



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  
＜友池班＞

平成17年度 総括分担研究報告書  
主任研究者 友池仁暢

2006年4月

## ■CONTENTS

### I. 総括研究報告

特発性心筋症に関する調査研究[友池 仁暢] .....	1
-----------------------------	---

### II. 分担研究報告

[筒井 裕之]わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像 .....	3
[久保田 功]心筋細胞内脂質代謝とGq蛋白共役型受容体シグナルの制御 .....	5
[和泉 徹] エリスロポエチンによるラット実験的自己免疫性心筋炎における免疫調整作用に関する研究 .....	7
[小川 聡]家族性突然死症候群 .....	9
[永井 良三]アンジオテンシンIIによる心筋障害に対する鉄の関与 .....	11
[藤原 久義]アンジオテンシンIIタイプ1受容体シグナルの心筋梗塞組織動態に及ぼす影響 .....	13
[堀 正二]心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明 .....	15
[松森 昭]心筋症の予後および心筋症におけるC型肝炎ウイルス感染、炎症、免疫に関する研究 .....	17
[中谷 武嗣]特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究 .....	19
[横山 光宏]心筋細胞に対するmyocardinの抗アポトーシス作用の機序について .....	21
[松崎 益徳]拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討 .....	23
[今泉 勉]慢性心不全患者における低温サウナ療法の効果と安全性に関する検討 .....	25
[砂川 賢二]炎症制御にもとづく新たな心筋症・心不全治療戦略の開発 .....	27
[鄭 忠和]心Fabry病に対するレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の検討 .....	30
[川名 正敏] 閉塞性肥大型心筋症に対するI群抗不整脈薬とβ遮断剤の併用療法の長期有効性についての研究 .....	32
[磯部 光章]急性心筋炎におけるHepatocyte growth factorの役割と遺伝子導入による治療効果 .....	34
[小室 一成]心筋虚血再灌流障害に対するG-CSFの心臓保護作用についての検討 .....	37
[廣江 道昭]拡張型心筋症における血清テネイシンCの意義 .....	39
[木村 彰方]高血圧性心筋症に見出されたBMP10変異の機能解析 .....	41
[岡野 光夫]積層化心筋シートにおける電気生理学的解析 .....	44
[福田 恵一]組織工学による血管増生心筋組織の構築ならびにその移植による冠血管床の再生 .....	46
[武田 信彬]ラミニンγ1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討 .....	51
[河合 祥雄]HCM/DCMの狭間にある中間型心筋症の病理動態に関する研究 .....	52
[室原 豊明]特発性拡張型心筋症における抗アルドステロン薬の効果 .....	53
[今中 恭子]反応型心筋線維化病変進行におけるテネイシンCの役割 .....	55
[北浦 泰]拡張型心筋症を呈する心臓サルコイドーシス .....	58
[斎藤 能彦]心不全とT型カルシウムチャンネル .....	61
[島田 俊夫] マスキング時のバイオマーカーによる左室拡張機能障害早期発見のための試み .....	64
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	66
IV. [資料]研究成果の刊行物・別冊	
Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism Cardiovascular Research 67:705-713, 2005 .....	86
Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction Circulation 112:683-690, 2005 .....	95

Adenovirus-mediated overexpression of diacylglycerol kinase $\xi$ inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy Circulation 111:1510-1516, 2005 .....	104
Clinical characteristics of heart disease patients with a good prognosis in spite of markedly increased plasma levels of type-B natriuretic peptide (BNP): Anomalous behavior of plasma BNP in hypertrophic cardiomyopathy Circulation Journal 69: 277-282, 2005 .....	111
Creation of a genetic calcium channel blocker by targeted gem gene transfer in the heart Circulation Research 95:398-405, 2004 .....	117
Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 25:2282-2288, 2005 .....	126
Postinfarction gene therapy against transforming growth factor- $\beta$ signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure Circulation 111:2430-2437, 2005 .....	133
Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death Biochemical and Biophysical Research Communications 333:562-567, 2005 .....	142
Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies Circulation Research 96:144-147, 2005 .....	148
An X-ray diffraction study on mouse cardiac cross-bridge function in vivo: Effects of adrenergic $\beta$ -stimulation Biophysical Journal, 2006 (in press) .....	153
Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor Journal of Biological Chemistry 280:6580-6587, 2005 .....	169
Safety and efficacy of repeated sauna bathing in patients with chronic systolic heart failure: A preliminary report Journal of Cardiac Failure 11:432-436, 2005 .....	177
Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy American Journal of Physiology-Heart 289:1858-1864, 2005 .....	182
Hepatocyte growth factor ameliorates the progression of experimental autoimmune myocarditis: A potential role for induction of T helper 2 cytokines Circulation Research 96:823-830, 2005 .....	190
G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes Nature Medicine 11:305-311, 2005 .....	199
The haplotype block, <i>NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA</i> , within the class III-class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy Tissue Antigens 66:200-208, 2005 .....	206
Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential Biochemical and Biophysical Research Communications 341:573-582, 2006 (in press) .....	215
Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells Nature Biotechnology 23:607-611, 2005 .....	225
心室remodelingとHCM/DCMの狭間 .....	230
Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury American Journal of Pathology 167:71-80, 2005 .....	240
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(パチスタ手術)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 .....	250
Apoptotic myocardial cell death in the setting of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy Acta Cardiologica 60-465-470, 2005 .....	260

# I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業)

総括研究報告書

## 特発性心筋症に関する調査研究

総括研究者： 友池 仁暢(国立循環器病センター院長)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

### ＜分担研究者＞

筒井裕之(北海道大学循環病態内科学教授)

久保田 功

(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野教授)

和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

永井良三

(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

藤原久義(岐阜大学大学院医学研究科循環病態学教授)

堀 正二

(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学教授)

松森 昭

(京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授)

中谷武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)

横山光宏

(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学教授)

松崎益徳

(山口大学大学院医学研究科器官病態内科学教授)

今泉 勉(久留米大学医学部第三内科教授)

砂川賢二

(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)

鄭 忠和

(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

### A. 研究目的

1974年、旧厚生省特定疾患調査研究班を中心として特発性心筋症の疫学・病因・病態・診断・治療について基礎的、臨床的検討が始った。研究は今日に至るまで継続しており、この領域での進歩・発展に大きな貢献を果して来た。特発性心筋症の診断基準については、1980年のWHO/ISFC合

同心筋症定義分類委員会の勧告を受け、1986年旧厚生省特定疾患調査研究班において「特発性心筋症診断の手引き」として作成された。心筋症とその病態に関する研究は世界的に長足の進展歩を遂げ、診断や治療法は日進月歩の革新が続いている。その背景の下、1995年WHO/ISFC合同委員会で再改訂が行われた。ヒトゲノムの解読、ナノテクノロジーの幕開け、コンピューターサイエンスの進歩による画像診断の精度向上と情報量の多面化は、本研究班の①診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの改訂、②遺伝子解析や免疫学的解析に基づいた病因の解析による予防法の革新③心筋再生医療を実施・臨床へ展開するといった研究事項に抜本的見直しを迫りつつある。また、1998年から本研究班と疫学研究班とが共同で行なっている特発性心筋症の全国疫学調査はEBMの充実とコホート研究としてのデータの質の向上も期待される。心臓移植待機患者の正確な把握は重症例に対する医療をシステム化する上での不可欠な作業となつて来た。以上が本研究の概要である。目標を効率よく具体化するため、冒頭掲出の組織構成に加え、研究協力者を重点的に組織する分担・共同研究を計画した。

### B. 研究方法

1) 具体的方針として、従来からの病因・病態・診断・治療における我が国最先端の研究を継続するとともに、以下の4項目を研究の中心課題に据える。①特発性心筋症の診療マニュアルの作成：ことに、診断基準の見直し、②横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)、③心筋再生医療の基礎的・臨床的検討、④免疫学的解析、遺伝子型

解析による病因的解析を進め病態、重症度、治療効果の指標を探る。

2)前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)、②診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの作成(拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ARVC、二次性心筋症(含たこつぼ型)、ミトコンドリア病、Fabry病、家族性突然死症候群、虚血性心筋症、新たな遺伝・遺伝子に関する研究(心筋炎後を含めた免疫学的解析)③新たな治療法(再生医療、遺伝子治療、外科的治療)再生医療、遺伝子治療、外科的治療(上記目的を達成するため、本年度は下記の臨床研究を立案実施した。詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討する。同時にその他の心筋症(肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群)についても同様に検討する。

①各病態の転帰を追跡する。これらのデータを連結可能匿名化して臨床診断・治療の際の対比情報として活用できるようにする。

②転帰(生存曲線、心事故発生、心不全再燃・重症化、QOLを含む概念として)を規定する臨床指標、検査指標の探索、精度評価、前向き検討を行う。

③最終年度には発症登録と転帰調査を全国規模で展開すべき要件を明らかにし、ネットワークを提案・構築をする。

#### (研究デザイン)

本研究は、特発性拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ミトコンドリア病(心筋症)、ファブリー病、家族性突然死症候群、サルコイドーシスと新規に診断された症例およびその他の心筋症症例において、診療において測定されている詳細な臨床指標、検査指標のうちいかなる因子または因子の組み合わせが、これらの心筋症の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するものである。エントリ一時の臨床指標、検査指標を投薬内容と合わせてデータベースに登録し、心事故の有無を5年間フォローアップし、心事故の発生と登録された因子の関連について従来の統計法とともにデータマイニング手法を用いて解析する。

### C. 研究結果

1)具体的方針として、従来からの病因・病態・診断・治療における我が国最先端の研究を継続するとともに、以下の4項目を研究の中心課題に据える。

①特発性心筋症の診療マニュアルの作成：ことに、標準的治療法の見直し

②横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)：(1)特定疾患の疫学に関する研究(14164301)

疫学調査(前回調査のコホート研究)、(2)遺伝子解析手法の応用に関する研究(14164201)遺伝子解析手法による診断法の確立

③心筋再生医療の基礎的・臨床的検討

④免疫学的解析、遺伝子他型解析による病因的解析を進め病態、重症度、治療効果の指標の探索

2)前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。

①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)：(1)特定疾患の疫学に関する研究(14164301)疫学調査(前回調査のコホート研究)、(2)遺伝子解析手法の応用に関する研究(14164201)、遺伝子解析手法による診断法の確立

②診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの作成：拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ARVC、二次性心筋症(含たこつぼ型)、ミトコンドリア病、Fabry病、家族性突然死症候群、虚血性心筋症、新たな遺伝・遺伝子に関する研究(心筋炎後を含めた免疫学的解析)

③新たな治療法開発：再生医療、遺伝子治療、外科的治療(再生医療、遺伝子治療、外科的治療)

④研究協力者：川名正敏、磯部光章、小室一成、廣江道昭、木村彰方、岡野光夫、福田恵一、武田信彬、河合祥雄、室原豊明、今中恭子、北浦泰、斎藤能彦、島田俊夫/事務局：北風政史

3)平成17年度以降、効率的に事業を執り行うべく、B-1)で掲げた4項目の課題を中心に、組織構成を確立し、上記B-2)④の研究協力者と共同で3年間の計画の中で完遂すべく研究に着手する。かかる研究に加え、各研究協力者が心筋症の病態と治療について検討を行い、班会議において発表を行い、疫学調査・遺伝子解析・診断基準の見直しについて検討を行った。

### D. 考察

特発性心筋症について各研究協力者が心筋症の病態と治療について検討を行い、班会議において発表を行い、疫学調査・遺伝子解析・診断基準の見直しについて検討を行うとともに、臨床調査研究の基盤作りを行った。

### E. 結論

特発性心筋症の病態・疫学について本研究班において多方面から検討を行った。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業)

分担研究報告書

### 特発性心筋症に関する調査研究

－わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像－

JCARE-CARD研究の中間集計結果より－

分担研究者： 筒井 裕之(北海道大学循環病態内科学教授)

**<研究要旨>**心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

#### A. 研究目的

わが国では循環器領域における疫学研究データが極めて乏しいため、慢性心不全の臨床像、治療、予後などの実態は不明である。欧米で行われた研究結果をそのままわが国にあてはめることができないのは言うまでもなく、わが国独自の研究が必要である。さらに、大規模臨床試験の患者は、年齢や基礎疾患など実際の患者(Real world)とは大きく異なっており、一部の患者しか反映していないことから、臨床試験と並行して観察研究が必要である。本研究の目的は、全国多施設共同のデータベースを用いて、わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像を明らかにすることである。

#### B. 研究方法

心不全の増悪のために入院治療を行った患者を対象とした全国患者登録データベースを用いて拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像を解析する。

##### (倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して研究を計画・実施しているが、特に倫理委員会の審査、対象患者からの同意取得、匿名性などに特段の倫理的配慮を行っている。

1) 倫理委員会の審査：研究対象患者のプライバシー保護を確実にするために、倫理委員会において倫理面に対する配慮が十分に行なわれているか審査を受けたうえ承認を得て実施している。倫

理委員会が設置されていない施設の参加を可能にするために、各々の地域の中核施設(大学病院など)の倫理委員会に審査を依頼する。

2) 対象患者からの同意取得：研究に際しては、あらかじめ研究内容、意義と危険性およびプライバシー侵害の恐れがないこと、同意しなくても不利益は受けないこと、同意は随時撤回できることを患者に説明し、文書で同意を得ている。

3) 匿名性：症例の登録は、各施設におけるIDで行い、データがどの症例のものかは、診療を担当した主治医のみが把握している。研究担当者は、IDがどの患者のものか特定できないため患者のプライバシーは保護される。さらに、データベースには、別の症例コードを入力するため、データベースから患者個人を特定することは困難である。

#### C. 研究結果

登録された慢性心不全患者の平均年齢は71歳で、65歳以上の高齢者が70%を占めた。特に女性の高齢者の占める割合が高かった。心不全の原因となる基礎心疾患は、虚血性心疾患が32%と最も多く、弁膜症、高血圧、拡張型心筋症が続いた。拡張型心筋症は慢性心不全の原因心疾患の18%をしめ、虚血性心筋症とともに慢性心不全の主要基礎疾患であった。拡張型心筋症は、虚血性心筋症に比し若年で、合併疾患(高血圧、糖尿病、高脂血症、脳血管疾患、貧血)が少ないが、心房細動はより多かった。心不全増悪の誘因は、両者とも塩分・水分制限の不徹底や過労などが多かったが、

虚血性心筋症では誘因として虚血が最も多いのに対し、拡張型心筋症では不明のことも多かった。入院中の粗死亡率は、両者に差を認めなかった。本研究は現在進行中であるが、登録時データの段階でも、慢性心不全患者を対象としたわが国初の大規模な登録研究として高く評価されている。本年度の研究成果は、論文として発表するとともに、日本循環器学会・日本心臓病学会・日本老年医学会のシンポジウムなどにおいて「わが国初のデータ」として公表することを招請された。

#### D. 考察

我々は、7年前より福岡市において慢性心不全にて入院治療を受けた患者を対象とした登録観察研究を行ってきた。さらに、平成16年より全国レベルで患者登録を行う「慢性心不全の増悪のため入院治療を要する患者を対象とした調査研究(JCARE-CARD研究)」を開始した。本研究は、わが国の慢性心不全患者の基礎疾患、合併症、重症度などの臨床像や治療、予後などの実態、さらに予後の規定因子を明らかにするものである。また、実際の患者で治療法の有効性を解析することによって、無作為コントロール試験では得られないわが国独自のエビデンスを創出していくことを目標としている。さらに、将来にわたって継続し、循環器領域における登録観察研究のモデル研究となることも目指している。今後、長期予後やその規定因子の解析もふくめ、さらに詳細な検討を進めていく予定である。

#### E. 結論

全国多施設共同のデータベースを用いて、わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- ・眞茅みゆき, 筒井裕之: 臨床疫学からみたわが国における慢性心不全患者の実態. 循環器科 57(3): 218-223, 2005.
- ・筒井裕之: 慢性心不全治療における疾患管理. 臨床と研究 82(8): 1388-1392, 2005.

##### 2) 学会発表

- ・筒井裕之: わが国の慢性心不全患者の予後を改善するには何が必要か, 第69回日本循環器学会(セミナー)(横浜/2005年3月19日)
- ・筒井裕之: 高齢者の拡張期心不全; 実態から見た治療のあり方. 第47回日本老年医学会(シンポジウム)(2005年6月17日)
- ・Tsutsui H, Tsuchihashi M, Takeshita A, JCARE Investigators: "Real world" patients with heart failure; Lessons from the nationwide registry in Japan, 第53回日本心臓病学会(アジアカンファレンス)(大阪/2005年9月20日)
- ・眞茅みゆき, 筒井裕之, 竹下 彰: わが国における収縮不全・拡張不全の頻度・予後, 第53回日本心臓病学会(シンポジウム)(大阪/2005年9月19日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### < 研究協力者 >

JCARE研究班

## 特発性心筋症に関する調査研究

—心筋細胞内脂質代謝と Gq 蛋白共役型受容体シグナルの制御—

分担研究者： 久保田 功(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野教授)

<研究要旨>心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返して行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

### A. 研究目的

Gq蛋白共役型受容体(GPCR)シグナルの持続的かつ過剰な活性化が、心肥大・心不全の発症と進展に重要な役割を演じていることが多くの研究から明らかになった。受容体刺激によりホスホリパーゼCが活性化され、ジアシルグリセロール(DAG)が生じる。DAGは protein kinase C(PKC)を活性化し、PKCは核内の遺伝子発現調節、蛋白リン酸化など多様な作用を有し、心肥大と心不全の発症に深く関与している。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DAGをリン酸化(不活性化)してホスファチジン酸へ変換し、細胞内DAG量を調節する。本研究の目的はDGKによる心筋細胞内脂質代謝制御の意義を解明することである。DGKがPKC活性を制御することでGPCRアゴニストによる心臓リモデリングを抑制するかを検討する。

### B. 研究方法

#### 1) 培養心筋細胞での検討

DGK $\zeta$ の培養心筋細胞における機能を検討するため、アデノウイルスベクターを用いてDGK $\zeta$ 遺伝子をラット新生仔培養心筋細胞に導入した。 $\beta$ ガラクトシダーゼを導入した細胞をコントロールとした。エンドセリン(ET-1)を培養細胞液中に添加し、ET-1による細胞内シグナルの活性、転写因子活性、遺伝子発現、蛋白合成、心筋細胞表面積についてAd-DGK $\zeta$ とAd-LacZ間で比較検討した。細胞内シグナルについては、培養心筋細胞から細胞膜分画と細胞質分画にわけて蛋白を抽出し、PKC isoformの細胞内局在の変化をWestern blotで検討した。PKC下流の転写因子activator protein-1(AP1)のDNA結合能はルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイで検討した。蛋白合成能は $^3\text{H}$ -leucineの

取り込みで評価した。

#### 2) トランスジェニックマウスでの検討

次に、DGK $\zeta$ の機能を*in vivo*で検討するため、 $\alpha$ -myosin heavy chain promoterを用いてDGK $\zeta$ 遺伝子を心臓にのみ選択的に発現したトランスジェニックマウスを作成した。心臓でのDGK $\zeta$ の発現はPCRとウェスタンブロットにてそれぞれmRNA、蛋白レベルで確認した。また各臓器からRNAを抽出し、DGK $\zeta$ 遺伝子が心臓にのみ特異的に発現していることを確認した。心臓でのDGK $\zeta$ キナーゼ活性はコントロールとした野生型マウス(wild-type littermate)の約18倍であった。

すべての実験プロトコールは山形大学遺伝子組み換え実験安全委員会および山形大学動物実験委員会にて承認され、山形大学遺伝子組み換え実験安全管理規則および山形大学医学部動物実験指針に従って行われた。

### C. 研究結果

#### 1) 培養心筋細胞での検討

代表的なGPCRアゴニストのひとつET-1刺激による細胞内シグナル伝達へのDGK $\zeta$ の影響について検討した。ET-1によりPKC $\epsilon$ の活性化(膜分画へのトランスロケーション)を認めたが、DGK $\zeta$ 遺伝子を導入した細胞ではET-1によるPKC $\epsilon$ の活性化が抑制された。ET-1刺激によるAP1 DNA結合活性の増加はDGK $\zeta$ により抑制された。また、ET-1による心肥大のマーカー遺伝子atrial natriuretic factor (ANF)の発現は、DGK $\zeta$ により抑制された。ET-1による心筋細胞面積の増加もDGK $\zeta$ 遺伝子導入により抑制された。培養心筋細胞では、DGK $\zeta$ はET-1によるDAG-PKC以下の肥大シグナルの活性化を抑制し、心筋細胞肥大を抑制した。



## 2) トランスジェニックマウスでの検討

DGK $\zeta$ トランスジェニックマウスの外見、成長、繁殖は正常であった。心臓の発達、構造は正常で、線維化等の病理学的な異常所見も見られなかった。心重量は野生型マウスと同等で、心肥大は認められず、心エコーにて評価した左室内径、左室短縮率は野生型マウスと同等で、心機能は正常であった。アンジオテンシンIIとフェニレフリンに対する細胞内肥大シグナル活性化と心肥大の反応について検討した。野生型マウスでは認められたアンジオテンシンIIとフェニレフリン持続皮下注によるPKC $\alpha$ および $\epsilon$  isoformの活性化は、DGK $\zeta$ トランスジェニックマウスでは抑制された。また、野生型マウスではアンジオテンシンIIとフェニレフリンによりANFの発現増加と左心室重量の増加が見られたが、DGK $\zeta$ トランスジェニックマウスではNFの発現と左心室重量の増加は抑制された。GPCRアゴニストであるアンジオテンシンIIとフェニレフリンによる心臓リモデリングはDGK $\zeta$ により*in vivo*でも抑制された。

## D. 考察

DGKは細胞内脂質代謝を制御することで、Gq蛋白共役型受容体アゴニストによるPKC活性化とそれに引き続く細胞内シグナル伝達カスケード活性化を阻止することが培養心筋細胞とマウスを用いて示された。DAG-PKC系は、アンジオテンシンII、エンドセリン-1、フェニレフリンなどGq蛋白共役型受容体に共通するシグナル分子なので、DGKにより脂質代謝を制御することは個々の受容体レベルでブロックするよりも、より効果的に心肥大を抑制できる可能性がある。

## E. 結論

DGK $\zeta$ は心筋細胞においてGq蛋白共役型受容体シグナルの調節因子として機能することが明らかになり、心肥大・心不全治療の標的分子となる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- Takahashi H, Takeishi Y, Seidler T, Arimoto T, Akiyama H, Koyama Y, Shishido T, Tsunoda Y, Niizeki T, Hozumi Y, Abe J, Hasenfuss G, Goto K, Kubota I: Adenovirus-mediated overexpression of diacylglycerol kinase $\zeta$  inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 111:1510-1516, 2005.
- Arimoto T, Takeishi Y, Takahashi H, Shishido T, Tsunoda Y, Niizeki T, Koyama Y, Shiga R, Nakajima O, Nishimaru K, Endoh M, Walsh RA, Goto K, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase  $\zeta$  prevents Gq protein coupled receptor agonists-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 113:60-66, 2006.

### 2) 学会発表

- Arimoto T, Takahashi H, Niizeki T, Koyama Y, Takeishi Y: Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase-zeta prevents phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. American Heart Association Scientific Sessions (Dallas, USA/November, 2005)
- Niizeki T, Arimoto T, Koyama Y, Takahashi H, Shishido T, Takeishi Y: Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase- $\zeta$  attenuated left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2005 (Dallas, USA/November, 2005)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## < 研究協力者 >

竹石恭知

(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—エリスロポエチンによるラット実験的自己免疫性心筋炎における免疫調整作用に関する研究—

分担研究者： 和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

**<研究要旨>**心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

## A. 研究目的

造血系サイトカインであるエリスロポエチン(EPO)は、中枢神経系、心臓、腎臓における組織保護作用が確認されており、特に虚血性障害における効果が顕著であることが知られている。一方、実験的自己免疫性脳脊髄炎や実験的腸炎モデルにおける抗炎症作用の報告も存在するが、心筋の炎症に対する作用については未だ検討されていない。我々は自己免疫性心筋炎(EAM)モデルを用いて、EPOの心筋における炎症抑制作用、免疫調整作用について検討を行った。

## B. 研究方法

## 1) EAM全経過における検討

1-1. EAMモデルの作成：ブタ心筋ミオシン(250 mg)／完全 Freund アジュバント(625 mg H73RA)混和液を、ルイスラット(5週令、雌)の両側足底に皮下注射する(day 0)。

1-2. EPO投与：ラットをEPO投与群(3,000 U/kg; n=12)、生食投与群(n=16)に分類し、連日同剤の皮下投与を行う。(day 0-day 20) day 21に屠殺し、効果検討を行なった。

1-3. 心筋炎の評価：以下の①～③項目にて、心筋炎の重症度の評価を行なった。

①ラット心体重比

②肉眼的心筋炎のスコア(macroscopic score)

③心筋病理組織での炎症細胞浸潤のスコア

(microscopic score)

1-4. サイトカイン、ケモカインmRNAの測定：心筋ホモジネート組織からの抽出RNAをcDNAに逆転写し、real-time PCR法にてサイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10)およびケモカイン(MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ) mRNAの発現を定量した。

## 2) EAM効果期に局限させた検討

既樹立の心筋炎惹起性特異的T細胞株の静脈内投与にて惹起されるEAMは誘発期のみを反映したモデルとなる。ラットを1)と同様にEPO投与群(n=22)、生食投与群(n=22)に分類し、同T細胞株を尾静脈より投与する(6.0 $\times 10^5$ /匹)。T細胞株投与前日(day -1)からday 9まで連日薬剤を皮下投与し、day 10に屠殺し、1-3, 1-4と同様に効果検討を行った。

## 3) 導入期に局限させた検討

心筋炎惹起性特異的T細胞株、照射下胸腺細胞、CM2(心筋ミオシンaa.1539-1555)混合培養にEPO(0.001~100 U/mL)を混和し、48時間後<sup>3</sup>H-サイミジン取り込みを測定し、細胞増殖能の評価を行った。また、抗原提示細胞として用いる照射下胸腺細胞のみにEPOを24時間暴露させた後、同様に心筋炎惹起性特異的T細胞株、CM2を加え、細胞増殖能の評価を行った。

## C. 研究結果

1) EPOはEAM全経過を通じた投与において、心筋組織中の炎症性サイトカイン、ケモカインmRNAの減少とともに、実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の重症度を有意に軽減させた。心体重比：5.1 $\pm$ 1.0 vs. 6.8 $\pm$ 1.7( $\times 10^{-3}$ ; p<0.01)、macroscopic score：1.8 $\pm$ 0.4 vs. 3.7 $\pm$ 0.6(P<0.01)、microscopic score：1.4 $\pm$ 0.5 vs. 3.3 $\pm$ 0.7(p<0.01)、IFN- $\gamma$ , IL-10, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 mRNA：1.4 $\pm$ 1.0 vs. 2.3 $\pm$ 7.0, 4.7 $\pm$ 2.8 vs. 16.1 $\pm$ 7.6, 16.1 $\pm$ 11.9 vs. 42.8 $\pm$ 30.2, 54.3 $\pm$ 3.08 vs. 135.0 $\pm$ 88.7( $\times 10^3$  copy/10ng total RNA; それぞれp<0.01)。

2) EPOはEAMの効果期に局限させた投与においては、有意な心筋炎の抑制作用を示さなかった。

心体重比： $4.2 \pm 0.5$  vs.  $4.2 \pm 0.4 (\times 10^{-3}; \text{NS})$ 、  
macroscopic score： $2.9 \pm 0.7$  vs.  $2.3 \pm 0.8 (\text{NS})$ 、  
microscopic score： $2.1 \pm 0.5$  vs.  $1.7 \pm 0.6 (\text{NS})$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 mRNA： $2.9 \pm 2.3$  vs.  $3.9 \pm 2.2$ 、 $1.2 \pm 1.3$  vs.  $1.8 \pm 1.0$ 、 $22.2 \pm 20.2$  vs.  $23.5 \pm 17.5$ 、 $25.0 \pm 16.1$  vs.  $24.6 \pm 19.3 (\times 10^3 \text{ copy}/10\text{ng total RNA}; \text{それぞれNS})$ 。

3)細胞増殖試験において、EPOは心筋炎惹起性ミオシン特異的T細胞株の増殖抑制効果を持たなかった。また、抗原提示細胞(照射下胸腺細胞)にのみEPOを暴露させた場合においても、T細胞の増殖は抑制されなかった。

#### D. 考察

EPOがEAM全経過を通じた投与において有意な心筋炎症の抑制効果を有し、一方、効果期に限局させた投与実験において効果が示されなかった結果からは、①導入期のいずれかに作用点が存在する可能性、②EPOの効果発現に時間がかかる(前投与期間の不足)という2つの可能性が示唆される。①の可能性については、事実今回のvitro実験(細胞増殖試験)が既樹立の心筋炎惹起性T細胞のミオシン抗原(CM2)による増殖試験であったことから、厳密な導入期を反映していない。今後、ミオシン投与によるEAMモデルにおいて、導入期のみEPOを投与し、vivoでの導入期効果を確認する予定である。また、vivo実験において導入期に効果が認められない場合は、前投与期間を長く設けた、効果期のみに限局したEPO投与実験を要する。

#### E. 結論

EPOは心筋組織中のサイトカインやケモカインの減少を通じてEAMを抑制する。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1)論文発表

- Takeuchi I, Inomata T, Nishii M, Koitabashi T, Nakano H, Shinagawa H, Takehana H, Izumi T: Clinical characteristics of heart disease patients with a good prognosis in spite of markedly increased plasma levels of type-B natriuretic peptide(BNP); anomalous behavior of plasma BNP in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J* 69:277-282, 2005.
- Koitabashi T, Inomata T, Niwano S, Nishii M, Takeuchi I, Nakano H, Shinagawa H, Takehana H, Izumi T: Paroxysmal atrial fibrillation coincident with cardiac decompensation is a predictor of poor prognosis in chronic heart failure. *Circ J* 69:823-830, 2005.
- Maeda K, Shioi T, Kosugi R, Yoshida Y, Takahashi K, Machida Y, Izumi T: Rapamycin ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Int Heart J* 46:513-530, 2005.
- Koitabashi T, Inomata T, Niwano S, Nishii M, Takeuchi I, Nakano H, Shinagawa H, Takehana H, Izumi T: Distinguishable optimal levels of plasma B-type natriuretic peptide in heart failure management based on complicated atrial fibrillation. *Int Heart J* 46:453-464, 2005.

##### 2)学会発表

- Shinagawa H, Inomata T, Koitabashi T, Osaka T, Nakano H, Takeuchi I, Nishii M, Takehana H, Izumi T: Immunomodulatory effects of erythropoietin on the experimental autoimmune myocarditis of rats, 第9回日本心不全学会学術集会(セッション「Cardiomyopathy & Myocarditis」)(下関/2005年10月20-22日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## 特発性心筋症に関する調査研究

—家族性突然死症候群について：遺伝子解析による検討—

分担研究者： 小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほか肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

### A. 研究目的

突然死とは「発症から24時間以内の予測不可能な死亡」と定義され、我が国では年間約10万人にもものぼると推定されている。突然死の予防は、適切なリスク評価による発作の予知及び発症時の対策などが重要と考えられる。突然死の心臓性原因疾患のうち、器質的心疾患を認めないもの、いわゆる特発性のものの中に家族性突然死症候群が含まれる。家族性突然死症候群は、原因不明に心室細動などの致死的不整脈を発症し突然死をもたらす疾患であり、先天性QT延長症候群やBrugada症候群などが知られている。近年これらの疾患の多くは心筋細胞のイオンチャネルの異常が原因であることが明らかとなり、さらに同じ疾患においても異常のあるイオンチャネルの種類によってはその臨床症状や治療法が全く異なることが明らかになっている。

今回の研究は、これら突然死を来す可能性のある患者において、心筋細胞に発現している既知のイオンチャネルの遺伝子を解析、異常を検索し、その遺伝子異常が既知のものであれば、その遺伝子型を元にしてその患者の治療および生活指導に反映させることを目標としている。さらに、その血縁者の遺伝子解析を行い無症候性キャリアと診断された場合は、定期的な経過観察を含めた対策をとる。

また未知のものであれば、その遺伝子異常をもつイオンチャネル蛋白を培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞などに発現させ、パッチクランプ法を用いた電流解析を行う。変異型イオンチャネルの電気生理学的特性が野生型と異なる場合は、そのメカニズムを解明する。一般にイオンチャネルは、遺伝子転写レベル、膜への輸送(トラフィッ

キング)及びチャネルの電気生理学的特性のいずれか一つでも障害されると正常に機能できなくなる。そこで遺伝子発現量やチャネル蛋白の細胞内局在などを分子生物学的及び生化学的解析法を用いて検討する。最終的には、その知見を元に患者本人の治療に還元することを目標としている。

### B. 研究方法

臨床的に特発性心室細動(ブルガダ症候群を含む)・および先天性QT延長症候群と診断された慶應大学病院受診患者に対して、遺伝子解析について文書による同意が得られた場合に限って、その末梢血検体を用いる。研究場所は慶應義塾大学医学部内とする。

適切なインフォームド・コンセント、身体的安全性およびプライバシー保護など、試料等提供者の尊厳および人権を尊重する。研究協力の任意性と撤回の自由を保証し、試料等提供の候補者は、提供を拒否することにより不利益を被らない。同意はいつでも撤回できる。遺伝子解析の研究者が試料を学外へ持ち出すことを禁止する。また試料等提供者に関する個人情報は解析担当者が知りえないようにし、機関の外部に持ち出されることを禁止する。個人情報研究の実施に直接関与しない個人情報管理者のみが管理する。検体には個人情報を記載せず、番号のみとする。解析は慶應義塾大学で施行する。試料は本研究目的以外には使用しない。試料は記載された研究者以外に譲渡せず、結果を第三者に漏洩しない。

①対象とする疾患は家族性突然死を起こしうる疾患とする。特に、特発性心室細動(ブルガダ症候群)および先天性QT延長症候群など。

②分析方法：PCR-RFLP、キャピラリーシーク

エンサー、denatured HPLC あるいはその組み合わせにより心筋イオンチャネル関連遺伝子の解析を行う。対象となる遺伝子はKCNQ1、HERG、SCN5A、KCNE1、KCNE2、KCND2、KCND3、KCNA5、KCNJ2、ADRB1、ADRB2、CACNA1C、CACNB2、Rad、Rem、calmodulinである。

### C. 研究結果

現在まで、当院でブルガダ症候群14名及び先天性QT延長症候群2名の患者から血液サンプルを採取し、遺伝子解析を施行中である。ブルガダ症候群患者では、主にSCN5A遺伝子(ナトリウムチャネル $\alpha$ サブユニット)を解析中であるが、その約8割が終了した時点で、1名の患者に遺伝子異常が発見された。これは、ナトリウムチャネル $\alpha$ サブユニットのリピートIIのS1にある713番目のアミノ酸バリンがグルタミン酸に置換したものであった。これまでブルガダ症候群で同部位の遺伝子異常は報告されておらず今後機能解析を行う予定である。

また、先天性QT延長症候群2名の患者はその臨床的所見(心電図や発作発症様式)から、LQT2が疑われたためHERG遺伝子(遅延整流性カリウム電流の早い成分)を解析した。うち一名において、325番目のアミノ酸LがQに置換される点変異が発見された。こちらも今後機能解析を行う予定である。

### D. 考察

ブルガダ症候群の遺伝子異常については、2002年のPrioriらの報告によると130名の発端者のうち28名(22%)、121名の家族のうち56名(46%)にSCN5Aの変異が発見されたが、SCN5Aの遺伝子異常は、心停止患者の予測に関しては感受性32%、特異性57%であったことからブルガダ症候群の診断には有用であるが危険因子の階層化にはあまり有用ではないことが示された。我々の解析でも、これまで14例中1例(7%)でのみSCN5Aに遺伝子異常を認めており、SCN5Aのみの異常で心電図でのST上昇などの表現形が現れるとは考えにくく、他の環境因子や他のイオンチャネルの異常を合併している可能性がある。現在突然死の予防においては、自動除細動器(ICD)挿入により成果が見られている。しかし、ICD挿入は突然死を予防することはできるが、失神や不整脈そのものは予防できない。また、ICD挿入による問題点も無視できない。

高コストであるうえ、職業上の制限や誤作動による精神的問題によるQOLの低下が問題となることがある。現状では、Prioriらの報告のように、突然死のリスク評価にはSCN5A遺伝子のスクリーニングは有用ではないことから、他の遺伝子異常や促進因子の同定が急務である。

先天性QT延長症候群は、大きく先天性の嚙唾を伴わないRomano-Ward症候群と嚙唾を伴うJervell and Lange-Nielsen症候群に分類される。Romano-Ward症候群は現在8種類に分類されており、LQT1および2がそれぞれ40%程度、LQT3が10%程度とLQT1から3で全体の約9割を占めており、この3種類について臨床的および基礎的に詳細な検討がなされてきた。しかしなお、これらに分類することが出来ない症例も存在し、今後も引き続き遺伝子解析による検討が必要と思われる。

また、薬物服用、電解質異常などの二次的要因でQT延長を来す疾患を後天性QT延長症候群と定義するが、最近後天性と思われた患者から遺伝子異常が発見されるようになり、QT延長の促進因子であるのではないかと考えられるようになった。後天性QT延長症候群の遺伝子異常が、薬物服用や電解質異常などの二次的要因に加えてQT延長の促進因子であるとすれば、発作を予防可能であり今後も検討が必要である。

### E. 結論

家族性突然死症候群である先天性QT延長症候群やBrugada症候群は、現在まで遺伝子解析により多くの原因遺伝子が同定され治療に還元されるようになったが、まだ未知の遺伝子異常の存在も予想され今後の更なる研究が期待される。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録情況

なし。

### <研究協力者>

村田光繁(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科)

吉川 勉(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—アンジオテンシンⅡによる心筋障害に対する鉄の関与—

分担研究者： 永井 良三(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

### A. 研究目的

今回われわれは、アンジオテンシンⅡ投与ラットに鉄キレーターを投与し、心・血管リモデリング、血管機能の低下に対する影響を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 動物モデルの作成

AngⅡは浸透圧ポンプの皮下への埋め込みにより7日間連続で、0.7 mg/kg/日の容量で投与した。鉄キレーターはデフェロキサミンを連日皮下中にて200 mg/kg/日の容量で投与した。

#### 2) 心・血管リモデリングの検討

ホルマリン固定標本のMasson trichrome染色を行い、線維化領域を半定量した。

#### 3) TGF-β1の発現に関する検討

TGF-β1 mRNAの発現局在について、In situ hybridizationで検討した。また、細胞種の同定のため、連続切片をED-1(マクロファージのマーカー)、αSM-アクチンの免疫染色を行った。また、心全体からmRNAを抽出し、TGF-β1 mRNAの発現をNorthern blotにて検討した。

#### 4) 鉄の沈着の検討

鉄の沈着の有無は、プルシアン青染色にて行った。また、フェリチンの発現に関しては、抗ラットフェリチン抗体を用いた免疫染色にて検討した。

#### 5) 血管機能の検討

Organ bathに大動脈をつるし、フェニレフリンで前収縮させたのち、内皮依存性、非依存性の弛緩反応を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では既に確立された細胞と実験動物疾患モデルを用いて検討する。動物は換気、給餌等の

完備した施設で飼育し、学内もしくは研究所内の規定に適合する条件で実験を行うため倫理的な問題は無い。

### C. 研究結果

#### 1) AngⅡによるTGF-βの発現亢進

AngⅡ投与は、右心室優位に心筋の脱落、肉芽腫様病変を形成した。この心筋障害部において鉄の沈着、フェリチン発現亢進を認めた。また、連続切片の染色から、これらの細胞ではTGF-β1を高発現していた。TGF-β1 mRNAの発現はAngⅡにより約1.7倍に増加していた。

#### 2) 鉄キレーターの効果

デフェロキサミンの投与は、AngⅡ投与による心への鉄沈着、フェリチンの発現亢進を抑制した。デフェロキサミン投与により、ラット心の線維化領域は、右室7.6%→1.3%へ、左室2.0→0.2%へそれぞれ減少した。デフェロキサミンは、AngⅡによるTGF-β1 mRNAの発現亢進を抑制した。また、デフェロキサミン投与はAngⅡによる、生体酸化ストレスマーカー、血中8-epi-prostaglandin F2αの濃度上昇を抑制した。デフェロキサミン投与は大動脈においても、アンジオテンシンⅡによるフェリチンの発現亢進、鉄沈着を抑制した。デフェロキサミンは、また、大動脈における酸化ストレスのマーカー遺伝子である、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、および、HNE修飾蛋白の発現亢進を抑制した。共焦点顕微鏡を用いた検討では、外膜細胞において、HNE修飾蛋白はフェリチンとco-localizationしていることがわかった。

#### 4) 鉄キレーターによる

#### 血管機能/リモデリングの改善

アンジオテンシンⅡ投与ラットから摘出した大

動脈を用いて血管張力スタディを行ったところ、内皮依存性および非依存性血管弛緩反応が減弱していたが、この現象は鉄キレーションにより抑制された。また、アンジオテンシンIIの連続 30日間投与によって生じた大動脈のリモデリング(血管壁の肥厚、外膜の線維増生)についても、鉄キレーションは部分的に改善した。

#### D. 考察

鉄のキレーションはアンジオテンシンIIによる心において、TGF- $\beta$ 1の発現亢進、線維増生を抑制し、大動脈においてはリモデリング、血管機能を改善した。アンジオテンシンIIによる鉄動態の異常は、血管機能障害、線維化関連遺伝子発現亢進を介して心筋障害の増悪因子として働くことが示唆された。

#### E. 結論

Ang IIによる心血管の発症機序に、鉄動態の異常とそれに引き続く酸化ストレスの亢進が関与している可能性があると考えられた。鉄動態の改善がAng IIによる心血管障害を緩和する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

• Ishizaka N, Nagai R, et al: Iron chelation suppresses

the ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2282-2288, 2005.

##### 2) 学会発表

• 石坂, 永井, 他: アンジオテンシンIIによる大動脈における酸化ストレスへの鉄代謝異常の関与, 第51回日本心臓病学会学術集会(東京/2003年9月9日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

##### 1) 特許取得

• 永井良三, 今井 靖: 動脈硬化及び虚血性疾患の診断方法(特願2004-097464)(出願日: 2003年3月30日)

• 永井良三, 眞鍋一郎, 大石由美子: メタボリックシンドロームの治療薬成分のスクリーニング方法と、メタボリックシンドロームの診断方法(特願2004-104923)

• 石原 淳, 鳥取恒彰, 永井良三, 眞鍋一郎: KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA(特願2004-075115)

• 石原 淳, 永井良三, 眞鍋一郎: KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA(特願2003-202863)

##### 2) 実用新案登録

なし。

##### 3) その他

なし。

## 特発性心筋症に関する調査研究

—アンギオテンシンⅡタイプ1受容体シグナルの心筋梗塞組織動態に及ぼす影響—

分担研究者： 藤原 久義(岐阜大学大学院医学研究科循環病態学教授)

**<研究要旨>**心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

### A. 研究目的

アンギオテンシンⅡタイプ1受容体(AT1)シグナルの心筋梗塞(MI)巣自体の形態変化への影響ならびにその分子機構を明らかにし、AT1阻害が心筋梗塞後の左室リモデリングならびに心不全を軽減する機序を明らかにすること。

### B. 研究方法

AT1ノックアウトマウス(AT1KO, n=20)ならびにワイルドマウス(WT)にて、左冠動脈永久結紮によりMIを作製した。WT群は無治療群、ヒドララジン治療群(17 mg/kg/day, 低血圧コントロール)、オルメサルタン治療群(10 mg/kg/day, AT1阻害薬)に分けた(各n=20)。慢性期(MI 4週後)ならびに亜急性期(MI 1週後)に各群間で生存率、心機能、左室リモデリング、アポトーシス、心室でのタンパク発現を比較した。

#### (倫理面への配慮)

手術は吸入麻酔下に行い、屠殺は大量の麻酔薬注射にて行い、動物への苦痛は極力軽減した。

### C. 研究結果

AT1KOでは従来の報告通り慢性期においてWTに比較し梗塞後左室リモデリングと心不全の軽減がみられ、非梗塞巣の線維化の減少がみられた。WTに比しAT1KOでは梗塞癒痕が短縮しかつ梗塞壁厚の増大がみられた。AT1KOの梗塞巣の細胞数は有意に増加しており、特に血管内皮細胞と血管外の $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性細胞が増加していた。亜急性期の検討にてAT1KOでは梗塞巣肉芽組織細胞のアポトーシスならびにDNAの酸化傷害の減少、細胞増殖活性の増大がみられた。また、AT1KOではAkt活性の上昇がみられた。AT1KOに

見られた以上の梗塞後心不全の改善ならびに梗塞組織動態変化はAT1阻害薬オルメサルタン治療群でも同様にみとめられた。しかし同等に血圧を低下させたヒドララジン群ではみとめられなかった。

### D. 考察

AT1KOあるいはオルメサルタン治療によるAT1阻害では、亜急性期における肉芽組織細胞の増殖活性増加と細胞死抑制により慢性期梗塞巣における細胞数の増加、癒痕組織の形態変化がもたらされて壁ストレスが減少することにより、左室拡大軽減・左心機能の改善の一因をなしていることが推測された。またこの作用は血圧降下とは無関係でありAT1阻害特有のものと考えられた。

### E. 結論

AT1シグナルは心筋線維化に加え、梗塞巣の組織動態を改変することにより梗塞後左室リモデリングならびに心機能に悪影響を及ぼす。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

・Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure.



Circulation 111(19):2430-2437, 2005.

2)学会発表

• Kanomori H, Takemura G, Li Y, Li L, Ogino A, Miyata S, Okada H, Esaki M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H : Angiotensin II type 1 receptor blocker improves postinfarction

ventricular remodeling by inhibition of granulation tissue cell apoptosis, 第70回日本循環器学会総会・学術集会(名古屋/2006年3月24-26日)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

## 特発性心筋症に関する調査研究

—心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明—

分担研究者： 堀 正二(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発症以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返して行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

## A. 研究目的

心臓に圧負荷や容量負荷をはじめとする力学的負荷がかかると心臓は肥大という形態をとることでその増大した負荷に適応する。しかし、負荷が長期間持続するとその適応は破綻し心拡大、収縮力低下をきたし心不全が発症する。我々はこれまでに、この適応から破綻へのメカニズムにはアポトーシスをはじめとする心筋細胞死が重要な役割を果たしていること、またこの心筋細胞死にはMAPKKKであるapoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)が極めて重要な役割を果たしていることを報告してきた。すなわち、ASK1ノックアウトマウスを用いて圧負荷および心筋梗塞という異なる2つの病態モデルを作成しその表現形を検討したところ、いずれのモデルにおいてもASK1ノックアウトマウスでは野生型と比較し心筋細胞死が著明に減少し心筋リモデリングの進展および心不全の発症が有意に抑制されたのである。このことより我々はASK1が新たな心不全治療の有望なターゲットであると考えた。そこでASK1抑制による心不全治療の臨床応用を目指すべく、ASK1のドミナントネガティブ体を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を作成し、心筋症を自然発症するハムスターに投与して心不全の進展を抑制できるか否かを検討した。

## B. 研究方法

ASK1のドミナントネガティブ体として709番目のアミノ酸をlysineからarginineに変異させさらにN末端から649番目までを欠失させたコンストラクト(ASK $\Delta$ N(KR))を作成し、これを発現するAAV(AAV/ASK $\Delta$ N(KR))を作成した。AAV/ASK $\Delta$ N(KR)は培養心筋細胞においてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激による

ASK1の活性を有意に抑制することを確認した。そこでAAV/ASK $\Delta$ N(KR)およびコントロールとしてLacZを発現するAAV(AAV/LacZ)を心筋症自然発症ハムスターであるBIO TO-2ハムスターに経冠動脈的に心筋へ感染させ、感染後6週および14週の時点で心不全の状態を心エコー、観血的血行動態測定で評価した。mRNAの発現量はドットプロット法により検討した。心筋線維化の程度はMasson-trichrome染色で評価した。アポトーシスはin situ TUNEL assayでのTUNEL陽性心筋細胞数および活性化caspase 3に対する免疫組織染色にて評価した。

## C. 研究結果

コントロール群(AAV/LacZ 投与群)では、左室短縮率(LVFS)の経時的な低下(AAV投与前; 24.9 $\pm$ 1.6%、投与6週間後; 13.7% $\pm$ 0.8%、投与14週間後; 7.2 $\pm$ 0.7%)および左室拡張末期径(LVDd)の経時的な増加(投与前; 4.9 $\pm$ 0.1mm、6週間後; 5.9 $\pm$ 0.1mm、14週間後; 6.7 $\pm$ 0.1mm)を認めた。しかしAAV/ASK $\Delta$ N(KR)投与群では、投与6、14週間後におけるLVFSの低下およびLVDdの増加はコントロール群と比較すると有意に抑制されていた(LVFS: 6週間後; 17.0 $\pm$ 0.8%、14週間後; 12.4 $\pm$ 0.6%、LVDd: 6週間後; 5.4 $\pm$ 0.1mm、14週間後; 5.9 $\pm$ 0.1mm, p<0.01 vs. コントロール群)。投与14週間後における観血的血行動態測定により得られる収縮性の指標であるmaximum LV dp/dtはコントロール群と比較するとAAV/ASK $\Delta$ N(KR)において有意に高値(8348.7 $\pm$ 476.3 vs. 5392.1 $\pm$ 757.3 mmHg/sec, p<0.01)、拡張性の指標であるminimum LV dp/dtはAAV/ASK $\Delta$ N(KR)において有意に低値(-6701.4 $\pm$ 441.4 vs. -4265 $\pm$ 622.1 mmHg/

sec,  $p < 0.05$ )であり、AAV/ASK $\Delta$ N(KR)投与により有意に心機能の低下が抑制されていた。またこの心機能低下の抑制を反映してANF、BNPのmRNAの発現量はAAV/ASK $\Delta$ N(KR)群で有意に減少していた。Masson-trichrome染色で評価した心筋線維化の程度はAAV/ASK $\Delta$ N(KR)群で有意に軽度であり、type III collagen mRNAの発現量もAAV/ASK $\Delta$ N(KR)群で有意に減少していた。in situ TUNEL assayでのTUNEL陽性心筋細胞数および活性化caspase 3陽性細胞数はAAV/ASK群で有意に減少しており、AAV/ASK $\Delta$ N(KR)投与により心筋細胞のアポトーシスが抑制されていることが示された。ASK1の下流のMAPK cascadeの活性化について検討したところ、JNK、p38 MAPKはAAV/ASK $\Delta$ N(KR)群で有意に活性化が抑制されていた。

#### D. 考察

ASK $\Delta$ N(KR)によるASK1活性の抑制は、自然発症心筋症による心不全の構造的、機能的進行を抑制することが示された。これは心不全発症過程において出現するJNK、p38 MAPKを介するアポトーシスによる心筋細胞死を減少させてことによると考えられる。

#### E. 結論

ASK1は心臓リモデリングにおいて重要な働きを果たしておりASK1阻害剤は新規心不全治療薬になりうる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Kashiwase K, et al: CaMKII activates ASK1 and NF- $\kappa$ B to induce cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 327:136-142, 2005.
- Tsujimoto I, et al: The antioxidant 3-methyl-1-phenyl-pyrazolin-5-one (edaravone) attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 45:1-6, 2005.
- Watanabe T, et al: Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun* 333:567-562, 2005.
- Takeda T, et al: Presenilin 2 regulates the systolic function of heart by modulating Ca<sup>2+</sup> signaling. *FASEB J* 10:1096/fj.05-3744fje, 2005.

##### 2) 学会発表

- Hikoso S, et al: Chronic inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 by myocardial gene transfer Suppressed progeression of heart failure in genetic cardiomyopathy, American Heart Association (Dallas, USA/November 13, 2005)
- Watanabe T, et al: Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also non-apoptotic cardiomyocyte death, American Heart Association (Dallas, USA/November 13, 2005)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む) なし。

## 特発性心筋症に関する調査研究

—心筋症の予後および心筋症におけるC型肝炎ウイルス感染、炎症、免疫に関する研究—

分担研究者： 松森 昭(京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返し行われてきた。心筋症とその重篤な病態としての心不全の診断と治療は日進月歩の進歩がみられ、時代に即応した転帰の把握は重症で難治性の心疾患に欠かせぬ情報である。本研究では、詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討するとともに、心筋症の病態・治療・疫学に関し研究を行う。

## A. 研究目的

心筋症の予後、心筋症の発症におけるC型肝炎ウイルス(HCV)感染の意義を明らかにするとともに、心筋症診断の新しいバイオマーカーとしての血中グロブリン遊離軽鎖(FLC)の意義を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

1) (心筋症の予後調査)心筋症調査研究班により1999年に行われた全国免疫調査をもとに5年後の予後調査を実施した。

2)心筋症の心筋標本を用いて、HCV抗原の局在を新しく開発した免疫組織染色法により検討した。

3)近年、われわれは心不全および心筋炎の発症にマスト細胞が重要な役割を果たすことを見出し、今回、マスト細胞機能と関連が深いと考えられる免疫グロブリン遊離軽鎖(FLC)と心不全の関連について検討した。

## C. 研究成果および考察

1) (心筋症の予後調査)最終の予後解析対は、拡張型心筋症1,932例、肥大型心筋症2,134例であった。拡張型心筋症の5年生存率は73%であり、新規症例390例では、78%であった。肥大型心筋症の5年生存率は84%で、新規症例342例では86%であった。

2)HCV肝炎の肝臓では主として浸潤細胞が陽性で、一部の内皮細胞に陽性所見が見られた。HCV感染陽性の拡張型心筋症の心臓でも肝臓と同様に浸潤細胞を中心に陽性所見が見られ、内皮細胞の一部が陽性であった。

3)心不全群での血中FLCカップ鎖は $41 \pm 39$  mg/

ml( $n=63$ , 平均 $\pm$ SD  $17.334$  mg/ml)で正常人 $28 \pm 5$  mg/ml( $n=17$ ,  $21-40$  mg/ml)に比し有意に高値を示した( $p < 0.0001$ )。血中FLCラムダ鎖は、 $93 \pm 68$  mg/ml( $36-429$  mg/ml)で正常人 $44 \pm 9$  mg/ml( $27-57$  mg/ml)に比し、有意に上昇した( $p < 0.0005$ )。FLCカップ鎖/ラムダ鎖の比は $0.46 \pm 0.14$ と正常人 $0.66 \pm 0.16$ と有意に低下した( $p < 0.0001$ )。また、血中NT-proBNPとFLCカップ鎖( $r^2=0.51$ ,  $p < 0.005$ )、およびラムダ鎖( $r^2=0.81$ ,  $p < 0.0001$ )は正の相関を示した。

本研究により、心不全においてBリンパ球が活性化され、FLCの生産が増加することが明らかとなった。今後、心筋症、心筋炎などの、心不全の病因によりFLCの差異がみられるかを検討する予定である。

## D. 健康危険情報

なし。

## E. 研究発表

## 1)論文発表

- Hara M, Ono K, Wada H, Sasayama S, Matsumori A: Performed angiotensin II is present in human mast cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 18(6):415-420, 2005.
- Matsumori A: Role of hepatitis C virus in cardiomyopathies. In “Chronic Viral and Inflammatory Cardiomyopath”, ed. by Schultheiss H-P, Kappa J-F, Grötzbach G, Springer-Verlag, Berlin, 2006, pp 100-120.
- Matsumori A: Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res* 96(2):144-147, 2005.