

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業  
特発性心筋症に関する調査研究班  
平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16年 3 月

主任研究者 北 畠 顕

## 目次

|  |       |
|--|-------|
| I. 平成 15 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                                 |       |
| ■ 圧負荷と容量負荷心肥大における遺伝子発現の差異の検討                   |       |
| —Metallothionein-1 の心肥大における役割について—             | 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            | 24    |
| 北里大学医学部内科学 II 教授                               | 和泉 徹  |
| 大学院生   | 西井 基継 |
| 講師   | 猪又 孝元 |
| ■ 拡張型心筋症におけるムスカリン M2 受容体を介する自己免疫機序             | 28    |
| 慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科学教授                            | 小川 聡  |
| ■ 心不全の重症化機構と遺伝子治療                              | 30    |
| 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 |
| ■ 特発性心筋症の基礎・臨床研究                               |       |
| —apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1)— | 32    |
| 大阪大学大学院医学研究科病態情報内科学教授                          | 堀 正二  |
| ■ 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                   | 33    |
| 山口大学医学部器官制御医科学講座循環病態内科学教授                      | 松崎 益徳 |
| ■ PD-1 欠損マウスを用いた拡張型心筋症における                     |       |
| 心筋トロポニン T の関与についての解明                           | 36    |
| 京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授                          | 松森 昭  |
| ■ ダール高血圧感受性ラットの心肥大, 心不全に対するチアゾリン誘導体            |       |
| Pioglitazone の効果の検討                            | 37    |
| 神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸病態学講座教授                       | 横山 光宏 |
| ■ 心筋症モデルハムスターにおける心筋細胞死の様式に関する研究                | 39    |
| 岐阜大学再生応用(循環器内科学)教授                             | 藤原 久義 |
| ■ 心筋の肥大とリモデリングにおける NF- $\kappa$ B の役割          | 41    |
| 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 |

|  |   |
|--|---|
| ■マウスの実験的ウイルス性心筋炎における costimulatory molecule (PD-1, PD-L1, PD-L2) の発現とその役割の解析 ..... | 44  |
|  | 東京大学大学院医学系研究科循環器内科<br>世古 義規, 永井 良三<br>順天堂大学医学部免疫<br>八木田秀雄, 奥村 康<br><br>東京医科歯科大学歯学部分子免疫<br>東 みゆき |
| ■遅発性肥大型心筋症孤発例における遺伝子異常 .....   | 47  |
|  | 鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学<br>阿南隆一郎, 新村 英士, 佐々木 健<br>皆越 眞一, 鄭 忠和                                     |
| ■心筋疾患の動向 .....   | 49  |
|  | 国立循環器病センター 友池 仁暢  |
| ■拡張型心筋症に対する carvedilol 投与の冠循環に与える影響：<br>経胸壁心エコー図による経時的な検討 .....                    | 51  |
|  | 大阪市立大学大学院医学研究科循環器病態内科学教授 吉川 純一  |
| ■特発性拡張型心筋症においてカルベジロールが QT dispersion に及ぼす影響 .....                                  | 52  |
|  | 筑波大学臨床医学系内科教授 山口 巖  |
| ■肥大心・不全心におけるエンドセリン遺伝子の発現と PPAR $\alpha$ との関連に関する研究 .....                           | 54  |
|  | 筑波大学臨床医学系循環器内科教授<br>山口 巖<br>研究協力者<br>宮内 卓, 藤森 明, 酒井 俊, 前田 清司<br>河野 了, 飯田 啓治, 後藤 勝年              |
| ■拡張型心筋症患者心筋における諸種ウイルスゲノムの検索<br>—我が国と米国における患者の陽性率およびウイルス存在様式の検討— .....              | 60  |
|  | 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におけるテネイシン C の発現に関する研究 .....   | 63  |
|  | 大阪医科大学第三内科教授 北浦 泰   |
| ■グレリンの心筋細胞内情報伝達に関する研究 .....  | 65  |
|  | 東京女子医科大学循環器内科助教授 川名 正敏  |
| ■拡張型心筋症の新規原因遺伝子の発見と機能解析 .....  | 67  |
|  | 東京医科歯科大学難治疾患研究所教授 木村 彰方   |
| ■慢性血液透析患者における心筋障害と血清 HGF 濃度の意義 .....   | 70  |
|  | 島根大学医学部付属病院循環器疾患治療部内科<br>公受 伸之, 島田 俊夫<br>京都大学大学院医学研究科循環動態学<br>松森 昭                              |

|  |          |
|--|----------|
| ■ミトコンドリアゲノム一塩基多型 (mtSNP) データベースの構築 .....                   | 74       |
| 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    |
| ■たこつぼ心筋症に関する研究 .....                                       | 76       |
| 順天堂大学医学部循環器内科助教授   | 河合 祥雄    |
| ■心筋組織修復におけるテネイシン C の機能と作用ドメインの解析 .....                     | 77       |
| 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講師  | 今中-吉田 恭子 |
| 三重大学医学部病理教授  | 吉田 利通    |
| 国立国際医療センター早朝   | 矢崎 義雄    |
| ■移植骨髄細胞は心筋再生に寄与する .....                                    | 81       |
| 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)                                |          |
| ■拡張型心筋症患者における Ca <sup>2+</sup> 制御蛋白の遺伝子発現と心不全重症度との関係 ..... | 83       |
| 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 .....                       | 85       |
| 国立循環器病センター生理機能検査部長   | 北風 政史    |
| ■ICOS 分子を介した T 細胞の活性化の阻害による心筋炎の改善効果 .....                  | 87       |
| 東京医科歯科大学大学院循環制御学教授   | 磯部 光章    |
| ■細胞シート工学による血管付き心筋組織の作製 .....                               | 94       |
| 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    |
| ■心筋細胞を支配する交感神経系の発達を規定する因子の解明 .....                         | 96       |
| 慶應義塾大学医学部心臓病先進治療学講師  | 福田 恵一    |
| ■成体心筋幹細胞の同定と単離—心筋分化誘導による心筋症治療へ向けて— .....                   | 97       |
| 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授                                      | 小室 一成    |
| ■ラミニン $\gamma$ 1 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節 .....                   | 99       |
| 東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部教授                                       | 武田 信彬    |
| ■拡張型心筋症の病態・診断・治療に関する研究 .....                               | 100      |
| 北海道大学大学院循環病態内科学教授  | 北島 顕     |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....                                   | 103      |

I 平成15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呼吸循環器内科学             | 教授   |
|       | 豊岡照彦                 | 東京大学大学院医学系研究科医学部保健管理センター      | 所長   |
|       | 堀 正二                 | 大阪大学大学院医学系研究科医学部病態情報内科学講座     | 教授   |
|       | 松崎益徳                 | 山口大学医学部器官制御医科学講座              | 教授   |
|       | 松森 昭                 | 京都大学大学院医学研究科医学部臨床器官病態学講座      | 助教授  |
|       | 横山光宏                 | 神戸大学大学院医学系研究科医学部循環呼吸器病態学講座    | 教授   |
|       | 藤原久義                 | 岐阜大学医学部内科学第2                  | 教授   |
|       | 竹下 彰                 | 九州大学医学部附属病院                   | 客員教授 |
|       | 永井良三                 | 東京大学大学院医学系研究科医学部器官病態内科学講座     | 教授   |
|       | 鄭 忠和                 | 鹿児島大学医学部内科学第一                 | 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                 | 大阪市立大学内科学第1                   | 教授   |
| 山口 巖  | 筑波大学医学専門学群臨床医学系内科学   | 教授                            |      |
| 研究協力者 | 北浦 泰                 | 大阪医科大学内科学Ⅲ                    | 教授   |
|       | 川名正敏                 | 東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所循環器内科学     | 助教授  |
|       | 木村彰方                 | 東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患研究部門分子病態   | 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                 | 順天堂大学医学部内科学                   | 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心臓血管内科              | 副院長  |
|       | 北風政史                 | 国立循環器病センター心臓血管内科              | 部長   |
|       | 磯部光章                 | 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科医学部循環制御学講座 | 教授   |
|       | 岡野光夫                 | 東京女子医科大学先端生命医科学研究所            | 所長   |
|       | 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                 | 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学           | 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 北島 顕

北海道大学大学院医学研究科 教授

### 平成 15 年度の総括

1974 年厚生省特定疾患調査研究班が発足して以来、心筋症の疫学・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・発展は著しいものがある。この間、河合忠一、戸嶋裕徳、安田寿一、矢崎義雄、篠山重威各班長の主導的力量と目覚ましい成果は本研究班の目標とすべき所である。特発性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、細胞工学、遺伝子工学などの進歩、薬物治療法の有効性の確認や心臓移植の再開も加わり、疾患概念や治療法が大きく変貌しつつある。したがって、本研究班の研究目的の第 1 は、心筋症に関する診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの作成を行うこと、第 2 は、疫学について、1998 年から本研究班と疫学研究班とが共同で行っている疫学調査を継続し、生命予後についての現状を把握するためのデータベースを構築すること、第 3 は、病因の解析について、遺伝子解析や免疫学的解析を中心に検討を進めること、第 4 に、治療面では、心筋再生医療の基礎的・臨床的検討を取り上げ、その研究成果を広く社会へ普及・還元すること。以上を本研究班の研究目的に設定した。目標具現化のため、それぞれの領域での我が国の第一人者を組織に迎え、研究分担者・協力者との間に分担・共同研究を計画した。以下に平成 15 年度の成果を総括する。

第 1 に、臨床調査個人票の活用のため、特発性心筋症臨床調査個人票（新規、継続用）を改定し、厚生労働省に提出した。また、診断基準の見直しを含めた「特発性心筋症診断の手引き」の作成のため、現在、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ミトコンドリア病、心ファブリー病、家族性突然死症候群、ARVC、たこつぼ型心筋症などについて分担し、各々について、診断の手引き（案）を策定中である。第 2 に、疫学研究班との間で疫学調査の継続を確認し、疾患別記述調査票を策定した。5 年前、篠山班の際になされた心筋症に関する患者調査票に基づき、再度、生命予後を中心にアンケート調査を行った。第 3 に、平成 15 年度 2 回の班会議を開催し、病因の解析について、ことに遺伝子解析



や免疫学的解析を中心に行った。中でも、平成15年度第1回班会議は国際シンポジウム形式として、2日間に渡り、世界各国の研究者と意見交換を行った。第4に、共同研究として、テネイシン・オステオポンチンを用いた拡張型心筋症の敏感かつ特異的診断法の確立に関する検討を開始した。第5に心筋再生医療の基礎的・臨床的検討を開始した。以上の病因解析、診断、治療に関する具体的成果は本平成15年度研究報告集に掲載されている。

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点にある。そのため、班員は本分野でのわが国の代表的研究者から構成された。心筋症の診断基準については、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、Web-site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。さらに、各都道府県における登録業務を簡素化し、かつ、臨床調査個人票の臨床的活用のため、特発性心筋症臨床調査個人票（新規、継続用）を改定し、厚生労働省に提出した。また、診断基準の見直しを含めた「特発性心筋症診断の手引き」の作成のため、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ミトコンドリア病、心ファブリー病、家族性突然死症候群、ARVC、たこつぼ型心筋症などについて分担し、各々について、診断の手引き作成を次年度の課題とした。以上、班を代表してご報告申し上げます。

### Ⅲ 班員分担別研究報告

# 圧負荷と容量負荷心肥大における遺伝子発現の差異の検討 —Metallothionein-1の心肥大における役割について—

今泉 勉

久留米大学医学部第三内科

## 研究要旨

【目的】圧負荷（PO）と容量負荷（VO）とによって生じる心肥大における遺伝子発現の差異をDNA chipを用いて検討する。さらに肥大心で発現増大がみられた metallothionein-1（MT-1）の役割について検討する。【方法】圧負荷心肥大は腹部大動脈縮窄で、容量負荷肥大は腹部大動脈-下大静脈シャントにより作製した。左室の遺伝子発現の変化は、術後4週間で検討した。DNA chipはrat genome array U34A（Affymetrix）を用い、同社のプロトコルに従って解析した。

【結果】それぞれ術後4週間における心エコー上、POでは左室の求心性肥大を呈し、VOでは遠心性肥大を呈していた。また左室/体重比は両群共に有意に上昇していた。DNA chip解析では、両肥大群でANP、BNP、MT-1、skeletal alpha-actinなどの遺伝子群がshamに比し増加していた。またVOやPOで特異的に発現変化を認める遺伝子群が同定された。これらのうちGMP reductaseなど4つの遺伝子発現変化をreal time-PCRで確認した。次に、両方の肥大心で有意に上昇していたMT-1の肥大心における発現増大の意義を検討した。MT-1をH9C2細胞に過剰発現させると、ノルエピネフリンによるTUNEL陽性細胞の増加を有意に減少させた。従って、MT-1は肥大心筋細胞において細胞保護的に働く可能性が示唆された。【結論】VOとPOとで同じように変化する遺伝子群や異なった発現パターンを示す遺伝子群を同定した。また本検討によりMT-1の肥大心における新たな役割が示唆された。

## 研究目的

心肥大は、力学的負荷、ホルモン、サイトカイン、成長因子などさまざまな因子で誘導され、その細胞内情報伝達も多様である。心肥大を来す力学的負荷としては圧負荷と容量負荷の2種があり、前者は高血圧性心臓病や大動脈狭窄症が、後者は僧帽弁閉鎖不全症などが代表的な疾患である。心肥大は、当初負荷に対する生理的な適応であるが、後に拡張および収縮障害、不整脈、冠予備能低下、微小循環障害などを来し、予後不良の独立した因子となる。

圧負荷と容量負荷とは、心室壁に対する収縮期負荷と拡張期負荷という違いがあり、圧負荷では増大した後負荷や壁応力に対応できるように、また容量負荷では左室コンプライアンスを高めるように異なったりモデリングが起こる。これらの心肥大の分子・細胞レベルの差異については、心筋細胞の成長が横方向か縦方向かの違い、微小管密度の増加の有無、ミオシン重鎖の合成率亢進と分解率低下との違い、蛋白レベルでのcollagen増大の有無、TGF- $\beta$ 3、IGF-1 mRNAの発現レベルの違いなどが報告されている。しかしながら、両者の本質的な差異や、それぞれの肥大シグナリングにおける共通経路と特異

的経路については未だ十分解明されていない。肥大の原因による分子・細胞レベルの相違は、特異的肥大治療薬の開発や、肥大から不全への進行を防止する治療法開発のために、ぜひ解明する必要がある。本検討では、圧負荷心肥大と容量負荷心肥大のモデルを作成し、肥大の質の違いについてDNA chipを用い、包括的に遺伝子発現の差異を検討する。さらに今回の検討では、両方の肥大心で発現増大がみられた metallothionein-1（MT-1）の発現亢進の意義について検討を行った。

## 研究方法

動物モデルはWistarラットを用いて、圧負荷心肥大は腹部大動脈縮窄で、容量負荷肥大は腹部大動脈-下大静脈シャントにより作製した。コントロールは、偽手術を施行したshamを用いた。これらのラットは、モデル作成後4週間で実験に供した。心摘出当日に心エコー（Aloka SSD5500）により駆出率、拡張末期径、壁厚を測定し、心臓摘出後、心、左室および右室体重比を求めた。DNA chipによる解析は、Affymetrix社のGeneChip解析装置とRat genome U34 A arrayを用い、同社のプロトコルに従った。Real-time PCRはGeneAmp

5700 PCR system と TaqMan one-step RT-PCR master mix reagent kit (Applied Biosystems) を使用した。

(倫理面への配慮)

当大学の動物実験倫理基準に従った。モデル作成時や心摘出時は、全身麻酔を行った。

## 研究結果

まず図1に4週間後の心エコー所見を示す。LVDDは、Sham及びPOと比較してVOで有意に拡大していた(PO;96±8% of Sham, VO;119±9% of Sham)。右に示すIVSTでは、POで肥厚がより強い傾向を示した(PO,126±12% of Sham; VO, 120±11% of Sham,)。予測されるようにPOでは求心性肥大を呈し、VOでは遠心性肥大と異なりリモデリングを呈していた。%FSは、Shamと比較して両群とも有意差はなく、LADはVO, PO共にShamに比し拡大していた。図2に示すように左室及び心/体重比は、Shamと比較すると両群共に上昇していたが、VOがPOよりもやや大であった(PO,139±11%; VO,157±16% of Sham)。

これらの左室心筋を用いてDNA chip解析を行ったところ、両肥大群で共に有意に増加した遺伝子は、BNP, ANP, skeletal alpha-actinなどのように、既に心肥大での変化が報告されている遺伝子と共に、今までに報告されていないMT-1, lysyl oxidase like-2 (LOXL-2)などの計37遺伝子であった。反対に40の遺伝子が両群で低下していた。次に圧負荷でのみ選択的に変化した遺伝子群は、37個が増加しており43個が減少していた。容量負荷のみで変化した遺伝子群は、52個が増加し33個が減少していた。

次にreal time RT-PCR法によりDNA chipで得られた結果を確認した(図3, 4)。BNP, MT-1, LOXL-2の各mRNAはVO, POともにShamに比し増加しており、これらの変化はDNA chip解析の結果と一致していた。VOとPOを比較するとMT-1では有意にVOが高く、BNPやLOXL2でもVOが高い傾向があったが有意差はなかった。GMP reductaseはDNA chipでVOでのみ特異的に減少していたため、real-time PCRで確認したところ、chipと同様の結果であった。(図4)。

今回の検討では、両肥大群共に増加した遺伝子のうち、最も強い変化を来したものはBNPとANPであったが、これらに次いで強い変化を来したものとしてはMT-1があった。MT-1は肥大心における発現亢進は報告されていなかったため、この蛋白の

肥大心における役割を引き続き検討した。MT-1は様々な細胞で細胞保護に働くことが示されているので、心肥大においても同様であると推測し次の検討を行った。MT-1をH9C2細胞に過剰発現させ、norepinephrine (NE)によるTUNEL陽性細胞数増加に与える影響を検討した。コントロール・ベクターであるpcDNAを発現した細胞では、NEによってTUNEL染色陽性細胞が増加していた。それに対しMT-1を過剰発現させた細胞では、図5のようにTUNEL染色陽性細胞は抑制されていた。従ってMT-1は細胞死に対して保護的に働く可能性が示唆された。

## 考察

今回の検討から、原因が異なることにより生じる肥大の質による遺伝子変化の差異が明らかにされた。圧負荷による肥大心では、心筋細胞の横方向への成長がみられるのに対し、容量負荷では縦方向への成長がみられるが、その差異の分子レベルの機序は不明である。今回の結果は、その機序解明の手掛かりになることが期待される。我々の検討において、肥大心で変化している遺伝子の数は、DNA chipを用いた他の検討に比し多いとは言えないが、その一因は複数のチップを用いてすべての組み合わせで陽性と判定された遺伝子のみを挙げているためである。チップ数が増加する程、チップ間のばらつきにより同じ変化を来す遺伝子数は減少する。従って変化した遺伝子数は少ないものの、今回挙げたものはより確実に変化していると考えられる。

今回、両肥大群で増大したものとしては、BNP, ANP, skeletal alpha-actinなどのように今までに何度も報告されているものと共に、metallothionein-1 (MT-1), biglycanなどのように新たに判明した遺伝子がある。今回の検討では、MT-1の心筋肥大における役割を検討した。MT-1は、Zn<sup>2+</sup>に高い親和性を示すシステイン・リッチな蛋白であり、生体内では重金属に対する解毒作用を有す。最近の研究では、生体内の微量金属と結合し、メタロプロテインやメタル依存性転写因子の活性制御に関わることや、フリーラジカル消去に重要な役割を担うことが報告されている。心血管領域においては、アドリアマイシン心筋症においてMT-1の発現亢進がみられ、MT-1過剰発現マウスでは、アドリアマイシンの心筋障害が抑制されたことが示されている。このように、MT-1は多様な細胞で細胞保護に働くことが示されており、心肥大においても細胞保護的に働くことと推測した。上記のようにMT-1をH9C2細胞に過

剰発現させ、norepinephrine (NE) による TUNEL 陽性細胞数増加に与える影響を検討すると、NE による TUNEL 陽性細胞陽性化を抑制することがわかった。従って MT-1 は細胞死に対して保護的に働く可能性が示唆された。MT-1 が抗酸化作用を有することが推測されていることから、今回の検討におけるアポトーシス抑制作用も同様の機序を介す可能性が推測されるが、抑制機序は今後の検討課題である。

今回 real-time PCR により確認した蛋白は、すべて DNA chip での変化が大きなものであり、real-time PCR でも DNA chip と同様な変化がみられた。4 つの遺伝子のうち LOXL2 は lysyl oxidase (LOX) のアイソフォームである。LOX は銅依存性細胞外モノアミン酸化酵素であり、コラーゲンやエラスチンの架橋反応を担っている。LOX およびそのアイソフォームは架橋反応以外にも TGF $\beta$ 、IL-1、PDGF などにより発現制御を受けることや、細胞内や核内にも局在することなどから、細胞の成長、発達などに関与すると推測されている。また腫瘍細胞で LOX の発現が低下していることや、LOX のアンチセンスの発現により細胞の形質転換がみられることから、抗腫瘍作用も有すと考えられている。心筋においても LOX family は、他臓器と同様にコラーゲンやエラスチンの架橋を担うが、それ以外の機能は不明である。銅欠乏ラットでは、心肥大や時に心破裂を来すが、その心筋では LOX の酵素活性低下と共にコラーゲン含量が増加していることが示されている。これは LOX の機能低下により未熟なコラーゲンが蓄積し、細胞外マトリック

スが脆弱となっていることが推測され、心臓における LOX の重要性を示唆している。さらに最近報告された LOX ノックアウトマウスは、新生児期に死亡し大動脈破裂が死亡に大きく関与することと胎児期に低心拍である可能性が示唆されている。一方 LOXL2 は、広汎な臓器に発現しており、心臓での発現も比較的豊富であるが、その機能はほとんどわかっていない。肥大心での LOX family の発現変化は報告されておらず、その意義は不明であるが、腫瘍抑制に関与することなどから、心筋細胞肥大自体を制御する可能性がある。また肥大心では間質の増生がみられるが、これらのリモデリングに LOXL2 の変化が何らかの役割を果たす可能性が推測され、現在検討中である。

GMP reductase は IMP の産生酵素であるが、その生体での役割に関する報告は非常に少なく詳細は不明である。GMP reductase が ATP プールに影響を与えるという報告があり、この蛋白の変化が心筋のエネルギー代謝に何らかの役割を果たす可能性が考えられる。

以上のように肥大の質の違いによる遺伝子変化の差異は、今回の検討によりスクリーニングできたが、今後それぞれの蛋白について発現様式や肥大心における機能についての検討を要す。

## 結論

VO と PO とで同じように変化する遺伝子群や異なった発現パターンを示す遺伝子群を同定した。また本検討により MT-1 の肥大心における新たな役割が示唆された。

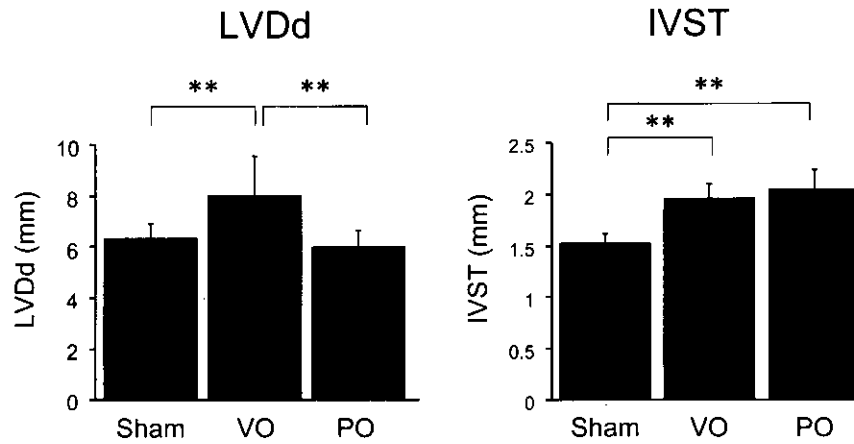


図1 モデル作成4週間後における心エコー所見  
LVDd indicates end-diastolic diameter of left ventricle; IVST, inter-ventricular septal wall thickness. Values are mean±SD, \*\*p<0.01

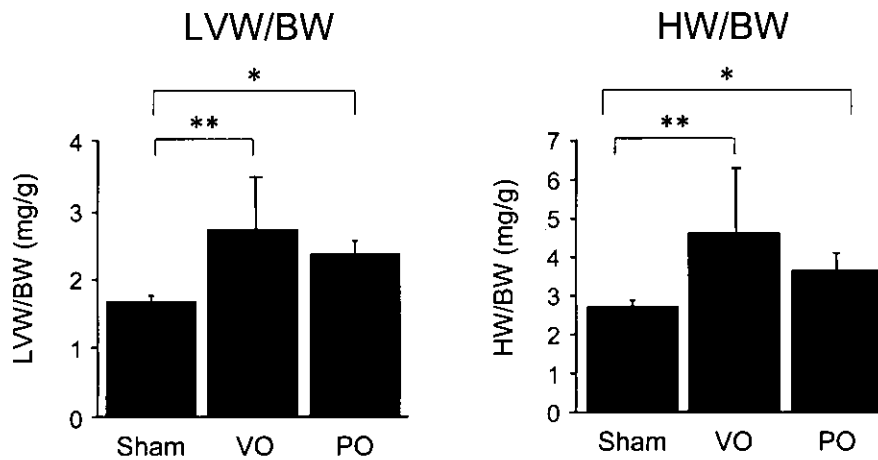


図2 モデル作成4週間後における心体重比および左室体重比  
LVW/BW indicates left ventricular weight normalized to body weight; HW/BW, heart weight normalized to body weight. Values are mean±SD, \*p<0.05, \*\*p<0.01

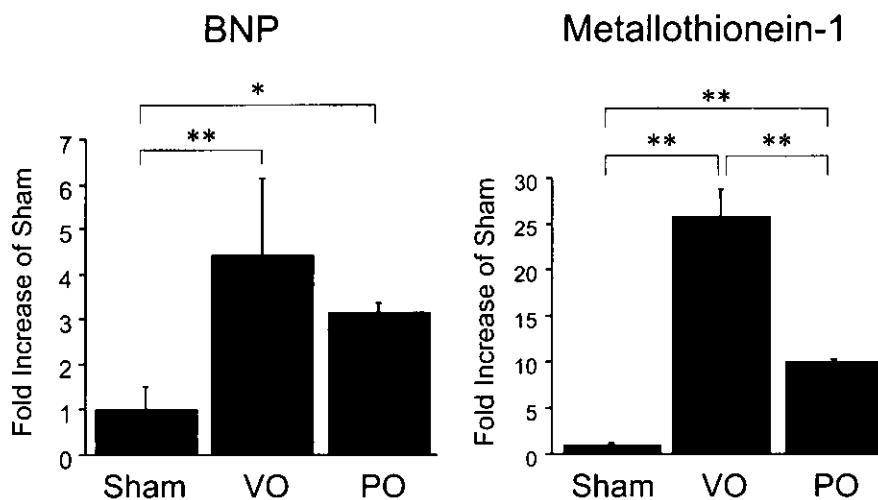


図3 Real-time PCRによるBNPとMetallothionein-1のmRNA発現変化  
Values are mean±SD, \*\*p<0.01, \*P<0.05

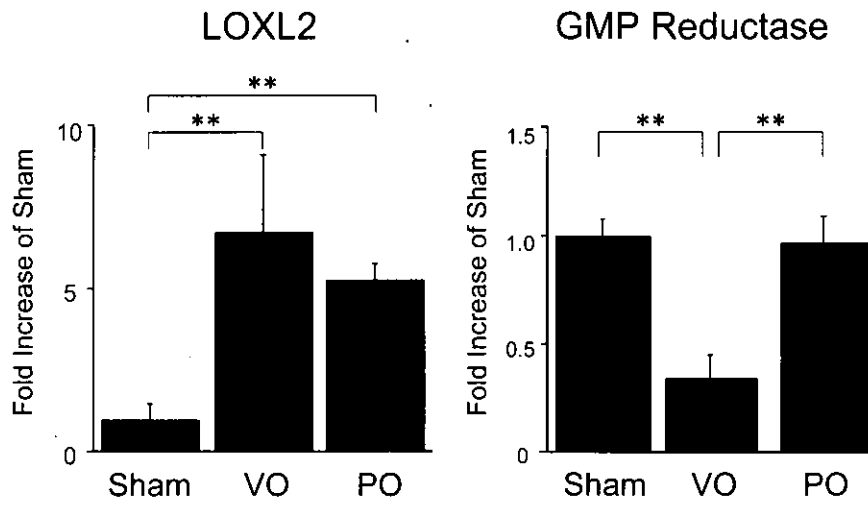


図4 Real-time PCRによるLOXL2とGMP reductaseのmRNA発現変化  
Values are mean±SD, \*\*p<0.01

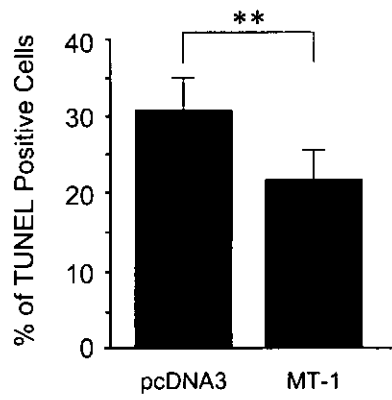


図5 NEによるTUNEL染色陽性化に対するMT-1過剰発現の影響  
Values are mean±SD, \*p<0.01

## 研究発表

### 論文発表

1. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. TGF- $\beta$  function blocking already effective as therapeutic strategy: Reply. *Circulation* 2003;107:37e.
2. 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* 2003;41:819-823.
3. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kusaba K, Takemiya K, Koga M, Jalalidin A, Tokuda K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Kuwahara F, Imaizumi T. Rho-kinase inhibition enhances Bax expression and apoptosis in balloon-injured rat carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42 (suppl):S43-S47.
4. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Imaizumi T. Sub-suppressor dose of angiotensin type-1 receptor blocker inhibits TGF- $\beta$ -mediated perivascular fibrosis in hypertensive rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42 (suppl):S61-S65.
5. Koga A, Oka N, Kikuchi T, Miyazaki H, Kato S, Imaizumi T. Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 42: 213-219, 2003.
6. Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 178-184, 2004.
7. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension*. 2004;43:499-503.
8. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction -Another model of inflammation-. *Hypertension* (in press).
9. 岡直樹, 大村治也, 今泉勉: 心肥大, 心不全 a カベオラと心機能 *Heart View* 7:106-111, 2003.
10. 岡直樹, 宮崎宏, 今泉勉: 肥大型心筋症 高久史磨, 溝口秀昭, 矢崎義雄, 狩野庄吾, 武藤徹一郎編. 改訂第3版 外来診療のすべて メジカルビュー社 p304-305, 2003.
11. 岡直樹, 相賀素, 今泉勉: 心筋症における excitation-contraction coupling の変化 杉下靖郎, 門間和夫, 矢崎義雄, 高本眞一編. *Annual Review 循環器* 2003 中外医学社 p72-76, 2003.

### 学会発表

The International symposium of Cardiology Frontiers: Cardomyopathy and Heart Failure. (October 17-18, 2003, Sapporo, Japan)

- Kai H, Imaizumi T. Role of early inflammatory changes in cardiac remodeling and diastolic dysfunction in hypertensive rat heart.
- Yasukawa H, Chen KR, Knowlton KU, Imaizumi T. SOCS1 and viral myocarditis.
- Oka N, Kikuchi T, Koga A, Ohmura H, Miyazaki H, Imaizumi T: Role of Caveolin-3 in Cardiac Hypertrophy.

European Society of Cardiology Congress 2003 (Vienna, Austria), August 30-September 3, 2003)



- Kai H, Tokuda K, Kuwahara F, Kai M, Imaizumi T. Sub-suppressor dose of candesartan prevents perivascular inflammation and myocardial fibrosis, but not myocyte hypertrophy, in hypertensive hearts.
- Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Kai M, Imaizumi T. ICAM-1- and MCP-1-mediated macrophage infiltration plays a key role in cardiac remodeling in hypertensive rats.

The 57th Fall Conference of the HBPR Council (Washington, D.C., USA), September 23-26, 2003.

- Tokuda K, Kuwahara F, Kai H, Imaizumi T. Angiotensin II plays a role in reactive myocardial fibrosis by activating macrophage accumulation in pressure-overloaded hearts through the mechanism independent of pressure change.

# 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

北里大学医学部内科学 II

## 研究要旨

心筋炎の一部において、拡張型心筋症への移行が認められることは周知の事実である。その機序において、自己免疫応答が重要な役割を果たしていることが想定されている。一方、心筋炎およびそれに伴う拡張型心筋症の主病態は心筋組織炎症による心不全である。つまり活動性心筋炎を有する症例は、心不全のみならず心筋組織炎症の制御を必要とする。

心不全における $\beta 2$  受容体-抑制性 G 蛋白 (Gi) 情報伝達経路の役割が最近注目を浴びており、Gi 阻害剤としての Pertussis Toxin (PTX) は不全心筋の交感神経刺激に対する心筋収縮反応の低下を回復させることが報告された。つまり、Gi は心ポンプ不全に対する新たな治療目標になり得る可能性が示唆された。一方、PTX は以前より自己抗原免疫に対して不応性を示す動物種に臓器特異的自己免疫応答を誘発する目的で長年使用されてきた。しかしながら、Gi 制御が心筋組織炎症の進展にどのように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。

そこで、Gi の心筋組織炎症に対する役割を明らかにすべく、以下の研究を企画した。

既報の如く心筋ミオシン免疫により実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) を作成し、EAM に対する免疫 0 日目および 10 日目における PTX 単回血管内投与の効果を検討した。加えて、心筋炎惹起性 T 細胞に対する PTX の直接的な効果も検討した。この結果、免疫 0 日目の PTX 投与は、心筋炎惹起性 T 細胞活性の増強に関連して EAM の進展を加速させたのに対し、免疫 10 日目の投与は逆に心筋組織レベルのインターフェロン (IFN)- $\gamma$  の低下に伴い EAM を抑制した。

機序の詳細な説明が今後必要であるが、不全心における心血行動態の改善という点で注目されている Gi の制御は、同時に心筋組織炎症の進展にも深く関わっていることが示された。特に注目すべきは、免疫 10 日目における単回のみ PTX 投与が EAM を抑制し、その効果が持続した点に加え、効果期における Gi 抑制の強力な心筋炎制御効果であった。

## 研究目的

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抑制性 Gi 蛋白の役割を明らかにする。

## 研究方法

既報の如く、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実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を作成した。

1: 誘発期における検討 抑制性 G 蛋白阻害剤としての Pertussis Toxin (PTX)(0.04, 0.4  $\mu$ g/ラット) および溶媒を心筋ミオシン免疫と同時に、1 回のみ単回血管内投与した。免疫 21 日目に屠殺し、肉眼的検討(肉眼的重症度スコア MS; 心体重比 HW/BW)が行われた。

2: 効果期における検討 PTX (0.04, 0.4, 4  $\mu$ g/ラット) および溶媒を免疫 10 日後に 1 回のみ単回血管内投与した。21 日目の屠殺後に肉眼的検討を

行い、引き続き心筋組織におけるインターフェロン (IFN)- $\gamma$  およびケモカイン (RANTES, MCP-1) 産生を ELISA キットにて測定した。

3: *in vivo* での検討 溶媒または PTX ( $10^6$ - $10^4$  mol/l) の存在下で、心筋ミオシン並びに抗原提示細胞と共に心筋炎惹起性 T 細胞を培養し、各濃度の PTX ( $10^6$ - $10^4$  mol/l) の自己反応性 T 細胞活性に対する効果を ELISA kit および細胞内サイミジン ( $^3$ H) 摂取測定により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の全ての過程において、ラットにはジエチル・エーテルによる全身麻酔を施行した上で薬物投与、心筋ミオシン感作並びに屠殺を行った。

## 結果

検討 1 において、PTX 群では対象群 (溶媒) に比し濃度依存性に MS( $2.8 \pm 0.3$  vs.  $3.3 \pm 0.2$  vs.  $3.8 \pm 0.4$ ,  $P < 0.01$ ) および HW/BW ( $0.8 \pm 0.08$  vs.  $1.0 \pm 0.05$  vs.  $1.12 \pm 0.04$  %,  $P < 0.01$ ) が増強した (図-

1A). これに対し検討 2 において、これらの指標 (MS:  $2.9 \pm 0.2$  vs.  $2.0 \pm 0.3$  vs.  $1.5 \pm 0.3$  vs.  $1.8 \pm 0.5$ ,  $P < 0.05$ ; HW/BW:  $0.91 \pm 0.06$  vs.  $0.71 \pm 0.11$  vs.  $0.56 \pm 0.10$  vs.  $0.60 \pm 0.12$  %,  $P < 0.05$ ) が濃度依存性に減弱した (図-1B). 加えて、検討 2 において、PTX 群では対象群に比し心筋組織における IFN- $\gamma$  産生が濃度依存性に低下した (IFN- $\gamma$ :  $2620 \pm 380$  vs.  $2120 \pm 370$  vs.  $1240 \pm 200$  vs.  $2530 \pm 440$  pg/mL/g (heart),  $P < 0.01$ ) (図-2). 免疫 10 日目における PTX 投与群および対照群における心筋組織 RANTES および MCP-1 レベルは一定の傾向を示さなかった (図-2). 検討 3 において、PTX ( $10^6$ - $10^4$  mol/l) の添加は濃度依存性に心筋ミオシン特異的 T 細胞増殖 ( $169990 \pm 19622$  vs.  $172210 \pm 12320$  vs.  $186725 \pm 9642$  vs.  $128260 \pm 9986$  cpm,  $P < 0.01$ ) およびその IFN- $\gamma$  産生 ( $59.1 \pm 1.8$  vs.  $68.0 \pm 3.4$  vs.  $82.1 \pm 0.9$  vs.  $47.6 \pm 3.6$  ng/ml,  $P < 0.01$ ) を対照群に比し有意に増強させた (図-3).

## 考察

心内膜生検により拡張型心筋症患者の約 10% に活動性心筋炎が認められることが報告されており<sup>1)</sup>, 心筋炎の一部は拡張型心筋症へ移行することが知られている。この機序において自己免疫応答が中心的な役割を果たしていることが動物モデルを用いた検討から想定されている<sup>2)</sup>。ヒト心筋炎および拡張型心筋症患者における自己抗体の存在が報告されており、この事実はヒトにおける自己免疫応答の関与を支持するものである。心筋炎および活動性心筋組織炎症に付随した拡張型心筋症の主病態は心筋組織炎症に伴う心不全であり、心不全に伴う交感神経活性は、一時的に心収縮能を増強させる一方、長期的には心筋再構築を促し、結果的に心不全を加速させるという悪循環を修飾する。このことから  $\beta$  受容体遮断剤はこの悪循環を断ち切るために用いられ、 $\beta$  受容体刺激剤の使用は心ポンプ失調に限定されてきた。しかしながら交感神経活性の心筋組織炎症自体に対する影響は不明なままであった。我々は以前、心不全に伴う  $\beta 2$  受容体刺激の自己免疫性心筋炎に対する保護効果を報告した。即ち、交感神経活性は  $\beta 2$  受容体刺激を介して、自己免疫応答を中心とした心筋組織炎症の進展を制御していることが示された。

心不全における  $\beta$  受容体発現の変化、つまり、 $\beta 2$  受容体発現の  $\beta 1$  受容体に対する相対的な増加が報告されている<sup>3)</sup>。また、 $\beta 2$  受容体刺激は、 $\beta 1$  受容体と異なり心筋細胞上の抑制性 G 蛋白 (Gi) も

活性化させる。最近、Gi 阻害剤としての Pertussis Toxin (PTX) を用いた検討から、Gi 阻害が交感神経刺激に対する不全心筋における心筋収縮反応の低下を回復させることが報告された<sup>4)</sup>。このことから、Gi 制御は心ポンプ不全における新たな治療目標になり得る可能性が示唆された。一方、PTX の臓器特異的自己免疫応答に対する増強効果は、動物モデルを用いた検討から以前より知られている<sup>5)</sup>。しかしながら、Gi の自己免疫性心筋炎に対する効果は不明なままである。

心筋ミオシン免疫と同時に PTX を投与した結果、他の自己免疫性疾患モデルと同様に EAM は増悪した。しかしながら、免疫 10 日目における一回のみの PTX 投与は、逆に心筋組織における IFN- $\gamma$  産生の低下に関連して EAM を抑制した。この相反する効果を説明する機序として以下のことが挙げられる。PTX そのもの自己反応性 T 細胞活性に対する直接的な増強効果、つまり細胞移行実験から IFN- $\gamma$  によって誘導される心筋ミオシン反応性 T 細胞免疫の EAM 誘発における中心的な役割が知られており、PTX のみの添加が心筋ミオシンペプチドにより誘発される自己反応性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を濃度依存性に増加させた。一方、ミオシン免疫 10 日目に起こる自己反応性 T 細胞の血管から標的臓器への接着・遊走過程に対する Gi の制御効果、つまり血管内皮上のケモカインがリンパ球上の Gi 蛋白結合受容体に結合した結果 Gi 蛋白シグナルが伝達され、リンパ球の血管内皮への接着が強化されるのに引き続き標的臓器への細胞移行が起こる<sup>6)</sup>。PTX は、この Gi 蛋白シグナル伝達を抑制することが知られており<sup>6)</sup>、この結果自己反応性 T 細胞の心筋組織への浸潤が抑制される。

免疫 10 日目における PTX ( $4 \mu\text{g}$ /ラット) の投与は、むしろ EAM を悪化させた。このことは、PTX の自己免疫応答に対する相反する効果のバランスもまた心筋組織炎症の進展に重要な役割を果たしていることを示唆した。

本検討において注目すべき点は、二つ挙げられる。一つは、単回投与により心筋組織炎症に対する制御効果が得られたことから、その機序は今後の課題であるが、Gi は心筋組織炎症の強力な制御因子の一つであり、その制御効果が持続する点である。二つは、EAM を用いた薬物実験は、誘発期における薬物投与が大部分であったが、本検討において効果期における薬剤投与が EAM を抑制した点である。

## 結論

Gi は心ポンプ不全のみならず心筋組織炎症の主な制御因子の一つである。従って Gi 制御は心筋炎治療において新たな治療目標となり得る。

## 参考文献

- Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz, Rose NR, Mc Manus BM, Billingham ME, Moon TE: The Myocarditis Treatment Trial Investigators. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med*, 333:269-275,1995.
- Kodama M, Hanawa H, Seki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K, Shibata A: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res*, 75: 278-284,1994.
- Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K: Myocardial beta-adrenergic receptor functions during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest*, 91:907-914,1993.
- Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K: Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR) - but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing hearts. *Circulation*, 108:1633-1639,2003.
- Arimoto H, Tanuma N, Jee Y, Miyazawa T, Shima K, Matsumoto Y: Analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis induced in F344 rats by pertussis toxin administration. *J Neuroimmunol*, 104:15-21,2000.
- Su SB, Silver PB, Zhang M, Chan CC, Caspi RR: Pertussis Toxin inhibits induction of tissue-specific autoimmune disease by disrupting G protein-coupled signals. *J Immunol*, 167:250-256,2001.

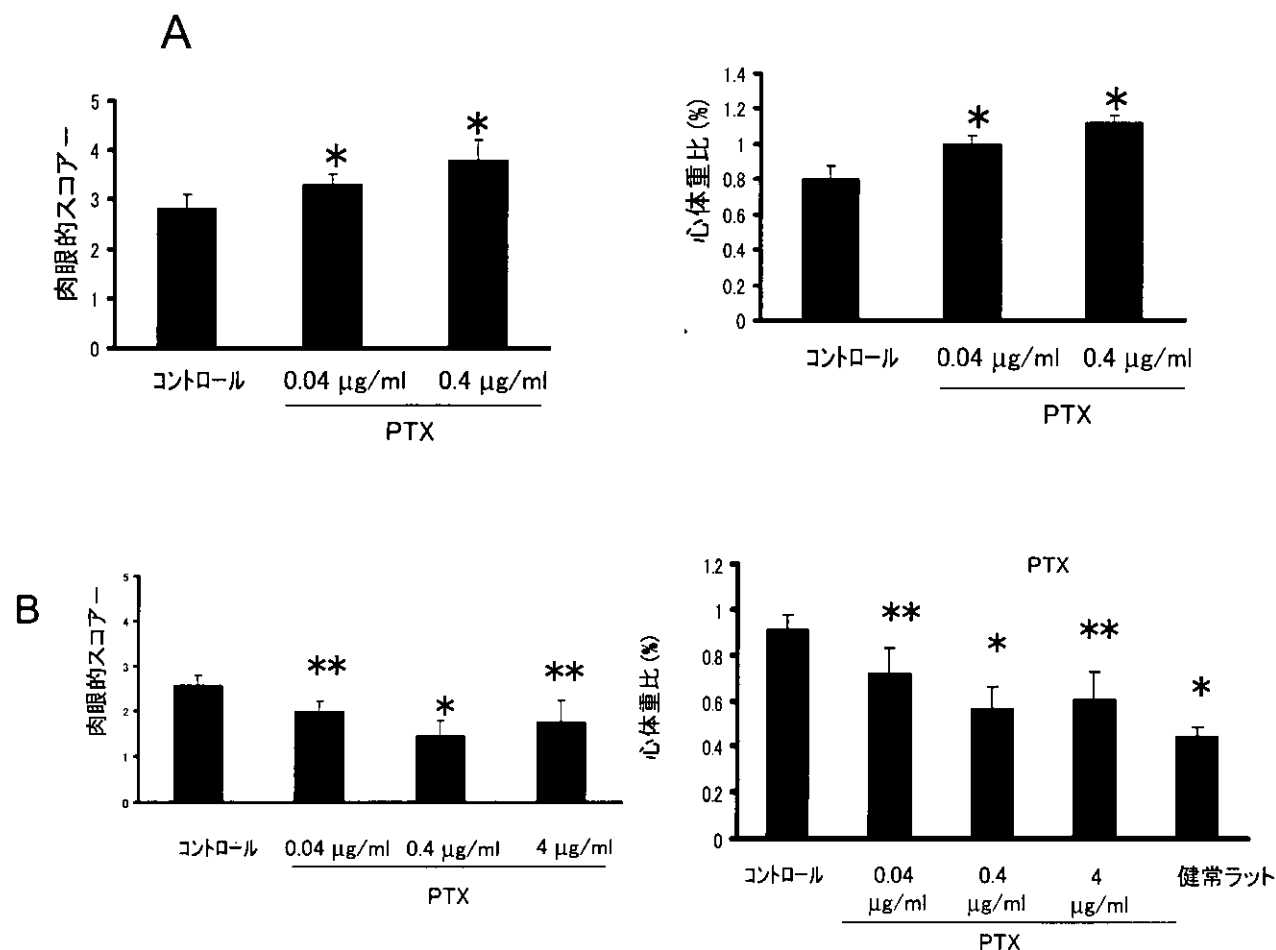


図1 Pertussis Toxin (PTX) のEAMに対する効果

A, 各濃度の Pertussis Toxin (PTX) および溶媒を心筋ミオシン免疫と同時に, 単回投与した。 B, 各濃度の PTX および溶媒を心筋ミオシン免疫 10 日目に単回投与した。

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$  対 コントロール