

29. 心筋 side population 細胞による心筋再生へ向けた基礎的検討

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 永井敏雄

小山知美、小室一成

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。心臓移植は根治的治療であるが、ドナー不足という問題を恒常的に抱えている。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。

【目的】我々はこれまでに成体の内在性心筋幹細胞として心筋 Sca-1 陽性細胞がオキシトシンにより *in vitro* で自律拍動する心筋細胞に分化することを報告した。今回、我々は心筋の未分化な細胞分画である side population (SP) 細胞から自律拍動する心筋細胞への分化誘導を試みた。

【方法】新生仔ラット心筋を単離後に Hoechst 33342 で染色し、FACS による染色性の低い分画であり、50 μ M の verapamil 処理により消失する分画を心臓 SP 細胞として分取した。

【結果】RT-PCR 法により新生仔ラット心臓、SP 細胞には Bcrp1 mRNA の発現が認められ、免疫染色法により SP 細胞表面に Bcrp1 蛋白の発現が認められた。オキシトシン 100nM を添加した培養液で心臓 SP 細胞を培養したところ、培養 4 週間後に一部の細胞に自律拍動が認められた。RT-PCR 法および免疫染色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および蛋白の発現と緻密なサルコメア構造が確認された。*in vitro* における多分化能を検討した結果、心臓 SP 細胞は特異的な分化誘導により骨細胞および脂肪細胞へ分化した。

【結論】Sca-1 はマウスにしか存在しない細胞表面抗原であるが、SP 細胞はヒトの心臓を含む種々の臓器に存在する。今後、心臓 SP 細胞におけるオキシトシンの役割を解析することは、内在性の心筋幹細胞分化誘導による治療法の確立に重要である。

30. 拡張型心筋症における再生医療 ー骨格筋芽細胞(SMb1)移植による心不全治療(II)ー

東京大学医学部 器官病態内科

豊岡 照彦、手塚 あさき、海老澤 崇

新潟大学病院 薬剤部

河田 登美枝

新潟大学 医用工学科

中澤 幹夫

【目的】重症心不全の根本治療には責任遺伝子が同定されている時は、原因遺伝子を強制発現させれば原因治療となる(Kawada *et al.*, *PNAS* 2002)が、不可逆的な心筋変性による remodeling が著しく進んだ末期心不全状態では新たな対応が求められる。今回は予備検討として正常動物、F1B、骨格筋由来の(SMb1)を δ -sarcoglycan (SG)遺伝子欠損 T0-2ハムスター(Sakamoto *et al.*, *PNAS* 1997)に細胞移植後の病理像を検討する。なお、F1BとT0-2の同種、異系動物の間で、拒絶反応を呈さないことは前回の当会議で報告した。

【方法】4-5週令の正常対照F1Bハムスター、大腿4頭筋より既報に従い採取、培養増殖し、これに細胞膜をDiIで、また核をDAPIで染色後に10-15週令のT0-2、前径骨筋に10⁶個投与した。5週後に同筋の病理像をDiIで、DAPIと細胞膜確認用のdystrophin抗体で蛍光3重染色して検索した。

【結果】donorから移植されたSMb1は多数前径骨筋に発現した。細胞膜の一部はDiIで赤く斑に染まり、同じ細胞膜の他の部分はDiIで染まらなかったが、DAPIで青く明瞭に染まった。また投与部位近傍の細胞はDiIで染まらない場合でも、DAPIで染まった。更に、投与部位から離れた部位や他側の前径骨筋ではDAPIで全く染まらず、donor由来である事も示された。また骨格筋の場合、週令が進んでもdystrophinの細胞膜から細胞質へのtranslocation(Toyo-oka *et al.*, *PNAS* 2004)も認めなかった。

【総括】donorから移植されたSMb1は効率良くrecipientの骨格筋に生着し、細胞分裂する事が示された。この結果は昨年報告したWestern blottingによるmyosinの定量結果とも一致して、分裂後の筋芽細胞から筋細胞への分化する事が立証された。

31. 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

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

清水達也、関根秀一、磯井由紀、岡野光夫

【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。

【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、コネキシン 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。

【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キシン 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。

【総括】 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が示唆された。

別添資料(2)

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

特発性心筋症に関する調査研究班

平成16年度 第2回班会議

抄録集

日 時：2005年2月4日(金) 9:55～16:15

会 場：北海道大学学術交流会館

[病態・診断:自己免疫・心筋炎I]

1. 抑制性G蛋白シグナル阻害による実験的自己免疫性心筋炎の両方向性修飾効果とその機序の解明

北里大学医学部 内科学Ⅱ 猪又孝元

中野浩成, 西井基継, 品川弥人, 竹内一郎, 小板橋俊美, 竹端 均, 和泉 徹

【背景】交感神経 $\beta 2$ 受容体刺激は、心筋での炎症病態の重要な修飾因子になりうることが知られてきた。我々は、特に $\beta 1$ 刺激との反応性の差異に着目し、その下流シグナルでの抑制性 G(Gi) 蛋白の制御に局限した実験系を構築し、Gi 抑制が実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を両方向性に修飾しうることを前回の班会議で報告した。

【目的】Gi 阻害薬(百日咳毒素: PTX)によるEAMへの病態修飾効果について、その機序を解明する。

【方法】従来法に基づきEAMラットを作成した。PTXの投与時期により、ミオシン免疫と同時投与(導入期)および免疫後14日目(効果期)の2群に分けた。ラットは免疫後21日目に屠殺し、EAMの評価と心筋組織の病理学のおよびサイトカイン発現を検討した。一方、CM2特異的T細胞株(CTL)を尾静脈より静注することでEAMラットを作成し、免疫後9日目に屠殺し同様の評価を行った。また、CTLを静注前にin vitroでPTX処理したうえでの、心筋炎惹起能を検討した。

【結果】導入期におけるPTXの投与はEAMを悪化させたが、効果期およびCTL移入時での投与では逆にEAMを改善した(肉眼的心筋炎スコア(MS, PTX 0 vs. 4 μ g/匹)) 導入期 2.5 ± 1.0 vs. 4.0 ± 0.0 ; 効果期 3.2 ± 0.6 vs. 0.9 ± 0.9 ; CTL移入 3.2 ± 0.8 vs. 0.4 ± 0.7)。心筋組織中のサイトカイン発現では、IFN- γ が心筋炎スコアと負の、IL-10は正の相関傾向を示した。一方、CTLはPTX処理により細胞増殖能には変化を来さなかったが、細胞移入による心筋炎惹起は有意に抑制された(MS: 3.1 ± 0.5 vs. 2.4 ± 0.9)。

【結論】PTXはその投与時期により、EAM発症に対して反対方向の修飾効果を示した。効果期のGi阻害は、EAM惹起の主体を担うTリンパ球の増殖を変化させず、局所接着および遊走の抑制をきたしたことが想定された。G蛋白シグナルは、心筋組織炎症の免疫制御において多様な修飾効果を有すると考えられる。

2. Negative Costimulatory Pathwayを調節することによるマウスの慢性心筋炎の誘導および心筋障害における血清中自己抗体の関与

東京大学大学院医学系研究科循環器内科 世古義規、永井良三

順天堂大学医学部免疫 八木田秀雄、奥村 康

順天堂大学医学部生体分子 藤村 務、高ひかり、村山季美枝

【目的】PD-1/PD-1 ligand を介する経路はT細胞の活性化に抑制的に作用することが知られている。我々は先に、マウスのウイルス性心筋炎において心筋細胞上にPD-L1の発現が誘導され、抗PD-1抗体のin vivo投与により心筋障害が増強されることを報告した。CTLA-4はB7のレセプターでありCD28と競合的に作用してT細胞の活性化に抑制的なシグナルを媒介するとされる。そこで、これらのnegative costimulatory pathwayの心筋炎における役割を検討した。

【方法】C3H/HeマウスにCoxsackieB3virus (CVB3)を接種して急性心筋炎を作成し、①心筋組織におけるCTLA-4の発現を免疫組織染色にて解析した。②マウスを4群に分けウイルス接種後、A群にはcontrolとしてrat IgGを、B群には抗PD-1抗体を、C群には抗CTLA-4抗体を、D群には(抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体)をin vivoに投与した。③ウイルス接種8週後に屠殺し、HE染色にて心筋障害を評価した。④各群のマウスより採取した血清を用いて、正常のマウスの心筋組織を免疫組織染色した。⑤培養心筋細胞より(核、細胞膜、細胞質)の各成分を分離抽出してSDS-PAGEにて泳動後、各群のマウスより採取した血清を用いてWestern blotを行った。

【結果】①CTLA-4は急性期の浸潤細胞に強く発現され、その周辺の心筋細胞上に軽度(～中等度)の発現が誘導された。②rat IgGを投与したcontrol群ではウイルス接種8週後の心筋にはごく軽度の炎症を認めるのみであったが、(抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体)を投与した群では広範な炎症巣が認められた。それぞれの抗体の単独投与群では併用投与群に比べて炎症の程度は軽度であった。③control群のマウスの血清により正常の心筋組織はほとんど染色されなかったが、併用投与群のマウスの血清により心筋細胞膜が明らかに染色された。④Western blotでは、併用投与群のマウスの血清により培養心筋細胞の細胞膜と核成分において200kD付近に明らかなbandが認められたが、control群の血清ではごくわずかの反応しか認められなかった。

【総括】PD-1とCTLA-4の2つのnegative costimulatory pathwayを阻害することにより心筋炎の慢性化が誘導されたことから、これらの経路は炎症の終息に重要な役割を果たしていると考えられた。また、慢性化した心筋炎マウスの血清中には自己抗体が存在し、心筋細胞膜・核由来の何らかの抗原を認識していることが明らかとなったことから、これらの自己抗体が心筋障害の進展に関与していることが示唆された。現在、質量分析計により自己抗体が反応する抗原を同定している。

3. 拡張型心筋症患者における『心抑制性抗心筋自己抗体』のニワトリ胚による抗原同定

北里研究所病院内科*、慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科

馬場彰泰*、吉川勉、島田恵*、赤石誠*、土本寛二*、小川聡

【背景】拡張型心筋症(DCM)患者に対する免疫吸着療法の急性ならびに慢性効果が証明されつつあるが、特に『心抑制性抗心筋自己抗体』の有無が本治療法の効果を左右する重要な臨床指標であることが報告された。しかし如何なる抗原に対する自己抗体が『心抑制性』であるかは不明であり、また心筋培養細胞を使用した検査法しか存在しなかったため簡易検査法の開発が望まれていた。

【目的】(1)抗心筋自己抗体の『心抑制作用』をスクリーニングする方法としてニワトリ胚の心エコー検査法を確立し、(2)既知の自己抗原のいずれが『心抑制性作用』を有するかを明らかにする。

【方法】DCM患者104例の保存血清を使用した。既報告のとおり、抗心筋自己抗体の陽性症例数は、間接蛍光抗体法39例、Immunoblotting法(IB)38例、抗ベータ1受容体(B)抗体40例、抗M2受容体(M)抗体42例、抗トロポミオシンI抗体16例、抗Na-K-ATPase(NKA)抗体26例であった。各血清からIgGを精製し、16日齢の有性鶏卵の気室より各々1mgずつ添加した。投与20分後に割殻し心エコー図検査にて左室駆出率を計測した。対照群として「生理的食塩水(生食)」、上記6種の方法では抗心筋自己抗体を検出しえなかった非DCMによる慢性心不全患者の「精製IgG」を、それぞれ10例ずつ設定した。『心抑制性抗心筋自己抗体』の有無により、各自己抗原の陽性率、および臨床背景(年齢、性別、NYHA心機能分類、左室駆出率、基本調律、不整脈)との関係を調査した。

【結果】有性鶏卵の左室駆出率(平均±標準偏差)は、生食群 $83.6 \pm 2.4\%$ 、非DCM精製IgG群 $83.2 \pm 2.4\%$ であった。左室駆出率60%未満を『心抑制作用あり』と定義すると、DCM患者104例($65.1 \pm 15.0\%$)のうち65例($53.7 \pm 2.3\%$)が、心抑制性自己抗体を有していた。各臨床指標で有意差($p < 0.01$)を認めたものは、IB抗体(31/38例)、B抗体(32/40例)、M抗体(35/42例)、NKA抗体(22/26例)のみであった。多変量解析を行うと、B抗体(オッズ比10.6[3.4~33.1])およびM抗体(オッズ比13.8[4.3~43.8])の2つのみが独立した危険因子であった($p < 0.01$)。

【結論】ニワトリ胚による簡易スクリーニング法により、本邦DCM患者の63%に『心抑制性抗心筋自己抗体』が検出された。多くの抗心筋自己抗体の中でも、ベータ1アドレナリン受容体ならびにM2ムスカリン受容体に対する自己抗体が、この『心抑制性』に関与している可能性がある。

4. マウス心筋梗塞後リモデリングにおけるNF- κ B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

河野 俊一、門田 欣也、砂川 賢二、竹下 彰

【目的】NF- κ Bは、炎症反応の中心的な転写因子であり、ヒトの不全心において活性化されている。我々は、これまで、心筋特異的TNF- α 過剰発現マウスやアンジオテンシン持続注入マウスを用いて、NF- κ Bの活性化が心筋の肥大や線維化において促進的に作用していることを明らかにしてきた。本研究の目的は、マウス心筋梗塞モデルを用いて、心筋梗塞後リモデリングにおけるNF- κ B活性化の役割を明らかにすることである。

【方法】生体内で長期的・選択的にNF- κ Bの活性化を抑制する手段として、NF- κ B (p50) ノックアウトマウスを用いた。8-14週齢の雄マウスの左冠動脈を結紮し、死亡率、心機能、組織像、JNKのリン酸化、TNF- α の発現について、野生型マウスと比較検討した。

【結果】心筋梗塞後24時間の梗塞部および7日後の非梗塞部心筋においてEMSAを施行し、野生型マウスで認められたNF- κ Bの活性化が、NF- κ Bノックアウトマウスでは完全に抑制されていることを確認した。両群間で心筋梗塞サイズに有意差はなく、急性期の死亡率についても同程度であった。しかし、心筋梗塞後7日以降も観察を継続したところ、野生型マウスでは心不全を発症し徐々に死亡していくのに対し、NF- κ Bノックアウトマウスでは死亡率の有意な改善を認めた。心筋梗塞後28日の時点で心エコーと左室内圧測定を行った。野生型マウスでは、左室内径の拡大と短縮率の低下、左室拡張末期圧の上昇と収縮期圧の低下を認めたが、NF- κ Bノックアウトマウスでは、それらが有意に抑制されていた。また、組織像では、野生型マウスでは心筋細胞の肥大と間質の線維化を認めたが、NF- κ Bノックアウトマウスではそれらが有意に抑制されていた。さらに、JNKのリン酸化についても、野生型マウスでは亢進していたものが、NF- κ Bノックアウトマウスではほぼ完全に抑制されていた。一方、梗塞部および非梗塞部におけるTNF- α の発現は、野生型マウスに比べ、NF- κ Bノックアウトマウスではさらに亢進していた。

【総括】マウス心筋梗塞モデルにおいて、NF- κ Bのノックアウトは、リモデリングの有意な抑制と生存率の改善をもたらした。NF- κ Bは、炎症反応だけでなく、心筋の肥大やリモデリングにおいても重要な役割を果たしており、心不全治療の新たな標的分子となりうることが示唆された。

[病態・診断:自己免疫・心筋炎Ⅱ]

5. テネイシンCの生体内機能とそれを利用した心筋組織改変治療の可能性

三重大学医学部病理 今中-吉田恭子、鈴木舞子、西岡朋弘、吉田利通

三重大学胸部外科 山本希誉仁、小野田幸治

三重大学脳神経外科 竹内拓、当麻直樹

国立国際医療センター腎臓循環器科 廣江道昭

【目的】細胞外マトリックス蛋白の一つテネイシンC(TNC)は、一般に正常生体組織では発現しないが、組織障害や炎症など組織リモデリングに伴って特異的に発現する。我々は、この性質を利用して、TNCが心筋疾患活動性の指標分子として実際の診断に有用であることを明らかにした。一方、TNCは強い生物活性を持ち、組織リモデリング時の細胞動態を制御する。しかし、これまでの培養細胞を用いた多くの実験により、細胞の種類によっては相反する結果を示すなど、作用機序は非常に複雑であると考えられている。我々は、TNCを利用した心筋組織修復治療の可能性を探るため、TNCの生体の心血管組織における生物作用の解明を試みた。

【方法】1. TNCノックアウトマウスを用いて、血管再狭窄病変モデルを作製し新生内膜形成を、あるいはangiotensinⅡ投与による高血圧心臓線維化マウスを作製し線維化の程度を野生型マウスと比較した。2. ラットを用いて作製した動脈瘤モデル内に、TNCコーティングプラチナコイルを留置し、血管内組織器質化反応をbFGFコートやコーティングしていないものと対比した。

【結果】TNCノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べ新生内膜での細胞増殖、細胞外基質の沈着が明らかに少なかった。また、angiotensinⅡ投与による心筋組織の血管周囲の膠原線維の増加も、野生型マウスより有意に少なかった。逆に、プラチナコイルに結合させ局所投与したTNCは、周囲への筋線維芽細胞の動員と膠原線維形成を著しく促進し、瘤腔内に器質化線維化性組織を形成し瘤を縮小した。

【総括】TNCは生体内で明らかに強い生物活性を示し、線維化促進作用を示す。したがってこのTNCを制御することにより、心筋組織構築を望ましい方向に改変できるのではないかと考えられる。

6. 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―

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、北浦 泰

三重大学医学部病理学 今中一吉田恭子、吉田利通

国立国際医療センター腎臓循環器内科 廣江道昭

北海道大学医学部付属病院循環器科 岡本 洋、筒井裕之、北畠 顕

【背景】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)と関連することを報告した。しかし、DCM患者におけるこれら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企画された。

【方法】1)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レベルを測定した。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ス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レベルの測定も行い両者の差(trans-cardiac gradient)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。

3)上記1)2)の結果につきを集計と統計解析を行った。

【結果】抄録作成時において統計解析が未完成の部分があり、班会議当日に結果を報告致します。

7. アイトープ標識化抗テネイシンC抗体による心筋組織再構築の非侵襲的評価法の開発

¹放射線医学総合研究所画像医学部、²千葉大学大学院薬学研究院 分子画像薬品学

³三重大学医学部 病理学、⁴千葉大学大学院医学研究院 循環病態医科学

⁵国立国際医療センター 腎臓・循環器科

小高謙一^{1,4} 上原知也² 今中一吉田恭子³ 足立清夏² 田所裕之¹ 吉田勝哉⁴

長谷川洋⁴ 小室一成⁴ 入江俊章¹ 棚田修二¹ 荒野 泰² 吉田利通³ 廣江道昭⁵

心筋梗塞や心筋炎になると、心筋組織が変化し、組織再構築を起こす。組織再構築の評価が心不全の悪化を予測する可能性が高く、早期診断が必要であるが、診断法が確立されていない。テネイシンC(TNC)は組織再構築の盛んな部位に一時的に発現するため、抗体をアイトープ標識し、組織再構築の活発な部分を評価した。

¹¹¹In-抗TNC抗体を心筋梗塞ラットと対照ラットに静注すると、心臓放射活性は心筋梗塞群で有意に高値を示した。オートラジオグラムでは顆粒球浸潤組織中の壊死部周辺に高い放射活性を認めた。2核種同時収集SPECT画像では¹¹¹In-抗TNC抗体の梗塞部集積が明瞭に示され、心筋血流の欠損部に一致した。

本研究では、アイトープ標識化抗TNC抗体が組織再構築の盛んな部位に集積することを証明し、非侵襲的評価法としての有用性を示した。臨床応用のため、低分子化抗TNC抗体を開発中である。

8. エプレレノンによる心筋リモデリング改善効果におけるオステオポンチン関与の可能性

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

菅原 武、岡本 洋、松井 裕、徐 祝潔、秋野正敏、筒井裕之

北海道大学遺伝子病制御研究所分子免疫分野

今 重之、上出利光

カレス札幌

北島 顕

【目的】 オステオポンチン(OPN)は、心筋障害時に炎症性細胞や線維芽細胞で発現し、これらの細胞の接着、走化性、増殖を調節して、細胞外マトリックスの制御と安定性に寄与する。本研究は、アンジオテンシンII(AII)負荷による心筋リモデリングの進展に対する、アルドステロン拮抗薬エプレレノンの効果を調べ、この効果にオステオポンチンが関与している可能性を考察した。

【方法】 野生型マウス(C57BL/6)および同系統のOPN遺伝子欠損マウス(OPN^{-/-})に、AII(2 μ g/kg/分)を、背部に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いて4週間投与し、さらに野生型群の一部では、エプレレノン(200mg/kg/日)を経口投与した。4週間後、各群で血圧、心エコーにより左室拡張末期径(LVDd)、%FS、c-IRTを測定した後にマウスを犠牲死させ、心重量/体重比、心筋細胞横径、血管周囲および間質の線維化率を測定した。また、RT-PCR法で、心肥大マーカーであるANF、コラーゲンタイプI(Col-I)、OPNの発現量を測定した。

【結果】 野生型マウスでは、AII投与により血圧が上昇し、心エコーではc-IRTの延長が観察され、心重量/体重比と心筋細胞横径の増加、血管周囲および間質の線維化率増加がもたらされた。これらの変化は、AIIとエプレレノンを併用した群では抑制された。AIIを投与したOPN^{-/-}では、野生型マウスでみられたc-IRTの延長、血管周囲および間質の線維化率増加が完全に抑制されたが、心重量/体重比と心筋細胞横径の増加は抑制されず、LVDd増加と%FSの減少がみられた。また野生型マウスではAII投与により、ANF、Col-I、OPNの発現が増加していたが、これらの変化はエプレレノン併用群でほぼ完全に抑制された。AIIを投与したOPN^{-/-}では、Col-Iの発現は抑制されたが、ANFの発現は抑制されなかった。

【総括】 エプレレノンはAII投与による血圧上昇と心リモデリングを抑制する。この効果のうち、線維化とc-IRT延長に対する抑制は、OPN発現の抑制を介する可能性が示された。

[病態・診断・治療:臨床]

9. Wolff-Parkinson-White症候群に伴う肥大型心筋症の分子遺伝学的解析

鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学

阿南隆一郎、新村英士、桶谷直也、石田実雅、浜崎秀一、尾辻 豊、
皆越眞一、鄭 忠和

【背景】AMP-activated protein kinase γ 2 subunit (PRKAG2) 遺伝子の変異によってWolff-Parkinson-White症候群を伴う家族性肥大型心筋症が起こることが報告された。最近の研究ではPRKAG2遺伝子の変異により心筋内に糖蓄積が起こり、心筋肥厚、早期興奮症候群および伝導障害が起こることが明らかになってきている。

【目的】Wolff-Parkinson-White症候群の孤発例における肥大型心筋症の頻度やその病因を明らかにすること。

【方法】Wolff-Parkinson-White症候群と診断され、当科において心臓電気生理学的検査が施行された65名(男性37名、女性28名、平均年齢 49 ± 16 歳)において血圧、心エコー上の左心室壁厚、副伝導路の位置について検討を行った。心エコー上最大左室壁厚が13mm以上のものを肥大型心筋症として更に詳細に検討した。またこれら9名の原因不明の心筋肥厚を呈した症例のPRKAG2遺伝子の解析を行った。

【結果】65名中18名(男性16名、女性2名、平均年齢 60 ± 10 歳)で左心室壁の肥厚が見られた。このうち、8名には高血圧が1名には大動脈弁狭窄症(二尖弁)が見られたが、残りの9名には高血圧やその他の心肥大を来すような弁膜症等の異常が認められず、肥大型心筋症と診断した。副伝導路の位置は左前壁中隔1名、左前側壁2名、左側壁1名、左後側壁2名、右前壁1名、右後中隔2名であり、副伝導路の位置と肥大の有無とは相関を認めなかった。肥大型心筋症と診断されなかったもののうち1名に心房中隔欠損症、1名にEbstein奇形、1名に大動脈弁の二尖弁が認められた。遺伝子解析の結果9名においてPRKAG2遺伝子には病因となるような遺伝子異常は見いだせなかった。

【結論】心臓電気生理学的検査により副伝導路が確認されたWolff-Parkinson-White症候群65名中9人(14%)に肥大型心筋症がみられた。今回の検討では肥大型心筋症を伴うWolff-Parkinson-White症候群の孤発例においてはPRKAG2遺伝子異常は見られず、病因の多様性が示唆された。

10. 特発性心筋症に見出されたタイチンN2B領域変異の機能解析

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野¹、岡山大学医学部循環器内科²

木村彰方¹、松本雄二¹、林 丈晴¹、安波道郎¹、中村一文²、大江 透²

【目的】肥大型心筋症(HCM)の50-70%および拡張型心筋症(DCM)の約20-30%は遺伝性疾患であり、それらの症例では常染色体優性遺伝形式に従う家族歴を認めることが多い。これまでの分子遺伝学的解析により、HCMおよびDCMでそれぞれ15種以上の異なる原因遺伝子が報告されている。最近の知見として、HCMとDCMの双方で同じ遺伝子に変異を認めることがあるが、それぞれの変異によっていかなる機能変化が生じているかについては不明な点が多い。そこで本研究では、我々が以前に報告したタイチンN2B領域変異についてFHL2との結合性変化を検討した。また、FHL2はタイチンis2領域およびNobex3領域にも結合すると報告されているため、それらの領域について家族性DCM患者における変異を合わせて検索した。

【方法】HCM同胞例に見い出された変異(Ser3799Tyr)およびDCM孤発例に見い出された変異(Gln4053ter)について、酵母2ハイブリッド(Y2H)法を用いてFHL2との結合性を検討した。一方、家族性DCM症例32例を対象として、タイチンis2領域およびNobex3領域変異を検索した。

【結果】HCM変異(Ser3799Tyr)はタイチンN2B領域結合性を約25%増強したが、これに対してDCM変異(Gln4053ter)では結合性が約30%減少した。一方、家族性DCM症例の変異検索では、タイチンNobex3領域には変異がなかったが、DCM親子例でis2領域に変異(Arg25572Gln)が見い出された。この変異は一般健常者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が、is2領域とFHL2との結合性は我々のY2H測定系では検出限界以下であったために機能変化の程度は不明であった。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、HCMおよびDCM双方の病因となることが示唆された。

【総括】タイチンN2B領域変異によるFHL2結合性変化は、HCM変異では増強、DCM変異では減少であり、機能変化の方向性が逆であった。

11. 心サルコイドーシス早期診断における超音波integrated backscatter解析 (IB法) の有用性

大阪市立大学大学院 循環器病態内科学

穂積健之、兵頭永一、杉岡憲一、竹本恭彦、山岸弘幸、吉川純一

【背景】サルコイドーシスにおいては、心筋病変を合併し進展すると、拡張型心筋症類似の病態となり予後不良である。しかし、心サルコイドーシスの早期存在診断は、必ずしも容易にはなされていないと思われる。近年、心筋組織異常の診断に超音波integrated backscatter解析 (IB法) の有用性が報告されているが、心サルコイドーシスでの検討はみられない。

【目的】心サルコイドーシスの早期診断におけるIB法の有用性を検討すること。

【方法】対象は心臓以外の組織でサルコイドーシスと診断され、通常的心エコー図上明らかな異常を認めない連続22例であった(年齢56歳、男性6例)。心エコー図上の各指標(左室内径、左室壁厚、左房径、駆出率)を計測し、IB法における心周期変動量(CV)・位相のずれ(D)を、心室中隔中部・基部および後壁中部・基部にて計測した。

【結果】心筋生検または核医学的検査(Gaシンチ、Tlシンチ、18-FDG PET)にて、8例に心病変が認められ(A群)、残り14例で心病変が認められなかった(B群)。心エコー図上の各指標には、両群間で有意差は認められなかった。IB法では、中隔基部CVはA群で有意に低下しており(1.8 ± 4.4 vs. 6.6 ± 1.3 , $P < 0.05$)、中隔基部DはA群で有意に増加していた(1.3 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.1 , $P < 0.05$)。中隔基部CVのカットオフ値を4.7とすると、心エコー図上異常を認めないサルコイドーシス例における心病変を診断できる感度は75%、特異度は93%であった。

【総括】超音波integrated backscatter解析は、心サルコイドーシスの早期診断に有用である可能性が示唆された。

12. ミトコンドリア心筋症における核医学検査を用いた心筋代謝異常の検討

1) 福井大第2内科, 2) 同 第3内科, 3) 東京都老人総合研究所
井川正道¹⁾, 河合康幸²⁾, 栗山 勝¹⁾, 米田 誠¹⁾, 田中雅嗣³⁾

【目的】核医学検査を用いてミトコンドリア心筋症における心筋代謝異常を検討した。

【対象】MELAS患者3例(NYHA I-IV度)。

【方法】^{99m}Tc-MIBI-SPECT(MIBI)および¹²³I-BMIPP-SPECT(BMIPP)を用いて心筋代謝に対する評価を行い、同時に心エコーによる心機能および心筋の形態変化も評価した。

【結果】心機能が正常の症例1(NYHA I度)では、MIBI、BMIPPともほぼ正常であった。中等度の心機能低下がある症例2(NYHA II度)ではMIBI早期像での取込み低下と洗い出しの亢進が認められた。最も心機能が低下していた症例3(NYHA IV度)では、MIBI早期像での取込み低下と洗い出しの亢進、BMIPPの取り込みの亢進が認められた。また、心エコーでは後壁の著明な肥厚が認められた。

【考察】MIBIはミトコンドリア膜電位依存性に、その90%以上がミトコンドリアに取り込まれる。MIBI洗い出しの亢進は、ミトコンドリア呼吸鎖障害による膜電位低下を反映する。BMIPPは遊離脂肪酸のアナログであり、グリセロール3リン酸の代謝産物と結合し中性脂肪の細胞内プールに関わる。ミトコンドリア呼吸鎖障害時には、エネルギー産生は解糖系に移行するが、この際発生する過剰な還元当量[NADH]を[NAD⁺]に戻すため、乳酸発酵とグリセロール3リン酸を介する細胞質・ミトコンドリアシャトル系が働く。さらに強い呼吸鎖障害が存在する場合には、グリセロール3リン酸が過剰となり、その処理ために、遊離脂肪酸の取り込みが亢進する。すなわち、BMIPPの取り込み率の亢進は、強い呼吸鎖障害における過還元状態を反映すると思われる。MELAS患者3例の結果では、心機能の低下に比例して、MIBI洗い出しおよびBMIPP取り込みは亢進、呼吸鎖障害の程度に反映しているものと考えられた。また、心エコー上の後壁の著明な肥厚は、特発性肥大型心筋症における所見(心中隔壁厚>心後壁厚)とは逆であり、ミトコンドリア心筋症に特徴的である可能性が考えられた。

【総括】MIBI-およびBMIPP-SPECTを用いて、ミトコンドリア心筋症における心筋代謝異常の評価が可能である。

13. タコツボ型心筋障害の病理組織学的検討

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
虎の門病院		西山信一郎、松下 央
朝日大学村上記念病院		加藤周司
東京医科歯科大学		磯部光章、磯部和哉

【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タコツボ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。

【方法】タコツボ型心筋障害が疑われた症例15例の心筋生検および7剖検例(60、81、81、82、83歳女性、75、78歳男性)の心室組織所見を検討した。剖検例においては心尖部、心基部付近の左心室横切面切片で、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いて強拡大検鏡で全層を走査し、壁構成心筋細胞に対する障害心筋細胞数の割合を計測した。

【結果】心内膜心筋生検所見では、多核白血球を伴う細胞浸潤、心筋脱落および巣状・斑状の線維化を認め、早期には細胞浸潤、次いで心筋脱落、線維症との経時的変化が想定された。特記すべき事に初期の症例に多核白血球を伴う細胞浸潤や、発症当日の生検所見に線維症などの陳旧病変が見られた。剖検例では心筋細胞は散在性またはびまん性に障害され、全層に渡り障害像が散見された。障害像は個々の心筋細胞または数個の心筋細胞の好酸性染色亢進、筋収縮帯(筋原線維変性)、融解などの単一心筋障害像、それらの集簇・融解・消失像を基本とした。障害された心筋細胞処理像も認められた。壁構成心筋細胞(層)数に対する障害心筋細胞数の割合は、全剖検例において心基部に比し心尖部で高率であった(5.3% vs 13.5%)。

【総括】障害心筋細胞は心基部より心尖部で多く、心尖部壁運動低下を説明する。また、筋収縮帯(筋原線維変性)病変は過収縮を説明しうると考えた。組織所見が単一心筋細胞障害像とそれらの集簇によりなることは、心外膜主冠動脈病変、筋層内小血管病変、微小冠循環病変の何れかによる循環障害とは矛盾すると考えられた。

[病態・治療:遺伝子・関連分子I]

14. 循環器病における分子生物学・臨床医学融合による心不全治療薬開発

国立循環器病センター 心臓血管内科

北風 政史

【目的】日本人死因の第2位を占める心血管疾患の最終終末像の大半が心不全を呈する。しかし、現在の心不全治療において内科的治療では限界があり、心臓移植に頼るほかないのが現状である。そこで本研究では新規の心不全治療法の開発を目的とした。

【方法・結果】第一に心不全の病態にかかわる遺伝子群の網羅的解析を行った。重症心不全患者20例から心筋を採取し、その遺伝子発現プロファイル・臨床データを正常ヒト心筋と比較した。第二に、これらの中から、創薬の標的となるものまたは心不全の病態マーカーとなるものを抽出し機能解析をおこなった。機能解析は心筋細胞に遺伝子を導入した後、各種刺激に対する反応性を一次スクリーニングとして、さらに候補遺伝子を抽出した、機能解析を含めた2次、3次スクリーニングにより、創薬候補遺伝子は20種、病態と密接に関係して発現量が増減する可溶性のマーカー遺伝子は約10種同定された。創薬候補遺伝子は主に可溶性の物質、心筋に特異性の高い蛋白、病態と相関して上下する遺伝子、酵素、受容体などの生理活性に結びつきやすい遺伝子を選択した。これらの創薬候補遺伝子は抗体・遺伝子改変マウスの作成、蛋白自体の機能解析等の多面的な検討と権利化をすすめている。実際の心不全病態候補遺伝子・創薬候補遺伝子としてアデノシン関連遺伝子・HB-EGF・アディポネクチンが上げられる。これらの遺伝子について、多くの基礎実験をおこない、現在アデノシンHB-EGF・アディポネクチンによる心不全治療の臨床試験を行っている。さらに、これらの遺伝子発現プロファイルの解析に加えて我々は心不全患者から採取した血液DNAを患者のインフォームドコンセントを得たうえで採取した。その変異を同定することにより、遺伝子背景と心不全との関連を検討している。現在までに健常人との比較において有意に偏った頻度で心不全患者に存在する一塩基変異(SNP=single nucleotide polymorphism)が数種同定されており病態との関わりが検討されている。

【総括】将来的にはこれらの情報を統合して心不全の病態を多面的に捉えた上で、患者情報を踏まえた適切で効果的な治療法の確立を目指す予定である。我々は、かかる視点で更に研究を続けることにより、日本での心臓病・心不全治療へ展開し、日本の医療・福祉に貢献していきたいと考える。

15. DNA chipを用いた肥大心の遺伝子発現解析

-肥大心でのmetallothionein-1とlysyl oxidase like-proteinの発現変化と役割について-

久留米大学医学部第三内科

岡 直樹、大村治也、宮崎 宏、上田集宣、今泉 勉

【目的】我々はラットの圧負荷(PO)と容量負荷肥大心(VO)における遺伝子発現をDNA chipを用いて検討している。今回は、今までに得られたデータをまとめて発表する。

【方法】POは腹部大動脈縮窄で、VOは腹部のAV shuntにより作製し、左室の遺伝子発現は4週間後にDNA chip(Affymetrix)で測定した。

【結果】心エコーにおいてPOでは求心性肥大がみられたのに対し、VOでは遠心性肥大を呈しており、左室/体重比は両群ともに有意に上昇していた。DNA chip解析では、両肥大心で同様に变化する遺伝子と特異的に变化する遺伝子が同定された。次に発現亢進がみられたmetallothionein-1(MT)の肥大心筋細胞での役割を検討した。MTはPOにおいて負荷1日後から発現亢進がみられ、28日後まで持続的に上昇していた。MTはさまざまな組織で細胞保護的に働くため、肥大心筋細胞でも同じように働く可能性を推測し、肥大到に伴うアポトーシスとの関連を検討した。高濃度のノルエピネフリン(NE)をH9C2細胞に添加するとTUNEL陽性細胞数が増加しcaspase-3活性が増大したが、MTを過剰発現した細胞ではこれらの変化が抑制されていた。従ってMTは肥大到に伴うアポトーシスに対して抑制的に働く可能性が示唆された。次に両肥大心で発現増大がみられたlysyl oxidase like-protein (LOXL)の解析を行った。POでのLOXL mRNA発現は、負荷1日後に強い亢進がみられ、その後やや低下した後徐々に再度発現する二相性変化を呈していた。培養心筋細胞を用いた検討では、NE, angiotensin II (A-II), IL-6などにより発現亢進がみられた。LOXLを細胞に発現させるとlysyl oxidase (LOX)活性が亢進し、A-IIの添加でも活性上昇がみられたため、酵素活性もmRNAと同様に制御されていると推測された。LOX阻害薬を培養心筋細胞に添加するとA-IIによる肥大反応は抑制され、LOXL発現は肥大自体を制御している可能性が示唆された。

【総括】VOとPOとで同様に变化する遺伝子と異なったパターンを示す遺伝子を同定した。変化がみられた遺伝子のうち、MTは心筋細胞で細胞保護的に働く可能性が示唆され、LOXLは心筋細胞肥大到に促進的に働くことが推測された。

16. 心筋特異的Raf-1ノックアウトマウスはMEK-ERK非依存性に心機能不全を生じる

大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学

大津欣也、山口修、堀正二

【目的】Raf/MEK/ERKシグナル伝達系は種々の細胞において分化、増殖、アポトーシスに関わっていることが報告されている。心臓においても細胞レベルでの検討あるいはトランスゲニックマウスを用いた検討により心肥大、心不全に関わっていることが推察されている。本研究では心臓におけるRaf-1の役割を明らかにするために心筋特異的Raf-1ノックアウトマウスを作成し、その表現型を検討した。

【方法】Raf-1遺伝子の第3エクソンの両側にflox配列を挿入したfloxed Raf-1マウスと α -myosin heavy chain promoterの下流にCre recombinaseを挿入したトランスゲニックマウスを交配し心筋特異的Raf-1ノックアウトマウス(Raf CKO)を作成した。心機能、心形態は超音波エコー法により検討した。また左室内腔にチップカテーテルを挿入し圧を測定した。アポトーシスの検定はTUNEL法を用いた。ウェスタンブロットは常法により心臓ホモジネートを用いて行った。ASK1の活性は免疫沈降法、in vitro kinaseアッセイ法により評価した。

【結果】Raf CKOマウスはメンデルの法則に基づいて生まれ、外見上はコントロールマウス(CTL)と差を認めなかった。心エコー法で評価するとRaf CKO心の左室拡張末期径、収縮末期径はCTLに比し有意に増加しており、左室短縮率は有意に減少していた。またLV dp/dt max, LVdp/dt minとも減少していた。アポトーシスについて検討したところTUNEL陽性細胞数はRaf CKO心において有意に増加していた。

ベースラインおよびエンドセリン静注3分後の心臓におけるリン酸化MEK1/2量はRaf CKOとCTL間で有意差を認めなかった。またリン酸化ERK、p38量も両群間で有意差を認めなかった。しかしJNKは有意にRaf CKO心で活性化されていた。さらにアポトーシスを誘導することが知られているASK1の活性はRaf CKO心で増加していた。そこでRaf CKO心における表現型発現にASK1が関わっているかどうか検討するためRaf-1、ASK1のダブルノックアウトマウス(DKO)を作成した。DKO心ではRaf CKO心で見られた心拡大、心機能不全、アポトーシスは認められなかった。

【総括】Raf-1はASK1を介したアポトーシスを阻害することによりMEK-ERK非依存性に心保護的に働いている。