

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

磯部 光章

東京医科歯科大学循環制御内科学

研究要旨

急性心筋炎において T リンパ球が心筋細胞障害の中心的な役割を果たしていることが知られているがその詳細の機序は不明であり、有効な治療法は確立していない。本研究では T 細胞活性化に重要な役割を果たしている CD28 ファミリーの 1 つである ICOS 分子の急性心筋炎における役割を検討した。

ラット実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を用いて、抗 ICOS 抗体や ICOSIg による ICOS/ICOSL 経路阻害の自己免疫応答に対する効果を明らかにした。antigen priming(AP)段階での ICOS/ICOSL 経路阻害は心筋炎進展抑制の効果は認められなかったが、immune response(Ir)段階での ICOS/ICOSL 経路阻害は心筋炎の進展を抑制した。また、ICOS/ICOSL 経路阻害は、IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-1 β や TNF- α などサイトカインを抑制し、抗原特異的 T 細胞の増殖を抑制した。以上より、immune response(Ir)段階での ICOS/ICOSL 経路阻害はサイトカインを抑制し、抗原特異的 T 細胞を不活性化することにより心筋炎の進展を抑制し、急性心筋炎の治療に有効と考えられた。

研究目的

急性心筋炎は致死的な疾患であり、拡張型心筋症の原因の 1 つである。しかし、その病因は明らかでなく、効果的な治療法もまだ存在していない。ウイルス感染後の心筋ミオシンへの反応が心筋炎の進展に関与しているように心筋炎において自己免疫は重要な役割を果たしていることが知られている。ラット実験的自己免疫性心筋炎(EAM)は、激しい心筋障害や多核巨細胞の存在に特徴づけられ、ヒト巨細胞型心筋炎の動物モデルとして使われている。EAM は T 細胞の活性化によって引き起こされ、このモデルには 2 つの段階があることが報告されている。最初の段階では主にマクロファージからなる局所の炎症が認められ、第 14 日目まで続き、次の段階ではマクロファージや CD4 陽性 T 細胞からなる心全体の強い炎症が認められ、第 21 日目まで続くとされている。我々は EAM の第 0 日目から第 14 日目を antigen priming(AP)段階、第 14 日目から第 21 日目を immune response(Ir)段階と定義した。

T 細胞の活性化には抗原提示細胞 (APC) からの 2 つの独立したシグナルが必要であり、1 つは抗原特異的であり T 細胞受容体によって伝えられ、もう一方は CD28 などの副刺激分子を介して生じる。副刺激の 1 つである CD28 と B7 の経路を阻害する CTLA4-Ig の投与は EAM の進展を抑制することが

以前報告されているが、CD28 ファミリーの 3 番目として同定され、活性化 T 細胞の表面に発現する。Inducible costimulator(ICOS) /ICOSL 経路の阻害の心筋炎での報告はなされていない。今回、我々は抗 ICOS 抗体と ICOSIg を用いて ICOS 阻害またそのリガンドである B7-H 阻害それぞれの効果を調べ、EAM における ICOS/ICOSL 経路阻害の効果を検討した。

研究方法

1. 動物モデル

ブタ心筋ミオシンを Mycobacterium tuberculosis H37RA を加えた等量の完全フロイドアジュバンドと混ぜ、第 0 日にルイスラットの両足底に 0.1ml ずつ皮下注射し作成した。

2. ICOSIg の精製

ICOSIg 蛋白を精製するために、ヒト ICOScDNA の細胞外ドメインとヒト IgGFc 領域を含んだアデノウイルスベクターを用いた。COS 細胞にウイルスを加え、プロテイン A カラムを用いて蛋白を精製した。

3. 治療

第 1 実験では、第 0、4、7、11、14 と 18 日目に抗 ICOS 抗体 (3mg/kg) を経静脈的に投与した (group Ab)。group Ir は抗 ICOS 抗体 (3mg/kg) を、group Ig は ICOSIg (1mk/kg) を経静脈的に第 14 日目と第 18 日目に投与された。コントロール

として group C1, group C2 はコントロール抗体を, group C3 はコントロール IgG を投与された。ラットは ICOS 経路阻害の効果を検討するために第 21 日目に屠殺した。

第 2 実験では, 抗 ICOS 抗体(3mg/kg)を経静脈的に第 0, 4, 7 と 11 日目に投与され, 第 14 日目に屠殺された (group Ap)。Group C4 は, コントロール抗体を経静脈的に第 0, 4, 7 と 11 日目に投与した。(図 1)

4. FACS 分析

心筋浸潤細胞と脾細胞を第 21 日目心筋炎ラットより採取し, CD4 陽性, CD8 陽性細胞における ICOS の発現を FACS を用いて検討した。

5. 病理組織所見

第 21 日目のラット心臓を取り出し, ヘマトキシリン-エオジン染色して光学顕微鏡にて観察し, 炎症細胞浸潤, 心筋細胞変性などの病変の占める面積(病変面積)を検討した。

心エコー

第 21 日目に麻酔下にてラット経胸壁心エコーをし, 心機能の検討を行った。

6. サイトカイン発現の検討

取り出された心臓より mRNA を抽出し, ribonuclease protection assay (RPA)を用いてサイトカイン発現を検討した。

7. T 細胞増殖反応の解析

心筋炎ラットから採取した脾細胞に抗 ICOS 抗体, ICOSIg をそれぞれの濃度で加え, ブタ心筋ミオシンと培養した。また, コントロール群と治療群のそれぞれから採取した脾細胞とブタ心筋ミオシンを培養し, その増殖反応を検討した。その上清を用いて ELISA 法にて IFN- γ や IL-2 の濃度の検討を行った。

8. 統計処理

Student's *t*-test や ANOVA を用い, データを統計的に分析した。

(倫理面への配慮)

すべての実験手技は東京医科歯科大学の「動物実験の基本指針」に基づいて行った。

研究結果

1. ICOS の発現

ICOS は心筋浸潤細胞にその発現が認められ, 特に CD4 陽性細胞に強く認められた。しかし, 脾細胞においてその発現は認められなかった。

2. ICOS/ICOSL 経路阻害の臨床的効果

第 1 実験では, Group Ab, Ir そして Ig のどの群もコントロール群と比較して約 30%の心重量・体重比の減少, 約 40%の病変面積の減少, 約 40%の心機能(左室短縮率)の改善を認めた。しかし, 第 2 実験では, Group Ap とコントロール群において心重量・体重比, 病変面積, 心機能に有意な差は認めなかった。(図 2, 3)

3. サイトカイン発現の抑制

第 1 実験では, Group Ab, Ir そして Ig のどの群もコントロール群と比較して IL-4, IL-6, IL-10, IL-1 β そして TNF- α の発現は各々約 60%と抑制された。しかし, 第 2 実験では, Group Ap とコントロール群においてサイトカイン発現に有意な差は認めなかった。(図 4)

4. T 細胞増殖反応の抑制と Th1 タイプサイトカインの抑制

抗原特異的 T 細胞増殖は抗 ICOS 抗体, ICOSIg によって抑制され, 治療群の抗原特異的 T 細胞増殖もコントロール群と比較して減少していた。また, その上清を用いた ELISA 法にて IFN- γ 産生は有意に抑制されていたが, IL-2 産生の有意な抑制は認めなかった。(図 5, 6)

考察

我々は, 最初に FACS にて EAM ラットの心筋浸潤 T 細胞における ICOS の発現を確認した。しかし, 脾細胞での ICOS の発現は確認できなかった。この所見は, ICOS は炎症部位の活性化 T 細胞に強く発現するという以前の報告に一致している。我々は ICOS/ICOSL 経路阻害によって EAM の進展は抑制されるという仮説を立て, ICOS の役割を検討した。

ICOS/ICOSL 経路阻害は第 21 日目での EAM の進展を抑制した。心重量・体重比や病変面積は, 第 0 日目からと第 14 日目からの ICOS/ICOSL 経路阻害両群において同様の効果であった。心機能も両群で同程度の改善であった。一方で, 第 0 日目から CTLA4-Ig で治療した EAM は第 14 日目からの治療群と比較して EAM の進展はより抑制されたとの報告がある。我々は, さらにラットを第 14 日目に屠殺し, antigen priming 段階での ICOS/ISOCL 経路阻害の効果を検討したが, 臨床的効果は認められなかった。このように antigen priming 段階での ICOS/ISOCL 経路阻害は有効ではなかったが, immune response 段階での ICOS/ISOCL 経路阻害は EAM に対し効果的であった。このことは

ICOS が炎症部位で T 細胞活性化の後、誘導されるためと思われる。発症後の治療は臨床面においても重要であり、ICOSIg を用いた ICOS/ISOCL 経路阻害も検討した。ICOSIg による治療も効果的な臨床効果が得られ、B7-H 阻害も治療効果があると考えられた。

さらに、ICOS は 2 次感作の制御にも関与しメモリー細胞に関与しているため、ミオシン免疫後の脾細胞を用いて細胞増殖実験を行った。EAM でのミオシン特異的 T 細胞増殖は ICOS/ICOSL 経路阻害によって抑制された。

Th1, Th2 型サイトカインは T 細胞によって産生され、EAM の炎症を調節している。Immune response 段階での ICOS/ISOCL 経路阻害は Th-1 型サイトカインを誘導する IL-6, IL-1 β や TNF- α などの前炎症サイトカインの発現を抑制していたが、antigen priming 段階での ICOS/ISOCL 経路阻害では抑制を認めなかった。これらの結果も、以前の報告のように ICOS は活性化 T 細胞に発現し、antigen priming 段階の T 細胞には発現していない

ことと関連していると思われる。また、抗原特異的 T 細胞は心筋ミオシンにより IFN- γ や IL-2 など Th-1 型サイトカインを産生する。In vitro にて、ICOS/ISOCL 経路阻害によるその変化を検討した。IFN- γ 産生は抑制され、IL-2 産生は変化を認めなかった。この結果は、ICOS/ICOSL 経路刺激は IFN- γ 産生を促進し、IL-2 産生は促進しないという以前の報告を指示し、EAM の進展において IFN- γ の役割が重要であることを示唆している。

antigen priming 段階での ICOS/ICOSL 経路の阻害は、心筋炎の病態に影響を及ぼさなかったが、immune response 段階での ICOS/ICOSL 経路の阻害は、前炎症サイトカインや Th-1 タイプサイトカインの産生や T 細胞の活性化を抑制し、心筋炎の進展を制御することが示された。

結論

ICOS/ICOSL 経路の阻害は、サイトカインの産生や T 細胞の活性化を抑制し、心筋炎の進展を制御することが示された。

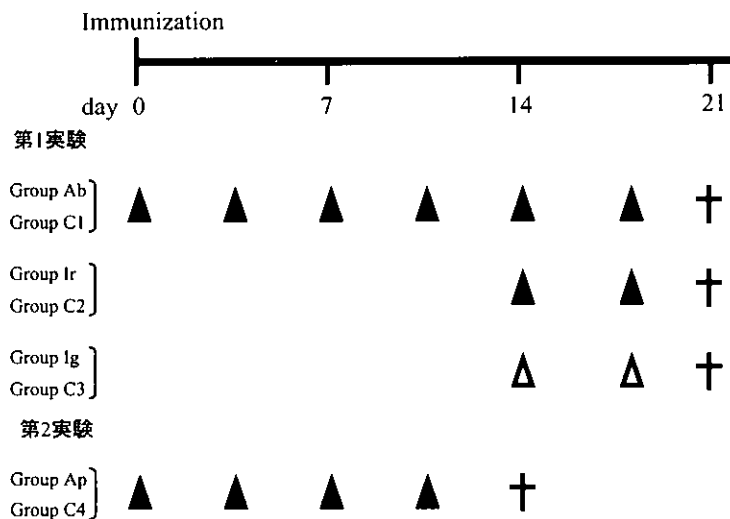


図1 プロトコール

▲ : Anti-ICOS Ab or control Ab, △ : ICOS Ig or control Ig, † : Histological examination

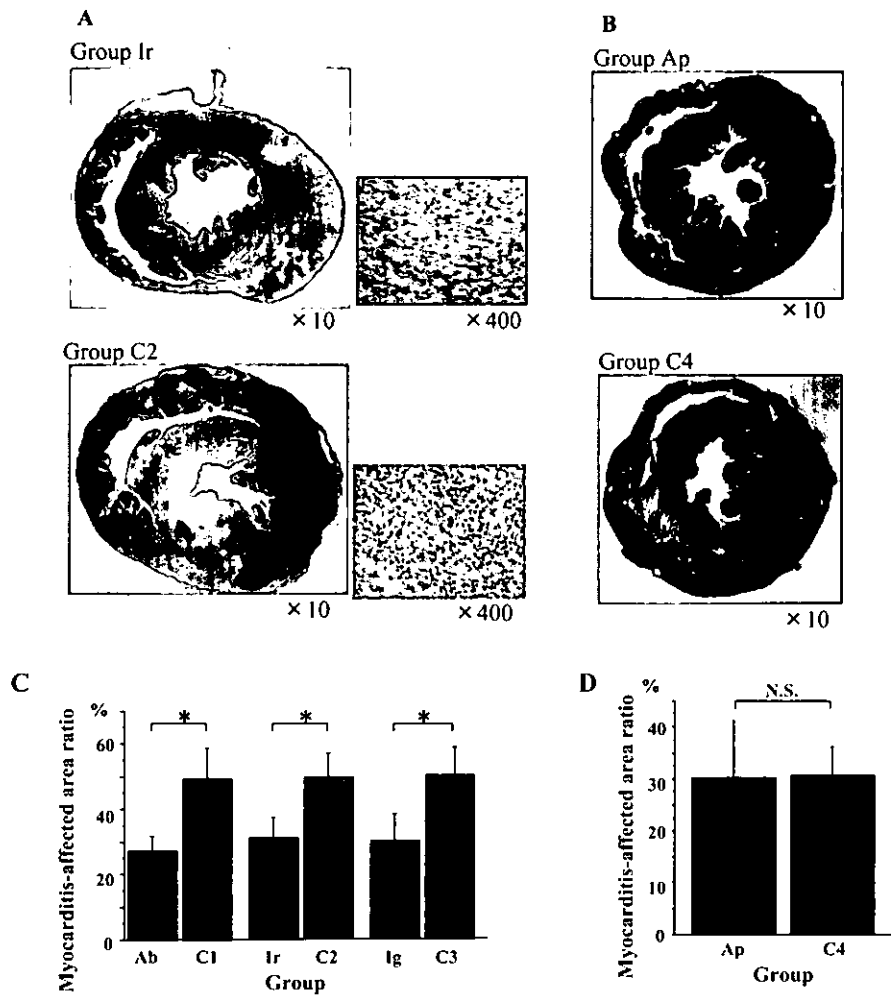


図2 Hematoxylin and eosin 染色

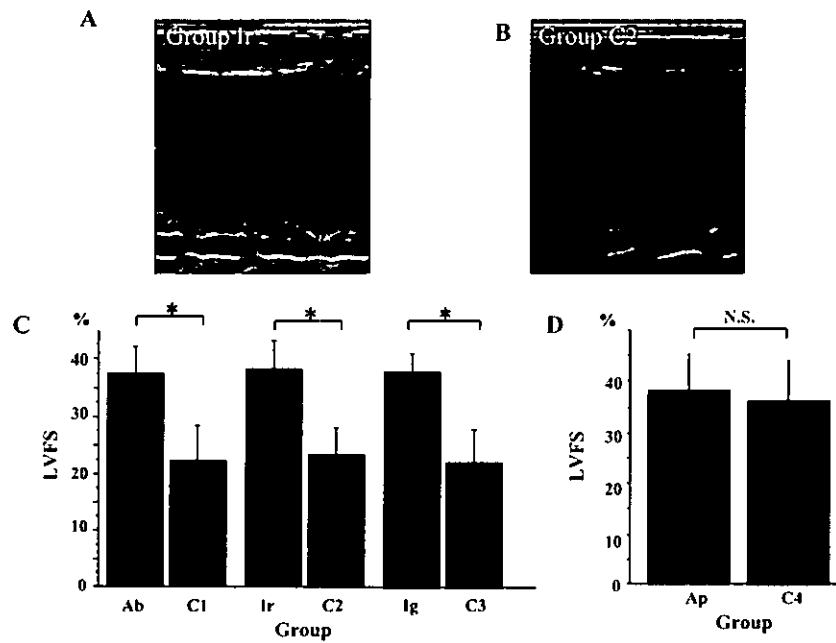


図3 心エコー

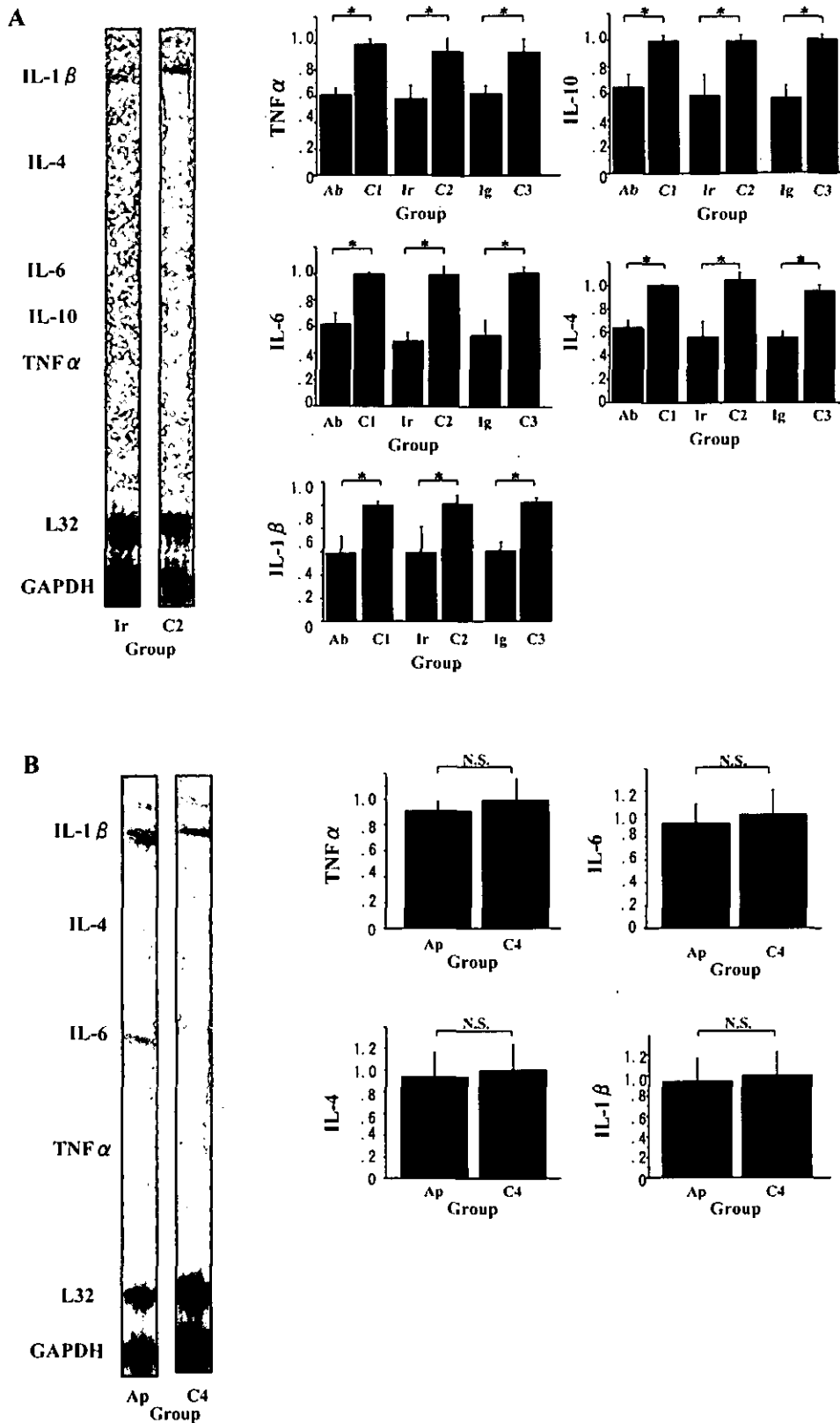


図4 心筋組織におけるサイトカイン

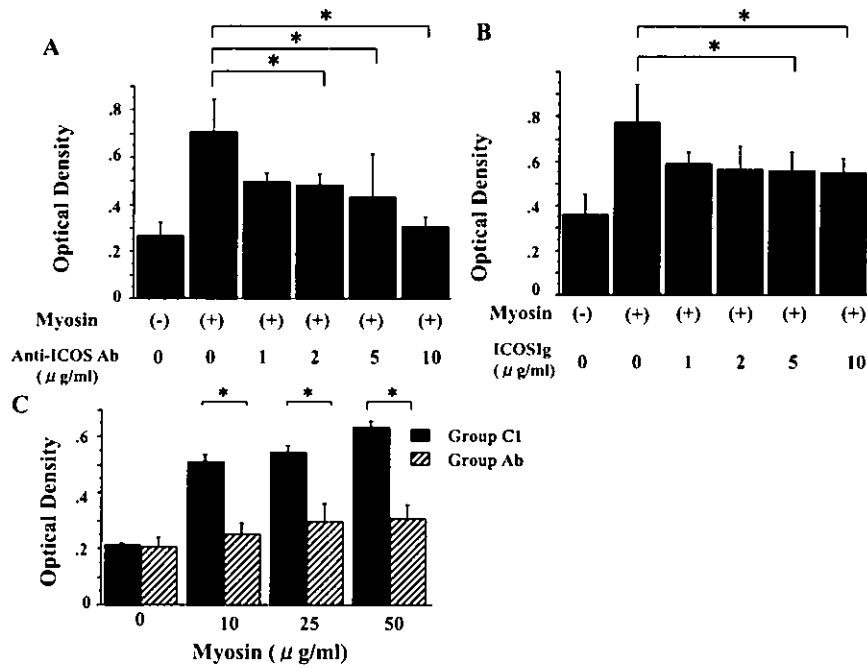


図5 抗原特異的 T 細胞増殖における ICOS/ICOSL 経路阻害の効果

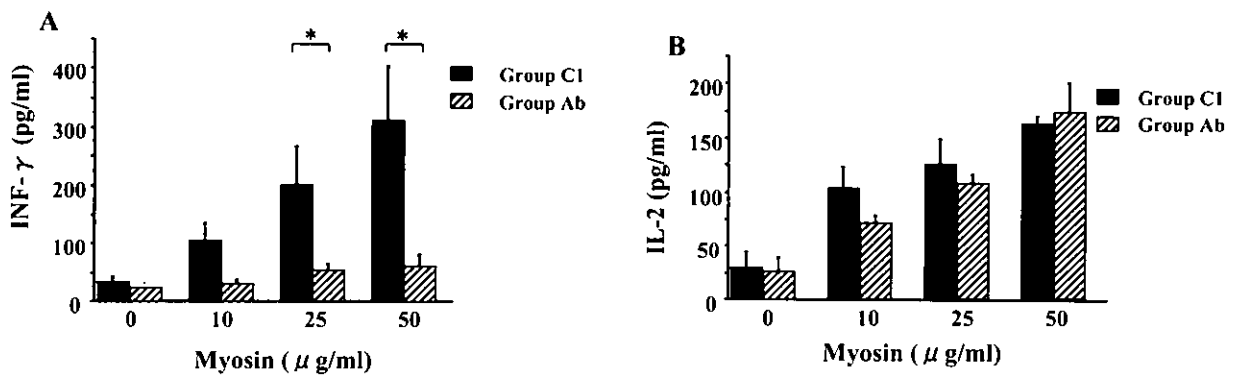


図6 抗原特異的 T 細胞増殖におけるサイトカイン分泌

研究発表

論文発表

1. Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, Inobe M, Uede U: Induction of immuneologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation*, 75: 1374-9, 2003
2. Futamatsu H, Suzuki J, Kosuge H, Yokoseki O, Kamada M, Ito H, Inobe M, Isobe M, Uede T: Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking activated T

- cells through inducible costimulatory molecule pathway. *Cardiovasc Res*, 59 : 95-104, 2003
3. Suzuki J, Cole SE, Batirel S, Kosuge H, Shimizu K, Isobe M, Libby P, Mitchell RN. Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts. *Am J Transplant*. 3: 968-976, 2003
 4. Haraguchi G, Kobayashi Y, Brown ML, Tanaka A, Isobe M, Gianturco SH, Bradley WA: PPAR α and PPAR γ activators suppress the monocyte-macrophage apolipoprotein B48 receptor. *J Lipid Res*, 44 : 1224-1231, 2003
 5. Wada Y, Fujimori M, Suzuki J, Kawauchi M, Tsukioka K, Sawa Y, Morishita R, Kaneda Y, Takamoto S, Isobe M, Amano J: Intimal hyperplasia in cardiac allografts is dependent upon transcriptional regulator Egr-1: effective inhibition by antisense Egr-1 ODN transfection. *J Surg Res*, 115:294-302, 2003
 6. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Nobori K, Tamamori-Adachi M, Isobe M: Nitric oxide inhibits ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by modulating cyclin A-associated kinase activity. *Cardiovasc Res*, 59: 308-320, 2003
 7. Onai Y, Suzuki J, Nishiwaki Y, Gotoh R, Berens K, Dixon R, Yoshida M, Ito H, Isobe M: Blockade of selectin-mediated cell adhesion by a small molecule selectin antagonist attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 481 : 217-225, 2003
 8. Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M: Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Com*, 310 : 1062-1066, 2003

学会発表

1. Nishiwaki Y, Yoshida M, Nakamura Y, Masuda H, Asahara T, Isobe M: Recruitment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to vascular endothelium involves E-selectin dependent mechanism. 国際動脈硬化学会, 京都, 2003, 10月
2. Hisanori Kosuge, Jun-ichi Suzuki, Go Haraguchi, Ryo Gotoh, Noritaka Koga, Manabu Inobe, Mitsuaki Isobe, Toshimitsu Uede: The LIGHT-HVEM (herpes virus entry mediator) signal plays an important role in regulating graft arterial disease through smooth muscle cells proliferation. 76th American Heart Association Scientific Sessions. Orlando, USA, Nov.
3. Noritaka Koga, Hisanori Kosuge, Go Haraguchi, Miyuki Azuma, Mitsuaki Isobe: The blockade of interaction between programmed death 1(PD-1) and its ligand (PD-L1) accelerates graft arterial disease (GAD) in cardiac allografts. 76th American Heart Association Scientific Sessions (Poster Session). Orlando, USA, Nov.
4. Yasuhiro Maejima, Susumu Adachi, Kino Morikawa, Kiyoshi Nobori, Mimi Tamamori-Adachi, Mitsuaki Isobe, Hiroshi Ito: Nitric oxide inhibits hypoxia/reoxygenation-. 76th American Heart Association Scientific Sessions. Orlando, USA, Nov.

知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

特許取得

1. Agents inhibiting chronic rejection reactions after organ transplantation. (US Patent No. 6,552,083 B1) (issued April 22, 2003) (米国)

細胞シート工学による血管付き心筋組織の作製

岡野 光夫

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

研究要旨

重症心不全に対する新たな治療法として細胞から組織を再構築し移植する研究が始まっている。世界的には心筋細胞を生体吸収性の3次元支持体に播種・培養し心筋組織を再構築する手法が一般的であるが、我々はシート状の心筋細胞を積層化することで3次元の心筋組織を再構築する独自の研究を展開している。本年度の研究では初期の酸素・栄養の透過性に起因する作製組織の厚さの限界を克服するため多段階移植の技術を用いることでより厚い心筋組織を作製することを試み、実際に厚さおよそ1mmの心筋組織の再構築に成功した。

研究目的

近年、幹細胞生物学の発展により、拡張型心筋症などの心不全患者に対する新たな治療法として細胞移植療法が世界的に注目されている。さらに次世代の再生医療として組織工学的手法により心筋組織を再構築し移植する治療の実現も期待されている。当研究室では低温処理のみで培養した細胞をシート状に回収できる温度応答性培養皿を用い細胞シートを積層化することで3次元組織を再構築する独自の手法「細胞シート工学」による心筋組織再構築を追究している。これまでに心筋細胞シートを重層化することで同期して拍動する心筋組織の構築には成功しているが、虚血による厚みの限界が組織工学共通の新たな課題となっている。そこで本研究では重層化心筋細胞シートを十分な血管新生を待って繰り返し移植することにより、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織の構築が可能かどうかを検討することを目的とした。

研究方法（倫理面への配慮）

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

離せず維持されるため細胞をシート状に回収できる。この培養皿上に新生仔ラット心筋細胞を培養し細胞シートを作製した。低温処理により脱着した細胞シートを3枚積層化しヌードラット皮下組織に移植した。この3層の心筋グラフトを移植後、1, 2, 3日の間をおいて次の3層の心筋グラフトを移植し、それらの電氣的同期の有無や組織切片像を解析した。さらに最大10回（計30枚）まで移植を繰り返し、拍動の観察・組織の解析を行った。実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

研究結果

1, 2日のインターバルの場合は1週間後2つの移植組織は完全に同期して自律拍動し、一方への移植片への電気刺激が他方の移植片に伝達されることが確認された。また組織切片上、全層にわたって虚血による壊死は認めずより厚い心筋組織の構築が可能となった。Factor VIII染色では組織内には多数の毛細血管が確認された。一方3日インターバルをおいた場合は同期せずそれぞれ異なる拍動を示した。これは組織の上層に結合組織層が形成され2つの移植片の電氣的結合を妨げるためと考えられた。これらの結果をふまえ重層化細胞シート移植を1あるいは2日のインターバルで10回まで反復したところ同期して拍動する厚さ約1mmの心筋組織の再構築が可能となった。

考察

以上の結果より重層化心筋細胞シートの複数回移植により、同期して拍動するより厚い心筋組織の構築が可能であることが示された。すなわち *in vivo* においては多段階移植により酸素・栄養の透過性の

限界を超えることが可能であることが示された。また、移植片同士が互いに同期する条件としては移植片に線維性の被膜ができる前に移植することが重要であることが明らかとなった。

による治療法は虚血による作製組織厚の限界を克服するものであり心筋のみならず他臓器も含めた今後の再生医療に大きく貢献するものと考えられる。

結論

細胞シート工学と多段階移植技術との組み合わせ

研究発表

論文発表

1. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 24:2309-16 (2003)
2. Shimizu T, Okano T. Tissue engineering for ischemic heart disease. *Nippon Rinsho*. 61(4), 710-715 (2003)

学会発表

1. Cardiomyopathy and Heart Failure 2003. Oct 17, 18, 2003, Sapporo, myocardial tissue reconstruction by cell sheet engineering. Shimizu T, Okano T.
2. 第6回組織工学会 東京 6月12,13日 シンポジウム「循環器の再生医療」 細胞シート工学による心筋組織の再構築 清水達也 他

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

福田 恵一

慶應義塾大学医学部心臓先進治療学

研究要旨

心臓の機能調節において交感神経は重要な役割を果たしているが、その発生にかかわる分子機構は不明である。我々は、初代培養心筋細胞でエンドセリン-1(ET-1)が特異的に神経成長因子 (NGF) を制御すること、またその細胞内シグナル伝達機構を明らかにした。ET-1 ノックアウトマウスでは特異的に心臓内 NGF が減少し、胎生後期より心臓への交感神経支配の減少、星状神経節の縮小が観察された。この表現型は心臓でのみ NGF を過剰発現することで改善し、心臓内の ET-1 - NGF 経路が心臓交感神経系の発生を制御していることが明らかとなった。

研究目的

心臓交感神経系の発生にかかわる分子機構を明らかにすること。

研究方法

心筋細胞を用いて NGF 制御にかかわる細胞内分子機構を明らかにする。ET-1 ノックアウトマウス、心臓特異的 NGF 過剰発現マウスを用いて in vivo での心臓交感神経系の解析を行う。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては慶應大学医学部の動物倫理委員会の承認を得て行った。

研究結果

心筋細胞では ET-1 が NGF を強く誘導し、ET-1

ノックアウトマウスでは心臓内 NGF が著減していた。胎生後期より心臓交感神経系の発達は遅滞したが、それは心臓内 NGF 量に依存していた。

考察

心臓交感神経系では発生過程において心臓内 NGF 量が重要であり、それは ET-1 により強く制御されていることが示唆された。

結論

心臓交感神経系の発生において心臓内の ET-1 - NGF 経路が重要であることが明らかとなった。

研究発表

論文発表

1. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, Yasuyo Hisaka, et al. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 113: (in press) 2004 (2004年3月15日号)

学会発表

1. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, Yasuyo Hisaka, et al. Endothelin-1 disruption retards cardiac sympathetic nerve development by down regulation of nerve growth factor. American Heart Association. 75th Scientific meeting 2003.11. Orlando, USA

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—

小室 一成

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

研究要旨

心筋症，特に心不全合併例の予後は内科的薬物療法，補助循環を含めた外科治療の発達にもかかわらず不良である。我々は，成体の内在性心筋幹細胞による効率よい心筋再生分化療法を確立するため，心臓幹細胞の単離同定と分化誘導を行った。その結果，成体マウスの心臓から単離した stem cell antigen-1 (Sca-1) 陽性細胞は oxytocin により自律拍動する心筋細胞に分化することを明らかにした。また，Sca-1 陽性細胞は *in vitro* で特異的な分化誘導により骨細胞および脂肪細胞へ，また，同系マウスへの移植により *in vivo* で心筋のみならず，骨格筋や肝細胞へ分化した。したがって，心筋 Sca-1 陽性細胞は心臓の組織幹細胞と考えられ，oxytocin は心臓由来 Sca-1 陽性細胞を自律拍動する心筋細胞に分化させるために重要な役割を有していることが示唆された。

研究目的

心筋症，特に心不全合併例の予後は内科的薬物療法，補助循環を含めた外科治療の発達にもかかわらず不良である。心筋再生療法は心不全に対する新しい治療概念であり，細胞移植，分化誘導療法両者の側面から研究されているが，心機能を改善するために十分な心筋細胞を安全に補充する技術は確立されていない。我々は，成体の内在性心筋幹細胞による効率よい心筋再生分化療法を確立するための基礎研究として，心臓幹細胞の単離同定と分化誘導を行った。

研究方法

成体マウスの心臓から酵素法により単離した細胞から，磁気ビーズ法により stem cell antigen-1 (Sca-1) 陽性細胞を分取した。この心臓由来 Sca-1 陽性細胞を oxytocin 100nM または 5-azacytidine 10 μ M を添加して培養し，心筋特異的遺伝子，蛋白の発現を RT-PCR 法および免疫染色法により検討した。また，Sca-1 陽性細胞の多分化能を検討するために骨および脂肪細胞への分化誘導および，*in vitro* の移植実験を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については，千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に実験は動物愛護と動物福祉の観点から，動物使用は目的に合致した最小限にとどめる。またその際の手技は，麻酔等手段により苦痛を与えない配慮をおこなう。実験者は，管理者と相互協力のもと適切な環境のもと

飼育管理を行う。

研究結果

心臓由来 Sca-1 陽性細胞は培養直後には緩徐に増殖するが，oxytocin による分化誘導後に急速に増殖し，一部の細胞に自律拍動が認められた。RT-PCR 法による解析では分化誘導後に心筋転写因子および収縮蛋白遺伝子が発現し，また，免疫染色法により心筋転写因子および心筋収縮蛋白の発現とサルコメア構造が確認された。自律拍動が認められた細胞には Ca^{2+} トランジェントが認められ，イソプロテレンールに反応して拍動頻度が増加し， $\beta 1$ 選択的遮断薬により抑制された。心臓由来 Sca-1 陽性細胞の細胞表面抗原を FACS により検討した結果，CD34，c-Kit とともに低レベルであり，造血幹細胞とは異なる細胞集団であると考えられた。さらに，*in vitro* および *in vivo* での心臓由来 Sca-1 陽性細胞の多分化能を検討した結果，Sca-1 陽性細胞は *in vitro* で特異的な分化誘導により骨細胞および脂肪細胞へ，また，同系マウスへの移植により *in vivo* で心筋のみならず，骨格筋や肝細胞へ分化した。

考察

骨髄，骨格筋をはじめとする成体組織には幹細胞が存在するが，今回の我々の研究により成体の心臓には Sca-1 を表面抗原とする幹細胞が存在することが明らかになった。心臓由来 Sca-1 陽性細胞は分化誘導前から低レベルの Csx/Nkx2.5 と GATA4 を発現しており，ある程度心筋細胞へ分化の方向性が決定付けられていると考えられる。一方，*in vitro*

で脂肪細胞や骨細胞に分化すること, in vivo の移植実験で筋細胞の他に骨格筋や肝細胞に分化することから, 心臓由来 Sca-1 陽性細胞は多能性を有した心臓特異的組織幹細胞と考えられる. また, oxytocin は心臓由来 Sca-1 陽性細胞を自律拍動する筋細胞に分化させるために重要な役割を有していることが示唆された. 今後, oxytocin の作用機序を解析する事により, 心臓特異的組織幹細胞が心

筋細胞に分化する分子機序を解明できる可能性がある.

結論

成体の心臓には Sca-1 を細胞表面マーカーとする幹細胞が存在し, oxytocin は成体の心筋幹細胞の分化過程に関与する事が示唆される.

研究発表

論文発表

1. Zou, Y., Takano, H., Mizukami, M., Akazawa, H., Qin, Y., Toko, H., Sakamoto, M., Minamino, T., Nagai, T., Komuro I. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Survival of Cardiomyocytes and Induces Regeneration of Myocardium After Myocardial Infarction. *Circulation* 108:748-753, 2003.
2. Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., Komuro, I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* 23: 212-220, 2004.
3. Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., Komuro, I. Adult cardiac Sca-1 positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* (in press).

学会発表

1. 小室一成: 「Cardiovascular continuum におけるアンジオテンシン II の役割」第 67 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 平成 15 年 3 月 30 日.
2. 飯嶋義浩, 小室一成他: Mechanical stress and calcium signaling involve transdifferentiation of skeletal muscle derived cells. 第 67 回日本循環器学会学術集会, 福岡, 平成 15 年 3 月 30 日.
3. Komuro I: Oxidative stress and development of cardiac hypertrophy, XXV Annual Meeting of the International Society for Heart Research, June 28-30, Mystic, Connecticut, USA, 2003.

ラミニン γ 1 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節

武田 信彬

東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部

研究要旨

細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは心筋症でも何らかの変化、また、心機能へ影響を及ぼすものと推測される。本研究ではラミニンの変化を遺伝子レベルで検討するべく、ラミニン γ 1 鎖遺伝子がどのような分子生物学的メカニズムで活性化されるかを検討した。その結果 TGF- β などで誘導された転写因子 TFE-3 が、ラミニン γ 1 鎖プロモーター領域にある DNA エlement bcn-1 に結合して活性化することがわかった。

研究目的

細胞外マトリックスの厚生成分であるラミニンは、高血圧症、糖尿病、拡張型心筋症などで心筋細胞や血管平滑筋に増加し、組織の硬化を招くといわれている。従ってその増加は心機能にも影響すると思われるが、これらの病態が遺伝子レベルでどのようにラミニンの変化に関わっているかはまだ明らかでない。本研究ではこのラミニンの変化を遺伝子レベルで検討し、さらに心筋症などにおけるラミニンの変化にどのような分子生物学的メカニズムが関与しているかを解明するのが目的である。

研究方法

マウスのラミニン γ 1 鎖プロモーター遺伝子をヒトのそれと比較し、共通に存在する DNA エlement (bcn-1) を見つけ、血管平滑筋細胞核抽出液を用いて、ゲルシフトアッセイで、bcn-1 エlement に結合する転写因子の存在を確認。ルシフェラーゼアッセイで、ラミニン γ 1 鎖プロモーターの転写が bcn-1 エlement を介して促進されることを確認。さらに、イーストのワンハイブリッドシステムで、心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行う。

(倫理面への配慮)

コマーシャルベースのものを使用しており、実験

動物委員会の倫理規定に沿ったものである。

研究結果

ラミニン γ 1 鎖プロモーター領域に DNA エlement bcn-1 を発見、phorbol 12-myristate 13-acetate や TGF- β などに誘導され bcn-1 エlement の結合する転写因子の存在がわかった。また、ラミニン γ 1 鎖プロモーターの転写が bcn-1 エlement を介して強く促進されることを認めた。さらに、bcn-1 エlement に転写因子 TFE-3 が結合することがわかった。

考察

TGF- β に誘導された TFE-3 が bcn-1 に結合してラミニン γ 1 鎖プロモーターが活性化されるが、ラミニン γ 1 鎖プロモーター領域に存在する Smad 結合エlement の関与も重要である。本研究の結果は、細胞外マトリックスの構成成分ラミニンの増加機構の解明を介して、心筋症、高血圧性肥大大心、糖尿病心などの病態解明にも役立つものと思われる。

結論

Bcn-1 エlement は TGF- β などで誘導され、TFE-3 に依存してラミニン γ 1 鎖プロモーターを活性化するが、心筋組織のラミニン増加を来たす病態における関与が示唆される。

研究発表

学会発表

1. International Symposium of Cardiology Frontiers: Cardiomyopathy an Heart Failure 2003, Sapporo, Japan (October 2003, Sapporo)

拡張型心筋症の病態・診断・治療に関する研究

北島 顕

北海道大学大学院循環病態内科学

研究要旨

1) 病態面では、免疫学的機序の関与、ことに、自己免疫性心筋炎モデルを用い、Macrophage migration inhibitory factor やオステオポンチンの関与を検討した。2) 診断面では共同研究として、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。さらに、3) 治療面では β 遮断薬を取り上げ、効率的、個別的な「テラー・メイド」の治療方法の開発を分担した。

研究目的

1) 病態面：ラット実験的自己免疫性心筋炎(EAM)は自己免疫機序の関与する心筋炎、巨細胞性心筋炎などの疾患モデルと考えられる。一方、Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は、活性化Tリンパ球より分泌されるサイトカインで、マクロファージの遊走を制御し炎症部位にマクロファージを集め、炎症、免疫反応を惹起する因子として報告された。EAMの進展におけるMIFの関与について検討した。

2) 診断面：拡張型心筋症におけるBNPなどの心筋障害マーカーはあるが、リモデリング機構に関する指標がないため、テネイシン・オステオポンチンに着目し、敏感かつ特異的診断法になりえるかを検討することを目的とした。

3) 治療面：拡張型心筋症の β 遮断薬による薬物治療を取り上げ、日本人の特性に配慮した β 遮断薬至適用量を確認し、さらに、至適用量におけるレスポナー、ノンレスポナー解析を行い、EBMに基づいた効率的、個別的治療方法を確立することを目的とした。

研究方法

1) 病態面：EAMにおけるMIFの発現を、ELISA法、RT-PCR法、免疫染色法を用いて検討した。また、抗MIF中和抗体を免疫と同時期より、あるいは発症後より投与を開始し、その治療効果を検討した。更に、有効性の機序の検討として、心臓におけるIL-1 β 、TNF- α 、VCAM-1の発現を検討した。

2) 診断面：自己免疫性心筋炎モデル、急性心筋梗塞モデルにおける各リモデリング過程におけるテネイシン・オステオポンチンの心筋局所での発現状況

を検討する。引き続き患者血清を用いた臨床的検討に取り組む予定である。

3) 治療面：拡張型心筋症患者において β 遮断薬投与群でのレスポナー解析を行い、臨床各指標との関連を検討する。また、 β 1受容体(Ser49Gly, Arg389Gly)、 β 2受容体(Arg16Gly, Thr164Ile, Glu27Gln)などの遺伝子多型性との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析では倫理面に配慮し、「ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則」の精神に基づき、かつ、文部科学省・厚生労働省のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針等のガイドラインを遵守のうえ実施する。事前に申請者の所属施設内の倫理委員会からの倫理面からの審査を受け実施した。

研究結果

1) 病態面：正常ラットと比較し、EAMにおいて血清、心臓でのMIFの発現が亢進していた。また抗MIF中和抗体を、免疫と同時期より、または発症後より投与した場合、いずれも有意に心筋炎の進展を抑制した。更に、抗MIF中和抗体治療群においては、EAMと比較して有意に、心臓におけるIL-1 β 、TNF- α 、VCAM-1の発現が抑制された。

2) 診断面：検討段階にあり、まだ、十分な結果が出ていない。

3) 治療面：拡張型心筋症患者136例で β 遮断薬投与群84例(導入率62%)と β 遮断薬非投与群52例について、平均2461日観察した。 β 遮断薬投与群では改善36.3%、不変55.8%、悪化7.8%と有意にレスポナーが多く、効果は臨床症状の改善、血漿ANP、BNP値の低下と相関したが、投与前の心機能、心拍数、血漿ANP、BNP値とは相関せず、長期的にレスポナーを予測することは困難であった。

$\beta 1$ 受容体 (Ser49Gly, Arg389Gly), $\beta 2$ 受容体 (Arg16Gly, Thr164Ile, Glu27Gln) などの遺伝子多型性との関連を検討した結果, ACEI/D.NOS3. $\beta 2$ 受容体(Glu27Gln)とレスポナーとの関連を認めた.

考察

MIF は自己免疫性心筋炎の進展において重要な役割を果たしていること, 抗 MIF 中和抗体の投与は自己免疫性心筋炎の治療に有効であることが示された. また, その有効性の機序としては, IL-1 β , TNF- α , VCAM-1 の発現の抑制によることが示唆された. 拡張型心筋症患者で β 遮断薬は有効で, 生

命予後を改善するが, 効果には個人差があり, 臨床所見から長期的にレスポナーを予測することは困難, ACEI/D.NOS3. $\beta 2$ 受容体(Glu27Gln)遺伝子多型性解析が有望な方法と考えられた.

結論

拡張型心筋症は, 免疫学的に多彩な病態が経過を修飾すること, 診断にはテネイシン・オステオポンチンなどの修飾因子が有望であること, β 遮断薬は有効であるが, 効果には個人差があり, 遺伝子多型性解析により効果を予測することが可能であると考えられた.

研究発表

論文発表

1. Toshihiro Shimizu, Hiroshi Okamoto, Satoru Chiba, Yutaka Matsui, Takeshi Sugawara, Masatoshi Akino, Jia Nan, Hisao Onozuka, Taisei Mikami, and Akira Kitabatake. Altered Microvasculature is Involved in Remodeling Process in cardiomyopathic Hamsters. *Jpn Heart J* 44:111-126, 2003
2. Shimizu T, Okamoto H, Chiba S, Matsui Y, Sugawara T, Akino M, Nan J, Kumamoto H, Onozuka H, Mikami T, Kitabatake A. VEGF-mediated angiogenesis is impaired by angiotensin type 1 receptor blockade in cardiomyopathic hamster hearts. *Cardiovasc Res*58(1):203-212, 2003
3. Nan Jia, Hiroshi Okamoto, Toshihiro Shimizu, Satoru Chiba, Yutaka Matsui, Takeshi Sugawara, Masatoshi Akino, Akira Kitabatake. A Newly Developed Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, CS866, Regress Cardiac Hypertrophy Through Reduction in Beta-1 Integrin Expression. *Hypertens Res* 26:737-742, 2003
4. Yutaka Matsui, Hiroshi Okamoto, Manabu Inobe, Nan Jia, Toshihiro Shimizu, Masatoshi Akino, Takeshi Sugawara, Katsunari Tezuka, Junko Morimoto, Chiemi Kimura, Shigeyuki Kon, Tadaaki Miyazaki, Akira Kitabatake, and Toshimitsu Uede. Adenovirus-mediated gene transfer of ICOSIg fusion protein ameliorates ongoing experimental autoimmune myocarditis *Human Gene Therapy* 14:521-532, 2003
5. Yutaka Matsui, Susan Rittling, Hiroshi Okamoto, Manabu Inobe, Nan Jia, Toshihiro Shimizu, Masatoshi Akino, Takeshi Sugawara, Junko Morimoto, Chiemi Kimura, Shigeyuki Kon, David Denhardt, Akira Kitabatake, Toshimitsu Uede. Osteopontin Deficiency Attenuates Atherosclerosis in Female Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1029-1034, 2003
6. ROLE OF OSTEOPONTIN IN CARDIAC FIBROSIS AND REMODELING IN ANGIOTENSIN II-INDUCED CARDIAC HYPERTROPHY. Yutaka Matsui, Nan Jia, Hiroshi Okamoto, Shigeyuki Kon, Hisao Onozuka, Masatoshi Akino, Lizhi Liu, Junko Morimoto, Susan R. Rittling, David Denhardt, Akira Kitabatake, and Toshimitsu Uede. HYPERTENSION, in press.

学会発表

1. International Society for Heart Research The 17th Annual Scientific Meeting of the Japanese Section" Heart Failure and Cardiac Development", Osaka Japan, 2000

2. National Organizing Committee, Mast cell mediators and human diseases: Clinical Aspects. International Congress on Cardiomyopathies and Heart Failure, Kyoto, Japan, 2002
3. International Symposium: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003, Sapporo, 2003
4. International Network on Myocarditis, Sapporo, 2003, Featured Research Session Complete Freund's adjuvant can activate TLR2 and suppress cardiac necrosis in cardiomyopathic heart. Hiroshi Okamoto, Mitsunori Ohtubo, Masatoshi Akino, Jia Nan, Takeshi Sugawara, Toshihiro Shimizu, Yutaka Matsui, Hideki Kumamoto, Noriko Ihida, Akira Kitabatake, Satoru Chiba, 2003.3.28
5. 第 67 回日本循環器学会学術集会 福岡 日本 Takahiro Tsukamoto, Koichi Morita, Kazuyuki Noriyasu, Chietsugu Katoh, Yuji Kuge, Hiroshi Okamoto, Akira Kitabatake, Nagara Tamaki, 2003.3
6. Di Wu, Taisei Mikami, Keiko Nishihara, Hisao Onozuka, Satoshi Yamada, Kaoru Komuro, Kazutomo Gotoh, Hiroshi Okamoto, Akira Kitabatake : Influence of left ventricular diastolic function on the clinical course of patients with hypertrophic cardiomyopathy. 2003.3.29 第 67 回日本循環器学会学術集会 福岡 日本
7. Masatoshi Akino, Hiroshi Okamoto, Satoru Chiba, Takeshi Sugawara, Toshihiro Shimizu, Yutaka Matsui, Masatsugu Horiuchi, Akira Kitabatake : Angiogenesis is altered by angiotensin type 1 receptor blockade in cardiomyopathic hamster hearts. Hiroshi Okamoto, Yutaka Matsui, Masatoshi Akino, Takahiro Tsukamoto, Nan Jia, Akira Kitabatake, Toshihiro Shimizu, 2003.3.29 第 67 回日本循環器学会学術集会 福岡 日本 2003 2003/05/09
8. Toshihiro Shimizu, Hiroshi Okamoto, Yutaka Matsui, Masatoshi Akino, Takahiro Tsukamoto, Nan Jia, Akira Kitabatake 第 67 回日本循環器学会学術集会 福岡 日本
9. T. Tsukamoto, K. Morita, K. Noriyasu, C. Katoh, H. Kageyama, K. Mabuchi, Y. Kuge, K. Nakada, H. Okamoto, A. Kitabatake, N. Tamaki : The impact of coronary stenosis and risk factors on myocardial flow reserve. 2003.11.2 International Symposium for PET and Molecular Imaging, Sapporo, Japan, 2003/11/20
10. Hiroshi Okamoto, Yutaka Matsui, Manabu Inobe, Masatoshi Akino, Jia Nan¹, Takeshi Sugawara, Toshimitsu Uede, and Akira Kitabatake. Blockade of T Cell Costimulatory Signals Using Adenovirus Vectors Could Prevent Both the Onset and Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis. International Symposium: Cardiomyopathy and Heart Failure 2003, Sapporo, 2003
11. 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会 Osteopontin Deficiency Attenuates Atherosclerosis in Female Apolipoprotein E Deficient Mice Yutaka Matsui, Susan R. Rittling, Shigeyuki Kon, Manabu Inobe, Hiroshi Okamoto, Nan Jia, Junko Morimoto, Chiemi Kimura, David Denhardt, Tadaaki Miyazaki, Akira Kitabatake, and Toshimitsu Uede
12. Osteopontin Deficiency Attenuates Atherosclerosis in Female Apolipoprotein E Deficient Mice. Matsui Y, Okamoto H, Rittling SR, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akino M, Sugawara T, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Denhardt D, Uede T, Kitabatake A. American Heart Association Scientific Sessions 2003-Orlando, Florida
13. Adenovirus-mediated gene transfer of ICOSIg fusion protein ameliorates ongoing experimental autoimmune myocarditis. Matsui Y, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akino M, Sugawara T, Tezuka K, Nakayama Y, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Miyazaki T, Uede T, Kitabatake A. American Heart Association Scientific Sessions 2003-Orlando, Florida

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者氏名：今泉 勉
 所属機関名：久留米大学医学部第三内科 教授

書籍

1. 岡 直樹, 宮崎 宏, 今泉 勉：肥大型心筋症. 高久史麿, 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, 東京, 304-305, 2003
2. 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, 東京, 72-76, 2003

雑誌

1. Kuwahara F, et al : TGF- β function blocking already effective as therapeutic strategy: Reply. Circulation 107, 37e,2003
2. Kuwahara F et al : Roles of intercellular adhesion molecule-1 in hypertensive cardiac remodeling. Hypertension 41, 819-823, 2003
3. Shibata R, et al. : Rho-kinase inhibition enhances Bax expression and apoptosis in balloon-injured rat carotid artery. J Cardiovasc Pharmacol 42 (suppl) S43-S47, 2003
4. Tokuda K et al. : Sub-suppressor dose of angiotensin type-1 receptor blocker inhibits TGF- β -mediated perivascular fibrosis in hypertensive rat hearts. J Cardiovasc Pharmacol 42 (suppl) S61-S65, 2003
5. Koga A, et al. : Adenovirus-mediated overexpression of caveolin-3 inhibits rat cardiomyocyte hypertrophy. Hypertension 42, 213-219, 2003
6. Hayashi T, et al. : 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, et al. : Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. Hypertension 43, 499-503, 2004
8. Kuwahara F, et al. : Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction -Another model of inflammation-. Hypertension, in press, 2004

分担研究者氏名：和泉 徹
 所属機関名：北里大学医学部 教授

書籍

1. T Izumi, H Takehana, T Inomata et al : Myosin Autoreactive T cells and Autoimmune Myocarditis. Lessons from the Disease Caused by Cardiac Myosin Peptide CM2. Akira Matsumori, Cardiomyopathies and Heart Failure, Kluwer Academic Publisher, Boston, 59-65, 2003
2. T Izumi, N Aoyama, M Nishii et al : Fulminant Myocarditis-From Lethal Disease to Survival. N.Dhalla, PhD,MD, Frontiers in Cardiovascular Health, Kluwer Academic Publisher, Boston, 159-169, 2003

雑誌

1. M Yoshida, Y Takano, T Izumi et al : E-Selection Polymorphism Associated With Myocardial Infarction Causes Enhanced Leukocyte-Endothelial Interactions Under Flow Conditions, Arterioscl Thromb Vasc Biol. 23 : 783-8, 2003

2. N Fukuda, S Kurokawa, T Izumi et al : A Young Girl with Vasospastic Angina Associated with Mutation in Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. A Case Report *Angiology* 54 : 233-7, 2003
3. J Kojima, S Niwano, T Izumi et al : Effect of Pilsicainide on Atrial Electrophysiologic Properties in the Canine Rapid Atrial Stimulation Model -A Possible Suppressive Effect on Atrial Electrical Remodeling-. *Circulation J* 67 : 340-6, 2003
4. T Yoshida, S Niwano, T Izumi et al : Bepridil Prevents Paroxysmal Atrial Fibrillation by a Class III Antiarrhythmic Drug Effect. *Pac Clin Electrophysiol* 26 : 314-7, 2003
5. H Takehana, T Inomata, T Izumi et al : Recurrent Fulminant Viral Myocarditis With a Short Clinical Course. *Circulation J* 67 : 646-8, 2003
6. T Masuda, K Sato, T Izumi et al : Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion. *Crit Care Med* 31 : 1987-92, 2003
7. C Noda, T Matsuda, T Izumi et al : Vanadate Improves Cardiac Function and Myocardial Energy Metabolism in Diabetic Rat Hearts. *Jpn Heart J* 44 : 745-7, 2003

分担研究者氏名：小川 聡

所属機関名：慶應義塾大学医学部内科学 教授

なし

分担研究者氏名：豊岡 照彦

所属機関名：東京大学器官病態内科 教授

書籍

1. Toyo-oka and Kawada T. : Gene-based therapy of advanced heart failure secondary to the disruption of dystrophin-related proteom. N.S.dhalla *Signal transduction and cardiac hypertrophy*, Canada, 449-459, 2003

雑誌

1. Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T. : High fidelity SNP genotyping using sequence- specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* 4, 477-84, 2003
2. Hakamada-Taguchi R, Uehara Y, Kuribayashi K, Numabe A, Saito K, Negoro H, Fujita T, Toyo-oka T, Kato T. : Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ Res* 93 : 948-56, 2003
3. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, Takeo S. : Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 59 : 419-27, 2003
4. Abe T, Hikiji H, Shin WS, Koshikiya N, Shima S, Nakata J, Susami T, Takato T, Toyo-oka T. : Targeting of iNOS with antisense DNA plasmid reduces cytokine-induced inhibition of osteoblastic activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285 : E614-21, 2003
5. Numabe A, Ara N, Hakamada-Taguchi R, Suzuki N, Hirawa N, Kawabata Y, Negoro

- T, Nagata T, Goto A, Toyo-Oka T, Fujita T, Uehara Y. : Effects of the anti-platelet aggregation drug dilazep on cognitive function in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 26 : 185-91, 2003
6. Koizumi T, Hikiji H, Shin WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyo-oka T. : Cell density and growth-dependent down-regulation of both intracellular calcium responses to agonist stimuli and expression of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Biol Chem* 278 : 6433-9, 2003

分担研究者氏名：堀 正二

所属機関名：大阪大学大学院医学系研究科 教授

書籍

1. 柏瀬一路他：慢性心不全. 山口 徹, 堀 正二編, 循環器疾患の最新の治療, 南江堂, 東京, 246-251, 2004
2. 山本一博他： 拡張不全の診断と治療. 堀 正二, 心不全治療への挑戦, メディカルビュー, 東京, 30-38, 2003

雑誌

1. Yamaguchi et al : Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 : 15883-15888, 2003
2. Higuchi et al : The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem* 278 : 20770-20777, 2003

分担研究者氏名：松崎 益徳

所属機関名：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

書籍

1. 松崎益徳：心筋炎. 山口 徹・北原光夫, 今日の治療指針 2004 年度版, 医学書院, 東京, 41-42, 2004

雑誌

1. Nakamura H, Takata S, Umemoto S, Naik G, Moe G, Liu P, Matsuzaki M : Induction of Left Ventricular Remodeling and Dysfunction in the Recipient Heart Following Donor Heart Myocardial Infarction: New Insights into the Pathological Role of Tumor Necrosis Factor-alpha from a Novel Heterotopic Cardiac Transplant-Coronary Ligation Rat Model. *Journal of the American College of Cardiology* Vol.42 : 173-181, 2003
2. 中村浩士, 高田智子, 梅本誠治, 松崎益徳：心筋梗塞後におけるリモデリングと心機能低下の遠隔作用：分離心筋梗塞モデルにおける腫瘍壊死因子 α の動態と作用の検討. *Journal of Cardiology* Vol. 41 41-42, 2003
3. Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M : Identification of Autoantibodies with the Corresponding Antigen for Repetitive Coxsackievirus Infection-induced Cardiomyopathy. *Circulation Journal*, in press