

心臓サルコイドーシスにおけるオステオポンチンおよび テネイシン C の発現に関する研究

北浦 泰

大阪医科大学第三内科

寺崎 文生, 塚田 敏, 大塚 宏治, 下村 裕章, 浮村 聡

大阪医科大学第三内科

今中 - 吉田 恭子, 吉田 利通

三重大学医学部病理学

廣江 道昭

国立国際医療センター腎臓循環器内科

堀井 泰浩, 磯村 正, 須磨 久善

葉山ハートセンター

岡本 洋, 筒井 裕之

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

北畠 顕

カレス札幌

研究要旨

我が国では心臓サルコイドーシス（心サ症）の頻度が高く、重症心不全や致死的不整脈により死因として極めて重要である。従って、心サ症の治療と予後においてはとくに早期診断が重要であるが、心臓以外の臓器病変が明かでない場合、その早期診断は困難で、心臓手術の後や死後剖検で明かになることも多い。また、心サ症の活動性や治療効果の判定も確立しているとは言えない。細胞外マトリックス蛋白の中で、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大きいものを *matricellular protein* としてとらえる考え方がある。オステオポンチン (OPN) およびテネイシン C (TNC) は、このカテゴリーに属する蛋白であり、炎症や組織リモデリングに伴って発現する。

本研究は心サ症患者の心筋組織における OPN および TNC の発現とその特徴を明らかにすることを目的として行われた。その結果、心サ症患者心筋のサルコイド肉芽腫において、OPN および TNC 両者の高度発現が認められ、それらが心サ症の診断や活動性の評価の指標になる可能性が示唆された。

研究目的

サルコイドーシス（サ症）は原因不明の全身性多臓器疾患で非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を特徴とする。我が国では心臓サルコイドーシス（心サ症）の頻度が高く、重症心不全や致死的不整脈により死因として極めて重要である。従って、心サ症の治療と予後においてはとくに早期診断が重要であるが、心臓以外の臓器病変が明かでない場合、その早期診断は困難で、心臓手術の後や死後剖検で明かになることも多い。また、心サ症の活動性や治療効果の判定も確立しているとは言えない。

細胞外マトリックス蛋白の中で、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大きいものを *matricellular protein* としてとらえる考え方がある。オステオポンチン（OPN）およびテネイシン C（TNC）はこのカテゴリーに属する細胞外マトリックス蛋白である。OPN は正常では骨、腎に多く発現しているが、動脈硬化、血管形成術後再狭窄、心筋梗塞などで発現する。また単球、マクロファージ系で産生され、肺結核や肺サルコイドーシスの肉芽腫で発現するとの報告がある。TNC は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炎症や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。我々は、先に慢性心筋炎において TNC の発現が亢進することを見出し報告した。

以上より OPN および TNC は肉芽腫の形成や慢性炎症にも関与することが予測されるが、心サ症における OPN および TNC の実態は明かにされていない。本研究の目的は心サ症患者の心筋組織における OPN および TNC の発現とその特徴を明らかにすることであり、OPN および TNC が心サ症の診断や活動性の指標に成り得るか否か検討する。

研究方法

1. 心臓手術時の切除心筋あるいは術中生検組織（左室縮小形成術 6 例、僧帽弁形成術 2 例）または剖検心（2 例）の組織学的検索で活動性心サ症と確定診断された 10 例を対象とした（表 1）。対照には特発性心筋症（DCM）患者 10 例の左室縮小形成術時切除心筋を用いた。
2. 心筋の一部をホルマリン固定後パラフィン包

埋し HE 染色を行った。また、OPN に対する抗体（anti-human osteopontin 10A/6; IBL）および TNC に対する抗体（4F10TT）を用いて免疫組織化学染色を行い OPN および TNC の発現と局在を検討した。

3. 凍結保存した心筋を用いて、リアルタイム PCR 法により、心筋における炎症性サイトカイン mRNA の発現を解析した。

（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

1. 一般に DCM 患者心筋においては OPN および TNC の発現は軽度であった。
2. 一方、心サ症患者心筋においては OPN および TNC 両者の高度の発現が認められた。OPN はサルコイド肉芽腫内の多核巨細胞およびマクロファージの細胞質に存在した。また、TNC は多核巨細胞およびマクロファージには認められず、それらを取りまく周囲の間質（細胞外マトリックス）に極めて高度に発現が認められた。肉芽腫周囲の完成した線維化巣には TNC の発現は認められなかった。
3. 心筋における炎症性サイトカイン mRNA の解析では、インターロイキン（IL）-1 α 、IL-2、IL-12p40、インターフェロン（IFN）- γ の特異的な発現亢進が認められた。これらは全て 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインであり、結果の一部は先に報告した（文献 1）。

文献

1. 心臓サルコイドーシス患者心筋における 1 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインの発現に関する研究。厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班平成 13 年度研究報告集：pp86-89

考察

1. 心サ症患者心筋における肉芽腫の形成と進展、活動性に *matricellular protein* である OPN および TNC が関与していると考えられる。とくに OPN はマクロファージや多核巨細胞の活動性と関連があり、TNC は、コラーゲン線維の形成など肉芽腫の線維化進展過程に重要な役割を果たしていることが示唆される。
2. OPN および TNC の発現分布の様相から、両者が相補的に働く可能性がある。とくに、1 型ヘル

パー T 細胞関連サイトカインやトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β などとの相互関連に興味をもたれ今後の検討課題である。

OPN および TNC 両者の高度発現が認められ、それらが心サ症の診断や活動性の評価の指標になる可能性が示唆された。

結論

心サ症患者心筋のサルコイド肉芽腫において、

表

症例	年齢	性別	手術等	施行日	術前診断
1	60	M	LVP	1997.9.1	DCM
2	63	M	LVP	1999.7.6	DCM
3	51	F	LVP	1999.7.30	分類不能心筋症
4	59	F	LVP	1999.10.12	DCM
5	51	F	LVP	2001.10.2	DCM
6	36	M	LVP	2001.12.6	DCM
7	49	F	MVP	2002.7.29	分類不能心筋症
8	55	M	MVP	2004.4.28	DCM
9	43	F	剖検	1991.10.2	DCM
10	31	M	剖検	1985.9.27	サルコイドーシス

DCM: 拡張型心筋症

LVP: 左室縮小形成術, MVP: 僧帽弁形成術

研究発表

論文発表

1. 拡張型心筋症を呈する心臓サルコイドーシス —左室縮小形成術（バチスタ手術）症例を中心に— 日本サルコイドーシス / 肉芽腫性疾患学会雑誌 24: 21-30, 2004

学会発表

1. Markedly enhanced expression of both osteopontin and tenascin-C in myocardial granulomas of patients with active cardiac sarcoidosis
第 69 回日本循環器学会学術集会（シンポジウム），2005 年 3 月，横浜
2. 拡張型心筋症を呈する心臓サルコイドーシス —左室縮小形成術症例を中心に—
第 102 回日本内科学会総会，2005 年 4 月，大阪

特発性拡張型心筋症における組織リモデリングと 慢性炎症に関する研究 —テネイシン C 血中濃度と臨床検査指標との関連性の検討—

北浦 泰

大阪医科大学第三内科

寺崎 文生, 塚田 敏, 大塚 宏治, 下村 裕章

大阪医科大学第三内科

今中 - 吉田 恭子, 吉田 利通

三重大学医学部病理学

廣江 道昭

国立国際医療センター腎臓循環器内科

岡本 洋, 筒井 裕之

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

北畠 顕

カレス札幌

研究要旨

細胞外マトリックス蛋白の中で、線維や基底膜などの構造物を形成せず、多彩な生物活性により主として細胞と細胞外の物質との相互作用を仲介するものを matricellular protein としてとらえる考え方がある。テネイシン C (TNC) は、このカテゴリーに属する蛋白であり、炎症や組織リモデリングに伴って発現する。

特発性拡張型心筋症 (DCM) は慢性進行性で予後不良の疾患であり、その成因や病態に組織リモデリングや慢性炎症が重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、先に、左室縮小形成術で得られた DCM 患者切除心筋組織において、TNC の発現亢進がみられる症例があり炎症性細胞浸潤 (慢性心筋炎) と相関することを報告した。しかし、DCM 患者における TNC の血中レベルについては明かにされていない。そこで、DCM 患者における TNC 血中濃度の測定を行い、それらと各種臨床検査指標との関連を検討した。

その結果、末梢血 TNC レベルは NYHA 心機能分類、血中 BNP 濃度、心胸郭比と正相関を示したことより心不全の重症度を反映する可能性が示唆された。また、末梢血 TNC レベルは左室内径短縮率と負相関、左室駆出率、左室流入血流速減速時間と負相関傾向を示したことより、左室機能低下を反映する可能性が考えられた。

研究目的

細胞外マトリックス蛋白の中で、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大きいものを matricellular protein としてとらえる

考え方がある。テネイシンC (TNC) はこのカテゴリーに属する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、最近、急性心筋梗塞や急性心筋炎などの病態において炎症や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。

特発性拡張型心筋症 (DCM) は慢性進行性で予後不良の疾患であり、その成因や病態に組織リモデリングや慢性炎症が重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、先に、左室縮小形成術で得られた DCM 患者切除心筋組織において、TNC の発現亢進がみられる症例があり炎症性細胞浸潤 (慢性心筋炎) と相関することを報告した。しかし、DCM 患者における TNC の血中レベルについては明かにされていない。そこで、DCM 患者における TNC 血中濃度の測定、およびそれらと各種臨床検査指標との関連を検討する目的で本研究が行われた。

研究方法

1. 2001 年 1 月から 2004 年 12 月までの間に大阪医科大学第三内科に通院加療中、または入院精査、加療を行った DCM 患者のべ 48 例の末梢血血清 TNC 濃度を測定した。48 例中 3 例については経年的に 2 回測定が行われた。また、48 例中 22 例については両心室同期ペーシング療法の術前検査等に際して、冠静脈洞および上行大動脈の血清 TNC 濃度の測定も行い両者の差 (trans-cardiac gradient: TNC-G) を検討した。

2. DCM 患者の各種臨床指標の観察項目として原則的に特定疾患特発性拡張型心筋症調査票に記載された項目を検討した。今回、TNC 測定時の状況を反映させる目的で臨床検査施行日等を検討し、パラメータとして、年齢 (AGE)、性別 (SEX)、血中 BNP 濃度 (BNP: pg/ml)、血中高感度 CRP 濃度 (hsCRP: ng/ml)、収縮期血圧 (SBP: mmHg)、拡張期血圧 (DBP: mmHg)、心拍数 (HR: /min)、NYHA 心機能分類 (NYHA)、心胸郭比 (CTR: %)、左室拡張終期径 (LVDd: mm)、左室収縮終期径 (LVDs: mm)、心エコー検査における左室内径短縮率 (FS: %)、左室駆出率 (EF: %)、左室流入血流速減速時間 (DCT: msec) を採用した (表 1)。

3. 上記の結果につきを集計と統計解析を行った。

(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

1. 要約統計量

各パラメータの要約統計量を表 1 に示す。

2. テネイシン C と各パラメータとの相関分析 (表 2)

有意水準を両側 5% としたとき相関係数の有意性検定 (無相関の検定) で、テネイシン C との関係が有意であったパラメータは以下であった。

(* DBP と FS は負の相関関係)

DBP ($r = -0.48905$, $p = 0.0004$ ***)

NYHA ($r = 0.47102$, $p = 0.0007$ ***)

hsCRP ($r = 0.45896$, $p = 0.0010$ **)

BNP ($r = 0.46254$, $p = 0.0012$ **)

FS ($r = -0.34256$, $p = 0.0172$ *)

性別 ($r = 0.33775$, $p = 0.0189$ *)

CTR ($r = 0.35822$, $p = 0.0407$ *)

TNC と性別、BNP、NYHA、FS、EF、DT との散布図および回帰直線を図 1 に示す。

3. テネイシン C の有意差検定

各パラメータの値をソートし、N がだいたい同じになるように low 群と high 群の 2 群に分けて群間比較 (t 検定) を行った。(*性別は M 群と F 群、NYHA は 1 & 2 群と 3 & 4 群)。有意な差が認められたのは NYHA ($p = 0.0025$)、性別 ($p = 0.0189$)、BNP ($p = 0.0437$) の 3 項目であった。性別、BNP、NYHA、FS、EF、DT の Mean $\pm$ S.D. のグラフを図 2 に示す。

4. TNC-G と各パラメータとの相関分析

TNC-G については、正の値 (増加)、負の値 (減少) の両者が認められた。また、有意水準を両側 5% としたとき相関係数の有意性検定 (無相関の検定) で、TNC-G との関係が有意であったパラメータは BNP のみであった (図表呈示なし)。

考察

1. 末梢血 TNC レベルに男女差が認められたが、その理由については不明である。

2. 末梢血 TNC レベルは NYHA、BNP、CTR と正相関を示したことより心不全の重症度を反映する可能性がある。

3. 末梢血 TNC レベルは FS と負相関、EF、DCT と負相関傾向を示したことより、左室機能低下を反

映する可能性がある。

4. TNC-G については、正の値（増加）や負の値（減少）の両者が認められ、その意義については今後の検討課題である。DCM 患者における末梢血 TNC レベルの上昇が、全て心筋における TNC 産生増加によるものではない可能性を示唆すると考えられる。末梢血 TNC レベルの上昇が心不全時の全身状態を反映している可能性があり、心臓以外の臓器、組織における TNC の産生を検討する必要がある。

5. 上記 2. および 3. に関しては Aso らも同様の結果を報告している（文献 1）。

文献

1. Aso N, Tamura A, Nasu M. Circulating tenascin-c levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2004; 94: 1468-1470

結論

特発性拡張型心筋症患者において、末梢血テネイシン C レベルは心不全の重症度および左室機能低下を反映する可能性がある。

表 1

変数	N	平均値	標準偏差	標準誤差	最小値	中央値	最大値
TNC	48	71.469	26.542	3.831	31.80	66.45	150.00
AGE	48	61.417	14.122	2.038	22.00	65.00	88.00
SEX(M:1, F:2)	48	1.250	0.438	0.063	1.00	1.00	2.00
BNP	46	254.046	539.220	79.504	2.00	78.80	2840.00
hsCRP	48	3086.040	11672.860	1684.830	67.00	693.50	80900.00
SBP	48	120.188	15.320	2.211	86.00	120.00	150.00
DBP	48	70.729	9.819	1.417	52.00	70.00	92.00
HR	48	74.625	11.010	1.589	60.00	72.00	107.00
NYHA	48	2.396	0.984	0.142	1.00	2.00	4.00
CTR	33	55.848	8.348	1.453	40.00	55.00	74.00
LVDd	48	60.854	8.427	1.216	46.00	60.00	77.00
LVDs	48	47.458	10.567	1.525	25.00	47.00	71.00
FS	48	22.708	8.863	1.279	4.00	21.00	48.00
EF(UCG)	48	43.625	13.473	1.945	23.00	41.50	79.00
DT	42	204.643	79.704	12.299	80.00	192.50	480.00

表 2

	TNC	AGE	SEX	BNP	hsCRP	SBP	DBP	HR
TNC	1.00000	-0.00628	0.33775	0.46254	0.45896	-0.06359	-0.48905	0.11165
		0.9662	0.0189	0.0012	0.0010	0.6677	0.0004	0.4500
	48	48	48	46	48	48	48	48

	NYHA	CTR	LVDd	LVDs	FS	EF(UCG)	DT
TNC	0.47102	0.35822	0.04513	0.21735	-0.34256	-0.25946	-0.25916
	0.0007	0.0407	0.7607	0.1378	0.0172	0.0749	0.0975
	48	33	48	48	48	48	42

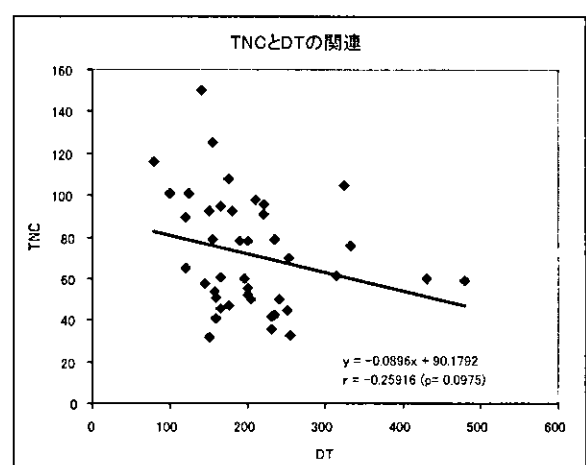
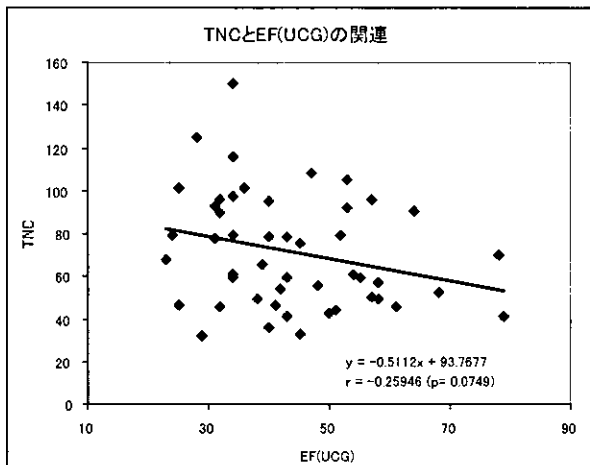
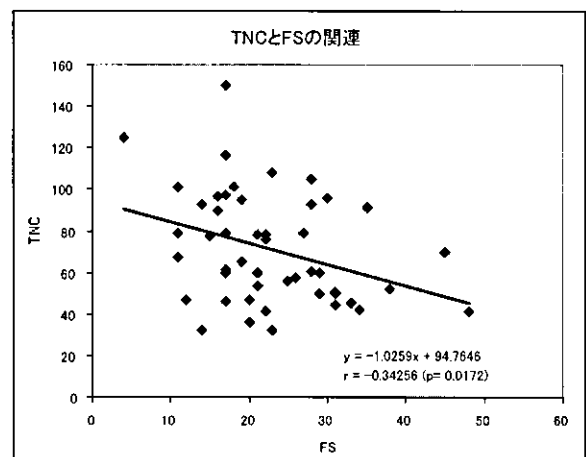
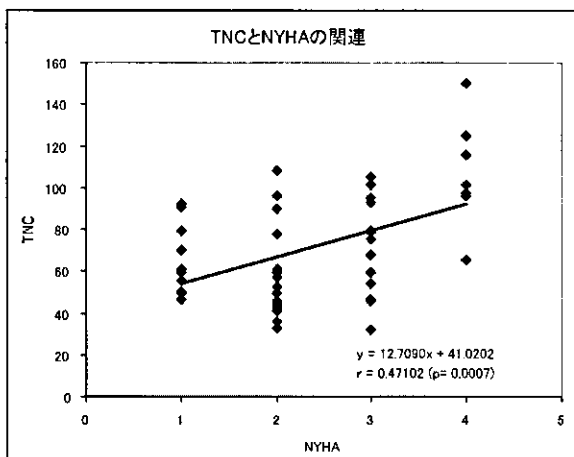
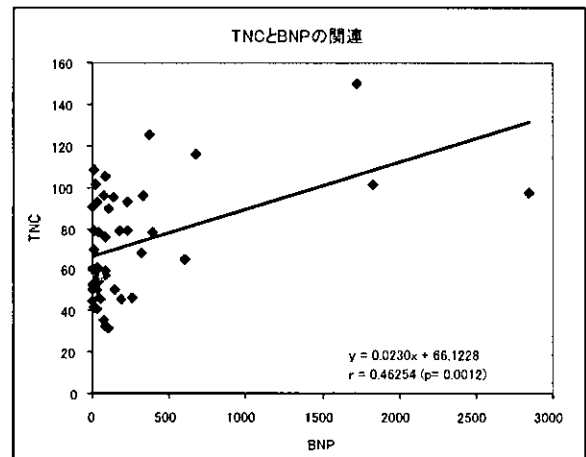
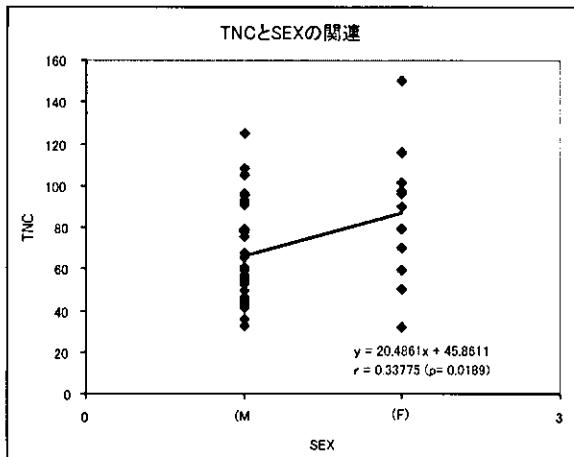
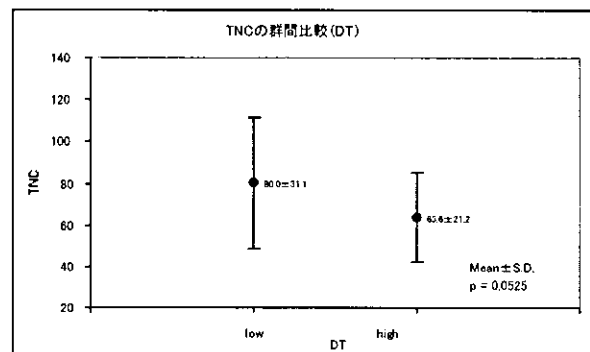
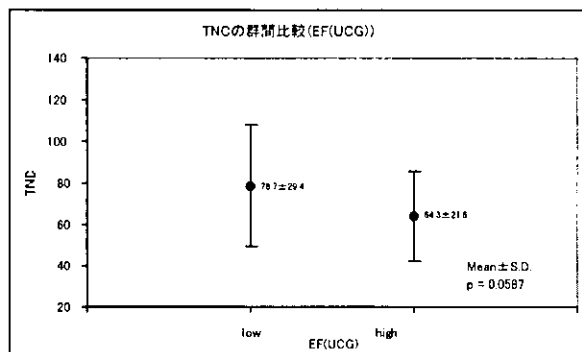
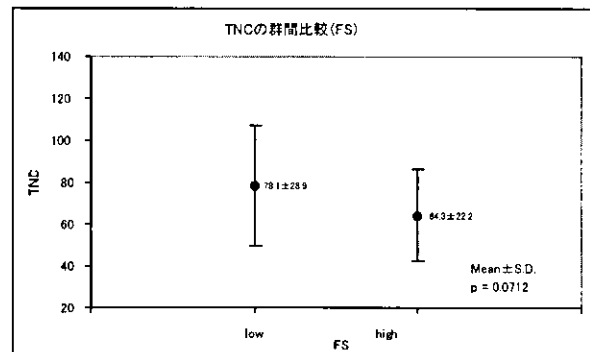
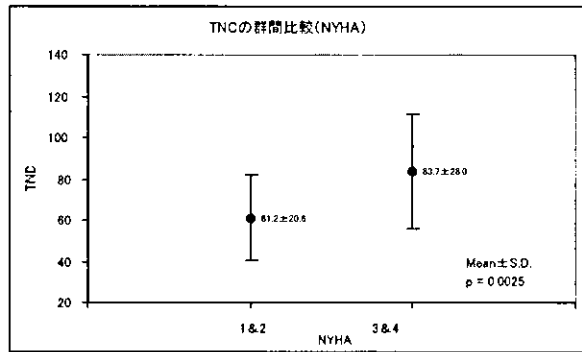
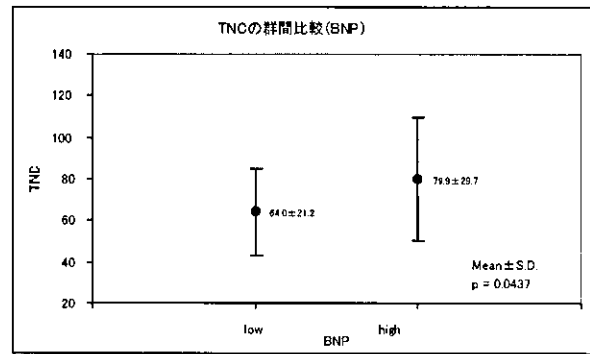
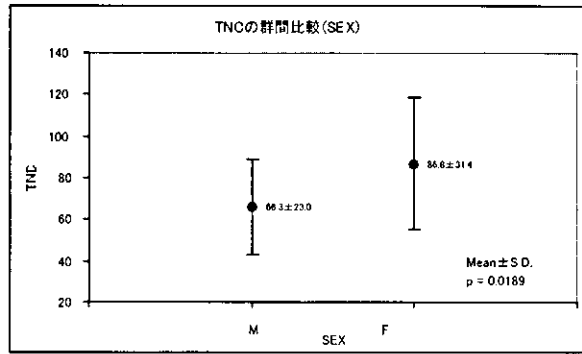


図 1



拡張型心筋症における Peroxisome proliferator-activated Receptor (PPAR) γ および PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) の発現

川名 正敏

東京女子医科大学附属青山病院

研究要旨

目的：PPAR は糖代謝、脂質代謝に関与する転写因子のひとつであり、脂肪組織・骨格筋とともに心筋での発現を認める。一方 PPAR の co-activator である PGC-1 は、心筋においてエネルギー需要に応じてミトコンドリアの数や機能の制御因子として重要な役割を果たしていることが知られている。しかしこれらの心筋における病理学的検討は少ない。今回我々は重症左心不全を伴う拡張型心筋症 (DCM) の左室心筋における、PPAR および PGC-1 の発現について検討し、また PPAR γ については、その活性化を確認し、さらに代償性心不全での PPAR γ の発現につき、免疫組織学的検討を行った。方法と対象：左室補助装置 (LVAD) 装着 (n=11) および心移植 (n=1) を必要とした 12 例の重症 DCM 患者の心筋組織を術中に採取し、PPAR および PGC-1 の発現について半定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。また PPAR γ については免疫組織学的検討を併せ行った。このうち 2 例では術後 9 ヶ月、および 12 ヶ月の LVAD 装着後死亡時の心筋組織を採取した。また経皮的心筋生検で DCM と診断した症例 16 例でも同様の検討を行った。コントロールとして 6 例の正常検体で同様の検討を行った。結果：RT-PCR 法により全ての非代償性心不全 DCM 患者において PGC-1 の発現とともに PPAR α 、 γ の発現が認められた。一方 PPAR γ の発現はコントロールではほとんど認めなかった。また、LVAD による減負荷後の心筋においては PPAR および PGC-1 の発現は著明に低下していた。PPAR γ の免疫組織学所見では多数の変性心筋細胞の核において陽性所見を得た。免疫染色では、非代償性心不全例 12 例、代償性心不全 16 例、およびコントロール 6 例の免疫染色による PPAR γ 陽性細胞数は 3 群間で有意な差を認めた。結論：PPAR および PGC-1 は DCM 患者の不全心筋において発現し、LVAD による減負荷後には PPAR γ 発現が低下した。DCM 患者における心不全でのエネルギー代謝の変化には PPAR γ による制御が関与している可能性が示唆された。

研究目的

拡張型心筋症 (DCM) は薬物抵抗性心不全を呈する予後不良の進行性の疾患であり、重症心不全症例では左室補助装置 (LVAD) 植え込みや、心移植などの外科的治療を要する。重症心不全の不全心筋ではエネルギー代謝の変化がみられ、脂肪酸代謝から糖代謝へのシフトや、エネルギー需要に応じてミトコンドリア数が増えるなどの変化を認める。また心不全に伴い変化する様々なサイトカインが病態形成に関与すると考えられている。

PPAR は、ペルオキシソーム増殖剤をはじめとする様々な内因性・外因性リガンドによって活性化され、標的遺伝子を転写レベルで制御する核内受容体スーパーファミリーの一群である。PPAR α 、 γ の 2 つのアイソフォームについては、脂肪細胞、骨格筋細胞で、エネルギー代謝に重要な役割を持っていることが解明されている。これら PPAR はと

もに心臓での発現が認められ、特に PPAR α はミトコンドリアにおける脂肪酸酸化系の諸酵素の遺伝子発現を調節し、脂肪酸代謝の鍵となっており、肥満心などの負荷心では PPAR α の発現が低下している。

PPAR γ は、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が PPAR γ の強力な合成リガンドであり、骨格筋でのエネルギー代謝に重要な役割を果たしている。心臓においては、*in vitro* の実験で、チアゾリジン誘導体によりアンジオテンシンを介した心肥大を抑制することや、また心肥大に伴う TNF α を代表とする炎症性サイトカインの制御に関与していることが示されている。

PGC-1 は PPAR γ の co-activator として褐色脂肪細胞 (BAT)、心臓、腎臓、脳に発現するが、組織特異性および生理学的状況に応じて発現が制御されている。心臓ではラットで短時間の絶食によって PGC-1 の発現が誘導される。PGC-1 は

PPAR α と協調してミトコンドリア FAO に含まれる PPAR α の標的遺伝子を誘導することがわかっており、PPAR α 、 γ 両者の co-activator であるが、その他各種受容体の活性化補助因子として、注目を浴びている。

心臓においては PGC-1 が心不全の合併症である悪液質に伴って上昇する TNF α などの炎症性サイトカインによって活性化されることも報告されており、PGC-1 活性を抑えることが悪液質を改善する可能性が示唆されている。

またネズミの心筋において PGC-1 の over-expression はミトコンドリアの過剰増殖を招き、DCM 化することも報告されている。また PGC-1 が筋肉での GLUT-4 の遺伝子発現を制御してその結果グルコースの取り込みを増加させていることもなども報告をされており、これらは脂肪酸代謝から糖代謝へのシフトとの関連も予測させる。

このように、新たな役割が次々と解明されつつある PPAR、PGC-1 は心筋でのエネルギー代謝に重要な役割を果たしていることが予測されるが、ヒト不全心筋での発現については詳しい検討はなされておらず、この study では、非代償性心不全患者のヒト心筋細胞に、PPAR と PGC-1 が発現すること、また LVAD 装着によって、減負荷された症例で、これらの発現が低下したこと、代償性心不全患者でも PPAR γ 発現するが、非代償性心不全例と比較すると有意差を持って低いことを示し、その意義について考察をした。

研究方法

1. 対象患者

我々は LVAD 装着もしくは心移植を要した、非代償性拡張型心筋症の患者 12 名の心筋組織検体を LVAD 装着時、または心移植時に採取した。またこのうち 2 名では、LVAD 装着後 9 ヶ月、12 ヶ月で、心エコー上左室径、EF が改善し、心筋負荷は軽減されたと考えられるが、心不全以外の原因（脳出血、多臓器不全）で、死亡した剖検時にも心筋を採取した。

患者の平均年齢は 35.5 歳で、男性 9 名、女性 3 名であった。入院時の NYHA は III 度もしくは IV 度であった。代償性心不全症例 16 名の心筋生検組織検体も採取した。またコントロールとして、6 名の心筋組織検体を用いた。

2. 半定量的 RT-PCR 法

12 例の手術時検体、および 2 例の LVAD による減負荷が得られた症例の剖検、またコント

ロール 6 例の左室心筋を採取し、総 RNA は RNAzol (TelTest, Friendswood, Tex) を用いて、single-step guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法で、分離した。心筋細胞における PPAR α 、PPAR γ 、PGC-1 の発現を検討するため、半定量的 RT-PCR 法を行った。RNA は逆転写酵素 (Superscript, Gibco-BRL, Gaithersburg, Md) により 37℃ の standard buffer にて 1 時間 cDNA へ逆転写した。PCR は Raedy To Go PCR beading (Pharmacia Biotech) を用いて行った。

3. Trans AM PPAR γ transcription factor assay

非代償性心不全患者については、Trans AM Kit を用いて、核内転写因子として PPAR 認識配列に結合する、組織中 PPAR γ の定量を行った。

4. 組織学的検査および免疫組織学的検査

12 例の手術時検体、および 2 例の LVAD による減負荷が得られた症例の剖検時、心筋生検施行症例 16 例、またコントロール 6 例の心筋について、PPAR γ の核内局在は PPAR γ 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), LSAB kit (Dako Japan Co Ltd.) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は対象患者より書面にて informed consent を得ておこなった。

研究結果

1. PPAR α 、PPAR γ 及び PGC-1 の発現

非代償性心不全検体 12 例では、PPAR α 、PPAR γ 、PGC-1 の発現を認めた。しかし、コントロール症例では PPAR α 、PPAR γ 、PGC-1 の発現は認められなかった。

また、LVAD 装着から 12 ヶ月後、および 9 ヶ月後の減負荷時に、左室が可能であった症例では、LVAD 前後で、PPAR α 、PPAR γ 、PGC-1 の発現が著明に低下していることがわかった。

2. Elisa-based DNA binding activity of PPAR γ

非代償性心不全症例 12 例について検討を行った。Trans AM kit を用い、PPAR 認識配列に結合する PPAR γ の活性化を検討した結果、非代償性心不全期では、高い活性を認め、LVAD 植え込み時と比較して、コントロールでは活性化が低かった。(P<0.05) LVAD 離脱時は、活性化は低値となっているが、対象数が少ないこともあり、植え込み時との有意差は出なかった。

3. 免疫染色法による PPAR γ の発現

非代償性心不全の心筋の変性心筋細胞の核内に、PPAR γ が染色されるが、LVAD 離脱可能な状態の心筋細胞には PPAR γ の発現は認めなかった。コントロールの左室では、間質のマクロファージに一部発現を認めるが、心筋細胞には PPAR γ の発現は認めなかった。心筋生検症例でも肥大心筋細胞に PPAR γ の発現を認めたが、重症例と比較すると PPAR γ 陽性細胞数は低下した。結果をまとめると、非代償性心不全例 12 例、代償性心不全 16 例、およびコントロール 6 例の免疫染色による PPAR γ 陽性細胞数は 3 群間で有意な差を認めた。

考察

今回の study で我々はヒト不全心筋で、PPAR α 、PPAR γ 、PGC-1 の発現が亢進していることを提示した。また左室の減負荷が可能であった 2 症例では、これらの発現が低下することを提示した。

PPAR γ はチアゾリジン誘導体 (TZD) を外因リガンドとし、骨格筋においては、糖代謝を制御することがわかっており、我々は不全心において、脂肪酸代謝から糖代謝へのエネルギーシフト (胎児化) が起きることがわかっていることから、心筋でも骨格筋と同様に、糖の取り込み増加のために PPAR γ の発現が亢進する可能性を考えた。また PPAR γ は抗炎症作用のあることが知られており、負荷心での代償機構として発現が亢進し、病態形成に関与している可能性も考えられる。リガンド薬の TZD が肥満において TNF α の発現を低下させることが知られ、また心筋でも動物実験で LPS-induced TNF α 、NF κ β の発現を低下させていることや、心肥大を抑制することがわかってきている。よって、PPAR γ の発現亢進は不全心筋での

抗炎症作用、抗サイトカイン作用の意義をもつことも想定される。

DCM の患者で PGC-1 の発現が亢進していることについては、心不全に伴って上昇する炎症性サイトカインによって誘導された結果 PPAR などと協調してエネルギー代謝変換に関わる可能性が示唆される。

しかし、PGC-1 は PPAR のみならず、NRF、UCP との協調発現をするため、今後も追実験が必要である。

我々の実験では初めてヒトの心筋検体を使い、負荷心で PPAR γ および PGC-1 の発現が亢進し、また減負荷の状態ではこれらの発現が低下することが示された。また非代償性心不全症例については、代償性心不全例と比較すると発現は少ないが、PPAR γ の発現を認めた。これは心不全の病態において内因性に PPAR や PGC-1 の発現が亢進し、病態を形成していることを示している。

今後、PPAR や PGC-1 が心不全の状態を評価する分子マーカーとなりうるかは注目すべき点と思われる。

また臨床的に PPAR 外因性リガンドは不全心において心筋エネルギー代謝に影響を及ぼす可能性があり、また抗炎症作用も期待できる可能性がある。PGC-1 阻害薬も病態の進行を抑制する可能性があり、検討していく項目と考えられる。

結論

PPAR および PGC-1 は DCM 患者の不全心筋において発現し、LVAD による減負荷後には PPAR γ 発現が低下した。DCM 患者における心不全でのエネルギー代謝の変化には PPAR γ による制御が関与している可能性が示唆された。

研究発表

学会発表

Annual Scientific Meeting of American Heart Association, 2004

拡張型心筋症の新規原因遺伝子の同定：FHL2 遺伝子の解析

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 FHL2 遺伝子変異を検索した。FHL2 は代謝酵素を結合し、これをサルコメアに局在させる機能があるとされているが、変異検索の結果、家族性拡張型心筋症症例に一般健常者集団には認められないミスセンス変異を見出した。この変異は FHL2 遺伝子の進化上保存されたアミノ酸の置換を伴うものであり、タイチン N2B 領域との結合性を減弱させるものであった。一方、タイチン N2B 領域変異のうち、肥大型心筋症家系に見出されたミスセンス変異は FHL2 との結合性を増強し、拡張型心筋症例に見出された終止変異は FHL2 との結合性を減弱させた。以上のことは、FHL2 遺伝子が新たな拡張型心筋症原因遺伝子であること、特発性心筋症の一部はサルコメアへの代謝酵素分布異常に起因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、最近のトピックスとして、T タイチン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、タイチン Z 帯領域変異は Z 帯構成要素間の結合性変化によって心筋ストレッチ反応異常をもたらすことが我々の研究で明らかとなっている。しかしながら肥大型心筋症、拡張型心筋症のいずれにも認められるタイチン N2B 領域変異では、いかなる機能変化が生じるかが明らかではない。一方、最近タイチン N2B 領域に FHL2 タンパクが結合すること、FHL2 はアデニールシクラーゼ、フォスフォフルクトキナーゼ、クレアチニンキナーゼなどの代謝系酵素を結合することが報告された。そこで、タイチン N2B 領域変異によって FHL2 との結合性がいかに変化するかを検討した。また、特発性心筋症患者集団における FHL2 遺伝子変異を検索し、その機能解析を行った。以上の検討から、特発性心筋症の新たな病態形成機構を解明することを目的とした。

研究方法

1) 特発性心筋症患者集団における FHL2 遺伝子変異およびタイチン is2 領域変異の検索：既知の原因遺伝子に変異が認められない家族性肥大型心筋症患者 96 名、家族性拡張型心筋症患者 34 名、孤発性拡張型心筋症患者 96 名を対象として、FHL2 遺伝子の全コーディング領域およびタイチン is2 領域の変異を SSCP 法によってスクリーニングした。異

常 SSCP パターンを認めた症例については、シーケンシングによって変異を確認した。

2) FHL2 変異による細胞内分布変化：正常および変異 FHL2 を EGFP に結合し、ラット心筋初代培養細胞、C2C12 細胞株、RD21 細胞株に導入し、共焦点レーザー顕微鏡下で GFP シグナルの細胞内分布を観察した。

3) タイチン N2B 領域と FHL2 との結合性解析：酵母 2 ハイブリッド法を用いて、タイチン N2B 領域変異（肥大型心筋症変異 Ser3799Tyr および拡張型心筋症変異 Gln4053ter）、タイチン is2 領域変異（Arg25572Gln）、FHL2 変異（拡張型心筋症変異 Gly48Ser）存在下に、タイチンと FHL2 間の結合性がどのように変化するかを β ガラクトシダーゼ比活性の変化として検討した。

（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、いずれも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を受けて実施している。（拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（平成 16 年 8 月 25 日承認）；肥大型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（平成 16 年 8 月 25 日承認）；高血圧性心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（平成 16 年 8 月 25 日承認）；難治性不整脈の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（平成 16 年 8 月 25 日承認））

研究結果

1) 特発性心筋症患者集団における FHL2 遺伝子変異およびタイチン is2 領域変異の検索：家族性拡張型心筋症患者 34 名、孤発性拡張型心筋症患者 96 名を対象として、FHL2 遺伝子の全コーディング領域およびタイチン is2 領域の変異を SSCP 法によってスクリーニングした。異

張型心筋症患者 1 名に FHL2 遺伝子に Gly48Ser 変異を認めた。この変異は FHL2 遺伝子の進化上保存されたアミノ酸の置換を伴うものであり、健常者集団には認められない変異であった。一方、別の家族性拡張型心筋症患者 1 名にタイチン is2 領域に Arg25572Gln 変異を認めた。この変異も健常者集団には認められない変異であった。

2) FHL2 変異による細胞内分布変化: EGFP 標識した正常 FHL2 および変異 FHL2 を筋芽細胞系培養細胞株 (C2C12, RD21) に導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、FHL2 は focal contact 部に一致して分布し、正常、変異とも大きな違いは認められなかった。一方、ラット心筋初代培養細胞に導入した場合は、EGFP 標識は心筋サルコメアに一致して分布したが、変異 FHL2 のシグナル強度は、正常 FHL2 に比較してやや減弱していた。

3) タイチン N2B 領域と FHL2 との結合性解析: タイチン N2B 領域と FHL2 との結合性を酵母 2 ハイブリッド法によって検討した。タイチン N2B 領域変異のうち、肥大型心筋症変異 (Ser3799Tyr) は FHL2 との結合性を約 26% 増強した。一方、拡張型心筋症変異 (Gkn4053ter) では FHL2 結合性が約 32% 減弱した。これに対して、FHL2 変異ではタイチン結合性が約 55% 減弱した。一方、タイチン is2 領域と FHL2 間には有意な結合性が検出されなかったため、Arg25572Gln 変異による機能変化は不明であった。

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 FHL2 変異が拡張型心筋症の原因となることを解明した。FHL2 は心筋に強く発現し、インテグリンと結合し focal contact 部に分布すること、p53 に結合し転写の補因子となること、サルコメアに代謝系酵素をリクルートするなどの多彩な機能を有することが知られている。本研究で見出した拡張型心筋症特異的な変異は、focal contact 部への分布には大きな相違をもたらさなかったが、サルコメアへの分布強度がやや低下することが示された。また、酵母 2 ハイブリッド法を用いることで、FHL2 変異によってタイチン結合性が著しく減弱することが示された。一方、タイチン N2B 領域変異では、拡張型心筋症特異的な変異では FHL2 結合性が減弱し、肥大型心筋症特異的な変異ではこれが増強することが明らかとなった。これらのことは、タイチン N2B 領域変異、FHL2 変異のいずれかが生じることでタイチンと FHL2 間の結合性異常が生じ、結果として代謝系酵素のサルコメア分布に異常をもたらすものと考えられた。また、is2 領域変異も検出されたが、我々の用いた酵母 2 ハイブリッド法ではタイチン is2 領域と FHL2 との間に有意な結合性が認められなかったため、この変異による機能変化は不明であった。今後 2 ハイブリッドで用いるベクター系を変更することで、機能変化を検討する予定である。

結論

FHL2 は新たな拡張型心筋症原因遺伝子である。特発性心筋症の一部はサルコメアへの代謝系酵素分布異常に起因する。

研究発表

論文発表

1. Arimura T, Hayashi T, Terada H, Lee SY, Zhou Q, Takahashi M, Ueda K, Nouchi T, Hohda S, Sibutani M, Hirose M, Chen J, 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.* 2004; 279: 6746-6752.
2. Komamura K, Iwai N, Kokame K, Yasumura Y, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, Kimura A, Tomoike H, Kitakaze M, Miyatake K: The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *J. Hum. Genet.* 2004; 49: 129-133.
3. Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesata Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A: Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 27194-27198.
4. Aizawa Y, Ueda K, Wu LM, Inagaki N, Hayashi T, Takahashi M, Ohta M, Kawano

- S, Hirano Y, Yasunami M, Aizawa Y, Kimura A, Hiraoka M: Truncated KCNQ1 mutant, A178fs/105, forms hetero-multimer channel with wild-type causing a dominant-negative suppression due to trafficking. FEBS Lett. 2004; 574: 145-150.
5. Sasano T, Ueda K, Orikabe M, Hirano Y, Kawano S, Yasunami M, Isobe M, Kimura A, Hiraoka M: Novel C-terminus frameshift mutation, 1122fs/147, of HERG in LQT2: additional amino acids generated by frameshift cause accelerated inactivation. J. Mol. Cell. Cardiol. 2004; 37: 1205-1211.
 6. Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki, N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Cho BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knoll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A: TCAP mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J. Am. Col. Cardiol. 2004; 44: 2192-2201.

学会発表

1. Kazuo Ueda, Yuji Hirano, Seiko Kawano, Akinori Kimura: HERG potassium channel regulated by phosphotyrosine kinase, The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2004
2. Kazuo Ueda, Long-Mei Wu, Hiroki Shibata, Natsuko Inagaki, Takeharu Hayashi, Yuji Matsumoto, Noritsugu Nakano, Megumi Takahashi, Masaaki Ohta, Yuji Hirano, Seiko Kawano, Akinori Kimura, Yoshifusa Aizawa, Masayasu Hiraoka: KCNQ1 Mutation Causing Defective Channel Trafficking and Dominant-Negative Suppression Underlie Severe Phenotype of Congenital Long QT Syndrome, The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2004
3. Takuro Arimura, Takeharu Hayashi, Motoji Sawabe, Kohji Chiba, Kennichi Nakahara, Michio Yasunami, Akinori Kimura: Heart-specific growth factor-like gene may be involved in the development of hypertensive heart disease, The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2004
4. Takuro Arimura, Nanatsu Itoh, Kazuo Ueda, Shigeru Hohda, Megumi Takahashi, Natsuko Inagaki, Michio Yasunami, Yoshinori Koga, Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Jeong Euy Park, Ralph Knöll, Masahiko Hoshijima, Kenneth R Chien, Akinori Kimura: Functional alterations of TCAP mutations found in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy, The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2004
5. Kazuo Ueda, Satoru Komura, Takashi Washizuka, Masaomi Chinushi, Yuji Matsumoto, Takeharu Hayashi, Natsuko Inagaki, Megumi Takahashi, Long-Mei Wu, Noritsugu Nakano, Michio Yasunami, Akinori Kimura, Masayasu Hiraoka, Yoshifusa Aizawa: A Novel Missense Mutation (R2401H) in the Human Cardiac Ryanodine Receptor Gene (RyR2) in Patient with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia, The 68th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, March, 2004
6. 木村彰方：心筋症の遺伝子診断はここまで進歩した．第52回日本心臓病学会学術集会，京都，平成16年9月
7. 志知大輔，吉川枝里，太田正穂，勝山善彦，日野原邦彦，高橋めぐみ，安波道郎，木村彰方，松森昭，成瀬妙子，猪子英俊：C型肝炎ウィルスに起因した心筋症の疾患感受性遺伝子探索．第13回日本組織適合性学会大会，大阪，平成16年9月
8. 中野記嗣，有村卓朗，林丈晴，柴田宏樹，堀久枝，安部美奈子，沢辺元司，千田宏司，中原賢一，安波道郎，木村彰方：多因子遺伝（1）．候補遺伝子アプローチによる高血圧性心筋症

の関連遺伝子検索．日本人類遺伝学会第 49 回大会，東アジア人類遺伝学会連合第 4 回大会，東京，平成 16 年 10 月

9. 木村彰方，松本雄二，林丈晴，中村剛之，柴田宏樹，広井知歳，笹岡大史，有村卓朗，今泉徹，Gisele Bonne, Ketty Schwartz, 安波道郎：循環器及び血管性疾患，拡張型心筋症における FHL2 変異の解析．日本人類遺伝学会第 49 回大会，東アジア人類遺伝学会連合第 4 回大会，東京，平成 16 年 10 月
10. 上田和雄，林丈晴，稲垣夏子，高橋めぐみ，相澤義泰，平岡昌和，木村彰方：循環器及び欠陥性疾患．不整脈に関連する HCN4 チャネル輸送障害型遺伝子変異の機能変化．日本人類遺伝学会第 49 回大会，東アジア人類遺伝学会連合第 4 回大会，東京，平成 16 年 10 月
11. 相澤義泰，上田和雄，稲垣夏子，林丈晴，柴田宏樹，高橋めぐみ，中野記嗣，安波道郎，木村彰方，平岡昌和：循環器及び欠陥性疾患．A novel mechanism of defective trafficking and dominant-negative suppression of KCNQ1 channel found in long QT syndrome. 日本人類遺伝学会第 49 回大会，東アジア人類遺伝学会連合第 4 回大会，東京，平成 16 年 10 月
12. Abe M, Hori H, Nakano N, Sawabe M, Kimura A: Characterization for monoclonal antibodies against a heart specific fusion screened from Dahl salt-sensitive rat, DSS-10. 第 78 回日本生化学会大会，横浜，平成 16 年 10 月

慢性透析患者の心筋障害に対する ARB・ACE 阻害剤の効果

島田 俊夫

島根大学医学部附属病院循環器内科

研究要旨

慢性透析患者の心筋障害に対し、ACEI 及び AT1 受容体拮抗薬が有効か否かを検討した。透析患者 99 名中血清 cTnT 濃度陽性で ACEI 及び ARB を内服していない患者を無作為に 3 群 (ARB 群, ACEI 群, 非投与群) に割付し, 1 年間の経過で血清 cTnT の変化を検討した。血清 cTnT 濃度は ACEI 群で低値を示した。1 年の経過で血圧は 3 群とも変化はなかった。血漿 ANP は非投与群でのみ低下傾向を示し, Dry weight の減少との関連を示唆した。血漿 BNP は ACEI 群でのみ有意に低下した。hsCRP は ACEI 群で低下傾向, ARB 群で増加傾向を認めた。血清 cTnT 濃度は 3 群とも有意な変化を認めなかった。ACEI 群, ARB 群で PRA は増加し, Aldosterone は低下した。透析患者において ARB, ACE 阻害剤は心筋障害を改善しなかったが, ACE 阻害剤は炎症を改善し, 心負荷を軽減する可能性が示唆され, 投与量を増量してさらに検討する必要がある。一方, ARB 群では炎症の増悪を認め, 透析患者における AT1 receptor blocker の有効性についてはさらに検討が必要である。

研究目的

慢性透析患者において, 血清心筋トロポニン T (cTnT) 及び血漿 BNP 濃度は強力な予後規定因子である事が報告されている。我々は, 透析患者において cTnT は約半数において陽性であり, その規定因子として心肥大・炎症・高リン血症・HCV 持続感染が関与することを報告した。透析患者におけるレニン-アンジオテンシン系のコントロールが, 心筋障害を軽減し予後を改善するか否かを明らかにすることは重要である。本研究の目的は, 慢性透析患者の心筋障害に対し, ACEI 及び AT1 受容体拮抗薬が有効か否かを検討することである。

研究方法

対象は慢性腎不全患者 99 名中透析前血清 cTnT 濃度が 0.01ng/ml 以上の患者 58 名のうち ACEI 及び ARB を内服していない患者 54 名。患者を無作為に 3 群 (ARB 群 17 名, ACEI 群 20 名, 非投与群 17 名) に割付し, 1 年間の経過で血清 cTnT の変化を検討した。ARB 群はカンデサルタンを 1mg より最高 8mg まで, ACEI 群は塩酸デモカプリル 0.5mg より最高 4mg まで血圧が許容する範囲で増量した。観察期間中は他の降圧剤の追加や増量は行わなかった。薬剤の副作用 (咳, 低血圧), 転院, 死亡等による脱落例を除き, 最終的に ARB 群 11 名, ACEI 群 11 名, 非投与群 14 名について検討した。

検討項目は透析前の血漿 ANP, BNP 濃度, 血清

cTnT 濃度, 高感度 CRP, 血漿レニン活性 (PRA), アルドステロン (ALD), 平均血圧, Dry Weight である。

研究結果

3 群間で Dry Weight, 血圧, 血漿 ANP, BNP 濃度, hsCRP, PRA, Aldosterone, K に差はなかった。血清 cTnT 濃度は, 非投与群 0.116 ± 0.075 , ARB 群 0.077 ± 0.046 , ACEI 群 0.045 ± 0.022 ng/ml と ACEI 群で低値を示した ($p=0.06$)。平均投与量はカンデサルタン 4.5mg/日, 塩酸デモカプリル 0.6mg/日。1 年の経過で Dry weight は非投与群で有意に減少したが他群では変化はなかった。血圧は 3 群とも変化はなかった。血漿 ANP は非投与群でのみ低下傾向を示し ($p=0.06$)。Dry weight の減少との関連を示唆した。血漿 BNP は ACEI 群でのみ有意に低下した ($p<0.05$)。hsCRP は ACEI 群で低下傾向, ARB 群で増加傾向を認めた。血清 cTnT 濃度は 3 群とも有意な変化を認めなかった。PRA は ACEI 群, ARB 群では増加し, Aldosterone は低下したが, 非投与群では変化を認めなかった。

考察

透析患者において ARB, ACE 阻害剤は心筋障害を改善しなかった。しかし, ACE 阻害剤は炎症を改善し, 心負荷を軽減する可能性が示唆された。心筋障害の軽減効果については投与量を考慮しさらに

検討する必要がある。一方、ARB 群は ACE 阻害剤群より心筋障害が強い群であったために心負荷軽減が得られなかった可能性がある。しかし CRP の上昇を認めたことは AT2 receptor を介した炎症増悪作用が関与した可能性もあり、透析患者における AT1 receptor blocker の有効性についてはさらに検討が必要である。

結論

今回の検討では透析患者において ARB、ACE 阻害剤は心筋障害を改善しなかった。

ミトコンドリア DNA の病的変異と多型の鑑別

田中 雅嗣

東京都老人総合研究所

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疾患の直接的病因となる変異とを鑑別することが重要な作業である。血液細胞あるいは口腔粘膜細胞を 672 例の日本人から同意を得た上で採取し、百寿者、パーキンソン病患者、アルツハイマー病患者、血管病変を伴う糖尿病患者、一般糖尿病患者、若年肥満者、若年非肥満者、計 7 群、各 96 名の mtDNA の全塩基配列を決定し、mtSNP database を構築した。MITOMA に登録されている文献上報告された mtDNA 変異と日本人で観察された mtSNP を比較した。その結果、従来、病態への関与が疑われた変異の中には日本人集団において頻度の低い多型として存在するものが含まれていることが明らかになった。MITOMAP と mtSNP という 2 つのデータベースを比較することによって、mtDNA の病的変異と多型を鑑別することが可能であることが確認された。

研究目的

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疾患の直接的病因となる変異とを鑑別することが重要な作業である。我々は日本人 672 人の mtDNA 全塩基配列の分子進化系統樹を解析し、110 種類の subhaplogroup に分類した (Genome Res 14: 1832-1850, 2004)。また発現制御領域の 150C>T 多型がフィンランドの高齢者と日本の百寿者に共通して頻度が高いことを報告した (Eur J Hum Genet 13: 166-170, 2005)。さらに 3644T>C (ND1:V113A) 多型が双極性障害に関連していることを見いだした (Genomics, in press)。これらの研究を基礎として、ミトコンドリアゲノムにおける多型とミトコンドリア心筋症の病因となる変異を鑑別できるかどうかを検証した。

研究方法

血液細胞あるいは口腔粘膜細胞を 672 例の日本人から同意を得た上で採取し、百寿者、パーキンソン病患者、アルツハイマー病患者、血管病変を伴う糖尿病患者、一般糖尿病患者、若年肥満者、若年非肥満者、計 7 群、各 96 名の mtDNA の全塩基配列を決定し (16,569 塩基対 × 672 例 = 11,134,368 塩基対)、mtSNP database を構築した。MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) に登録されている文献上報告された mtDNA 変異と日本人で観察され

た mtSNP を比較した。
(倫理面への配慮)

データベースに登録された個体の情報は連結不可能匿名化されている。それぞれの個体からインフォームドコンセントを得ており、それぞれの研究施設の倫理委員会の承認を得ている。

研究結果

ミトコンドリア心筋症の病因となる変異として、Maternal Myopathy and Cardiomyopathy (MMC) で報告された変異 (3260G, 3303T) Maternally Inherited Hypertrophic CardioMyopathy (MHCM) の変異 (4295G, 9997C)、Maternally Inherited Cardiomyopathy (MICM) の変異 (4300G, 12192A) などが MITOMAP に登録されているが、これらの変異は mtSNPdb において検出されなかった。MITOMAP において蛋白質コード領域および発現制御領域では 88 サイト 92 パターンの変異が登録されていた。これらの変異のうち 16 ヶ所の変異が mtSNPdb において検出された。それぞれの変異の疾患病態への関与についての科学的根拠の集積状態 (Status) 別に見ると、確認された変異 (confirmed) は 18 のうち 2 ヶ所が mtSNP に登録されていた。両者は Leber 病の病因変異として確認されている。4216T>C (ND1:Y304H) は百寿者では検出されず、アルツハイマー病患者 1 名と血管病変を伴う糖尿病患者 1 名において検出された。14484T>C (ND6:M64V) は血管病変を伴う糖尿病患者 1 名において検出された。MITOMAP に

において暫定的に病的変異 (provisional) とされている変異 64 ヶ所のうち 6 変異が mtSNP に登録されていた。アルツハイマー病とパーキンソン病で報告されている 3397A>G (ND1:M31V) はパーキンソン病患者の 1 例で検出された。4136A>G (ND1:Y277C) は Leber 病への関与が示唆されているが、アルツハイマー病の 1 例で検出された。これらの多型は百寿者では検出されなかったもので、加齢に伴う変性疾患に関与している可能性は否定できない。一方、9804G>A (CO3:A200T), 11696G>A (ND4:V313I), 12026A>G (ND4:I423V) は Leber 病あるいは糖尿病への関与が示唆されていたが、百寿者において検出されたので病的意義はないと判断された。また非翻訳領域の多型 16198T>C は Poulton らにより、拡張型心筋症のリスクファクターであると報告されていたが、百寿者 96 人中 37 例で検出されたので、病態への関与は小さいと推定された。

考察

mtSNP データベースには日本人において見いだ

される多型がほぼ網羅されているので、mtSNP に登録されていない変異が心筋症の患者で検出された場合には、病的変異の可能性を考え、変異 mtDNA が heteroplasmy の状態にあるか、変異 mtDNA の割合が家系内における臨床症状の重症度と関連するかどうかなどの確認作業が必要となる。さらにサイブリッドを用いたミトコンドリア機能の解析が必要である。

結論

従来、病態への関与が疑われた変異の中には日本人集団において頻度の低い多型として存在するものが含まれていることが明らかになった。MITOMAP と mtSNP という 2 つのデータベースを比較することによって、mtDNA の病的変異と多型を鑑別することが可能であることが確認された。

研究発表

論文発表

1. Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo L-J, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K-i, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 14: 1832-1850, 2004
2. Takagi K, Yamada Y, Gong J-S, Sone T, Yokota M, Tanaka M. Association of a 5178C>A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis* 175: 281-286, 2004
3. Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Adachi N, Miyoshi A, Kashimura S, et al. Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis* 26: 91-98, 2004.
4. Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, et al. Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 84: 1041-1050, 2004
5. Guo L-J, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, Sato Y, Ito M, Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion* in press 2004
6. Niemi AK, Moilanen JS, Tanaka M, Hervonen A, Hurme M, Lehtimäki T, Arai Y, Hirose N, Majamaa K. A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects. *Eur J Hum Genet* 13: 166-170, 2005

学会発表

1. Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, Fujita Y. Functional differences among human mitochondrial subhaplogroups. The 2nd Conference of the Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, Taipei, Taiwan Apr 1-2, 2004
2. Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms in Japanese centenarians. The 5th Workshop on Supercentenarians, Tokyo, Japan, Jun 14-15, 2004
3. Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, Fujita Y. Mitochondrial genome polymorphisms associated with longevity, Alzheimer's disease, or Parkinson's disease. The 29th Congress of the Federation of European Biochemical Societies, Warsaw, Poland Jun 26-Jul 1, 2004