

# 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

由谷 親夫, 福原 慎也, 富田 伸司, 中谷 武嗣

国立循環器病センター臨床検査部

## 研究要旨

重症心不全に対する新治療法として細胞を介した心筋再生療法が注目されている。体外からの細胞移植が検討されている一方で、近年自己心筋の再生能の存在が示され、内因性幹細胞のメカニズムの解明/応用に大きな期待が寄せられる。今回、われわれは心筋再生しうる幹細胞の起源が骨髄であるという仮説のもとに、GFP キメラマウスを作成し虚血心・非虚血性心不全モデルに遊走した細胞の起源と、心筋分化現象を検討した。その結果 G-CSF は骨髄細胞を梗塞部位および心筋障害部位により多く誘導し、心筋細胞に分化した。また心筋細胞の障害も G-CSF によって悪化は改善した。

## 研究目的

われわれは心筋再生しうる幹細胞の起源が骨髄であるという仮説のもとに、GFP キメラマウスを作成し虚血心・非虚血性心不全モデルに遊走した細胞の起源と、心筋分化現象を検討した。また G-CSF の有効性について検討した。

## 研究方法（倫理面への配慮）

C57BL/6 マウスに 900 cGy の致死照射を行い、GFP マウス由来の骨髄細胞 (GFP-BMC) ( $1 \times 10^6$  個) を尾静脈から移植した。移植 4 週間後、脾摘に続いて左前行枝冠動脈を結紮し、4 週間後に G-CSF 投与群 ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) (I 群) と非投与群間 (II 群) で心臓と他臓器 (肺・小腸・腎・脊髄) を組織学的に検討した。また GFP-BMC 移植後に Doxorubicin ( $2.5\text{mg}/\text{kg}$ ) を腹腔内投与して心筋症心不全モデルを作成し、8 週間後に G-CSF 投与群 (I 群) と非投与群 (II 群)、生食投与群 (III 群) 間で心臓を組織学的に検討した。

## 研究結果

キメラマウスのキメラ率は 59.4% であった。生存率は、II 群が 37.5% であったのに対し、I 群は 80% に改善した ( $p=0.06$ )。梗塞部位に誘導される GFP-BMC 数は II 群 ( $10.4 \pm 5.6/\text{mm}^2$ ) に比して I 群 ( $24.5 \pm 17.1/\text{mm}^2$ ) で有意に高値であった ( $p < 0.0001$ )。

誘導された GFP-BMC は troponin I, MHC-slow, nestin の発現を認めたが、2 群間に差は認められなかった。しかし、Ki-67 の発現を認めた GFP-BMC 数は II 群 ( $1.2 \pm 1.4/\text{mm}^2$ ) に比して I

群 ( $2.4 \pm 1.6/\text{mm}^2$ ) において大であった ( $p=0.01$ )。

梗塞部位の面積は 2 群間で差はなかった。梗塞巣に誘導された細胞のなかで GFP negative/TnI, MHC, nestin, Ki-67 positive の発現を有する細胞数について両群間で差はなかった。また、傷害が認められていない他臓器にも GFP-BMC は認められたが、炎症性変化や梗塞は認められなかった。

Doxorubicin 心不全モデルでは I 群の心臓で認められた GFP-BMC 数は  $15.4 \pm 7.4/\text{HPF}$  であり、II 群 ( $11.3 \pm 5.6/\text{HPF}$ )、III 群 ( $7.2 \pm 2.8/\text{HPF}$ ) よりも高値であった ( $p < 0.05$ )。I 群における GFP-BMC 免疫染色陽性率は troponin I は  $4.3 \pm 2.5\%$ 、MHC-slow  $5.0 \pm 4.3\%$ 、ANP  $3.9 \pm 2.4\%$ 、connexin43  $11.9 \pm 3\%$  であった。生存率は I 群は 81.8%、II 群は 50.0%、III 群は 62.5% であった。全群において他臓器 (肝臓、肺、脊髄、腎臓、小腸) に炎症反応は認められなかった。

## 考察

G-CSF は心筋梗塞後の生存率を伸ばした。G-CSF は骨髄細胞を梗塞部位へ誘導させ、心筋に分化することを促した。傷害された臓器以外に影響は認められなかった。また G-CSF 投与により骨髄幹細胞は Doxorubicin 拡張型心筋症モデルの心臓により多く遊走され、心筋細胞に分化した。Doxorubicin モデルにおいても生存率は G-CSF 投与により改善の傾向にあった。

## 結論

内因性幹細胞が虚血性心疾患だけでなく非虚血性心疾患である心筋症にも効果的であると考えられる。

**研究発表**

**論文発表**

1. S.Fukuhara, S. Tomita, T. Nakatani, Y. Ohtsu, M. Ishida, C. Yutani, S. Kitamura. G-CSF promoted bone marrow cells to migrate into infarcted heart and differentiate into cardiomyocytes. (AHA 75st Scientific Sessions 2002, Chicago, USA)

# 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

宮武 邦夫

国立循環器病センター

## 研究要旨

$\beta$ 遮断薬は慢性心不全、特に拡張型心筋症の基本的治療薬となったが、 $\beta$ 遮断薬がなぜ心機能を改善するかは明らかではなく、かつ $\beta$ 遮断薬の効果が少ない症例も少なからず存在する。特に、無効例ではその予後は不良で外科的治療や両心室ペースングなど他の治療法を時期を逸せず的確に選択する必要がある。そこで、慢性心不全に対する $\beta$ 遮断薬の作用機序の解明は $\beta$ 遮断薬の使用法や慢性心不全患者の治療選択に極めて重要である。

## 研究目的

拡張型心筋症患者において $\beta$ 遮断薬の慢性投与はACE阻害薬やアンギオテンシンII拮抗薬と異なり、心臓サイズを有意に減少させ、駆出率（EF）を増大させる（リバース・リモデリング）。本研究の目的はこのリバース・リモデリングの機序を解明することである。

## 研究方法（倫理面への配慮）

$\beta$ 遮断薬投与前と投与4ヶ月後に右室心筋生検を施行し、EF、血中BNP濃度と心筋の病理組織学的変化との関連を検討した。施行にあたり、当センターの倫理委員会の承諾を得て、患者には文書にてインフォームド・コンセントを得た。

## 研究結果

$\beta$ 遮断薬により有意に左室容積は減少、EFは増大、BNPは低下した。心筋サイズは変化なく、間質の浮腫は減少し、細胞間線維化がわずかに増加した。また、心筋細胞の変性は改善した。

## 考察

$\beta$ 遮断薬による心機能の改善には、心筋細胞密度の増加、心筋細胞変性の改善を伴うものと考えられた。今後は心筋細胞変性改善の意義の解明が重要と思われる。

## 結論

$\beta$ 遮断薬による心機能の改善には心筋細胞の病理組織学的構造の改善を伴うことがわかった。

# DNA アレイと SNPs 解析による慢性心不全の病態解明

北風 政史

国立循環器病センター

## 研究要旨

新しい遺伝子解析技術である DNA アレイ・SNPs 解析を用いて心不全の病態を遺伝子の観点から評価し、新しい心不全診断・治療に資することがが待ち望まれている。そこで、本研究では、DNA アレイ・SNPs 解析により心不全における遺伝子発現の変化を解析し、遺伝子発現から見た心不全の病態評価の可能性について検討した。前年度までに様々な知見が得られているが、今年度はアデノシン関連遺伝子について解析を行いアデノシンの代謝・受容体の発現異常が心不全の病態に大きく関与することが遺伝子発現の解析からも明らかになった。

## 研究目的

近年、遺伝子解析技術の急速な進歩により、循環器病態解明・新しい診断・治療法開発へのアプローチの方法が大きく転換しつつある。特に、テーラーメイド医療に向けて、新しい遺伝子解析技術である DNA アレイ・SNPs 解析を用いて心不全の病態を遺伝子の観点から評価し、新しい心不全診断・治療に資することがが待ち望まれている。そこで、本研究では、DNA アレイ・SNPs 解析により心不全における遺伝子発現の変化を解析し、遺伝子発現から見た心不全の病態評価の可能性について検討した。

## 研究方法（倫理面への配慮）

我々は心不全の病態に深くかかわっていると考えられるアデノシン関連遺伝子について DNA チップの結果解析を行った。

研究の遂行にあたっては、文書による説明と同意を得て行っている。また、遺伝子情報に関しては「連結可能匿名化」を行い、個人特定が出来ないようにした。

## 研究結果

前年度までに以下の点について報告した。

①DNA チップの結果より EST も含めた約 5 万個の遺伝子のうちその発現が正常の 3 倍以上に上昇した遺伝子は約 500 個、3 分の 1 以下に低下した遺伝子は 200 個程度であり、大多数の遺伝子については発現レベルの大きな変動はなかった。また、変動した遺伝子群についてクラスター解析を行ったが、従来の臨床的特徴による分類とは必ずしも一致しなかった。しかし従来から心不全で変動す

ることが知られている BNP 遺伝子と同様の変化をする遺伝子が 100 個程度見つかりその中に心不全関連遺伝子が含まれていると考えられた。  
②心不全患者における SNPs の解析を開始しており、現在までに約 200 例の検体に対して標的遺伝子の SNPs 解析が可能となっている。

③約 1200 のイヌ心臓関連遺伝子の DNA アレイを作成し高頻度ペースティングイヌ心不全モデルの遺伝子発現レベルの変化を解析した。

今年度のアデノシン関連遺伝子の解析において以下の点が明らかになった。

心保護に関係するアデノシンの関連遺伝子に関しては、その産生・分解系においては ecto-5'-nucleotidase の発現増加、adenosine deaminase 発現低下、など心筋内アデノシンレベルを増加させる方向の変化が見られた。かかる遺伝子変化は血中 BNP レベルや心エコーで求めた左室駆出率と良好な相関を認めたことより、心不全の病態と密接に結びついていることが示唆された。一方、アデノシン受容体の遺伝子発現は低下し、特に adenosine A2a receptor 発現低下が著明であった。

## 考察

不全心筋のアデノシン関連遺伝子の解析から、アデノシンの代謝・受容体の発現異常が心不全の病態に大きく関与することが示された。

## 結論

新しい遺伝子解析技術である DNA アレイ解析は不全心に対する新しい診断・治療に有用であると考えられた。

# 転写因子 ATF3 による心筋保護療法の開発に向けての研究

磯部 光章

東京医科歯科大学大学院循環制御学

## 研究要旨

われわれは以前より遺伝子治療の技法を用いた心筋保護療法の開発に従事してきたが、最近、転写因子の一つである ATF3 (activated transcriptional factor 3) が心筋においてアポトーシスを抑制することを見いだした。培養心筋細胞にアドリアマイシンを作用させると心筋のアポトーシスが誘発されるが、それに ATF3 を発現するアデノウィルスベクターを作製し作用させたところ、ATF3 の強制発現によりアドリアマイシンによる心筋細胞のアポトーシスが抑制されることが、FACS 解析や TUNEL 法により示された。

さらにわれわれは、培養心筋細胞における虚血再灌流において ATF3 の発現亢進が経時的に認められること、またそれによるアポトーシスを ATF3 アデノウィルスが抑制することを見いだした。ATF3 の抗アポトーシス作用は c-jun などの転写亢進作用を ATF3 homodimer が抑制するために起こると推定し、ゲルシフトアッセイを用いてそのメカニズムに関して検討した。その結果、アポトーシス誘導因子の p53 の上流にある AP-1-like site に ATF3 が強く結合されることが示された。このことは c-jun などの転写亢進因子の結合を抑制することにより p53 の発現が抑制され、アポトーシスが抑えられることを示唆する。

現在、ラットの心筋虚血モデルに ATF3 アデノウィルスを作用させ、in vivo において抗アポトーシス効果があるか否かを検討中である。これらが確認されれば、ATF3 アデノウィルスを用いた新しい心筋保護遺伝子治療への道が開けるものと考えられる。

## 研究目的

新しい心筋細胞保護因子としての ATF3 による心筋アポトーシスの抑制効果を検討する。

## 研究方法（倫理面への配慮）

1. 生後 2-3 日の新生児ラットの培養心筋細胞を使用した。
2. ドキソルビシン刺激後の ATF3 および p53 の発現誘導を Northern blot, Western blot にて評価した。
3. TUNEL 染色, flow cytometry, 細胞数計測により、ドキソルビシン誘導性アポトーシスの評価をおこなった。
4. 気密チャンバーを用いた低酸素刺激虚血再灌流モデルによる心筋細胞アポトーシスに関しても同様の実験を行った。
5. アデノウィルスを用いた ATF3 の過剰発現によるアポトーシスへの影響の検討した。
6. 心筋細胞核抽出蛋白と AP-1 site の結合を Gel shift assay で評価した。

## 研究結果

1. アドリアマイシンにより培養心筋細胞における ATF3 の遺伝子発現, 蛋白発現が亢進した。
2. ATF3 を発現するアデノウィルス (AxATF3) によりアドリアマイシンによる心筋アポトーシスが抑制された (TUNEL 染色, flow cytometry, 細胞数計測による評価)。
3. 虚血再灌流により培養心筋細胞における ATF3 の遺伝子発現, 蛋白発現が亢進した。
4. ATF3 を発現するアデノウィルス (AxATF3) により虚血再灌流による心筋アポトーシスが抑制された (TUNEL 染色, flow cytometry, 細胞数計測による評価)。
5. 心筋細胞核抽出蛋白で AP-1-like site に ATF3 が結合結合することが Gel shift assay で確認された。

## 考察

本研究により ATF3 に心筋保護作用があることが示された。その機序としてアポトーシス誘導因子である p53 の抑制が考えられた。今後の研究の発展により ATF3 アデノウィルスを用いた新しい心

筋保護遺伝子治療への道が開けるものと考えられた。

## 結論

ATF3 の過剰発現により心筋細胞アポトーシスが抑制された。

## 研究発表

### 論文発表

1. Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda M. Tamamori-Adachi M, Ito H, S Piyamas. et al. Critical role of Cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res.* 92 12-19, 2003
2. Tamamori-Adachi M, Ito H, Nobori K, Hayashida K, Kawauchi J, Adachi S, Ikeda M, Kitajima S. Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture : a possible implication for cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 296 (2) : 274-80, 2002
3. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, Adachi S, Ono Y, Kawauchi J, Kitajima S, Marumo F, Isobe M. ATF3 Inhibits Doxorubicin-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes : A Novel Cardioprotective Role of ATF3. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34 ; 1387-1392, 2002

### 学会発表

1. Tamamori-Adachi M, Ito H, Adachi S, et al. Induction of cardiac muscle cell proliferation by transport of cyclin/D1CDK4 to nucleus. 75th American Heart Association, Scientific Sessions, 2002, Chicago
2. Nobori K, Ito H, Tamamori-Adachi M, et al. Overexpression of ATF3 Inhibits Doxorubicin-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. 75th American Heart Association, Scientific Sessions, 2002, Chicago
3. Ito H, and Tamamori M (2002) Regeneration of cardiac myocytes by cell cycle regulators (指名) . The International Society for Heart Research, The 19th Annual Meeting of the Japanese Section, Yamagata
4. Nobori,K., Ito,H., Adachi,S. et al. (2002) ATF3 Inhibits Doxorubicin-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Sapporo.
5. Horikawa,T., Hirao,K., Miyazaki,S, et al. (2002) Experimental atrial fibrillation originated from the pulmonary vein : Importance of vagal stimulation and driving force. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Sapporo.
6. Maejima,Y., Ito,H., Adachi,S. et al (2002) Oxidative Inhibits Ischemia-Reperfusion-induced Myocardial Apoptosis by Suppression of Cyclin A- associated Kinase Activity.. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Sapporo.
7. Adachi,S., Ito,H., Maejima,Y. et al. (2002) Cyclin A/cdk2 kinase activity regulates apoptosis of cardiomyocytes induced by doxorubicin.. The 66th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Sapporo.
8. 安達 進, 伊藤 宏, 磯部光章, ら (2002) G2期のDNA傷害性アポトーシスにおけるc-Mycの役割 第25回日本分子生物学会総会, 横浜
9. 野堀 潔, 伊藤 宏, 玉盛三美, ら (2002) アデノウィルスベクターを用いたATF3遺伝子導入による, 心筋培養細胞のドキシソルピシン誘導性アポトーシスの抑制についての検討. 第

31回日本心脈管作動物質学会,

10. Nobori,K., Ito,H., Tamamori,M. et al. (2002) ATF3 inhibits Doxorubicin-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. The 6th Scientific Sessions, Japanese Society of Heart Failure. Tokyo

# 不全心筋に対する移植心筋組織構築のための 新規組織工学的的手法に関する研究

岡野 光夫

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

## 研究要旨

重症心不全に対する新たな治療法として細胞から組織を作製し移植しようとする研究が始まっている。世界的には心筋細胞を生体吸収性の3次元支持体に播種・培養し心筋組織を作製する手法が用いられているが、我々はシート状のラット心筋細胞を積層化することで3次元組織を構築することに成功し、肉眼レベルで同期して拍動する心筋組織の構築を可能とした。さらに皮下に移植した心筋組織が1年の長期にわたって拍動を維持して生存することを確認した。

## 研究目的

近年、幹細胞生物学の発展により、胚性幹細胞や骨髄間質細胞からヒトに移植可能な心筋細胞の分化誘導法が確立される可能性が示唆され、拡張型心筋症などの心不全患者に対する新たな治療法として心筋細胞移植療法が世界的に注目されている。さらに組織工学的的手法による培養心筋組織構築の実現が期待されている。当研究室では低温処理のみで培養した細胞をシート状に回収できる温度応答性培養皿を用いた細胞シートを積層化することで3次元組織を再構築する新規手法を追究している。本研究ではこの手法により心筋細胞シートを積層化することにより3次元心筋組織を再構築し、ヒトに移植可能な心筋グラフト創成への基盤技術を確立することを目的としている。

## 研究方法（倫理面への配慮）

シート状の細胞の回収には温度応答性培養皿を用いた。この培養器材は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を電子線照射により表面修飾したもので、通常の培養温度である37℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿を使うと、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である。さらに、細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、低温処理により細胞がその下面の接着因子とともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため細胞をシート状に回収できる。この培養皿状に新生仔ラット心筋細胞を培養し細胞シートを作製した。低温処理により脱着した細胞シー

トを積層化、電気生理学的解析および組織学的解析を行った。さらに、積層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植、皮膚表面電位を測定、さらに切開してその収縮弛緩、組織像を経時的に観察した。実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

## 研究結果

低温処理により脱着した心筋細胞シートを重層化したところ2枚の細胞シートは同期して拍動し、組織切片にて多数のコネキシン43の発現を認めたことより、重層化心筋細胞シート間の形態的および電気的結合が示された。さらに、4層まで積層化したところ、肉眼レベルで同期して収縮弛緩運動することが確認された。次に、重層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植した結果、ホスト心臓とは異なるグラフト由来の皮膚表面電位が確認された。移植部を切開したところ心筋グラフトが肉眼レベルで自発的に収縮弛緩していた。グラフト内には数日中に多数の毛細血管網新生が確認された。組織切片上、伸展し横紋を有する心筋細胞ならびに細胞間にはデスモゾームやギャップジャンクションを認め心筋様組織が再構築されていた。さらに長期にわたって観察したところ心筋組織がホストラットの成長に伴いその大きさ厚さを増大しより大きな収縮力を示す結果を得た。さらに最長1年までその拍動を維持して生存することを確認した。

## 考察

シート状の心筋細胞の積層化によりシート間に電気的、形態的な結合ができ全体が同期して拍動したことはさらなる積層化によりより厚く高機能な移植心筋組織作製の可能性を示唆するものであり、心筋

症による重症心不全に対する新たな治療法となることが期待される。

## 結論

温度応答性培養皿を用いた心筋細胞シートの積層

化により同期して自律拍動する心筋グラフトの in vitro および in vivo での作製が可能となった。細胞シート工学は、既存の技術では不可能であったことを可能としており、不全心筋組織に対する移植片の構築に貢献するものと考える。

## 研究発表

### 論文発表

1. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Tissue engineering for myocardial regeneration. *J Artif Org.* 5 : 216-222, 2002
2. 清水達也, 岡野光夫. 組織工学によるバイオ人工心臓. *救急・集中治療.* 14 : 1077-1085, 2002

### 学会発表

1. Cardiac BioInterventions (CBITM 2002) , 2002.10.4-5, San Francisco  
Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Long survival of tissue-engineered pulsatile cardiac tissue grafts.
2. The 75th Scientific Sessions of American Heart Association, 2002.11.17-20, Chicago  
Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Tissue-Engineered Cardiac Grafts Survive and Preserve Their Beating up to 6 Months in Rat Subcutaneous Tissues. *Supplement to Circulation* Vol.106, No.19, II-464 (2002)

# 骨髄成体幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発

福田 恵一

慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学

## 研究要旨

心筋梗塞部位に骨髄幹細胞が誘導され心筋再生が行われるか否か、さらにサイトカインにより心筋組織再生が促進されるか否かを解析した。GFP 強発現マウスの骨髄を放射線照射後の同系マウスに移植した。2 月後心筋梗塞を作成し、翌日より 10 日間 G-CSF, GM-CSF を投与した。心エコーにて心機能を評価後に心臓を摘出しレーザー顕微鏡により解析した。梗塞後 2 ヶ月の生存率は対照群 60%, G-CSF 群 90% で、著明な改善を認めた。GM-CSF 群では対照群に比し急性期の死亡率増加を認めた。G-CSF 群は対照群に比し心機能改善を認め、GM-CSF 群では増悪した。梗塞後 2 ヶ月の時点で梗塞部位に GFP 陽性細胞が多数観察され、その一部は心筋、血管内皮、平滑筋細胞に分化した。G-CSF により GFP 陽性細胞は著しく増加した。骨髄多能性幹細胞は梗塞巣に移動し、血管内皮平滑筋心筋等の組織再生に寄与した。適切なサイトカインの投与は幹細胞による組織再生能力を向上させ、心機能を改善した。

## 研究目的

われわれはこれまで *in vitro* において骨髄間葉系幹細胞が心筋細胞に分化できることに報告してきたが、生体内で間葉系幹細胞が心筋細胞に分化するか否かは明らかではない。生体内で親近本研究では心筋梗塞部位に骨髄幹細胞が誘導され心筋再生が行われるか否か、さらにサイトカインを用いることにより骨髄幹細胞による心筋組織再生が促進されるか否かを解析した。

## 研究方法（倫理面への配慮）

GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を採取し、致死量放射線照射後の同系マウス (C57BL/6) に骨髄移植した。2 月後末梢血を採取し、血球系細胞を FACS 解析した。血球系細胞のキメラ率が 90% を超えるマウスに関して、麻酔開胸し左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成した。梗塞作成翌日より 10 日間 G-CSF, GM-CSF を投与した。生存率を観察するとともに、2 ヶ月後心エコーにて心機能を評価後に心臓を摘出した。レーザー顕微鏡により抗心筋アクチニン抗体、抗平滑筋アクチン (SMA) 抗体、抗 von Willebrand Factor (vWF) 抗体と DAPI (核染色) の共染色により心筋組織再生について解析した。全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

## 研究結果

梗塞後 2 ヶ月の時点での生存率は生食投与群では約 60%, G-CSF 投与群で約 90% であり、著明な生存率の改善を認められた。梗塞後 2 か月の段階の心エコーによる解析では G-CSF 投与群では生食投与群に比べて左室駆出率 (EF) の上昇、左室拡張末期径 (LVEDD) の短縮が観察され、心機能の改善を認められた。一方、GM-CSF 投与群では EF の低下、LVEDD の拡大を認め、心機能の増悪が観察された。梗塞後 2 ヶ月の時点での組織では梗塞部位に一致して GFP 陽性細胞が多数観察され、その一部は心筋、血管内皮、平滑筋細胞の抗体と共染色され、骨髄幹細胞により組織再生がなされていること、G-CSF 投与によりこの GFP 陽性細胞が著しく増強することが観察された。GFP 陽性細胞中の心筋細胞の占める割合は 10% 程度であり、残りの細胞の多くは抗アクチニン抗体、抗 SNA 抗体、抗 vWF 抗体の染色が陰性であり、線維芽細胞様の細胞であると推測された。

## 考察

本研究により心筋梗塞症発症時に骨髄中の成体幹細胞が生体内で動員され、梗塞巣の修復に関与すること、G-CSF 等のサイトカインはこの幹細胞の動員に有効であることが示された。成体幹細胞を流血中に誘導し組織分化することができれば、患者本人の幹細胞で組織再生し得る方法を開発することができることになり、心筋症その他の心筋全体が障害さ

れる疾患の治療にも結びつくものと考えられる。

る組織再生能力を向上させ、心機能を改善した。

## 結論

骨髄多能性幹細胞は心筋梗塞時に梗塞巣に移動し、血管内皮・平滑筋・心筋等の組織再生に寄与した。適切なサイトカインの投与は骨髄多能性幹細胞によ

## 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

## 研究発表

### 論文発表

1. Fujita J, Fukuda K, et al. G-CSF and GM-CSF differentially affect the regeneration of infarcted myocardium by bone marrow-derived cells J Clin Invest 投稿中
2. Keiichi Fukuda. Use of mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes and its application to the treatment of congestive heart failure. Pieter Doevendans, Stefan Kaab Cardiovascular genomics : New pathophysiological concepts. Kluwer Academic Publishers The Netherlands 2002,245-256
3. Keiichi Fukuda Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. Competes Rendus Biologies 325 ; 1-12,2002
4. Keiichi Fukuda. Use of adult mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocyte and its application to cell transplantation therapy. J Bone Marrow Transplant. In press,2003
5. H Kodama, K Fukuda, et al. Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 341 ; 169-150, 2002
6. D Hakuno, K Fukuda, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes (CMG cell) expressed functionally active adrenergic and muscarinic receptors. Circulation 105 ; 380-386, 2002
7. Keiichi Fukuda. Stem cell transplantation as a mode of regenerative medicine. Jpn Med Assoc J In press, 2003
8. Keiichi Fukuda. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. Congenital anomalies. 42 ; 1-9, 2002

### 学会発表

1. 第2回日本再生医療学会 シンポジウム「骨髄幹細胞動員による心筋梗塞治療法の開発」  
J Fujita, K Fukuda et al. GCSF improves post-infarction heart failure by mobilizing bone marrow stem cells, but GM-CSF increases the mortality by deteriorating heart function in mice. 74th AHA Scientific meeting. 2002.11.17-20 , Chicago, USA

## 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

### 特許取得

1. 「心筋形成能のある成体骨髄由来細胞」国内（第372826号，平成11年12月28日）  
「心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞」国際（PCT/JP00/001148，平成12年2月28日）  
「心筋細胞への分化能を有する骨髄由来細胞」国際（PCT/JP00/07741，平成12年11月2日）  
「心筋細胞への分化能を有する細胞」国際（PCT/JP00/09323，平成12年12月27日）
2. 「遺伝子細胞治療剤」国内 出願中（特願2002-028717，平成14年3月20日）

# 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

小室 一成

千葉大学循環病態医科学

## 研究要旨

重症心不全の治療法として成体幹細胞移植による再生医療の確立は重要課題である。我々は、骨格筋内に心筋細胞へ分化する幹細胞が存在するか、また、このような幹細胞の心筋への分化を促進または抑制する因子が存在するかについて検討した。その結果、成体の骨格筋には心筋細胞に分化可能な臓器特異的幹細胞が存在し、その分化には受動的伸展刺激および、 $Ca^{2+}$ 、calmodulin、calcineurin を介するシグナルが関与していることが示唆された。骨格筋幹細胞は心不全患者に対する細胞移植治療の細胞ソースとして有用であると考えられた。

## 研究目的

心不全は心筋症の予後の重要な規定因子であるが、重症心不全患者の予後は外科的、内科的治療法の発達にもかかわらず不良である。細胞移植治療や細胞分化誘導療法を中心とする再生医療は、近年新しい治療法として注目されている。骨格筋は代用心筋の候補として早期から研究され、すでに欧米ではヒト自家骨格筋芽細胞移植の臨床治験が開始され、臨床症状および心機能の改善が報告されている。一方、Goodellらは骨格筋には筋肉の他に造血細胞に分化できる幹細胞が存在すると報告し、多分化能を有する体性幹細胞が生体の様々な臓器に存在することが明らかになった。本研究では、骨格筋内に心筋細胞へ分化可能な幹細胞が存在するか、また、このような幹細胞の心筋への分化を促進または抑制する因子について検討し、骨格筋由来自家幹細胞移植による心不全治療の基礎的検討を行うことを目的とした。

## 研究方法（倫理面への配慮）

1) GFP transgenic mouse より骨格筋細胞を単離し、①新生仔ラット心筋細胞と共培養、②骨格筋由来細胞のみの単独培養、③心筋細胞と培養液のみを共有し、互いに接着しない double chamber 法により培養した。培養5日後に免疫細胞染色法により心筋特異的トロポニン (cTnT)、心房利尿ペプチド (ANP)、GATA4、CSX/Nkx2.5、cadherin、connexin43 の発現について比較検討した。

2) 骨格筋の幹細胞が多く含まれる分画として、FACSにより得られた SP (side population) 分画と骨格筋初代培養上清中の遅延接着細胞群をそれぞれ心筋細胞と共培養し、心筋細胞に分化した骨格筋

細胞の数を、GFP 陽性骨格筋由来細胞  $10^5$ 個あたりの cTnT 陽性細胞数として定量的に評価した。

3) GFP transgenic mouse の骨格筋由来細胞を新生仔ラット心筋細胞と①通常の培養液、② nifedipine  $5\mu M$  加培養液、③ nifedipine  $5\mu M$  加培養液内で周期的受動的伸展刺激を加えて共培養した。また、共培養開始時に無  $Ca^{2+}$  培養液、calmodulin inhibitor (W7  $0.1\mu M$ )、calcineurin inhibitor (FK506  $1\mu M$ 、cyclosporin A  $0.4\mu M$ ) をそれぞれ加え、培養5日後に免疫細胞染色法により cTnT の発現を検討し、GFP 陽性骨格筋由来細胞  $10^5$ 個あたりの cTnT 陽性細胞数として比較した。

4) 近年、幹細胞が細胞融合して他の系譜の細胞の形質を獲得することが報告されている。そこで、GFP transgenic mouse の骨格筋由来細胞をアデノウイルスにより LacZ 遺伝子を導入した心筋細胞、または SYTOred により生体染色した心筋細胞と共培養し、GFP と  $\beta$  galactocidase の発現あるいは SYTOred による蛍光の有無により細胞融合について検討した。

(倫理面への配慮) 動物実験に関しては千葉大学の規定に基づき、動物愛護上の配慮を十分に行った。

## 研究結果

1) 心筋細胞と共培養することにより、GFP 陽性骨格筋由来細胞の一部に cTnT、ANP、GATA4、CSX/Nkx2.5 の発現が認められ、心筋細胞との細胞間接着部位に cadherin と connexin43 が発現していた。骨格筋由来細胞単独培養、または double chamber 方による培養法では、GFP 陽性骨格筋由来細胞に心筋特異的蛋白あるいは転写因子の発現は認められなかった。

2) GFP transgenic mouse 骨格筋の SP 分画細胞には MP (main population) 分画に比較して心筋細胞との共培養により, cTnT を発現する GFP 陽性骨格筋由来細胞が多く存在した。また, 骨格筋細胞培養上清中の遅延接着細胞には, 筋芽細胞を主体とする早期接着細胞と比較して, 心筋細胞との共培養により cTnT を発現する GFP 陽性骨格筋由来細胞が多く存在した。

3) 心筋細胞と共培養時に cTnT を発現する GFP 陽性骨格筋由来細胞数は nifedipine  $5 \mu\text{M}$  添加により対照に比較して減少したが, 周期的受動的伸展刺激を加えることにより, nifedipine による抑制効果は消失した。無  $\text{Ca}^{2+}$  培養液, calmodulin inhibitor (W7), calcineurin inhibitor (FK506, cyclosporin) により, 共培養による GFP 陽性骨格筋由来細胞の cTnT の発現は対照に比較して有意に減少した。

4) GFP 陽性骨格筋細胞を LacZ 遺伝子発現あるいは SYTOred 標識心筋細胞と共培養すると, GFP と cTnT の両者を発現した細胞の 60-75% に  $\beta$ -galactocidase 陽性あるいは SYTOred 陽性細胞が存在した。

## 考察

成体の骨格筋には心筋細胞と共培養することによ

り, 心筋細胞の形質を獲得する細胞が存在した。また, 心筋細胞への分化には周囲の心筋細胞との接着, および心筋細胞の拍動による受動的伸展刺激および,  $\text{Ca}^{2+}$ , calmodulin, calcineurin を介するシグナルが関与していることが示唆された。骨格筋の SP 分画および遅延接着細胞群を心筋細胞と共培養した結果から, 骨格筋内の未分化幹細胞が心筋細胞に分化したと考えられるが, 心筋の形質を獲得する機序には transdifferentiation と融合の両者が示唆された。

## 結論

骨格筋には心筋細胞に分化可能な体性幹細胞が存在することが示唆された。このような細胞が心筋細胞の形質を獲得する機序として transdifferentiation と細胞融合の両者が考えられた。今後, 骨格筋内の多分化幹細胞を単離, 培養し, transdifferentiation と細胞融合の両者の機序についてさらに検討を要する。

# 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

武田 信彬

東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部

## 研究要旨

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を検討するため、32-38週齢の心筋症ハムスターUM-X7.1を用いて心筋の $\beta$ 受容体、G蛋白、adenylate cyclase活性を測定した。心筋症ハムスターではコントロール(正常)ハムスターに比べて心筋 $\beta 1$ 受容体数は低下、 $\beta 2$ 受容体は数、Kdには有意差は無かった。Isoproterenol, forskolin, NaF, Gpp(NH)Pで刺激したときのadenylyl cyclase活性も心筋症ハムスターで低下、一方、G蛋白(Gs, Gi)の含量、bioactivityは増加していた。心筋症ハムスターの心機能障害にこれら $\beta$ 受容体シグナル伝達系の変化が関与しているものと思われる。

## 研究目的

不全心筋では細胞内微小器官の変化がみられるが、 $\beta$ 受容体シグナル伝達系の変化は心筋収縮力の変化に多きな影響を与えることから特に重要である。本研究では心筋症ハムスターの不全心筋のメカニズム解明のため、心筋症ハムスターUM-X 7.1を用いて、心筋 $\beta$ 受容体およびそのシグナル伝達系の変化を検討した。

## 研究方法

32-38週齢の心筋症ハムスターUM-X7.1を使用。ペントバルビタール60mg/kgの腹腔内注射で深麻酔を行い心臓を摘出、心筋膜成分を抽出した(1)。

この膜成分の $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase活性を測定して純度を検定、その後 $\beta$ 受容体、G蛋白、adenylyl cyclaseを測定した。 $\beta$ 受容体の測定は $^{125}\text{-I}$ -odocyanopindolol, CGP-2012A( $\beta 1$  antagonist), ICI-118,551( $\beta 2$  antagonist)を用いて行った。Gs, Giはそれぞれ心筋膜成分をコレラ菌毒素、百日咳菌毒素で処理して測定。Giのbioactivityは百日咳菌毒素刺激によるADP-ribosylation、機能的活性は百日咳菌毒素で処理した膜成分のadenylyl cyclaseでそれぞれ評価、また、Gsのbioactivityはコレラ菌毒素刺激によるADP-ribosylation、機能的活性はコレラ菌毒素で処理した膜成分のadenylyl cyclaseでそれぞれ評価した。Gs, GiのmRNAについてもNorthern blot法で測定した。

## 研究結果

心筋症ハムスターではコントロール(正常)ハムスターに比べて体重、心重量/体重比、肝重量いずれも有意に大で、また、腹水貯留も認められた。これらの所見から心不全状態にあるものと考えられた。抽出した膜成分の $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase活性は心筋症ハムスターとコントロールハムスターで有意差はなく、膜成分の純度が両者で同様であることを示している。心筋症ハムスターでは、心筋 $\beta 1$ 受容体数はコントロールハムスターの約55%と著明に低下していた。 $\beta 2$ 受容体数、また、Kdには有意差はなかった。Adenylyl cyclase活性の基礎値は心筋症ハムスターとコントロールハムスターで差はなかったが、容量反応曲線から評価したisoproterenolに対するadenylyl cyclase活性の反応は心筋症ハムスターで低下、NaF, forskolin, Gpp(NH)pで刺激した時のadenylyl cyclase活性も心筋症ハムスターで有意に低下していた。また、心筋症ハムスターではG蛋白(Gs, Gi)の含量、mRNA, bioactivityともにコントロールハムスターに比べて増加していた。

## 考察

今回の結果は他の心筋症ハムスターを使った報告と一致する(2)。心筋症ハムスターではコントロールハムスターと比べて $\beta 2$ 受容体の数には差がなく、 $\beta 1$ 受容対数が低かったことから、isoproterenolに対するadenylyl cyclaseの反応の低下は一つにはこの $\beta 1$ 受容体数の減少によるものと考えられる。また、adenylyl cyclase活性はGs, Gi蛋白に制御

されている (3). G 蛋白との相互作用によって adenylyl cyclase を刺激する NaF, forskolin, Gpp (NH) p 存在下での adenylyl cyclase 活性の低下は不全心筋における G 蛋白濃度の変化と一致する. Gi 蛋白の量と bioactivity, 機能的活性は心筋症ハムスターで増加しており, これは不全心筋で Gi 蛋白が増加するという報告と一致する (4). これも isoproterenol に対する adenylyl cyclase の反応が心筋症ハムスターで減少していたことの原因になり得る. 心筋症ハムスターで Gs 蛋白の含量, mRNA, bioactivity は増加していたが, 機能的活性は低下していた. この Gs 蛋白の adenylyl cyclase からの uncoupling も心筋症ハムスターの isoproterenol に対する adenylyl cyclase の反応性低下に関与しているものと思われる.

### 結論

心筋症ハムスター UM-X7.1 の心機能障害に心筋細胞膜の  $\beta$  受容体シグナル伝達系の変化が関与しているものと思われる.

### 参考文献

1. Wagner JA, Reynold JJ, Weisman HF, Dudeck ML, Weisfeld ML, Synder SH : Alterations in calcium antagonist receptors and sodium calcium exchange in cardiomyopathic hamster tissue. *Circ Res* 65 : 205-214, 1989.
2. Kessler PD, Cates AE, Van Dop C, Feldman A M : Depressed bioactivities of the guanine nucleotide-binding protein that stimulates adenylyl cyclase in hearts from cardiomyopathic Syrian hamsters. *J Clin Invest* 84 : 244-252, 1989.
3. Sethi R, Dhalla KS, Panagia V, Dhalla NS : Status of post adrenergic receptor mechanisms in cardiac hypertrophy and heart failure. In : NS Dhalla, GN Pierce, V Panagia, RE Beamish (eds). *Heart Hypertrophy and Failure* Kluwer Academic Publishers, Boston 1995, pp419-446.
4. Boehm M, Gierschik P, Erdmann E . Quantification of Gi-proteins in the failing and nonfailing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 87(Suppl 1) : 37-50, 1992.

# In vivo 肥大心筋におけるインテグリン $\beta$ 1 発現の変化

北島 顕

北海道大学大学院医学研究科

## 研究要旨

心肥大発症と退縮過程にインテグリン $\beta$ 1 とアンジオテンシン1型受容体とはインテグリンのシグナル伝達経路を介して関与することが、ラット肥大心モデルで検討された。

## 研究目的

インテグリンは細胞接着受容体として接着斑を形成し、細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介する。心筋細胞伸展刺激により、インテグリンが活性化されることが知られ、心筋細胞肥大形成のシグナル伝達に重要な役割を担っている。本研究は、心肥大発症と退縮におけるインテグリン発現の関与を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）

方法及び結果：12週齢 SHR-SP (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats) を同週齢の Wistar Kyoto ラット (WKY) と比較した。また、6週齢 SHR-SP を4群に分け、プラセボ、ACE阻害薬 (ACEI, temocapril; 10 mg/Kg/day)、アンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB, CS-866; 10mg/Kg/day)、ACEI, ARB併用 (Combination 5mg/Kg/day, each) を6週間経口投与した。左室心筋よりRNAを抽出し、Competitive RT-PCR法を用いてインテグリン $\beta$ 1、心房利尿ペプチド

(ANP)、アンジオテンシン1型受容体の発現を、免疫染色によりインテグリン $\beta$ 1を解析した。

## 研究結果

SHR-SPはWKYに比し、心筋細胞肥大とわずかな血管周囲の線維化からなる心肥大が形成されるとともにインテグリン $\beta$ 1、ANPとアンジオテンシン1型受容体の発現が亢進し、インテグリン $\beta$ 1蛋白の発現量の増加を認めた。いずれの薬剤投与群も、プラセボ投与群に比し、有意な血圧降下と肥大退縮を示し、心エコー図上、拡張機能の改善を認めた。また、いずれの薬剤投与群もインテグリン $\beta$ 1、ANPとアンジオテンシン1型受容体発現は有意に減少した。

## 考察および結論

インテグリン $\beta$ 1とアンジオテンシン1型受容体とは、心肥大発症と退縮過程に関与する。アンジオテンシンIIは1型受容体を介して、インテグリンのシグナル伝達経路に影響する可能性が示唆された。

## 研究発表

### 論文発表

1. Nan Jia, Hiroshi Okamoto, Toshihiro Shimizu, Satoru Chiba, Yutaka Matsui, Takeshi Sugawara, Masatoshi Akino, Akira Kitabatake. A Newly Developed Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, CS866, Promotes Regression of Cardiac Hypertrophy by Reducing Beta-1 Integrin Expression. Hypertens Res (In press)

### 学会発表

1. 賈 楠, 岡本 洋, 清水紀宏, 秋野正敏, 松井 裕, 菅原 武, 北島 顕  
A Newly Developed Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, CS866, Promotes Regression of Cardiac Hypertrophy by Reducing Beta-1 Integrin Expression  
第19回国際心臓研究会/2002.10.31
2. 賈 楠, 岡本 洋, 清水紀宏, 秋野正敏, 松井 裕, 菅原 武, 北島 顕  
Integrin Beta1 Results in Cardiac Hypertrophy Through Angiotensin II Type 1 Receptor

第5回日中高血圧シンポジウム/2002.11.5

3. 賈 楠, 岡本 洋, 清水紀宏, 秋野正敏, 松井 裕, 菅原 武, 北島 顕

In vivo 肥大心筋におけるインテグリン $\beta$ 1発現の変化

第25回心筋代謝研究会/2002.7.19

# 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

北島 顕

北海道大学大学院医学研究科

## 研究要旨

慢性心不全における  $\beta$  遮断薬導入後の反応性について薬剤開始前に予測する因子を遺伝子 SNPs 解析を含めて検討した。拡張型心筋症患者 136 例中  $\beta$  遮断薬投与群 84 例（導入率 62%）と非投与群 52 例について、平均 2461 日の観察期間で解析した結果、観察期間内で  $\beta$  遮断薬投与による生命予後改善効果が示された。 $\beta$  遮断薬投与群のうち responder 群と non-responder 群に分類して解析を進めたところ、投与前は心機能、心拍数、血漿 ANP、BNP 値を含めて各指標で有意差を認めなかった。 $\beta$  遮断薬投与前後での各群の変化については responder 群で心拍数、左室拡張末期径、BNP 値の有意な改善を認め、non-responder 群では BNP の有意な悪化を認めたものの自覚症状の改善との相関はみられなかった。responder 群と non-responder 群で遺伝子変異について検討したところ、解析の途中ではあるが、 $\beta 1$  受容体のうち Ser49Gly の変異が responder 群で有意に高い頻度を示した。 $\beta 2$  受容体のうち Glu27Gln の変異では逆に responder 群よりも non-responder 群で有意に頻度が高くなっていた。 $\beta$  遮断薬に対する responder の予測に  $\beta$  受容体の遺伝子変異を含めた SNPs 解析が十分有用であると考えられた。

## 研究背景

慢性心不全において  $\beta$  遮断薬を用いることは既に一般的になりつつあるが、導入後の反応性が個人により異なることは実際に臨床の現場で多くの人間が経験することである。従来の報告では心筋がまだ viable で交感神経活性が更新している症例では  $\beta$  遮断薬を導入した際により反応が得られている。しかし投与後の著しい個体差を説明するにはまだ十分ではなく、遺伝的要因に基づいた薬物動態あるいは薬力学的な個体差の関与することが想定される。実際、 $\beta 1$  受容体の変異のない心不全患者では予後が短縮すること、 $\beta 2$  受容体の遺伝子変異も運動耐容の改善や心不全の経過に影響を及ぼすこと等が報告されている。

## 研究目的

当科では  $\beta$  遮断薬に対する responder を薬剤開始前に予測できれば、その後の治療選択に有用であろうと考え、既に通院中の患者群を retrospective に解析することにした。

## 研究方法

当科で 1991 年から 2002 年まで登録された拡張型心筋症患者をエコー台帳から抽出する。心エコー上 %FS 23 以下を基準として、冠動脈病変を有するな

ど明らかな原因疾患がある場合は除外した。拡張型心筋症患者 136 例中  $\beta$  遮断薬投与群 84 例（導入率 62%）と非投与群 52 例について、平均 2461 日の観察期間で解析した。

$\beta$  遮断薬投与群に対し遺伝子検査の informed consent を行い、得られた血液から  $\alpha$  及び  $\beta$  受容体遺伝子の SNPs 解析を施行した。

## 結果

$\beta$  遮断薬と生命予後との関連について、多変量解析に引き続き、 Kaplan-Meier 解析を行った結果、観察期間内で  $\beta$  遮断薬投与による生命予後改善効果が示された。

$\beta$  遮断薬投与群のうち、投与前後で %FS が 3%以上改善した群を responder 群、3%以下の不変群と -3%以上減少したを悪化群を併せて non-responder 群と分類して解析を進めたところ、投与前は心機能、心拍数、血漿 ANP、BNP 値を含めて各指標で有意差を認めなかった。 $\beta$  遮断薬投与前後での各群の変化については responder 群で心拍数、左室拡張末期径、BNP 値の有意な改善を認め、non-responder 群では BNP の有意な悪化を認めたものの自覚症状の改善との相関はみられなかった。

投与した  $\beta$  遮断薬のうちメトプロロールとカルベジロールについてトラフ値での血中濃度を測定したがその平均値で responder 群と non-responder 群

で有意差はみられなかった。

responder 群と non-responder 群で遺伝子変異について検討したところ、解析の途中ではあるが、 $\beta 1$  受容体のうち Ser49Gly の変異が responder 群で有意に高い頻度を示した。 $\beta 2$  受容体のうち Glu27Gln の変異では逆に responder 群よりも non-responder 群で有意に頻度が高くなっていた。

## 考察

Ser49Gly は元々Gs coupling site であり、この変異は Agonist affinity を高める、Desensitization を増強、Downregulation を進行させ、さらに AC 活性を高めることが報告されている<sup>1)2)</sup>。これらが複雑に絡み合うことで結果的に $\beta$ 遮断薬の反応性をよくすることが推測されている。Borjesson M らの報告では 183 例の心不全患者を Ser49Gly 変異の有無により 2 群に分け 5 年間経過観察した結果、変異が有る群では生命予後が約 2 倍改善がみられている。逆に Glu27Gln の変異は受容体の down regulation に関係すると言われ<sup>3)-5)</sup>、2002 年の AHA では心不全患者にカルベジロールを投与した場合、good responder で頻度が低く、むしろ poor responder で多く出現していると報告された。今回データは示していないかがこの 2 つの変異を有するか否かで responder と non-responder の頻度を synergistic に解析したところ Ser49Gly の変異を有し Glu27Gln の変異を持たない群では、その逆に比して約 2 倍改善群となることが示された。

## 総括

今回は全症例分のデータが集まっておらず解析途

中のため新しい見解を報告するには至らなかったが、 $\beta$ 遮断薬に対する responder の予測に $\beta$ 受容体の遺伝子変異を含めた SNPs 解析が十分有用であると考えられた。今後例数を増やして解析を続けていくことで responder を予測出来る組合せを見つけることを目標とする。

## 参考文献

1. Borjesson M, Magnusson Y, et.c. : A novel polymorphism in the gene coding for the beta (1) -adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure ; Eur Heart J 2000 21 (22) : 1853
2. Malin C, Levin, Stefano M, etc ; The Myocardium-protective Gly-49 Variant of the 1-Adrenergic Receptor Exhibits Constitutive Activity and Increased Desensitization and Down-regulation , J. Biol Chem 2002, 277, 30429
3. Victor D, Gbenga G, et.c : The effect of common polymorphism of the  $\beta 2$ -adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization ; N Engl Med 2001, 345,1030
4. Kersten M. S, Lynne E. W,et.c. : Synergistic polymorphism of  $\beta 1$ - and  $\alpha 2c$ -adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure; N Engl Med 2002, 347, 1135
5. John R. C, Anastasios G. G, et.c :  $\beta 2$ -Adrenoceptor Polymorphism Determines Vascular Reactivity in Humans ; Hypertension 2000, 36, 371

#### IV 研究成果の刊行に関する一覧表