部動物実験委員会の承認を経て, 関連法案ならびに「九州大学医学部における動物実験に関する指針」に準拠して行った.

### 一酸化窒素 (NO)

(1) TNF- $\alpha$  マウスの心筋における内皮型および誘導型 NO 合成酵素 (eNOS, iNOS) の発現を, ノーザンおよびウエスタンブロットにて検討した. (2) 10 週齢の雌のマウスに iNOS の選択的阻害薬である ONO-1714 (0.1mg/kg iv) を投与し, iNOS 阻害の急性効果を心エコーおよび左室内圧測定にて検討した. (3) TNF- $\alpha$  マウスと iNOS ノックアウトマウスを交配することで iNOS 遺伝子が欠損した TNF- $\alpha$  過剰発現マウスを作成し, 長期的 iNOS 阻害が心不全の発症と進展に及ぼす効果を検討した.

### 活性酸素種 (ROS)

(1) 電子スピン共鳴法を用いて, 心筋における活性酸素種の産生を検討した. (2) 抗酸化酵素として, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼの発現と活性を測定した. (3) 電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態学的変化

を観察した. (4) 培養心筋細胞において, TNF- $\alpha$  が活性酸素種の産生とミトコンドリア DNA に及ぼす効果を検討した.

## 研究結果

### 一酸化窒素 (NO)

(1) TNF- $\alpha$  マウスでは野生型マウスに比べて iNOS の発現が亢進していた. eNOS の発現は両者で明らかな差を認めなかった. (2) TNF- $\alpha$  マウスでは, 心室壁が有意に肥厚し, 収縮力の指標である左室内径短縮率と +dP/dtmax がともに低下していた. 心拍数および血圧は, 両群間で差はなかった. TNF- $\alpha$  マウスでは  $\beta$  刺激時の陽性変力作用が有意に減弱していた. ONO-1714 は安静時の血行動態指標に有意の変化を与えなかった. しかし, TNF- $\alpha$  マウスにおいて減弱した  $\beta$  陽性変力作用を有意に改善した. (3) iNOS 遺伝子をノックアウトすると, ONO-1714 の場合と同様に, TNF- $\alpha$  マウスの  $\beta$  陽性変力作用が有意に改善した. しかし, 心筋の肥大やサイトカインの発現に変化はなく, 心不全の発症と死亡率の増加を軽減することはできなかった.

### 活性酸素種 (ROS)

(1) TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋では, 野生型マウスに比べて, ヒドロキシルラジカルが増加しており, その多くがスーパーオキシド由来であることが示唆された. (2) Cu/Zn-SOD とカタラーゼに明らかな変化はなかったが, TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋では Mn-SOD が減少し, グルタチオンペルオキシダーゼが増加していた. これらの変化は, シクロフォスファミドを用いて炎症細胞の浸潤を抑制しても不変であった. (3) TNF- $\alpha$  過剰発現マウス

のミトコンドリアは不整で小さく、内嚢の破壊が示唆された。(4) TNF- $\alpha$ によって、培養心筋細胞では、活性酸素種の産生増加とミトコンドリア DNA の減少が認められた。

## 考察

近年の基礎的・臨床的研究により、炎症性サイトカイン、特に TNF- $\alpha$ が、心不全の発症と進展に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。TNF- $\alpha$ は、免疫・炎症反応において中心的役割を担っているだけでなく、心筋収縮力を低下させ、心筋の肥大とアポトーシス、線維化をもたらすことが *in vitro* の実験において示されている。また、慢性心不全患者では、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの血中濃度が上昇しており、不全心自体においても TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの発現亢進が認められる。心筋における TNF- $\alpha$  発現の病態生理学的意義を検討するため、我々は、 $\alpha$  ミオシン重鎖のプロモータを用いて心筋特異的に TNF- $\alpha$  を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、このマウスがヒトの拡張型心筋症に酷似した病態を示し、うっ血性心不全のために高率に死亡していくことを報告してきた (*Circ Res.* 1997; 81: 627-635.)。心不全の発症と進展における炎症性サイトカインの役割を明らかにし、心不全治療の新たな標的分子を明らかにすることが本研究の目的であるが、本年度は、一酸化窒素と活性酸素種について検討した。

TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋では iNOS の発現が亢進していた。選択的 iNOS 阻害薬 ONO-1714 の投与によって  $\beta$  刺激時の陽性変力作用の有意な改善を認めた。そこで、iNOS を長期的に阻害することで TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心不全の発症と進展

を阻止することが可能ではないかと考え、iNOS ノックアウトマウスとの交配によって iNOS 遺伝子が欠損した TNF- $\alpha$  過剰発現マウスを作成した。しかし、結果は、iNOS 遺伝子をノックアウトすることで  $\beta$  刺激時の収縮性は有意に改善したが、心不全の発症と進展を阻止することはできず、生存率の有意な改善は得られなかった。よって、炎症性サイトカインによる心筋障害の過程において、NO 以外の経路がより重要であることが示唆された。

一方、活性酸素種についての検討では、TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋において活性酸素種の増加とミトコンドリアの破壊が認められた。虚血心筋においては、TNF- $\alpha$  の発現は Mn-SOD を誘導することで心筋保護的に作用していることが示唆されているが、TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心筋ではむしろ Mn-SOD は減少しており、ミトコンドリアの障害を反映しているものと思われた。培養心筋細胞における結果を考慮に入れると、心筋における持続的な TNF- $\alpha$  の発現はミトコンドリアを障害し、活性酸素種の産生増加を介して、心筋傷害的に作用している可能性が示唆された。今後、活性酸素種の抑制によって心不全の発症と進展を阻止することか可能か否か検討していく予定である。

## 結論

iNOS を阻害することで  $\beta$  刺激時の収縮力は有意に改善したが、TNF- $\alpha$  過剰発現マウスの心不全発症を阻止することはできなかった。炎症性サイトカインによる心筋障害には、NO 以外の経路がより重要であることが示唆された。心筋における持続的な TNF- $\alpha$  の発現はミトコンドリアを障害し、活性酸素種の産生増加を介して、心筋傷害的に作用している可能性が示唆された。

## 研究発表

### 論文発表

1. Funakoshi H, Kubota T, Machida Y, Kawamura N, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Involvement of inducible nitric oxide synthase in cardiac dysfunction with tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H2159-2166.
2. Funakoshi H, Kubota T, Kawamura N, Machida Y, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Disruption of inducible nitric oxide synthase improves beta-adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Circ Res.* 2002; 90: 959-965.
3. Machida Y, Kubota T, Kawamura N, Funakoshi H, Ide T, Utsumi H, Li YY, Feldman AM, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha increases production of hydroxyl radical in murine myocardium. *Am J Physiol*

*Heart Circ Physiol.* 2003 ; 284 449-455.

4. Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* (in press)

# 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

佐田 政隆, 永井 良三

東京大学大学院医学系研究科循環器内科

## 研究要旨

心移植後の冠動脈硬化症の詳細な機序は不明であり、有効な治療法は確立していない。本研究では新生内膜細胞の起源の同定を試みると同時に薬物療法の効果を検討した。全身に LacZ もしくは GFP を発現するマウス、ならびにマーカー発現マウスの骨髄を移植したマウスを用いて異所性心臓移植を行った。FK506 により急性拒絶を制御し、一ヶ月後の動脈硬化病変を検討した。①移植後動脈硬化新生内膜の大部分 (88.3 ± 12.1%) の細胞はレシピエント由来であった。また、各種の平滑筋細胞マーカーの発現が確認された。②LacZ マウスと GFP マウス間の心移植では、細胞融合と思われる二重陽性細胞は検出されなかった。③骨髄移植マウスをレシピエントに用いたところ、骨髄由来細胞がグラフト新生内膜に認められた。④スタチンは有意に移植後動脈硬化を抑制した。⑤tranilast は新生内膜形成を有意に抑制した。TGF $\beta$ などのサイトカインの発現低下と新生内膜細胞の増殖抑制が認められた。以上より、骨髄などを起源とするレシピエント由来細胞が移植後動脈硬化の病態に貢献すると思われる。移植後動脈硬化予防のために有効な薬物療法の開発が期待される。

## 研究目的

欧米では、重症心疾患の治療として心臓移植が広く行われている。新規免疫抑制剤の開発により急性拒絶のコントロールは良好となったが<sup>1</sup>、「移植後動脈硬化」と呼ばれる原因不明の血管病変が生じ、再移植や死亡の原因となり長期予後を制限する。移植後動脈硬化症の原因は不明であり、治療法は確立していない。通常の粥状動脈硬化症と異なり、心移植後動脈硬化病変は瀰漫性で求心性であり、脂質の蓄積が少ない。

移植後動脈硬化病変では、血管内腔に新生内膜が形成され、その増殖によって管腔は狭小化する。この内膜の大部分は平滑筋細胞から構成されており、中膜の平滑筋細胞が遊走し増殖したものであると考えられてきた<sup>2</sup>。そして、その中膜平滑筋細胞の脱分化、遊走、増殖を制御する遺伝子治療、薬物療法が考案されてきた。心移植後の冠動脈硬化症の詳細な機序は不明であり、有効な治療法は確立していない。

本研究では、マウス心移植モデルを用いて、新生内膜細胞の起源を同定し、薬物療法の可能性を検討した。

## 研究方法

### (1) マウス異所性心臓移植

全身に LacZ 遺伝子を発現するマウス ROSA26 マウス (C57BL/6 x 129S background, (Stock number 002072)<sup>3</sup>)は米国ジャクソン研究所から購入した。他の野生型マウスは日本 SLC (静岡) から購入した。全ての実験手技は東京大学の「動物実験に関する指針」に沿い、米国国立衛生院の実験動物の取り扱いに関する指針に従った。7-9 週令の ROSA26 マウス (H-2<sup>b</sup>) と野生型 C3H/HeN マウス (H-2<sup>d</sup>) との間の異所性心臓移植は (それぞれをドナーもしくはレシピエントとして n=7) 以前報告された方法で行った<sup>1</sup>。さらには、7-9 週令の雌の BALB/c (H-2<sup>d</sup>) マウスから雄の C3H/HeJ (H-2<sup>k</sup>) マウスへの心臓移植を行った。急性拒絶の予防のため、すべてのレシピエントに FK506 を投与した (0.3mg/kg/日の腹腔内連日投与)。全身に LacZ もしくは GFP を発現するマウス、ならびにマーカー発現マウスの骨髄を移植したマウスを用いて異所性心臓移植を行った。FK506 により急性拒絶を制御し、一ヶ月後の動脈硬化病変を検討した。また、レシピエントに移植一週間前から薬物を連日投与し、グラフト動脈硬化への影響を検討した。

### (2) 薬物の投与

レシピエントマウスに、0.5% Carboxymethyl

Cellulose に懸濁した atorvastatin (10 mg/kg/day) もしくは tranilast (300 mg/kg/day) を経口ゾンデにて心移植一週間前から連日投与した。コントロールとして 0.5% Carboxymethyl Cellulose を投与した。Cerivastatin (6 mg/kg/day) は生理的食塩水に希釈して連日皮下に注射した。コントロールとして生理的食塩水を連日投与した。

### (3) Xgal 染色と免疫染色

LacZ マウスを用いた移植後 28 日目にレシピエントマウスは過剰量のペントバルビタールによって安楽死させた。その後、移植心臓を 4% のパラホルムアルデヒドによって灌流固定し、X-gal 染色液 (PBS 中に 1 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP40 を含有) を用いて 37°C で一昼夜染色した。その後パラフィンに包埋し、切片 (5  $\mu$ m) にヘマトキシリン染色を施行した。免疫染色は以前報告した方法で行った<sup>5</sup>。

### (4) プラスチック包埋と免疫蛍光

GFP の蛍光を保持するために、移植心臓は、生理的食塩水で灌流したのち 4% のパラホルムアルデヒドに固定し、プラスチック樹脂 (Technovit 8100, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) 中に包埋した。ポリマー化したブロック (Histobloc, Heraeus Kulzer) は特殊なナイフ (Histoknife, Heraeus Kulzer) を備えたマイクロトーム (HM335E, MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) を用いて薄切した。LacZ に対する蛍光二重染色は、MOM ブロッキングキットと抗 LacZ モノクローナル抗体 (clone GAL-13, Sigma, St. Louis, MO) を用いておこなった。

## 結果

### (1) レシピエント由来細胞で構成される新生内臓

野生型のマウスの心臓を全身にマーカー遺伝子 LacZ ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ) を発現するマウス (LacZ マウス) に移植した<sup>6</sup>。野生型のグラフト冠動脈にヒトと同様の求心性の動脈硬化が生じた。移植後動脈硬化新生内臓の大部分 (88.3  $\pm$  12.1%) の細胞はレシピエント由来であった。また、各種の平滑筋細胞マーカーの発現が確認された。この逆に、LacZ マウスの心臓を野生型マウスに移植した場合は、LacZ 陽性の中膜平滑筋細胞は中膜に留まり、新生内臓は LacZ 陰性のレシピエント由来の細胞で構成されていた。マクロファ-

ジは外膜に認められたが、新生内臓には認められなかった。T 細胞は血管壁には検出されなかった。このような病理像は野生型マウスを用いた移植臓器の病変と同等であった。同様の現象は、性不一致個体間心臓移植後の動脈硬化病変においても、Y 染色体をマーカーとした in situ hybridization によって確認された。この新生内臓は、平滑筋細胞に特異的なミオシン重鎖、カルポニン、h-カルデスモン、 $\beta$ アクチンを発現していた。7 以上の実験結果により流血中の前駆細胞が付着することで病変が形成されることが明らかとなった。

### (2) ドナー、レシピエント間の細胞融合の可能性

移植後動脈硬化において、レシピエント細胞とドナー細胞が融合する可能性を検討した。GFP マウスの心臓を LacZ マウスへ移植した場合、中膜は GFP 単独陽性細胞、新生内臓は LacZ 単独陽性細胞から構成されていた (図1)。LacZ マウスの心臓を GFP マウスへ移植した場合、中膜は LacZ 単独陽性細胞、新生内臓は GFP 単独陽性細胞から構成されていた。ドナー細胞とレシピエント細胞の融合と思われる両者陽性細胞はほとんどみうけられなかった。

### (3) レシピエント骨髄細胞の関与

レシピエント中の平滑筋前駆細胞の起源を同定するために、野生型マウスの骨髄を致死量 X 線で照射し LacZ マウスもしくは GFP マウス (全身に蛍光物質 GFP; green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白を発現するトランスジェニックマウス) の骨髄を移植した。骨髄、脾臓、胸腺などでは移植骨髄細胞が同定されたが、無傷の血管には骨髄細胞は定着していなかった。この骨髄移植マウスに野生型マウスの心臓を移植したところ、グラフト動脈硬化病変の 8 割以上の細胞は骨髄由来であった。

### (4) スタチンによる移植後動脈硬化の抑制

DBA2 から B10D2 へ移植する系においてレシピエントに atorvastatin 10mg/kg/day を連日投与した。移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内臓/中膜比: 1.6  $\pm$  0.3 vs 0.9  $\pm$  0.2) (図2)。BALB/c から C3H へ移植する系 (FK506 0.3 mg/kg/day 併用) においても、6mg/kg/day の cerivastatin の投与によって移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内臓/中膜比: 1.2  $\pm$  0.2 vs 0.7  $\pm$  0.1)。

### (5) Tranilast による移植後動脈硬化の抑制

DBA2 から B10D2 に移植するモデルにおいて、300 mg/kg/day の tranilast をレシピエントに連日投与したところ、グラフトに生じる新生内臓形成

が有意に抑制された（内膜/中膜比：0.8±0.1 vs 0.5±0.1；両群ともn=6）（図3）。Tranilastの投与によってTGFβなどのサイトカインの発現低下が認められた。また、Tranilastの投与によって新生内皮細胞でのp21の発現が増加した。また、それに伴ってPCNA陽性細胞の数が減少した。

## 考察

ある臓器のリモデリングは局所実質細胞の増殖と細胞死によると従来考えられてきた。ところが、体内には骨髄をはじめとしていろいろ臓器に幹細胞が存在し、遠隔臓器の損傷を感知して、動員分化増殖して、修復に関与していることが明らかになりつつある<sup>8-11</sup>。血管に関しても、免疫学的、機械的、液性（サイトカインや酸化脂質）傷害が血管に加わると骨髄から未分化細胞が動員され、平滑筋ないし内皮細胞に分化しようと考えられる<sup>12</sup>。そして、その修復反応が過剰になると病変形成にも関与すると想定される。

本研究の結果によると、移植後動脈硬化においても、血中に平滑筋前駆細胞が存在しており、傷害されたグラフト内皮に接着し平滑筋に分化し増殖することにより新生内皮を形成すると考えられる。筆者らの結果を追試する動物実験が見られるうえ<sup>13,16</sup>、ヒトの移植後動脈硬化でも同様の現象が生じていることが最近報告された<sup>17,18</sup>。

現在のところ、このような血管リモデリングに関与する前駆細胞は同定されていない。ES細胞で報告されたように、内皮細胞と平滑筋細胞の共通の血管前駆細胞というべき未分化細胞<sup>12</sup>が血中に存在し動脈硬化病変に関与しているのかもしれない<sup>19</sup>。もしくは、ある程度運命づけられた内皮前駆細胞と平滑筋前駆細胞というべきものが存在し必要な前駆細胞が選択的に取り込まれるのかもしれない。血中のどのような分画の細胞が病変形成に関与するのか、平滑筋細胞への分化と増殖がどのような分子機序で制御されているのかについて現在研究を進展させている。

昨年、骨髄細胞や神経幹細胞が共培養した細胞と自然に融合し酷似した表現系を示す現象が報告された<sup>20,21</sup>。本研究の結果によるとレシピエントの形質をもった細胞がグラフト新生内皮を構成する現象は、細胞融合のみでは説明できないようである。

スタチンはコレステロール降下剤として開発されたが、現在、その多面的な効果が注目されている。本研究で移植後動脈硬化を抑制したのもその免疫抑制作用が中心と思われる。それに加えて、スタチン

が骨髄由来の前駆細胞の動態にもなんらかの影響を与えているのかもしれない。今後の研究が期待される。

Tranilastは抗アレルギー剤として広く用いられている。また、冠動脈形成術後の再狭窄を予防するという報告もみられている<sup>22,23</sup>。Tranilastは細胞周期や炎症、増殖因子などに対して抑制的に作用する。現在安全に用いられている薬剤であり、単剤もしくは併用薬として、今後移植後動脈硬化症に対して有効性が示されることが期待される。

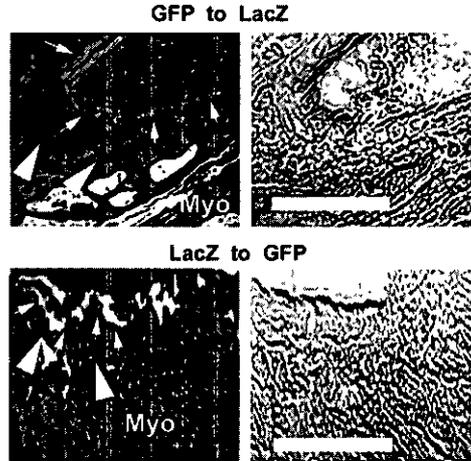
## 結論

移植後動脈硬化病変の新生内皮は、レシピエント由来の平滑筋前駆細胞がグラフトに定着して増殖することで生じることが明らかとなった。「平滑筋前駆細胞」がどのような性質の細胞であるのか、どのように骨髄から動員されるのか、どのように血管壁に定着し分化、増殖するのかについて今後研究が進展すると思われる。本研究の成果は、移植後動脈硬化症の病態生理に新しい視点を与えると同時に、「レシピエント由来の平滑筋前駆細胞の動員、定着、分化、増殖を標的とした移植後動脈硬化予防法の開発」へつながると期待される。

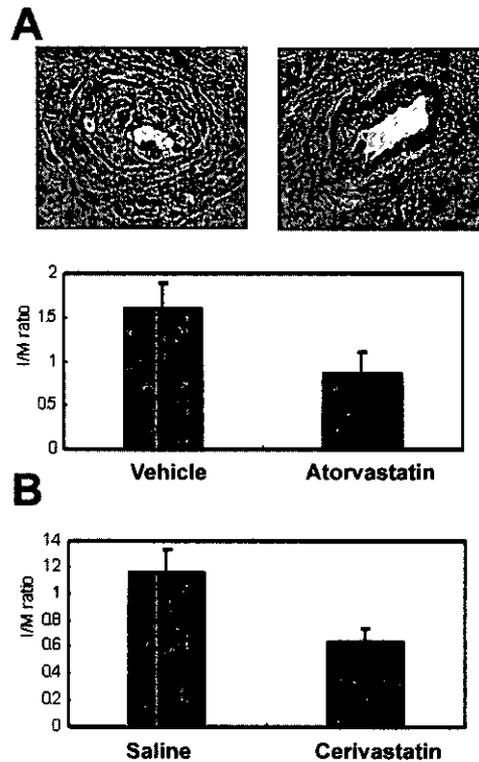
## 参考文献

1. Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplantation Proceedings* 1987; 19: 19-25
2. Ross R. Genetically modified mice as models of transplant atherosclerosis. *Nature Med.* 1996; 2: 527-528
3. Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG and Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA βgeo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 3789-3794
4. Corry RJ, Winn HJ and Russell PS. Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation.* 1973; 16: 343-350.
5. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y and Nagai R. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32: 2097-2104
6. Saura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R and Makuuchi M. Circulating smooth muscle

- progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med.* 2001 ; 7 : 382-383.
7. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y and Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002 ; 8 : 403-409.
  8. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J and Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 2000 ; 406 : 257.
  9. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalmy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL and Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000 ; 2000 : 1229-1234.
  10. McKay R. Stem cells-hype and hope. *Nature.* 2000 ; 406 : 361-364.
  11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzgenbichler B, Schatteman G and Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 ; 275 : 964-967.
  12. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K and Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 2000 ; 408 : 92-96.
  13. Plissonnier D, Nochy D, Poncet P, Mandet C, Hinglais N, Bariety J and Michel JB. Sequential immunological targeting of chronic experimental arterial allograft. *Transplantation.* 1995 ; 60 : 414-424.
  14. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P and Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001 ; 7 : 738-741.
  15. Hillebrands JL, Klatter FA, van Den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P and Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001 ; 107 : 1411-1422.
  16. Hillebrands J, B.M. vdH, Klatter FA, Popa ER, Nieuwenhuis P and Rozing J. Recipient origin of neointimal vascular smooth muscle cells in cardiac allografts with transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transplant.* 2000 ; 19 : 1183-1192.
  17. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, Stern E and Rush DN. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* 2001 ; 345 : 93-97.
  18. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA and van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet.* 2001 ; 357 : 33-37.
  19. Carmeliet P. One cell, two fates. *Nature.* 2000 ; 408 : 43-45.
  20. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE and Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002 ; 416 : 542-545.
  21. Ying QL, Nichols J, Evans EP and Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002 ; 416 : 545-548.
  22. Tamai H, Katoh O, Suzuki S, Fujii K, Aizawa T, Takase S, Kurogane H, Nishikawa H, Sone T, Sakai K and Suzuki T. Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty : tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT). *Am. Heart J.* 1999 ; 138 : 968-975.
  23. Kosuga K, Tamai H, Ueda K, Hsu YS, Ono S, Tanaka S, Doi T, Myou-U W, Motohara S and Uehata H. Effectiveness of tranilast on restenosis after directional coronary atherectomy. *Am. Heart J.* 1997 ; 134 : 712-718.
  24. Hsu T-S, Tamai H and Ueda K. Efficacy of tranilast on restenosis after coronary stenting (abstract). *Circulation.* 1996 ; 94 (suppl I) : I-620.



**図1** レシピエント細胞とドナー細胞の融合の可能性  
 全身にマーカー遺伝子 LacZ ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ) を発現するマウス (LacZ マウス) と GFP (Green Fluorescence Protein 緑色蛍光蛋白) を発現するマウス (GFP マウス) との間で心臓移植を行い、レシピエント細胞とドナー細胞が融合する可能性を検討した。GFP マウスの心臓を LacZ マウスへ移植した場合 (上段)、中膜は GFP 単独陽性細胞、新生内膜は LacZ 単独陽性細胞から構成されていた。LacZ マウスの心臓を GFP マウスへ移植した場合 (下段)、中膜は LacZ 単独陽性細胞、新生内膜は GFP 単独陽性細胞から構成されていた。ドナー細胞とレシピエント細胞の融合と思われる両者陽性細胞はほとんどみられなかった。Bar, 50  $\mu$ m.



**図2** スタチンによる移植後動脈硬化の抑制  
 A. DBA2 から B10D2 へ移植するモデルにおいてレシピエントに atorvastatin 10mg/kg/day を連日投与したところ、移植後動脈硬化の病変形成を有意に抑制された (内膜/中膜比:  $1.6 \pm 0.3$  vs  $0.9 \pm 0.2$ )  
 B. BALB/c から C3H へ移植するモデル (FK506 0.3 mg/kg/day 併用) で Cerivastatin (6 mg/kg/day) は生理的食塩水に希釈して連日皮下に注射した。コントロールとして生理的食塩水を連日投与した。6mg/kg/day の cerivastatin の投与によって移植後動脈硬化の病変形成が有意に抑制された (内膜/中膜比:  $1.2 \pm 0.2$  vs  $0.7 \pm 0.1$ )。

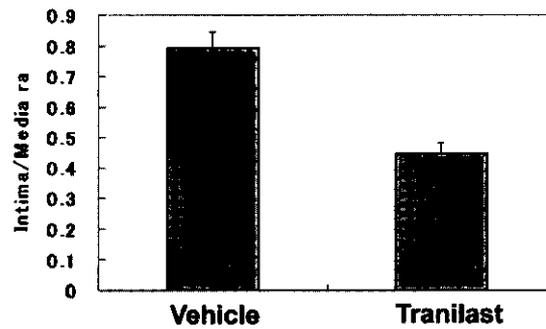
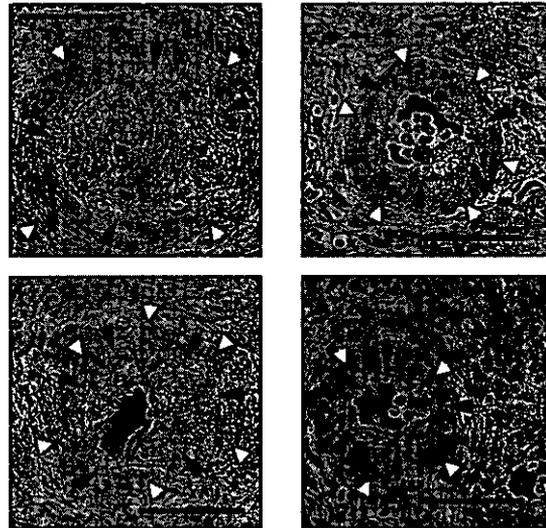


図3 Tranilastによる移植後動脈硬化の抑制

DBA2からB10D2に移植するモデルを用いた。心移植一週間前から0.5% Carboxymethyl Celluloseに懸濁したtranilast (300 mg/kg/day) もしくは0.5% Carboxymethyl Cellulose (Vehicle) を経口ゾンデにて連日投与した。コントロールとして0.5% Carboxymethyl Celluloseを投与した。グラフトに生じる新生内膜形成が有意に抑制された(内膜/中膜比:  $0.79 \pm 0.05$  vs.  $0.45 \pm 0.04$ ; 両群とも  $n=6$ )。Bar, 50  $\mu$ m.

# 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

鄭 忠和

鹿児島大学第一内科

## 研究要旨

核内膜に存在する蛋白の一つである lamin A/C の異常で、常染色体優性遺伝形式を呈し、房室伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症が引き起こされることが報告されている。今回我々は、房室伝導障害を伴う拡張型心筋症症例と伝導障害を伴わない拡張型心筋症症例の遺伝子解析を行い、房室伝導障害を伴う拡張型心筋症症例からこれまでに報告されていない点変異（R190W, I210N, L215P, R377L）を見いだした。また、遺伝子異常を持つ症例の心筋病理所見を検討したところ、房室伝導系を中心に高度な脂肪変性か認められた。一方、房室伝導障害を伴わない拡張型心筋症症例からは lamin A/C 遺伝子の異常は見いだされなかった。以上のことから、lamin A/C 遺伝子の異常は種々の程度の房室伝導障害を伴う拡張型心筋症を引き起こすと考えられた。

## 研究目的

核内膜に存在する蛋白の一つである lamin A/C の異常で、常染色体優性遺伝形式を呈し、房室伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症が引き起こされることが報告されている。今回、我々は房室伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症 23 家系と、房室伝導障害を伴わない家族性拡張型心筋症 20 家系の遺伝子解析を行い、また病理所見を検討した。

## 研究方法（倫理面への配慮）

診断は、心電図・心エコー図・病理所見・家族歴などから行い、すべての患者からインフォームドコンセントを得た後、末梢血から DNA を抽出した。PCR 法を用いて DNA を増幅後、直接塩基配列決定法にて lamin A/C 遺伝子の解析を行った。解析の結果見つけたそれぞれの変異は制限酵素（Family 1: Fau I, Family 2: Spe I, Family 3: AlwN I, Family 4: Sml I）を用いて確定した。また遺伝子解析の了解を得た 150 人を正常コントロール群とした。点変異を持つ 1 症例から、心筋連続切片を作成し、その病理所見の検討も行った。

## 研究結果

遺伝子解析を行った結果、房室伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症 23 家系中 4 家系（Fig 1）から、異なる 4 つの点変異 Arg190Trp（R190W）、Ile210Asn（I210N）、Leu215Pro（L215P）、Arg377Leu（R377L）を見つけた（Fig 2）。これらの点変異は、すべて lamin A/C の Rod の部分

に位置しており、いずれもアミノ酸を変化させ、置換されたアミノ酸は進化の過程において高度に保存させていた。また正常コントロール群に、同じ変異がないことを確認した。以上のことから、これら 4 つの変異はそれぞれの家系の原因となりうる異常であると考えられた。一方、房室伝導障害を伴わない家族性拡張型心筋症 20 家系からは lamin A/C 遺伝子上に異常は見つけられなかった。R190W の点変異を持つ症例の心筋病理所見を検討したところ、房室伝導系を中心に脂肪変性か認められた。心筋自体にはそのような所見は認められなかった。

## 考察

常染色体優性遺伝形式を呈する家族性拡張型心筋症の病因としてこれまでに 8 種類の遺伝子（lamin A/C<sup>1)</sup>、Troponin T<sup>2)</sup>、Titin<sup>3)</sup>、beta myosin heavy chain<sup>4)</sup>、alpha tropomyosin<sup>5)</sup>、cardiac actin<sup>6)</sup>、desmin<sup>7)</sup>、delta sarcoglycan<sup>8)</sup>）が報告されている。その中の 1 つである lamin A/C は核膜内側に存在し、核の構造の維持・安定性に関与している<sup>4)</sup>。lamin A/C 遺伝子の異常による家族性拡張型心筋症においては、房室ブロックの合併が高率である事が特徴である<sup>1)</sup>。一方、lamin A/C 遺伝子の異常は、骨格筋障害を主症状とする疾患（Emery-Dreifuss muscular dystrophy<sup>9)</sup>、Limb-Girdle muscle dystrophy 1B<sup>10)</sup>）、脂肪変性を主症状とする familial partial lipodystrophy (FPLD)<sup>11)</sup>）からも報告されている。拡張型心筋症の症例から見つかった点変異は、lamin A/C の rod に集中しているのに対し、骨格筋障害を主症状とする疾患から見

つかった異常は, lamin A/C 遺伝子全体に散在し, FPLD から見つかった異常は lamin A/C 遺伝子の tail 部分に集中している, という特徴がある. lamin A/C 遺伝子に異常が見つかった, 房室伝導障害を伴う拡張型心筋症例はいずれも骨格筋障害を臨床上有しておらず, Creatine Kinase も正常内であったことから, lamin A/C の rod の部分は心筋に特に重要な働きを持っていると推測される. また, 房室伝導障害を伴わない拡張型心筋症の症例からは lamin A/C 遺伝子の異常は見つからなかったことから lamin A/C が刺激伝導系にも重要な働きを持つと推測される.

今後, 以上のことをさらに検討するため, 現在我々はモデルマウスを作成中である.

## 結論

房室伝導障害を伴った家族性拡張型心筋症から, lamin A/C 遺伝子の 4 つの点変異を見つけた. 房室伝導障害を伴わない家族性拡張型心筋症からは異常は見つけられなかった. 点変異を持つ症例の病理所見上, 刺激伝導系を中心に認められる脂肪変性が, 種々の程度の房室伝導障害を伴った拡張型心筋症を引き起こすと考えられた.

## 参考文献

1. Fatkin D, Macrae C, Sasaki T, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med.* 1999 ; 34 : 1715-1724.
2. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000 ; 343 : 1688-96.
3. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 2002 ; 30 (2) : 201-4
4. Olson TM, Michel VV, Thibodeau SN, et al. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 1998 ; 280 : 750-752.
5. Li D, Tapscoft T, Gonzales O, et al. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1999 ; 100 : 461-464.
6. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, et al. Mutations in the human  $\delta$ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000 ; 106 : 655-662.
7. Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclea lamins : their structure, assembly and interactions. *J Struct Biol.* 1998 ; 122 : 42-66.
8. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1999 ; 21 : 285-288.
9. Muchir A, Bonne G, van der Kooij AJ, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet.* 2000 ; 9 : 1453-1459.
10. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* 2000 ; 24 : 153-156.

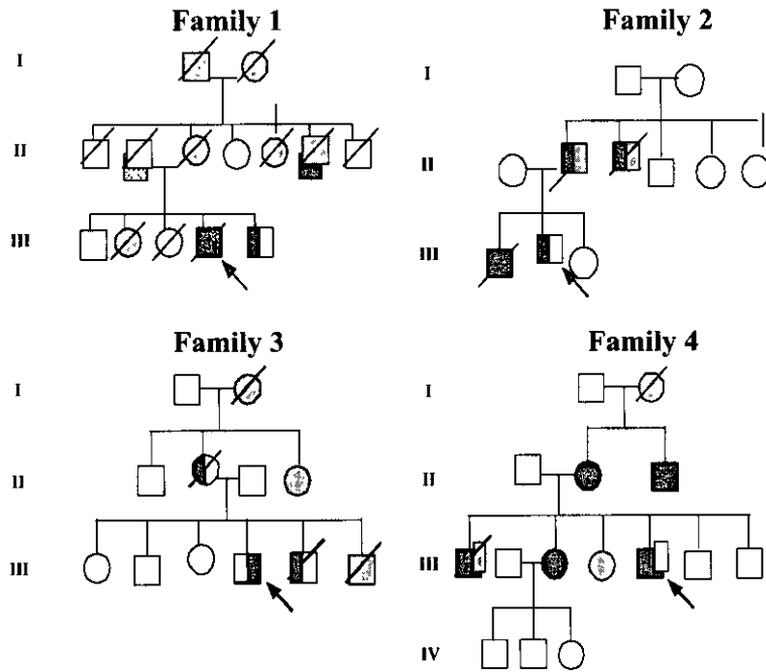


Fig. 1 lamin A/C 遺伝子に点変異が見つかった 4 家系の家系図. (矢印：発端者. 左塗りつぶし：拡張型心筋症あり. 右塗りつぶし：房室伝導障害あり. +：遺伝子異常あり. -：遺伝子異常なし. 斜線：死亡.)

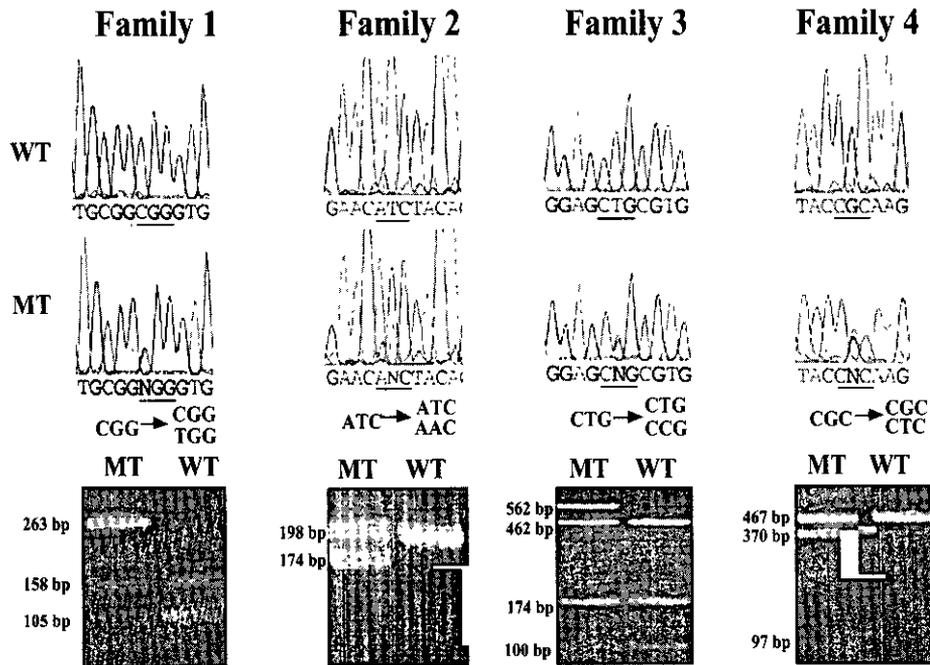


Fig. 2 遺伝子解析. 上段に解析結果, 下段に制限酵素処理後の PCR 産物切断片.

Pathological findings of AV Conduction system in Family 1  
(R190W)

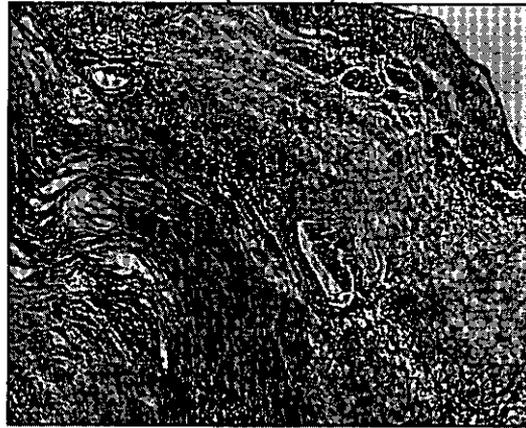


Fig. 3 病理組織像. 房室伝導系周囲の高度な脂肪変性が認められる.

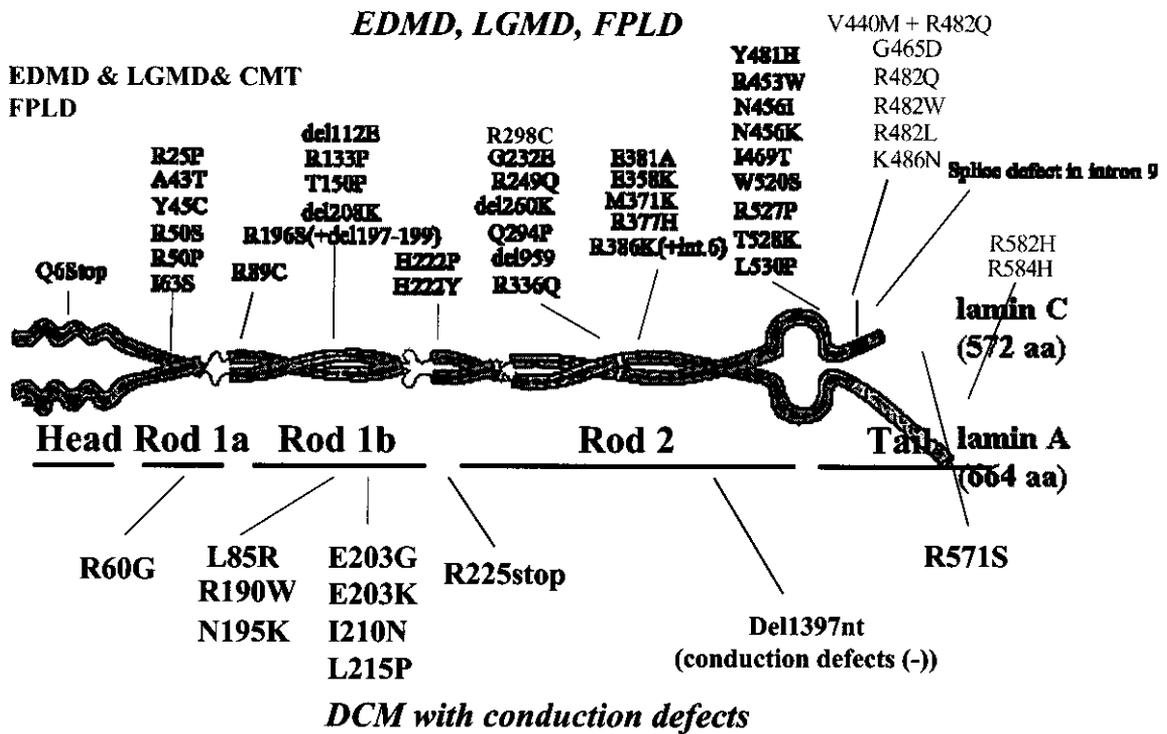


Fig. 4 過去に報告された lamin A/C 遺伝子異常と、今回報告した点変異. 上段は、Emery-Dreifuss muscular dystrophy, Limb-Girdle muscle dystrophy, Familial partial lipodystrophy (赤字) から報告された異常. 下段に、房室伝導障害を伴った拡張型心筋症から報告された異常. 今回報告した異常はイタリック体で示す.