

# 拡張型心筋症の新規原因遺伝子の発見と機能解析

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所

## 研究要旨

新規の特発性心筋症原因遺伝子を同定する目的で、肥大型心筋症患者および拡張型心筋症患者を対象にして Cypher/ZASP 遺伝子変異を検索し、一般健常者集団には認められない変異を拡張型心筋症発端患者に同定した。本変異は Cypher/ZASP の PKC 結合ドメインに存在し、進化上よく保存されたアミノ酸の変異であり、患者家系内の発症者は全員この変異を有していた。また、家系調査から本変異は遅発性拡張型心筋症と関連するものと考えられた。そこで、酵母 2 ハイブリッド法およびプルダウン法にて変異による機能変化を検討したところ、PKC との結合親和性を増強する変異であった。以上の結果は、Cypher/ZASP が心筋の拡張型心筋症原因遺伝子であり、その発症機序に Z 帯への PKC の集積が関係することを強く示唆する。

## 研究目的

近年の分子遺伝学的解析により特発性心筋症の原因遺伝子が次々に明らかにされて来たが、最近のトピックとして、Tcap, MLP, タイチン, アクチニンなどの Z 帯構成要素の変異が肥大型心筋症, 拡張型心筋症のいずれにも見出されること、拡張型心筋症変異は心筋ストレッチ反応の低下をもたらすことが我々の研究で明らかとなっている。特に興味深いことに、拡張型心筋症関連 Tcap 変異はカルサルチンへの結合性が減弱し、肥大型心筋症関連 Tcap 変異は逆にこれを増強する。カルサルチンは Z 帯において脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを結合する新規タンパクとして発見されたものであるが、これらのことは、ストレッチ反応とタンパクリン酸化が密接に関連することを強く示唆する。最近、PKC と結合する新規 Z 帯タンパク Cypher/ZASP が発見されたが、Cypher/ZASP はカルサルチンとアクチニンの両者に結合する。そこで本研究では、新規の特発性心筋症の原因遺伝子を同定することを目的として、ヒト Cypher/ZASP の cDNA およびゲノム遺伝子の構造を明らかにし、特発性心筋症患者における変異を検索した。また、見出された変異の機能変化を検討することで、Z 帯構成要素異常を心筋症病態との関連を解明することを目的とした。

## 研究方法

1) ヒト Cypher/ZASP 遺伝子 cDNA およびゲノム構造の解明：マウスでは Cypher あるいは Oracle, ヒトでは ZASP の名称で報告された

cDNA はいずれも同一遺伝子のスプライシングバリエーションと考えられるため、これらの構造を比較して種々のプライマーを設定し、それらを用いて RT-PCR によって種々のヒト組織における Cypher/ZASP 遺伝子発現と cDNA 構造を検討した。また、同様のプライマーを用いて LA-PCR 法でゲノム遺伝子を増幅し、そのシーケンス解析を行った。

2) 特発性心筋症患者における Cypher/ZASP 変異の同定：既知の原因遺伝子に変異が認められていない家族性肥大型心筋症患者 96 名、拡張型心筋症患者 96 名（うち家族性拡張型心筋症は 34 名）を対象として、Cypher/ZASP 遺伝子変異を PCR-SSCP 法にてスクリーニングした。異常 SSCP パターンを認めた場合には、同一パターンが健常者集団には認められないことを確認後、その塩基配列を決定するとともに家系調査を行うことで、心筋症に特異的な変異であることを確認した。

3) 酵母 2 ハイブリッド法による Cypher/ZASP 変異の機能解析：Cypher/ZASP 変異は第 3 LIM ドメインに存在するため、このドメインに対応する正常 cDNA および拡張型心筋症変異 (Asp626Asn) をプライマー伸介法で導入した cDNA をそれぞれ bait ベクターにクローニングした。一方、PKC- $\alpha$  (1-160), PKC- $\epsilon$  (1-297), PKC- $\zeta$  (1-180) に対応する cDNA をそれぞれ activator ベクターにクローニングした。これらの bait-activator を各々の組み合わせで酵母 Y187 株にトランスフォームし、安定なトランスフォーマントを得た。ついで、独立したトランスフォーマントを 8-10 個選択し、その  $\beta$ gal 活性を測定した。 $\beta$ gal 活性をタンパク量で補正し

た値で bait-activator 間の結合親和性の指標とした。

4) プルダウン法による Cypher/ZASP 変異の機能解析：正常マウス Cypher cDNA あるいは拡張型心筋症変異 (Asp626Asn) を導入した Cypher cDNA を、HA タグを付加した PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  あるいは PKC- $\gamma$  の cDNA とそれぞれ組み合わせ 293 細胞にトランスフォームし、トランスフォーマント細胞から抽出したタンパクをプルダウン実験に用いた。抗 HA 抗体で免疫沈降したタンパクを抗 Cypher 抗体で検出するとともに、抗 Cypher 抗体で免疫沈降したタンパクを抗 HA 抗体で検出した。得られたプロット上のシグナル共同を比較することで、Cypher/ZASP 変異による PKC 結合親和性の指標とした。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト遺伝子解析研究にあたるため、3 省合同遺伝子解析研究ガイドラインに従って行うものであり、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認(平成 13 年度 1 月 18 日付)を受けて実施している。

## 研究結果

1) 種々のプライマーを用いた RT-PCR 解析の結果、ヒト Cypher/ZASP 遺伝子には少なくとも 6 種の cDNA バリエーションが存在することが判明した。以前に報告されていた cDNA のうち、ZASP variant 2 として報告された cDNA に対応する転写産物はいかなるプライマーの組み合わせでも検出されなかった。一方、ゲノム構造を決定した結果、ヒト Cypher/ZASP は全 16 エクソンで構成されるが、このうち第 9 エクソン使用の有無で LIM ドメインを含む長いタンパクをコードするかが決定されること、第 4 および第 10 エクソンは心筋に比較的強く発現するエクソンであることが明らかになった。なお、ゲノム構造との比較で ZASP variant 2 に対応するエクソン-イントロン構造が存在しないことが判明したため、報告されたバリエーションはアーチファクトであると結論した。

2) 特発性心筋症患者の Cypher/ZASP 遺伝子変異を検索したところ、家族性拡張型心筋症発端患者 1 名に Asp626Asn 変異を検出した。この変異は健康日本人 400 名には認められず、Cypher/ZASP の LIM ドメイン内の進化上よく保存されたアミノ酸の置換であった。また、家系を調査したところ、Asp626Asn 変異は発端者の同胞の 2 名の拡張型心筋症患者と 1 名の小脳失調患者に認められたが、健康な同胞および他の 1 名の小脳失調患者には認めら

れなかった。なお、家系内発症者はいずれも男性は 50 歳以降、女性は 65 歳以降に発症しているため、本変異は遅発性拡張型心筋症と関連するものと考えられた。

3) 酵母 2 ハイブリッド法を用いて Cypher/ZASP 変異による機能変化を検討した。その結果、変異の存在下に種々の PKC への結合親和性が有意に増強する (PKC- $\alpha$  ;  $1.072 \pm 0.108$  vs  $0.747 \pm 0.094$ ,  $p < 0.05$ , PKC- $\epsilon$  ;  $0.872 \pm 0.054$  vs  $0.562 \pm 0.036$ ,  $p < 0.001$ , PKC- $\zeta$  ;  $0.554 \pm 0.026$  vs  $0.325 \pm 0.010$ ,  $p < 0.001$ ) ことが判明した。

4) Cypher/ZASP 変異による PKC 結合性変化を異なる方法で確認するために、マウス Cypher 遺伝子に心筋症変異を導入し、細胞内で HA タグを付加した PKC との結合性をプルダウン法によって検討した。その結果、変異の存在下に Cypher と種々の PKC の結合親和性が有意に増強する (PKC- $\alpha$  ;  $1.96 \pm 0.03$  倍,  $p < 0.01$ , PKC- $\beta$  ;  $1.38 \pm 0.12$  倍,  $p < 0.02$ , PKC- $\gamma$  ;  $1.50 \pm 0.29$  倍,  $p < 0.04$ ) ことが確認された。

## 考察

我々は昨年度までに Z 帯構成要素である Tcap, タイチン, MLP などの変異が肥大型心筋症あるいは拡張型心筋症の病因となることを明らかにしたが、本研究において、新たに Cypher/ZASP 遺伝子異常が拡張型心筋症の病因となることが強く示唆された。特に注目すべきは、見出された Cypher/ZASP 変異によって PKC への結合親和性が亢進することである。以前より心肥大に伴って PKC の量が増加すること、心不全への移行に伴って Z 帯を含む膜分画への PKC 分布が増加することが報告されていたが、我々の見出した変異は Z 帯への PKC 分布をより増強するものと考えられる。このことから、拡張型心筋症の発症には Z 帯タンパクのリン酸化制御が深く関与すると推定される。また、我々の報告とはほぼ同時に、欧米人の拡張型心筋症患者にも我々が同定したものは別の Cypher/ZASP 変異が報告された。それらの変異の機能変化がいかなるものであるかは明らかではないが、変異 Cypher/ZASP を高発現させた細胞ではアクチン細胞骨格の安定性異常が生じることが示されている。このことは、Z 帯タンパクの異常が細胞骨格の分布変化を来す可能性を示し、今後いかなるタンパクが Cypher/ZASP 機能とアクチン安定性を繋ぐものであるかを解明することが必要である。

**結論**

Cypher/ZASP は新たな拡張型心筋症の原因遺伝子である。拡張型心筋症に認められた

Cypher/ZASP 変異では PKC との結合性が增强することから、Z 帯構成要素のリン酸化制御が拡張型心筋症の病因に関わることが強く示唆される。

**研究発表**

**論文発表**

1. Arimura T, Hayashi T, Terada H, Lee SY, Zhou Quian, Takahashi T, Ueda K, Nouchi T, Hohta S, Sibutani M, Hirose M, Chen Ju, Park JE, Yasunami M, Hayashi H, Kimura A: A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, in press
2. 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.
3. Kimura A, Hayashi T, Itoh-Satoh M, Arimura T, Lee WH, Lee SY, Park JE: Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy: Identification of novel disease genes for hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. In *Cardiomyopathies and Heart Failure; Biomolecular, Infectious and Immune Mechanisms* (ed. Matsumori A), pp415-428, Klumer Academic Publishers, Boston, 2003.
4. Kimura A, Itoh-Satoh M, Hayashi T, Takahashi M, Arimura T, Yasunami M, Lee SY, Hwang TH, Lee WH, Park JE: Mutational profiles and molecular pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy in Asian populations. In *Frontiers in Cardiovascular Health* (eds. Dhalla NS, Chockalingam A, Berkovitz HI, Singal PK), pp195-206, Klumer Academic Publishers, Boston, 2003.

**学会発表**

1. 木村彰方, 有村卓郎, 林丈晴, 高橋めぐみ, 安波道郎, 寺田登, 林秀晴: 新規の特発性心筋症原因遺伝子の同定と変異の機能解析. 日本人類遺伝学会第 48 回大会, 長崎, 2003 年 10 月
2. 林丈晴, 有村卓郎, 伊藤真夏, 上田和雄, 高橋めぐみ, 松本雄二, 稲垣夏子, 堀久枝, 安波道郎, 古賀義則, 中村浩士, 松崎益徳, Jeong-Euy Park, 木村彰方: Z 帯構成要素遺伝子異常による機能変化と特発性心筋症. 日本人類遺伝学会第 48 回大会, 長崎, 2003 年 10 月
3. 中野記嗣, 有村卓郎, 林丈晴, 高橋めぐみ, 稲垣夏子, 中原賢一, 沢辺元司, 新井富生, 安波道郎, 木村彰方: 候補遺伝子アプローチによる高血圧性心筋症の原因遺伝子検索. 日本人類遺伝学会第 48 回大会, 長崎, 2003 年 10 月

# 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

公受 伸之, 島田 俊夫

島根大学医学部付属病院循環器疾患治療部内科

松森 昭

京都大学大学院医学研究科循環動態学

## 目的

透析患者において高感度心筋トロポニン T (cTnT) に反映される心筋障害の規定因子として左室肥大, 炎症, C型肝炎ウイルス (HCV) 持続感染が重要であることを報告した. 一方透析患者では血清肝細胞増殖因子 (HGF) 濃度は高く, 透析時に使用するヘパリンは血清 HGF 濃度を一過性に増加させる事も知られている (1). HGF はさまざまな生物学的活性を有しており, 多くの臓器に対し防御的に作用していると考えられている. 従って透析患者における血清 HGF 濃度の意義を明らかにすることはきわめて重要である.

## 方法

単一施設にて慢性血液透析を受けている患者 91 名を対象とし, また 1 年間の経過を追えた 89 名においては血清 cTnT 濃度の変化を規定する因子を検討した. 男性 59 名, 女性 32 名, 平均年齢  $63 \pm 12$  才, 透析期間は平均 10.6 年 (0.7~32.2 年) である. 患者全てに研究の意義を十分に説明し了解を得た. 透析に至った基礎疾患としては慢性糸球体腎炎 47 名, 糖尿病性腎症 21 名, 腎硬化症 7 名, その他 16 名である. また合併症としては脳血管疾患 12 名, 心血管疾患 10 名, 大動脈末梢血管障害 15 名である. HCV 抗体陽性は 27 名, HCV-RNA 陽性は 17 名に認めた. 検討項目は年齢, 透析期間, 喫煙, 糖尿病の有無, HbA1c, 総コレステロール, 血圧 (平均), 脈圧, 高感度 CRP, 血漿 BNP, 透析前後の血清 HGF, 透析中ヘパリン投与量, HCV 抗体, RNA の有無, 心臓超音波検査上での左室拡張末期径 (LVDd), 左室駆出率 (%FS), 左室心筋重量係数 (LVMI) である. 血清 cTnT は Roche 社製 ECLusys2010 を用い化学発光法により測定し  $0.030 \text{ ng/ml}$  以上を陽性とし, 1 年間に  $0.03 \text{ ng/ml}$  以上の増加を心筋障害悪化群,  $0.03 \text{ ng/ml}$  以下の低下を心筋障害改善群, その他を心筋障害不変群とし 3 群間の比較をおこなった.

統計処理は統計ソフト GB-STAT 6.0 を用い対応のない t 検定,  $\chi^2$  検定, 分散分析 (Post-hoc test として Scheffe を用いた), 多変量解析には重回帰分析を用い, 危険率は 0.05 未満を有意とした.

## 結果

1 年前に血清 cTnT が陰性であった 51 名 (57%) のうち不変群は 40 名 (78%), 悪化群は 11 名 (22%) であった. 一方, 1 年前に血清 cTnT が陽性であった 38 名 (43%) のうち改善群は 9 名 (24%), 不変群は 11 名 (29%), 悪化群は 18 名 (47%) であった. 血清 HGF 濃度は透析後有意に増加した. 透析前血清 HGF 濃度は透析期間と正相関を示した.

1 年前の血清 cTnT 陰性者における不変群と悪化群の 2 群比較では, 悪化群では不変群に比し年齢が高く ( $p < 0.01$ ), 糖尿病の合併が多く ( $p < 0.01$ ), HbA1c が高く ( $p < 0.01$ ), 血圧が高く脈圧が大きく ( $p < 0.01$ ), LVMI が大であった ( $p < 0.05$ ), 喫煙の有無, 総コレステロール, 高感度 CRP, 血漿 BNP, ヘパリンの使用量, LVDd, %FS, 透析前後の血清 HGF, HCV の有無はいずれも有意差はなかった. また 1 年の経過で血漿 BNP は有意な変化を認めなかった (表 1). 重回帰分析では, 血清 cTnT 陰性患者における 1 年間の血清 cTnT の変化に対し, 血圧, HbA1c が独立して関与した. (表 2)

次に 1 年前の血清 cTnT 陽性者における悪化群, 不変群, 改善群の 3 群比較では, 悪化群では総コレステロールが高く ( $p < 0.05$ ), 血圧はむしろ低く ( $p = 0.07$ ), hsCRP が高く ( $p < 0.05$ ), 透析後血清 HGF が低値であった ( $p < 0.01$ ). 年齢, 喫煙, 糖尿病の有無, HbA1c, 血漿 BNP, 透析前血清 HGF, ヘパリン使用量, HCV の有無, LVDd, %FS, LVMI には有意差を認めなかった. 悪化群においてのみ BNP は 1 年前に比し 1 年後に有意に増加した ( $544.8 \pm 848.7$  VS.  $770.2 \pm 1007.5$ ,  $p < 0.05$ ). 不変群でも増加傾向 ( $571.0 \pm 473.5$  VS.  $855.5 \pm 1074.0$ ), 改善群においては低下傾向を認めた

(604.8±638.9 VS. 498.4±420.6) (表 3). 重回帰分析では、血清 cTnT 陽性患者における 1 年間の血清 cTnT の変化に対し、透析後血清 HGF、血圧、高感度 CRP が独立して関与した。すなわち、透析後血清 HGF は高値であるほど心筋障害に対し抑制的に関与することが明らかとなった (表 4).

## 考察

慢性血液透析患者において心血管障害はその重要な死因の一つである。近年心筋に特異的な 3 世代高感度心筋トロポニン T は透析患者においてもその特異性に変化がないことが明らかとなってきた (2)。さらに予後規定因子としての重要性も CRP 等のマーカーとともに注目されてきている (3, 4)。前回の報告において我々は透析患者において血清 cTnT の規定因子の検討を行い、HCV-RNA の存在と血清 HGF 濃度が重要であることを明らかにした。即ち透析患者にみられる血清 HGF 濃度の高値の一部はその心筋障害を反映していると考えられる。これは HCV-RNA 陽性患者を除外した検討でも同様であり、肝疾患の影響以外の要因と考えられる。血清 HGF は透析患者の予後との関連も報告されており (5)、これを裏付ける所見と考えられる。

一方、透析患者において血清 cTnT の変化が予後予測にも重要であるとの報告もある (6)。従って、血清 cTnT の変化を規定する因子を明らかにすることが重要である。我々の検討では、心筋障害の認められない対象においては、その障害の発生に糖尿病と高血圧が関与する事が明らかとなった。注目すべき事は心筋障害の存在する対象において、その進展に関与するのは炎症の存在であり、一方それに抑制的に関与するのが透析後の血清 HGF レベルである。血圧が低値であることは心筋障害の進展に関与していたが、透析患者においては低血圧が予後不良の因子であり、両者の関連性が示唆される。

血清 HGF は障害臓器においてはその局所レベルでは産生が低下しているが、他臓器においては産生が亢進しエンドクリン的に作用する事が知られている。一方、血清 HGF はヘパリンの投与により一過性に増加することが松森らの研究で明らかとなっている。また透析そのものも血清 HGF を上昇させることも報告されている (7)。しかしヘパリン後や透析後の血清 HGF レベルの臨床的意義についての報告は少ない。また透析後の血清 HGF のレベルはそれらに加え炎症やレニン・アンジオテンシン系、血管マトリックスや他臓器の状態にも影響されているものと考えられ、その規定因子を明らかにすること

は生体の防御能を明らかにする上で重要と考えられる。今回透析後 HGF レベルが心筋障害に抑制的に関与したことはその意味で臨床的にも重要な知見であると考えられる。

## 結論

慢性血液透析患者の心筋障害の経過観察には血清心筋トロポニン T が有用である。透析前の血清 HGF は、HCV 感染に加えて心筋障害を反映するマーカーと考えられる。また透析後の血清 HGF の高値は心筋障害に対する生体の抑制的な働きを反映していると考えられる。透析後の血清 HGF を高値で維持する治療が透析患者の予後を改善する可能性が示唆され、今後の検討が重要である。

## 参考文献

- 1 Okuda M, Matsumori A, Ono K, Miyamoto K, Takahashi M, Sasayama S. Hepatocyte growth factor is a major mediator in heparin-induced angiogenesis. *Biochem Biophys. Res Commun* 1999;255:80-87
- 2 Ricchiuti V, Voss EM, Ney A, Odland M, Anderson PAG, Apple FS. Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem*. 1998;44:1919-1924
- 3 Dierkes J, Domröse U, Westphal S, Ambrosch A, Bosselmann HP, Neumann KH, Luley C. Cardiac troponin T predicts mortality in patients with end-stage renal disease. *Circulation*. 2000;102:1964-1969
- 4 deFilippi C, Wasserman S, Rosanio S, Tiblier E, Sperger H, Tocchi M, Christenson R, Uretsky B, Smiley M, Gold J, Muniz H, Badalamenti J, Herzog C, Henrich W. Cardiac troponin T and C-reactive protein for predicting prognosis, coronary atherosclerosis, and cardiomyopathy in patients undergoing long-term hemodialysis. *JAMA*. 2003;290:353-359
- 5 Malatino LS, Mallamaci F, Benedetto FA, Bellanuova I, Cataliotti A, Tripepi G, Zoccali C. Hepatocyte growth factor predicts survival and relates to inflammation and intima media thickness in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2000;36:945-952
- 6 Ooi DA, Zimmerman D, Graham J, Wells GA. Cardiac troponin T predicts long-term outcomes in hemodialysis patients. *Clin Chem*. 2001;47:412-417
- 7 Rampino T, Libetta C, Simone WD, Ronghino A,

**Comparison of clinical data (negative cTnT group, n=51)**

Variables	aggravated(n=11)	unchanged(n=40)	p value
Age,year	69 ± 7	58 ± 13	<0.01
HD duration,days	2130 ± 1073	3763 ± 2468	<0.05
Smoke (+),n	9	15	ns
DM (+),n	6	6	<0.01
HbA1c,%	5.0 ± 1.1	4.2 ± 0.7	<0.01
TC,mg/dl	154 ± 24	150 ± 27	ns
mBP,mmHg	126 ± 18	111 ± 16	<0.01
Pulse P.,mmHg	81 ± 25	57 ± 22	<0.01
hsCRP,mg/dl	0.137 ± 0.144	0.100 ± 0.117	ns
BNP,pg/ml	407.3 ± 212.7	295.2 ± 198.2	ns
HGF preHD,ng/ml	0.166 ± 0.053	0.159 ± 0.065	ns
HGF postHD,ng/ml	0.256 ± 0.101	0.375 ± 0.357	ns
Heparin,unit	2455 ± 416	2700 ± 749	ns
HCVRNA (+),n	2	5	ns
HCVAb (+),n	4	9	ns
LVDd,mm	48 ± 6	45 ± 4	ns
%FS,%	35.7 ± 5.8	38.9 ± 7.2	ns
LVMl,g/m2	128.6 ± 21.7	109.8 ± 23.6	<0.05
Aortic PWV,m/sec	9.2 ± 2.3	7.2 ± 1.6	<0.01

**Multiple Regression Analysis for change of cTnT (negative cTnT group: n=51)**

Ind Var	B Coef	Std Err(B)	t-Value	Prob
mBP	0.0007	0.0003	2.6545	0.0116
HbA1c	0.0128	0.0054	2.394	0.0218
Age	0.0005	0.0003	1.57	0.1249
LVMl	0.0002	0.0002	1.4187	0.1644
PWV	-0.0031	0.0022	-1.3974	0.1706
Constant	-0.1506			
Multiple R = 0.6505		p<0.001	Std Err Est = 0.0235	F = 5.4275

Comparison of clinical data (positive cTnT group, n=38)

Variables	aggravated(n=18)	unchanged(n=11)	improved(n=9)	p value(ANOVA)
Age,year	65 ± 13	69 ± 10	63 ± 8	ns
HD duration,days	4301 ± 3137	4653 ± 3315	4197 ± 3314	ns
Smoke (+),n	9	8	3	ns
DM (+),n	4	3	1	ns
HbA1c,%	4.6 ± 1.1	4.6 ± 1.0	4.3 ± 0.7	ns
TC,mg/dl	164 ± 28	142 ± 24	139 ± 22	<0.05
mBP,mmHg	106 ± 23	121 ± 28	126 ± 19	0.07
Pulse P.,mmHg	70 ± 24	70 ± 21	68 ± 20	ns
hsCRP,mg/dl	0.179 ± 0.123	0.238 ± 0.216	0.067 ± 0.093	<0.05
BNP,pg/ml	544.8 ± 848.7	571.0 ± 473.5	604.8 ± 638.9	ns
HGF preHD,ng/ml	0.237 ± 0.179	0.304 ± 0.160	0.300 ± 0.305	ns
HGF postHD,ng/ml	0.373 ± 0.265	0.733 ± 0.489	1.053 ± 0.691	<0.01
Heparin,unit	2647 ± 580	2500 ± 433	3000 ± 901	ns
HCVRNA (+),n	3	3	3	ns
HCVAb (+),n	5	4	4	ns
LVDd,mm	47 ± 6	46 ± 8	50 ± 6	ns
%FS,%	38 ± 9	34 ± 11	37 ± 6	ns
LVMI,g/m2	135 ± 40	131 ± 40	135 ± 34	ns

Multiple Regression Analysis for change of cTnT  
(positive cTnT group: n=38)

Ind Var	Model 1		Model 2	
	B Coef	Prob	B Coef	Prob
HGF postHD	-0.1071	0.0017	-0.1069	0.0054
mBP	-0.0024	0.0021	-0.0024	0.0046
hsCRP	0.2307	0.0345	0.2305	0.0524
LVMI	0.0005	0.2432	0.0005	0.2814
Heparin	-	-	-0	0.9861

Multiple R = 0.6804  
 p=0.0012  
 Std Err Est = 0.0912  
 F = 6.0329  
 Constant 0.2341

Multiple R = 0.6804  
 p=0.0075  
 Std Err Est = 0.0938  
 F = 4.1369  
 Constant 0.2355

# 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

田中 雅嗣

財団法人岐阜県国際バイオ研究所

## 研究要旨

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基配列は多様性が高いため、ミトコンドリア心筋症などの疾患の病因となる変異を同定する場合に、一般集団における多型と病因となる変異とを鑑別することが重要な作業である。これまで MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>) などが変異および多型の検索に利用されてきたが、日本人の mtDNA 多型頻度に関する情報は得られなかった。我々は、日本人におけるミトコンドリアゲノム一塩基多型 (mtSNP) データベースを構築し、tRNA, rRNA, mRNA における多型の頻度データ、多型に伴うアミノ酸置換によって生じる蛋白質の立体構造変化などの情報提供を開始した。

## 研究目的

ミトコンドリアゲノムの進化速度は核ゲノムの進化速度の 5-10 倍であり、塩基配列の個体差が大きい。心筋症における病態の進展にミトコンドリアゲノム多型が影響を及ぼしている可能性がある。我々はミトコンドリアゲノム多型の機能的相違を明らかにするために、日本人におけるミトコンドリアゲノム一塩基多型 (mtSNP) データベースを構築した。

## 研究方法

ミトコンドリアゲノム全長を第 1 PCR により 6 本の断片として増幅し、60 本の互いに重なり合う断片を第 2 PCR により増幅した。Big-Dye terminator 法によってシーケンス反応を行い、全塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

実施に先立ち、本研究所および研究協力機関の倫理委員会の承認を得た。血液細胞あるいは頬粘膜細胞を被験者から同意を得た上で採取した。

## 研究結果

672 例のミトコンドリアゲノム全体では 1294 カ所に多型が見いだされ、その塩基置換率は 7.8% で

あった。塩基置換率は非コード領域で 21.5% (264/1228)であったのに対し、2 種の rRNA 遺伝子では 3.6% (90/2513)、22 種の tRNA 遺伝子では 4.6% (70/1512)であった。13 種の蛋白質遺伝子での塩基置換率は 7.7% (870/11367)であり、その 30.8%がアミノ酸置換を伴っていた。

## 考察

核ゲノムの SNP 頻度は約 0.1%と見積もられているが、ミトコンドリアゲノムの SNP 頻度は 7.8%であった。その約 30%がアミノ酸置換を伴い、哺乳類において高度に保存されているアミノ酸残基の置換も含まれていた。

## 結論

ミトコンドリアゲノムに規定された蛋白質のアミノ酸配列における個体差が大きく、672 例で 1 例のみに検出されたアミノ酸置換も数多く存在した。これらのアミノ酸置換が機能的に有意差のない単純な多型であるか、あるいは機能的に異なった変異であるか判断するには、大規模関連研究あるいはサイブリードを用いたミトコンドリアの機能解析が必要である。

## 研究発表

### 論文発表

1. Tanaka M, Fuku N, Takeyasu T, Guo L-J, and Kurata M. Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Ann NY Acad Sci* 1011: 1-14, 2004
2. Matsui T, Hogetsu K, Akao Y, Tanaka M, Sato T, Kumasaka T, and Tanaka N. Crystallization and X-ray analysis of the N-terminal core domain of a tumour-



- associated human DEAD-box RNA helicase, rck/p54. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 156-159, 2004
3. Yamada Y, Hamajima N, Kato T, Iwata H, Yamamura Y, Shinoda M, Suyama M, Mitsudomi T, Tajima K, Kusakabe S, Yoshida H, Banno Y, Akao Y, Tanaka M, and Nozawa Y. Association of a polymorphism of the phospholipase D2 gene with the prevalence of colorectal cancer. *J Mol Med* 81: 126-131, 2003.
  4. Okura T, Koda M, Ando F, Niino N, Tanaka M, and Shimokata H. Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum Genet* 113: 432-436, 2003.
  5. Izawa H, Yamada Y, Okada T, Tanaka M, Hirayama H, and Yokota M. Prediction of genetic risk for hypertension. *Hypertension* 41: 1035-1040, 2003.
  6. Iwao N, Iwao S, Kobayashi F, Kazuo T, Tanaka M, Atsuta Y, Tamakoshi A, and Hamajima N. No association of the mitochondrial genotype (Mt5178A/C) with six cancers in Japanese population. *Asian Pacific J Cancer Prev* 4: 331-336, 2003.
  7. 田中雅嗣, ミトコンドリア DNA 多型と生活習慣病. *Molecular Medicine*, 2004. 41: 22-35.
  8. 福典之, 田中雅嗣, 肥満に関連するミトコンドリアゲノム一塩基多型の発見. *医学のあゆみ* 205: 420-421, 2003.
  9. 福典之, 田中雅嗣, 肥満に関連するミトコンドリアゲノム多型. *肥満研究* 9: 88-89, 2003.
  10. 田中雅嗣, 武安岳史, 福典之, 日本人のミトコンドリア遺伝子多型とその表現型ミトコンドリアゲノム多型データベース. *実験医学* 21: 1717-1723, 2003.

#### 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

##### 特許取得

1. 2003-095198・H15.3.31・ヒトミトコンドリア遺伝子変異に基づく遺伝子検出法（肥満者 vs 非肥満者）
2. 2003-095199・H15.3.31・ヒトミトコンドリア遺伝子変異に基づく遺伝子検出法（糖尿病 vs 肥満者）
3. 2003-095200・H15.3.31・ヒトミトコンドリア遺伝子変異に基づく遺伝子検出法（百寿者 vs パーキンソン病患者）
4. 2003-106725・H15.4.10・ミトコンドリア DNA 塩基配列を利用した個人識別法
5. 2003-118029・H15.4.23・ヒトミトコンドリア遺伝子変異に基づく遺伝子検出法（百寿者 vs 糖尿病患者）
6. 2003-165746・H15.6.10・ヒトミトコンドリア遺伝子変異に基づく遺伝子検出法（百寿者 vs アルツハイマー病患者）

# たこつぼ心筋症に関する研究

河合 祥雄

順天堂大学医学部循環器内科

## 研究要旨

本邦の本症報告者のアンケート調査に基づいて作成した「たこつぼ心筋症（心筋障害）診断の手引き（案）」を、本症に造詣の深い研究者の意見を取り入れ、たこつぼ心筋障害（たこつぼ心筋症）診断の手引き（2案）を作成した。

## 研究目的

本症に精通した研究者の意見を取り入れた、たこつぼ心筋障害（たこつぼ心筋症）診断の手引きを作成する。

## 研究方法

本疾患についての論文（原著論文（英文、邦文）、総説、症例報告を含む）著者、および本疾患について経験が多いと考えられた研究者 33 名に、診断の手引き（案）の検討〔内容：和文の名称、英文名称（邦文名称と対応を含めて）、逆たこつぼ現象、心室収縮異常の部位（心尖部バルーン状拡張のみでよいか、心室基部の動きは、過収縮のみをタコツボとするか、正常収縮も含めるか、基部も含めた一過性の収縮低下も含めるのか、など）、冠状動脈造影の位置づけ〕を依頼し、その意見を参考に手引き案を修正した。

（倫理面への配慮）

診断の手引きであり、特別の配慮はない。

## 研究結果

依頼に対し、21 名よりご意見を受け、それを基礎に診断の手引き（2案）を作成した。病名は、急

性発症で、一過性の病態であるので、たこつぼ心筋障害（たこつぼ心筋症）が選択され、英文名は、takotsubo (ampulla) cardiomyopathy とした。心室収縮部位については、「心尖部バルーン状の拡張」とし、診断の参考事項は、「心室造影または心エコー図における心尖部バルーン状拡張とその速やかな改善」とした。除外項目 a) の項に「冠状動脈造影は、急性期の造影が望ましいが、慢性期に行い、有意狭窄病変がないか、心室収縮異常形態に関与する病変がないことを確認する必要がある」を挿入した。

## 考察

本病態は一過性であり、多くが可逆的であるので、心筋障害と考えることが合理的である。英文原著を含め多数の論文があり、米国からも多数症例の報告があるので、1 疾患単位あるいは 1 病態として認められると考えられよう。

## 結論

今回初めて、本邦のたこつぼ心筋症（心筋障害）研究者の共同研究として、診断の手引き（第 2 案）を作成した。

## 研究発表

### 論文発表

1. 河合祥雄, 山田京志: たこつぼ心筋症 (たこつぼ様一過性心機能障害) の再現性について. 心臓 36: 30-33, 2004.
2. 河合祥雄, 山田京志, 鈴木宏昌: "たこつぼ心筋障害" の病理. Heart View 8: 159-166, 2004.

# 心筋組織修復におけるテネイン C の機能と作用ドメインの解析

廣江 道昭

国立国際医療センター腎臓循環器科

今中-吉田 恭子

三重大学医学部病理

吉田 利通

三重大学医学部病理

矢崎 義雄

国立国際医療センター

## 研究要旨

細胞外マトリックスのうち、線維や基底膜といった構造物を形成せず、多彩な生物活性により細胞と細胞外の物質との相互作用を仲介する役割が特に大きいものを Matricellular Proteins と総称し、テネイン C は組織障害にともなって発現し、炎症・組織修復過程で重要な役割を演ずると考えられる。心筋障害後の組織修復に関わる細胞は、主に、間質細胞から分化し平滑筋アクチン (SMA) を発現するなど特殊化した筋線維芽細胞である。本研究ではこの筋線維芽細胞の動態制御における TNC の役割とその責任機能ドメインを同定することを目的とした。マウスで心筋障害モデルを作製し修復過程を検討すると、筋線維芽細胞は TNC 陽性部位に出現し、TNC の沈着は筋線維芽細胞の出現に先行した。また、TNC ノックアウトマウスでは野生型に比べ筋線維芽細胞の出現が遅れた。培養系でノックアウトマウス心臓由来の線維芽細胞に精製 TNC を作用させると SMA 発現は有意に上昇し、その作用は抗 TNC 抗体によって抑制された。また、BrdU の取り込みに変化はなかったが、遊走を促進した。次にこれらの機能ドメインを明らかにするため、フィブロネクチン (FN) III 反復の選択的スプライシング部位を含む全長型、同部位の欠損型、選択的スプライシング部位のみ、フィブリノゲン (Fbg) 様ドメイン、上皮増殖因子様ドメインの 5 種類のリコンビナント蛋白を作成し、線維芽細胞に対する作用を検討すると、分化促進能は FNIII スプライシング部位及び Fbg 様ドメインに、遊走促進作用は FNIII 定常部位および Fbg 様ドメインに存在することが示された。これらの機能だけを特異的に増強できれば、生体に不都合な心筋リモデリングを予防できる可能性がある。

## 研究目的

テネイン C (TNC) は細胞外マトリックス蛋白の一つで、胎児期の形態形成、癌浸潤、創傷治癒、組織再生など組織構造の改築にともなって限られた場所に一過性に発現する。心臓では、発生初期に心筋細胞分化、冠動脈発生などの際に一過性に発現し、正常成体ではほとんど発現しないが、心筋梗塞、心筋炎や拡張型心筋症の一部など種々の病的状態で組織障害にともなって発現し、組織修復過程の初期に

重要な役割を演ずると考えられている。我々は、TNC が心筋細胞に作用し、周囲に結合織の接着を緩めることを見いだした。この脱接着作用は、残存心筋の再配列を容易にし、組織構築改変を助けるはずである。しかしながら、再性能の乏しい実質細胞からなる心筋組織修復の大部分は、間質細胞による間質線維化反応であり、なかでも筋線維芽細胞が、中心的な役割をはたす。筋線維芽細胞とは、間質の未分化ないわゆる線維芽細胞が形質転換をおこして、 $\alpha$ 平滑筋アクチン ( $\alpha$ SMA) を発現するなど平滑

筋細胞に近い性質を獲得し、収縮力を発生して創部の縮小をきたすとともに、膠原線維を産生するなど多彩な機能をもつ。以前から、主に癌間質で筋線維芽細胞とTNCとの関係が注目されてきたが、我々が最近報告したように、心筋梗塞の組織修復でTNCが筋線維芽細胞の出現に先行して発現することから、さらに、筋線維芽細胞の組織障害部位への出現がTNCノックアウトマウスでは野生型に比べて明らかに遅れることより、TNCが筋線維芽細胞の動態を制御していることが強く示唆される。本研究では、筋線維芽細胞の動態制御、すなわち線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化、増殖、遊走に対するTNCの作用とその責任機能ドメインを同定することを目的とした。

## 研究方法

TNCノックアウトマウスから心臓線維芽細胞を培養し、精製TNCタンパク、および各フラグメントのリコンビナント蛋白を直接作用させ、トランスウェルアッセイ及び免疫染色法を用いて検討した。

**細胞培養：**8週令のTNCノックアウトマウスの心室からコラゲナーゼを用いて線維芽細胞を単離培養した。コンフルエントに達したところで継代培養し、実験には2代目の継代培養細胞を使用した。

**TNC及びリコンビナント蛋白の作成：**TNCは、ヒト神経膠腫細胞株U-251 MG細胞の培養液上清からより精製した。またマウスTNCのEGF様配部位、FNIII全長型、FNIII定常部位、FNIII選択的スプライシング部位、Fbg様部位の5種類の細胞リコンビナントタンパクを作製した(図1)。

**細胞増殖：**6wellプレートに心臓線維芽細胞をまき、無血清培地に替えて24時間培養した後、培養液に(0, 5, 10 $\mu$ g/ml)またはリコンビナント蛋白(10 $\mu$ g/ml)を加えて12時間培養した後、8-bromodeoxyuridine (BrdU 10 $\mu$ g/ml)を添加しさらに2時間取り込ませて固定し、抗BrdU抗体による免疫染色で、BrdU取り込み陽性率を評価した。

**細胞遊走：**カルチャープレートに、8 $\mu$ mの有孔膜を貼ったセルカルチャーインサートを置き、下層には走化性因子としてIMDM(5%FCS)を入れた。上層には、マウス心臓線維芽細胞とTNC(0, 5, 10 $\mu$ g/ml)またはリコンビナント蛋白(10 $\mu$ g/ml)を37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>下で16時間作用させた後、膜側に遊走した細胞をクリスタルバイオレットで染色し細胞数を計測した。

**筋線維芽細胞への分化：**6wellプレートに心臓線維芽細胞をまき、無血清培地で24時間培養したのちTNC(0, 5, 10, 20 $\mu$ g/ml)またはTNCリコンビナント蛋白(10 $\mu$ g/ml)を24時間作用させ、蛍光抗体法で全細胞に対する $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ SMA)陽性細胞の割合を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、三重大学動物実験委員会で承認されたプロコールに従って行った。

## 研究結果

**心臓線維芽細胞の増殖に対する作用：**BrdUによる細胞増殖活性測定では、TNCをそれぞれ5, 10, 20 $\mu$ g/mlを作用させた線維芽細胞群とTNC 0 $\mu$ g/mlの対照群とを比較したところ、TNC濃度0 $\mu$ g/mlの対照群では10.5 $\pm$ 1.0%であるのに対し、5 $\mu$ g/ml作用させた群では10 $\pm$ 0.8%, 9.5 $\mu$ g/mlの群では9.5 $\pm$ 1.1%, 20 $\mu$ g/mlの群では9.5 $\pm$ 1.9%となり、BrdU取り込み細胞の率はほぼ等しく有意な差は見られなかった。

**心臓線維芽細胞の遊走促進作用：**トランスウェルアッセイを用いてTNCの線維芽細胞の遊走への影響を検討すると、TNC 0 $\mu$ g/mlの対照群では27個/1mm<sup>2</sup>、TNCを5, 10 $\mu$ g/ml作用させた細胞群でそれぞれ50.0 $\pm$ 15.0個/1mm<sup>2</sup>、50.0 $\pm$ 6.3個/1mm<sup>2</sup>の細胞が膜の5%FCS側に遊走した。TNCを5, 10 $\mu$ g/ml作用させた細胞群では対照群のおよそ2倍の線維芽細胞が遊走しており、対照群に比べ有意に(p<0.01)TNCは細胞遊走を促進した。

**筋線維芽細胞への分化促進作用：**抗 $\alpha$ SMA抗体とローダミン・ファロイジンとの二重染色を用いて $\alpha$ SMA陽性細胞の率を算出した。対照群では35.0 $\pm$ 2.0%であるのに対し、TNCを5, 10, 20 $\mu$ g/mlで作用させた細胞群では、 $\alpha$ SMA陽性率はそれぞれ42.0 $\pm$ 1.4%, 50.0 $\pm$ 1.4%, 55.0 $\pm$ 3.3%とそれぞれの間で有意な差(p<0.05)が見られ、TNCは濃度依存性に $\alpha$ SMAの発現を促進した。

**心臓線維芽細胞の遊走を促進する機能ドメイン：**選択的スプライシング部位を含むフィブロネクチンIII反復部位のリコンビナントタンパク(FL)及び選択的スプライシング部位を含まないフィブロネクチンIII反復部位(SO)、フィブリノーゲン様部位(Fbg)は線維芽細胞の遊走を有意に促進し、これらは精製TNCを添加した場合と同程度であった。一方上皮増殖因子様部位(EGF)では遊走の促進活性は見られず、SV及びFbgに細胞遊走の促進

活性があることが示唆された。

心臓線維芽細胞の  $\alpha$ SMA 発現を促進する機能ドメイン：FL 及び選択的スプライシング部位 (SV)、Fbg は線維芽細胞の  $\alpha$ SMA 発現率を精製 TNC を添加した場合と同程度に促進したが、EGF では、 $\alpha$ SMA 発現の促進活性は見られなかった。したがって、SO 及び Fbg に  $\alpha$ SMA 発現の促進活性があることが示唆された(図2)。

考察

TNC は、一般に細胞増殖の促進、細胞接着・抗接着作用などの機能をもつことが考えられているが、細胞の種類及び分化状態、共存する他の細胞外マトリックスなどにより、細胞に対する TNC の作用は異なる。本研究で、TNC は心臓線維芽細胞の増殖には影響しないが、遊走を促進し、線維芽細胞に作用して SMA 発現を亢進する、すなわち、筋線維芽細胞への分化を促進することが明らかになった。したがって、心筋梗塞後、急性期、梗塞部と健常部の境界に存在する線維芽細胞が産生した TNC は、オートクリンあるいはパラクリンの自らあるいは周囲の線維芽細胞に作用して筋線維芽細胞への分化を促し、さらに組織損傷部位への遊走を促進することにより、筋線維芽細胞の動員の初期段階を制御していると考えられた。

さらに、本研究で、線維芽細胞の遊走促進作用は選択的スプライシング部位を含まない FNIII 定常部位及び Fbg 様部位に、SMA 発現促進活性は、FNIII 選択的スプライシング部位及び Fbg 様部位

と異なる部位にあることが明らかになった。一方、我々は乳癌細胞の遊走促進機能部位は、線維芽細胞とは異なり TNC 選択的スプライシング部位にあることが明らかにしており、心筋組織修復時の間質細胞遊走促進作用と癌細胞に対する細胞遊走促進作用とは、異なるレセプターを介した経路を介して伝達されることが明らかになった。

TNC は組織損傷に対する 生体反応により最初に発現する分子の一つであり、相反する多くの機能を持ち、微妙なバランスを保ちながら、その後の一連の細胞動態を制御しているのは当然であり、心筋組織修復過程も例外ではない。本研究で明らかにしたような、筋線維芽細胞動員機能の他、少なくとも、間質細胞に作用しマトリックスメタロプロテイナーゼの発現を誘導し、心筋細胞と結合織の接着をゆるめる。単純に考えれば、これらの心筋細胞のスリッページの原因となり心室拡張をきたす。一方、筋線維芽細胞は強い収縮力を発生するとともにコラーゲンを産生して瘢痕収縮を促し、心室拡張抑制的に働くはずであり、TNC の筋線維芽細胞への分化、間質細胞遊走機能だけを特異的に増強できれば、生体に不都合な心筋リモデリングを予防できる可能性がある。

結論

TNC は、複数の機能ドメイン、複数のレセプターを介して、組織修復を行う間質細胞の障害部位への遊走および筋線維芽細胞への分化を促進する

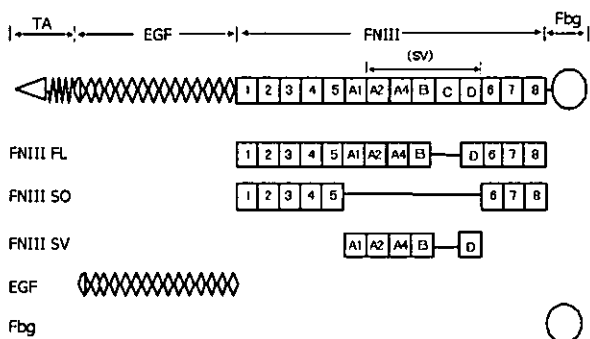


図 1

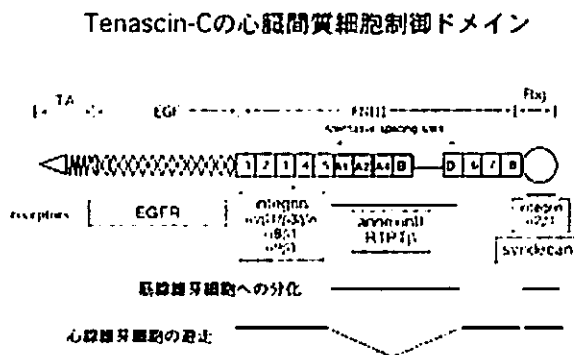


図 2

## 研究発表

### 論文発表

1. Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda MA. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res.* 92: e12-e19, 2003
2. Tanuma J, Ishizaki A, Gatanaga H, Kikuchi Y, Kimura S, Hiroe M, Oka S. Dilated cardiomyopathy in an adult human immunodeficiency virus type 1-positive patient treated with a zidovudine-containing antiretroviral regimen. *Clin Infect Diseases* 37: e109-e111, 2003
3. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: Multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol* ( in press)
4. Imanaka-Yoshida K, Matsumoto K, Hara M, Sakakura T, Yoshida T. The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development. *Differentiation*; 71: 291-8,2003
5. Tsunoda T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol*; 162: 1857-67,2003
6. Kalembeiyi I, Inada H, Nishiura R, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer*; 105: 53-60, 2003
7. 廣江道昭, 矢崎義雄. 心血管疾患と炎症—最近の知見を中心に—. *循環器科* 53 : 267-369, 2003
8. 今中—吉田恭子, 廣江道昭. 炎症進展と終焉における細胞外マトリックスの役割—. *循環器科* 53 : 294-300, 2003

# 移植骨髄細胞は心筋再生に寄与する

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

心筋症をはじめとした重症心不全患者の治療に再生医療が注目され、昨年 G-CSF を用いた内因性幹細胞に関して報告した。まず今回は Doxorubicin 拡張型心筋症モデルを用いて G-CSF 投与の有効性を検討した結果、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。生存率は G-CSF 投与により改善の傾向にあった。次に骨髄細胞が心筋再生に寄与することは証明されたが、実際にどの程度であるかは不明である。われわれは前回と同様の GFP キメラマウスを作成し、再生心筋細胞に対する骨髄由来細胞の寄与率を検討した。免疫染色を施行し、TnI/Nestin/Ki67 を評価した。その結果、キメラ率は 54%であった。各陽性細胞全体に占める骨髄由来と非骨髄由来の割合は、いずれにおいても骨髄由来の陽性細胞は低値であった。したがって、骨髄は再生心筋細胞の起源の 1 つであるが、再生心筋細胞への寄与は小であった。

## 研究目的

骨髄細胞の再生心筋細胞への貢献は報告してきたが、実際にどの程度寄与しているかは不明である。

1) G-CSF の有効性については報告したが、拡張型心筋症モデルでの有効性を検討した。2) また、われわれは GFP キメラマウスを用いて再生心筋細胞に対する骨髄由来細胞の寄与率を検討した。

## 研究方法

1) まず最初の実験では 27 匹の C57BL/6 雄マウスに 900cGy の放射線照射と GFP マウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)( $1 \times 10^6$  cells)移植を施行し、キメラマウスを作成した。4 週間後に脾摘を行い、さらに 2 週間後に Doxorubicin(2.5 mg/kg 腹腔内投与)を 6 回/2 週間投与し、心筋症モデルを作成した。I 群(n=11)には、G-CSF (50  $\mu$ g/kg/day 皮下投与  $\times$  8 回)を、Doxorubicin 投与終了直後より開始した。II 群(n=8)には 3 週間後から G-CSF を同量投与した。III 群 (n=8) には生食を投与した。Doxorubicin 最終投与から 8 週間後に心臓を摘出し、troponin I / MHC-slow / ANP / connexin 43 の免疫染色を施行した。

2) 次に 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(200  $\mu$ g/kg/day)(I 群)と非投与群間(II 群)の 2 群に分けた。結紮 8 週間後に 2 群間

で心臓を組織学的に検討した。凍結切片作成後、DAPI で染色した。また抗 Troponin I (TnI)抗体、抗 Nestin 抗体、および抗 Ki67 抗体を用いて免疫染色した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は NIH および国立循環器病センターの倫理委員会の基準に基づいて施行した。

## 研究結果

1) I 群の心臓で認められた GFP-BMC 数は  $15.4 \pm 7.4$  / HPF であり、II 群( $11.3 \pm 5.6$  / HPF)、III 群( $7.2 \pm 2.8$  / 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  $11.9 \pm 7.3\%$ 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。

2) キメラマウス骨髄キメラ率は 54.6%であった。梗塞境界部位における全細胞数は  $1000.3 \pm 288.0$  /  $\text{mm}^2$  で、GFP-BMC 数は  $103.3 \pm 72.0$  /  $\text{mm}^2$  であった。キメラ率で補正した後、骨髄由来 TnI 陽性細胞数は  $23.9 \pm 22.3$  /  $\text{mm}^2$ 、nestin 陽性細胞数は  $12.9 \pm 12.6$  /  $\text{mm}^2$ 、および Ki67 陽性細胞数は  $18.3 \pm 12.6$  /  $\text{mm}^2$  であった。各陽性細胞全体に占める骨髄由来と非骨髄由来の割合は、TnI ( $6.7 \pm 7.3$  % vs.  $93.3 \pm 7.3$  %), nestin ( $2.4 \pm 1.3$  % vs.  $97.6 \pm 1.3$  %), Ki67 ( $3.9 \pm 3.2$  % vs.  $96.1 \pm 3.2$  %)であり、骨髄の寄与率が有意に少なかった ( $P < 0.001$ )。

## 考察

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。生存率は G-CSF 投与により改善の傾向にあった。

心筋梗塞境界領域において、骨髄は再生心筋細胞の起源の 1 つであるが、再生心筋細胞への寄与率は

約 6 %であった。

## 結論

心筋梗塞境界領域において、骨髄は梗塞・虚血部位へ遊走し心筋細胞へ分化することが判明した。しかし、骨髄細胞は再生心筋細胞の起源の 1 つであるが、再生心筋細胞への寄与率は小であった。

## 研究発表

### 論文発表

1. Bone marrow mononuclear cell transplantation improved cardiac function of rat doxorubicin-induced cardiomyopathy model. (J Heart Lung Transplant, In press)
2. Endogenous bone marrow-derived stem cells reconstituted myocardium Only in the small proportion after acute myocardial infarction (J Heart Lung Transplant, In press)

### 学会発表

1. 2003 American Heart Association Scientific Sessions (オーランド)  
ISHLT 23<sup>rd</sup> Annual meeting and scientific sessions, 2003



# 拡張型心筋症患者における $Ca^{2+}$ 制御蛋白の遺伝子発現と心不全重症度との関係

宮武 邦夫

国立循環器病センター

## 研究要旨

不全心においては筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下が報告されているため、心機能や心不全重症度と筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現量の低下度との関係を検討した。拡張型心筋症による軽中等症の慢性心不全患者(心臓カテーテル検査時)13例と重症心不全患者(補助人工心臓装着時)4例で、心筋細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法により測定した。筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現量は軽中等症患者と重症患者において同程度の低下を認めた。また、低下の程度と心機能とは相関しなかった。すなわち、筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現と心機能や心不全重症度とは直接的な因果関係がなく、心機能の低下や重症度は必ずしも、筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下によるものではない事が示唆された。

## 研究目的

近年、不全心筋では心筋細胞内  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスの異常が指摘されている。このホメオスタシスには心筋細胞膜の  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchanger (NCX) や筋小胞体の筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA), phospholamban (PLB), リアノジン受容体(RyR) など  $Ca^{2+}$  調節蛋白が重要な働きをしている。動物実験やヒト重症心不全例(移植摘出心筋)ではこれらの蛋白の遺伝子発現の変化が報告されているが、軽～中等症の慢性心不全患者における報告は少ない。

## 研究方法

$\beta$  遮断薬導入前の拡張型心筋症による軽～中等症の慢性心不全患者 13 例(軽中等症群)と内科的治療抵抗性の重症心不全患者 4 例(重症群)を対象とした。軽症群では心臓カテーテル検査時に得られた右室心筋生検標本を用い、重症群では LVAS 装着時の左室標本を用い、収縮蛋白( $\alpha$ -myosine heavy chain ( $\alpha$  MHC),  $\beta$  MHC),  $\beta$  受容体関連蛋白( $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$  AR),  $\beta$  AR kinase 1 ( $\beta$  AR K1),  $Ca^{2+}$  調節蛋白 (NCX, SERCA, PLB, RyR) の遺伝子発現を調べた。遺伝子発現は RT-PCR 法を用い、各々の遺伝子発現量を GAPDH 発現量で正規化し、正常心筋サンプルに対する相対値で表した。例えば一つの DCM 患者サンプルの SERCA の発現量が正常心筋サンプルの発現量と同じ場合は 1 と表現した。

(倫理面への配慮)

本試験は「ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則」

の精神に基づき、患者の人権および福祉を守り、試験の科学的な室と信頼性および安全性を確保するために GCP の理念に準拠して行った。施行にあたり当センターでの倫理委員会での承諾を得て、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

$\beta$  遮断薬導入前では正常対照群に比し、軽中等症群も重症群と同様に  $\alpha$  MHC ( $0.15 \pm 0.12$  vs  $0.10 \pm 0.14$ ) は低下し、 $\beta$  MHC ( $1.81 \pm 0.94$  vs  $1.84 \pm 0.57$ ) は増加していた。 $\beta$  ARK1 ( $1.66 \pm 1.01$  vs  $1.38 \pm 0.52$ ) は増加し、SERCA ( $0.67 \pm 0.28$  vs  $0.81 \pm 0.39$ ), RyR ( $0.58 \pm 0.19$  vs  $0.67 \pm 0.09$ ), PLB ( $0.41 \pm 0.25$  vs  $0.31 \pm 0.07$ ) は減少していた。これらの変化度は左室機能と相関しなかった。NCX は軽中等症群では変化していなかったが ( $0.99 \pm 0.42$ ), 重症心不全患者では増加していた ( $1.89 \pm 0.38$ )。

## 考察

移植摘出心(拡張型心筋症症例)では  $\beta$  遮断薬非使用例では筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下が認められ、超低心機能でも  $\beta$  遮断薬が投与されていると、筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下は少ないことが報告されている。本研究でも  $\beta$  遮断薬非投与下では軽中等症でも重症例でも同様の筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下を認めた。すなわち、心機能の低下や重症度は必ずしも、筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現の低下によらないと考えられた。

## 結論

$\beta$ 遮断薬非使用例での筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現低下の程度は心機能や心不全重症度と関係しな

かった。すなわち、筋小胞体関連蛋白の遺伝子発現と心機能や心不全重症度とは直接的な因果関係がないことが示唆された。

研究発表

学会発表

2003年、日本心不全学会にて発表した。

# 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の心筋保護作用についてマウス大動脈結紮モデルを用いて確認すると同時に、臨床においてアデノシン投与による心不全病態の変化を調べた。

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つ

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 個程度見つかってお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。

④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。

今回、マウス大動脈結紮モデルにおいて、アデノシンは著明な心筋保護作用を有することが明かとなった。また、臨床においても心不全症例にペルサンチンを投与することにより運動耐用量の増加と自覚症状(NYHA Class)の改善を認めた。

## 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の心不全に対する新しい診断・治療に有用であると考えられた。

## 研究発表

### 論文発表

1. Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma 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 Oct 17;93(8):759-66. Epub 2003 Sep 11.