

## 2) 学会発表

- Matsumori A, Tracy S, Chapman NM, Mason J: Cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with heart failure due to hepatitis C virus myocarditis, ESC Congress 2005 (Stockholm, Sweden/September 3-7, 2005)
- Matsumori A, Horii T, Nakano T, Isomura T, Suma H: Free immunoglobulin light-chains as a new biomarker of heart failure, 9<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Heart Failure Society of America (Boca Raton, USA/September 18-21, 2005)
- Matsumori A, Shimada T, Yoshizawa H, Chapman NM, Tracy S, Mason J: N-terminal pro-Brain natriuretic peptide as a biomarker of myocardial injury in patients with heart failure due to

myocarditis and in health screening of individuals infected with hepatitis C virus, Scientific Sessions of the American Heart Association 2005 (Dallas, USA/November 13-15, 2005)

- Matsumori A, Horii T, Nakano T, Isomura T, Suma H: Increased serum concentrations of free immunoglobulin light-chains as A new clinical biomarker for the evaluation of heart failure. Scientific Sessions of the American Heart Association 2005 (Dallas, USA/November 13-15, 2005)

## F. 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

—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—

分担研究者： 中谷 武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)

＜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。

## A. 研究目的

内科的および外科的治療の進歩により、心不全治療成績は向上してきた。しかし、高度心筋障害を伴う心不全においては、心臓ポンプ機能の代替が必要であり、補助人工心臓や心臓移植の適応が考慮される。今回、現状の治療限界となった心臓移植対象の重症心不全例に対する左補助人工心臓(LVAS)の適応について検討した。

## B. 研究方法

対象は、1994年以降2005年までに、重症心不全で心臓移植が考慮され、VAS装着を必要とした慢性心不全急性増悪例75例である。年齢は8～58(平均35)歳で、基礎疾患は心筋症70例、虚血性心筋疾患6例であった。用いたLVASは、体外設置東洋紡LVAS 63例(左房脱血11例、左室脱血52例)、体内設置携帯型LVAS 8例(HeartMate VE 3例、Novacor 4例、EvaHeart 1例)および両心補助5例であった。

VAS装着後の管理を以下に示す。装着術後早期は、循環動態と全身状態の安定化を計る。全身状態が安定化すれば、早期抜管を図る。また、感染の危険性を減少させるため、経口摂取を開始し、種々のラインの早期抜去を試みる。早期からリハビリテーションを開始し、ベッド上での受動運動から筋力に応じて運動量を増し、病室内での日常生活を行えるようにする。さらに、全身状態の改善に応じて、徐々に自転車こぎや病棟内歩行などを加える。VAS駆動法は、固有レートかfull-fill to full-emptyモードを選択する。全身状態改善後は、ACE阻害剤やβブロッカーを含む内科的心不全治療を再開する。適宜、心エコー法やBNP測定などにより自己心機能を評価し、自己心機能に応じ補助量減少や、運動量増大など自己心のトレーニング

を計る。補助量減少や運動量増大しても自己心機能が良好である場合、VASからの離脱を考慮する。VAS施行中の抗血栓療法は、外科的出血コントロール後に開始する。経口摂取が早期から開始できる症例ではワーファリンを用いる。目標PT-INRは術後早期では2とし、安定期には3～4前後に維持する。早期にワーファリンが開始できない症例や、PT-INRのコントロールに難渋する症例ではヘパリン(通常低分子ヘパリン)を併用する。また、術後早期から抗血小板療法を併用する。通常はアスピリン81を1錠/日投与し、ずり応力下血小板血栓形成能を測定して血小板機能をチェックし、投与量を調整する。また、脳出血時には、乾燥人血液凝固第X因子複合体を投与する。VAS使用時に注意すべき合併症として、血栓塞栓症とともに感染症があり、感染予防に注意する。

## C. 研究結果

装着期間は施行中を含め平均414日で、内21例(国内13例、渡航8例)が平均575日後に移植された。33例は平均388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平均149日後に離脱し、計画的に離脱した7例は長期生存している。14例は最長1267日平均383日間補助継続中である。また、当センターでの心臓移植15例中13例はLVAS症例であったが、移植後の成績は良好で、移植後最長は6年10ヵ月に及んでいる。心臓移植対象例においてLVASによる長期補助が可能となり、心機能回復例も認めている。また心臓移植例の成績は良好であった。

## D. 考察

我が国で2005年末までに施行された心臓移植は

29例であるが、21例がLVAS装着例であった。施行期間は平均666日で、最長は当施設での東洋紡製左室脱血型での1227日で、15例が1年以上の補助例であった。システムは、東洋紡製15例、Novacor LVAS 2例、HeartMate-IP 2例、-VE 2例であった。当施設で心臓移植適応ありと判定した119例における1年および3年累積生存率をみると各々84%および57%であるが、死亡およびLVAS装着のイベントフリー生存率では各々52%および32%と低下し、LVASによる生存率の著明な改善を認めた。

心臓移植対象例に対するLVASの適応により、長期安定した循環補助が行えるようになり、心機能回復例では離脱の可能性もある。また、心機能回復不良例においては、心臓移植へのブリッジとして、3年以上の補助が可能であった。しかし、体外設置型においては、病院内での生活が必要であった。これに対し、体内植込み型では退院し、在宅療法が可能となるが、現在用いられる拍動流型のLVASは大きく、装着例が限定された。今後、日本人の体格にあったQOLの高いLVASが必要であり、現在臨床導入を開始している。

#### E. 結論

心臓移植対象例に対しLVAS装着を行なうことにより長期の安定した循環補助が可能となってきた。今後、QOLの高い補助を長期間安定して行なうために、新しいLVASの導入とともに、管理法のさらなる検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- ・ 中谷武嗣：日本における心臓移植の現況。今日の移植 18：287-293, 2005.
- ・ 中谷武嗣：治療の進歩；補助人工心臓。日本内科学会雑誌 94：111-118, 2005.
- ・ 中谷武嗣：心不全の外科治療。Heart View 9：239-245, 2005.

##### 2) 学会発表

- ・ 花谷彰久, 中谷武嗣, 神崎秀明, 金 智隆, 橋村一彦, 中谷 敏, 駒村和雄, 山岸正和, 庭屋和夫, 小林順二郎, 坂東 興, 田鎖 治, 北風政史, 北村惣一郎, 宮武邦夫：Preoperative prediction of myocardial recovery by left ventricular assist system, 第69回日本循環器学会総会・学術集会(横浜/2005年3月19-21日)
- ・ 中谷武嗣, 庭屋和夫, 花谷彰久, 小林順二郎, 坂東 興, 田鎖 治, 中嶋博之, 今中秀光, 塚野慎也, 津田悦子, 光武耕太郎, 宮田茂樹, 真野暁子, 八木原俊克, 北村惣一郎：Management of pre-and post-heart transplant patients at National Cardiovascular Center, 第58回日本胸部外科学会定期学術集会(インターナショナルシンポジウム)(岡山/2005年10月5-7)
- ・ 加藤倫子, 中谷武嗣, 真野暁子, 津田悦子, 庭屋和夫, 小林順二郎, 坂東 興, 田鎖 治, 中嶋博之, 花谷彰久, 駒村和雄, 光武耕太郎, 植田初江, 宮武邦夫, 越後茂之, 北風政史, 八木原俊克, 友池仁暢, 北村惣一郎：国立循環器病センターにおける心移植後管理の経験, 第24回日本心臓移植研究会学術集会(下関/2005年10月22日)
- ・ 中谷武嗣, 庭屋和夫, 花谷彰久, 小林順二郎, 坂東 興, 田鎖 治, 中嶋博之, 塚野真也, 光武耕太郎, 宮田茂樹, 堀 由美子, 宮武邦夫, 八木原俊克, 北村惣一郎：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における経験, 第33回人工心臓と補助循環懇話会(パネルディスカッション)(栃木県塩谷郡/2005年1月28-29日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### <研究協力者>

加藤倫子(国立循環器病センター臓器移植部)  
真野饗子(国立循環器病センター臓器移植部)  
庭屋和夫(国立循環器病センター心臓血管外科)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 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)

**<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、破綻すると心不全へ移行すると考えられているが、そのメカニズムにおける心筋細胞アポトーシスの役割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、胎生期より成人期を通じて心臓に発現が認められる転写因子である。myocardinはserum response factor(SRF)を介してserum response element(SRE)依存性プロモーターを活性化する。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論文報告しているが、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。我々はmyocardinが $\alpha$ 1受容体刺激薬phenylephrinによる心筋肥大を制御していることを、2004年の心筋症班会議で報告した。さて心不全の成因において、 $\beta$ 受容体刺激は肥大とアポトーシスの両方で関連していると考えられている。今回我々は、 $\beta$ 受容体刺激による心筋細胞アポトーシスにおけるmyocardinの役割を検討した。

### B. 研究方法

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った。

#### (倫理面への配慮)

ラットに対する実験は当大学の「動物実験における倫理の原則」に則って行った。

### C. 研究結果

ラット新生仔培養心筋細胞を $\beta$ 受容体刺激薬isoproterenolにて刺激、アポトーシスを誘導し、

TUNEL法、caspase-3活性にて評価した。アポトーシスはmyocardinの強制発現により有意に抑制され、DN変異体により増加がみられた。myocardinの強制発現により、心筋細胞内にanti-apoptotic proteinであるBcl-2の発現が増加しており、それによって抗アポトーシス作用を及ぼしていることが考えられた。Bcl-2のプロモーター領域にはSREが2箇所が存在し、レポーターアッセイを用いた実験にて、myocardinはSREを介してBcl-2の発現を転写レベルから増加させることを確認した。さらに我々は、isoproterenolによるmyocardinの細胞内の動態変化について検討した。ウェスタンブロッティングにて、定常状態ではmyocardinは核内に多くが存在し、細胞質内の発現は少なかった。isoproterenolの刺激により、核内のmyocardinは12時間後より減少し、24時間後には殆ど確認できなくなった。逆に細胞質内では12時間後より著明な増加がみられた。このことより、isoproterenolによるmyocardinの核内での減少が心筋細胞のアポトーシス感受性を高めていると考えられた。また、核内のmyocardinは細胞質内のものより分子量が高く、脱リン酸化による核内からのexportや、分解などの関与が予想された。

### D. 考察

myocardinはSRE依存性の転写因子であるが、肥大大関連遺伝子のほかに抗アポトーシス作用を持つ遺伝子の転写を制御していると考えられる。myocardinは心筋細胞の生存に関わり、心不全の成因において重要な働きを持つ因子であると考えられ、今後はin vivoの心不全モデルを用い、実際の心不全における役割の検討も行っていきたい。

## E. 結論

myocardinは生後の心筋細胞において肥大に関与しているが、一方で細胞生存に対しては、Bcl-2の発現を増加させ、アポトーシス抑制的に働いており、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。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- Toh R, Shinohara M, Takaya T, Yamashita T, Masuda S, Kawashima S, Yokoyama M, Yagi N: An X-ray diffraction study on mouse cardiac cross-bridge function in vivo; effects of adrenergic {beta}-stimulation. *Biophys J* 90(5):1723-1728, 2006.
- Watanabe S, Shite J, Takaoka H, Shinke T, Imuro Y, Ozawa T, Otake H, Matsumoto D, Ogasawara D, Paredes OL, Yokoyama M: Myocardial stiffness is an important determinant of the plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with both diastolic and systolic heart failure. *Eur Heart J* Feb 7, 2006.
- Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, Takahashi M, Ohashi Y, Ichikawa S, Terashima M, Mori T, Awano K, Shinke T, Shite J, Hirata K, Yokozaki H, Kawashima S, Yokoyama M: Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation* 112(14):2114-2120. 2005.
- Kawai K, Hata K, Kawai H, Takaoka H, Miyata-Fukuoka Y, Okubo H, Yokoyama M: Pathophysiological characteristics and responsiveness to neurohormonal antagonism in idiopathic dilated cardiomyopathy patients with

antihepatitis C virus antibody. *Int Heart J* 46(3):407-417. 2005.

- Emoto N, Raharjo SB, Isaka D, Masuda S, Adiarito S, Jeng AY, Yokoyama M: Dual ECE/NEP inhibition on cardiac and neurohumoral function during the transition from hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension* 45(6):1145-1152, 2005.
- ### 2) 学会発表
- Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Kawai M, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S: Myocardin inhibits  $\beta$ -adrenergic stimulation-induced cardiac myocyte apoptosis by enhancing Bcl-2 expression, 第9回日本心不全学会学術集会(セッション: Apoptosis/ Cell Death)(下関/2005年10月20-22日)
  - Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Kawai M, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S: Myocardin inhibits  $\beta$ -adrenergic agonist-induced cardiac myocyte apoptosis by enhancing Bcl-2 expression, America Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2005 (Session: Apoptosis)(Dallas, USA/ November 13-16, 2005)
  - Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Kawai M, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S: Dual role of myocardin on hypertrophy and apoptosis in cardiac myocyte, 第22回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会(セッション: Apoptosis/Cell Death)(大阪/2005年12月15-17日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし。

## < 研究協力者 >

小林成美  
(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討—

分担研究者： 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)

**<研究要旨>**心不全時には、 $\beta$ 受容体の過剰刺激による心筋型リアノジン受容体(RyR2)からのFKBP12.6の解離や酸化ストレスによりRyR2内のN-terminal domainとCentral domainの連関障害が生じており、この連関障害がRyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 露出の原因である。したがって、この連関障害の是正によりRyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 露出が抑制され、心筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷が改善し、収縮不全・拡張不全は改善する。悪性高熱症(MH)の治療薬であるダントロレンは、骨格筋型リアノジン受容体(RyR1)と同様に、RyR2内の制御ドメイン内のDP1領域(Leu<sup>590</sup>-Cys<sup>609</sup>)に結合し、N-terminal domainとCentral domain間の連関障害を是正し、その結果、RyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 露出が抑制され、心筋細胞機能が改善することが示された。このように、ダントロレンは、RyR2をターゲットとした新しい心不全治療薬になる可能性があることが示唆された。

### A. 研究目的

悪性高熱症(MH)やArrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)、Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)においては、リアノジン受容体(RyR)を構成している1アミノ酸の突然変異により、RyRから $\text{Ca}^{2+}$ 露出が生じる。この多くの突然変異の分布は、RyR内のある特定の部位(N-terminal domainとCentral domain)に限局しており、これらのdomainが、チャンネルの開閉を調節する制御ドメインとして働いている。心不全時には、 $\beta$ 受容体の過剰刺激によるRyR2からのFKBP12.6の解離や酸化ストレスによりRyR2内のN-terminal domainとCentral domainの連関障害が生じており、この連関障害がRyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 露出の原因である。したがって、この連関障害の是正によりRyR2からの $\text{Ca}^{2+}$ 露出が抑制され、心筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷が改善し、収縮不全・拡張不全が改善する。最近、筆者らは、MHの治療薬であるダントロレンは、RyR1内の制御ドメイン内のDP1領域(Leu<sup>590</sup>-Cys<sup>609</sup>)に結合し、これらのチャンネル制御ドメインの連関障害を是正することによりチャンネル異常を改善させることを報告した。そこで、筆者らは、ダントロレンが、心不全においてもRyR2内のチャンネル制御ドメイン連関を強めて、RyR2から $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を抑制し、心不全を改善させるか否かについて検討した。

### B. 研究方法

ビーグル犬に心内膜下リードを挿入し240/minで4週間ペーシングし、心不全モデルを作成し、左室心筋から心筋筋小胞体(SR)および心筋細胞を単離精製し、以下の実験を行った。

(倫理面への配慮)

心不全モデル動物を使用した実験なので、動物

の苦痛がないように行った。

### C. 研究結果

#### 1) 不全心筋SRからの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出に対する

ダントロレンの効果

$\text{Ca}^{2+}$  indicatorのfluo-3を用い、SR vesicle外の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を分光光度計でモニターし、SRからの $\text{Ca}^{2+}$ 露出を測定した。不全心筋SRでは、SRからの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が観察されたが、ダントロレン存在下では不全心筋SRからの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出は濃度依存性に抑制された( $\text{IC}_{50}=0.3\mu\text{M}$ )。

#### 2) 蛍光消退実験による

ドメイン連関状態の定量化

合成ペプチド(Gly<sup>2460</sup>-Pro<sup>2495</sup> of RyR2)をsite-specific carrierとして用い、RyR2上のN-terminal domainを特異的にmethylcoumarine acetamide (MCA)で蛍光ラベルした。この蛍光に対する大きな蛍光Quencherのaccessibilityを評価することで、チャンネル制御ドメインのzipping-unzipping状態を定量化した。正常心筋では、RyRチャンネル制御ドメインは、zipping状態であったが、心不全心筋ではすでにRyRはunzipping状態であった。ダントロレンは、不全心筋RyR2において、濃度依存性にドメイン連関をunzipping $\rightarrow$ zippingに修復した( $\text{IC}_{50}=0.3\mu\text{M}$ )。このダントロレンのドメイン連関の修復効果は、SRからの $\text{Ca}^{2+}$  leak assayの実験と同様、 $\text{IC}_{50}$ が $0.3\mu\text{M}$ であることから、ドメイン連関障害(unzipping程度)の是正がSRからの $\text{Ca}^{2+}$ 漏出の抑制につながることを示唆された。

#### 3) 単離心筋細胞のcell shortening、

$\text{Ca}^{2+}$  transientに及ぼすダントロレンの効果

$1\mu\text{M}$ のダントロレンは正常心筋細胞のcell shorteningや $\text{Ca}^{2+}$  transientに影響を与えなかったが、不全心筋細胞のcell shorteningと $\text{Ca}^{2+}$  transientを著明に改善した。

#### 4) 単離心筋細胞の生存率に及ぼす

##### ダントロレンの効果

不全心筋より単離した心筋細胞を培養し、生存細胞数をcountし生存率を求め、ダントロレン投与群、ダントロレン非投与群の比較検討を行った。不全心筋細胞の生存率は、4日後には、約15%にまで低下するが、ダントロレン投与群では、約80%まで改善した。

#### D. 考察

不全心筋において、ダントロレンは、RyR2内のN-terminal domainとCentral domainの連関障害を是正することにより、RyRからのCa<sup>2+</sup>漏出を抑制し、心筋細胞機能異常を改善させることが示された。

#### E. 結論

ダントロレンは、リアノジン受容体を標的とした新しい心不全治療薬になる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Yano M, Yamamoto T, Ikeda K, Matsuzaki M: Mechanisms of disease; ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(1):43-52, 2006.
- Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M: Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest* 115(3):556-564, 2005.
- Yano M, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M: Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacol Ther* 107(3):377-391, 2005.
- Yano M, Okuda S, Oda T, Tokuhisa T, Tateishi H, Mochizuki M, Noma T, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M: Correction of defective inter-domain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 112:3633-3643, 2005.
- Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ikeda Y, Ohkusa T, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M: Defective regulation of inter-domain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure.

*Circulation* 111:3400-3410, 2005.

- Okuda S, Yano M, Doi M, Oda T, Tokuhisa T, Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ohkusa T, Matsuzaki M: Valsartan restores sarcoplasmic reticulum function with no appreciable effect on resting cardiac function in pacing-induced heart failure. *Circulation* 109:911-919, 2004.
- Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, Suetsugu M, Hisaoka T, Ohkusa T, Obayashi M, Kohno M, Matsuzaki M: FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 107:477-484, 2003.
- Kohno M, Yano M, Kobayashi S, Doi M, Oda T, Tokuhisa T, Okuda S, Ohkusa T, Kohno M, Matsuzaki M: A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am J Physiol* 284:H1035-H1042, 2003.
- Doi M, Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Tokuhisa T, Okuda S, Suetsugu M, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Kohno M, Matsuzaki M: Propranolol prevents the development of heart failure by restoring FKBP12.6-mediated stabilization of ryanodine receptor. *Circulation* 105:1374-1379, 2002.
- Yano M, Ono K, Ohkusa T, Suetsugu M, Kohno M, Hisaoka T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Yamamoto T, Kohno M, Noguchi N, Takasawa S, Okamoto H, Matsuzaki M: Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102(17):2131-2136, 2000.

##### 2) 学会発表

- Kobayashi S, Yano M, Tateishi H, Mochizuki M, Noma T, Tokuhisa T, Oda T, Obayashi M, Yamamoto T, Matsuzaki M: Dantrolene stabilizes domain-domain interactions within the ryanodine receptor in failing hearts, American Heart Association Scientific Sessions 2005 (Dallas, USA/ November 13-16, 2005)(*Circulation* 112:II-453, 2005)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし。

## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 今泉 勉(久留米大学医学部第三内科教授)

**<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

慢性心不全の治療目標は生命予後とQOLの改善である。近年、本症の生命予後はRAS系阻害薬や $\beta$ 遮断薬の導入により明らかに改善しているが、QOLは十分改善したとは言い難く、新たな治療法の開発が望まれる。60℃での低温サウナ浴は、心不全患者において血管拡張作用を介して心拍出量増加や肺動脈楔入圧低下などの急性効果をもたらすと報告されている。さらに2週間の継続によって血管内皮機能の改善も示されており、慢性心不全患者への補助療法として期待されるが長期的な効果や安全性は未だ十分確立されていない。そこで我々は、慢性心不全症例における長期低温サウナ療法の安全性と有効性を検討した。

### B. 研究方法(倫理面への配慮)

対象は一般薬物療法下で安定している収縮不全由来の慢性心不全患者15名であり(男:女=12:3, NYHA分類平均 $2.8 \pm 0.4$ )、その内訳は6名が拡張型心筋症、1名は拡張相肥大型心筋症、7名は陳旧性心筋梗塞であり、1名が弁膜症であった。低温サウナ(60℃)は週に5日間、1日1回で4週間行った。臨床症状の評価は、息切れ、倦怠感、食欲不振、不眠、便秘の各項目についてself-assessment quality-of-life questionnairesを用いて4段階で評価した。運動負荷は全員に6分間歩行テストを行い、5名の症例には心肺運動負荷試験を行った。統計学的手法に関しては、サウナ療法前後はpaired t-testを用い、2群間比較はunpaired t-testを行った。運動負荷所見に関してはKruskal-Wallis testを用いた。本研究はヘルシンキ宣言に従い、当施設倫理委員会の承諾を得た後、個々の症例においてもインフォームドコンセントを取得し施行した。

### C. 研究結果

すべての症例が問題なくプロトコルを完了し、13名の患者では自覚症状の改善がみられた。NYHA class IIIの12名は、3名でclass IIへの改善がみられた。プロトコル終了時の心拍数は変化しなかったが、血圧は低下したためrate-pressure productは有意に減少した( $6811 \pm 1323$  to  $6292 \pm 1093$ )。心エコー上左室駆出率は改善し、運動耐用能の指標である6分間歩行距離( $388 \pm 110$  to  $448 \pm 118$  m)、最大酸素消費量( $13.3 \pm 1.8$  to  $16.3 \pm 2.1$  mL/kg/min)、嫌気性代謝域値( $9.4 \pm 1.2$  to  $11.5 \pm 1.9$  mL/kg/min)の各項目も改善した。同療法後血中エピネフリンやノルエピネフリンは有意に低下したが、BNPは低下傾向を認めたものの統計学的な有意差には至らなかった。12ヶ月の経過観察期間中に15名のうち2名が心不全死をきたした。心不全による入院回数は、サウナ療法前後を比較すると年間 $2.5 \pm 1.3$ 回から $0.6 \pm 0.8$ 回と有意に減少した。

### D. 考察

本検討では、4週間の低温サウナ療法が慢性心不全患者の臨床症状と運動耐用能を改善させることをはじめて報告した。本療法により有意な副次的障害は発生せず、左室駆出率や血漿中カテコラミンが改善することや、入院回数も減少させることも示された。対象となった患者は、左室拡張末期径が平均68mm、左室駆出率は30%と著明な左室収縮障害を有し、6分間歩行距離は400m以下、peak VO<sub>2</sub>は14mL/kg/min.以下と重症の心不全例である。一般的な高温サウナ(80℃)は、心仕事量を増大させ交感神経系を賦活化することから心不全患者には禁忌とされている。本研究では、継続的な



低温サウナは重症心不全患者でも安全に施行しうることを証明した。また自覚症状は15人のうち13名で改善し、悪化した例はみられなかったため、本療法は薬物療法で安定している慢性心不全患者にも有効であることが示された。もともとNYHA classは3名の患者で改善したのみであり、自覚症状の改善についてはプラセボ効果が否定できない。しかし、より他覚的に評価可能な6分間歩行距離はすべての患者で改善し、多段階心肺運動負荷試験でも施行できた全症例で改善がみられた。今回の検討ではコントロール群を設定していないが、対象者はすべてサウナ療法前から安定した運動耐用能を示していたため、“warm-up”効果も否定的と推測される。運動耐用能が改善した理由はいくつか考えられるが、最も可能性が高いのは左室収縮能の改善に由来するものである。左室駆出率は30%から34%に改善し、CTRは有意に縮小した。心機能の回復は、体重が変化しなかったことから単なる前負荷の軽減とは考えられず、むしろプロトコル終了後の血圧低下やサウナ療法により血管内皮機能が改善するという報告から推測すると、血管拡張作用による後負荷軽減効果が考えられる。また血中カテコラミンの低下は、心不全改善の原因か結果かは不明であるものの、交感神経系の活動性低下を反映するものと考えられ予後改善のサインであろう。

## E. 結論

低温サウナは慢性心不全例において安全に施行可能な治療法であり、自覚症状や運動耐用能を改善させることがわかった。本療法は収縮不全による慢性心不全患者において有用な補助療法となりうると思われた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T: Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension* 43(2):499-503, 2004.
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T: Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction; another model of inflammation. *Hypertension* 43(4):739-745, 2004.
- Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A: Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic

cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 313(1):178-184, 2004.

- Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T: Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in precocious-aging klotho mouse. *Circulation* 110(10):1148-1155, 2004.
  - Osada K, Imaizumi T, for the Heart Transplant Candidate Registry Committee of the Japanese Circulation Society: Special report from the heart transplant candidate registry committee in Japan. *J Heart Lung Transplant* 24:810-814, 2005.
  - Morita H, Ikeda H, Haramaki N, Eguchi H, Imaizumi T: Only two-week smoking cessation improves platelet aggregability and intraplatelet redox imbalance of long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 45(4): 589-594, 2005.
  - Kikuchi T, Oka N, Koga A, Miyazaki H, Ohmura H, Imaizumi T: Behavior of caveolae and caveolin-3 during the development of myocyte hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:204-210, 2005.
  - Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T: Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol* 45(8):1280-1286, 2005.
  - Miyamoto H, Kai H, Nakaura H, Osada K, Mizuta Y, Matsumoto A, Imaizumi T: Safety and efficacy of repeated sauna bathing in patients with chronic systolic heart failure; a preliminary report. *J Card Fail* 11(6):432-436, 2005.
  - Yamagishi S, Nakamura K, Ueda S, Kato S, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks the angiotensin II signaling in endothelial cells via suppression of NADPH oxidase; a novel anti-oxidative mechanism of PEDF. *Cell Tissue Res* 320(3):437-445, 2005.
- ### 2) 学会発表
- なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 山岸昌一, 今泉 勉: 色素上皮由来因子の新規治療用途(特願2004-80387)
- 山岸昌一, 今泉 勉: 血管障害を処置または予防するための色素上皮由来因子の新規治療用途(特願2004-133310)

## < 研究協力者 >

宮本浩光(久留米大学医学部第三内科)  
甲斐久史(久留米大学医学部第三内科)  
中浦宏幸(久留米大学医学部第三内科)  
長田克則(久留米大学医学部第三内科)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 砂川 賢二(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)

**<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

本研究の目的は、心不全の発症と進展における炎症性サイトカインの役割を明らかにし、炎症制御にもとづく新たな心筋症・心不全治療戦略を開発することである。今回、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 誘発性心筋症におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)-2の役割と心筋梗塞後リモデリングに対するニコチンの効果について検討したので報告する。

### B. 研究方法

1)MMP-2活性化を長期的・選択的に抑制するため、心筋特異的TNF- $\alpha$ 過剰発現(TG)マウスにMMP-2遺伝子欠損マウスを交配した。12週齢において、生存率、心エコー、心臓カテーテル検査、病理組織学的解析、MMP/TIMP発現、サイトカイン発現を比較検討した。

2)①マウスの腹腔内にニコチンを前投与し、LPS刺激に対する心筋での炎症性サイトカインの発現を検討した。②マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成後、浸透圧ミニポンプを用いてニコチンを持続投与し(400  $\mu$ g/kg/day)、28日間観察した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、九州大学総長および医学部動物実験委員会の承認を経て、関連法案ならびに「九州大学医学部における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

### C. 研究結果

1)TGマウスにおける心筋のMMP-2活性の上昇は、MMP-2遺伝子を欠損させることにより完全に抑制されており、他のMMPおよびTIMPに有意な

影響はなかった。TGマウスは、MMP-2遺伝子の欠損により生存率がさらに低下し、心機能低下がさらに増悪した。TGマウスでは心筋細胞肥大と間質線維化を認めたが、MMP-2遺伝子の欠損により有意な変化は認めなかった。TGマウス心筋ではTNF- $\alpha$ が増加していたが、この増加はMMP-2遺伝子の欠損により有意な変化は認めなかった。さらに、その他の炎症性サイトカインの発現にも影響しなかった。一方、TGマウスにおける炎症細胞浸潤の程度は、MMP-2遺伝子の欠損により有意に増強した。

2)①ニコチンの前投与によって、LPSに対する心筋での炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、RANTES)の発現は有意に抑制された。②ニコチンを持続投与したマウスでは、生食群と比較して、心拍数および血圧に有意な変化を認めなかったものの、心筋梗塞後28日目における左室の拡大と収縮能の低下が有意に抑制されていた。28日間の死亡率は、生食群と比べニコチン群で有意に低く、主に心不全死が抑制されていた。

### D. 考察

不全心ではTNF- $\alpha$ をはじめとする種々の炎症性サイトカインの発現が亢進している。今回、TNF- $\alpha$ 誘発性心筋症におけるMMP-2の役割について検討した。MMP-2遺伝子を選択的に欠損させることにより、TNF- $\alpha$ 誘発性心筋症における心筋炎症、さらには心不全が増悪し、生存率が低下した。MMP-2は、これまで細胞外マトリックスのリモデリングにおいて促進的に作用していると考えられてきたが、サイトカイン誘発性心筋症においては心保護的に作用している可能性が示唆された。

一方、我々は、これまで、迷走神経刺激によつ

て心筋梗塞後の心室リモデリングが有意に抑制され、生命予後の改善が得られることを明らかにしてきた(Circulation 109:120-124, 2004)。しかし、その機序については不明の点が少ない。近年、敗血症モデルにおいて、迷走神経刺激が炎症性サイトカインの産生を抑制し、ショックの発症を防止することが報告され、アセチルコリンのニコチン型受容体を介した抗炎症作用が注目を集めている。そこで、本研究では、心筋梗塞後リモデリングに対するニコチンの効果について検討した。その結果、ニコチンの持続投与は心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制し、生存率を有意に改善することが明らかになった。よって、心筋梗塞後リモデリングに対する迷走神経刺激の改善効果の一部は、アセチルコリンのニコチン型受容体を介した作用である可能性が示唆された。

## E. 結論

MMP-2はサイトカイン誘発性心筋症において心保護的に作用していること、ニコチンの持続投与は心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制し生存率を改善することが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- Kawano S, Kubota T, Monden Y, Kawamura N, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K: Blockade of NF- $\kappa$ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovasc Res* 67:689-698, 2005.
- Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AF, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K: Blockade of NF- $\kappa$ B improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF- $\alpha$ -induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 66:520-529, 2005.
- Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Feldman AM, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H: Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1858-H1864, 2005.
- Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H: Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. *Circulation* 112:683-690, 2005.

### 2) 学会発表

- Monden Y, Kubota T, Kawano S, Kawamura N, Inoue T, Tsutsumi T, Tsutsui H, Sunagawa K: Blockade of tumor necrosis factor- $\alpha$  prevents apoptosis but promotes ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):204, 2005)
- Kawano S, Kubota T, Monden Y, Kawamura N, Tsutsumi T, Inoue T, Tsutsui H, Sunagawa K: Effects of NF- $\kappa$ B blockade on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):646, 2005)
- Matsushima S, Tsutsui H, Matsusaka H, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Sunagawa K: Overexpression of glutathione peroxidase attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in diabetic mice, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):380, 2005)
- Matsusaka H, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Sunagawa K: Target deletion of p53 attenuates apoptosis and left ventricular rupture after myocardial infarction in mice, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):373, 2005)
- Matsusaka H, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Sunagawa K: Blockade of matrix metalloproteinase (MMP)-2 exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced cardiomyopathy, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):157, 2005)
- Ikeuchi M, Tsutsui H, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A, Sunagawa S: Overexpression of mitochondrial transcription factor A prevents mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction, 第69回日本循環器学会総会(横浜/2005年3月19-21日)(*Circ J* 69(Suppl I):130, 2005)
- Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H: Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the exacerbation of left ventricular remodeling and failure in diabetes-associated myocardial infarction, 第9回日本心不全学会学術集会(下関/2005年10月20-22日)
- Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H: Target deletion of matrix metalloproteinase-2 attenuates cardiac remodeling and failure in mice with chronic pressure overload, 第9回日本心不全学会学術集会(下関/2005年10月20-22日)
- Matsushima S, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T,

- Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H : Angiotensin II receptor blockade ameliorates myocardial remodeling and dysfunction in diabetes by inhibiting connective tissue growth factor, 第9回日本心不全学会学術集会(下関/2005年10月20-22日)
- Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H : Target deletion of p53 attenuates apoptosis and left ventricular rupture after myocardial infarction in mice, 第9回日本心不全学会学術集会(下関/2005年10月20-22日)
  - Kubota T, Kawano S, Monden Y, Sunagawa K. Blockade of NF- $\kappa$ B improves cardiac function and survival after myocardial infarction, The 1st Sino-Japan Cardiovascular Forum (SJCF) (Beijing, China/November 4, 2005)
  - Monden Y, Kubota T, Sunagawa K. Treatment with soluble TNF receptor prevents apoptosis but promotes ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction, The 1st Sino-Japan Cardiovascular Forum (SJCF) (Beijing, China/November 4, 2005)
  - Kubota T. NF- $\kappa$ B as a new therapeutic target for cardiac hypertrophy and remodeling, The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the ISHR (Osaka/December16-17, 2005)
  - Matsushima S, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Kubota T, Sunagawa K, Hattori F, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H: Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 ameliorates left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice, The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the ISHR (Osaka/December16-17, 2005)(J Mol Cell Cardiol 39:1000, 2005)
  - Ide T, Tsutsui H, Kubota T, Sunagawa K: A contribution of oxidative stress from mitochondria on remodeling after myocardial infarction; evaluation by in vivo ESR, The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the ISHR (Osaka/December16-17, 2005)(J Mol Cell Cardiol 39:1014, 2005)
  - Matsushima S, Matsusaka H, Ikeuchi M, Ide T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H: Angiotensin II receptor blockade ameliorates myocardial remodeling and dysfunction in diabetes by inhibiting connective tissue growth factor, The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the ISHR (Osaka/December16-17, 2005)(J Mol Cell Cardiol 39:1023, 2005)
  - Matsushima S, Ide T, Matsusaka H, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H: Overexpression of glutathione peroxidase attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in diabetic mice, The 22nd Annual Meeting of the Japanese Section of the ISHR (Osaka/December16-17, 2005)(J Mol Cell Cardiol 39:1026, 2005)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。
- <研究協力者>  
久保田 徹(九州大学大学院医学研究院循環器内科学)  
井手 友美(九州大学大学院医学研究院循環器内科学)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 鄭 忠和(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

<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

Fabry病は、リソソーム水解酵素のひとつである $\alpha$ -galactosidase A( $\alpha$ -gal A)活性の遺伝的欠損により、器質であるglobotriaosylceramide(Gb3)が心臓をはじめとする臓器に進行性に蓄積することにより生ずる。本症は伴性劣性遺伝形式をとり、4万人に1人の頻度で発症するとされている。我々はこれまで、原因不明の左室肥大患者の3-4%に心障害のみを呈する非典型的なFabry病が潜在することを報告し、これらの一群を心Fabry病として提唱してきた。

心Fabry病を含むFabry病に対する根本療法のひとつである酵素補充療法が本邦でも2004年から開始され、一定の治療効果を挙げている。しかし、本療法は2週間に1回の通院による点滴治療を必要としている。我々は、本症に対するもうひとつの根本療法で、1回の治療で治癒を目指せる可能性があると考えられる遺伝子治療法の確立に向けて、骨髄単核細胞に対するレンチウイルスベクターを用いた $\alpha$ -gal A遺伝子導入が、臓器、特に心臓において長期間に渡り $\alpha$ -gal A活性を上昇させ、さらに蓄積基質であるGb3を減少させ得るか否かを、Fabry病モデル動物である $\alpha$ -gal A欠損マウス(Fabryマウス)を用いて検討した。

### B. 研究方法

治療遺伝子導入ベクターpHR'-cppt-EF1 $\alpha$ - $\alpha$ -gal A-WPRE-SINを、HIV-I由来であるpHR'-cppt-EF1 $\alpha$ -enGFP-WPRE-SIN遺伝子導入ベクターのenGFP部分をヒト $\alpha$ -gal A cDNAに置き換えることで作成した。Fabryマウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取し、単核細胞を分離した。この骨髄単核細胞をマウスSCF、マウスIL-6、マウスTPOを用

いた培養液中で12時間培養し、レンチウイルスベクターpHR'-cppt-EF1 $\alpha$ - $\alpha$ -gal A-WPRE-SINを用いて $\alpha$ -gal A遺伝子を導入した。遺伝子導入骨髄単核細胞を、全身放射線照射を行ったレシピエントFabryマウスに移植した。移植後、経時的に血漿 $\alpha$ -gal A活性を測定した。さらに、移植24週後に、心臓、骨髄、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳を採取し、各臓器の $\alpha$ -gal A活性測定およびGb3の測定を行った。

### C. 研究結果

$\alpha$ -gal A遺伝子導入後のFabryマウスの血漿 $\alpha$ -gal A活性は、移植後24週に渡り未治療Fabryマウスおよび野生型C57Bl/6マウスに比し有意に高値で経過した。移植24週後に解析した $\alpha$ -gal A遺伝子導入Fabryマウスの心臓、骨髄、肝臓、脾臓の $\alpha$ -gal A活性は、未治療Fabryマウスおよび野生型マウスに比し有意に高値であった。これらの臓器の $\alpha$ -gal A活性は、野生型マウスの2倍程度にまで上昇していた。また、肺、腎臓の $\alpha$ -gal A活性も、未治療Fabryマウスに比し有意に上昇していた。脳においても、未治療Fabryマウスに比し酵素活性の上昇を認めた。

蓄積基質であるGb3は、 $\alpha$ -gal A遺伝子導入Fabryマウスの心臓では、未治療Fabryマウスの1.5%にまで低下していた。他の臓器においても同様にGb3の低下を認めた。

### D. 考察

本研究で、骨髄単核細胞にレンチウイルスベクターを用いて $\alpha$ -gal A遺伝子を導入し、遺伝子導入骨髄単核細胞を移植することにより、長期間に渡る血漿、臓器中の $\alpha$ -gal A酵素活性の上昇のみなら

ず、基質であるGb3の低下を認めることが明らかとなった。

Fabry病の欠損酵素である $\alpha$ -gal Aにおいては、“metabolic cooperativity”という現象が知られている。すなわち、 $\alpha$ -gal A遺伝子が導入された細胞では、細胞内で $\alpha$ -gal Aが過剰発現されるとともに、発現された $\alpha$ -gal A蛋白は細胞外に分泌される。分泌された $\alpha$ -gal A蛋白は非遺伝子導入細胞に取り込まれ、その細胞で蓄積した基質を分解することが可能である。このため、Fabry病の遺伝子治療においては、標的細胞の全てに遺伝子を導入する必要はないと考えられる。このような理由から、我々は比較的安全にアプローチしやすい骨髄単核細胞を遺伝子導入標的細胞として選定した。

Fabry病に対する遺伝子治療に関し、これまでに様々なウイルスまたは非ウイルスベクターを用いた研究が報告されている。我々はオンコレトロウイルスベクターを用いた骨髄単核細胞に対する遺伝子導入法を報告してきたが、比較的低い遺伝子導入効率のため心臓、腎臓、脳など十分な酵素活性上昇を得られない臓器を認めていた。レンチウイルスベクターはオンコレトロウイルスベクターと比較し、細胞周期休止期にある細胞へも感染しやすい。本研究の遺伝子導入標的細胞である骨髄単核細胞は主に細胞周期休止期にあると考えられる。本研究では、レンチウイルスベクターを用いることによりオンコレトロウイルスと比べ高率に遺伝子導入できた可能性があり、このことがより高い酵素活性上昇の一因と考えられた。

$\alpha$ -gal A酵素活性は、正常の5%以上で臨床上的治療効果があるとの報告がある。本研究では正常値以上を示す血漿中 $\alpha$ -gal A活性、臓器内 $\alpha$ -gal A活性を認め、十分に治療域に達していたと考えられる。尚、 $\alpha$ -gal A酵素蛋白の異常高発現による副作用は報告されていない。このことから、本法は臨床上有用である可能性が示唆された。

$\alpha$ -gal A蛋白の生体内半減期は短いため、酵素補充療法においては効果維持のため2週間に1回の点滴静注を必要としている。本研究で示した長期に渡る、安定した酵素蛋白発現は、1回の治療で治癒を目指せる可能性があることから心Fabry病を含むFabry病患者のQOLを著しく改善すると推測される。

近年、レトロウイルスを用いた臨床遺伝子治療において、様々な先天性遺伝性疾患(先天性重症複合免疫不全症候群、アデノシンデアミナーゼ欠損症など)での高い治療効果が報告されている。ただし、先天性免疫不全症候群以外では、遺伝子導入された細胞の拒絶の問題により、長期にわたる安定した効果が十分に得られているとは言い難い。本研究では細胞移植前に全身放射線照射を行っている。本療法の臨床応用にあたり、有症のFabry病患者や心Fabry病患者に対する全身放射線照射は好ましくないと考えられる。今後の課題として、いかに前処置の強度を抑えられるかが重要となる。オンコレトロウイルスベクターによる遺伝子治療後に白血病を発症した症例が3例報告されているが、レンチウイルスベクターでも理論上同様の危険性を否定し得ない。今後は、本法の臨床応用に向けて、大動物、特に霊長類において治療効果の判定のみならず、安全性の検証を大規模かつ十分に進める必要がある。

## E. 結論

Fabryマウスに、レンチウイルスベクターを用いて $\alpha$ -gal A遺伝子を導入した骨髄単核細胞を移植することにより、長期にわたる心臓をはじめとする臓器の安定した $\alpha$ -gal A活性の上昇およびGb3蓄積の低下を認めた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

なし。

### 2) 学会発表

- ・吉満 誠、竹中俊宏、樋口公嗣、Medin JA、尾辻 豊、鄭 忠和：心Fabry病の遺伝子治療；レンチウイルスベクターを用いた検討，第53回日本心臓病学会学術集会(セッション：心筋心膜疾患)(大阪/2005年9月19-21日)

## 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

—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—

分担研究者： 川名 正敏(東京女子医科大学附属青山病院循環器内科教授)

＜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

閉塞性肥大型心筋症(HOCM)の左室流出路圧較差(LVOT-PG)に対する薬物療法としては、I群抗不整脈薬(I-AD)、β遮断剤(B-B)、またはCa拮抗剤などが広く用いられているが、今だにこれらの長期予後への効果は明らかでなく、また実際の臨床では数多く行われている併用療法の長期有効性については未だ検討されていない。今回我々は、HOCM症例に対するI-ADとB-Bの併用療法の長期有効性を明らかにすることを目的として、血行動態や心事故に対する効果を単剤療法と比較検討した。

### B. 研究方法

当院でHOCMと診断された連続108例(LVOT-PG>30mmHg at rest, mean LVOT-PG=75 mmHg)のうち、長期的に薬物療法がなされた71例(66%)を対象とした。I-ADとB-B併用療法群(n=40)と単剤療法群(n=31)の両群において、LVOT-PGの改善率、NYHA-class、心血管事故(不整脈、心不全、脳卒中)および心臓死の頻度について比較検討した。平均観察期間は、7.2±5.0年であった。

#### (倫理面への配慮)

本研究は臨床研究であるが、日常診療を基礎とした観察研究であり、個人情報管理も厳格に行われているので、倫理面では特に問題ないものと思われる。

### C. 研究結果

LVOT-PGの改善率は、併用療法群では有意な改善を認めたが(83 to 37 mmHg, p<0.0001)、単剤療法群は有意な改善を示さなかった(65 to 54 mmHg, p=NS)。NYHA-classにおいても同様に併

用療法群は有意に改善を認めたが(2.8 to 1.9, p<0.0001)、単剤療法群は有意な改善を示さなかった(2.2 to 2.1, p=NS)。また、心臓死においては両療法群間に有意差を認めなかったが、心血管事故率では併用療法群が単剤療法群と比較して有意に低かった(7.5% vs. 25.8%, p<0.05)。

### D. 考察

本研究の結果から左室流出路狭窄の改善にβ群薬のみでは効果は限定的であり、β遮断薬との併用が望ましいことが明らかになった。これに呼応するよう長期予後に関しても併用療法が良好であることから、日常臨床では基礎にβ遮断薬を投与しながら最もLVOT-PGを低下させるI群薬を選択するのが適切であると思われる。

### E. 結論

I-ADとB-Bの併用療法はHOCMに対して長期的有効性を示すことが示唆された。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

1)論文発表

なし。

2)学会発表

・Yashiro B, Terajima Y, Kajimoto K, Hirata N, Hagiwara N, Kasanuki H: Relationship of atrial fibrillation to sudden cardiac death in patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy; a long-term follow-up study. Heart Rhythm 1:S183, 2004.

- Kawarai H, Kajimoto K, Kawashiro N, Terajima Y, Yashiro B, Hagiwara N: Long-term prognosis in patients with end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 110:III-366, 2004.
- Minami Y, Kajimoto K, Imai T, Hagiwara N: Long-term efficacy of medical treatment in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy; role of combined therapy with  $\beta$ -blocker and class I antiarrhythmic drug. *Circulation* 110:III-600, 2004.
- Mizuno M, Kajimoto K, Yumino D, Hagiwara N, Kasanuki H: Plasma brain natriuretic peptide is predominantly elevated in patients with pressure overload induced hypertrophy but not with volume overload induced hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 45:354A, 2005.
- Yashiro B, Kajimoto K, Terajima Y, Kawashiro N, Imai T, Hagiwara N, Kasanuki H: Relationship of atrial fibrillation to sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy; a

comparison between obstructive and non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 112:II-577, 2005.

- Mizuno M, Kawarai H, Yumino D, Kajimoto K: Combined assessment of T-wave alternans and plasma B-type natriuretic peptide can predict sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 112:II-702, 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### < 研究協力者 >

梶本克也(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 南 雄一郎(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 今井 拓(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 川城直美(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 石塚尚子(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 萩原誠久(東京女子医科大学病院循環器内科)  
 笠貫 宏(東京女子医科大学病院循環器内科)



## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—  
研究協力者： 磯部 光章(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学教授)

**<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. 背景

Hepatocyte growth factor(HGF)は血管新生、抗線維化、抗アポトーシスなどの作用を持ち心血管系の疾患においても重要な役割を持っていることが報告されている。また、HGFは免疫系においても重要な役割を持っていることが報告されているが、T細胞活性化におけるHGFの役割、心筋炎に対するHGF治療の有効性の報告はなく、我々はヒト心筋炎のモデルである実験的心筋炎モデル(EAM)を用いそれらの検討を行った。

### B. 研究方法と研究結果

EAMモデルはブタ心筋ミオシンをラットに免疫することにより作製した。免疫後約14日目より発症し、21日目にそのピークとなる。ELISA法を用いてHGF発現の検討したところ、血漿、心筋それぞれ7、18日目をピークにHGF濃度は速やかに増加した。さらに、HGFレセプターであるc-Metの脾細胞と心筋浸潤細胞での発現をフローサイトメトリーを用いて検討したところ、免疫後21日目にCD4、CD8陽性細胞ともに増強していた。

さらに、HVJ-envelopeベクターキットを用いて直接心筋にヒトHGFプラスミドを導入することにより心筋炎に対するHGF投与効果を検討した。ヒトHGF遺伝子を導入すると外因性HGFとともに内因性HGF濃度も15日目をピークに増加した。HGF遺伝子を0日目から導入すると心筋炎増悪時に認められる心体重比の増加や炎症細胞浸潤、心筋細胞変性などの心筋炎面積の割合は治療群では有意に抑制された。心エコーによる心機能評価においても未治療群では約20%であった左室内径短縮率が治療群においては約40%と改善効果が認められた。さらに、疾患が発症した後である14日目から

のHGF遺伝子導入においても同様の心筋炎の進展抑制効果が認められた。

次に、我々は抗原特異的T細胞の増殖反応アッセイを用いその増殖におけるHGFの役割を検討した。HGFを投与することにより有意に抗原特異的T細胞増殖反応は抑制された。また、HGF添加によりその上清のIFN- $\gamma$ の産生は抑制され、IL-4とIL-10の産生は増加することをELISA法にて認めた。同様の結果はin vivo HGF投与においても認められた。

さらに、HGFの免疫反応以外の効果を検討するために、心筋細胞におけるHGFの抗アポトーシス作用の検討をTUNEL染色により行った。HGF遺伝子導入群においてTUNEL陽性細胞は抑制され、HGFの抗アポトーシス作用が認められた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は動物実験である。実験は学内の動物実験に関する審査を受けており、動物愛護の観点からの倫理的問題はない。

### C. 考察

HGFの多様な生物学的活性が報告されている。免疫系における作用についてはほとんど知られていない。今回の心筋炎での検討で、HGFが自己免疫性疾患の発症とその治癒に関わっていることが推測された。一方我々はマウス心移植のモデルで、臓器拒絶におけるHGFの役割についても検討を重ねてきた。心移植後にHGF蛋白を投与すると約半数のマウスで投与中止後もアログラフトが長期生着する。これらのマウスではドナーの皮膚移植片が新たな免疫抑制なしに生着することから免疫寛容が誘導されることが明らかにされた。一方腎移植後拒絶反応においてもHGF投与の効果が報

告されている。特に長期的な慢性時拒絶反応である腎線維化を基盤とする腎機能障害の改善に顕著な効果があるとされる。さらに骨髄移植における移植片対宿主病の改善にも動物実験で有効性が示されている。

我々の今回の心筋炎における検討と、移植心での検討結果から、HGFの免疫性疾患における効果について以下のような機序が考えられる。Th細胞より産生されるサイトカインのプロファイルの変化は移植と心筋炎のモデルに共通して認められる。即ち、Th1サイトカインであるINF- $\gamma$ の産生低下とTh2サイトカインであるIL-10の増加がT細胞の細胞性免疫機能に抑制的に働いていると考えられる。特にINF- $\gamma$ は心拒絶反応の主要なmediatorであり、血管の内膜肥厚の主役と考えられている。

一方、抑制性T細胞の働きについての知見が深まっているが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>であるTreg細胞の機能亢進がこのHGFによる免疫抑制作用に関与している可能性がある。即ちTregはIL-10やTGF- $\beta$ の作用によりその機能が增強すると考えられており、心拒絶や心筋炎で認められたIL-10の増加がこの効果をもたらしている可能性がある。またHGF治療した動物ではICAM-1などの抗原提示に関わる接着分子の発現亢進が低下しており、T細胞への抗原提示機能そのものが低下している可能性もある。さらに従来HGFの作用として報告されている、抗線維化機能、抗アポトーシス機能はkiller T細胞による組織障害を軽減している要素もあると考えられる。しかし、これらの可能性は今後の検証が必要である。

また今後の臨床応用を考えるとときに、HGFの投与方法については検討の必要がある。今回心筋炎のモデルではHGF発現ベクターを心筋内に直接注入することにより投与を行った。心移植のモデルではHGF蛋白を注射した。いずれも血中濃度の増加とレセプターであるc-Metの発現増加を伴っている。臨床応用に際してのベクターの制約は非常に大きい、十分な血中濃度を得るためには遺伝子導入が優れている。今後安全なベクターの開発と併せての検討が必要となろう。

#### D. 結論

HGFをターゲットとした遺伝子治療は外因性HGF増加に伴う内因性HGF産生を促進し、心筋アポトーシスと抑制、Th1サイトカイン産生抑制、Th2サイトカイン産生増加により心筋炎の進展を抑制することが期待され、心筋炎の臨床において治療方法の一つとなりえると考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

- 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 HGF in a murine model of cardiac transplantation: Induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 110: 1650-1657, 2004.
- 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* 60(3):271-276, 2005.
- Maejima Y, Adachi S, Morikawa K, Ito H, Isobe M: NO inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol* 38(1):163-174, 2005.
- Futamatsu H, Suzuki J, Mizuno S, Koga N, Adachi S, Kosuge H, Maejima Y, Hirao K, Nakamura T, Isobe M: HGF ameliorates the progression of experimental autoimmune myocarditis; a potential role for induction of T helper 2 cytokines. *Circ Res* 96:823-830, 2005.
- Ogawa M, Suzuki J, Koga N, Kosuge H, Isobe M: A specific COX-2 inhibitor attenuates cell infiltration but does not prolong graft survival in murine cardiac transplantation. *Transplant Proc* 37: 121-122, 2005.
- Suzuki J, Ogawa M, Sagesaka YM, Isobe M: Catechins attenuate myocardial cell infiltration and fibrosis but do not prolong graft survival in murine cardiac allografts. *Transplant Proc* 37:119-120, 2005.
- Tashiro H, Aoki M, Isobe M, Hashiya N, Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R: Development of novel method of non-viral efficient gene transfer into neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 39:503-509, 2005.
- Suzuki J, Ogawa M, Sagesaka Y, Isobe M: Tea catechins attenuate myocardial cell infiltration and graft arterial diseases in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res*, in press.
- Izawa A, Sano K, Takehara M, Inobe M, Suzuki J, Oka T, Imamura H, Kubo K, Takahashi M, Ikeda U, Amano J, Isobe M, Uede T: Adenovirus vector containing CTLA4IgG induces clinically relevant immunosuppression via Cre/LoxP-mediated gene recombination. *Cardiovasc Res* 69:289-297, 2006.
- Futamatsu H, Suzuki J, Adachi S, Okada H, Otomo K, Ohara T, Hashimoto Y, Kakuta T, Iesaka Y, Yamaguchi H, Sakurada H, Sato A, Obayashi T, Niwa A, Hirao K, Isobe M: Utility of gallium-67

scintigraphy for evaluation of cardiac sarcoidosis with ventricular tachycardia utility of gallium-67 scintigraphy for evaluation of cardiac sarcoidosis with ventricular tachycardia. Int J Cardiovasc Imaging, in press.

- Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Kosuge H, Tanaka H, Isobe M: A cyclooxygenase-2 inhibitor alters Th1/Th2 cytokine balance and suppresses autoimmune myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol, in press.
- Suzuki J, Isobe M: Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation, fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis. Eur J Heart Fail, in press.
- Isobe M, Kosuge H, Suzuki J: T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy; potential targets for therapeutic interventions. Arterioscler Thromb Vasc Biol, in press.

- Isobe M, Futamatsu H, Suzuki J: Hepatocyte growth factor; effects on immune-mediated heart diseases. Trend Cardiovasc Med, in press.

## 2)学会発表

- Isobe M: Gene therapies for immune-mediated heart diseases, AHA (Dallas, USA/Nov 13-16, 2005)
- Kosuge H, Koga N, et al: Suppression of acute and chronic allograft rejection by pioglitazone, AHA (Dallas, USA/November 13-16, 2005)
- 鈴木淳一, 磯部光章, 天野 純: 心不全の進展におけるhepatocyte growth factorの役割, 第53回日本心臓病学会学術集会(パネルディスカッション)(大阪/2005年9月19日)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## <研究協力者>

二松秀樹(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学)  
鈴木淳一(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—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—

研究協力者： 小室 一成(千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授)

**<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

G-CSFは急性心筋梗塞後の心臓リモデリングや心機能低下に対する抑制効果をもつ。今回、我々は心筋虚血再灌流モデルにおいて再灌流開始時よりG-CSFを投与した際の心臓に対する急性効果を検討した。

### B. 研究方法

ランゲンドルフ装置を用いてラット心を灌流し、35分の虚血後120分の再灌流を行った。G-CSF(300ng/ml)を再灌流開始時より投与した群とControl群で検討した(ともにn=5)。梗塞サイズはtriphenyltetrazolium chloride(TTC)染色にて計測した。G-CSFによるシグナル伝達経路を検討するため、再灌流7分後の心臓を用いWestern blot法にて解析した。また、G-CSFにより活性化されるシグナル経路の役割を検討するため、PI3K(LY29002, 5 $\mu$ M)、Jak2(AG490, 5 $\mu$ M)、MEK(PD98059, 10 $\mu$ M)、NOS(L-NAME 30 $\mu$ M)の各阻害薬を再灌流前より投与してからG-CSFを投与した。

#### (倫理面への配慮)

ラットは動物愛護の精神にのっとり、千葉大学の動物実験取り扱い規約にしたがって実験に用いた。

### C. 研究結果

G-CSF投与によりTTC染色で計測した梗塞サイズは有意に縮小した(G-CSF群; 34.7 $\pm$ 4.5%, Control群; 58.6 $\pm$ 3.6%, P<0.001)。G-CSF投与群では、再灌流7分後の心臓におけるJak2, STAT3, ERK, Akt, eNOSの活性化は有意に増加した。G-CSFによる梗塞サイズの縮小効果はLY294002, AG490, L-NAMEにより抑制されたが、PD98059では抑制されなかった。

### D. 考察

我々はこれまでG-CSFを急性心筋梗塞後から投

与することにより、その後の心臓リモデリングや心不全を抑制することを報告してきた。その機序の1つとして、心筋細胞に対する直接作用が特に重要であることを明らかにした。マウスの急性心筋梗塞モデルを用いた研究により、G-CSFが心筋細胞内のJak2-STAT3経路を活性化することにより آپトーシスを抑制された。今回の研究では灌流心を用いることにより、幹細胞の動員作用等が関与しない実験系で心臓に対する直接作用を調べることができた。今回の研究結果により、虚血再灌流後の急性期においては心臓におけるAkt-eNOSの活性化が心臓保護作用に重要である可能性が示唆された。すなわち、G-CSFによる心臓保護作用には、心筋梗塞後の急性期ではAkt-eNOSを介したキナーゼカスケードが関与し、その後はJak2-STAT3を介した転写・翻訳レベルでの調節が関与していると考えられた。

### E. 結論

G-CSFは虚血再灌流障害に対し心筋に直接作用し、再灌流後からの投与でも心臓保護作用を持つこと(postconditioning作用)が示された。G-CSFによる急性の心臓保護作用はnon-genomicであり、特にAkt-eNOSシグナル伝達経路の活性化が重要であると考えられた。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

・Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J,