

17. *In vivo*でマウス左心室からX線回折像を撮影する試み ～心筋疾患に対する新たな病態評価法の開発～

¹ 神戸大学大学院 医学系研究科 循環呼吸器病態学

² SPring-8 / 高輝度光科学研究センター 放射光研究所

杜 隆嗣¹, 八木 直人², 篠原 正和¹, 高谷 具史¹, 川嶋 成乃亮¹, 横山 光宏¹

【背景】心筋からのX線回折により生じる2つの赤道反射、1, 0および1, 1反射、は太いフィラメントと細いフィラメント間の架橋形成の程度を反映し、その格子間隔はフィラメント間の距離を表す。従来よりの報告は単離心筋での撮像が主であるのに対し、第三世代放射光施設 SPring-8では(1)高輝度で指向性の良い放射光により厚いサンプルからでも反射が得られ、(2)露出時間が短くてよいため一心拍中での反射の変化を追跡でき、(3)細く絞られたビームにより限られた狭い範囲のみ照射できることより、拍動している心臓からの撮像が可能になった。今回、我々はさらに生体内かつ非開胸下で、つまり体外へ暴露することなく、マウスの心臓からX線回折像を撮像することに成功した。

【方法】まず骨格筋からの反射を極力除くため、イソフルレン吸入麻酔下でC57BL/6マウスの大胸筋ならびに広背筋を左側のみ剥離した。続いてビームが前胸壁より垂直に入射されるようにマウスを固定した。呼吸に伴う胸郭の変動を排除するため、あらかじめ人工呼吸下に過換気とし、撮像直前に停止させることで無呼吸を得た。入光は左第3肋間より開始し、順次ビームに対し垂直面でマウスの位置を変えて撮像した。ビームサイズは0.25 X 0.10 mm²で、15msecのフレームを一回につき計70コマ撮像した。反射パターンと実際の心臓への入射部位の識別のため撮像終了後、ビーム強度を上げて照射しマーキングした。

【結果】ビームが心臓左室壁に入射されると、肋間筋由来の反射によるスポットに加え、(1)心表面では心周期にあわせて激しく動くスポットを認め、(2)さらに左室自由壁の内部に入ってゆくと反射はアーク状となり、(3)前壁から後壁を貫くようになるとリング状を呈した。一心拍中における1, 0および1, 1反射の強度比と1, 0格子間隔より算出した太いフィラメント間の距離の関係を解析したところ、興味深いことに、容量一圧関係における等容性ならびに等張力性変化に類似した曲線を形成した。

【結語】生体内で撮像するメリットとしては(1)ランゲンドルフ灌流による摘出心での評価に比べ、血液の存在下かつ非開胸のため組織浸透圧が生理的範囲内である、(2)血圧や心電図など他の生体情報を同時にモニターできる、(3)変力・変時作用を有する薬物への反応性、虚血や心毒性物質による病態モデル、さらには遺伝子改変動物など多様なモデルを扱えることがあげられる。以上より本手法が今後この分野のさらなる発展とともに、心筋疾患の分子レベルでの病態解明・評価へ寄与することが期待される。

[病態・治療:薬物治療他]

18. 慢性心不全患者における交感神経機能活性とQTc dispersionに対するカルベジロールの効果

筑波大学 大学院 人間総合科学研究科 循環器内科

星智也, 河野了, 西功, 増見智子, 美崎昌子, 宮内卓, 武田徹, 渡辺重行, 山口巖

【目的】我々は前回, 特発性拡張型心筋症において, カルベジロール投与により心筋収縮能だけではなく, QTc dispersionの改善すなわち電氣的不均一性にも改善が認められたことを報告した. また, 以前よりカルベジロールが不全心筋の交感神経機能を改善することは知られており, 電氣的不均一性の改善と交感神経機能の改善の関連が推測されるが, これに関する検討の報告はない. 今回は, カルベジロール投与前後においてQTc dispersionを測定し, これとMIBG心筋シンチグラフィを用いて測定した交感神経機能の変化と比較することで, この両者の関連についての検討を行った.

【方法】特発性拡張型心筋症患者14例 (51±16歳, 男性11例, 女性3例) に対して, カルベジロールを多段階漸増法により20mgまで投与した. カルベジロール投与の前後で, 標準12誘導心電図によるQTc dispersionの用手的計測を行った. 心エコー図を用いてEFおよび左室16分割の壁運動評価を行い (0:normal, 1:mild hypokinesis, 2:moderate hypokinesis, 3:severe hypokinesis, 4:akinesis, 5:dyskinesis), その合計をWMS (wall motion score) とした. またMIBG心筋シンチグラフィを用いて後期像におけるH/M比を測定し, 16分割の視覚的定量評価を行い (1:normal, 2:mild decrease of uptake, 3:moderate decrease of uptake, 4:severe decrease of uptake, 5:defect) その合計をTDS (total defect score) とした. 後期像H/M比の変化分[(治療後のH/M比 - 治療前のH/M比) / 治療前のH/M比 × 100]を改善率 $IR_{H/M}$ (improvement rate) とし, 同様にWMS・QTc dispersion・TDSの改善率をそれぞれ IR_{WMS} ・ IR_{QTd} ・ IR_{TDS} として算出した.

【結果】カルベジロール投与の前後では心拍数 (68±11 → 63±12 bpm, $p<0.01$) の低下が認められたが, 収縮期血圧 (113±13 → 118±12mmHg) および拡張期血圧 (70±7 → 69±12mmHg) には有意な変化は認められなかった. 心エコー法ではLVDd (68±8 → 67±7 mm) には有意な変化は認められなかったものの, カルベジロール投与によりEF (25±11 → 36±14%, $p<0.001$) およびWMS (57±10 → 49±11, $p<0.001$) ともに改善し, さらに血清BNP値 (237±170 → 88±68pg/ml, $p<0.01$) にも改善が認められた. また, QT dispersion (0.063±0.022 → 0.050±0.020, $p<0.01$) とQTc dispersion (0.067±0.024 → 0.050±0.021, $p<0.01$) にも短縮が認められた. MIBG心筋シンチグラフィの後期像におけるH/M比 (1.52±0.23 → 1.66±0.26, $p<0.01$) とTDS (44±14 → 41±12, $p<0.01$) にもカルベジロールにより改善が認められた. これらのうち, $IR_{H/M}$ と IR_{BNP} の間には有意な正の相関が認められ ($r=0.59$, $p<0.05$), $IR_{H/M}$ と IR_{WMS} にも有意な正の相関が認められた ($r=0.56$, $p<0.05$). 一方, $IR_{H/M}$ と IR_{QTd} の間には明らかな相関は認められず ($r=0.19$, NS), IR_{TDS} と IR_{QTd} にも明らかな相関は認められなかった($r=0.03$, NS).

【結論】カルベジロールを投与した拡張型心筋症患者において, 交感神経機能活性およびQTc dispersionの改善を認めたが, 両者の間に有意な関連性は示されなかった. カルベジロールによりQTc dispersionすなわち電氣的不均一性の改善は, 交感神経機能活性の改善を介するのではない可能性が示唆された.

19. 日本人における慢性心不全症例に対する
カルベジロール長期投与の有用性について。

*The effect of carvedilol on mortality in Japanese patients with
chronic heart failure.*

*1 東京女子医科大学附属青山病院 循環器内科

*2 同心臓病センター 循環器内科

川城直美*1

松田直樹*2 梶本克也*2 志賀剛*2 笠貫宏*2 川名正敏*1, 2

【目的】 β 遮断薬は慢性心不全患者の臨床症状や予後改善に有効であると報告されている。しかし、大規模試験の報告は欧米からのものが主であり、本邦での投与量に比較すると大量投与での報告である。今回我々は、327例の慢性心不全症例に対してカルベジロールの導入を試み、平均 4.3 ± 1.8 年にわたり経過観察を行い、本邦における慢性心不全患者に対するカルベジロールの導入率、維持投与量および長期予後を検討した。

【対象と方法】 対象は、1996年から2000年10月まで当施設において、NYHA分類II-IV度に相当する慢性心不全と診断され、カルベジロールが投与開始された327例とした。

カルベジロールの初期投与量は、1.25mgから5mgの中で選択し、最終の目標投与量は20mgとしてカルベジロールを漸増し、認容性のある最大量を維持投与量とした。投与前、投与1-3ヵ月後、6ヵ月後、それ以後は1年ごとに心臓超音波検査、心プール検査、脳性ナトリウムペプチド(BNP)濃度の測定を行った。さらに導入不可能例、中止例に対しても可能な限り生存の追跡調査を行った

【結果】 対象症例327例のうち21例(6.4%)が2ヶ月以内に内服を中止、306例(93.6%)はカルベジロールの導入が可能であった。さらに経過観察中に38例(11.6%)が、内服を中止し、カルベジロールを長期継続投与可能であった症例は、327例中278例(82.0%)であった。カルベジロールの平均維持投与量は 14.1 ± 7.5 mgであった。対象は平均 4.3 ± 1.8 年にわたり経過観察が行われ、観察期間中に327例中58例(17.7%)が死亡した (5年生存率80%)。

また導入可能例は不可能例に比べて5年生存率は高値であった。(80% vs 50% $p=0.005$)

【結論】 カルベジロールの導入が可能であった症例は、LVDdは縮小傾向を示し、BNPは減少傾向を認めた。これらの効果は長期にわたり持続しており、日本人の慢性心不全症例においても、カルベジロール導入は心不全の改善に効果があり、導入可能症例の生存率は導入不可能例に比較して高値であるといえた。

20. 慢性透析患者の心筋障害に対するARB・ACE阻害剤の効果

島根大学医学部附属病院 循環器内科 公受伸之、島田俊夫、村上陽、石橋豊
おおつかクリニック 鈴木恵子
京都大学大学院大学医学研究科循環動態学 松森昭

【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。透析患者における心肥大には血圧以外の因子の関与も指摘されており、血圧によらずレニン-アンジオテンシン系をコントロールすることにより心筋障害が軽減され、予後の改善が期待できる可能性が考えられる。本研究の目的は、慢性透析患者の心筋障害に対し、ACEI及びARBが有効か否かを検討することである。

【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使用は行わなかった。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。

【結果】 1年の観察期間前後でDry Weightの有意な変化は認めなかった。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/日であった。投与前の血清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($p=0.07$)。投与前のBNP、ANP、cTnT、hsCRP、PRA、ALDの血中レベルは3群間で有意差はなかった。経過中、ACEI群、ARB群ではPRAは増加し、血漿ALDレベルは低下したが、非投与群では変化を認めなかった。hsCRPはACEI群で低下傾向を認めた。血漿BNP濃度もACEI群で低下傾向を示した。非投与群、ARB群では血漿ANP、BNP濃度に変化を認めなかった。血清cTnT濃度は3群とも有意な変化を認めなかった。

【総括】 慢性透析患者においてACE阻害剤の投与は炎症を改善し、心負荷を軽減する可能性が示唆されたが、今回の検討では心筋障害の改善効果は認められなかった。ARB群はより心筋障害が強かったために血漿BNP濃度の低下が認められなかった可能性があり、その有効性についてはさらに検討が必要である。

21. 重症心不全に対する補助人工心臓の適応

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、庭屋和夫¹、友池仁暢²、北村惣一郎³

【目的】内科的治療の限界となった重症心不全に対しては、状況に応じてIABP、経皮的心肺補助法的(PCPS)あるいは補助人工心臓(VAS)が適応されるが、今回我々が経験したVAS症例について報告する。

【対象】1994年以降重症心不全のためVAS装着を必要とした66例で、心臓移植の適応が考慮された拡張型心筋症(DCM)56例を含む慢性心不全急性増悪例である。

【結果】用いたLVASは、体外設置東洋紡LVAS56例(左房脱血11例、左室脱血45例)、体内設置携帯型5例(HeartMate VE3例、Novacor2例)および両心補助5例である。装着期間は施行中を含め7～1245(平均405)日で、内17例(国内9例、渡航8例)が39～993(451)日後に移植され、渡航1例以外は生存(最長5年8ヵ月)している。30例は、7～1245(395)日後に死亡したが、主な死因は感染・脳血管障害であった。8例で心機能改善を認め90～310(149)日後に離脱し、計画的に離脱した7例は長期生存(最長離脱後10年6ヵ月)している。11例は99～1168(549)日間補助継続中で、重症心不全・移植病棟にて管理中である。

【総括】LVASにより長期良好な循環補助が得られた。心機能改善がみられない症例では心臓移植を考慮せざるを得ず、我が国においても心臓移植後の成績は良好であるが、移植数が限られている。このため、心臓移植待機例においてはLVAS長期管理が避けられない状況である。体外設置型でも左室脱血により3年以上の補助も行えるが、QOL改善が望まれる。体内設置型のQOLは良好で、積極的な導入が期待される。しかし、現在使用されるものは大型であり、体格の制限がある。現在、体格の小さな症例に適したLVASの治験が計画されており、早期の臨床への導入が望まれる。

[病態・治療:遺伝子・関連分子 II]

22. 心筋症ハムスターJ2N-kにおける心筋細胞内微小器官も変化

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

University of Manitoba, Institute of Cardiovascular Sciences

Naranjan S. Dhalla

【目的】我々の施設で開発した心筋症ハムスター J2N-kを用いて、その心機能障害を検討する。J2N-kは経過中に左室内腔の拡張、心筋細胞の壊死、繊維化などの形態学的、組織学的変化を生じ、心不全に陥る。これまでに摘出左室乳頭筋の等尺性最大発生張力の低下、また、左室心筋ミオシンアイソザイムV₃の増加などなどを確認した。今回は筋小胞体SRの変化を検討する。

【方法】35－37週齢の雄の心筋症ハムスターJ2N-kを使用した。また、正常ハムスターとして開発したJ2N-n(同週齢)をコントロールとして用いた。

心機能はペントバルビタール麻酔後超音波法にて測定した。左室心筋からSRを分離、Ca²⁺ uptake、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) 活性、プロテインキナーゼA (PKA) 活性を測定した。

【結果】心エコー法による心機能評価は、左室駆出率EFが心筋症ハムスター約69%、正常ハムスター約82%、%FSも心筋症ハムスターで低かった。左室内腔 (LVIDd) は心筋症ハムスターで有意に大であった。SRのCa²⁺ uptake、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) 活性、プロテインキナーゼA (PKA) 活性もすべて心筋症ハムスターで低下していた。

【総括】心筋症ハムスターJ2N-kの心機能障害にこれらSRのCa²⁺輸送に関わる機能の変化が関与しているものと思われる。

23. 心筋細胞における早期老化の誘導:Doxorubicinによる酸化ストレス刺激を用いた検討

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学¹⁾、秋田大学医学部第2内科²⁾

前嶋康浩¹⁾、安達進¹⁾、森川紀乃¹⁾、伊藤宏²⁾、磯部光章¹⁾

【背景】近年、細胞の老化が酸化ストレス等により短期間のうちに誘導されることが増殖細胞において明らかにされた。この現象は早期老化と呼ばれる。我々は非増殖細胞である心筋細胞においても早期老化が細胞周期制御因子を介して起こり、細胞の機能を低下させている可能性があると考えた。本研究はアポトーシスを誘導しない低濃度のDoxorubicin(DOX)刺激により培養心筋細胞に酸化ストレスを与え、加齢に伴う変化と比較することで心筋細胞に早期老化が起こるかどうか検討することを目的とする。

【方法および結果】DOX 10^{-6} mol/Lを加えた心筋細胞や心筋線維芽細胞ではapoptosisが誘導されたが、DOX 10^{-7} mol/Lを加えてもapoptosisは誘導されなかった。しかし、心筋線維芽細胞の増殖能は有意に低下し、老化細胞のマーカーであるsenescence-associated β -galactosidase (SA β -Gal)染色陽性細胞が有意に増加し、cdk 抑制因子であるp21^{cip1/waf1}やp27^{kip1}蛋白も発現が増加していた。非増殖細胞である心筋細胞では、DOX 10^{-7} mol/Lを添加して7日間培養するとSA β -gal陽性細胞が有意に増加し、p21^{cip1/waf1}やp27^{kip1}蛋白の発現も増加していた。。また、成獣ラットの心筋組織においても加齢に伴ってSA β -gal陽性の心筋細胞が有意に増加していた。p21^{cip1/waf1}やp27^{kip1}の蛋白発現量は加齢と共に増加していた。加齢ラットの心筋ではTroponin I (TnI)のリン酸化が低下するが、DOX 10^{-7} mol/Lを添加した心筋細胞のTnIのリン酸化もまたbaselineにおいて著明に低下していた。さらに、Isoproterenol刺激によるTnIリン酸化の反応も有意に反応が低下していた。加齢に伴う心筋細胞における各種遺伝子の発現レベルの変化についてもNorthern blotting・定量的RT-PCR法にて検討したが、GATA4, Nkx2.5, α -MHCなどは発現低下、ANP, Angiotensin II, β -MHCなどの発現は増加しており、低濃度DOX刺激心筋細胞においても同様の変化がみられた。Telomerase活性は加齢とともにその活性が低下するが、低濃度DOX刺激心筋細胞のTelomerase活性をTRAP法にて検討したところ、経時的に低下していた。

【総括】低濃度のDOX刺激により培養心筋細胞は加齢に伴う変化と類似した変化が誘導されることが示され、心筋細胞にも早期老化が誘導され、心筋障害の一因となっている可能性が示唆された。

24. エリスロポエチン投与はドキソルビシン心筋症の心機能を改善する

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 龍虎、宮田 周作、江崎 正泰、李 一文、岡田 英志、

金森 寛充、丸山 留美、Ngin Cin Khai、三上 敦、湊口 信也、藤原 久義

京都女子大学

藤原 允子

【目的】エリスロポエチン(EPO)のドキソルビシン(DOX)心筋症に対する有効性を検討すること。

【方法と結果】8週令雄C57BL/6マウスを対しDOX 15 mg/kgを腹腔投与し、ドキソルビシン(DOX)心筋症モデルを作製した。治療群では、DOX投与後さらにヒト・リコンビナントEPO 5000 U/kgを腹腔内に注射した(n=11)。無治療群では同量の生理食塩水を投与した(n=11)。2週間後、無治療群ではDOX非投与群(シャム群、n=10)に比し左室の拡大ならびに左室機能の低下がみとめられたが、これらはEPO治療群で有意に改善していた。組織学的には、無治療群でみられた心筋細胞の萎縮、心筋の線維化、炎症細胞浸潤がEPO治療群で有意に軽減されていた。TUNEL陽性細胞の頻度は治療・無治療両群間で差が無かった。超微形態的には無治療群でみられた心筋細胞の変性所見の改善がEPO治療群でみられたが、両群において心筋細胞のアポトーシス像は見出されなかった。心筋におけるEPO受容体の発現亢進が治療群においてみとめられ、DOXによる心筋GATA-4ならびにミオシン等の筋原線維タンパクの減少が、EPO投与により回復した。一方、DOX心筋症に見られたTNF- α 、TGF- β の過剰発現がEPO群では抑制されていた。

【結語】EPO投与はドキソルビシン心筋症モデルの心不全を改善した。その作用機序として心筋細胞変性(心筋細胞萎縮・筋原線維減少)ならびに心筋線維化の軽減が示唆された。

[再生医療]

25. Jak/STAT系シグナル伝達を介したG-CSFの梗塞後心臓リモデリング抑制効果の検討

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

永井敏雄、原田睦生、秦穎潔、南野徹、高野博之、小室一成

大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学

大阪大学 保健センター

瀧原圭子

虚血性心疾患に対する内科的・外科的治療法は進歩しているが、心筋梗塞後の重症心不全に対する有効な治療法は心臓移植以外に見当たらず、新たな治療法として細胞移植やサイトカインを用いた再生医療が注目されている。近年、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)には心筋梗塞後の心筋細胞の再生効果があることが報告され、骨髄組織由来の造血幹細胞による心筋細胞への分化転換や血管新生作用がその機序として考えられてきた。しかし、造血幹細胞の心筋細胞への分化には否定的な報告もなされており、G-CSFによる心筋再生、保護効果の機序はいまだに解明されていない。今回我々は、G-CSFが心筋細胞への直接作用を介して梗塞後の心臓リモデリングを抑制することを見出したので報告する。

G-CSFはG-CSFレセプターを介してJak/STATシグナルを活性化し、骨髄細胞の分化、増殖、生存を促進する。そこで我々は、培養心筋細胞に酸化ストレスによるアポトーシスを誘導してG-CSFの効果を検討した。G-CSFは心筋細胞上のG-CSFレセプターに作用し、Jak/STATシグナルを活性化することにより、抗アポトーシス蛋白の発現を増強し、アポトーシスを有意に抑制した。マウス心筋梗塞モデルにおいてもG-CSF投与によりJak/STATシグナルが活性化され、抗アポトーシス蛋白の発現が増強し、心筋細胞死が抑制された。心筋梗塞後2週間ではG-CSF投与により心機能が有意に改善し、心臓リモデリングは著明に抑制されていた。また、G-CSFは血管新生も促した。これまでの報告ではG-CSFの心筋保護効果は、骨髄由来の造血幹細胞の関与が示唆されていたが、G-CSFは幹細胞の末梢血中への動員を著明に促したが、心臓への定着は増加させなかった。また心臓内の心臓幹細胞数や心筋細胞の分裂にも影響を与えなかった。我々は心筋細胞に対するG-CSFの直接作用を確認するために、心筋細胞特異的にSTAT3が抑制されたトランスジェニックマウス(dnSTAT3-Tgマウス)を用いて同様の実験を行った。dnSTAT3-TgマウスにおいてはG-CSFによる造血幹細胞の末梢血中への動員効果は野生型マウスと同等であるにもかかわらず、心臓における抗アポトーシス蛋白の発現増強効果や血管新生増強効果を失い、心臓リモデリング抑制効果を失っていた。

以上のことから、G-CSFはJak/STATシグナルを介して心筋細胞に直接作用し、梗塞後心臓リモデリングを抑制することが明らかとなり、虚血性心疾患に対するサイトカイン治療の有用性を示唆した。

26. 心筋組織幹細胞の特徴と発生学的由来の解析

慶應義塾大学医学部循環器内科

福田恵一、富田雄一

【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

【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て。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。

【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】心臓組織幹細胞の一部は神経堤に由来している。

27. 細胞シートを用いた再生心筋組織における血管新生

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

清水達也、関谷佐智子、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。また*in vivo*移植後、この再生心筋組織内には十分な血管新生が誘導され長期に拍動を維持して生存することも確認した。そこで本研究では再生心筋組織内の血管網がどのようなメカニズムで新生するかを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ラットの心筋細胞を培養し、心筋細胞シートを作製した。心筋シート内の血管新生関連遺伝子(VEGF, Cox-2, Tie-2)の発現の解析ならびにCD31免疫抗体染色による血管内皮細胞の有無を確認した。また重層化GFP陽性心筋細胞シートのGFP陰性ラット皮下組織への移植および重層化GFP陰性心筋細胞シートのGFPラット皮下組織への移植実験を行い組織内の血管網の起源を解析した。

【結果】心筋シート内には血管新生促進因子であるVEGFとCox-2、血管内皮細胞特異的なTie-2の発現が確認された。さらに、CD31免疫抗体染色により血管内皮細胞が培養中に既に心筋シート内に増殖・網状構造を構築することが確認された。GFP陽性動物を用いた実験から移植した重層化心筋細胞シート内の血管はすべて移植片由来であることが明らかとなった。またグラフト由来の血管が宿主組織内にのびて宿主由来の血管と接合していることも示された。以上の結果から再生心筋組織の血管新生のメカニズムとして①心筋シート内の血管内皮細胞の存在、②心筋細胞の産出するVEGFなどの血管新生関連因子による血管内皮細胞の増殖・網状構造の形成、③酵素処理を用いない血管内皮網状構造を維持した細胞シートの回収と3次元化、④*in vivo*における機能的な血管網の再構築と宿主毛細血管との接合による血流循環が考えられた。

【総括】以上の研究により再生心筋組織内の血管新生のメカニズムが明らかとなったが、さらに高い血管新生能力を持つ心筋シートを作成し構造と機能を維持したまま重層化・移植することにより血管床の豊富な機能的な心筋組織の再生が実現するものと考えられる。

28. 分離心筋梗塞モデルを使用した心筋再生の検討

山口大学医学部器官制御医科学講座循環病態内科学

中村浩士、松嶋敦、松崎益徳

【目的】心筋再生を目的とした再生医療は主に動物実験を用いて研究されている。一般的には GFP で標識したマウスより骨髄幹細胞を取り出し、非標識の心筋梗塞マウスに注入し梗塞部位での心筋再生を観察する方法が取られて来た。しかしこの方法では様々な侵襲が、幹細胞を含めた細胞全体と生体にも掛かるため、結果として心筋再生の効率が悪く且つ方法論が複雑で実験結果の信憑性に欠けることが知られている。そこで我々は異所性心移植術を用いた分離心筋梗塞モデルを応用し、心筋再生に必要な生体内の環境の温存を図り効率よく心筋再生を観察できる実験系を開発した。本方法論の整合性を確かめるため心筋再生の過程を組織学的に検討した。

【方法】12週齢雄のGFPマウス(バックグラウンド:C57/BL6)をレシピエントとし、同じく12週齢雄のC57/BL6のマウスをドナーとし、中村らの方法(JACC 2003)にて分離心筋梗塞を作成した。手術後5, 40, 60日目に心臓を摘出し組織学的に解析した。

【結果】手術の成功率は90%であり、移植した心臓は最低でも6ヶ月以上拍動し拒絶されないことを確認した。GFP陽性細胞は術後5日目より梗塞部周辺に観察された。術後30日目にはGFP陽性の血管も認められた。術後30, 60日目には梗塞周辺部位に紡錘形の巨大細胞が一塊となって出現し、同部位はミオシンとの二重染色でも陽性であった。

【まとめ】移植心臓中に観察された長形のGFP陽性細胞は再生した心筋であると考えられ、GFPマウスの幹細胞が移植心臓内に移行し、心筋再生を起こしたと考えられた。本モデルは心筋梗塞後における心筋再生のメカニズムの解析にも有用である可能性が示唆された。

【知的所有権の出願】

分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法

中村浩士、松崎益徳、山口TLO(特願2004-044096)

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

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(SMbl)を δ -sarcoglycan (SG)遺伝子欠損TO-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TO-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TO-2、前径骨筋に 10^6 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SMbl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SMbl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。

**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 総括・分担研究報告書**

平成 17 年 3 月発行

主任研究者 北 畠 顕

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目

Tel : (011) 706-6973 Fax : (011) 706-7874

E-mail tokutei@med.hokudai.ac.jp

事務局 岡 本 洋