

遅発性肥大型心筋症孤発例における遺伝子異常

阿南 隆一郎, 新村 英士, 佐々木 健, 皆越 眞一, 鄭 忠和

鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学

研究要旨

家族性肥大型心筋症の病因は心筋のサルコメアを構成する蛋白の遺伝子異常であることが明らかにされた。最近、遅発性あるいは孤発例の肥大型心筋症においてもこれらの遺伝子の異常があることが示されてきている。今回我々は遅発性でありかつ孤発例である日本人の肥大型心筋症の病因を分子遺伝学的に検討した。41名の遅発性肥大型心筋症孤発例（男性31名、女性10名、平均年齢63±10歳）を対象とし、 β 心筋ミオシン重鎖（ β MHC）、心筋トロポニンT、心筋トロポニンI、心筋ミオシン結合蛋白-C（MyBP-C）、心筋ミオシン調節軽鎖、心筋ミオシン必須軽鎖の遺伝子解析を行った。 β MHC遺伝子の Arg663His 変異を1例に、MyBP-C遺伝子の Arg160Trp 変異、Glu334Lys 変異、Gly507Arg 変異、Thr1046Met 変異を各1例に見いだした。心筋ミオシン結合蛋白-C遺伝子、 β 心筋ミオシン重鎖遺伝子の変異は、遅発性肥大型心筋症孤発例の病因となると考えられた。

研究目的

特発性心筋症は難治性疾患であり、その病因を遺伝学的に明らかにすることは、特発性心筋症の克服に有用であると考えられる。

家族性肥大型心筋症の分子遺伝学的解析により、その病因は心筋のサルコメアを構成する蛋白をコードする遺伝子の異常であることが明らかにされた。現在までに β 心筋ミオシン重鎖、心筋ミオシン必須軽鎖、心室型ミオシン調節軽鎖、心筋ミオシン結合蛋白-C、心筋トロポニンT、心筋トロポニンI、 α -トロポミオシン、心筋 α アクチン、タイチン、 α 心筋ミオシン重鎖の10種類の蛋白をコードする遺伝子の異常が、肥大型心筋症の病因であることが示されている。

最近の分子遺伝学的研究により、遅発性あるいは孤発例の肥大型心筋症においてもこれらの遺伝子の異常があることが示されている。しかし遅発性あるいは孤発例の肥大型心筋症における遺伝子異常の報告は少ない。

本研究の目的は遅発性でありかつ孤発例である肥大型心筋症の遺伝子解析を行い、その病因を分子遺伝学的に検討することである。

研究方法

遅発性であり孤発例である肥大型心筋症の症例を対象とした。全例において家系調査を行い、家系内に肥大型心筋症の症例がないもので、肥大型心筋症の診断あるいは症状の出現が40歳以降である症例

を対象とした。

病歴、身体所見、標準十二誘導心電図、胸部レントゲン写真、心臓超音波検査を全例と家系の構成員において評価した。

文書による同意を得た上で採血を行い、末梢血よりDNAを抽出した。遺伝子解析は β 心筋ミオシン重鎖（ β MHC）、心筋トロポニンT、心筋トロポニンI、心筋ミオシン結合蛋白-C（MyBP-C）、心筋ミオシン調節軽鎖、心筋ミオシン必須軽鎖の各遺伝子につき直接塩基配列決定法により行った。（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子解析研究を含み、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント）に関し配慮が必要であり、鹿児島大学医学部の遺伝子解析研究に関する倫理委員会に研究計画を申請し承認を受けている（承認番号33, 57）。本院は遺伝カウンセリングの体制も整っている。研究対象者には文書を用いた説明をした上で、文書による同意を得ている。

研究結果

遅発性肥大型心筋症孤発例は41名であった。31名は男性、10名は女性であり、平均年齢は63±10歳であった。

遺伝子解析により5例において遺伝子変異が見いだされた。 β MHC遺伝子の Arg663His 変異が一例に見られた。また MyBP-C 遺伝子の Arg160Trp 変異、Glu334Lys 変異、Gly507Arg 変異、

Thr1046Met 変異が各 1 例に見られた。他の遺伝子に変異の見られた症例はなかった。

これらの変異は正常者 100 名において見られなかった。

考察

遅発性肥大型心筋症孤発例の 41 例の遺伝子解析を行い、5 例において遺伝子変異を見いだした。

β MHC 遺伝子の Arg663His 変異はこれまでに家族性肥大型心筋症の家系において報告のある変異であり、その特徴は心房細動を 47% の症例に合併することであると報告されている。我々の症例は洞調律であったが、左房径が 41 mm と軽度拡大しており将来心房細動への移行に注意が必要と思われた。

MyBP-C 遺伝子の Arg160Trp 変異、Glu334Lys 変異、Gly507Arg 変異、Thr1046Met 変異はこれまでに報告のない新規の変異である。

これらの遅発性肥大型心筋症孤発例にみられた変異が肥大の病因であることを支持する所見として以

下の所見があげられる。

- 1) これらの遺伝子は家族性肥大型心筋症の病因遺伝子であること、
- 2) これらの変異は正常者ではみられなかったこと、
- 3) 進化の過程で保存されたアミノ酸の変異であること、
- 4) 家族性肥大型心筋症においてみられた変異もあること。

結論

遅発性肥大型心筋症孤発例の 41 例の遺伝子解析を行い、5 例において遺伝子変異を見いだした。

β MHC 遺伝子の Arg663His 変異、MyBP-C 遺伝子の Arg160Trp 変異、Glu334Lys 変異、Gly507Arg 変異、Thr1046Met 変異が各 1 例ずつにみられた。心筋ミオシン結合蛋白-C 遺伝子、 β 心筋ミオシン重鎖遺伝子の変異は、遅発性肥大型心筋症孤発例の病因となると考えられた。

研究発表

学会発表

1. Anan R, Niimura H, Sasaki T, Minagoe S, Tei C. Molecular Etiology of Elderly Onset Hypertrophic Cardiomyopathy in Japanese Patients Without Family History. 第 68 回日本循環器学会総会 (2004 年 3 月, 東京)

心筋疾患の動向

友池 仁暢

国立循環器病センター

研究要旨

循環器病専門病院における退院患者のうち、主病名として心不全あるいは心筋疾患と診断された患者について基礎疾患、緊急入院比率、平均年齢、アウトカム指標としての平均在院日数、平均診療点数を調査した。国立循環器病センターの場合、心不全患者は平成13年は281名であり、うち心筋疾患は20%を占め、虚血性心臓病、弁膜疾患に次いで多く、平均在院日数は53日と病院全体の平均在院日数の約2倍であった。心筋疾患を主病名とする患者は168名で平均年齢は心不全を主病名とする心筋疾患より24.8歳若く、平均在院日数は53.3日であった。

研究目的

心不全（ICD-10,I 50）を主たる病名とする患者の中で、心筋疾患の患者数、重症度（緊急入院比率、在院日数、平均診療点数等のアウトカム評価）等による実態を、心筋疾患を主病名とする患者群の特徴と対比する。

研究方法

平成13年1年間の退院時抄録（調査課管理）と退院時診療報酬票（医事課管理）を連結し、匿名化したデータセットについて、心不全の背景疾患と診療のアウトカムを分析した。
（倫理面への配慮）

倫理委員会の審議において、「疫学研究に関する倫理指針」が遵守されているか検討した。①研究の目的を達成するには入院患者全てを対象としなければならない、②保険診療の枠組みの中で行われている医療の実態を知ること、③国立医療機関として高度医療を含む医療の実態の情報開示が求められている等の為に個人情報の匿名化を条件に研究実施が認められた。

研究結果

国立循環器病センター平成13年の退院患者のうち、心不全を主病名とした患者数は281名、男女比2.1、緊急入院率76%、死亡率2.5%、平均年齢67.6

（±13.5）歳、平均在院日数44.8日、平均診療点数は178511.6点であった。基礎疾患として最も頻度の高い基礎疾患は虚血性疾患（98名）、第2位は弁疾患（71名）であった。心筋疾患は57名（心不全の20.3%）、男女比3.07、緊急入院率75%、平均年齢60.8歳、死亡率35%、平均在院日数53.5日、平均診療点数は186,254.5点であった。心筋疾患を主たる病名とした患者は168名で、男女比2.3、緊急入院率28%、平均年齢42.8歳、死亡率4.8%、平均在院日数53.3日、平均診療点数304,722点であった。

考察

心不全患者は高齢者が多く、在院日数も長期化する傾向がある。心不全を主病名にする心筋疾患は約20%であり、死亡率も35%と高いことから、重症患者が多いことが示唆された。心筋疾患を主病名にした患者は、心不全を主病名とした心筋疾患に比べ、平均年齢は24.8歳近く若齢であった。診療点数が高かったのは外科治療例が多い為と思われる（10.1% VS 1.7%）。

結論

専門病院における心不全治療の状況を平成13年単年について分析した。主病名が心筋疾患である患者群に比べ、緊急入院例が多く、死亡率も高かった。病院全体の平均在院日数に比べて心筋疾患は著しく長期の入院であった。心不全を主病名とした場合、高齢者が多いのも特徴であった。

研究発表

論文発表

1. Yamagishi M, Ito K, Tsutsui H, Miyazaki S, Goto Y, Nagaya N, Sumiyoshi T, Fukami K, Haze K, Kitakaze M, Nonogi H, Tomoike H. Lesion severity and hypercholesterolemia

- determine long-term prognosis of vasospastic angina treated with calcium channel antagonists. *Circ. J.* 2003;67(12):1029-35.
2. Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, Takeishi Y, Kubota I, Tomoike H. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2003;57(1):119-28.
 3. Tsukada S, Iwai M, Nishiu J, Itoh M, Tomoike H, Horiuchi M, Nakamura Y, Tanaka T. Inhibition of experimental intimal thickening in mice lacking a novel G-protein-coupled receptor. *Circ.* 2003;107(2):313-9.
 4. Miyamoto T, Takeishi Y, Shishido T, Takahashi H, Itoh M, Kubota I, Tomoike H. Role of nitric oxide in the progression of cardiovascular remodeling induced by carotid arterio-venous shunt in rabbits. *Jpn Heart J.* 2003;44(1):127-37.
 5. Inoue S, Nakamura H, Otake K, Saito H, Terashita K, Sato J, Takeda H, Tomoike H. Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(5):764-70.
 6. Yamaoka-Tojo M, Yamaguchi S, Nitobe J, Abe S, Inoue S, Nozaki N, Okuyama M, Sata M, Kubota I, Nakamura H, Tomoike H. Dual response to Fas ligation in human endothelial cells: apoptosis and induction of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *Coron Artery Dis.* 2003;14(1):89-94.
 7. Iwai N, Mannami T, Tomoike H, Ono K, Iwanaga Y. An acyl-CoA synthetase gene family in chromosome 16p12 may contribute to multiple risk factors. *Hypertension.* 2003;41(5):1041-6.
 8. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, Ogata J, Tomoike H, Ogiwara T. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke.* 2003;34(7):1628-33.
 9. Minamihaba O, Yamaki M, Tomoike H, Kubota I. Severity in myocardial dysfunction contributed to long-term fluctuation of heart rate, rather than short-term fluctuations. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2003;8(2):132-8.
 10. Sato J, Sata M, Nakamura H, Inoue S, Wada T, Takabatake N, Otani K, Tomoike H, Kubota I. Role of thymidine phosphorylase on invasiveness and metastasis in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2003;106(6):863-70.
 11. Asakura M, Takashima S, Asano Y, Honma T, Asanuma H, Sanada S, Shintani Y, Liao Y, Kim J, Ogita H, Node K, Minamino T, Yorikane R, Agai A, Kitamura S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Canine DNA array as a potential tool for combining physiology and molecular biology. *Circ J.* 2003;67(9):788-92.
 12. Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res.* 2003; 93:759-66.

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

特許取得

1. 友池仁暢 他 2 名：遺伝子食後高中性脂肪血症家兔，特許第 334563 号
2. TOMOIKE H, et al.: Hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbit model. US Patent No.6, 515, 196B2

拡張型心筋症に対する carvedilol 投与の冠循環に与える影響： 経胸壁心エコー図による経時的な検討

吉川 純一

大阪市立大学大学院医学研究科循環器病態内科学

研究要旨

Carvedilol 投与により、拡張型心筋症（DCM）を含めた心不全例の予後改善が報告されているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。DCM では冠微小血管異常による冠血流予備能（CFR）低下が知られているが、carvedilol 投与により DCM の冠循環の改善する可能性がある。今回、我々は経胸壁ドプラ心エコー図（TTDE）を用いて、carvedilol 投与による DCM の CFR に与える影響を検討した。

研究目的

経胸壁ドプラ心エコー図（TTDE）を用いて、carvedilol 投与による DCM の冠動脈予備能（CFR）に与える影響を経時的に検討すること。

研究方法

新規に carvedilol 内服投与開始予定の DCM 患者 10 例に対し、carvedilol 投与前、維持投与量到達時、6 ヶ月後のそれぞれの時点で、TTDE を用いて ATP 負荷（140 μ g/kg/分静注）前後で左冠動脈前下行枝の冠血流速度を測定し、CFR を計測した。（倫理面への配慮）

Carvedilol を投与しない場合の DCM 患者への不利益を考え、コントロール群は設定していない。

研究結果

Carvedilol の維持投与量到達日数は 44 \pm 9 日で、維持投与量は 13 \pm 7mg/日であった。carvedilol 投与により、左室駆出率は維持投与量到達時には不変

であったが(26 \pm 6 vs 29 \pm 6%)、6 ヶ月後には投与前と比べて改善を認めた(37 \pm 6%, $p < 0.05$)。一方、左室流入血流速 E 波の減速時間（DCT）は維持投与量到達時に投与前と比べて延長し(153 \pm 69 vs 209 \pm 66ms, $p < 0.01$)、6 ヶ月後も維持された(233 \pm 60ms, $p < 0.01$)。CFR は、投与前と比べて維持投与量到達時に改善を認め(2.3 \pm 0.8 vs 3.3 \pm 0.7, $p < 0.05$)、6 ヶ月後も維持された(3.6 \pm 0.3, $p < 0.01$)。

考察

Carvedilol 投与により DCM における冠微小循環障害が改善することが示され、予後改善のメカニズムの一つである可能性が示唆された。

結論

TTDE による経時的検討では、DCM 患者に対する carvedilol 投与により、冠微小循環の改善が左室収縮能の改善に先立って維持投与量到達時に認められ、投与 6 ヶ月後も維持されることが示された。

研究発表

学会発表

1. 杉岡憲一, 穂積健之, 竹本恭彦, 渡辺弘之, 藤本浩平, 松村嘉起, 室生卓, 葭山稔, 竹内一秀, 吉川純一 拡張型心筋症における carvedilol 投与の冠血流予備能に対する影響 第 51 回日本心臓病学会学術集会 2003 (平成 15) 年 9 月 8 日 東京
2. Kenichi Sugioka, Takeshi Hozumi, Yasuhiko Takemoto, Kohei Fujimoto, Yoshiki Matsumura, Minoru Yoshiyama, Kazuhide Takeuchi, Junichi Yoshikawa Short-term Administration of Carvedilol Improves Coronary Flow Reserve in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy 第 7 回日本心不全学会学術集会 2003 (平成 15) 年 10 月 24 日 大阪

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

山口 巖

筑波大学臨床医学系内科

研究要旨

本研究の目的は、拡張型心筋症患者において、カルベジロールが左室壁運動と QT dispersion の両者に与える影響について検討することである。17例の特発性拡張型心筋症患者に対して、カルベジロールを多段階漸増法により 20mg まで投与し、左室駆出率 (LVEF) に 10%以上の改善が認められた反応良好群 8例と、10%未満の改善に留まった反応不良群 9例に分類した。反応良好群では QT dispersion ($0.062 \pm 0.024 \text{sec} \rightarrow 0.047 \pm 0.023 \text{sec}$, $p < 0.05$) と QTc dispersion ($0.068 \pm 0.028 \rightarrow 0.048 \pm 0.024$, $p < 0.05$) は短縮し、WMS ($55 \pm 11 \rightarrow 41 \pm 15$, $p < 0.05$) の改善が認められた。これに対し反応不良群では QT dispersion ($0.054 \pm 0.015 \text{sec} \rightarrow 0.054 \pm 0.022 \text{sec}$, NS) と QTc dispersion ($0.058 \pm 0.019 \rightarrow 0.054 \pm 0.021$, NS) に有意な変化は認められなかった。またカルベジロール投与により、反応良好群では Δ WMS と Δ QTc dispersion に有意な正の相関が認められた。特発性拡張型心筋症患者では、カルベジロール投与により機械的収縮のみでなく、電気的不均一性も改善する可能性があることが示唆された。

研究目的

QT のばらつきを示す QT dispersion は心室筋再分極過程における不均一性を示す指標と考えられている。前回我々は、慢性心不全患者においてカルベジロールにより QT dispersion, すなわち電気的不均一性が改善することを報告した。一方で、近年、大規模臨床試験により拡張型心筋症の心不全治療における β 遮断薬の有効性が確立されつつあり、致死的不整脈による突然死や左室壁運動の改善を期待できることが広く知られるようになった。しかしながら、カルベジロールが、左室壁運動と QT dispersion の両者に与える影響については未だ明らかではない。本研究の目的は拡張型心筋症患者における左室壁運動と QT dispersion についての関連を検討し、 β 遮断薬が機械的収縮と電気的不均一性の両者に与える影響について検討することである。

研究方法

17例の特発性拡張型心筋症患者 (55 \pm 13歳, 男性 10例, 女性 7例) に対して、カルベジロールを多段階漸増法により 20mg まで投与した。カルベジロール投与により、左室駆出率 (LVEF) に 10%以上の改善が認められた症例を反応良好群、10%未満の改善に留まった症例を反応不良群と分類した。カルベジロール投与前後で 12誘導心電図を記録し、臨床情報を伏せられた 1人の医師が QT dispersion

(最長 QT 時間-最短 QT 時間) と、QTc dispersion (最長 QTc-最短 QTc) を計測した。また心エコー図における左室 16分割により局所壁運動を視覚的に点数化し (0:normal, 1:mild hypokinesis, 2:moderate hypokinesis, 3:severe hypokinesis, 4:akinesis, 5:dyskinesis), その総計である WMS (Wall Motion Score) を算出した。

(倫理面への配慮)

我々は、拡張型心筋症患者の治療において一般的であるカルベジロールを用いた。研究の遂行にあたっては、倫理面に十分な配慮を行うべく、対象者に研究目的と方法につき口頭にて説明を行い、同意承諾を得た。

研究結果

反応良好群 8例ではカルベジロールにより LVEF が 25 \pm 12% から 45 \pm 15% (mean \pm SD, $p < 0.01$) に改善した。一方、反応不良群 9例において LVEF は 24 \pm 7% から 27 \pm 9% までしか変化しなかった。カルベジロール投与前では 2群間の LVEF, WMS, 最長 QT 時間, 最短 QT 時間に有意差は認められなかった。カルベジロール投与前の QT dispersion は、反応良好群で $0.062 \pm 0.024 \text{sec}$, 反応不良群で $0.054 \pm 0.015 \text{sec}$ であり、また QTc dispersion は反応良好群で 0.068 ± 0.028 , 反応不良群で 0.058 ± 0.019 であり、いずれも反応良好群ではより拡大している傾向があったが、統計的な有意

差は認めなかった。

反応良好群ではカルベジロール投与により QT dispersion (0.062 ± 0.024 sec \rightarrow 0.047 ± 0.023 sec, $p < 0.05$) と QTc dispersion (0.068 ± 0.028 \rightarrow 0.048 ± 0.024 , $p < 0.05$) は短縮し, WMS (55 ± 11 \rightarrow 41 ± 15 , $p < 0.05$) の改善が認められた。これに対し反応不良群では QT dispersion (0.054 ± 0.015 sec \rightarrow 0.054 ± 0.022 sec, NS) と QTc dispersion (0.058 ± 0.019 \rightarrow 0.054 ± 0.021 , NS) に有意な変化は認められず, WMS (56 ± 5 \rightarrow 55 ± 5 , NS) にも明らかな改善は認められなかった。

カルベジロール投与前において, WMS と QT dispersion および QTc dispersion には有意な相関関係は認められなかった。反応良好群ではカルベジロール投与による WMS の変化分 (Δ WMS) と QTc dispersion の変化分 (Δ QTc dispersion) の間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.72$, $p < 0.05$) が, 反応不良群では相関は認められなかった。また治療前の QTc dispersion と Δ QTc dispersion にも相関が認められた ($r = 0.58$, $p < 0.05$)。

考察

QT dispersion は心室筋再分極における不均一性を示し, その拡大は心室性不整脈の危険因子と考えられている。拡張型心筋症による慢性心不全患者においては, 心室性不整脈を有する群では有さない群よりも QT dispersion が拡大し, そのうち QT dispersion が 80 msec を越える集団では心室性不整脈の Relative Risk は 4.5 であったと報告されている (Eur Heart J 1998; 19: 1054-1062)。また, 拡張型心筋症患者において, β 遮断薬の投与により QT

dispersion が改善したとの報告もあり (Int J Cardiology 2001; 77: 141-148), QT dispersion の改善に伴って致死的不整脈が減少することが期待される。本研究では, カルベジロール投与により左室収縮能が改善した反応良好群でのみ QT dispersion と QTc dispersion の改善が認められた。またカルベジロール投与前後での左室壁運動の改善と QTc dispersion の短縮には正の相関が認められた。これまでに拡張型心筋症患者での左室壁運動と QT dispersion の関連についての報告はない。

近年, 不全心筋において筋小胞体のリアノジン受容体 (RyR2) の過リン酸化を抑制することで, Ca^{2+} 漏出を防ぎ, 細胞内 Ca^{2+} 過負荷を改善することが示され (Circulation 2001; 104: 2843-2848), β 遮断薬の抗心不全効果のメカニズムの一つとして心筋内でのカルシウム動態の調節が注目されている。細胞内 Ca^{2+} 濃度は心筋細胞の EC coupling においても, 非常に重要な役割を果たしている。本研究では, 治療前の QTc dispersion が拡大している症例, すなわち電氣的不均一性が大きい症例ほど, カルベジロールによりそれが改善されることが示された。カルベジロールは RyR2 に作用して細胞内 Ca^{2+} 過負荷を改善することにより, QT dispersion は改善され, 同時に心筋収縮能も改善される可能性があるとも考えられる。

結論

特発性拡張型心筋症患者では, カルベジロール投与により機械的収縮のみでなく, 電氣的不均一性も改善する可能性があることが示唆された。

肥大心・不全心におけるエンドセリン遺伝子の発現と PPAR α との関連に関する研究

山口 巖, 宮内 卓, 藤森 明, 酒井 俊, 前田 清司,
河野 了, 飯田 啓治, 後藤 勝年

筑波大学臨床医学系循環器内科

研究要旨

ET_A受容体選択的拮抗薬 YM598 の長期投与が慢性心不全の運動耐容能の低下を改善するかどうかをトレッドミル運動負荷試験により検討した。予めトレッドミルに馴化させたラットを用い、冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全 (CHF) モデルラットを作製した。梗塞の急性期を過ぎた術後 10 日より YM598 1 mg/kg を約 25 週間、1 日 1 回反復経口投与した。YM598 投与後 20 週ならびに 24 週においてトレッドミル運動負荷試験を実施した結果、YM598 は CHF ラットにおいて減少した走行時間を延長させた。

YM598 投与後 25 週における死亡率に関しては、偽手術 (Sham) 群では 1 例の死亡も認められなかったのに対し、蒸留水を投与した CHF ラットの死亡率は 47.6 %であった。一方、YM598 を投与した CHF ラットの死亡率は 7.1%であり、YM598 の長期投与によって死亡率が著明に軽減された (p=0.013)。

生存した CHF ラットならびに Sham ラットの心肺重量を測定した結果、CHF ラットの左心室重量体重比、右心室重量体重比および肺湿重量体重比は Sham ラットに比べて有意に増大し、左心室ならびに右心室の肥大と肺鬱血が生じていた。YM598 の長期投与は両心室肥大ならびに肺鬱血を著明に抑制した。また、生存した CHF ラットならびに Sham ラットの心機能を測定した結果、CHF ラットでは左心室内圧最大一次微分値が有意に低下し、左心室拡張終期圧、右心室内圧および中心静脈圧が有意に上昇していたことから、CHF ラットにおいて左心室収縮機能および拡張機能の低下、肺高血圧ならびに全身性鬱血が生じていた。YM598 の長期投与は Sham ラットと同程度まで心不全ラットの左心室収縮/拡張機能を改善し、右心負荷を軽減した。また組織学的検討の結果、YM598 の長期投与により左心室残存心筋の線維化も抑制された。

従って、慢性心不全ラットにおいて YM598 の長期投与は運動耐容能の低下を改善し、死亡率を減少させるとともに心筋リモデリングを抑制し、心機能を著明に改善することが示された。

研究目的

慢性心不全 (CHF) は高血圧や心臓弁膜症などによって引き起こされる心肥大や、虚血性心疾患 (狭心症・心筋梗塞) などが進行した際の最終的な病態[1]であるが、その成り立ちについては未だに不明な点が多く、現状ではその進展を阻止する有効な治療法がない。また心不全は致死的な病態である為適切な治療法の開発は急務である。

エンドセリン(ET-1)は 1988 年にブタ大動脈内皮細胞培養上清から発見された 21 残基のアミノ酸からなる強力な血管収縮性ペプチド[2]であり、ET_A、ET_B の 2 種類のエンドセリン受容体の存在が知られている[3,4]。ET_A 受容体は主に平滑筋に存在して血管収縮を、ET_B 受容体は主に血管内皮細胞に存在して内皮依存性の血管拡張をつかさどっている[5]。

ET-1 は血管内皮細胞だけでなく心筋細胞からも産生され、心筋細胞ならびに血管平滑筋の収縮性を向上させる[2,6-8]。心不全患者においては血漿中 ET-1 濃度が高値である事が知られている[9]。一方 ET-1 は心筋肥大促進作用や心筋細胞障害作用を有する[6,8,10,11]とともに線維芽細胞増殖作用を有する[12]ことから、心臓における長期的なエンドセリン系の亢進は CHF の進展を助長すると考えられる[13-15]。実際に、心筋梗塞後心不全ラットへのペプチド性 ET_A 受容体選択的拮抗薬 BQ-123 の持続注入は心不全ラットの死亡率を減少させ、心機能を改善させるとの報告[15]も、内因性 ET-1 が心不全の進展に関与していることを示唆している。

YM598 は新規に合成された非ペプチド性 ET_A 受容体選択的拮抗薬であり、ヒト ET_A 受容体に対して高い親和性と選択性を有するとともに、優れた経

口活性を有する[16]。我々は既に YM598 を心筋梗塞後心不全ラットに長期投与することにより、CHF の死亡率が減少し心機能が改善することを示した[17]。運動耐容能は CHF 患者の生活の質 (QoL) の指標となるが、臨床において予後改善 (生存率改善) と QoL 改善を示すような心不全治療薬は未だに無い。そこで今回、心筋梗塞後心不全ラットにおける YM598 長期投与による運動耐容能改善と生存率改善作用を検討し、YM598 が新規心不全治療薬として有用かどうかを評価した。

研究方法

1. 心不全ラット作製と薬物投与

実験的心不全ラットとして冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全ラットを用いた[16,17]。冠動脈結紮ラットの作製には 4~5 週齢の SD 系雄性ラットを使用した。ラットをエーテル麻酔下に開胸し、肋間の切開部を鉗子で拡げて心嚢膜を破った後に心臓を開創部から押し出した。左冠動脈下行枝を結紮針糸で結紮した後、速やかに心臓を胸腔内へ戻した。その後、胸腔内に空気が残らないよう胸壁の外側に軽く力を加えながら閉胸し、Wound Crip を用いて皮膚を縫合した。約 7-10 日後において生存ラットに心電図検査を実施し、心筋梗塞の有無および梗塞領域の大きさを心電図上の異常 Q 波の出現で推定した。手術直後から 1 週間以内の急性心筋梗塞、不整脈等による死亡率は約 60%であった。

薬物投与は心筋梗塞ラットを梗塞サイズが均等になるように 2 群に分け、冠動脈結紮後 10 日から約 25 週間に渡り、Control 群 (CHF + d.w.群; 21 匹) には蒸留水を、YM598 1 mg/kg 投与群 (CHF + YM598 群; 14 匹) には YM598 の 0.2 mg/mL 溶液を、それぞれ 5 mL/kg の容量で 1 日 1 回反復経口投与した。また偽手術群 (Sham + d.w.群; 12 匹) として同様の術式において冠動脈を結紮しなかったラットに、同様に蒸留水を反復経口投与した。なお本実験では YM598 として YM598・カリウム塩 (Lot. K02; 山之内製薬にて合成) を使用し、フリー体換算した用量で投与した。

2. トレッドミル運動負荷試験

予めトレッドミル走行装置に馴化させるため、冠動脈結紮術施行前に走行トレーニングを実施した。心筋梗塞作成後約 1 ヶ月より、毎週 1 回走行トレーニングを実施し、さらにトレッドミル走行装置へ馴化させた。YM598 投与開始後 20 週ならびに 24 週において、トレッドミル運動負荷試験を実施し、一定速度 (25 m/min) 条件における走行時間で運動

耐容能を評価した。

3. 生存率、心行動態および心重量測定

心筋梗塞後心不全ラットに対する YM598 長期投与による抗心不全作用の検討として、薬物投与後約 25 週の各群の死亡率の算出と生存ラットにおける心重量ならびに心行動態の測定を行った。心行動態の測定は最終薬物投与の翌日に行った。

ペントバルビタール麻酔下にて、左頸動脈へ挿入したカニューレを介して心拍数 (HR)、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) を測定し、平均血圧 (MBP) を算出した。右頸動脈から左心室へ挿入したミラーチップカテーテル (2Fr) を介して左心室収縮期圧 (LVSP)、左心室拡張終期圧 (LVEDP) および最大左心室内圧一次微分値 ($LV + dP/dt_{max}$) を測定した。右頸静脈から右心室へ挿入したカニューレを介して右心室収縮期圧 (RVSP)、右心室拡張終期圧 (RVEDP) を測定した。また同カニューレを下行大静脈へ挿入し、全身性鬱血の指標となる中心静脈圧 (CVP) を測定した。心行動態測定後は、心肺組織を摘出し、右心室 (RV) ならびに左心室 (中隔含む; LV+S) 重量、肺重量 (Lung wt.) を測定した。心肥大の指標として、右心室体重比 (RV/BW) ならびに左心室重量体重比 (LV/BW) を算出し、肺鬱血の指標として肺重量体重比 (Lung/BW) を算出した。

4. 組織学的検討

心行動態ならびに心重量測定後の左心室組織を乳頭筋を含むように、約 2 mm 幅で切り出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液内に浸漬して左心組織を固定した。組織を包埋後、薄切してスライドグラスに貼り付け、Masson Tricrome 染色標本を作製した。組織標本は光学顕微鏡下において、個々の心筋レベルでの肥大および間質線維化の程度を観察した。

(倫理面への配慮)

ラットを用いて、実験を行った。ラットを sacrifice する際には、ペントバルビタールで麻酔をした。

研究結果

予めトレッドミルに馴化させたラットの冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製し、梗塞の急性期を過ぎた術後 10 日より YM598 1 mg/kg を約 25 週間、1 日 1 回反復経口投与した。YM598 投与後 20 週 (20W) ならびに 24 週 (24W) において一定の走行速度でトレッドミル運動負荷試験を実施した結果、偽手術ラット (Sham 群) の走行時間 (20W : 42.8 ± 4.4 min ; 24W : 52.5 ± 4.4 min) に比べ CHF ラット (CHF + d.w.群) の走行時間 (20W : 26.4

± 3.9 min; 24W: 25.8 ± 3.7 min) は有意に短かった。YM598 (CHF + YM598 群) は CHF で減少した走行時間を延長させた (20W: 34.4 ± 3.2 min; 24W: 37.8 ± 3.6 min)。YM598 による運動耐容能改善効果は 20W では有意ではなかったが、24W では有意であった (20W: $p=0.156$; 24W: $p=0.037$)。

YM598 投与後 25 週における死亡率に関しては、Sham 群 (12 例) では 1 例の死亡も認められなかったのに対し、蒸留水を投与した CHF + d.w. 群の死亡率は 47.6% (21 例中 10 例死亡) であった。一方、CHF + YM598 群の死亡率は 7.1% (14 例中 1 例死亡) であり、YM598 の長期投与によって死亡率が著明に軽減された ($p=0.013$)。

生存したラットの心肺重量を測定した結果、CHF + d.w. 群では左心室重量体重比 (LV/BW)、右心室重量体重比 (RV/BW) および肺湿重量体重比 (Lung/BW) が Sham 群に比べて有意に増大し、CHF ラットにおいて左心室ならびに右心室の肥大と肺鬱血が生じていた。YM598 の長期投与は両心室肥大ならびに肺鬱血を著明に抑制した。

また生存したラットの心行動態を測定した結果、心拍数 (HR) は各群間に差は認められず、平均血圧 (MBP) は CHF + d.w. 群においてのみ有意に低値であった。心機能に関しては、CHF + d.w. 群では Sham 群に比べて最大左心室内圧一次微分値 (LV +dP/dt_{max}) が有意に低下し、左心室拡張終期圧 (LVEDP)、右心室拡張終期圧 (RVEDP)、右心室内圧 (RVSP) および中心静脈圧 (CVP) が有意に上昇していたことから、CHF ラットにおいて左心室収縮機能および両心室拡張機能の低下、肺高血圧ならびに全身性鬱血が生じていた。YM598 の長期投与は Sham ラットと同程度まで CHF ラットの両心室収縮/拡張機能を改善し、右心負荷を軽減した。

さらに組織学的検討の結果、Sham ラットに比べて CHF ラットでは遠心性心肥大による特徴的な左心室内腔拡大像、ならびに左心室残存心筋 (梗塞領域以外の心筋) の単位心筋当りの心筋肥大および長軸径の延長が認められた。また著明な心筋間質の線維化が認められた。YM598 の長期投与により CHF ラットの左心室残存心筋の単位心筋当りの心筋肥大が抑制され、間質線維化も抑制された。

考察

新規心不全治療薬としての ET_A 受容体選択的拮抗薬 YM598 の有用性を冠動脈結紮による心筋梗塞

後心不全 (CHF) ラットを用いて検討した。CHF ラットに YM598 を約 25 週間にわたり長期経口投与した結果、死亡率が有意に軽減された。また YM598 投与後 20 週ならびに 24 週においてトレッドミル運動負荷試験を実施した結果、YM598 は CHF ラットにおいて減少した走行時間を延長させたことから、YM598 が慢性心不全時の運動耐容能を改善させることが示された。現在の心不全治療において生命予後の改善と症状軽減や活動性の増大等の生活の質 (QoL) の改善を示すような心不全治療薬は未だに存在しない。運動耐容能は活動性や自覚症状と密接に関連することから、今回の結果は YM598 が慢性心不全における予後改善と QoL 改善作用を有する新規治療薬として有用である可能性を示唆している。

実験終了時まで生存した CHF ラットにおいては心肥大と心機能低下が顕著に認められたが、YM598 を長期投与した CHF ラットでは Sham ラットと同程度まで心機能が改善され、心肥大が軽減されていた。心肥大の形成は本来心臓に加わった負荷に対して心機能を保持するための代償機構であるが、肥大心では個々の心筋細胞の肥大に対し毛細血管の増生が十分に起こらず相対的な心筋虚血に陥るために、心筋細胞の脱落や組織の線維化といった心筋リモデリングの進展を伴って収縮性・拡張性の低下を引き起こすとされている。今回組織学的検討から CHF ラットの残存心筋において著明な心肥大ならびに線維化が生じていたことと、心行動態において CHF ラットの LV +dP/dt_{max} が有意に低下し、LVEDP が有意に上昇していたことから、今回用いた CHF ラットにおいて心筋リモデリングと左心室収縮機能および拡張機能の低下が確認された。YM598 は本モデルにおいて心筋リモデリング抑制と左心室収縮・拡張機能改善効果を示した。従って、YM598 は慢性心不全の病態進行を抑制する可能性が高く、新規機序に基づく心不全治療法として注目し得ると考えられる。

さらに、CHF ラットでは Sham ラットに比べて Lung/BW が増加するとともに RVSP、RVEDP および CVP が有意に上昇していたことから、著明な右心負荷の増大と右心室拡張機能の低下が確認された。肺高血圧を伴う右心不全はそれ自体が予後規定因子と考えられ、慢性心不全の自覚症状に関連する。今回 CHF ラットに対する YM598 の長期投与は左心機能を改善するとともに、右心負荷の増大と右心室拡張機能の低下を著明に軽減したことから、今回得られた運動耐容能改善ならびに死亡率改善効

果の一因として右心系の負荷軽減も寄与しているものと推察される。

結論

慢性心不全ラットにおいて、エンドセリン受容体

遮断薬 YM598 の長期投与は運動耐容能の低下を改善し、死亡率を減少させるとともに心筋リモデリングを抑制し、心機能を著明に改善することが示された。

研究発表

論文発表

1. Miyauchi T, Maeda S, Iemitsu M, Kobayashi T, Kumagai Y, Yamaguchi I, Matsuda M.
Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung.
Journal of Applied Physiology 94:60-68, 2003
2. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Kuno S, Ajisaka R, Yamaguchi I, Matsuda M.
Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women.
Journal of Applied Physiology 95: 336-341, 2003
3. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H, Kakinuma Y, Matsuda M, Yamaguchi I.
Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism.
Hypertension Research 26: 829-837, 2003

学会発表

1. 高梨正勝, 宮内 卓, 入鹿山容子, 酒井 俊, 粕谷善俊, 小形岳寛, 家光素行, 須藤龍彦, 後藤勝年, 山口 巖.
エンドセリン-1 による心肥大に対して, PPAR- α 刺激薬は有効に抑制し, その抑制には c-Jun NH2 末端キナーゼの遮断が関与する.
第 76 回日本薬理学会 2003
2. Miyauchi T, Yamauchi-Kohno R, Kobayashi T, Sakai S, Aihara H, Yabana H, Murata S, Goto K, Yamaguchi I.
Poor survival of cardiomyopathic hamsters with CHF is greatly improved by combined treatment with endothelin(ET)-A receptor antagonist and ACE inhibitor.
第 67 回日本循環器学会 2003
3. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yamaguchi I.
Anti-ER stress action of HIF-1 alpha in compensation of impairment of energy metabolism due to cellular stress.
第 67 回日本循環器学会 2003
4. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Matsuda M, Yamaguchi I.
Exercise training improves the aging-induced decrease in molecular regulatory system of mitochondrial respiratory function in the rat heart.
第 67 回日本循環器学会 2003
5. Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Yamaguchi I.
A PPAR- α activator inhibits cardiac fibrosis by inhibiting of fibroblast proliferation and collagenesis in cultured fibroblasts and DOCA-salt hypertensive rats.
第 67 回日本循環器学会 2003
6. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Yamaguchi I.
Acute exercise induces activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway

- in the heart of rats.
第 67 回日本循環器学会 2003
7. Sakai S, Miyauchi T, Irukayama-Tomobe Y, Ogata T, Takanashi M, Iemitsu M, Goto K, Yamaguchi I.
Stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) attenuated endothelin-1-induced cardiac hypertrophy partly via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase (JNK) pathway.
第 67 回日本循環器学会 2003
 8. Miyauchi T, Sakai S, Maeda S, Iemitsu M, Fujimori A, Shikama H, Takanashi M, Tanabe T, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I.
Decreases in exercise capacity, myocardial energy metabolism, and survival in rats with CHF are greatly improved by endothelin-A receptor antagonist.
第 67 回日本循環器学会 2003
 9. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Goto K, Yamaguchi I, Matsuda M.
An endothelin-A/B dual receptor antagonist reverses the exercise-induced redistribution of tissue blood flow.
第 67 回日本循環器学会 2003
 10. Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Tanabe T, Watanabe M, Yamaguchi I, Matsuda M.
Exercise causes upregulation of renin-angiotensin system in kidneys and decreases renal blood flow.
第 67 回日本循環器学会 2003
 11. Takanashi M, Miyauchi T, Yamaguchi I.
Establishment of hypoxia inducible factor(HIF)-1 α overexpressing cells; useful model for analyzing the mechanisms of hypoxia-induced cellular pathophysiology.
第 67 回日本循環器学会 2003
 12. 小形岳寛, 宮内 卓, 下條信威, 高梨正勝, 増澤浩一, 山口 巖.
DOCA-salt 高血圧性ラット心臓での, PPAR α 刺激薬による心筋繊維化抑制効果と拡張機能増悪抑制効果—抗炎症作用からの検討—
Cardiovascular Medicine 21 第 3 回フォーラム 2003
 13. 村越伸行, 宮内 卓, 柳沢正史, 山口 巖.
動脈硬化疾患におけるエンドセリンの役割.
第 6 回最先端循環器フォーラム 2003
 14. Miyauchi T, Fujimori A, Maeda S, Iemitsu M, Sakai S, Takanashi M, Kawano S, Iida K, Shikama H, Tanabe T, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I.
Reduction in exercise capacity, myocardial energy metabolism, and survival in rats with CHF are greatly improved by endothelin-A receptor antagonist.
The International Symposium of Cardiology Frontiers Cardiomyopathy and Heart Failure 2003
 15. Shimojo N, Miyuchi T, Yoko Irukayama-Tomobe, Seiji Maeda, Ohkubo T, Tanaka Y, Goto K, Yamaguchi I.
Effects of medium-chain triglyceride(MCT) application to SHR on cardiac function, Hypertrophy, and expression of molecular markers including Endothelin-1.
Eighth International Conference on Endothelin 2003
 16. Tkanashi M, Miyauchi T, Goto K, Yamaguchi I.
Establishment of hypoxia indu α factor (HIF)- 1 α overexpressing cells which produce endothelin-1.
Eighth International Conference on Endothelin 2003

17. Ogata T, Miyauchi T, Irukayama-Tomobe Y, Takanashi M, Goto K, Yamaguchi I.
The PPAR- α activator fenofibrate inhibits endothelin-1-induced fibroblast proliferation as well as c-jun mRNA expression.
Eighth International Conference on Endothelin 2003
18. Fujimori A, Miyauchi T, Sakai S, Yuyama H, Iemitsu M, Sanagi M, Sudoh K, Shikama H, Goto K, Yamaguchi I.
YM598, an orally active ET_A receptor antagonist, ameliorates the progression of cardiopulmonary changes and both-side heart failure in rats with cor pulmonale and myocardial infarction.
Eighth International Conference on Endothelin 2003
19. Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Kasuya Y, Sakai S, Goto K, Yamaguchi I.
Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α decreases endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via blockade of c-jun NH2-terminal kinase and p38-MAPK pathways but not ERK pathway.
Eighth International Conference on Endothelin 2003
20. Masuzawa K, Miyauchi T, Takanashi M, Ogata T, Yamaguchi I, Goto K.
Effects of endothelin-1 eyedrops on the retina in rats.
Eighth International Conference on Endothelin 2003
21. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Matsuda M, Goto K, Yamaguchi I.
Time course alteration of endothelin-1 gene expression in the heart during exercise and 24-h postexercise periods in rats.
Eighth International Conference on Endothelin 2003

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 —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—

北浦 泰

大阪医科大学第三内科

研究要旨

以前より拡張型心筋症 (DCM) 患者心筋にエンテロウイルス, アデノウイルスなどの遺伝子が証明され, 病因との関連が注目されている. しかし, これらウイルスゲノムの陽性率は検索方法, 患者の地域および施設などにより相当に異なり, 特に異なる国における本症患者心筋について, 同一施設で同一方法で検索し比較した報告は未だなされていない. 本研究では, 心移植, 左室部分切除術で得られた心筋を用いて, 日本と米国の末期 DCM 患者において同一方法で諸種ウイルスゲノムの検索を行い, 各ウイルスの陽性頻度およびウイルス存在様式について検討した. 結果は, 我が国の DCM 患者 26 例中 9 例 (35%), 米国の DCM 患者 30 例中 7 例 (23%) にエンテロウイルスゲノムを認め, これらのウイルスは心臓親和性が強いコクサッキー B 群ウイルスと考えられた. また, エンテロウイルスゲノム陽性心筋には高頻度にアンチセンス鎖 RNA も存在し, 心筋におけるウイルス RNA の複製 (active viral RNA replication) が示唆された. 最近, 心筋ウイルスゲノム陽性の DCM 患者にインターフェロンを投与し, 全症例で心筋からウイルスが排除され心機能が改善したとの報告がある. DCM 患者の新しい治療法として, 心筋ウイルスゲノムの有無に基づいたインターフェロンなどによる抗ウイルス療法が期待される. また, 日米両国患者心筋よりインフルエンザ, アデノ, ムンプス, 単純ヘルペス, EB ウイルスなどはいずれも検出されず, DCM 患者心筋におけるこれらウイルスによる持続感染は否定的と考えられた.

研究目的

拡張型心筋症 (DCM) 患者心筋にエンテロウイルスゲノムが証明され, 病因との関連が検討されてきた. 最近, DCM 患者心筋にエンテロウイルス capsid 蛋白 VP1 が高頻度に証明され, 心筋におけるウイルス蛋白合成が示唆されている. また, コクサッキーウイルスの産生するプロテアーゼ 2A がジストロフィンを切断して心筋細胞骨格構造を破壊する可能性が示されるなどコクサッキー B 群ウイルスの持続感染が本症の病因として益々重要と考えられるようになってきている. さらに, 本症患者心筋にエンテロウイルス以外のアデノウイルスやパルボウイルスも検出されるとの報告があり, これらウイルスの病因との関連も今後の検討課題である. しかし, 本症患者心筋におけるエンテロウイルスに関する成績には未だ未解決の部分が残されており, ウイルスゲノムの陽性頻度や存在様式を明確にする必要がある.

本研究では, DCM 患者の心移植, 左室部分切除術の際に得られる充分量の心筋を用いて, 諸種ウイルスゲノムの検索を行い, 日米間における陽性頻度差やウイルス存在様式を検討した.

研究方法

大阪医科大学および湘南鎌倉総合病院において, 内科的治療により心不全のコントロールが困難なために左室部分切除術を施行された DCM 患者 26 例 (男性 20 例, 女性 6 例, 48±15 歳) の部分切除心筋, および米国ヘンリーフォード病院が保有する心移植を受けた DCM 患者 30 例 (男性 18 例, 女性 12 例, 46±16 歳) の心筋を対象とした. 切除心筋の一部は直ちに凍結し, -80°C に保存. 凍結心筋 20mg を用いて RT-PCR, PCR 法によりエンテロウイルス, インフルエンザウイルス, アデノウイルス, ムンプス, 単純ヘルペスウイルスおよび EB ウイルスのゲノムなどの検索を行った. エンテロウイルスゲノムの検出には, strand-specific viral RNA detection 法を用いてエンテロウイルスセンス鎖 RNA とアンチセンス鎖 RNA の検出を試みた. 5'側非翻訳領域の一部の領域はエンテロウイルス属において最もよく保持されており, ほとんどすべてのエンテロウイルスの検出が可能であり, この領域を PCR 増幅した. 次に, PCR 産物について direct sequence 法により核酸塩基配列を決定した.

研究結果

我が国の DCM 患者 26 例中 9 例 (35%)、米国 DCM 患者 30 例中 7 例 (23%) の心筋よりエンテロウイルスゲノムを検出した。エンテロウイルス陽性例の PCR 産物の核酸塩基配列は、本邦および米国 DCM 患者において、コクサッキー B 群ウイルスと高い相同性を示した。コクサッキーウイルスは全長 7.4 kbp の 1 本鎖 RNA ウイルスであり、ウイルス RNA の複製において、まずセンス鎖 RNA を鋳型として相補的なアンチセンス鎖 RNA が作られ、次に、アンチセンス鎖 RNA を鋳型としてセンス鎖 RNA が多数合成される。そのため、アンチセンス鎖 RNA の検出は、ウイルス RNA の複製の根拠とされる。今回、コクサッキーウイルスアンチセンス鎖 RNA を本邦 DCM 患者 9 例中 7 例 (78%)、米国 DCM 患者 7 例中 5 例 (71%) の高頻度に検出した。DCM 患者心筋においてコクサッキーウイルス RNA の複製 (active viral RNA replication) が行われていることを示している。しかし、心筋よりコクサッキー B 群ウイルスはいずれも分離されなかった。また、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ムンプス、単純ヘルペスウイルスおよび EB ウイルスのゲノムはいずれも検出できなかった。

考察

DCM 患者心筋に検出されるウイルスゲノムはエンテロウイルスによるものに限られ、日米間で頻度に差はあるものの心臓親和性が強いコクサッキー B 群ウイルスであった。エンテロウイルスゲノム陽性例では同時にウイルスアンチセンス鎖 RNA が高率に検出され、心筋におけるウイルス RNA の複製

(active viral RNA replication) が示唆された。この事実は本症の病因ならびに治療を検討する上で重要と考えられる。しかし、培養細胞によるウイルス分離ではウイルスが分離できないことより、本症患者心筋に存在するコクサッキー B 群ウイルスは感染性を持たない defective virus の可能性が考えられる。このようなコクサッキー B ウイルスが本症類似の病態をきたすことがトランスジェニックマウスを用いた実験で示されている。最近、ウイルス陽性の DCM 患者にインターフェロンを投与し、全症例で心筋からウイルスが排除され、心機能が著明に改善したと報告がなされ注目されている。これは、DCM 患者の心筋ウイルスの有無に基づいた抗ウイルス療法に道を開く事実として期待される。本症も慢性活動性 C 型肝炎と同様に病期とエンテロウイルスの型や変異、量、増殖活性などを明らかにし、インターフェロン療法の適応症例、投与方法の決定が急務である。また、本研究では日米両国共に、十分量の本症患者心筋を用いたにもかかわらずアデノウイルスを含めその他のウイルスは全て検出されず、これらウイルスによる感染は否定的と考えられた。

結論

日米両国の DCM 患者心筋より頻度は異なるがエンテロウイルスゲノムを検出し、心臓親和性が強いコクサッキー B 群ウイルスと考えられた。しかし、アデノウイルスを含めた他のウイルスは検出されなかった。エンテロウイルスゲノム陽性患者心筋にアンチセンス鎖 RNA を高率に認めることより、心筋におけるウイルス RNA の複製 (active viral RNA replication) が示唆された。

研究発表

論文発表

1. 北浦 泰, 出口寛文, 寺崎文生, 浮村 聡, 森田英晃ほか: インフルエンザ心筋炎一病態および発症機序について— 日本臨床 61: 1945-1952, 2003
2. 北浦 泰: 心筋炎, 循環器疾患最新の治療 2004-2005, 山口徹, 堀正二編集, 南江堂 pp163-168, 2004

学会発表

1. Prevalence of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. 19th Annual Meeting, Japanese Section of the International Society for Heart Research 2002年11月, 山形
2. Comparison of the prevalence of viral infection in the myocardium of U.S. and Japanese patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003 2003

年10月，札幌

3. Evaluation of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. 第68回日本循環器学会学術集会 2004年3月，東京
4. Analysis of enterovirus genome in the myocardium of murine myocarditis in the subacute phase and patients with end-stage dilated cardiomyopathy. 第68回日本循環器学会学術集会 2004年3月，東京

拡張型心筋症患者心筋におけるテネイン C の発現に関する研究

北浦 泰

大阪医科大学第三内科

研究要旨

我々は、先に拡張型心筋症（DCM）と診断され左室縮小形成術を受けた患者に少なからず慢性心筋炎や心サルコイドーシスが存在することを明らかにした。このことは、臨床的に DCM と慢性心筋炎や心サルコイドーシスとの鑑別が必ずしも容易でないことを意味している。テネイン C（TNC）は細胞外マトリックス糖蛋白の一つで、成人の正常心筋には発現せず、急性心筋梗塞や急性心筋炎などの炎症や組織リモデリングに伴って発現することが知られている。そこで、心筋における TNC の発現が慢性心筋炎のマーカーとなり得るか否かについて、左室縮小形成術時に得た DCM 患者心筋を用いて抗 TNC 抗体により免疫組織学的検索を行った。結果は、慢性心筋炎患者では心筋における TNC 発現が亢進しており、TNC 発現が慢性心筋炎の診断のマーカーになる可能性が示唆された。

研究目的

我々は、先に拡張型心筋症（DCM）と診断され左室縮小形成術を受けた患者に少なからず慢性心筋炎や心サルコイドーシスが存在することを明らかにした。臨床的に DCM とこれらの疾患との鑑別は困難で生検心筋所見が重要な根拠となるが、通常的心筋組織学的検索においてもその鑑別は容易でない。DCM と慢性心筋炎や心サルコイドーシスの鑑別診断は治療の観点からも重要な課題と考えられる。

テネイン C（TNC）は、細胞外マトリックス糖蛋白の一つであり、さまざまな組織で胎児期の形態形成、癌浸潤、創傷治癒、組織再生に伴って限られた場所に一過性に発現し、反接着因子、細胞遊走の促進因子として知られている。心臓では成人の正常心筋には発現せず、急性心筋梗塞や急性心筋炎などの病態において組織リモデリングに伴って発現することが報告されている。慢性心筋炎では活動性炎症が持続しており慢性心筋炎の患者心筋においては TNC 発現が常に亢進している可能性が考えられる。そこで我々は、慢性心筋炎患者の心筋組織において TNC の発現が亢進するとの仮説をたて、それ検証する目的で本研究を行った。

研究方法

左室縮小形成術を施行された拡張型心筋症患者 59 例（男 53 例、女 6 例）を対象とした。左室縮小形成術時切除心筋の一部をホルマリン固定した後、パラフィン包埋し薄切切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色による通常の組織学的検討に加

えて以下の検索を行った。抗 TNC 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い TNC の発現と局在を検索した。また、抗 LCA 抗体（リンパ球）と抗 CD68 抗体（マクロファージ）を用いて炎症性浸潤細胞の局在を検索した。TNC の発現と炎症性細胞浸潤の程度は、各々スコア 0～3+ の 4 段階で半定量的評価を行い、両者の関連を統計学的に検討した。間質の線維化についてはシリウスレッド染色と抗Ⅲ型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学染色にてその性状を検討した。シリウスレッド染色は偏光顕微鏡下での観察も行った。

臨床背景として、術後早期の左室駆出率の改善度、生命予後を各指標に用い、TNC の発現との関連をスコア別に比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究施行に際して、研究対象患者に研究目的と方法につき説明を行い承諾（インフォームドコンセント）を得た。

研究結果

DCM 患者心筋において、組織所見では多くの症例で高度な線維化が見られたが TNC の発現はおおむね軽度であり、約 1/4 の症例においては TNC の陽性像は観察されなかった。約半数の DCM 患者心筋において局所的かつ散在的にリンパ球とマクロファージを主体とする炎症性細胞浸潤がみられ、同部位に一致して TNC の高度の発現が観察された。心筋組織における炎症性細胞浸潤の程度および TNC 発現の半定量的評価を行い、両者の関係を統計学的に検討したところ、両者の間に有意の正関連

が認められた($p < 0.001$).

シリウスレッド染色の偏光顕微鏡による観察では、TNC陽性の炎症部位における線維化巣は細い線維が多く比較的新しいものと考えられた。さらに炎症性細胞浸潤を伴う間質のTNC発現部位にはⅢ型コラーゲンは認められず、その周囲の線維化巣がⅢ型コラーゲン陽性であった。以上より、炎症性細胞浸潤の部位においてはコラーゲン線維の構築に先だってTNCの発現が亢進していることが示唆された。

TNC高度発現群(スコア3+群)とTNC非発現群(スコア0群)とにおいて、臨床背景について比較検討した。術後早期の左室駆出率の改善度とTNC発現の間に有意の相関は認められなかった。また、カプランマイヤー法を用いた検討において、TNC発現の程度と生命予後の間に明かな相関は認められなかった。

考察

DCM患者心筋においてはTNCの発現は、必ずしも高度ではなかった。しかし、炎症性細胞浸潤とTNCの発現に相関がみられたこと、炎症性細胞浸潤の部位において心筋間質の線維化に先行してTNCの発現が見られたことより、炎症性細胞浸潤

を伴うTNCの高発現は心筋の持続性活動性炎症、すなわち慢性心筋炎に伴う組織リモデリングを反映していると考えられる。また、炎症性細胞浸潤を伴わないTNC発現は、微小循環障害や、機械的なストレスに伴う組織リモデリングを反映している可能性が推察され、DCMの病態に関与している可能性がある。TNC発現の程度と術後早期の左室駆出率の改善度や生命予後との間には有意な関連はみられなかった。TNCの発現は、局所の組織リモデリングを反映するが、左室収縮能を必ずしも反映しないと考えられた。予後の検討については、左室縮小形成術自体が予後を規定する介入因子として影響が大きいため、TNCの発現とDCM患者の予後を単純には比較できないと考えられた。しかし、TNCの発現とさまざまな臨床病態との関連は今後の検討課題と考えられる。

結論

臨床的にDCMと診断された患者において、心筋におけるTNCの発現亢進は、持続性、活動性炎症に伴う組織リモデリングを反映しており、慢性心筋炎を鑑別診断する際のマーカーとなり得る。

研究発表

学会発表

1. Tenascin-C expression in the myocardium obtained by partial left ventriculectomy from patients with dilated cardiomyopathy.
The International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003 2003年8月, 札幌
2. 拡張型心筋症におけるTenascin Cの発現: 左室縮小術時切除心筋を用いた免疫組織学的検討.
第25回 心筋生検研究会 2003年11月, 久留米
3. Tenascin-C expression in the myocardium from patients with dilated cardiomyopathy as a possible marker of chronic myocarditis. 第68回日本循環器学会学術集会 2004年3月, 東京

グレリンの心筋細胞内情報伝達に関する研究

川名 正敏

東京女子医科大学循環器内科

研究要旨

内因性 GHS (growth hormone secretagogue)であるグレリンの心筋細胞に対する効果を検討した。培養心筋細胞においてグレリンは ERK, Akt のリン酸化及び EGFR のリン酸化を誘導し, endothelin-1, BNP など心肥大関連遺伝子発現を亢進させた。心筋細胞においてグレリンは細胞肥大・生存に関わる作用を有することが示唆される。

研究目的

近年 GH-IGF axis が心臓の発育に重要であることが明らかになり、臨床的にも GH 欠損症例での心臓低形成が報告されている。また Growth Hormone (GH) 療法は重症慢性心不全治療法の一つとして臨床でも一部試みられており、この場合は、肝臓での IGF-1 合成亢進→心臓での IGF-1 受容体を介する強心作用が作用機序とされている。これに対して合成 GHS (growth hormone secretagogue) : Hexarelin は GH 生成とは独立して、心血管動態の改善をもたらすことが報告されている。

1999 年に Kangawa らによって発見された内因性の GHS である ghrelin は、心不全モデルにおいて心室機能を改善すること、ヒトでも心拍出量を増加させることが報告された。このような GHS が細胞内でどのような情報伝達系を介して作用するかについては不明な点が多い。

グレリン及びその受容体である GHSR は心臓でも mRNA レベルで発現が見られることから、cardiac GHSR を介した細胞内情報伝達経路の存在を検証することは、心筋細胞の生育、肥大に関する新しい情報伝達経路を明らかにする可能性がある。本年度の研究では Ghrelin が、心筋細胞において、肥大関連遺伝子発現を変化させるかどうか、それに伴って細胞内情報伝達系がどのように変化するかを明らかにすることを目的とする。

研究方法

- 1) 心筋細胞を ghrelin で刺激し、BrdU の細胞内取り込みを蛍光色素法を用いて測定し、心筋細胞の増殖能を評価した。
- 2) 心筋細胞を ghrelin で刺激し RNA を抽出して、ET-1 遺伝子、BNP 遺伝子発現を RT-PCR を用いて検討した。

- 3) 心筋細胞を ghrelin で刺激し蛋白を抽出して、ERK, AKT, EGFR のリン酸化をリン酸化抗体を用いた western blot 法にて観察した。

- 4) Ghrelin 刺激前に予め、MAPKK, PI3K, EGFR の各阻害薬(PD98059, LY294002, AG1478)を投与し、その変化を観察した。
(倫理面への配慮)

本研究は培養心筋細胞株を用いており、倫理面では特に問題はないと思われる。

研究結果

- 1) Ghrelin 刺激により心筋細胞の BrdU 取り込みが増加して、細胞増殖能の亢進が認められた。
- 2) Ghrelin 刺激により心筋肥大関連遺伝子である ET-1, BNP 遺伝子発現が増加した。
- 3) Ghrelin 刺激により 5 分をピークとして ERK のリン酸化が亢進した。さらに EGFR リン酸化も 15 分をピークとして観察され、同様のタイムコースで AKT のリン酸化も亢進していた。
- 4) MAPKK, PI3K, EGFR の各阻害薬の前投与により ghrelin によるこれら蛋白のリン酸化亢進が抑制された。

考察

- 1) 心筋細胞において、ghrelin は ERK リン酸化および心肥大関連遺伝子発現を増加させた。Ghrelin は GPCR から MEK-ERK の活性化を介して肥大・増殖シグナルに関与する可能性がある。
- 2) また、ghrelin は EGFR リン酸化も誘導した。他のリガンドと同様に、心筋細胞において ghrelin 受容体としての GHSR1a あるいはその類縁受容体から EGFR へのシグナル伝達経路が存在することが示唆される。
- 3) さらに、ghrelin が AKT リン酸化も誘導したことから、心筋細胞での細胞保護的シグナル伝達に

関与する可能性がある。

結論

以上の結果より、心筋細胞では他の G 蛋白共役

受容体からの情報伝達と同様に、グレリンは ERK 及び AKT、さらには EGFR を介したリン酸化カスケードが存在し、心肥大に関与する可能性が示唆される。