

[病態・診断・治療：臨床]

10. 拡張型心筋症の心臓移植例の経過について

国立循環器病センター臓器移植部¹、病院長²、総長³

中谷武嗣¹、花谷彰久¹、友池仁暢²、北村惣一郎³

【目的】当施設から日本臓器移植ネットワークへ83例の心臓移植登録を行ってきたが、今回当施設における11例の移植例の経過を報告する。

【対象】原病は、拡張型心筋症10例（1例劇症型心筋炎後）拡張相肥大型心筋症1例で、14-55（平均36）歳、男性9例、女性2例であった。

【対象・結果】移植患者の移植前における重症度は全例status 1で、内9例がLVAS装着、2例がカテコラミン持続投与中であった。LVAS補助期間は39-993（525）日で、待機期間も29-995（440）日に及んだ。脳死下臓器提供施設は、近畿地区2例、遠隔地9例であった。なお、第9例目および第10例目の症例においてはドナー情報が同時にあり、2例同時に移植手術を行った。

心筋保護液は、当初St. Thomas液で、7例目からCelsior液を用いた。術式は、3例目以降右房後壁の一部を温存するmodified Bicaval法を用いた。免疫抑制療法は、ネオオーラル、セルセプト、ステロイドによる三者併用療法を第一選択とし、4例においては腎機能障害などによりオルソクロン OKT3を用いた。また、経過中4例においてネオオーラルからプログラフへ変更した。3例でISHLT grade3Aの拒絶反応を認めたが、ステロイドパルス療法により軽快した。術後心機能は良好で、全例退院し存命中である。第1例目およびその1ヵ月後に施行した第2例目はともに5年を経過した。また、7例が社会復帰している。

【総括】同時施行2例はともに800日以上に及ぶLVAS補助例であったが、両例とも移植後50病日で退院した。このように心臓移植待機期間が長期化し、LVASによる補助も2年を越えるようになっているが、心臓移植術後の臨床症状は安定している。今後、移植心冠動脈病変などの慢性期管理への配慮が課題になると思われる。

11. ベータ遮断薬による拡張型心筋症における局所心筋収縮同期性の改善効果：心エコー・ストレイン法による検討

大阪市立大学大学院医学研究科循環器病態内科学

竹本恭彦、穂積健之、杉岡憲一、氏野経士、松村嘉起、葭山稔、吉川純一

【目的】左室心筋の収縮不均一性を有する拡張型心筋症（DCM）例にて、両心室ペーシングが心筋収縮同期性を改善することが、心エコー・ストレイン（SE）法による検討で報告されている。一方、ベータ遮断薬がDCM例の長期予後を改善することが報告されているが、左室心筋収縮同期性の改善効果については検討なされていない。SE法を用い、ベータ遮断薬治療による左室心筋収縮同期性の改善効果について検討すること。

【方法】DCM10例を対象とし、1)ベータ遮断薬投与前（Pre）、2)投与1ヶ月後（1M）、3)6ヶ月後（6M）に、SE法を用いて（GE社製Vivid7）、心尖部二腔・四腔・長軸像から、左室前壁・下壁・中隔下部・側壁・中隔前部・後壁の各壁の乳頭筋レベル・心基部レベルの計12分画で、収縮期ストレイン（SS）を評価した。各分画にて、R波からSSがピークに達するまでの時間（T peak）を計測した。左室心筋の収縮不均一性を評価するため、T peakの各分画間のばらつきを示す変動係数（coefficient of variation；CV）を算出した。

【結果】左室駆出率は、Preで $28 \pm 7\%$ 、1Mで $30 \pm 7\%$ （ $p=0.13$ vs Pre）、6Mで $38 \pm 11\%$ （ $p=0.03$ vs Pre、 $p=0.03$ vs 1M）であり、6ヶ月後に駆出率の有意な改善を認めた。一方CVは、Preには $18 \pm 5\%$ であったが、1Mに $15 \pm 6\%$ （ $p=0.02$ vs Pre）、6Mに $14 \pm 7\%$ （ $p=0.03$ vs Pre、 $p=0.59$ vs 1M）であり、1ヶ月以降に有意な改善を認めた。

【総括】心エコー・ストレイン法を用いた検討によれば、DCM例に対するベータ遮断薬投与により、左室駆出率の改善に先立ち、治療1ヶ月後より心筋収縮同期性の改善がみられた。

12. タコツボ型心筋障害剖検例の検討

順天堂大学 循環器内科 河合祥雄、鈴木宏昌、山田京志
鹿児島生協病院内科 馬渡耕史
島根医科大学 島田俊夫、長崎真琴
国立神戸病院 河田正仁、中村哲也
虎ノ門病院 西山信一郎、松下 央

【目的】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タコツボ型心筋障害の機序、形態学的な所見も明らかではない。今回、全国諸施設症例剖検例を用い、部位（左心室心尖部と心基部付近）よる病変の差について検討した。

【対象と方法】タコツボ型心筋障害（心尖部を中心とした広範な収縮障害、心電図異常など）が疑われ死亡した5剖検例（66, 81, 82, 88歳女性, 75歳男性）の心室病変を検討した。心尖部ならびに心基部付近の左心室横切面切片状で、前壁、側壁、後壁、心室中隔の4部位それぞれに直交する線分を引き、強拡大検鏡下で、壁構成心筋細胞（層）数に対する障害心筋細胞数の割合を計測した。

【結果】心筋細胞は散在性またびまん性に障害され、心内層から外層にかけて広範に障害像を認めた。障害像は原則的に個々の心筋細胞、または数個の心筋細胞の障害・変性・融解・消失像であり、病変はある特定の筋束に集中する場合と散在性に生じる場合が見られた。好酸性染色性の亢進、筋収縮帯形（筋原線維変性）、融解などの単一心筋細胞障害像それらの集簇像が瀰漫性にみられ、死亡までの時期により、障害心筋細胞は処理されていた。壁構成心筋細胞（層）数に対する障害心筋細胞数の割合はいずれにおいても心尖部で高率にみられた（平均14.3%, 7%）。

【考案】剖検例の検討では心基部と心尖部の病変程度が異なり、障害心筋細胞数は心基部より心尖部で多く、心尖部～前壁壁運動低下と基部の過収縮を説明する。また、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。

13. 心エコー図による心 FABRY 病の予後予測因子の検討

鹿児島大学大学院 侵襲制御学*、循環器・呼吸器・代謝内科学

竹中俊宏、川野 誠*、尾辻 豊、寺口博幸、湯浅敏典、吉福士郎、

上村祐一*、皆越眞一、鄭 忠和

【目的】心 Fabry 病では、当初左室肥大を認め、肥大型心筋症様の病態を示す。その後、病期の進行とともに、心エコー図にて左室後壁基部の肥大の消失、左室壁運動低下、機能性僧帽弁逆流、拘束型僧帽弁流入血流などの所見が出現し、心不全や致死性不整脈により死亡する。しかし、これら心エコー図所見の、心不全・心臓死の予測因子としての有用性は不明である。本研究の目的は、心 Fabry 病において、心エコー図上の (1) 左室後壁基部の肥大の消失、(2) 左室壁運動低下、(3) 有意な機能性僧帽弁逆流、(4) 拘束型僧帽弁流入血流、の各所見の出現が心不全・心臓死の予測因子となりうるかを検討することである。

【方法】心 Fabry 病患者連続 13 例 (43-79 歳、全例男性) を対象とした。NYHA 心機能分類 III 度を末期心不全、心不全死・不整脈死を心臓死と定義し、心エコー図上の (1) 左室後壁基部の肥大の消失 (<13 mm)、(2) 左室壁運動低下 (左室駆出率 $<50\%$)、(3) 有意な機能性僧帽弁逆流 (逆流率 $>30\%$)、(4) 拘束型僧帽弁流入血流 (E 波減速時間 <150 msec) の出現と、臨床上のイベントである (1) 末期心不全、(2) 心臓死、との時間的な関連を検討するために、Kaplan-Meier 法による解析を行った。

【結果】左室後壁基部の肥大の消失は 68.6 ± 2.2 歳、左室壁運動低下は 69.0 ± 2.1 歳、有意な機能性僧帽弁逆流は 70.7 ± 1.7 歳、拘束型僧帽弁流入血流は 71.1 ± 2.2 歳で出現した。また、末期心不全は 71.2 ± 2.1 歳で出現し、心臓死は 71.9 ± 1.7 歳で出現した。左室後壁基部の肥大の消失は、末期心不全、心臓死に有意に先行して出現していた ($p < 0.05$)。

【総括】心 Fabry 病における左室後壁基部の肥大の消失は、末期心不全に先行してみられる特徴的な所見である。

14. ミトコンドリア DNA の病的変異と多型の鑑別

岐阜県国際バイオ研究所 遺伝子治療研究部

田中雅嗣、武安岳史、藤田泰典、伊藤雅史

【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 名の 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, in press)。これらの mtDNA 全塩基配列データを基礎として、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。

【方法】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 名の血液細胞あるいは口腔粘膜細胞から DNA を単離し、mtDNA の全塩基配列を決定した (16,569 塩基対 × 672 例 = 11,134,368 塩基対)。これに基づいてミトコンドリアゲノム一塩基多型データベース (mtSNPdb) を構築した。MITOMAP に登録されている既報の mtDNA 変異と日本人で観察された多型 (mtSNP) を比較した。

【結果】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 ヶ所に 92 種類、rRNA および tRNA 遺伝子領域では 105 ヶ所に 107 種類の変異が登録されていた。(a) 蛋白質コード領域および発現制御領域の 88 ヶ所変異のうち 16 ヶ所の変異が mtSNPdb において検出された。MITOMAP において疾患病態への関与が確認されたと分類されていた変異 18 ヶ所のうち 2 ヶ所が mtSNPdb で検出された。Leber 病の病因変異として確認されていた 4216T>C (ND1:Y304H) は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。同じく Leber 病の病因変異とされていた 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。(b) MITOMAP において暫定的に病的変異と分類されていた変異 64 ヶ所のうち 6 変異が mtSNPdb で検出された。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 名で検出された。Leber 病への関与が示唆されている 4136A>G (ND1:Y277C) はアルツハイマー病の 1 名で検出された。これらの変異は百寿者では検出されなかったので有害変異と推定され、加齢に伴う神経変性疾患のみならず特発性心筋症にも関与している可能性が考えられた。(c) 9804G>A、11696G>A、12026A>G 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。(d) 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 人で検出されたので、病態への関与は小さいと推定された。(e) 感音性難聴の病因であること

が確定している 1555A>G (12S rRNA)変異がアルツハイマー病患者 1 名において検出された。(f) 感音性難聴の病因であると推定されている 961T>C (12S rRNA)置換は百寿者でも検出された。(g) maternally inherited cardiomyopathy (MICM) の病因変異として 12192G>A (tRNA-His)が MITOMAP に登録されていたが、百寿者において検出されたので多型であると判断された。

【総括】 MITOMAP と mtSNP の両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。mtSNP database 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 の割合が臨床的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。

【URL】 mtSNPdb (http://www.giib.or.jp/mtsnp/index_e.html/)
MITOMAP(<http://www.mitomap.org/>)

15. 拡張型心筋症に見出された FHL2 変異の機能解析

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野¹、久留米大学医学部三内科²

木村彰方¹、松本雄二¹、林 丈晴¹、柴田宏樹¹、広井知歳¹、有村卓朗¹、
安波道郎¹、中村剛之^{1,2}、古賀義則²、今泉勉²

【目的】拡張型心筋症（DCM）の約 20-30%は遺伝性であり、その多くは常染色体優性遺伝形式をとるが、既知の原因遺伝子（タイチン、デスミン、サルコグリカン、ディストロフィンなど）に変異が見出される症例は遺伝性 DCM の約 10%に過ぎず、さらに未知の原因遺伝子の同定が必要である。本研究では、DCM 原因遺伝子座のひとつである CMD1H（2q12-q14）にマップされる FHL2 遺伝子を候補として変異検索を行った。

【方法】家族性 DCM 症例 34 例について FHL2 遺伝子変異を検索した。見出された変異について、GFP 融合遺伝子を用いて細胞内分布を検討した。また、酵母 2 ハイブリッド（Y2H）法を用いてタイチン N2-B 領域との結合性を検討した。さらに、他の拡張型 DCM 患者に見出されたタイチン N2-B 変異（Gln4053ter）による FHL2 結合性変化を Y2H 法で検討した。

【結果】家族性 DCM 症例 1 例に Gly48Ser を見出した。この変異は、FHL2 の進化上よく保存されたアミノ酸の置換であり、一般健常者 200 名には認められないため、本症例の DCM 病因と関連することが示唆された。FHL2 は β インテグリンと結合し、Z-disc やコストメアに分布する一方で、adenylate kinase、phosphofructokinase、muscle isoform creatine kinase などの代謝酵素と結合し、タイチン N2-B 領域（サルコメア I 帯）に分布する。そこで、GFP 融合コンストラクトを作製し、筋芽細胞系培養細胞株（RD21、C1C12）およびラット心筋細胞にトランスフェクトした後に、共焦点レーザー顕微鏡で GFP シグナルの分布を観察した。変異 FHL2 の発現量は正常に比べてやや低かったが、Z-disc や focal contact への分布に大きな質的变化はなかった。一方、Y2 法による検討では、FHL2 変異によってタイチン N2-B 領域との結合性は約 60%低下していた。また、タイチン Gln4053ter 変異では FHL2 結合性が約 40%低下していた。これらのことから、FHL2-タイチン連関の異常は、代謝酵素のサルコメア分布異常をもたらすことで、DCM の病因となることが強く示唆された。

【総括】FHL2 変異は新たな拡張型心筋症の原因遺伝子である。

[病態・治療：遺伝子・関連分子 I]

16. 圧負荷と容量負荷心肥大における遺伝子発現の差異の検討

- Lysyl oxidase like protein-1 の心肥大における発現制御について -

久留米大学医学部第三内科

大村治也、岡 直樹、宮崎 宏、上田集宣、今泉 勉

【目的】我々は、ラットの圧負荷 (P0) と容量負荷心肥大 (V0) における遺伝子発現の違いを DNA チップを用いて検討中である。今回は、両方の肥大心で発現増大がみられた lysyl oxidase like protein-1 (LOXL) について検討を行った。

【方法】P0 は腹部大動脈縮窄で、V0 は腹部大動脈-下大静脈シャントにより作製し、左室の遺伝子発現の変化は、術後 4 週間で検討した。DNA chip は rat genome array U34A (Affymetrix) を用い、同社のプロトコールに従って解析した。mRNA の発現は、total RNA を抽出し real-time RT-PCR 法で解析した。cDNA は、Gateway ベクターにクローニングした後、各種の発現ベクターを作製した。

【結果】心エコーにおいて、P0 では左室壁が肥厚していたが、左室拡大は認めず求心性肥大を形成していた。それに対し V0 では、左室壁の肥厚は軽度であったが、左室は拡大し遠心性肥大を呈していた。また左室/体重比は両群共に有意に上昇していた。DNA chip 解析では、ANP、BNP、metallothionein-1、LOXL、biglycan、skeletal α -actin などの遺伝子群が両肥大群で増加していた。また V0 や P0 で特異的に発現変化を認める遺伝子群が同定された。これらのうち GMP reductase など 4 つの遺伝子発現変化を real time-PCR で確認した。今回はこれらの遺伝子のうち、両肥大心で著明な発現増大がみられた LOXL に注目して解析を行った。P0 で LOXL mRNA 発現の time course を検討したところ、Day 1 に強い発現亢進がみられ、その後やや発現レベルが低下した後、徐々に再度発現が亢進した。従って、肥大反応早期と完成期にピークがある二相性発現がみられることが示された。H9C2 細胞と初代新生児培養心筋細胞を用いた検討では、Gq 依存性アゴニスト、特にエンドセリン-1 で強い発現亢進がみられた。HEK293 細胞に LOXL に発現させると lysyl oxidase 酵素活性亢進がみられた。またエンドセリンの添加でも、培養上清中で酵素活性上昇が確認された。現在、肥大心筋における LOXL の役割についても検討中である。

【総括】V0 と P0 とで同じように変化する遺伝子群や異なった発現パターンを示す遺伝子群を同定した。LOXL は、肥大心での発現が亢進しており、特にエンドセリンがそれに関与する可能性が示唆された。

17. アンジオテンシン II による心筋障害に対する鉄の関与

東京大学大学院医学系研究科 循環器内科

石坂 信和、永井 良三

【目的】ヘモクロマトーシスやアントラサイクリンによる心筋障害の機序として、心臓への鉄負荷が関与することが報告されている。われわれは、アンジオテンシン II 持続投与による心筋線維化への鉄の関与について検討した。

【方法】ラットに浸透圧ミニポンプを使い、アンジオテンシン II (0.7 mg/kg/日) を 7 日間持続投与した。鉄のキレート剤として、デフェロキサミン (200 mg/kg/日) を皮下注により投与した。

【結果】アンジオテンシン II 投与により、右室有意に心筋の線維化を生じた。この現象は、ロサルタンで完全に抑制されることから、AT₁ 受容体を介していると考えられた。線維化を生じている肉芽腫様病変部においては、鉄およびフェリチン陽性の細胞を散見し、大多数は免疫学的に、単球系の細胞であることが明らかになった。アンジオテンシン II 投与モデルへ、さらにデキストラン鉄を投与し鉄負荷をかけると、心筋障害部位の拡大とともに、myofibroblast への鉄の取り込みも認められた。In situ hybridization による検討では、TGF- β 1 の発現は、血管壁、単球系の細胞、myofibroblast において亢進していた。デフェロキサミンの投与により、血中 8-epi-プロスタグランディン F₂ α の濃度が低下することから、デフェロキサミンはアンジオテンシン II による生体酸化ストレスレベルを減少すると考えられた。デフェロキサミン投与は、心臓におけるフェリチン発現および鉄沈着を減少し、さらに心筋線維化も有意に抑制した。一方、デフェロキサミンの投与は血行動態や、血中アルドステロン濃度に影響を与えなかった。Northern blot ではデフェロキサミンがアンジオテンシン II による TGF- β 1、コラーゲンの mRNA の発現を抑制することが示された。さらにデフェロキサミン投与は、心での MCP-1 発現も減少させた。アンジオテンシン II により心臓へ沈着した鉄の由来は不明であるが、DMT-1 や Ferroportin などの鉄代謝関連遺伝子の発現はアンジオテンシン II によって影響を受けていなかった。

【総括】アンジオテンシン II による心筋線維化の促進因子として心臓への鉄沈着および、それによる酸化ストレスレベルの亢進が関与している可能性が示唆された。

18. 心不全発症・増悪因子としての耐糖能異常

国立循環器病センター

金 智隆、廖 禹林、小粥 章子、明石 雅史、瀬口 理、分野 正敢、
山本 博之、岡崎 英俊、北風 政史

【背景】従来、耐糖能異常は動脈硬化の原因となり虚血性心疾患を引き起こすことにより、心不全の悪化因子であると考えられてきた。しかし、近年一時的な血糖レベルの増加が酸化ストレスなどを介し生体に様々な悪影響を及ぼすことが報告されていることから、我々は耐糖能異常（糖尿病・I G T）が心不全の病態を悪化させる直接的な原因の一つではないかと考えこの研究を行った。

【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 α 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。

【結果】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/体重量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/体重量比、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・I G T 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 I F G 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。このことから一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、 α 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。

19. 心筋梗塞急性期および亜急性期における TNF- α の役割

九州大学大学院医学研究院循環器内科学 久保田 徹

門田欣也、河野俊一、筒井裕之、砂川賢二、竹下 彰

【目的】 不全心では TNF- α を始めとする炎症性サイトカインの発現が亢進しており、心不全の病態において重要な働きを担っていることが示唆されてきた。しかし、近年施行された慢性心不全患者を対象とした抗 TNF 療法の大規模臨床試験では、可溶性 TNF 受容体 (RENEWAL) と抗 TNF 抗体 (ATTACH) の何れも無効であった。むしろ、高用量の抗 TNF 抗体は、慢性心不全患者の死亡と心不全増悪による入院を有意に増加させ、有害であることが示唆された。本研究の目的は、心筋梗塞急性期および亜急性期における TNF- α の役割を明らかにすることである。

【方法】 8 週齢のオスのマウスの左冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作成した。TNF- α を中和する手段として可溶性 I 型 TNF 受容体を組み込んだアデノウイルス (AdTNFRI) を用い、LacZ を組み込んだもの (AdLacZ) を対照とした。＜急性期治療＞アデノウイルスを静注し、1 週間後に、マウスの左冠動脈を結紮した。＜亜急性期治療＞マウスの左冠動脈を結紮し、1 週間後に、アデノウイルスを静注した。

【結果】 ＜急性期治療＞梗塞サイズは、AdLacZ 群で 58.6 ± 2.2 (SD) %、AdTNFRI 群で $57.5 \pm 1.6\%$ と両群間に有意差を認めなかった。冠動脈を結紮して 2 週間後までに、AdLacZ 群で 43 匹中 19 匹が、AdTNFRI 群で 43 匹中 29 匹が死亡し、AdTNFRI 群の予後が有意に不良であった ($p < 0.05$)。特に、左室自由壁破裂が、AdLacZ 群では 7 匹であったのに対し、AdTNFRI 群では 18 匹と有意に増加していた ($p < 0.01$)。＜亜急性期治療＞冠動脈結紮後 4 週間までに、AdLacZ 群で 33 匹中 4 匹が、AdTNFRI 群で 35 匹中 9 匹が、うっ血性心不全のために死亡した ($p = 0.16$)。AdLacZ 群に比べて AdTNFRI 群では、左室拡張末期径の有意な拡大 ($5.58 \pm 0.05\text{mm}$, $6.03 \pm 0.06\text{mm}$, $p < 0.01$)、短縮率の有意な低下 ($14.2 \pm 0.2\%$, $11.4 \pm 0.3\%$, $p < 0.01$)、左室拡張末期圧の有意な上昇 ($9.6 \pm 1.8\text{mmHg}$, $14.2 \pm 2.2\text{mmHg}$, $p < 0.05$)、左室重量の有意な増加 ($122.6 \pm 1.6\text{mg}$, $135.5 \pm 2.2\text{mg}$, $p < 0.01$) を認めた。

【総括】 心筋梗塞急性期に TNF- α を中和すると心室破裂が増加し、亜急性期に中和すると左室リモデリングの促進と心機能の低下が認められた。TNF- α は、心筋梗塞急性期および亜急性期において、心保護的に作用している可能性が示唆された。

20. 圧負荷における STAT6-Tristetraprolin 経路による TNF- α 発現調節を介した保護的効果の検討

大阪大学医学系研究科病態情報内科学

大津欣也、彦惣俊吾、堀正二

【目的】 TNF- α は心不全の発症に重要な役割を果たしていることが知られている。TNF- α の発現レベルは産生と分解のバランスによって規定されているがその機序および心不全発症における役割については不明である。RNA 結合蛋白の一種である Tristetraprolin (TTP) は、STAT6 依存的に誘導され TNF- α mRNA を不安定化しその産生を抑制することが知られている。今回我々は STAT6 欠失マウス (STAT6^{-/-}) を用いて、圧負荷に対する in vivo での STAT6-TTP 経路の役割を検討した。

【方法】 STAT6^{-/-} および対照群 (野生型: WT) に胸部大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷モデルを作成し、表現型を検討した。

【結果】 ベースラインでの心機能は STAT6^{-/-} と WT の間に有意差を認めなかった。WT において TAC 1 週間後に STAT6 のリン酸化および核移行が認められ、STAT6 は圧負荷により活性化することが示された。TAC 1 週間後における左室拡張末期径、収縮末期径および肺重量は WT と比較し STAT6^{-/-} において有意に増加、左室短縮率は有意に低下しており、STAT6^{-/-} は圧負荷により心不全を発症していることが示された。TAC 後の心筋細胞のアポトーシスは WT と比較して STAT6^{-/-} で有意に増加していた。TNF- α mRNA の発現レベルは、WT では TAC 後に一過性の増加を認めたのみであったが STAT6^{-/-} では持続的な増加を認め、この持続的な TNF- α の増加が心筋細胞のアポトーシスに関与していることが示唆された。TAC 後 24 時間における TTP の発現は WT では sham 群と比較して有意に増加していたが STAT6^{-/-} では増加は認められなかった。ラット新生仔単離心筋細胞におけるエンドセリン-1 による TTP プロモーターの活性化は STAT6 依存的であった。以上より、圧負荷に対する TTP 発現誘導の欠如による TNF- α の持続的な増加が STAT6^{-/-} における心不全発症の原因である可能性が示唆された。

【総括】 STAT6 は心臓において TTP の発現の誘導を介して圧負荷に対して保護的な効果を発揮していると考えられた。この TNF- α の産生調節のメカニズムが、心不全の新たな治療法のターゲットになりうる可能性がある。

21. 心筋症モデルの病態と治療への応用

国立循環器病センター臨床検査部病理

池田善彦

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部遺伝子改変研究室

荒井勇二

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

由谷親夫

【目的】不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子の一つであるプラコグロビン遺伝子に変異を導入することにより、疾患モデルマウスを作製し、その病態解明を行うとともに、治療法を含めた研究への応用を目的とする。

【方法】ヒトプラコグロビン遺伝子を参考にして、マウス ES 細胞から cDNA、ゲノムを PCR によりクローニングし、ターゲッティングベクターを作製する。これを用いて ES 細胞のプラコグロビン遺伝子を改変する。

【結果】ヒトのゲノム構造を参考にしてマウス ES 細胞のゲノムのクローニングを試みたが、一部クローニングできない領域があったため、後半のゲノムを用いターゲッティングベクターを作製した。これを用いて、ES 細胞のプラコグロビン遺伝子の改変を行った。

【総括】これまで心筋症の原因遺伝子として収縮蛋白質、細胞接着に関わる蛋白質、細胞骨格等が明らかにされてきている。最近、不整脈源性右室心筋症の原因遺伝子として介在板を構築する遺伝子が明らかにされてきた。そこで、我々はその原因遺伝子一つであるプラコグロビン遺伝子に変異を導入することにより、モデル動物の作製を試みた。現在、遺伝子改変を行った数個の ES 細胞クローンを得て、キメラマウスの作製を行っている。

[病態・治療：遺伝子・関連分子Ⅱ]

22. 心不全を呈する拡張型心筋症患者の病態形成には Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 、および PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) が関与する

東京女子医科大学循環器内科学・病理学

田中 薫、迫村康成、松田直樹、西川敏郎、笠貫 宏、川名正敏

【目的】心筋細胞のエネルギー代謝、炎症制御に関わるとされる、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 、および PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) の心不全病態形成への関与を明らかにする。

【方法】対象は、左室補助装置 (LVAD) 挿入時及び心移植時に採取した 12 名の重症心不全を呈した拡張型心筋症症例の左室心筋 (LVAD を装着し、減負荷可能症例 2 例の検体を含む)、及び代償性心不全を呈す 16 名の心筋生検検体、コントロールとして心筋病変のない 6 名の検体を用いた。重症心不全症例については、RT-PCR にて、PPAR γ および PGC-1 の発現を検討し、また Trans AM Kit を用いて、PPAR γ の定量を行った。また生検例を含めた全症例で、PPAR γ の免疫染色を行った。PPAR γ 陽性細胞数と心不全の臨床マーカーである BNP、high-sensitive CRP の相関を検討した。

【結果】重症心不全例で、PPAR γ 、PGC-1 の発現を認めた。コントロールで、PGC-1 の発現は認めたが、PPAR γ の発現は認められなかった。LVAD を装着し、減負荷を得た症例 2 症例で、PPAR γ および PGC-1 の発現は著明に低下した。PPAR γ 活性化は、重症心不全期と比較して、コントロール及び LVAD 離脱時に低値となった。(P<0.05) 染色では全 DCM 例で心筋細胞核内 PPAR γ が陽性であり、非代償性心不全例 12 例、代償性心不全 16 例、及びコントロール 6 例の陽性細胞数は 3 群間で有意な差を認めた。(P<0.0001) また high-sensitive CRP と PPAR γ 陽性細胞数に有意な正相関を認めた。(R=0.72)

【総括】PPAR γ および PGC-1 は心不全を呈する拡張型心筋症患者の心筋細胞核内に発現し、病態形成に関わると考えられた。

23. *in vivo* 高血圧肥大心における PPAR α 刺激薬 (fenofibrate) の心筋線維化と左室拡張能に対する検討

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 病態制御医学 循環器内科

小形岳寛、宮内卓、下條信威、増澤浩一、山口巖

【目的】肥大型心筋症はその経過中に心筋の線維化をきたし、これが左室拡張能低下の一因となっていると考えられる。また、PPAR α 欠損は線維化を亢進させることが *in vivo* で報告されている。本研究にて、高血圧肥大心において PPAR α 刺激薬の長期経口投与が心筋線維化を抑制し、さらに線維化抑制が起こるならば左室拡張能が保たれるかを検討した。

【方法】高血圧肥大心線維化のモデルである DOCA-salt ラットに PPAR α 刺激薬の一つである fenofibrate (80 mg/kg/day) を5週間投与を行った群と、vehicle 投与を行った群で、拡張能・線維化の評価として血行動態、Masson trichrome 染色、hydroxyproline 定量、RT-PCR による procollagen mRNA 発現を比較した。その後、NF κ B と AP-1 の2つの経路について RT-PCR、Western blot、EMSA を行い、それらの作用機序を検討した。

【結果】fenofibrate 投与の有無で血圧、左室重量、収縮機能に差は認められなかった。しかし、拡張能の指標である LVEDP、 $-dP/dt/P$ は fenofibrate 投与により有意に改善した。左室コラーゲン染色、hydroxyproline 定量、procollagen I & III mRNA 発現という線維化の指標の比較においても fenofibrate 投与によって有意な抑制が認められた。NF κ B は炎症性サイトカインの産生増加に関与しており、NF κ B の binding activity、NF κ B の抑制蛋白である I κ B α の蛋白発現の他に、炎症性サイトカインの mRNA 発現を検討した。その結果、fenofibrate は IL-6、COX-2、VCAM-1、MCP-1 mRNA 発現、NF κ B 活性のいずれも有意に抑制し、同時に I κ B α 蛋白量を増加させた。AP-1 は endothelin (ET)-1 や ET-B 受容体の mRNA 発現を亢進するという報告があり、これらの発現の増加は線維化の亢進に関与すると報告されている。対照投与群では ET-1、ET-B 受容体の mRNA 発現は有意に増加していたが、fenofibrate 投与により有意に抑制された。

【総括】高血圧肥大心ラットモデルにおいて、PPAR α 刺激薬である fenofibrate は心筋線維化を抑制し左室拡張機能障害の増悪を抑制した。この効果の一部は、炎症に関与する NF κ B の抑制と ET-1 産生に関与する AP-1 の抑制の2つの作用から相乗的に引き起こされている可能性が示唆された。

24. Protein Phosphatase 1 Inhibitor-2 の心筋遺伝子導入は心筋症ハムスターの左室機能を改善する

山口大学医学部器官制御医科学講座 循環病態内科学¹ 分子脈管病態学²

池田 安宏²、山田 倫生^{1,2}、青木 浩樹²、吉村 耕一²、矢野 雅文¹、
松崎 益徳¹

【目的】心筋細胞において筋小胞体の Ca^{2+} cycling は Ca^{2+} 調節蛋白のリン酸化により調節されている。カテコラミンによる β 受容体の刺激は Protein kinase A (PKA) を活性化し、L 型 Ca チャンネル、リアノジン受容体 (RyR)、 Ca^{2+} -ATPase の阻害因子であるホスホランパン (PLN) をリン酸化し、 Ca^{2+} cycling を亢進させる。一方、Protein phosphatase type1, 2A はこれら Ca^{2+} 調節蛋白を脱リン酸化し Ca^{2+} cycling を抑制的に制御している。近年、慢性心不全で過剰な Protein phosphatase type1 (PP1) の活性上昇とそれに伴う PLN のリン酸化低下が Ca^{2+} cycling を低下させ病態進行に直接関わっていることが示唆されている。今回我々は、UMX7.1 心筋症ハムスターにおいて、心臓での PP 活性の変化・ Ca^{2+} 調節蛋白のリン酸化が心筋症の進行や加齢によりどう変化するかを検討し、さらに PP1 の特異的阻害因子である PP1 inhibitor-2 (I-2) を心臓特異的に発現させた際の心不全進行への影響を検討した。

【方法】UMX7.1 で心筋症の進行に対応して 6, 10, 28 週齢の時点で正常ゴールデンハムスターを対照として PP 活性、PKA 活性、蛋白発現を経時的に測定・心機能との相関を検討した。次に、14 週齢の UMX7.1 ハムスターに I-2 および lacZ 遺伝子をアデノウイルスベクターによる高効率心筋遺伝子導入法を用いて導入し、心機能・PP 活性・PKA 活性の変化を検討した。

【結果】UMX7.1 ハムスターでは心機能低下に伴う代償性心肥大期 (10 週齢) では正常ハムスターと比較し PP1 および PKA の活性は上昇し、RyR (S2809)・PLN (S16) のリン酸化も上昇していた。また左室機能が高度に低下し、左室拡張末期圧が上昇を呈した 28 週齢でも PP1 および PKA の活性は上昇していた。

心筋への I-2 遺伝子の導入 7 日後、有意な左室機能の改善を認め、心筋での BNP の発現は減少した。また、I-2 遺伝子導入群では PLN の baseline のリン酸化は上昇していたが、PKA 活性は lacZ 導入群より減少しており、血中カテコラミン濃度も低い傾向が見られた。遺伝子導入後の RyR (S2809) リン酸化には変化がみられなかった。

【総括】UMX7.1 ハムスターでは心筋症の進行過程での PP1 および PKA 活性の上昇は、この心筋症モデルの心機能増悪の一因になっていると考えられる。PP1 の活性の上昇は、PLN のリン酸化の低下と直接相関せず、PKA 活性上昇の代償反応であると考えられた。PP1 の特異的阻害因子の心筋への導入は、PKA 活性を上昇させることなく PLN リン酸化を上昇させ、心筋障害を助長することなく左室機能を改善可能であると考えられる。PP1 の阻害は、心不全治療の標的として有望である。

25. ラミニン γ 1 鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討

東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部

鈴木英明、武田信彬

東京慈恵会医科大学DNA研究所

荒川泰弘、伊藤正紀

【目的】細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンの変化を遺伝子レベルで検討する。

【方法】細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは、高血圧症、拡張型心筋症、糖尿病において心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的に増加し、組織の硬化を招くとされている。我々はその病因の解明の一助として、マウスとヒトのラミニン γ 1 鎖プロモータープロモーター領域に両種に共通して存在する DNA エlement (bcn-1) を見出した。そして bcn-1 エlement は、血管平滑筋細胞核抽出液を用いてゲルシフトアッセイにて PMA や TGF- β などに誘導され、さらに、ラミニン γ 1 鎖プロモーターの転写を強く促進することを報告した (H. Suzuki, J Biol Chem, 1996)。そこで、bcn-1 エlement に結合する転写因子を見出すためにイーストのワンハイブリッドシステムを用いて心筋由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを施行した。

【結果】スクリーニングにより bcn-1 エlement に転写因子 TFE-3 ならびに Smarcelr が結合することが判明した。さらに、TFE-3 は TGF- β により誘導され、ラミニン γ 1 鎖プロモーター領域に存在する SBE (Smad binding element) を介して Smad 蛋白を結合しラミニン γ 1 鎖プロモーターを活性化することが解った (Y. Kawata & H. Suzuki, J Biol Chem, 2002)。また、Smarcelr は、ノーザンプロットにて mRNA が心筋に強く発現しており、さらに PMA により誘導され、ラミニン γ 1 鎖プロモーターを活性化することが同様に解った。

【総括】bcn-1 エlement は TGF- β 、PMA などに誘導され、TFE-3 ならびに Smarcelr を介してラミニン γ 1 鎖プロモーターを活性化する Element であり、その心筋症等における心筋組織のラミニン増加への関与が示唆された。

26. 心筋細胞肥大とアポトーシスにおける myocardin の役割の検討

神戸大学大学院医学系研究科 循環呼吸器病態学講座

小林成美、上山知己、川嶋成乃亮、河合美樹、杜隆嗣、横山光宏

【目的】心臓は外部からのストレスに対して代償的に肥大し、破綻する心不全へ移行すると考えられている。不全心筋ではアポトーシスが増加しているとの報告があるが、肥大とアポトーシスの関係は解明されていない。myocardin は心筋細胞と平滑筋細胞に選択的に発現しており、SRF と結合し SRE を活性化する転写因子である。我々は胎生期の心筋細胞分化において myocardin の機能が重要であることを報告しているが、生後の心筋細胞における myocardin の役割は未だ明らかではない。今回我々は心筋細胞肥大とアポトーシスにおける myocardin の関与を検討した。

【方法】myocardin の wild-type と dominant negative (DN) 変異体を発現する組み換えアデノウイルスを作成し、新生仔ラットの培養心筋細胞を用い実験を行なった。

【結果】心筋細胞において myocardin の過剰発現により、ANF mRNA の発現が誘導され、myocardin の dominant negative 変異体により、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体刺激剤である phenylephrine (PE) による ANF mRNA の発現は抑制された。また、myocardin により ANF プロモーターは活性化され、DN 変異体により PE による ANF プロモーターの活性化は抑制されることより、myocardin は心筋細胞において転写レベルで ANF mRNA の発現を制御していることが明らかとなった。さらに、myocardin の過剰発現により心筋細胞において $[3H]$ leucine の取り込みや細胞の表面積の増加がみられ、DN 変異体により PE による同様の肥大効果は抑制された。次に cell death assay において、培地からの血清除去により誘導された心筋細胞死は myocardin の過剰発現により抑制された。アポトーシスの関与を TUNEL assay で検証したところ、myocardin を過剰発現させた心筋細胞ではコントロールに比し TUNEL 陽性細胞が少なく、逆に DN 変異体で増加がみられ、それは心筋細胞内の caspase 3 活性と比例した。また PE の刺激により DN 変異体感染細胞では TUNEL 陽性細胞が増加していた。

【総括】myocardin は生後の心筋細胞において肥大に関与しているが、一方で anti-apoptotic に働いており、心筋肥大から心不全にいたるメカニズムに重要であると考えられた。

[再生医療]

27. 造血系サイトカイン G-CSF は心筋梗塞慢性期心不全を改善する

岐阜大学大学院医学研究科循環病態学（第二内科）

竹村 元三、李 一文、岡田英志、宮田周作、江崎正泰、丸山留美、
金森寛充、李 龍虎、Ngin Cin Khai、三上 敦、湊口信也、藤原久義

【目的】顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）は骨髄由来幹細胞を末梢に動員することにより梗塞後の心筋再生を促進し心機能を改善することが報告されているが、近年心筋細胞再生以外の G-CSF の有効性のメカニズムが示唆され、われわれもウサギ心筋梗塞モデルで G-CSF の修復機構の促進作用を報告した。今回マウス慢性期心筋梗塞モデルを用いて、G-CSF 後投与の慢性心不全に対する有効性を検討した。

【方法と結果】12週令雄 C57BL/6 マウスの左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作製し、梗塞後12週目より G-CSF 10 µg/kg/day を5日間連続皮下注射2日間休薬し、4週間続けた。コントロール群には同量の vehicle を同様に投与した。心エコーならびに心臓カテテル検査にて、梗塞16週後の心機能ならびに左室リモデリングは G-CSF 群で有意に改善がみとめられた。また G-CSF 群において残存心筋細胞の有意な肥大が認められた。両群間で梗塞サイズに差はみられなかったが、G-CSF 群で残存心筋における線維化の軽減、matrix metalloproteinase-2 の発現亢進がみとめられた。ウェスタンブロットならびに免疫組織化学にて、梗塞心で G-CSF 受容体(G-CSFR)の発現亢進が残存心筋細胞にみられたが、その程度はコントロール群に比し G-CSF 群でより高度であった。さらに Akt ならびに phospho-Akt の発現亢進が G-CSF 群でみとめられた。次に GFP マウスの骨髄細胞を移植したキメラモデルで心筋梗塞を作製したところ、梗塞16週後においてコントロール群、G-CSF 群ともに骨髄細胞由来心筋細胞は認められなかった。

【結論】G-CSF は心筋梗塞慢性期心不全を改善した。その作用機序として心筋細胞再生ではなく心筋細胞肥大や心筋線維化の軽減が示唆された。

28. 骨髄移植モデルマウス実験から見た心筋再生

慶應義塾大学医学部循環器内科

福田恵一

【目的】骨髄には造血幹細胞、間葉系幹細胞等の異なる幹細胞が存在する。急性心筋梗塞症に際して、如何なる幹細胞が心臓細胞の再生あるいは梗塞巣のリモデリングに関与するかを明らかにする。

【方法】GFP transgenic mouse より①全骨髄細胞（造血幹細胞+間葉系幹細胞）あるいは②KSL-SP 方による単一の造血幹細胞を致死量の放射線を照射したマウスに骨髄移植した。③骨髄間葉系幹細胞株である CMG 細胞を GFP でマーキングし、放射線照射したマウスに radioprotective cell とともに脛骨内に骨髄内骨髄移植を行った。骨髄が快復後に心筋梗塞を作成し、GCSF を 10 日間投与した。2 ヶ月後に梗塞巣を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、いずれの細胞が再生心筋細胞の作成能力があるかを観察した。

【結果】全骨髄移植群、単一造血細胞移植群とも梗塞巣に多数の線維芽細胞細胞の浸潤を認めた。しかし、GFP 陽性の心筋細胞は全骨髄細胞のみに観察され、造血幹細胞を移植した群では細胞融合と考えられるごく少数の例外を除いて心筋細胞は観察されなかった。間葉系幹細胞を移植した群では脛骨内に生着した細胞を認め、一部の細胞は骨芽細胞、脂肪細胞に分化していた。心筋梗塞を作成したところ、梗塞巣内に GFP 陽性の心筋細胞を観察した。

【結論】心筋梗塞時の心筋細胞の再生には造血幹細胞は線維芽細胞の供給源として働くが、心筋再生には関与しない。これに対し、間葉系幹細胞は心筋再生に関与すると同時に、GCSF により梗塞巣に動員されることが明らかとなった。