

# たこつぼ型心筋障害の病理組織学的検討

河合 祥雄

順天堂大学医学部循環器内科

## 研究要旨

心尖部壁運動低下・無収縮と心基部の過収縮・正常収縮を特徴とするたこつぼ型心筋障害の機序、形態学的な所見は明らかではない。全国諸施設から提供された心筋生検資料を経時的に、剖検例を用い、心室部位（左心室心尖部と心基部付近）による病変の差について検討した。組織学的に単一心筋細胞障害像（好酸性染色性亢進、筋源線維変性、融解）とそれらの集簇像を散在・びまん性、広範囲に認め、経時的には障害、融解、線維性置換の過程を追えた。障害心筋細胞の割合は、心基部に比べ、心尖部心室筋で高率（5.3%：13.5%）であり、心尖部壁運動低下と、心基部に多く見られた筋収縮帯形成（筋源線維変性）は過収縮と関連すると考えられた。

## 研究目的

心尖部運動低下・無収縮と心基部過収縮・正常収縮を特徴とするたこつぼ型心筋障害の病理組織像につき共有されるべき見解は定まっていない。班会議共同研究として、収集された諸施設生検例、剖検例の組織所見を総括する。

## 研究方法

たこつぼ型心筋障害が疑われた15症例の心筋生検および7剖検例の心筋組織所見を検討した。生検例は各種染色を施し、生検日と対比し、検鏡した。剖検例は心尖部、心基部の左心室横切面切片で、前壁、側壁、後壁心室中隔の4部位を強拡大視野で全層を各3回走査し、壁構成心筋細胞に対する障害心筋細胞数の割合を測定した。

（倫理面への配慮）

発表に際し、本人の特定が不可能なように年齢・性のみを個人情報とし、受診機関名も伏した。

## 研究結果

組織学的に単一心筋細胞障害像（好酸性染色性亢

進、筋源線維変性、融解）とそれらの集簇像を散在・びまん性、広範囲に認め、経時的には障害、融解、線維性置換の過程を追えた。障害心筋細胞は、心基部（5.3%）に比べ、心尖部心室筋で高率（13.5%）であった。

## 考察

他の障害と同様に、経時的に心筋細胞は、障害、融解、線維性置換（心室瘤を形成もあり）の治癒過程をとる。左心室心尖部で障害心筋細胞は高率（5.3%：13.5%）であり、心尖部壁運動低下と関連すると考えられた。

病変は単一心筋細胞障害像とそれらの集簇像よりなることから、心外膜主冠状動脈病変、筋層内小動脈病変、微小冠状循環病変の何れによる循環障害は否定的と考えられた。

## 健康危険情報

本病態は一過性であり、多くが可逆的である予後良好な疾患と理解されているが、多数経験施設において、死亡例、心室瘤形成を含む重篤後遺症例が存在した。

## 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: 3630-33, 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 (2): 159-166, 2004.
3. 河合祥雄, 鈴木宏昌, 山田京志: たこつぼ型心筋障害. 浅田祐市郎, 江頭健輔, 甲斐久史, 古森公浩, 佐田政隆, 室原豊明 編集「心臓病ナビゲーター」, メディカルレビュー社, 東京, 2004年, 4月, 270-271.
4. 山田京志, 河合祥雄: たこつぼ心筋症とは. Heart View 8 (6): 588-592, 2004.

5. 河合祥雄：たこつぼ心筋障害（たこつぼ心筋症）の診断の手引き（第2案）作成過程．心臓 36：466-468,2004.
6. 河合祥雄：たこつぼ型心筋障害．臨床麻酔 .28:1345-1349,2004.
7. Murayama M, Yoneda T, Kawai S.: Muscle tension dynamics of isolated frog muscle with application of perpendicular distortion. European Journal of Applied Physiology Vol.93 (4) :489-495,2005.

#### 学会発表

1. Hoshimoto M, Koyama Y, Koike A, Kimura-Kato Y, Maruyama A, Ohashi R, Naya K, Watanabe M, Kawai S, Takayama S: Effects of interactive education program to modify life style of patients with hypertension. The FASEB Journal 18 (5) : AA1296,2004

# 抹消血中テネイシン C 測定による心室リモデリングの予測診断

廣江 道昭

国立国際医療センター腎臓・循環器科

## 研究要旨

細胞外マトリックス蛋白の一つ、テネイシン C は正常心臓では発現しないが、心筋梗塞後急性期に心臓に発現し、組織リモデリングで重要な役割を演ずる。本研究では、心筋梗塞患者血清中のテネイシン C を ELISA 法で測定すると、急性期に上昇し、また、その値が高いものほど、慢性期に心室が拡張し、心機能の回復が悪く、生存率が悪いことが明らかになった。したがって、血中テネイシン C は、心室リモデリングの予測因子として有用である。

## 研究目的

細胞外マトリックスのひとつテネイシン C は、正常な大人の心臓では発現しないが、心筋梗塞後、急性期に一過性に発現し、心筋組織リモデリングを制御する分子の一つと考えられる。一般に、細胞と細胞の間隙に沈着しているが、可溶性分画が存在し、局所でのテネイシン C の発現レベルを反映して血中濃度が上昇すると考えられる。本研究では、心臓リモデリングの予測因子として、血中テネイシン C が有用であるかについて検討した。

## 研究方法

70 例の心筋梗塞患者（男 48 例、女 22 例、平均  $66 \pm 11$  才）の血中テネイシン C を、ELISA 法を用い、入院時、発作後 5, 8, 14, 28 日目に測定し、陳旧性心筋梗塞 10 例（男 8 例、女 2 例、平均  $66 \pm 9$  才）、正常 20 例（男 14 例、女 6 例、平均  $49 \pm 15$  才）と比較した。急性心筋梗塞患者全例に入院時及び発症 6 ヶ月後に、 $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin SPECT 像を撮像し、心機能を評価した。

（倫理面への配慮）

各施設の倫理委員会で承認されたプロコールに従い、インフォームドコンセントに基づき了解を得られた心筋梗塞患者の血清中のテネイシン C 濃度測定した。

## 研究結果

### 急性心筋梗塞患者の血中テネイシン C 濃度

急性心筋梗塞患者の血中テネイシン C 濃度はピーク値  $85.2 \pm 40.2\text{ng/ml}$  と陳旧性心筋梗塞患者 ( $27.4 \pm 11.7\text{ng/ml}$ ,  $p < 0.01$ ) および正常コントロール ( $30.9 \pm 8.8\text{ng/ml}$ ,  $p < 0.01$ ) より有意に高かった。

入院時 ( $58.5 \pm 4.7\text{ng/ml}$ ) すでに上昇がみられ、

5 日目にピーク ( $79.3 \pm 6.6\text{ng/ml}$ ) となり徐々に徐々に低下したが、28 日目では  $51.3 \pm 20.3\text{ng/ml}$  と正常より高値を示した。

### 血中テネイシン C 濃度と臨床像の対比

急性心筋梗塞患者を血中テネイシン C の最高値が  $76.6\text{ng/ml}$  (中央値) 以上の高テネイシン C 群と  $76.6\text{ng/ml}$  未満の低テネイシン C 群の 2 群に分けた。2 群間で年齢、梗塞部位、peak CK-MB、BNP および total defect score に差はみられず、高テネイシン C 群では 28 日目の血中テネイシン C が有意に高かった。

入院時には、拡張終期径、収縮終期径、左室駆出率に差は見られなかったが、高テネイシン C 群では、6 ヶ月後の拡張終期径、収縮終期径がそれぞれ  $108.4 \pm 7.2\text{ml}$  から  $126.2 \pm 7.5\text{ml}$  ( $p < 0.01$ )、 $58.7 \pm 4.9\text{ml}$  から  $66.5 \pm 5.7\text{ml}$  ( $p < 0.01$ ) と有意に拡張したのに対し、低テネイシン C 群では  $92.6 \pm 7.2\text{ml}$  から  $87.6 \pm 6.5\text{ml}$ 、 $46.5 \pm 5.3\text{ml}$  から  $40.8 \pm 5.4\text{ml}$  と変化が見られなかった。一方、低テネイシン C 群では左室駆出率が  $51.7 \pm 3.0\%$  から  $55.7 \pm 2.8\%$  ( $p < 0.05$ ) と有意に改善したのに対して、高テネイシン C 群では  $46.7 \pm 1.9\%$  から  $48.4 \pm 2.1\%$  と改善が見られなかった。

$33.3 \pm 16$  箇月の経過観察中、高テネイシン C 群では 4 例死亡し、4 例が心不全のため入院したのに対し、低テネイシン C 群では、1 例死亡し、1 例が入院、Kaplan-meier cardiac event free カーブでは、高テネイシン C 群の方が有意に死亡と入院の頻度が高かった ( $p=0.0047$ )。

## 考察

テネイシン C の血中濃度は心筋梗塞後急性期に明らかに上昇している。梗塞後の血中濃度の経時

的变化を検討すると、テネイシンCレベルは心筋細胞逸脱酵素とほぼ同時に早期から上昇しはじめるが、5日目にピークとなり、異常高値は心筋細胞逸脱酵素のそれよりはるかに長期間持続する。また、ピークテネイシンC値は、 $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin SPECTによるtotal defect scoreやCK-MBピーク値とは相関せず、心筋細胞障害そのものではなく、それに対する周囲間質の活発な反応、すなわち組織リモデリングを反映すると考えられる。したがって、テネイシンCの発現レベルが高いということは、組織構築の改変が持続していることを意味する。テネイシンCは、多くの強い生物活性をもって組織リモデリングを制御する。例えば、MMPを誘導し、細胞接着を緩めることにより組織構造の改変を容易にするが、これらの作用は、心筋細胞のスリッページや結合組織の脆弱化をきたして心室拡張、いわゆる

心室リモデリングを来しうる。その一方で、障害部位へ筋線維芽細胞を動員し、膠原線維形成および収縮を促進する機能もち、理論的には、組織の収縮力を発生し拡張を防止するはずである。したがって、テネイシンCは心室リモデリングに対して、抑制・促進の両面性を持ち、単純ではない。

心筋障害後早期に発現する適量のテネイシンCは、創傷治癒を促進するが、長期間持続する過剰に発現すると、MMP-TIMPのバランスをくずすなど、正常な組織修復に必要な膠原線維形成を障害し、心室拡張を来す可能性が考えられる。

## 結論

心筋梗塞後の血中テネイシンCレベルは急性期に上昇し、慢性期の心室リモデリングの進展を予測する指標になりうる。

# 再生心筋細胞における骨髄細胞の寄与に関する研究

由谷 親夫

国立循環器病センター臨床検査部  
現 岡山理科大学理学部臨床生命科学科

福原 慎也, 富田 伸司, 中谷 武嗣

国立循環器病センター

## 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、2001年に細胞と細胞の接着が同期収縮に重要な働きをすることを報告し、2002年G-CSFを用いた内因性幹細胞に関して報告した。しかし、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。今回、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

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、脾臓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( $200 \mu\text{g/kg/day}$ )(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

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

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. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes  
Journal of cell transplantation 13; 741-748, 2004
2. Endogenous bone marrow-derived stem cells reconstituted myocardium only in the small proportion after acute myocardial infarction  
Journal of Heart and lung transplantation in press (online publish 2005)

学会発表

1. 2003 American Heart Association Scientific Sessions（オーランド）

# ヒト不全心でのエネルギー産生に関する遺伝子発現と $\beta$ ブロッカー治療による変化

宮武 邦夫

国立循環器病センター

## 研究要旨

$\beta$ 遮断薬の心筋代謝に及ぼす影響を検討した。15例の拡張型心筋症患者(DCM)に $\beta$ 遮断薬を4ヶ月投与し、投与前後の心筋生検標本を用い、不全心における代謝酵素の発現とその変化を測定した。不全心筋では遺伝子発現は糖代謝に傾いていたが、4ヶ月の $\beta$ 遮断薬治療では遺伝子発現の明らかな変化は認められなかった。したがって、 $\beta$ 遮断薬による心筋エネルギー基質の脂肪酸から糖へのスイッチは血中でのエネルギー基質濃度の変化によるものが大きいと考えられた。

## 研究目的

慢性心不全患者の $\beta$ 遮断薬治療による心機能の改善の一つには脂肪酸から糖へのエネルギー基質のスイッチが関与しているといわれている。そこで、慢性心不全患者における心筋エネルギー基質利用がどのように変化しているか、また $\beta$ 遮断薬治療によってどう変わるのかを心筋レベルで明らかにすること。

## 研究方法

$\beta$ 遮断薬を導入したDCM15例で、導入前と導入後4ヶ月にLVEF、BNPを測定した。同時に右室心筋生検を施行し、エネルギー基質代謝関連因子(GLUT-1, GLUT-4, muscle carnitine palmitoyltransferase I (m-CPTI), medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPA  $\alpha$ ), retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ))の遺伝子発現を測定した。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。  
(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、試験の科学的な妥当性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

LVEFとBNPは有意に改善した。 $\beta$ 遮断薬投与前にGLUT1は有意に増加し、GLUT4、MCADは有意に減少していた。エネルギー基質代謝酵素、キャリア蛋白、さらには転写因子(HIF-1  $\alpha$ , PPA  $\alpha$ , RXR  $\alpha$ )は $\beta$ 遮断薬治療前後で有意な変化はなかった。

## 考察

$\beta$ 遮断薬治療によって心筋利用エネルギー基質利用は脂質から糖に変化することが報告されているが、これは心筋レベルでのエネルギー利用機構の変化によるものではなく血中におけるエネルギー基質濃度の変化によることが示唆された。

E. 結論 慢性心不全における $\beta$ 遮断薬治療による利用心筋エネルギー基質の変化には心筋レベルでのエネルギー基質利用機構の関与は大きくないと考えられた。

研究発表

学会発表

第77回AHAにて発表

# 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。今年度は、心不全で変化する遺伝子に糖代謝関連遺伝子が含まれていたことから、糖代謝に着目し高血糖と心不全の関連について明らかとした。

## 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

マウス大動脈縮窄モデル（TAC モデル）において、ボグリボースが TAC 4 週後の心不全を改善できるか否かを検討した。また、糖尿病の治療薬として広く使われている  $\alpha$  グルコシダーゼ阻害薬であるボグリボースを慢性心不全症例 28 人（NYHA II - III）に無作為に投与し、3 ヶ月～半年後の症状と血中 BNP 濃度について検討した。

（倫理面への配慮）

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。

① DNA 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った。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シ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。

⑤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らかとなった。また、臨床においても心不全症例にベルサンチンを投与することにより運動耐用能の増加と自覚症状（NYHA Class）の改善を認めた。

今回、TAC モデルにおいては、随時血糖値の上昇を認めボグリボース投与により血糖の上昇は抑えられた。心重量 / 体重比はボグリボース群にお



いて有意に低下していた ( $P=0.026$ )。また、肺重量/体重比、左室短縮率、左室拡張末期径、肺動脈楔入圧の各心不全指標も有意に改善していた ( $P<0.05$ )。ヒト心不全症例においてボグリボース投与群と非投与群において3ヶ月～半年後の血中BNP濃度は、ボグリボース投与群においてのみ有意に低下していた。

## 考察

ヒト心不全症例においては、耐糖能異常の出現が対照群に比し有意に高値であった。耐糖能異常の内訳を見ると、糖尿病・IGTの頻度は慢性心不全で増加していたが、一過性高血糖の少ないと考えられ

る。IGTの頻度は逆に減少していた。さらに経口血糖負荷による血糖の上昇量が血中BNP濃度と相関を持つことから、一過性高血糖が心不全に直接大きな影響を与えていることが示唆された。さらに、マウスTACモデルおよび慢性非虚血性心不全症例においてボグリボースが心不全を改善することが示唆された。

## 結論

一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤は心不全の新しい治療薬となると考えられた。

## 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.

## 学会発表

日本糖尿病学会近畿地方会シンポジウム

# 心筋細胞に対する一酸化窒素による抗アポトーシス作用の機序解明

磯部 光章

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学

## 研究要旨

一酸化窒素（NO）は心血管系における種々の生理的プロセスに関与している生理活性分子であり、心筋障害の要因の一つである心筋細胞のアポトーシスに対しても大きな影響を及ぼしていることが知られている。NO はアポトーシスの誘因、NO の供給源・濃度や細胞内の酸化還元状態などの違いによってアポトーシスに対して抑制的に働いたり促進的に働いたりする二面性を持つ。我々はこの二面性を制御しているメカニズムを解明するため、NO が心筋細胞に対して抗アポトーシス効果を発揮する際に標的となる細胞内シグナル伝達路のうち、ミトコンドリア・デスレセプター・MAP/JNK 経路・PI-3K/Akt 経路など従来から知られている経路ではない新規の経路に着目した。その結果、心筋細胞に対する NO の抗アポトーシス効果の機序として、NO による cyclin A 依存性キナーゼ活性の抑制と、caspase-3 活性の S-nitrosylation による抑制という 2 つのメカニズムを新たに見いだした。本研究を更に深めることにより、心筋細胞のアポトーシスに対する NO の影響を制御することが出来るようになり、将来的に心筋障害の治療に応用が可能性になると考えられる。

## 研究目的

心不全の病態には、アポトーシスによる心筋細胞の脱落が関与することが知られている。NO には心筋細胞に対して抗アポトーシス効果があることが知られているが、その機序については充分には明らかにされていない。我々は以前に心筋細胞の cyclin A 依存性キナーゼ活性を抑制するとアポトーシスが抑制されることを明らかにした (Adachi S et al. Circ Res 88, 408-414, 2002) が、NO には cyclin A 依存性キナーゼ活性を制御する作用があることが近年明らかとなった。また、NO はシステイン残基の -SH を -SNO に修飾し、蛋白の機能を制御する役割を持つことが知られている。この反応は S-nitrosylation と呼ばれ、リン酸化やアセチル化などと同様に蛋白の重要な転写後調節機能のひとつである。近年、アポトーシス調節因子の中には S-nitrosylation をうけることによりその活性が制御されているものが存在することが明らかとなった。これらの知見をふまえて、我々は心筋細胞に対する NO の抗アポトーシス効果の機序として、(1) NO による cyclin A 依存性キナーゼ活性の抑制と、(2) caspase-3 活性の S-nitrosylation による抑制、という 2 つのメカニズムが関与している可能性があると考え、これらについて検討することを目的とした。

## 研究方法

実験 (1)：新生仔ラット由来培養心筋細胞に虚血 / 再灌流刺激を加えてアポトーシスを誘導し、TUNEL 法や Flowcytometry などを用いたアポトーシスの定量・細胞周期制御蛋白の Western Blotting、キナーゼ活性測定、培地内 NO 濃度測定 (Griess 法) を行った。dominant-negative cdk2 adenovirus(dncdk2)や roscovitine(100  $\mu$  mol/L) を用いて cdk2 活性を阻害し、cyclin A 依存性キナーゼ活性とアポトーシスとの関わりについて評価した。更に Nitro-L-arginine methylester(L-NAME) を用いた NO の合成阻害および NO 供与剤である S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) の投与による変化についても検討した。

実験 (2)：新生仔ラット由来培養心筋細胞に 1  $\mu$  mol/L の Doxorubicin (DOX) を加えてアポトーシスを誘導し、対照群・SNAP 添加群・SNAP+ HgCl<sub>2</sub> (脱 nitrosylation 作用を持つ) 添加群のそれぞれについて、アポトーシスの定量・Western blotting・caspase-3 活性測定・cGMP 依存性キナーゼ (cGK) 活性測定・peroxynitrite 濃度測定を行った。また、S-nitrosylation の評価法として、①心筋細胞由来の lysate を抗 caspase-3 抗体で免疫沈降し、HgCl<sub>2</sub> を添加することにより放出された NO 濃度を測定する方法、②抗 caspase-3 抗体で免疫沈降した lysate に含まれる蛋白の -SNO

基を -S-Biotin に置換し、その量の変化を Western blotting により解析する方法、③抗 caspase-3 抗体および -SNO 基に対する抗体を用いた二重染色法、の 3 法を用いた。

(倫理面への配慮)

本実験計画は東京医科歯科大学動物実験委員会において、その実験目的や実験方法などが検証され、倫理面より問題がないとの判定を受けた上で実験に着手した。

## 研究結果

実験 (1)：虚血 / 再灌流刺激により心筋細胞ではアポトーシスが誘導され、培地内 NO 濃度は再灌流後に有意に上昇した (15 分後:  $1.8 \pm 0.2$ -fold, 図 1) が、L-NAME を前処理するとアポトーシスは無添加群に比べて有意に上昇し (対照群;  $9.3 \pm 0.8\%$ , 再灌流刺激群;  $20.6 \pm 2.7\%$ , 再灌流刺激 + L-NAME 添加群;  $36.2 \pm 1.7\%$  [TUNEL 法], 図 2), NO 産生は抑制された。また、細胞周期制御因子のうち cyclin A 蛋白のみ経時的に上昇した (図 3) が、この変化は L-NAME を加えると更に促進された (図 4)。cyclin A 依存性キナーゼ活性は虚血 / 再灌流刺激により有意に増加し、L-NAME を加えると更に活性は上昇した (図 5)。dnedk2 や roscovitine を用いて cdk2 活性を阻害するとアポトーシスは有意に抑制された。内因性 cdk 阻害因子の一つである p21<sup>cip1/waf1</sup> 蛋白は虚血 / 再灌流刺激により経時的に上昇したが、L-NAME を加えると抑制された (図 6)。上記の検討において、SNAP を添加した場合は L-NAME 添加時とは逆の結果が得られた。

実験 (2)：培養心筋細胞に DOX を加えるとアポトーシスが誘導されるが、SNAP1mmol/L を加えることでアポトーシスは抑制された。HgCl<sub>2</sub>100  $\mu$ mol/L を追加するとこの効果は減弱した (図 7)。心筋細胞を DOX で 24 時間処理すると caspase-3 活性は上昇し、SNAP1mmol/L を加えるとその活

性は 63% にまで抑制されたが、HgCl<sub>2</sub>100  $\mu$ mol/L を追加するとこの効果は減弱した (図 8)。cGK 活性測定や cGK 阻害物質 (ODQ) を添加した検討の結果、上記の変化は cGK 活性には依存していなかった。高濃度の SNAP (10mmol/L) を添加すると培地内の peroxynitrite 濃度は上昇し、アポトーシスだけでなく壊死をきたした心筋細胞数が増加し、心筋細胞の viability はかえって低下した (図 9,10)。Western blotting による解析では、DOX により上昇した活性型 caspase-3 の蛋白量は SNAP 添加によって抑制された (図 11)。上記に示した 3 法により caspase-3 に対する S-nitrosylation の評価を行ったところ、DOX で刺激された心筋細胞由来の caspase-3 は対照群に比して SNAP を添加した群でより強力に S-nitrosylation を受けており、HgCl<sub>2</sub> を添加するとこの作用は減弱していた (図 12)。

## 考察

実験 (1) では心筋細胞のアポトーシス誘導に関与している cyclin A 依存性キナーゼ活性は NO によって抑制され、それに伴ってアポトーシスも抑制されることと、NO は p21<sup>cip1/waf1</sup> 蛋白の発現増加を促進することにより cyclin A 依存性キナーゼ活性を抑制し、その結果として抗アポトーシス効果を発揮していることを示した。また実験 (2) では、NO は S-nitrosylation によって caspase-3 活性を抑制することによっても心筋細胞のアポトーシスを抑制していること、高濃度の NO 存在下では peroxynitrite の産生が増加し、心筋細胞のアポトーシスだけでなく壊死も強く誘導されることを示した。

## 結論

本研究を通して心筋細胞に対する NO による抗アポトーシス作用の新規の機序を解明したが、これらの知見は心筋細胞のアポトーシスを制御する新規の治療標的となりうる可能性がある。

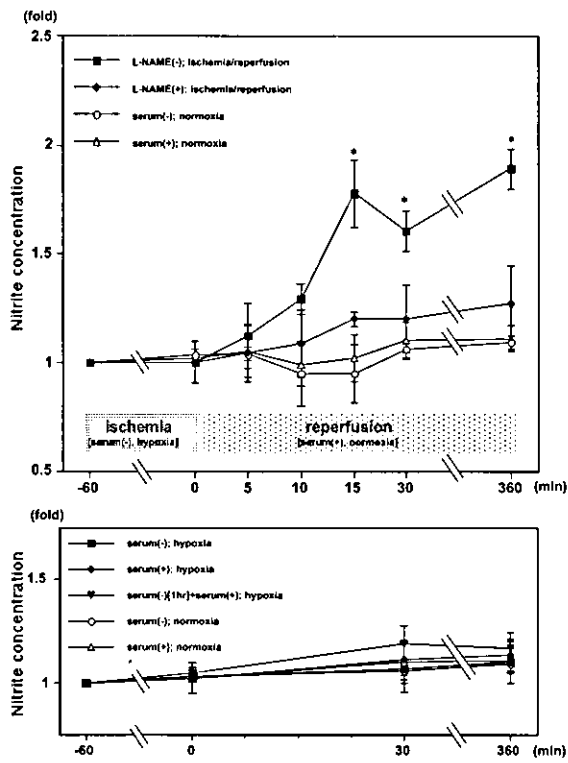


図1 培地内 NO 濃度の変化

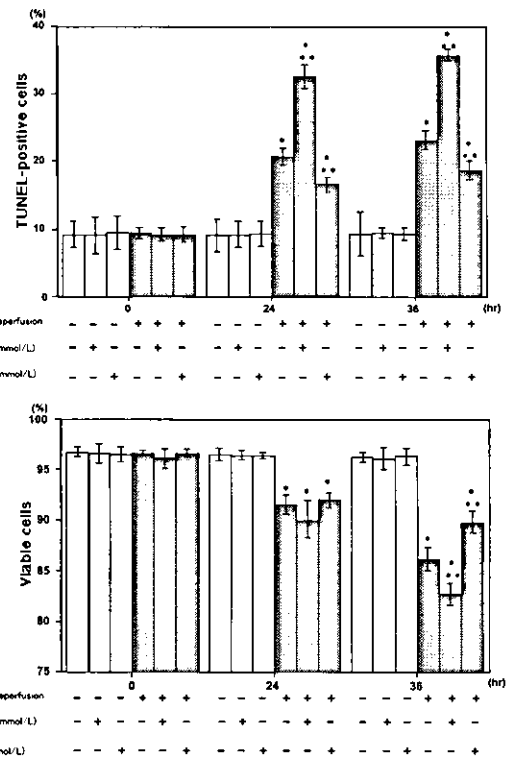


図2 虚血 / 再灌流刺激による心筋細胞のアポトーシス

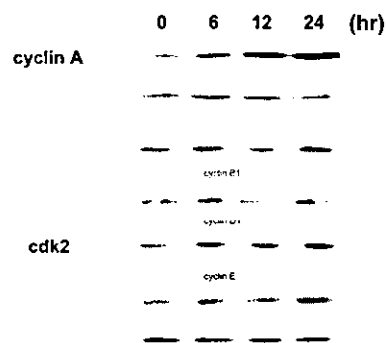


図3 細胞周期制御蛋白質量の変化



図6 p21<sup>cip1/waf1</sup> 蛋白質量の変化

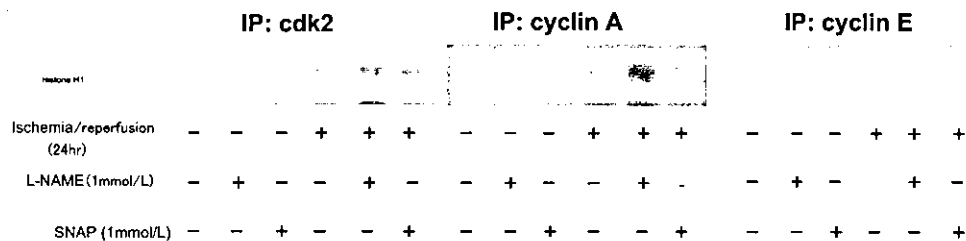
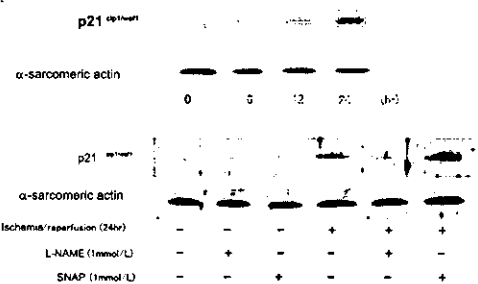


図5 Cyclin A 依存性キナーゼ活性の変化

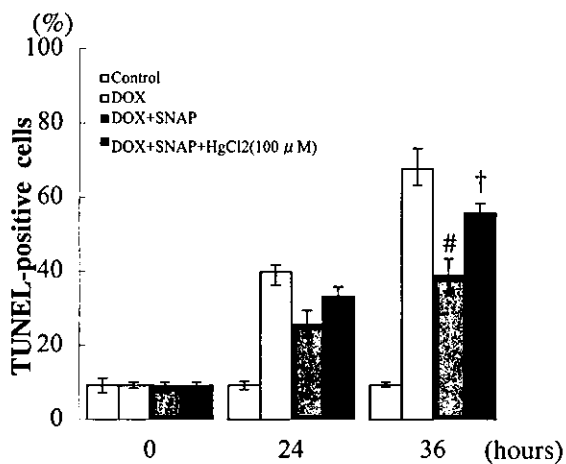


図7 Doxorubicin による心筋のアポトーシス

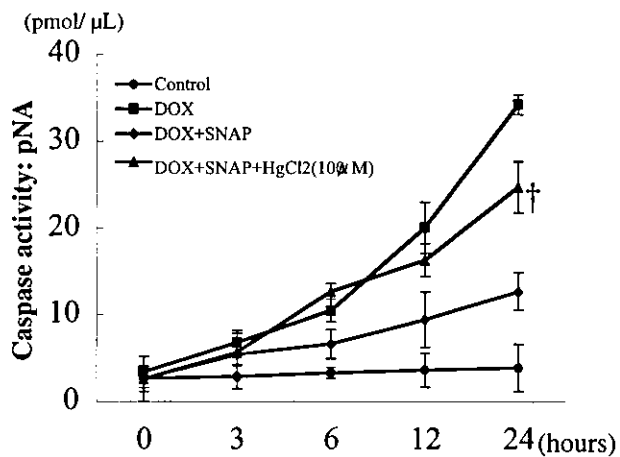


図8 Caspase-3 活性の変化

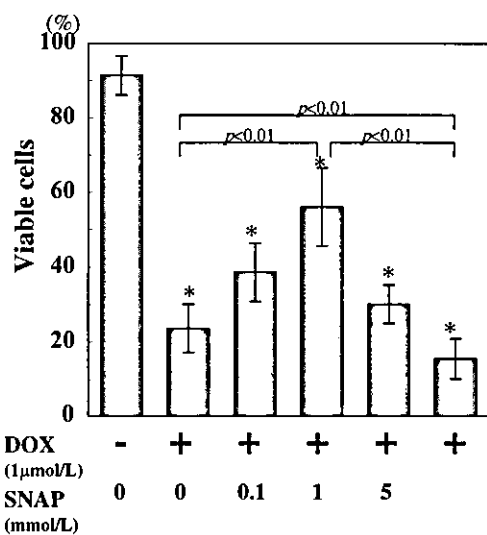


図9 SNAP 濃度による心筋細胞の viability の変化

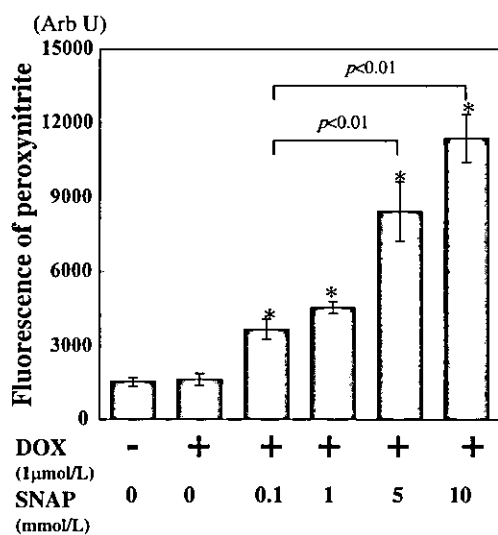


図10 Peroxynitrite 濃度の変化

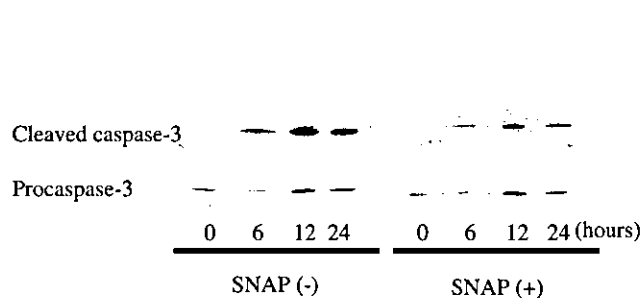


図11 Caspase-3 活性 (Western Blotting)

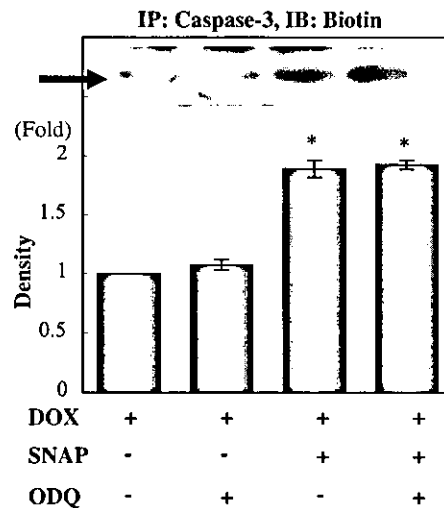


図12 Caspase-3 における S-nitrosylation

## 研究発表

### 論文発表

1. 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: 308-20, 2003
2. Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Moll Cell Cardiol* 38: 163-74, 2005
3. Isobe M, Kosuge H, Koga N, Futamatsu H, Suzuki J: Gene therapy for heart transplantation-associated acute rejection, ischemia/reperfusion injury and coronary arteriosclerosis. *Curr Gene Ther* 4 : 145-152, 2004
4. Suzuki J, Ito H, Gotoh R, Morishita R, Egashira K, Isobe M: Initial clinical cases using an NF-kB decoy at the site of the coronary stenting for prevention of restenosis. *Circ J* 68: 270-271, 2004
5. Suzuki J, Izawa A, Isobe M. Anti-vascular cell adhesion molecule-1 and anti-very late antigen-4 monoclonal antibodies inhibit neointimal hyperplasia in the murine model of arterial injury. *Acta Cardiologica* 59: 147-15, 2004.
6. Onai Y, Suzuki J, Kakuta T, Maejima Y, Haraguchi G, Furusawa H, Muto S, Itai A, Isobe M. Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 63 : 51-59, 2004
7. Kosuge H, Suzuki J, Kakuta T, Haraguchi G, Koga N, Futamatsu H, Gotoh R, Inobe M, Isobe M, Uede T: Attenuation of graft arterial disease by manipulation of the LIGHT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1409-1415, 2004
8. Sasano T, Okishige K, Azegami K, Isobe M: Clinical assessment of antiarrhythmic agents for paroxysmal atrial fibrillation guided by modification of the electrophysiological arrhythmogenicity. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 1250-1257, 2004
9. Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: Induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 110: 1650-1657, 2004
10. Koga N, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Onai Y, Futamatsu H, Maejima Y, Gotoh R, Saiki H, Tsushima F, Azuma M, Isobe M. The Blockade of the Interaction Between Programmed Death-1 (PD-1) and Its Ligand PD-L1 Accelerates Graft Arterial Disease (GAD) in Cardiac Allografts. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 24: 2057-2062, 2004
11. Gotoh R, Suzuki J, Kosuge H, Kakuta T, Sakamoto S, Yoshida M, Isobe M. E-Selectin blockade decreases adventitial inflammation and attenuates intimal hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 24: 2063-2068, 2004
12. Wakizono-Azuma R, Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Koga N, Onai Y, Kosuge H, Isobe M. HMG-CoA reductase inhibitor attenuates experimental autoimmune myocarditis through inhibition of T cell activation. *Cardiovasc Res* 64: 412-420, 2004
13. 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 Moll Cell Cardiol* 37: 1205-1211, 2004
14. Suzuki J, Ogawa M, Izawa A, Sagesaka YM, Isobe M. Dietary consumption of green tea catechins attenuate hyperlipidemia-induced atherosclerosis and systemic organ damage in mice. *Acta Cardiologica*. in press
  15. Soejima Y, Aonuma K, Iesaka Y, Isobe M: Ventricular unipolar potential radiofrequency catheter ablation of idiopathic non-reentrant ventricular outflow tachycardia. *Jpn Heart J* 45: 749-760, 2004

#### 学会発表

1. Isobe M. New strategies to treat immune-mediated heart diseases. Gene therapy to cardiac allograft rejection and myocarditis. Symposium 5 Congestive Heart Failure. 14<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Cardiology, Singapore, Jan, 2004.
2. Inomata H, Nabika T, Liang Y-Q, Watanabe T, Isobe M, Morii T, Yanai K, Yazaki Y, Sasazuki T, Kato N. Evaluation of gene-gene interaction for hypertension and associated metabolic traits in reciprocal crossbreeds derived from chromosome-1 congenic rats. 20th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Sao Paulo, Brazil, Feb, 2004.
3. Kosuge H, Suzuki J, Haraguchi G, Koga N, Gotoh R, Isobe M. Pioglitazone Suppresses Acute and Chronic Allograft Rejection. American Transplant Congress. Boston, USA, May, 2004.
4. Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Asahara T, Isobe M. Administration of adenovirus E-selectin significantly potentiates endothelial progenitor cell dependent neovascularization in murine ischemic hindlimb model. International vascular biology meeting, Toronto, Canada, June, 2004.
5. Isobe M, Morishita R, Suzuki J. New approaches to treat cardiovascular diseases targeting NFkB. XVIII World Congress International Society for Heart Research. Brisbane, Australia, Aug, 2004.
6. Suzuki J, Ogawa M, Sagesaka YM, Isobe M. Tea catechins attenuate myocardial remodeling and graft arterial diseases in murine cardiac allografts. XX International Congress of Transplantation Society, Vienna, Austria, Sep, 2004.
7. Suzuki J, Ogawa M, Isobe M. A nonviral gene transfer using the ultrasound-microbubble method has enhanced transfection efficiency of NF-kB decoy into murine cardiac allografts. XX International Congress of Transplantation Society, Vienna, Austria, Sep, 2004.
8. Horikawa T, Hirao K, Yano K, Azegami K, Isobe M. What transforms pulmonary vein rapid activations into atrial fibrillation? : vagotony is a stronger mediator than sympathetic stimulation. 77<sup>th</sup> Scientific Sessions of American Heart Association, New Orleans, USA, Nov, 2004.
9. Inomata H, Nabika T, Liang Y-Q, Watanabe T, Isobe M, Morii T, Yanai K, Yazaki Y, Sasazuki T, Kato N. Investigation of gene-gene interaction for hypertension and metabolic phenotypes in reciprocal F2 crossbreeds derived from chromosome-1 congenic rats. 14<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension, Paris, France, June, 2004.
10. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Mutoh S, Itai A, Isobe M. Inhibition of Ikb phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. 77<sup>th</sup> Scientific Sessions of American Heart Association, New Orleans, USA, Nov, 2004.
11. Futamatsu H, Mizuno S, Koga N, Adachi S, Kosuge H, Maejima Y, Nakamura T,

Isobe M. Gene transfer of hepatocyte growth factor improve the development of experimental autoimmune myocarditis through induction of T helper 2 cytokines. 77<sup>th</sup> Scientific Sessions of American Heart Association, New Orleans, USA, Nov, 2004.

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)



# 再生心筋組織移植におけるホスト-グラフト間の形態的結合

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。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。本年度の研究では重層化心筋細胞シートが移植後、ホスト心臓とどのように結合するのかを解析した。その結果、グラフトとホストの間にはギャップジャンクションを介した心筋細胞間の接着が確認され低分子の通過も確認された。このことは移植した再生組織がホスト心臓と電氣的に同期し心機能を改善しうることを示した。

## 研究目的

これまでに細胞シート工学により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再生に成功している。この心筋グラフトを不全心筋に対する治療として移植する場合、ホスト心臓と電氣的に結合することが重要である。そこで本研究では心筋梗塞モデルに重層化心筋細胞シートを移植し、ホスト心筋細胞と移植グラフト心筋細胞との電氣的結合を形態学的に解析することを目的とした。

## 研究方法

温度応答性培養皿上に新生仔 GFP ラットの心筋細胞を培養し、心筋細胞シートを作製した。温度低下により回収した細胞シート3枚を重層化し心筋グラフトとしてラット心筋梗塞モデルの心臓表面へ移植した。経時的に移植部を摘出し組織切片を観察、アクチニン、GFP、コネクシン43に対する免疫組織染色および透過型電子顕微鏡によりホスト心筋と心筋グラフトとの細胞間結合の形態学的解析を行った。さらにギャップジャンクションを移動可能な蛍光色素カルセインを心筋グラフトに取り込ませた後に移植を行い、グラフトからホストへの移動を解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学の動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して実験動物に対する十分な倫理的

配慮のもとに実験を行った。

## 研究結果

1週間後、心筋グラフトが全層にわたって生着していることが示された。梗塞部位上においては心筋グラフトは線維化した組織を被覆するように生着していた。非梗塞部上においては3日後になるとグラフトの心筋細胞がホスト側へ遊走をはじめ、1週間後にはホスト心筋細胞と結合することが確認された。ホスト-グラフトの心筋細胞結合部位においてはコネクシン43が陽性であることも確認されたし、透過電子顕微鏡による観察では介在板の存在も認められた。さらにこの結合した細胞間を低分子の蛍光色素であるカルセインが移動することが確認された。

## 考察

今回の研究結果より不全心筋部を被覆するように重層化心筋細胞シートを移植した場合、非梗塞部を介してホスト-グラフト間に電氣的結合を生じ、グラフトがホスト心臓と同期して拍動し心機能を改善しうることを示唆された。

## 結論

細胞シート工学による組織再生の技術は重症心不全に対する再生医療に大きく貢献するものと考えられる。

研究発表

論文発表

1. 清水達也, 岡野光夫. 細胞シート工学を利用した組織再構築 Bio Clinica 19;74-78 (2004)
2. 清水達也, 岡野光夫. 血管再生医学 Overview. 血管医学 5;535-536 (2004)

学会発表

1. Shimizu T, Okano T. Myocardial tissue reconstruction by cell sheet technology. The 18th World Congress for International Society for Heart Research. 2004.8. Blisbane.
2. Shimizu T, Okano T. Pulsatile tissue grafts: getting rid of old scaffolds? European Society of Cardiology 2004 2004.8 Munich

# 心筋組織幹細胞の特徴と発生学的由来の解析

福田 恵一

慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

## 研究要旨

心臓組織中の心筋幹細胞の多分化能と発生学的由来を明らかにするため、心筋細胞中より組織幹細胞を単離し、多分化能と細胞生物学的特徴を解析した。心筋組織幹細胞はcardiosphereを形成し、神経、グリア、心筋、骨格筋に分化した。これらの細胞をニワトリ早期胚の神経堤に移植すると、腹側経路、背外側経路に沿って移動し、神経、グリアに分化した。一部の細胞は血管に取り込まれ、平滑筋に分化した。神経堤を標識する lineage analysis を行った結果、神経堤由来の細胞は、心臓内に分布し、幹細胞として分布すると同時に心筋細胞に分化した。

## 研究目的

心臓組織中の心筋幹細胞の多分化能と発生学的由来を明らかにする

## 研究方法

初代培養心筋細胞中より SP 法と neurosphere 法を組み合わせ、クローナルな組織幹細胞を単離した。多分化能と細胞生物学的特徴を解析した。同時にこの細胞をニワトリ早期胚の神経堤に移植した。神経堤を標識する lineage analysis を行った。  
(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

SP 法と neurosphere 法を組み合わせにより得ら

れた cardiosphere 細胞は Neural crest stem cell と類似の遺伝子発現をすると同時に、神経、グリア、心筋、骨格筋に分化することを確認した。これらの細胞をニワトリ早期胚の神経堤に移植すると、腹側経路、背外側経路に沿って移動し、神経、グリアに分化した。また、一部の細胞は血管に取り込まれ、平滑筋に分化した。さらに、一部は心臓流出路の構築に寄与した。神経堤由来の細胞は、心臓内に分布し、幹細胞として分布すると同時に心筋細胞に分化した。

## 考察

心臓組織幹細胞の発生学的由来の一部が解明された。

## 結論

心臓組織幹細胞の一部は神経堤に由来している。

## 研究発表

### 論文発表

1. Fukuda K Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow stem cells and application to cell transplantation therapy. Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease, pp39-48, 2004, edited by Richard K. Burt and Alberto Marmont. (Landes Bioscience, USA)
2. Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda, Yuichi Tomita, Jun Fujita, Masaki Ieda, Satoko Tahara, Yuji Itabashi, Takashi Yagi, Haruko Kawaguchi, Yasuyo Hisaka, Satoshi Ogawa. Cardiomyocytes undergo cells division following myocardial infarction is a spatially and temporally restricted event in rats. Mol Cell Biochem. 259:177-181, 2004
3. Yasuyo Hisaka, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Isao Shibuya, Haruko Kawaguchi, Toshikazu Nakamura, Hidezo Mori, Koji Kimura, Naoto Fukuyama, Kenichiro Kosai, Satoshi Ogawa. Powerful and controllable angiogenesis by using gene-modified cells expressing human hepatocyte growth factor and thymidine kinase. J Am Coll Cardiol 43 (10) : 1915-1922, 2004

4. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda, Kensuke Kimura, Yasuyo Hisaka, Haruko Kawaguchi, Kouji Shimoda, Eiko Takeshita, Hideyuki Okano, Yukiko Kurihara, Hiroki Kurihara, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu, Linda Salamone, Howard J. Federoff, Satoshi Ogawa. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic nerve innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 113 (6) : 876-884, 2004
5. Eiichi Takahashi, Keiichi Fukuda, Shunichiro Miyoshi, Mitsushige Murata, Takahiro Kato, Makoto Ita, Tsutomu Tanabe, Satoshi Ogawa. LIF activates cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels via phosphorylation of serine 1829 in the rabbit Cav1.2 subunit. *Circ Res.* 94 (9) :1242-1248, 2004
6. Naoichiro Hattan, Haruko Kawaguchi, Kiyoshi Ando, Eriko Kuwabara, Jun Fujita, Mitsushige Murata, Makoto Suematsu, Hidezo Mori, Keiichi Fukuda. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 65:334-344, 2005
7. Keiichi Fukuda. Regenerative medicine for cardiomyocyte. *Jap Med Ass J.* 47 (4) : 328-332, 2004
8. Kawada H, Fujita J, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Itabashi Y, Ogawa S, Hotta T, Okano H, Ando K, Fukuda K. Non-hematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104 (12) :3581-3587, 2004
9. Tamamori-Adachi M, Hayashida K, Nobori K, Kawwuchi J, Omizu C, Kamura T, Fukuda K, Ogawa S, Nakayama K, Kitajima S: Skp2 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and cdk4: Evidence for impaired degradation by skp2-dependent pathway. *J Biol Chem* 279 (48) :50429-36, 2004
10. Yuji Itabashi, Shunichiro Miyoshi, Kojiro Tanimoto, Shinsuke Yuasa, Jun Fujita, Haruko Kawaguchi, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. A novel method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-polymer-coated dishes and its application for electrophysiological studies by optical mapping. *Artifi organs.* 29 (2) :95-103, 2005
11. Kentaro Hayashida, Jun Fujita, Yoshiko Miyake, Hiroshi Kawada, Shinsuke Yuasa, Masatoyo Yoshioka, Keisuke Matsumura, Yuji Itabashi, Kiyoshi Ando, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Bone marrow derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *CHEST* (in press) 2005
12. Fukuda K. Current status of myocardial regeneration and cell transplantation. *Future Cardiology* (in press) 2005
13. 福田恵一,「再生医療」先端医療シリーズ 28. 心臓病 心臓病の最新医療. 5-9. 永井良三他編集. 先端医療技術研究所. 2004 年.
14. 福田恵一.『心筋幹細胞』予防医学事典. 松島綱治, 酒井敏行, 石川昌, 稲寺秀邦編. 朝倉書店. 2005 年 (in press).
15. 林田健太郎, 福田恵一.『循環器疾患における再生療法：心筋細胞の再生』The Circulation Frontier 2004 年 8 巻 1 号 18-25.
16. 真鍋知宏, 福田恵一. 外科領域における再生医療の現況と展望：6. 心筋細胞の新生, 再生医療の現況と展望. 日本外科学会雑誌. 105 巻 8 号, 454-458, 2004 年.
17. 藤田淳, 福田恵一. 動き出す心筋創生：骨髄細胞からの心筋再生. 分子心血管病. 5 巻 3 号, 233-238, 2004 年.
18. 川口治子, 福田恵一. 再生医療による心臓病治療の最前線－基礎と臨床－：心筋の細胞治療.