

Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating Jak/Stat in cardiomyocytes. *Nat Med* 11:305-311, 2005.

• Nagai T, Shiojima, I, Matsuura K, Komuro I: Promotion of cardiac regeneration by cardiac stem cells. *Circ Res* 97:615-617, 2005.

• Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma

Y, Ohtsuka M, Komuro I: Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 84:185-193, 2006.

2)学会発表
なし。

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

—拡張型心筋症における血清テネイシンCの意義：病態との関連から—

研究協力者： 廣江 道昭(国立国際医療センター腎臓・循環器科部長)

<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

拡張型心筋症は、進行性・難治性の予後不良な心筋疾患であり、その治療に苦慮している。現在本症における病態・予後の評価法として、NHYA機能分類、心エコーによる心機能および血漿BNP値が汎用されており、これらの指標が治療効果判定にも応用されている。

テネイシンC(TNC)は細胞と細胞外物質との相互作用に関与する細胞性基質蛋白(matricellular protein)に属し、種々の組織で胎生期の形態形成のみならず癌浸潤、創傷治癒、組織再生などに伴って限局した組織に一過性に発現し、炎症・組織修復過程で重要な役割を演ずると考えられる。複数の生物活性ドメインをもち、スプライシングバリエントが存在し、インテグリン、アネキシン、シンデカンなどの受容体と結合し、細胞増殖の促進、細胞接着・抗接着作用などの機能を有している。

心臓では、発生初期に心筋細胞分化、心内膜床形成、冠状動脈の発生などの重要な段階で一過性に発現するが、正常成体の心筋組織にはほとんど発現しない。臨床的には、心筋梗塞、心筋炎など様々な病的状態で再発現し、その可溶性TNCが血中に流出することが判明している。心筋障害後の組織修復に関わる細胞は、主に、間質細胞から分化し平滑筋アクチンを発現するなど特殊化した筋線維芽細胞であり、炎症性サイトカイン、増殖因子(bFGF、TGF- β など)、低酸素、酸化ストレスやアンジオテンシンIIなどの刺激によってTNCを産生する。

本研究では、新しい炎症マーカーとして血清TNCが拡張型心筋症における心不全・心室リモデリングなどの病態評価に有効であるかについて検

討した。

B. 研究方法

対象は厚生労働省特発性心筋症調査研究班の「心筋症—診断の手引きとその解説」(2005年11月9日発行)によって拡張型心筋症(DCM)と診断した97症例(平均年齢 62 ± 14 才)と健常20例。評価項目は、血圧、脈拍数、NYHA機能分類、心エコー検査による左室拡張終期径(LVDd)、左室収縮終期径(LVDs)左室駆出率(LVEF)、CRP、血漿BNPおよび血清可溶性テネイシンCである。血清TNCは抗テネイシンCモノクローナル抗体を用いて開発したELISAキットによって測定した。統計は、non-paired T testおよび相関関係はPearson/Spearman法によって行った。

(倫理面での配慮)

この臨床研究にあたって、各研究施設での倫理委員会による承認後、患者よりインフォームドコンセントを取得して行った。

C. 研究結果

1) DCMの、脈拍数 73.9 ± 12.5 、心胸郭比 $56.8 \pm 7.8\%$ 、NYHA 2.4 ± 0.9 であった。LVDd 62.2 ± 9.2 mm、LVDs 50.9 ± 11.2 mm、LVEF $37.2 \pm 14.1\%$ 、CRP 0.351 ± 0.350 mg/ml、BNP 350.7 ± 641.2 pg/mlであった。

2) 健常例では、血清TNC値は平均 30.9 ± 8.8 ng/mlで、DCMでは平均 74.9 ± 35.8 ng/mlで、有意に増加していた($p < 0.01$)。

3) 血清TNC値と各パラメーターとの有意な相関関係は、NYHA($r = 0.525$, $p < 0.0001$)、BNP($r = 0.470$, $p < 0.0001$)、心胸郭比($r = 0.313$, $p < 0.004$)、LVDd($r = 0.210$, $p < 0.035$)、LVDs

($r=0.291$, $p<0.004$)、LVEF($r=-0.303$, $p<0.003$)であった。

4)血清TNC値と年齢、性差、脈拍数、血圧との相関関係は認められなかった。

D. 考察

血清TNCはDCM患者において著明に増加しており、NYHA機能分類、左室機能障害、心拡大および血漿BNPとの相関関係があることが判明した。特に、心不全の重症度と心臓リモデリングの程度との関連が認められ、BNP同様に臨床応用可能な新しい炎症・リモデリングマーカーとしての意義ができた。

今後、DCM患者の予後・心イベントの予知にも応用できるかについては更なる大規模臨床試験が必要になってくる。

E. 結論

血清TNCはDCM患者において著明に増加しており、心不全の重症度、左室機能障害に相関し、心臓リモデリングの把握に有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1)論文発表

- ・廣江道昭, 今中一吉田恭子: テネイシンとは。「新・心臓診療プラクティス; 心不全に挑む・患者を救う」(編集: 筒井裕之・吉川純一・松崎益徳), 文光堂, 東京, 2005, pp. 116-117.
- ・Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T: Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol* 167:71-80, 2005.
- ・Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa

T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M: Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol* 205:460-467, 2005.

- ・Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T: Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease; multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol* 19:517-525, 2004.
- ・Sato M, Toyozaki T, Odaka K, Uehara T, Arano Y, Hasegawa H, Yoshida K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Tadokoro H, Irie T, Tanada S, Komuro I: Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by ^{111}In monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Circulation* 106:1397-1402, 2002.
- ・Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yasutomi Y, Toyozaki T, Tsuchiya T, Noda N, Maki T, Nishikawa T, Sakakura T, Yoshida T: Tenascin-C is a useful marker for disease activity in myocarditis. *J Pathol* 197:388-394, 2002.

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)

なし。

<研究協力者>

北浦 泰(大阪医科大学第3内科)
寺崎文生(大阪医科大学第3内科)
北畠 顕(北海道大学循環病態内科)
筒井裕之(北海道大学循環病態内科)
岡本洋一(北海道大学循環病態内科)
大西勝也(三重大学検査医学)
吉田利通(三重大学修復再生病理)
今中一吉田恭子(三重大学修復再生病理)
佐藤 明(横須賀共済病院心臓センター)

高血圧性心筋症に見出された BMP10 変異の機能解析

研究協力者 木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨 心筋ストレッチ反応は心筋への圧負荷および容量負荷に対する生体反応であり、その異常は心筋症病態をもたらす。本研究では、高血圧性心筋症の病因を解明するために、心筋ストレッチ反応に関わると推定される BMP10 に着目した変異検索を行った。その結果、若年で高血圧性心筋症を発症した症例に Thr326Ile 変異を見出した。この変異は、BMP10 の進化上よく保存されたアミノ酸の置換をもたらし、連続剖検例の解析でも高血圧性心筋症患者7名中1名にこの変異が認められたが、心筋症のない剖検例では 700 名中に 1 名程度の頻度であった。これらのことは本変異が高血圧性心筋症と関連することを示唆するが、BMP10 の細胞内分布や機能には不明な点が多い。そこで、EGFP-MP10 融合コンストラクトをラット心筋培養細胞にトランスフェクトしたところ、BMP10 は細胞表面のみならずZ帯に分布することが判明した。また、酵母2ハイブリッド法および免疫沈降法を用いた検討から、BMP10 は Tcap に結合すること、Thr326Ile 変異によって Tcap 結合性が約半分に低下すると同時に細胞外分泌が亢進すること判明した。さらに、BMP10 はラット心筋細胞の肥大とサルコメア整合性の促進を来すことを明らかにした。これらのことから、BMP10 変異は高血圧性心筋症の病態形成に関わると考えられた。

A. 研究目的

これまでの研究で特発性心筋症の病因の一部は心筋のストレッチ反応の異常であることが明らかになっている。心筋のストレッチ反応は心筋に対する圧負荷ないし容量負荷に対する生体の代償反応であり、初期には心筋細胞の肥大反応をもたらす。しかしながら負荷が継続すると心筋のリモデリングが生じ、最終的には心拡大、心不全へと進行する。このような心筋負荷が生じる最も一般的な原因として高血圧があげられるが、同程度の高血圧があっても最終的に拡張型心筋症(DCM)様の病態(高血圧性心筋症)を呈する症例は約 5%にすぎないため、そこにはなんらかの遺伝的な要因が加わっていると推定される。本研究の目的は、高血圧性心筋症への感受性を規定する遺伝的要因(遺伝子変異)を同定することにある。我々は以前に Dahl 食塩感受性高血圧ラットの心筋において心肥大期から心不全期にかけて発現が増加する遺伝子群(高血圧負荷反応遺伝子群)を同定しているが、その一つに BMP10 がある。BMP10 は TGF β ファミリーに属するが、トリ、マウス、ラットなどにおいて心筋に特異的に発現することが知られている。高血圧負荷反応遺伝子群は心筋ストレッチ反応に関わることが示唆されるため、本研究では特発性拡張型心筋症および高血圧性心筋症患者集団を対象とした BMP10 遺伝子変異の検索を行い、見出された変異についての機能解析を実施した。

B. 研究方法

- 1) DCM 症例 128 名を対象として SSCP 法を用いて BMP10 変異を検索した。異常 SSCP パターンを認めた場合には塩基配列を決定し、変異を確認した。ついで連続剖検例 1402 例について BMP10 変異の有無を検討した。
- 2) EGFP-BMP10 融合遺伝子をラット心筋初代培養細胞にトランスフェクトし、48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて EGFP シグナルの細胞内分布を検討した。この際に抗 Tcap 抗体を用いた共染色を行った。
- 3) 高血圧性心筋症と関連する BMP10 変異について、酵母2ハイブリッド(Y2H)法および免疫沈降法を用いて Tcap 結合性の変化を検討した。
- 4) EGFP-BMP10 融合遺伝子を COS 細胞にトランスフェクトし、培養液中に分泌された BMP10 をウエスタンブロット法で検出した。また、この培養液をラット心筋初代細胞培養中に添加し、心筋細胞肥大効果を検討した。

【倫理面への配慮】

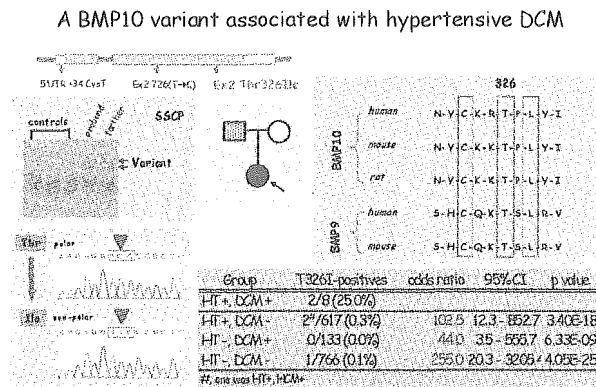
本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。[研究課題「高血圧性心筋症の病因と病態形成機構の究明に関する研究」(平成16年4月23日付承認)、「肥大型心

筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」(平成16年4月23日付承認)、「拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」(平成16年4月23日付承認)、および「高血圧の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」(平成16年4月23日付承認]

C. 研究結果

1) DCM 患者における BMP10 変異の検索

これまでの解析で DCM 原因遺伝子の変異が見出されなかった 128 名の DCM 患者を対象として BMP10 遺伝子変異を検索した。その結果、5'UTR +34 C vs T および第2エクソン 726 T vs C の変異を認めしたが、これらは多数の患者に検出されるため多型であると考えられた。



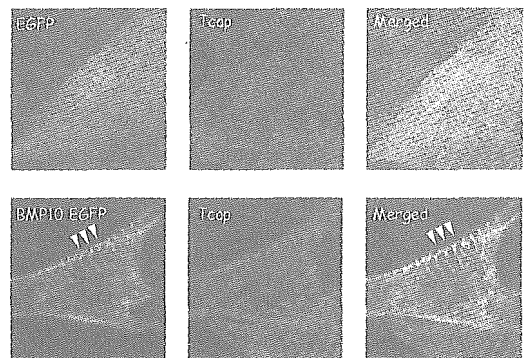
一方、若年性高血圧を有する DCM 患者に見出された Thr326Ile 変異は、BMP10 および BMP9 に共通して進化的によく保存されたアミノ酸の置換を伴うため、疾患関連変異の可能性が考えられた。そこで、約 1400 例の連続剖検症例について Thr326Ile の有無を検討したところ、4 名に本変異が検出された。うち1名は高血圧性 DCM であり、別の1名は高血圧性心肥大の症例であった。残りの2名には心疾患はないが、うち1名は高血圧を合併していた。連続剖検中には7名の高血圧性 DCM 症例および5名の血圧正常 DCM が居たため、本研究全体では高血圧性 DCM 症例8例中2例 (2/8=20%) にこの変異を認めたことになる。この頻度は、高血圧なし DCM 群における頻度 (0/133=0%)、高血圧あり DCM なし群における頻度 (2/617=0.3%) および高血圧なし DCM なし群における頻度 (1/766=0.1%) のいずれと比較しても有意に高いことから、本変異は高血圧性心筋症と関連することが示された。

2) BMP10 の細胞内分布

BMP10 は TGFβファミリーに属するため、細胞表面でプロセスされて細胞外に分泌されると推定されるが、その細胞内分布については不明であったため EGFP-BMP10 融合遺伝子を作製し、ラット心筋初代培養細胞にトランスフェクトし、EGFP の分布を検討した。その結果、BMP10 は細胞表面に分布するのみならず、細胞内で縞模様を呈した。さらに抗

Tcap 抗体あるいは抗アクチニン抗体との共染色によって、この縞模様は Z 帯であり、BMP10 は Tcap やアクチニンと共分布することが判明した。

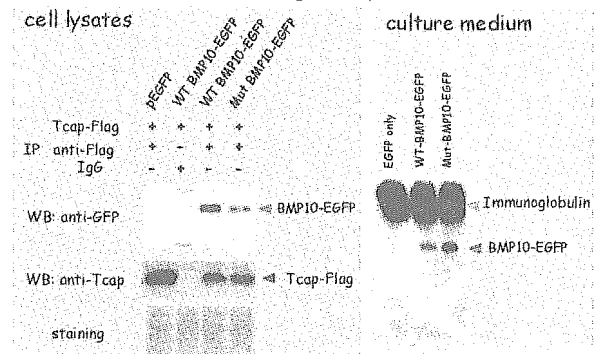
BMP10 co-localized with Tcap at the Z-disc of rat cardiomyocytes



3) BMP10 と Tcap との結合性

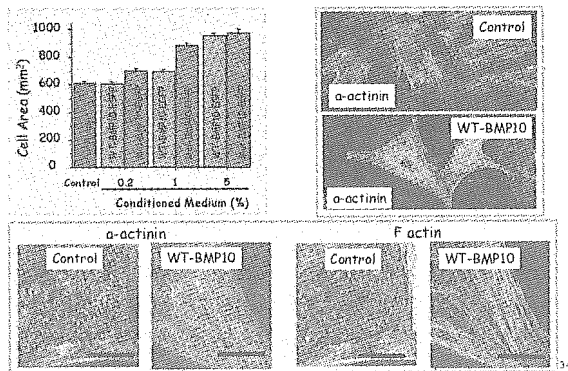
上記の結果は BMP10 と Tcap とが結合することを示唆するため、酵母2ハイブリッド法を用いてルシフェラーゼ活性によって結合性を評価した。その結果、プレカーサーBMP10 と Tcap との結合性は弱いが、成熟型 BMP10 は Tcap に結合すると考えられた。また、Thr326Ile 変異は Tcap 結合性を約半分に低下させた。そこで、このことを直接検証する目的で、flagをつけた Tcap と EGFPをつけた BMP10 を COS 細胞にトランスフェクトし、48 時間後の細胞を溶解させて免疫沈降法によって検討したところ、BMP10 は Tcap に結合すること、Thr326Ile 変異はこの結合性を約半分に低下させることが判明した。

BMP10 variant decreased binding to Tcap and increased secretion



4) 細胞外分泌 BMP10 による心筋肥大作用

上記のトランスフェクタントの培養液を回収して、ウエスタンブロット法で検討したところ、BMP10 は細胞外に分泌されることが判明した。ついで、この培養液をラット心筋初代細胞の培養に添加したところ、心筋細胞の肥大とサルコメア整合性の促進が観察された。また、Thr326Ile 変異トランスフェクタント培養液の添加では、BMP10 の細胞外分泌量が増加していることを反映して、より強い肥大作用が認められた。



D. 考察

高血圧ラットの心筋で心肥大、心不全に伴って発現が増加する BMP10 は高血圧負荷に対するストレッチ反応に関与すると考えられる。本研究では高血圧性 DCM と有意な関連を示す Thr326Ile 変異を見出した。BMP10 は心筋に特異的に発現することが知られていたが、本研究で BMP10 が Z 帯において Tcap と結合することを明らかにした。また、Thr326Ile 変異は Tcap 結合性を低下させ、その逆に細胞外分泌量の増加をもたらす。本研究で BMP10 によるラット心筋細胞の肥大作用とサルコメア整合性の促進作用を証明したことから、高血圧によって BMP 発現が亢進し、それが細胞外に分泌されることで心肥大をもたらすことが推定された。Thr326Ile 変異があると、細胞外分泌量の増加を介して心肥大作用が促進されると考えられることから、これは高血圧性心筋症の感受性遺伝子変異であると推定される。

E. 結論

BMP10 は高血圧性心筋症の病態促進因子であり、Thr326Ile 変異は高血圧性心筋症感受性遺伝子変異である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Matsumura Y, Hitomi N, Yamazaki N, Furuno T, Takata J, Nishinaga M, Kimura A, Doi YL: Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(9): 1737-1743.

2) Shichi D, Kikkawa FE, Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Matsumori A, Kulsky JK, Naruse KT, Inoko H: The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB-MICA, 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* 2005; 66(3): 200-208.

3) Inagaki N, Hayashi T, Arimura T, Koga Y, Takahashi M, Shibata H, Teraoka K, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A: alphaB-crystallin in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342(2):379-386.

4) Matsumoto Y, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Hiroi S, Nakamura T, Arimura T, Nakamura K, Ashizawa N, Yasunami M, Ohe T, Yano K, Kimura A: Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, in press

5) Aizawa Y, Mitsuma W, Ikrar T, Komura S, Hanawa H, Miyama S, Miyoshi F, Kobayashi Y, Chinushi M, Kimura A, Hiraoka M, Aizawa Y: Human cardiac ryanodine receptor mutations in ion channel disorders in Japan. *Int J Cardiol*, in press

2. 学会発表

1) Kimura A: Molecular etiology of hereditary arrhythmia. The 8th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Samsung Medical Center, Seoul, November, 2005.

2) Kimura A: Molecular etiologies of cardiomyopathies. Topic Clinical approach to personalized medicine in cardiovascular disease. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, March, 2005.

3) Kimura A: Application of genomic information in cardiovascular diseases. Morning lecture. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, March, 2005.

4) Inagaki N, Hayashi T, Ueda K, Takahashi M, Teraoka K, Chikamori T, Yasunami M, Yamashina A, Kimura A: Identification of a novel disease gene for dilated cardiomyopathy; an alphaB-crystallin mutation affecting the interaction with titin. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, March, 2005.

5) 木村彰方: 学会賞受賞講演 特発性心筋症の原因遺伝子群の同定と病態形成機構の解明. 日本人類遺伝学会第 50 回大会、倉敷、2005 年 9 月

6) 稲垣夏子、林丈晴、上田和雄、高橋めぐみ、柴田宏樹、有村卓朗、安波道郎、木村彰方: αB クリスタリン変異はタイチンとの結合能の低下を介して拡張型心筋症を引き起こす. 第 14 回日本組織適合性学会大会、熊本、2005 年 10 月

7) Kimura A, Nakano N, Arimura T: A BMP10 variant found in hypertensive dilated cardiomyopathy decreases binding to Tcap and increases extracellular secretion of BMP10. The 22nd Annual Meeting of The Japanese Section of ISHR, Shimonoseki, December, 2005

G. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

特発性心筋症に関する調査研究

—積層化心筋シートにおける電気生理学的解析—

研究協力者： 岡野 光夫(東京女子医科大学先端生命医科学研究所教授)

<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

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いたシート状の心筋細胞(心筋シート)の作製に成功している。細胞外マトリクスが無傷で存在する心筋シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。積層化心筋シートは電氣的に結合し、肉眼レベルで全体が同期して拍動することが確認できる。本研究では、積層化心筋シートを電気生理学的に解析し、2枚の心筋シートが積層後電氣的に結合するまでの時間を測定し、またその結合メカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 心筋シートの調製

新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿(電子線を用いて温度応答性高分子であるポリN-イソプロピルアクリルアミドを表面に共有結合させた培養皿)に播種した。そして4-5日間培養後、培養皿を20℃で低温処理することによりシート状に心筋細胞を脱着させ、得られた心筋シートを以下の実験に用いた。

2) 電気生理学的解析

心筋シートの自発活動電位は、多点細胞外電位記録システムを用いて測定した。1枚の心筋シートを電極に乗せ、さらにその上に一部が重なるように別の心筋シートに乗せ、それぞれの自発活動電位を測定した。そして経時的にそれらを測定し、活動電位が一致するまでの時間、すなわち、2枚の心筋シートが電氣的に結合するまでの時間を測定した。

3) ギャップ結合の検出

心筋細胞の電氣的結合に重要とされるギャップ結合が、積層した心筋シート間にいつ形成される

かについて以下の2方法で調べた。第1の方法は、ギャップ結合の構成蛋白質コネクシンの発現を検出し、免疫組織化学的にギャップ結合の形成を観察した。Green fluorescent protein(GFP)トランスジェニックラットに由来する心筋シート(GFP心筋シート)とGFP非発現の心筋シート(非GFP心筋シート)を重ね、1時間培養した。その後凍結切片を作製し、間接蛍光抗体法によりコネクシンの発現を検出した。第2の方法は、ギャップ結合を通過できる低分子蛍光物質カルセインを用い、それが心筋シート間を移動できるようになるまでの時間からその形成時期を推定した。具体的にはカルセインを導入した心筋シートを、非導入の心筋シートに重ね、経時的に蛍光顕微鏡観察を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

C. 研究結果

1) 2枚の心筋シート間の電氣的結合の成立

重ねた直後、2枚の心筋シートの2次元電位分布を調べると、それぞれの心筋シート内の細胞は電氣的に同期しているものの、2枚のシートは別々の周期の電気活動を示した。さらに心筋シートの活動電位の経時変化を解析したところ、2枚の心筋シートは重ね後34±2分(n=24)で電氣的に結合し、同期して拍動した。この時点では各々の電極上に到達する電位には時間差があったが徐々に短縮し46±3分後に完全に同期した。またギャップ結合を持たないHeLa細胞から作製したHeLa細胞シートを、2枚の心筋シートに挟むと、2枚の心筋シートは電氣的に結合しなかった。

2) 心筋シート間のギャップ結合の形成

GFP心筋シートと非GFP心筋シートを積層1時間後に、それらの間にCx43の発現が観察され、ギャップ結合の存在が確認された。この時コネキシン40ならびに45の発現は認められなかった。また心筋シート同士を重ねて30分後にはすでにカルセイン導入の心筋シートからカルセイン非導入の心筋シートへのカルセインの移動が認められ、それは時間経過とともに徐々に広がっていった。一方、カルセイン導入シートから、ギャップ結合が欠損しているHeLa細胞へのカルセインの移動は認められなかったことから、カルセインの心筋シート間の移動はギャップ結合を介していることを示している。免疫組織化学的解析とカルセインを用いた方法から得られた結果により、2枚の心筋シートの電気的結合はギャップ結合を介して起こることが強く示唆された。また免疫組織学的解析の結果、細胞間のみだけでなく、細胞表面あるいは細胞表面近くにもコネキシン43の発現が認められた。この結果は細胞表面あるいは細胞表面近くのギャップ結合前駆体(コネキシン六量体)の存在を示唆している。

D. 考察

今回重層した心筋シートは極めて早期にギャップ結合を形成して電気的に結合することを示した。このメカニズムとして、細胞同士が密に相互作用している心筋シートでは、多数のギャップ結合前駆体が細胞表面あるいは細胞表面近くにすでに存在し、心筋シート同士が接触した後、それらの移動のみでギャップ結合を形成できる可能性が考えられる。

E. 結論

温度応答性培養皿を用い、蛋白質分解酵素を用いずに回収した心筋シートにはギャップ結合前駆体が存在し、さらに細胞シート同士が直接接着す

ることにより速やかな電気的結合が可能になると考えられた。今回の結果は、心筋シートは極めて速やかに宿主心に結合する可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Sekine H, Shimizu T, Kosaka S, Kobayashi E, Okano T: Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. *J Heart Lung Transplant* 25(3):324-332. 2006.

2) 学会発表

・ Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: The electrophysiological analyses of layered cardiomyocyte sheets, The 6th International Conference on Intelligent Materials and System (Tokyo/July 4-6, 2005)

・ 原口裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫: 積層化心筋細胞シートの電気生理学的解析, 第8回日本組織工学会(東京/2005年9月1-2日)

・ 原口裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野光夫: 心筋細胞シートと非心筋細胞シート間の電気的相互作用の解析, 第5回日本再生医療学会(岡山/2006年3月8-9日)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし。

<研究協力者>

清水達也(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

原口裕次(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

関根秀一(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究協力者： 福田 恵一(慶應義塾大学医学部再生医学教室教授)

<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

現在、心筋梗塞や各種心筋疾患などにより末期心不全にいたった際の有効な治療法としては心臓移植が唯一であると考えられている。しかしながら臓器移植の最大の問題点として提供者不足ということが常にあり、特に日本においては患者の要求を満足できていないのが実情である。近年、各種細胞より様々な細胞への分化が可能であると報告されており幹細胞と呼ばれている。この幹細胞を用いて様々な特徴を持った細胞に分化させ、その細胞を移植することにより種々の疾患を治療しうることが報告され再生医療・細胞移植医療として期待されている。幹細胞の中でも特に胚性幹細胞は分化能、増殖能において優れていることが知られている。近年ヒト胚性幹細胞が樹立され、核移植による個々の自己胚性幹細胞が樹立されうる可能性もあり、種々の幹細胞医療において期待されている。心臓領域においても、これまで骨髄幹細胞を始め様々な幹細胞を用いて再生医療の試みはなされているが、満足した結果は得られていない。胚性幹細胞から心筋細胞へ分化した細胞を用いて、心筋疾患モデル動物への細胞移植を行った研究は数多く試みられており心機能や生命予後の改善が得られることは報告されている。臨床応用を考えた場合、最も重要でありかつ不足している点は胚性幹細胞から心筋細胞への分化誘導方法を確立する点であると考えられた。マウス胚性幹細胞より心筋細胞の分化誘導は様々なものが報告されてきたが、その効率や安定性に関して今後の臨床応用をにらんだ上では満足いくものではなかった。我々は、BMP antagonistのNogginをES細胞に処理すると心筋細胞を高率に分化誘導しえることを報告した(Yuasa S, et al: Transient inhibition of

BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. Nature Biotechnology 23(5): 607-611, 2005)。ここで用いた手法は、心筋細胞発生予定領域において強く発現する因子を見出し、その中で胚性幹細胞より心筋細胞へ分化誘導を促す因子を同定した。更に我々は、この報告で用いた手法である発生学的観点から再生医学への応用と同様の方法を用いて、更なる心筋細胞分化誘導因子の探索と更に高率な心筋細胞分化誘導方法の確立を目的としている。

これまで、世界中で胚性幹細胞より心筋細胞の分化誘導・様々な解析の報告はなされてきたが、確立された高率分化誘導方法はなかった。我々が報告したNogginを用いた心筋細胞分化誘導方法は、心筋細胞の発生分化に重要と考えられていたBMPをブロックすることにより誘導されうるというものであり定説とは逆の概念である。この分化誘導方法の発案にあたり、発生学的に心筋細胞が発生する初期に心臓予定領域で発現する因子としてNogginを同定した。この発現様式を応用することにより、Nogginを用いて分化誘導方法を見出した。心筋細胞の発生に限らず、様々な臓器発生において様々な因子が協調して作用することがわかっている。心筋細胞においてBMP antagonistであるNogginが作用することは判明したが、他の因子と複合的・強制的に作用することによって、より効率的に心筋細胞分化が得られることが予測される。

B. 研究方法

- 1) 発生学的に重要とされる分泌因子のcDNAを得てpBluescriptにsubcloningする。
- 2) T3, T7 RNA polymeraseを用いてDigoxigeninでラベルしたRNA probeを作成する。

3) マウス初期胚に対して、作成したRNA probeをhybridizeさせ、抗Dig抗体を用いて免疫染色を行う。

4) 用いたマウス初期胚(E 7.0~E 10.0)の中でpositive control(Nkx2.5, Isl1)と同部位に発現するものを同定する。Nkx2.5は心臓原基のprimary heart field, Isl1はsecondary heart fieldとして認識されており、最も初期に同定される心臓予定領域のマーカーの1つと考えられている。

5) 同定した遺伝子をCAG promoterを有する発現 plasmidに組み換え挿入する。全長cDNAを発現 plasmidに挿入するに際して、抗体が存在するものに関してはそのまま挿入し、抗体が存在しないものに関してはTagを付加し挿入する。

6) 同plasmidをCOS7細胞およびES細胞に遺伝子導入し蛋白を発現させる。COS7細胞に一過性又は安定導入し、培養上清中に蛋白が存在するかをWestern blotで検定する。また、ES細胞に安定導入し clonalなES細胞株を樹立し、その後の分化高率を検証するのに用いる。

7) 胚性幹細胞に対して、精製蛋白を作用させ心筋細胞分化誘導効率を検討する。現在、我々が開発したNogginを処理するによる心筋分化誘導方法に様々な分泌因子を添加した際には、多くのもので心筋細胞分化を抑制する傾向を認めており、ごく一部の因子で協調的に分化促進作用を認めている。単独で分化促進効果が十分に得られなくても、複合的に作用する可能性もあり我々の開発したNogginによる分化誘導方法が有効に用いられている。

8) 胚性幹細胞から分化する際に、その下流でのsignal伝達機構を検討する。様々な研究分野において、分泌因子の下流の分子機構解析は行われているがその詳細な機構を検討することにより創薬などに導かれる可能性がある。また、ヒト胚性幹細胞の分化誘導方法を開発する際の参考として利用価値があると思われる。

C. 研究結果

現在、心臓発生予定領域がはじめて同定される初期マウス胚(E7.0~7.5)を用いて、心筋細胞の発生に関与する因子を同定した。これらの詳細な発現様式を検討中である。それらは特にE7.5~E10.0まで発現しており心臓の形成される時期であり心筋細胞誘導に関与していることが予測される。また、これらを胚性幹細胞に添加することにより心筋細胞の発生に大きく関与していることが判明した。

D. 考察

現在、ヒト胚性幹細胞は世界中の限られた研究機関で研究が活発に行われているが、増殖速度や分化速度などの様々な点でマウス胚性幹細胞とは相違点が報告されている。ヒト胚性幹細胞を用いた分化誘導方法の研究は様々なものが報告されているが、様々な臓器でマウス胚性幹細胞の分化誘

導方法と類似点と相違点があることが分かっており心筋細胞においても同様の現象が予測される。今後ヒト胚性幹細胞を用いた細胞移植医療を実現するに当たり、マウス胚性幹細胞の心筋細胞分化方法を出来るだけ詳細に解析して、ヒトに適合できるものを見出していく必要がある。本研究の目的は、胚性幹細胞より心筋細胞への分化誘導法の確立およびその分化機構の解明として位置付けている。

E. 結論

マウス胚性幹細胞における心筋細胞分化をより確立したものとすべく因子を多数検討中であり、一部を同定している。これらは、今後ヒト胚性幹細胞に適用していき、胚性幹細胞を用いた心筋再生医療の確立を目指していくうえで非常に有用な知見が得られたと考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Ieda M, Fukuda K: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. In "Molecular Mechanism of Heart Disease", ed. by Mizukami Y, Ohkusa T, 2005, pp. 131-148.
- Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K: Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 65:334-344, 2005.
- Itabashi Y, Miyoshi S, Tanimoto K, Yuasa S, Fujita J, Kawaguchi H, Shimizu T, Okano T, Fukuda K, Ogawa S: A novel method for manufacturing cardiac cell-sheets using fibrin-polymer-coated dishes and its application for electrophysiological studies by optical mapping. *Artifi Organs* 29:95-103, 2005
- Hayashida K, Fujita J, Miyake Y, Kawada H, Yuasa S, Yoshioka M, Matsumura K, Itabashi Y, Ando K, Ogawa S, Fukuda K: Bone marrow derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *CHEST* 127:1793-1798, 2005.
- Fukuda K: Current status of myocardial regeneration and cell transplantation. *Future Cardiology* 1:167-175, 2005.
- Itabashi Y, Miyoshi S, Yuasa S, Fujita J, Shimizu T, Okano T, Fukuda K, Ogawa S: Analysis of the electrophysiological properties and arrhythmias in directly-contacted skeletal and cardiac muscle cell sheets. *Cardiovasc Res* 67:561-570, 2005.

- Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K: Transient and strong inhibition of BMP signals by Noggin induces cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 23:607-611, 2005.
 - Fukuda K, Fujita J: Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney International* 68:1940-1943, 2005.
 - Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K: Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170:1135-1146, 2005.
 - Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta H: Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 113:701-710, 2006.
 - Fukuda K: Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J* 69:1433-1448, 2005.
 - Inoue S, Hori S, Adachi T, Miyazaki K, Kyotani S, Fukuda K, Mori H, Nakazawa H, Aikawa N, Ogawa S: Flow-independent myocardial ischemia induced by endothelin-1; an NADH fluorescence analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:810-816, 2005.
 - Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S: Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, *in vivo*. *Circ Res*, 2006 (in press).
 - 福田恵一：心筋幹細胞，「予防医学事典」，編：松島綱治，他，朝倉書店，2005年，pp. 351-353.
 - 福田恵一：心筋培養とその応用，「心臓血管麻酔の進歩」，2005年，pp. 47-56.
 - 板橋裕史，福田恵一：間葉系幹細胞を用いた心筋再生，「血液フロンティア」15巻2号，2005年.
 - 田原聰子，福田恵一：心筋培養とその応用，「心臓血管麻酔の進歩」，2005年.
 - 福田恵一：G-CSFによる骨髄筋前駆細胞の動員，「Medical Science Digest」31巻2号，2005年，pp. 38-40.
 - 福田恵一：心筋再生と細胞移植の現状. *循環器科* 56：385-392, 2005.
 - 福田恵一：ノギン乱S筋細胞の新しい誘導法. *医学の歩み* 215(11)：919-920, 2005.
 - 福田恵一：ES幹細胞から心筋細胞への分化誘導法. *バイオテクノロジージャーナル* 5：552-555, 2005.
 - 福田恵一：再生心筋細胞の開発. *TMDC MATE* 10：4-5, 2005.
 - 吉岡正豊，福田恵一：移植細胞ツールとしての骨髄間葉系幹細胞. *Pharma Medica* 23(10)：59-66, 2005.
- 2) 学会発表
- Fukuda K: What is the most appropriate method for perform regeneration therapy in cardiovascular Field; Noggin is transiently and strongly expressed at the precardiac mesoderm, and inhibition of BMP signals by Noggin promotes cardiomyocyte differentiation in murine ES cells, The 22nd Annual meeting of Japanese section of International Society for Heart Research (Panel Discussion)(Osaka/ December 16-17. 2005)
 - Kimura K, Yun S, Kanazawa H, Imai A, Fukuda K, Noma S: A case report; left ventricular systolic dysfunction in a man possibly caused by cardiac sympathetic nerve disturbance accompanied with parkinson's Disease, World Parkinson Congress (Washington, DC, USA/February 22-26, 2006)
 - Yoshioka M, Yuasa S, Fujita J, Shukunami C, Hiraki Y, Shiomi T, Okada Y, Kimura N, Yozu R, Ogawa S, Fukuda K. An angioinhibitory factor of chondrocyte (chondromodulin-I) plays a critical role in maintaining cardiac valvular function, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Kimura K, Tomita Y, Ieda M, Fujita J, Onizuka T, Yoshioka M, Yuasa S, Kanazawa H, Itabashi Y, Endo J, Shimoji K, Yada H, Murata M, Kanki H, Kawaguchi H, Hisaka Y, Hattori F, Fukuda K, Ogawa S: Cardiac neural crest-derived cells alay hidden as dormant stem cells and differentiate into cardiomyocytes *in vivo*, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Suzuki R, Itabashi Y, Kokaji K, Yoshioka M, Yuasa S, Onizuka T, Endo J, Kimura N, Fukuda K, Yozu R: Myocardial cell sheet transplantation combined with omentopexy synergistically improved cardiac function and remodeling after myocardial infarction, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Yada H, Murata M, Yuasa S, Hagiwara Y, Matsumura K, Endo J, Adachi T, Miyoshi S,

- Fukuda K, Ogawa S: Rad GTPase negatively regulates native L-type calcium channel via direct interaction with calcium channel β -subunits in cardiomyocytes, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
- Yuasa S, Fukuda K, Itabashi Y, Onizuka T, Endo J, Shimoji K, Sugimura K, Shimazaki T, Okano H, Ogawa S: Noggin is transiently and strongly expressed at the precardiac mesoderm, and inhibition of BMP signals by Noggin promotes cardiomyocyte differentiation in murine ES cells, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Endo J, Fujita J, Hayashida K, Miyake Y, Shimoji K, Onizuka T, Matsumura K, Yoshioka M, Yuasa S, Kanazawa H, Itbashi Y, Ieda M, Hattori F, Fukuda K, Ogawa S: Bone marrow derived cells are mobilized and contribute to cardiac hypertrophy via cell fusion and transdifferentiation mechanism, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Yuasa S, Fukuda K, Yoshioka M, Matsumura K, Kanazawa H, Yada H, Suzuki R, Murata M, Ogawa S: A novel BTB/POZ protein, RhoBTB3, negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Ieda M, Fukuda K, Kanazawa H, Ieda Y, Fujita J, Yuasa S, Onizuka T, Yoshioka M, Matsumura K, Endo J, Shimoji K, Kawaguchi H, Ogawa S: Nerve growth factor is essential for axonal growth and neuropeptide expression in the developing cardiac sensory nervous system, American Heart Association 77th Scientific Meeting (Dallas, USA/ November13-16, 2005)
 - Kimura K, Fukuda K, Ieda M, Kawaguchi H, Kanazawa H, Ogawa S: Chamber specific augmentation of endothelin-1 by pulmonary hypertension induces right ventricular hyperinnervation regardless of the down regulation of catecholamine synthesis in vivo, European Society of Cardiology (Lisbon, Portugal/June11, 2005)
 - Fukuda K, Tomita Y, Matsumura K: Cardiac neural crest cells as a dormant multipotent stem cells in the mammalian heart, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Ieda M, Fukuda K, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Makino S, Sano M, Ogawa S: Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Tomita Y, Fukuda K, Matsumura K, Ieda M, Kawaguchi H: Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Matsumura K, Fukuda K, Tomita Y, Yuasa S, Yoshioka M, Kanazawa H, Ieda M, Sano M: Cardiac neural crest-derived cell lay hidden as dormant stem cells and differentiate into cardiomyocytes in vivo, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Yada H, Fukuda K, Murata M, Yuasa S, Endo J, Onizuka T, Kanazawa H, Ieda M, Adachi T, Sano M, Miyoshi S, Ogawa S: Red GTPase negatively regulates native L-type calcium channel via the direct interaction with calcium channel β -subunits in cardiomyocytes, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Yoshioka M, Fukuda K, Onizuka T, Endo J, Shimoji K, Matsumura K, Hiraki Y, Shukunami C, Yozu R: Valvular interstitial cell-derived chondromodulin-1 played a principal role in blocking the angiogenesis of human coronary endothelial cells in vitro, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Yuasa S, Fukuda K, Shimoji K, Endo J, Matsumura K, Onizuka T, Yoshioka M, Koshimizu U, Sugimura K, Shimazaki T, Okano H, Chen H, Kimura K, Sano M, Ogawa S: Noggin is transiently and strongly expressed at the precardiac mesoderm, and noggin promotes cardiomyocyte differentiation in murine ES cells, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Fukuda K, Yuasa S: Noggin promotes cardiomyocyte differentiation in murine ES cells, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Yoshioka M, Fukuda K, Endo J, Onizuka T, Shimoji K, Matsumura K, Hiraki Y, Shukunami C: An angioinhibitory factor of chondrocyte (chondromodulin-I) plays a critical role in maintaining cardiac valvular function, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
 - Yuasa S, Fukuda K, Shimoji K, Endo J, Matsumura K, Yoshioka M, Onizuka T, Yada H, Kanazawa H, Murata M, Ieda M, Chen H, Kimura K, Sano M,

Ogawa S: A novel BTB/POZ protein, RhoBTB3, negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)

- Endo J, Fukuda K, Fujita J, Hayashida K, Shimoji K, Matsumura K, Onizuka T, Yuasa S, Kanazawa H, Yoshioka M, Ieda M, Kimura K, Sano M, Ogawa S: Bone marrow-derived cells are mobilized and contribute to cardiac hypertrophy via cell fusion and transdifferentiation mechanism, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)
- Kimura K, Fukuda K, Ieda M, Kawaguchi H, Kanazawa H, Yagi T, Ogawa S: Cardiac sympathetic nerve density is regulated by the local endothelin-1-nerve growth factor pathway in adult rat, The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Nagoya/March 24-26, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

- 服部文幸, 福田恵一: 細胞内ミトコンドリアを指標とした心筋細胞の選択方法(特願2005-207799)(出願日: 2005年7月15日/2006年8月26日)(出願人: 学校法人慶應義塾, 第一サントリー生物医学研究所)(国際出願日: 2006年8月26日/国際出願番号: PCT/JP2005/015553)
- 服部文幸, 福田恵一: 幹細胞および胎児由来心筋細胞の精製方法および幹細胞由来予定心筋細胞の精製方法(特願2006-023770)(出願日: 2006年1月31日)(出願人: 第一アスピオファーマ, 学校法人慶應義塾)
- 福田恵一, 開 祐司: コンドロモジュリン-Iを有効成分とする血管新生関連疾患治療剤(特願2005-275479)(出願日: 2005年9月22日)

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

—ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討—

研究協力者： 武田 信彬(東京慈恵会医科大学総合診療部教授)

<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

ラミニンはフィブロネクチンやコラーゲンなどと並んで、細胞外マトリックスの蛋白の一つであり、組織の構造の維持に重要な働きをしている。ラミニンは α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の組み合わせで十数種類あり、拡張型心筋症においても心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的増加し、組織の硬化を招くとされている。我々はその病因の解明の一助として、心筋に特異的に存在するタンパクならびに相互分子をクローニングし、心筋症との関連を明らかにすることを目的に検討している。

B. 研究方法

ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子に存在するDNAモチーフ(BCN-1)を用いて、イーストのハイブリッドシステムによるスクリーニングを繰り返し施行した。

17bpのbcn-1モチーフの3組のコピーをHis3とLacZのレポーター遺伝子上流に挿入した。センス、アンチセンスオリゴヌクレオチドはpLac Ziレポータープラスミドにクローン化された(方法の詳細は文献(Suzuki H, et al. Am J Physiol Renal Physiol 275:F518-F526, 1998)参照)。

(倫理面への配慮)

特に問題になる点はない。

C. 研究結果

スクリーニングにより、心筋由来のライブラリーから二つの新規タンパクSmace1rならびにSMARP(Smarce1r-related protein)をクローニングした。Smace1r、SMARPは共にノーザンブロット

にて心臓にmRNAが強く発現していた。また、SMARPの細胞内局在を調べたところ、核小体内に移行することが判明した。そこで、N-末端およびC-末端のDeletion Constructを作製し検討したところ、N-末端の30塩基内に核小体移行シグナル(Nucleolar Localization Signal; NoLS)が存在する可能性が示されたため、さらにその領域のMutant proteinを作製し、NoLSを同定した。

D. 考察および結論

心臓に特異的に発現する新規タンパクSMARPの細胞内局在を調べたところ、核小体内に移行することが判明した。さらに、N-末端に存在する核小体移行シグナルNoLSを同定した。SMARPの核小体内での機能のさらなる検討は心筋症等におけるラミニン増加への関与を解明する一助となりうることを示唆された。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

鈴木英明(東京慈恵会医科大学総合診療部)
荒川泰弘(東京慈恵会医会大学DNA研究所)

特発性心筋症に関する調査研究

－ 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－

研究協力者： 河合 祥雄 (順天堂大学医学部循環器内科助教授)

＜研究要旨＞中間型心筋症の相対的位置付けをリモデリングベクトル、病理形態から検討した。中間型心筋症は、拡張相肥大型心筋症の途中経過だけでなく、肥大型心筋症に進展する例も含む多様なベクトルを有した。空胞変性の頻度が高く、単なる reverse remodeling でない可能性がある。

A. 研究目的

拡張型心筋症は内腔拡張、収縮力の低下を、肥大型心筋症は壁肥厚、収縮力低下のないことを前提とする。拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症の reverse remodeling の概念は、拡張型心筋症、肥大型心筋症のいずれでもない形態(中間型もしくは型不明型心筋症)が存在することを前提とする。型不明型心筋症の相対的位置付けを、中間型心筋症の拡張、肥厚の偏位ベクトルおよび病理形態から検討する。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

心筋症の左室形態は、心エコー図計測値の壁肥厚(>12mm)、左室拡張期内径拡大(>55mm)、収縮低下の有無で8型に分類できる。+/-で表すと、正常は[- - -]、肥大型心筋症は[+ - -]、拡張型心筋症は[- + +]。残りの5型は肥大型心筋症、拡張型心筋症のいずれでもない型不明型心筋症(中間型)となる。心筋症連続心筋生検1,388例より、拘束型心筋症、不整脈源性右室異形成症、特定心筋疾患を除外した471症例における中間型の経時的な左室形態の変化、組織所見などを検討した。データ処理に当たっては個人の特長ができないように配慮した。

C. 研究結果

HCM、DCM、型不明型心筋症の心疾患家族歴の頻度は29%、15%、13%。高度錯綜配列頻度は14%、6%、15%。空胞変性の頻度は、それぞれ14%、31%、19%で、型不明型心筋症はHCM、DCMに比べ、有意差に多い出現頻度を認めた。

経過の追跡し得た(平均6.3 +/- 6年間)型不明型心筋症は111例中71症例で、そのうちのデータが完備した61例について分析した。拡張例は14例で、その内訳は肥大型→中間型:3例、中間型→拡張型:10例、肥大型→中間型→拡張相肥大型心筋症:1例であった。組織学的に肥大5例、錯綜配列2(8)例、変性2(7)例が見られた。肥厚例は13例で、その内訳は、拡張相肥大型心筋症→中間型:5例、中間型→肥大型:8例であった。組織は肥大1例、錯

綜配列:4(8)例、変性2(6)例であった。

D. 考察

中間型にはd-HCMが含まれるが均一ではなく、壁厚、内腔、収縮能は様々であるので、移行する経路も多様性をもっていることが推定された。

追跡調査において、HCMからの移行例が3例認められたことは中間型にd-HCMが含まれるとする前述の考察を裏付ける。また、逆に中間型からHCMへの移行は8例に認められ、中間型はHCMの初期像としても留意する必要がある。従来、潜在性拡張型心筋症と捉えられていた症例の中には、d-HCMへの移行型やHCMの初期像が含まれている可能性がある。

E. 結論

中間型に有意に空胞変性が多く、ミトコンドリア心筋症に見られる空胞変性に酷似し、二次的心筋症の混在を示唆する。HCM、DCMは固定した病態ではなく、変化しうる一断面を捉えている可能性、ならびに中間型に特有の病理所見の存在が推察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究報告

1) 論文発表

・ Murayama M, Yoneda T, Kawai S: Muscle tension dynamics of isolated frog muscle with application of perpendicular distortion. *Eur J Appl Physiol* 93(4):489-495, 2005.

2) 学会発表

・ たこつぼ心筋障害の病理と病態; 診断の手びきをふまえて, 第12回心不全と不整脈フォーラム(2005年11月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

—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—

研究協力者： 室原 豊明(名古屋大学大学院器官制御内科学教授)

<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. 研究目的

軽症(NYHA I II)の特発性拡張型心筋症(DCM)患者における抗アルドステロン薬spironolactoneの心機能および心筋線維化に対する効果を検討すること。

最近、大規模臨床試験において抗アルドステロン薬が重症心不全患者の予後を改善することが報告された。動物モデルにおいて、アルドステロンが心筋線維化を促すことが報告されていることから、抗アルドステロン薬が不全心における心筋線維化を改善することが期待されるが、未だ、抗アルドステロン薬が心不全患者の予後を改善する機序は明らかではない。また、今までに抗アルドステロン薬を用いてなされた大規模臨床研究における対象は重症心不全であり、本邦に多いNYHA I IIの症状が軽い心不全症例に対する抗アルドステロン薬の効果も明らかではない。

B. 研究方法

対象は心不全症状の軽いDCM25例(NYHA I : 17例、NYHA II : 8例)で、抗アルドステロン薬のspironolactone 25mg/日投与前および約12ヶ月後に、血液中の線維化マーカー(Carboxyl-terminal propeptide of procollagen type I(PIP), Carboxyl-terminal telopeptide of collagen type I(CITP), Amino-terminal propeptide of procollagen type III(PIIINP))を計測した。また、組織ドップラー心エコー検査を行い左室拡張機能(LV early diastolic strain rate)を評価するとともに、心臓カテーテル検査を施行し、圧センサー付きカテーテルより得られた左室内圧曲線から求めた左室収縮機能(LVdP/dtmax)、左室弛緩機能(pressure half-time: T1/2)を評価した。左室心筋生検を行い、左室心筋

線維化を定量評価(collagen volume fraction: CVF)するとともに生検標本のI型およびIII型コラーゲンmRNAレベルを評価した。

(倫理面への配慮)

生検標本はすべて連結可能匿名化処理の後、mRNA解析まで保存した。

C. 研究結果

左室心筋生検標本のCVFと心筋線維化の血液マーカー(PIP/CITP比)の間には強い正相関を認めた($r=0.67$)。心筋線維化の血液マーカー(PIP/CITP比)の値が低い12例($PIP/CITP \leq 35$)をGroup A、高い13例($PIP/CITP > 35$)をGroup Bとしspironolactone投与による影響を検討した。spironolactoneの投与により、Group Bでは有意に血液中のPIP濃度が減少、CITP濃度が上昇した。また、I型およびIII型コラーゲン mRNAレベルもGroup Bでは有意にspironolactone投与により低下した。さらに、Group Bではspironolactone投与によりCVFは低下するとともに組織ドップラー心エコー検査より求めた左室拡張機能の指標である peak early diastolic strain-rateは有意に改善し、左室拡張末期stiffness(左室拡張末期容積/左室拡張末期圧)も有意に改善した。しかし、これらの効果はGroup Aでは認められなかった。

D. 考察

本研究の結果、血液中のPIP/CITP濃度比は左室心筋線維化の程度を示す臨床上有用な指標となりうる事が明らかとなった。PIPはI型コラーゲン生成時に産生されるタンパクで、CITPはI型コラーゲン分解時に産生されるタンパクであることから、その血液中の濃度比が心筋線維化の指標と

なりうることは以前にも高血圧性肥大心を用いた報告があったが、本研究の結果、DCMにおいても同様に有用であることが明らかとなった。抗アルドステロン薬spironolactoneが心筋線維化の重症な症例において、その心筋線維化を改善するとともに左室拡張機能を改善することが本研究の結果、初めて明らかとなった。左室拡張機能障害は慢性心不全の予後を規定する重要な因子の一つであり、抗アルドステロン薬が左室拡張機能を改善することにより、心不全患者の予後を改善している可能性が示唆された。抗アルドステロン薬には抗炎症作用、抗酸化作用等を有することが最近報告されていることから、臨床におけるこれら作用の影響についても今後検討する必要があると考えられる。

E. 結論

抗アルドステロン薬spironolactoneはDCMにおいて、左室心筋線維化を改善することにより左室拡張機能を改善する可能性が示唆された。この効果は、血液中の線維化マーカーが高い症例において、より顕著であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

• Izawa H, Murohara T, Nagata K, Isobe S, Asano H, Amano T, Ichihara S, Kato T, Ohshima S, Murase Y, Iino S, Obata K, Noda A, Okumura K, Yokota M: Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy; a pilot study. *Circulation* 112:2940-45, 2005.

2) 学会発表

• Izawa H, Murohara T, Oshima S, Asano H, Hirashiki A, Kobayashi M, Kato T, Yamada T, Obata K, Cheng X, Iino S, Inden Y, Noda A, Isobe S, Nagata K, Okumura K, Yokota M : Different effects of spironolactone on myocardial fibrosis and intracellular Ca²⁺-handling in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy, 第70回日本循環器学会学術集会(FRS16 : Clinical Heart Failure ; Diagnosis and Treatment - 1) (名古屋 / 2006年3月24 - 26日)

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

特発性心筋症に関する調査研究

-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-

研究協力者： 今中 恭子(三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学准教授)

<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

拡張型心筋症の代表的な組織変化のひとつは心筋線維化である。心筋線維化は、一般に心筋細胞の壊死・脱落を膠原線維で置き換える置換型線維化と、心筋細胞の脱落を伴わず細胞間の膠原線維が増える反応型線維化反にわけて考えられる。一般に心臓の線維化は拡張能を低下させ心機能不全を来すと考えられているが、置換型線維化は、実質細胞の再生能に乏しい心臓にとって組織修復のために必須の生体反応であり、反応型線維化だけを抑制するのが望ましい治療法と考えられる。線維化はいきなり膠原線維が形成され沈着するのではなく、何種類もの細胞外マトリックスの産生、沈着、分解を繰り返して形成されるが、その分子メカニズムはほとんど調べられておらず、現在、この2種類の線維化進展の分子機構が同一かどうか不明である。我々はこれまでの研究結果に基づき、テネイシンCが、病変進展の初期に線維化促進因子として働く分子の一つであると予想し、特に反応型線維化促進の分子機構とテネイシンCの関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

1) 反応型心臓線維化マウスモデルの作製とテネイシンCノックアウトマウスを用いた解析

7週令のメスマウスの背部皮下に浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシンIIを持続的に投与し、軽症高血圧反応型線維化モデルを作製し、組織染色による画像解析、免疫組織化学、in situ hybridization、RT-PCRにより解析した。

2) 心臓特異的テネイシンC過剰発現

トランスジェニックマウスの作製
CAGプロモーターとマウステネイシンC遺伝子の

間にloxではさんだstopを挿入したトランスジェニックマウスを作成した。このマウスとNkx2.5 Cre-マウス、 α -myosin heavy chain(α MHC)プロモーターCrePRIマウス(inducible α MHC-Cre)と交配し、心臓でのテネイシンCを過剰発現させることを試み、発現状況を免疫組織化学で確認した。

動物実験は、三重大学動物実験委員会で承認されたプロトコールに従って行った。

C. 研究結果

1) 反応型線維化の進展に伴う遺伝子発現の変化関与する細胞とサイトカイン

野性型Balb/c系マウスでは、アンジオテンシンII 500ng/ml/minを持続的に皮下投与すると、血圧は徐々に上昇し2週間後には収縮期圧150mg程度に安定した。アンジオテンシンIIを4週間投与した後の心筋組織には、心筋細胞の脱落に続発する置換型線維化はみられないが、組織学的に心筋内血管周囲に明らかな膠原線維の増加を見ることができ、リアルタイムRT-PCRでmRNAレベルでもコラーゲンI, IIIの遺伝子発現の有意な上昇をみとめた。さらに、免疫組織学的に、正常心筋組織では認められないテネイシンCが線維化病巣部に明らかに沈着していることが認められ、in situ hybridizationにより、その産生細胞は、血管の周囲に存在するいわゆる線維芽細胞であることが明らかになった。免疫組織学的にその細胞の性質を解析すると、 α -smooth muscle actin陰性、desmin陰性であったが、PDGF-R α の発現亢進が見られた。PDGF-R β は、血管内皮細胞で発現亢進が若干認められる程度であった。さらに、病変部位にはMac3陽性マクロファージの浸潤が多数認められた。RT-PCRでIL-1 β 、PDGFの遺伝子発現には変化が見られな

かったが、TGFβのmRNAの明らかな上昇が認められ、培養系でTGFβ、PDGF-BBは線維芽細胞のテネイシンC産生を増加させた。

C57BL6系のマウスに同様にアンジオテンシンII 500ng/ml/minを投与しても血圧の上昇、血管周囲の反応型線維化病変はみられず、投与量を2000 ng/ml/minまでふやすと血圧上昇、線維化病変が認められるようになったが、同時に微小梗塞痕(置換型線維化巣)が多数認められた。

2) テネイシンCノックアウトマウスと

野性型マウスの線維化病変の対比

我々の確立したアンジオテンシンII投与による反応型線維化モデルでは、balb/cバックグラウンドのテネイシンCノックアウトと野性型では、血圧上昇、心肥大の程度には差が見られなかったが、ノックアウトでは心筋内の反応型線維化の程度が有意に軽かった。さらに詳細に検討すると、血管周囲のヒアルロン酸の沈着には明らかな差が認められなかったが、ノックアウトでは膠原線維形成に先行するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンversicanの沈着が少ないことが明らかになった。また、アンジオテンシンII負荷したノックアウトでは血管周囲のマクロファージの浸潤が野性型のそれより有意に少なかった。

3) 心臓特異的テネイシンC過剰発現

トランスジェニックマウスの発源に関する検討

我々の作製したトランスジェニックマウスでは、Cre recombinaseが作用するとstopがはずれ、テネイシンCが過剰発現する。実際には、遺伝子の挿入された部位などによっては設計通りに発現制御できないことがあり、テネイシンCの発現を免疫組織化学的に確認した。

inducible αMHC-Creマウスと我々のトランスジェニックマウスを交配し、心筋細胞がテネイシンCを産生、周囲間質に分泌することが確認されたが、心臓には現在のところ著変を認めていない。

D. 考察

‘線維症’は間質の膠原線維が増える状態を指す一般的な言葉としてつかわれ、テネイシンCはこれまで肝、肺、腎や狭窄性血管内膜新生など種々の線維化病変の進展で重要な役割をしていると考えられてきた。実際、我々は、動脈瘤モデル腔内に局所投与したテネイシンCが筋線維芽細胞の動員を促進し膠原線維形成を著しく促進するという直接的な証拠を示した(論文6)。しかしながら、種々の線維化進展の分子メカニズムは根幹では共通すると思われるが、線維化反応の主役となる細胞の性質やその制御に関わる分子は組織により異なることが次第に明らかになりつつある。今回の我々の結果は、心臓の反応型線維化には血管周囲の炎症、特にマクロファージの浸潤が関与し、TGFβ、PDGF刺激により血管周囲の線維芽細胞で産生されたテネイシンCが線維化病変の進展でも重要な役

割をしていることが明らかになった。テネイシンCが膠原線維形成をどのように促進するかという詳細な分子メカニズムは未だ不明であるが、マクロファージの動員、コラーゲン線維沈着に先行するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンPG-M/versicanの沈着を促進することが予想された。

一方、Cre-Lox系を用いてマウスの心臓にテネイシンCを過剰発現させることに成功したが、現在のところ、単にテネイシンCを心臓に異所性に発現させても膠原線維形成が著しく亢進するという所見は得られていない。しかしながら、最近、我々は心筋梗塞急性期に血中テネイシンCレベルの高い患者は6ヶ月後に左室リモデリングをおこす確立が高く予後が悪い(論文1)という結果を得ており、心臓の構築変化にテネイシンCが何らかの重要な役割を演じていることは明らかであり、今後の詳細な解析が待たれる。

また、反応型線維化病変形成に動員されるおもな細胞はPDGF-Rα陽性で活性化された線維芽細胞の一種と考えられたが、α-smooth muscle actin、desminは陰性で、心筋の置換型線維化の際多数見られるいわゆる筋線維芽細胞とは表現型が異なり、反応型線維化と置換型線維化の分子メカニズムが完全には同じではない可能性が想像される。また、反応型線維化はTh2優位のBalb/c系のマウスに比較して、Th1優位のC57B6系では形成されにくく、心筋線維化病変の進展にTh2反応が強く関わっている可能性も示唆された。

E. 結論

心臓の反応型線維化病変の進展でテネイシンCが重要な役割を演じることが明らかになり、線維化の進展防止のための治療標的分子となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M: Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, in press.
- Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T: Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. Am J Pathol 167:71-80, 2005.
- Hirano K, Shimono T, Imanaka-Yoshida K, Miyamoto K, Fujinaga K, Kajimoto M, Miyake Y, Nishikawa M, Yoshida T, Uchida A, Shimpo H,

- Yada I, Hirata H: Method of cell transplantation promoting the organization of intraarterial thrombus. *Circulation* 112:I111-I116, 2005.
- Morimoto S, Imanaka-Yoshida K, Hiramitsu S, Kato S, Ohtsuki M, Uemura A, Kato Y, Nishikawa T, Toyozaki T, Hishida H, Yoshida T, Hiroe M: Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol* 205:460-467, 2005.
 - Yamamoto K, Onoda K, Sawada Y, Fujinaga K, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Yoshida T, Yada I: Tenascin-C is an essential factor for neointimal hyperplasia after aortotomy in mice. *Cardiovasc Res* 65:737-742, 2005.
 - Toma N, Imanaka-Yoshida K, Takeuchi T, Matsushima S, Iwata H, Yoshida T, Taki W: Tenascin-C coated on platinum coils for acceleration of organization of cavities and reduction of lumen size in a rat aneurysm model. *J Neurosurg* 103:681-686, 2005.
- 2) 学会発表
- Nishioka M, Suzuki M, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K: Tenascin-C has a crucial role in progression of myocardial fibrosis, The American Society for Cell Biology 45th Annual Meeting (San Francisco, USA/December 10-14, 2005)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし。