

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ
有効に導入するための統合的ゲノム薬理学研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩尾 洋

平成19(2007)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ有効に導入 するための統合的ゲノム薬理学研究	-----	1
岩尾 洋		
II. 分担研究報告		
1. サル心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理的検討 に関する研究	-----	11
岩尾 洋		
2. 臨床データと遺伝子データの照合・解析に関する研究	-----	15
岡本 洋		
3. 動物モデルの新機能の超音波学的および生物学的解析と ヒト臨床データに基づく心不全関連遺伝子の抽出 に関する研究	-----	18
葭山 稔		
4. 臨床情報の集積・臨床情報解析に関する研究	-----	26
寺崎文生		
5. ヒトゲノムを用いた統合的ゲノム薬理学的研究	-----	29
藤尾 慈		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	34

心不全に対しβ遮断薬療法を安全かつ有効に導入するための統合的ゲノム薬理学研究

統括研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：心不全治療におけるβ遮断薬の有効性が大規模臨床試験により示され、β遮断薬は心不全治療の第一選択薬となった。重要なことは、β遮断薬療法の臨床的有用性には確固たるエビデンスが認められるが、心不全治療におけるβ遮断薬の作用機序は依然明らかにされていないことにある。従って、現状では、薬効を規定する因子は不明であり、β遮断薬療法に対する薬効を投与前に予見することは困難である。本研究は、β遮断薬療法の個別適正化を実現するために、拡張型心筋症患者においてβ遮断薬に対する薬効を規定する遺伝的因子をゲノム疫学的アプローチにより検索すること、その遺伝的因子の意義を分子薬理学的アプローチにより解明することを目的とした統合的ゲノム薬理学研究である。

平成18年度は、心不全モデルにおいて発現変動する遺伝子群の遺伝子多型とβ遮断薬の薬効の相関の検討を行い、トロンボスポンジン、CD58、NFAT5の遺伝子多型とβ遮断薬の有効性との間に相関があることを明らかにした。また、心不全に対するβ遮断薬療法の薬理学的機序の解明にむけて、カニクイザルを用いた心筋症モデルを作製した。このモデルでは、心不全患者に対するβ遮断薬療法と同様に、β遮断薬投与により、カテコールアミンにより低下した心機能が改善することを確認した。

A. 研究目的

心不全は、さまざまな心疾患の終末像であり、その患者数は、生活習慣の欧米化と社会の高齢化に伴い今後ますます増加すると推測されている。これまで、CIBIS study、US Carvedilol studyをはじめ、さまざまな大規模臨床試験で、心不全に対するβ遮断薬の有用性が確認された。しかしながら、心不全に対するβ遮断薬療法の問題点としては、患者の約30%がβ遮断薬に対して無効（ノンレスポンド）であり、そのような症例では、β遮断薬の陰性変力作用により心不全が悪化することが挙げられる。従って、β遮断薬投与前に薬効の予想が可能になれば、心不全におけるβ遮断薬の有用性はさらに向上すると期待されるが、現状では、β遮断薬の抗心不全薬としての薬理機序すら不明であり、臨床現場における薬効の予測は実現されていない。

このような背景から、本研究は、ゲノム情報にもとづきβ遮断薬療法の薬効を予測し、心不全に対するβ遮断薬治療の個別適正化を実現することを目的とする。

具体的には、

- ① ゲノム疫学的アプローチにより、β遮断薬の薬効に影響を与える遺伝子多型を検索すること
- ② 分子薬理学的アプローチにより、心不全に対するβ遮断薬の効果の機序を解明し、①で検索された遺伝子多型の生物学的妥当性を検証すること
- ③ ①、②の結果を臨床現場へ導入し、β遮断薬の薬効の予測を行なうために、ベッドサイドで遺伝子多型の判定を行なう遺伝子判定装置を作製することを目的とする。

平成18年度は、

- ①ゲノム疫学的アプローチについては、β

遮断薬の薬効に影響を与える遺伝子多型の一次スクリーニング

②分子薬理学的アプローチについては、心不全におけるβ遮断薬療法のモデル系の確立を達成目標とした。

B 研究方法

「A 研究目的」で記載したように、本研究は、ゲノム疫学的アプローチと分子薬理学的アプローチを並行して行なった。（詳細は、研究分担の記載を参照。）

B-1. ゲノム疫学的アプローチ

1) β遮断薬の薬効を決定する遺伝子多型候補の選出

文献的に心不全との関係が報告されてきた73遺伝子、及び、心不全モデル動物（ドキシソルピシン心筋症、心筋梗塞後心不全など）で発現が変動した遺伝子およびその関連遺伝子、31遺伝子の計104遺伝子から、日本人における多型頻度が10%以上である遺伝子多型を選出した。

2) 心不全患者を対象とした、β遮断薬治療への反応性と遺伝子多型との関連に関する解析

拡張型心筋症患者で、分担研究者施設にて、すでにβ遮断薬治療を受けている患者80名に関し、遺伝子多型の判定を行った。β遮断薬治療の結果、左室内径短縮率(FS)が3%以上改善した患者をレスポンドー(responder)、3%未満の患者をノンレスポンドー(nonresponder)とし、これら遺伝子多型との関連を検討した。

B-2. 分子薬理学的アプローチ

心不全では、交感神経をはじめとした神経体液性因子の亢進が心機能に影響を与えている。特に、心不全におけるβ遮断薬療

法の分子メカニズムを解明するためには、カテコールアミン過剰による心不全モデルの作製は特に重要である。そこで、雄性カニクイザルにエピネフリンを投与しカテコラミン心不全モデルを作製した。また、この心不全モデルに対し、β遮断薬を投与した。効果の解析は以下の方法で行なった；

①心エコー図

②血液生化学的検査項目

③網羅的遺伝子発現解析

④組織化学的解析

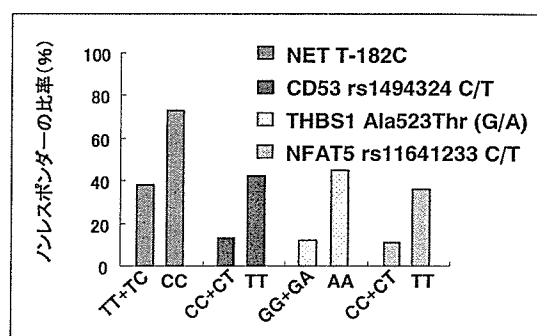
⑤受容体の発現量およびカイネティクスの解析

⑥収縮関連蛋白・カルシウムチャネル解析

C. 研究結果

C-1. ゲノム疫学的アプローチ

抽出した遺伝子の遺伝子多型頻度とβ遮断薬治療に対する反応性との関連に関する解析を行った。P<0.05を有意差ありとすると、下図に示す4つの遺伝子について、その多型がβ遮断薬の反応性と有意な相関を示した。



(図の説明) NET、CD53、THBS1、NFAT5の各遺伝子多型判定を行ない、図に示した各ゲノタイプにおけるノンレスポンドーの比率を示した。

C-2. 分子薬理学的アプローチ

カニクイザル正常心に対し、β受容体遮

断薬プロプラノロール、メトプロロールを投与した場合、心機能（左室駆出率）の低下をみた。一方、カテコールアミンで作製した不全心へのβ遮断薬の投与は、低下した左室駆出率を改善させた。

D. 考察

今回、ゲノム疫学的研究から、ノルエピネフリントランスポーター(NET)に加え、CD53、トロンボスポンジン(THBS) 1、NFAT5 の遺伝子多型が、β遮断薬の薬効と相関を示すことが明らかになった。これまで多くの研究では、β遮断薬の標的遺伝子であるアドレナリン受容体遺伝子多型とβ遮断薬の薬効との相関を検討するにとどまっていた。解析対象遺伝子を心不全関連遺伝子へと広げた本研究は、未だ明らかにされていない心不全β遮断薬療法の分子機序の解明に手がかりを与える可能性がある。今ゲノム疫学的アプローチとしては、今後、独立した別の集団（セカンドポピュレーション）で再見できるかどうかを検討する必要があると考えている。

これまで、さまざまな心不全モデルが報告されている。しかしながら、それらのモデルでβ遮断薬が、ヒトの場合と同様の有効性（すなわち、心不全の発症を予防するのではなく、心不全を発症した動物に投与し心不全を改善させる効果）を示す例は、われわれの知る限り皆無である。その意味からも、今回作製したカニクイザルカテコールアミン心不全モデルは、心不全に対するβ遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。今後、この系を用いて、ゲノム疫学的にβ遮断薬の薬効と相関することが明らかに

された遺伝子の発現量を検討すること、核医学的検査などにより遺伝子の機能を検討することが重要であろう。

E. 結論

平成 18 年度、ゲノム疫学的アプローチの結果として、ノルエピネフリントランスポーター(NET)に加え、CD53、トロンボスポンジン(THBS) 1、NFAT5 の遺伝子多型が、β遮断薬の薬効と相関を示すことが明らかになった。また、分子薬理学的アプローチの結果として、ヒト心不全に対するβ遮断薬療法を mimic するカニクイザルカテコールアミン心不全モデルを確立した。

今回行なったゲノム疫学的研究の結果をセカンドポピュレーションで検証すること、また、β遮断薬の薬効と相関することが示唆された遺伝子に関し、その遺伝子産物の発現量や機能をカニクイザルカテコールアミン心不全モデルで検討することが重要である。

F. 健康危険情報

特に認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表 (岩尾洋)

1. Kuwamura, H., Tominaga, K., Shiota, M., Asida, R., Nakao, T., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Ichijo, H., Arakawa, T., and Iwao, H. (2007) Growth Inhibition of Colon Cancer Cells by Transfection of Dominant-negative Apoptosis Signal-regulating Kinase-1. *Oncology Reports* 17:781-786

2. Tsusaki, H., Yonamine, H., Tamai, A., Shimamoto, M., Kuwano, K., Iwao, H., Nagata, R., and Kito, G. (2006) Left Ventricular Volume and Function in Cynomolgus Monkeys using Real-Time Three-Dimensional Echocardiography, *Journal of Medical Primatology* 36:39-46

3. Kim-Mitsuyama, S., Izumi, Y., Izumiya, Y.,

Namba,M., Yoshida,K., Wake,R.,
Yoshiyama,M., and Iwao,H. (2006)
Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac
hypertrophy induced by angiotensin II and
hypertension.

Gene Ther. 13: 348-355.

4. Tsusaki,H., Yonamine,H., Tamai,A.,
Shimamoto,M., Iwao,H., Nagaya,R., and
Kito,G. (2005) Evaluation of cardiac function in
primates using real-time three-dimensional
echocardiography as applications to safety
assessment.

J Pharmacol Toxicol Methods 52: 182-187.

5. Izumi,Y., Kim-Mitsuyama,S., Yoshiyama,M.,
Omura,T., Shiota,M., Matsuzawa,A.,
Yukimura,T., Murohara,T., Takeya,M.,
Ichijo,H., Yoshikawa,J., and Iwao,H. (2005)
Important role of apoptosis signal-regulating
kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 1877-1883.

6. Ashida,R., Tominaga,K., Sasaki,E.,
Watanabe,T., Fujiwara,Y., Oshitani,N.,
Higuchi,K., Mituyama,S., Iwao,H., and
Arakawa,T. (2005) AP-1 and colorectal cancer.

Inflammopharmacology 13: 113-125.

7. Wake,R., Kim-Mitsuyama,S., Izumi,Y.,
Yoshida,K., Izumiya,Y., Yukimura,T., Shiota,M.,
Yoshiyama,M., Yoshikawa,J., and Iwao,H.
(2005) Beneficial effect of candesartan on rat
diastolic heart failure.

Journal of Pharmacological Sciences 98:
372-379.

8. Yoshida,K., Kim-Mitsuyama,S., Wake,R.,
Izumiya,Y., and Izumi,Y., Yukimura,T.,
Ueda,M., Yoshiyama,M. and Iwao, H. (2005)
Excess aldosterone under normal salt diet
induces cardiac hypertrophy and infiltration via
oxidative stress.

Hypertens Res. 28, 447-455.

9. Kim-Mitsuyama,S., Yamamoto,E., Tanaka,T.,
Zhan,Y., Izumi,Y., Izumiya,Y., Ioroi,T.,
Wanibuchi,H., and Iwao, H. (2005)
Critical role of angiotensin II in excess
Salt-Induced brain oxidative stress of
stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Stroke 36: 1077-1082.

(岡本洋)

1. 岡本 洋 (2006) 佐古田論文に対する
Editorial Comment
心臓 38 (8) : 84

2. 岡本洋、秋野正敏、筒井裕之、今重之、
上出利光 (2006) Osteopontin 発現のリモ
デリングと心機能における意義
循環器科 59 (3) : 304-305

3. 寺崎文生、下村裕章、塚田敏、大塚宏治、
片嶋隆、大塚薫、浮村聡、
北浦泰、今中恭子、吉田利通、廣江道昭、
岡本洋 (2006) 心サルコイドーシス心筋で

は matricellular proteins と I 型ヘルパー
T 細胞関連サイトカインの発現が亢進する
循環器科 59 (3) : 298-299

4. 森本 紳一郎、植村 晃久、平光 伸也、
中谷 敏、土田 哲人、矢崎善一、和泉徹、
松森昭、後藤鉦司、廣江道昭、寺崎文生、
鈴木忠、岡本 洋、徳田衡、菱田仁 (2006)
サルコイドーシスの心病変の診断の手引き
(改定)

循環器科 59 (3) : 300

5. 岡本 洋 (2006) アドレナリン受容体 α
1B (G549A) とノルエピネフリントラン
スポーター (T-182C) の遺伝子多型は拈
張型心筋症患者の β 遮断薬治療への反応性
と相関する

AHA2006 第79回米国心臓病学会学術集会
(報告集), PROUS SCIENCE (Barcelona) :
9-11

6. Yoh Takekuma, Toru Takenaka, Masami,
Kiyokawa, Koujiro, Yamazaki, Hiroshi
Okamoto, Akira Kitabatake, Hiroyuki Tsutsui,
Mitsuru Sugawara (2006) Contribution of
Polymorphisms in
UDP-Glucuronosyltransferase and CYP2D6 to
the Individual Variation in Disposition of
Carvedilol

J Pharm Pharmaceut Sci

(www.cspcsCanada.org) 9(1) : 101-112

7. Hiroshi Okamoto (2006) Osteopontin and
Cardiovascular System
Molecular and Cellular Biochemistry,
Epub ahead of print

8. Hiroshi Okamoto, Shinpei Nonen, Yasushi
Fujio, Yasuhiko Takemoto, Minoru Yoshiyama,
Tomoyuki Hamaguchi, Yutaka Matsui, Junichi
Yoshikawa, Akira Kitabatake, Junichi Azuma
(2006) Adrenoceptor Alpha 1B and
norepinephrine transporter polymorphisms are
associated with the beta-blocker response in
patients with dilated cardiomyopathy.

Circulation 114 (18) : II-443

9. Fumio Terasaki, Hiroshi Okamoto, Michiaki
Hiroe, Kyoko Imanaka-Yoshida, Katsuya
Onishi, Akira Sato, Hiroaki Shimomura, Bin
Tsukada, Toshimichi Yoshida, Yasushi Kitaura,
Akira Kitabatake, and Study Group for
Intractable Diseases by a Grant from the
Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

(2006) Higher serum tenascin-C levels reflect
the severity of heart failure, left ventricular
dysfunction and remodeling in patients with
dilated cardiomyopathy

Circ J. 71(3) : 327-30

(葭山稔)

1. Ehara S, Yoshiyama M. (2007) Clinical
implication of coronary calcification.
Clin Calcium. Mar;17(3):325-31. Japanese.
2. Tanaka S, Yoshiyama M, Imanishi Y,

- Nakahira K, Hanaki T, Naito Y, Imai M, Tanaka M. (2006) MR Measurement of Visceral Fat: Assessment of Metabolic Syndrome. *Magn Reson Med Sci.* Dec;5(4):207-10.
3. Takemoto Y, Hozumi T, Sugioka K, Takagi Y, Matsumura Y, Yoshiyama M, Abraham TP, Yoshikawa J. (2007) Beta-blocker therapy induces ventricular resynchronization in dilated cardiomyopathy with narrow QRS complex. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Feb 20;49(7):778-83. Epub Feb 5.
4. Nishitani Y, Yoshiyama M, Hosaka K, Tagami J, Donnelly A, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. (2007) Use of Hoy's solubility parameters to predict water sorption/solubility of experimental primers and adhesives. *Eur J Oral Sci.* Feb;115(1):81-6.
5. Wake R, Fukuda D, Yoshiyama M, Shimada K, Yoshikawa J. (2007) The effect of the gravitation of the moon on acute myocardial infarction. *Am J Emerg Med.* Feb;25(2):256-8.
6. Ogawa K, Hozumi T, Sugioka K, Matsumura Y, Nishiura M, Kanda R, Abe Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Usefulness of automated quantitation of regional left ventricular wall motion by a novel method of two-dimensional echocardiographic tracking. *Am J Cardiol.* 2006 Dec 1;98(11):1531-7. Epub Oct 16.
7. Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From AH, Zhang J. (2007) Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* Mar;25(3):612-20. Epub 2006 Nov 9.
8. Fujimoto K, Hozumi T, Watanabe H, Tokai K, Shimada K, Yoshiyama M, Homma S, Yoshikawa J. (2006) Acute hyperglycemia induced by oral glucose loading suppresses coronary microcirculation on transthoracic Doppler echocardiography in healthy young adults. *Echocardiography* Nov;23(10):829-34.
9. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. (2006) Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* Sep;102(1):96-102.
10. Shirai N, Ikura Y, Naruko T, Ohsawa M, Sugama Y, Suekane T, Kitabayashi C, Ehara S, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Ueda M. (2006) Endothelin-converting enzyme expression in the neointima after percutaneous coronary intervention. *Osaka City Med J.* Jun;52(1):29-37.
11. Hirai H, Shibata T, Aoyama T, Yoshiyama M, Omura T, Suehiro S. (2006) Activation of mitogen-activated protein kinases, activator protein-1, and nuclear factor-kappaB during acute rejection after heterotopic heart transplantation in rats. *Osaka City Med J.* Jun;52(1):9-19.
12. Takemoto Y, Hozumi T, Sugioka K, Watanabe H, Matsumura Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. (2006) Automated three-dimensional analysis of mitral annular dynamics in patients with myocardial infarction using automated mitral annular tracking method. *Echocardiography.* Sep;23(8):658-65.
13. Wake R, Takeuchi M, Yoshitani H, Miyazaki C, Otani S, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Role of contrast-enhanced dobutamine stress echocardiography in predicting outcome in patients with known or suspected coronary artery disease. *Echocardiography.* Sep;23(8):642-9.
14. Okajima K, Kawase Y, Matsushita N, Iwata S, Doi A, Hasegawa T, Hato K, Nishimoto M, Abe Y, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Usefulness of myocardial contrast echocardiography with nicorandil stress for the detection of coronary artery stenosis. *Heart.* Sep;92(9):1331-2.
15. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Murata T, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. (2006) The effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* Aug;101(4):344-9. Epub 2006 Aug 5.
16. Iwata S, Hozumi T, Matsumura Y, Sugioka K, Yoshitani H, Murata E, Takemoto Y, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Cut-off value of coronary flow velocity reserve by transthoracic Doppler echocardiography for the assessment of significant donor left anterior descending artery stenosis in patients with spontaneously visible collaterals. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 1;98(3):298-302. Epub Jun 6.
17. Tatsumi H, Takagi M, Nakagawa E, Yamashita H, Yoshiyama M. (2006) Risk stratification in patients with Brugada syndrome: analysis of daily fluctuations in 12-lead electrocardiogram (ECG) and signal-averaged electrocardiogram (SAECG). *J Cardiovasc Electrophysiol.* Jul;17(7):705-11.
18. Wake R, Takeuchi M, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Quantitative assessment of left ventricular function during contrast-enhanced dobutamine stress echocardiography predicts future cardiac events in diabetic patients. *Circ J.* Jul;70(7):868-74.
19. Nishiya D, Omura T, Shimada K,

- Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. (2006) Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci.* May;101(1):31-9.
20. Murata E, Hozumi T, Matsumura Y, Fujimoto K, Sugioka K, Takemoto Y, Watanabe H, Yamagishi H, Yoshiyama M, Iwao H, Yoshikawa J. (2006) Coronary flow velocity reserve measurement in three major coronary arteries using transthoracic Doppler echocardiography. *Echocardiography.* Apr;23(4):279-86.
21. Zhu H, Hozumi T, Takemoto Y, Takagi Y, Negishi K, Abo K, Sugioka K, Matsumura Y, Otsuka R, Yoshitani H, Nakao M, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Estimation of myocardial ischemia by diastolic strain analysis in exercise stress echocardiography: comparison with exercise thallium-201 single photon emission computed tomography. *J Cardiol.* Apr;47(4):165-72. Japanese.
22. Asawa K, Kataoka T, Kobayashi Y, Hasegawa T, Nishioka H, Yamashita H, Qiu Z, Ehara S, Hirose M, Kamimori K, Shimada K, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Method analysis for optimal continuous imaging using intravascular optical coherence tomography. *J Cardiol.* Mar;47(3):133-41.
23. Shirai N, Naruko T, Ohsawa M, Ikura Y, Sugama Y, Hirayama M, Kitabayashi C, Ehara S, Inoue T, Itoh A, Haze K, Tanzawa K, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Ueda M. (2006) Expression of endothelin-converting enzyme, endothelin-1 and endothelin receptors at the site of percutaneous coronary intervention in humans. *J Hypertens.* Apr;24(4):711-21.
24. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Ueda M, Yoshikawa J. (2006) Coronary artery calcification revisited. *J Atheroscler Thromb.* Feb;13(1):31-7. Review.
25. Naruko T, Ueda M, Ehara S, Itoh A, Haze K, Shirai N, Ikura Y, Ohsawa M, Itabe H, Kobayashi Y, Yamagishi H, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Becker AE. (2006) Persistent high levels of plasma oxidized low-density lipoprotein after acute myocardial infarction predict stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(4):877-83
26. Hirata K, Watanabe H, Otsuka R, Fujimoto K, Tokai K, Yamagishi H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Noninvasive diagnosis of restenosis by transthoracic Doppler echocardiography after percutaneous coronary intervention: comparison with exercise TI-SPECT. *J Am Soc Echocardiogr.* Feb;19(2):165-71.
27. Hasegawa T, Ehara S, Kobayashi Y, Kataoka T, Yamashita H, Nishioka H, Asawa K, Yamagishi H, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Ueda M. (2006) Acute myocardial infarction: clinical characteristics and plaque morphology between expansive remodeling and constrictive remodeling by intravascular ultrasound. *Am Heart J.* Feb;151(2):332-7.
28. Fukuda D, Shimada K, Tanaka A, Kusuyama T, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kawarabayashi T, Iida H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. (2006) Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase-9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol.* Jan 15;97(2):175-80. Epub 2005 Nov 17.
29. Kim-Mitsuyama S, Izumi Y, Izumiya Y, Namba M, Yoshida K, Wake R, Yoshiyama M, Iwao H. (2006) Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac hypertrophy induced by angiotensin II and hypertension. *Gene Ther.* Feb;13(4):348-55.
30. Fukuda D, Yoshiyama M, Shimada K, Yamashita H, Ehara S, Nakamura Y, Kamimori K, Tanaka A, Kawarabayashi T, Yoshikawa J. (2006) Relation between aortic stiffness and coronary flow reserve in patients with coronary artery disease. *Heart.* Jun;92(6):759-62. Epub 2005 Oct 10.
- (藤尾慈)
1. Kubota, T., Nakajima-Taniguchi, C., Fukuda, T., Funamoto, M., Maeda, M., Tange, E., Ueki, R., Kawashima, K., Hara, H., Fujio, Y., Azuma, J. (2006) CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. *Pharmacogenomics J.* 6 115-119
 2. Uozumi, Y., Ito, T., Hoshino, Y., Mohri, T., Maeda, M., Takahashi, K., Fujio, Y., Azuma, J. (2006) Myogenic differentiation induces taurine transporter in association with taurine-mediated cytoprotection in skeletal muscles. *Biochem. J.* 394 699-706
 3. Matsuda, T., Fujio, Y., Nariai, T., Ito, T., Yamane, M., Takatani, T., Takahashi, K., Azuma, J. (2006) N-cadherin signals through Rac1 determined the localization of connexin 43 in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40 495-502
 4. Mohri, T., Fujio, Y., Maeda, M., Ito, T., Oshima, Y., Uozumi, Y., Segawa, M., Yamamoto, H., Kishimoto, T., Azuma, J. (2006) Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells.

- J. Biol. Chem.* 281 6442-6447
5. Maeda, M., Fujio, Y., Azuma, J. (2006) MTHFR gene polymorphism and diabetic retinopathy. *Current Diabetes Review.* 2 467-476
6. Yasui, M., Yamamoto, H., Ngan, C. Y., Damdinsuren, B., Sugita, Y., Fukunaga, H., Gu, J., Maeda, M., Takemasa, I., Ikeda, M., Fujio, Y., Sekimoto, M., Matsuura, N., Weinstein, I. B., Monden, M. (2006) Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: Implication of tumor vascularization. *Clin. Cancer Res.* 12 4720-4729
7. Fukuda T., Tanabe, T., Ohno, M., Tougou, K., Fujio, Y., Azuma, J., Yamamoto, I., Takeda, H. (2006) Warfarin dose requirement for patients with both *VKORC1 3673A/A* and *CYP2C9*3/*3* genotypes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80 553-554
8. Ito, T., Fujio, Y., Takahashi, K., Azuma, J. (2007) Degradation of NFAT5, a transcriptional regulator of osmotic stress-related genes, is a critical event for doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 282 1152-1160
9. Yamane, M., Matsuda, T., Ito, T., Fujio, Y., Takahashi, K., Azuma, J. (2007) Rac1 activity is required for cardiac myocyte alignment in response to mechanical stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 1023-1027
10. Hiramoto, Y., Shioyama, W., Kuroda, T., Masaki, M., Sugiyama, S., Okamoto, K., Fujio, Y., Hirota, H., Hori, M., K. Yamauchi-Takahara. (2007) Effect of bosentan on plasma endothelin-1 level in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ. J.* 71 367-369
11. Maeda, M., Yamamoto, I., Fukuda, M., Motomura, T., Kasayama, S., Nishida, M., Nonen, S., Fujio, Y., Azuma, J. MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* (in press)
12. Nonen, S. Okamoto, H., Fujio, Y., Takemoto, Y., Yoshiyama, M., Hamaguchi, T., Matsui, Y., Yoshikawa, J., Kitabatake, A., Azuma AJ. Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor α_{1D} are associated with the response to β -blockers in dilated cardiomyopathy. *Pharmacogenomics J.* (in press)
13. Tougou, K., Fukuda, T., Ito, T., Yamazaki, H., Fujio, Y., Azuma, J. Genetic polymorphism of bile acid CoA: Amino acid N-acetyltransferase in Japanese individuals. *Drug Metab. Pharmacokinet.* (in press)
2. 学会発表
(岩尾洋)
1. 第79回日本薬理学会年会 2006年3月8日~10日 横浜
トロンボポエチンは転写因子を Foxo3a を不活性化することにより巨核球造血を促進する
中尾 隆文、三浦 克之、岩尾 洋、Kaushansky Kenneth
2. 第109回日本薬理学会近畿部会 2006年6月16日 岡山
血管内皮細胞におけるスタチンの Akt 機能の与える影響
塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋
3. Effect of Statins on Activation of Akt in Vascular Endothelial Cells
The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
October 15-19, Fukuoka
Shiota, M., Izumi, Y., Nakao, T. and Iwao, H.
4. 第110回日本薬理学会近畿部会 2006年11月10日 京都
プラバスタチンは PI3K/Akt/mTOR/p70S6 kinase 経路を介して血管内皮細胞の増殖を促進する
中尾 隆文、塩田 正之、泉 康雄、岩尾 洋
5. 第16回日本循環薬理学会 2006年12月1日 東京
スタチンの多面的作用発現における PI3K/Akt 経路の関与
塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋
- (岡本洋)
1. 2nd IACS(International Academy of Cardiovascular Science) Sapporo, July 16, 2006
2. American heart association 80th. scientific scession, Chicago November 13, 2006
3. The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH2006) October 2006, Fukuoka
- (葭山稔)
1. Okamoto H, Nonen S, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Adrenergic α_{1B} (G549A) and norepinephrin transporter (T-182C) polymorphism are associated with the response to beta-blockers in the patients with dilated cardiomyopathy. 2006 American Heart Association. Chicago, USA, 12-15, Nov., 2006.
2. Takeshita H, Kataoka T, Kobayashi Y,

- Hozumi T, Iwata S, Ogawa K, Nishioka H, Shimada Y, Yamashita H, Ehara S, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Relationship indicators of carotid and left main coronary artery atherosclerosis by ultrasound and the number of coronary artery disease. 2006 American Heart Association. Chicago, USA, 12-15, Nov., 2006.
3. Ogawa K, Hozumi T, Sugioka K, Iwata S, Oe H, Otsuka R, Takagi Y, Yoshitani H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Automated assessment of left atrial function from time-left atrial volume curve by velocity vector imaging.. 2006 American Heart Association. Chicago, USA, 12-15, Nov., 2006.
4. Okamoto H, Nonen S, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Adrenergic alpha1B (G549A) and norepinephrin transporter (T-182C) polymorphism are associated with the response to beta-blockers in the patients with dilated cardiomyopathy. The 10th annual scientific meeting of the Japanese Heart Failure Society. Tokyo, Japan, 13-15, Oct., 2006.
5. Nishiya D, Omura T, Shimada K, Yoshiyama M, Kusuyama T, Matsumoto R, Takeuchi K, Yoshikawa J. Erythropoietin prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. European society of cardiology. Barcelona, Spain, 2-6 Sep, 2006.
6. Nakagawa E, Takagi M., Tatsumi H, Yoshiyama M. Reproducibility and characteristics of heart rate variability in patients with Brugada syndrome. European society of cardiology. Barcelona, Spain, 2-6 Sep, 2006.
7. Enomoto S, Omura T, Yoshiyama M. Microbubble destruction with ultrasound augments neovascularization by bone marrow cell transplantation in rat hind limb ischemia. European society of cardiology. Barcelona, Spain, 2-6 Sep, 2006.
8. Nishiya D, Omura T, Yoshiyama M. Long acting calcium channel blocker azelnidipine prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction. European society of cardiology. Barcelona, Spain, 2-6 Sep, 2006.
9. Negishi K, Takemoto Y, Takagi Y, Hong Z, Matsumura Y, Sugioka K, Yoshitani H, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Quantitative assessment of persistent regional myocardial dysfunction after myocardial ischemia using exercise stress echocardiography with newly developed myocardial strain profile analysis. American society of echocardiography Baltimore, USA, 3-7 June, 2006.
10. Kataoka T, Kobayashi Y, Asawa K, Yoshiyama M. Early and subtle neointimal growth detection following stent implantation using optical coherence tomography and intravascular ultrasound and histology. American college of cardiology. Atlanta, USA, 11-14 March, 2006.
11. Oe H, Hozumi T, Murata E, Yoshiyama M. Arachidonic acid and docosahezaenoic acid supplementation increases coronary flow velocity reserve in healthy Japanese elderly individuals. American college of cardiology. Atlanta, USA, 11-14 March, 2006.
- (藤尾慈)
1. The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 15-17, 2007 (Kobe, Japan)
Pharmacogenomics of β -blocker Therapy in Chronic Heart Failure
Azuma, J., Nonen, S., Okamoto, H., Fujio, Y., Takemoto, Y., Yoshiyama, M., Hamaguchi, T., Matsui, Y., Yoshikawa, J., Kitabatake, A.
2. 第27回日本臨床薬理学会年会, 2006年11月29日~12月1日(東京)
Warfarin維持投与量に対するCYP2C9およびVKORC1遺伝子多型の影響~CYP2C9*3/*3保有者の維持投与量に対する考察~
福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一
3. 第27回日本臨床薬理学会年会, 2006年11月29日~12月1日(東京)
科学的根拠に基づいた禁煙指導に向けて~ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニット (CHRNA4) 多型のニコチン依存性に及ぼす影響~
植木理紗, 谷口智子, 丹下悦子, 久保田智子, 南畝晋平, 福田剛史, 船本全信, 三浦源太, 前田真貴子, 藤尾慈, 東純一
4. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, November 12-15, 2006 (Chicago, Illinois, USA)
Atrogin-1 Ubiquitin Ligase is Upregulated by Doxorubicin, Leading to Muscle Atrophy in Cardiac Myocytes
Fujio, Y., Hoshino-Nariai, Y., Yamamoto, Y., Ito, T., Uozumi, Y., Mohri, T., Obana, M., Nariai, T., Kimura, Y., Maeda, M., Azuma, J.
5. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, November 12-15, 2006 (Chicago, Illinois, USA)
Disruption of *Taurine Transporter* Gene Results in Abnormal Cardiac Morphology Associated with Impairment of Mitochondrial Ultrastructure and Function in Mice
Ito, T., Fujio, Y., Uozumi, Y., Takahashi, K., Azuma, J.
6. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, November 12-15, 2006 (Chicago, Illinois, USA)

- Interleukin (IL)-11 Prevents Ischemia/Reperfusion Injury in Hearts as a Novel Cardioprotective Cytokine
Maeda, M., Fujio, Y., Kimura, R., Arita, A., Ito, T., Yamamoto, Y., Mohri, T., Oshima, Y., Azuma, J.
7. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, November 12-15, 2006 (Chicago, Illinois, USA)
Adrenoceptor $\alpha 1B$ (G549A) and Norepinephrine Transporter (T-182C) Polymorphisms are Associated with the Response to β -Blockers in the Patients with Dilated Cardiomyopathy
Okamoto, H., Nonen, S., Fujio, Y., Takemoto, Y., Yoshiyama, M., Hamaguchi, T., Matsui, Y., Yoshikawa, J., Kitabatake, A., Azuma, J.
8. The American Heart Association Scientific Sessions 2006, November 12-15, 2006 (Chicago, Illinois, USA)
Cardiac Sca-1+ Cells were Differentiated into Endothelial Cells by Leukemia Inhibitory Factor, a Paracrine Cytokine
Mohri, T., Fujio, Y., Maeda, M., Ito, T., Iwakura, T., Uozumi, Y., Yamamoto, Y., Azuma, J.
9. 3rd Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences - Translation of Basic Insights into Clinical Practice, July 31 - August 3, 2006 (Keystone, Colorado, USA)
Impaired Mitochondrial Ultrastructure and Metabolic Function in Cardiac and Skeletal Muscle in Taurine-Deficient Mice
Ito, T., Uozumi, Y., Fujio, Y., Takahashi, K., Azuma, J.
10. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型と warfarin の投与量との関係
福田剛史, 山本勇, 田邊智子, 大野雅子, 東郷克彦, 竹田晃, 藤尾慈, 東純一
11. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
浸透圧負荷の薬物代謝酵素チトクローム P450 遺伝子発現に及ぼす影響 —培養肝細胞における検討—
朝倉こう子, 伊藤崇志, 福田剛史, 東郷克彦, 藤尾慈, 東純一
12. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
心不全治療における β 遮断薬反応性の個人差: $\beta 1$ アドレナリン受容体、及び CYP2D6 遺伝子多型からの検討
南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 松井裕, 早田望, 福田剛史, 吉川純一, 北畠顕, 東純一
13. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
心不全発症における $\beta 1$ 及び $\alpha 2c$ アドレナリン受容体遺伝子多型の関与
南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 松井裕, 吉川純一, 北畠顕, 東純一
14. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
15. 科学的根拠に基づいた禁煙支援に向けて~ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニット(CHRNA4) 多型のニコチン依存性に及ぼす影響~
植木理紗, 谷口智子, 丹下悦子, 久保田智子, 福田剛史, 船本全信, 前田真貴子, 藤尾慈, 東純一
16. 医療薬学フォーラム 2006/第 14 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2006 年 7 月 15 日~16 日 (大阪)
心不全におけるアデニル酸シクラーゼタイプ 9 遺伝子多型の臨床的意義
早田望, 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 松井裕, 吉川純一, 北畠顕, 東純一
17. The 15th World Congress of Pharmacology IUPHAR 2006, July 2-7, 2006 (Beijing, China)
Degradation of transcription factor NFAT5 is induced by doxorubicin exposure in cultured cardiomyocytes
Ito, T., Uozumi, Y., Maeda, M., Yamamoto, Y., Mohri, T., Fujio, Y., Azuma, J.
18. The 15th World Congress of Pharmacology IUPHAR 2006, July 2-7, 2006 (Beijing, China)
Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac Sca-1+ stem cells
Mohri, T., Fujio, Y., Maeda, M., Ito, T., Iwakura, T., Oshima, Y., Uozumi, Y., Yamamoto, Y., Azuma, J.
19. The 13th Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics 2005 (PRACP2006), Jun27-30, 2006 (Changsha, China)
Genetic polymorphism of Tryptophan hydroxylase 2 could influence antidepressant response to fluvoxamine in Japanese patients with major depressive disorder
Fukuda, T., Yamashita, M., Kato, M., Wakeno, M., Okugawa, G., Takekita, Y., Hosoi, Y., Fujio, Y., Nobuhara, K., Kinoshita, T., Azuma, J.
20. The 13th Annual Meeting of Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics 2006 (PRACP2006), June 28-30, 2006 (Changsha, China)
Adrenoceptor $\alpha 1B$ and norepinephrine transporter polymorphisms are associated with the β -blocker response in the patients with dilated cardiomyopathy
Nonen, S., Okamoto, H., Fujio, Y., Takemoto,

Y., Yoshiyama, M., Hamaguchi, T., Matsui, Y.,
Yoshikawa, J., Kitabatake, A., Azuma, J.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願

特願 2005-185355

特願 2006-293062

国際出願 PCT/JP2006/312519

2. 実用新案登録

該当なし

サル心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理的検討

分担研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：我々は正常状態のサルに β 受容体遮断薬のプロプラノロールとメトプロロールを投与したときの心機能を three-dimensional echocardiography (3D心エコー) を用いて検討した。プロプラノロールとメトプロロール (0.1 or 0.3mg/kg/10min 静脈内投与) は共にヒトと同様に徐脈を示すと同時に、左室拡張末期容量 (EDV) は変化せず、左室収縮末期容量 (ESV) を増加する結果、一回心拍出量を低下し駆出率を約 14% 低下する。一方、心不全モデルにおいてはプロプラノロールとメトプロロールが駆出率を有意に改善する。すなわちサルにエピネフリンを投与して“たこつば型”心不全モデルを作成後、プロプラノロールとメトプロロールの投与により両薬剤とも心臓の左室駆出率を30%から40%に有意に改善した。上記の実験結果から β 受容体遮断薬の作用が正常時と心不全時では異なることがサルを用いた実験から明らかとなった。心不全モデルにおいて β 受容体遮断薬が左室駆出率を改善することから、本モデルを用いて β 受容体遮断薬の作用機序を解析し、治療関連候補遺伝子を探索することが可能であると考えた。

A. 研究目的

現在わが国の死因の第2位が心疾患であり、高齢化と生活習慣の欧米化により心疾患の最終段階である心不全はますます増加すると推測されている。心疾患に対する治療薬としての β 受容体遮断薬の地位は高く、益々その利用は増え続けている。特に、いろいろな心疾患の最終結果として起こる慢性心不全の治療薬としての位置づけは大規模臨床試験の結果から死亡率を低下させることにより確立されてきた。しかしながら、 β 受容体遮断薬がなぜ有効なのかを説明する作用機序に関しては未だに不明の点が多く存在する。特に、 β 受容体遮断薬の心筋に対する陰性変力作用により約30%のノンレスポonder患者においては、心不全を悪化させるという欠点をもつことも知られている。一方では、大多数の心不全患者の心臓の駆出率 (ejection fraction) を増加し、心機能を改善することが報告されている。

本研究は、 β 受容体遮断薬の薬物反応性がヒトと類似するサル心不全モデルを用いて、 β 受容体遮断薬の作用機序を遺伝子発現様式、受容体機能解析、免疫組織化学による解析を組み合わせることにより明らかにする試みである。

β 受容体遮断薬の薬物反応性が良い拡張型心不全モデルの一つであるカテコールアミン心筋症による心不全を作製する。心不全時の遺伝子発現解析、受容体機能解析、

免疫組織化学による解析を行い、 β 受容体遮断薬メトプロロール投与による駆出率改善時の遺伝子発現解析、受容体機能解析、免疫組織化学による解析を比較検討することにより、① β 受容体サブタイプの変化と β 1受容体のダウンレギュレーションと adenylyl cyclase、protein kinase A、② troponin Cなどの収縮関連蛋白質の関与、③リアノジン受容体、SERCA、phospholambanやカルモジュリンなどの細胞内カルシウム調節に関与する蛋白質、④NO合成酵素と酸化ストレスへの影響などを調べる。この研究により心不全での β 受容体遮断薬の作用を包括的に解析することで作用機序を解析し、治療関連候補遺伝子を探索することが出来る。

B. 研究方法

カテコールアミン心不全モデルの作製

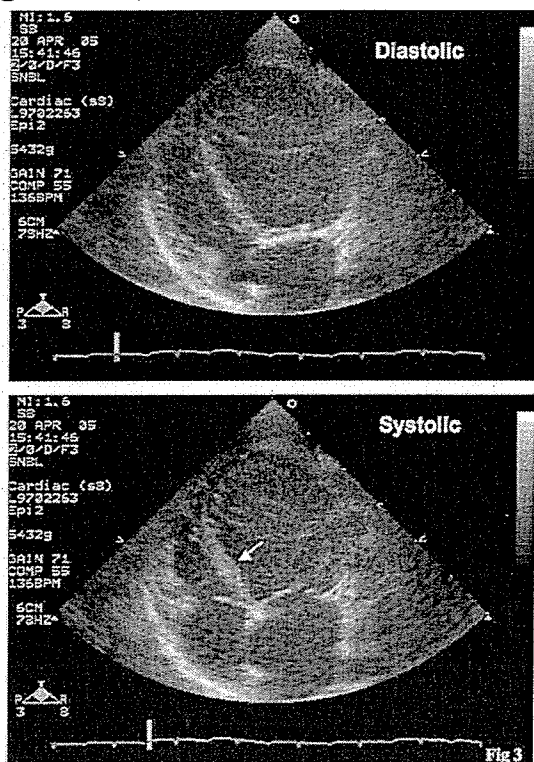
使用動物は検疫済みの雄性カニクイザル (3~8才、中国産) を使用する。実験動物安全指針に従い研究を進める。飼育はケージ (63cmx76cmx76cm) で行い、室温26度、湿度50%、照明時間は午前6時から午後6時でおこなう。カニクイザルは、イソフルラン吸入麻酔下にてRT3D心エコー (SONOS 7500, Philips Med. Sys., USA) を行う。同時に循環動態をモニターしながら、エピネフリン (10 μ g/kg/min) を24時間間隔で3時間持続静脈内投与を2回行うことで作製する。モデルの成否は、エピネフ

リンの2回目投与後24時間目の左室駆出率をRT3D心エコーで測定し、40%以下の動物を心不全モデルとする。左心室の機能測定には、RT3D心エコーで左心室の容積変化を求める。イメージデータは、専用に解析ソフトを用いて、左心室の拡張末期容積、収縮末期容積、1回拍出量および駆出率を求め、さらに心拍出量を算出する。

β 受容体遮断薬のメトプロロール(0.3mg/kg)を0.1ml/kg/minの割合で静脈内に20分間投与する。投与後30分後、2時間後、24時間後にRT3D心エコーにより心機能の測定後に心臓を摘出する。心臓は左右の心房、右心室、心室中隔、左心室自由壁に分ける。心不全時には心尖部の壁運動が他の部位に比べて著しく動きが弱いことから、心室中隔と左心室自由壁は心尖部、中間部、基部の3部位に分る。さらに、左心室自由壁は心内膜側と心外膜側に2等分する。以上の12箇所部位に心臓を分け、それぞれの部位間で遺伝子発現解析と受容体の解析と組織学的解析を行い、比較検討が出来るようにする。

解析項目

①心エコー図 (心エコー図参照)



②血液生化学的検査項目

心エコーの測定直前に10mlの静脈血を採血し、正常時、エピネフリン投与後、メトプロロール投与後に採血し、カテコールアミン、心房性利尿ペプチドANP、脳性利

尿ペプチドBNPを測定する。更に、心臓からの逸脱酵素の血中レベルを測定する。

③網羅的遺伝子発現解析

cDNAマイクロアレイ解析用に心臓を摘出後、速やかに各部位の組織を液体窒素で瞬間凍結する。QIAGEN RNeasy Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出後アフィメトリックス社製のRhesus Macaque Genome Arrayを使用して遺伝子発現を網羅的に解析する。心不全時には脳性利尿ペプチド発現が増加することがすでに知られている。そこで、脳性利尿ペプチドの遺伝子発現量の増加度を基準にして他の収縮関連遺伝子、カルシウムチャンネル蛋白遺伝子、 β 受容体遺伝子の発現量を測定する。収縮関連遺伝子として、troponin Cを中心にtroponin T, troponin N, myosin heavy chainのサブタイプ, actinのサブタイプの変化を検討する。 β 受容体サブタイプの変化と β 1受容体のdownregulationとadenyl cyclase、protein kinase Aの検討は、 β 1-receptor, β 2-receptor, β 3-receptor, β 1-adrenergic receptor kinase (β 1ARK), β -arrestin, adeny cyclaseの遺伝子発現量を検討する。細胞内カルシウム調節に関与する蛋白質は、細胞外膜のL型電位依存性カルシウムチャンネル、筋小胞体のリアノジン受容体(RyR2)、Ca/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA)、phospholambanなどの遺伝子発現を検討する。

④組織化学的解析

組織学的解析を行う目的で4%パラホルムアルデヒド固定、カルノア固定、凍結切片用ブロックを準備する。4%パラホルムアルデヒド固定後にパラフィン包埋したサンプルはヘマトキシエオジン染色とアザン染色を行う。カルノア固定によるものと凍結切片により免疫組織学的検討を行う。luxol fast blue染色により正常心筋は桃色に染まり、心不全による障害心筋は青染することが知られている。

酸化ストレスを組織学的に検討するため凍結切片を用いて細胞内活性酸素生成をH₂DCFDAにて検出する。また、アポトーシスを検討する目的で凍結切片とパラフィン切片を用いてTUNELを行い左心室心尖部での変化を他の部位と比較検討する。

⑤受容体の解析

心臓の各部位から得られた組織サンプルから膜画分を用いてレセプターバインディングアッセイを行う。標識リガンドとして

$\beta 1/\beta 2$ 受容体に特異的な

L-Dihydroalprenololと、 $\beta 1/\beta 2/\beta 3$ 受容体に特異的な3-iodocyanopindololを用いて受容体の結合様式、結合定数、最大結合量を計測する。 $\beta 1$ 受容体に特異性のより高いリガンドが入手できれば利用する。

界面活性剤を含む緩衝液にて組織をホモジネートして膜蛋白である受容体を可溶化し、SDS-PAGE電気泳動により分離後ウエスタンブロットを行い $\beta 1/\beta 2/\beta 3$ 受容体蛋白量を確認する。

⑥収縮関連蛋白・カルシウムチャネル解析 troponin Cとカルシウムの結合を検討する。

β 受容体の活性化によるprotein kinase Aの過剰反応による筋小胞体での過リン酸化が、筋小胞体からのカルシウムリークを起こし、細胞質でのカルシウムサイクルを障害しているとも考えられる。そこで、リアノジン受容体 (RyR2) とcalstabin2の結合能をJTV519を用いて検討する。さらに、RyR2のリン酸化状態をリン酸化抗体を用いて検討する。Phospholanbanはsarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase(SERCA)の活性をリン酸化により調節していることから、Phospholanbanのリン酸化を検討する。

C. 研究結果

正常状態のサルに β 受容体遮断薬のプロプラノロールとメトプロロールを投与したときの心機能を three-dimensional echocardiography (3D 心エコー) を用いて検討した。プロプラノロールとメトプロロール (0.1 or 0.3mg/kg/10min 静脈内投与) は共にヒトと同様に徐脈を示すと同時に、左室拡張末期容量 (EDV) は変化せず、左室収縮末期容量 (ESV) を増加する結果、一回心拍出量を低下し駆出率を約 14% 低下する。一方、心不全モデルにおいてはプロプラノロールとメトプロロールが駆出率を有意に改善する。すなわちサルにエピネフリンを投与して“たこつぼ型”心不全モデルを作成後、プロプラノロールとメトプロロールの投与により両薬剤とも心臓の左室駆出率を 30%から 40%に有意に改善した。

D. 考察

心不全モデルとしてのサル病態は確立できたと考えている。今回作製したカニクイザルカテコールアミン心不全モデルは、心不全に対する β 遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなる

と考えられる。今後、この系を用いて、ゲノム疫学的に β 遮断薬の薬効と相関する治療関連候補遺伝子の解析を進めることが重要である。

E. 結論

現在進行中の候補遺伝子と β 遮断薬の薬効と相関することが示唆された遺伝子に関し、その遺伝子産物の発現量や機能をカニクイザルカテコールアミン心不全モデルで検討すること必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwamura, H., Tominaga, K., Shiota, M., Asida, R., Nakao, T., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Ichijo, H., Arakawa, T., and Iwao, H. (2007) Growth Inhibition of Colon Cancer Cells by Transfection of Dominant-negative Apoptosis Signal-regulating Kinase-1. *Oncology Reports* 17:781-786
2. Tsusaki, H., Yonamine, H., Tamai, A., Shimamoto, M., Kuwano, K., Iwao, H., Nagata, R., and Kito, G. (2006) Left Ventricular Volume and Function in Cynomolgus Monkeys using Real-Time Three-Dimensional Echocardiography. *Journal of Medical Primatology* 36:39-46
3. Kim-Mitsuyama, S., Izumi, Y., Izumiya, Y., Namba, M., Yoshida, K., Wake, R., Yoshiyama, M., and Iwao, H. (2006) Dominant-negative c-Jun inhibits rat cardiac hypertrophy induced by angiotensin II and hypertension. *Gene Ther.* 13: 348-355.
4. Tsusaki, H., Yonamine, H., Tamai, A., Shimamoto, M., Iwao, H., Nagaya, R., and Kito, G. (2005) Evaluation of cardiac function in primates using real-time three-dimensional echocardiography as applications to safety assessment. *J Pharmacol Toxicol Methods* 52: 182-187.
5. Izumi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Yoshiyama, M., Omura, T., Shiota, M., Matsuzawa, A., Yukimura, T., Murohara, T., Takeya, M., Ichijo, H., Yoshikawa, J., and Iwao, H. (2005) Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 1877-1883.
6. Ashida, R., Tominaga, K., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Mituyama, S., Iwao, H., and Arakawa, T. (2005) AP-1 and colorectal cancer.

Inflammopharmacology 13: 113-125.
 7. Wake,R., Kim-Mitsuyama,S., Izumi,Y., Yoshida,K., Izumiya,Y., Yukimura,T., Shiota,M., Yoshiyama,M., Yoshikawa,J., and Iwao,H. (2005) Beneficial effect of candesartan on rat diastolic heart failure. *Journal of Pharmacological Sciences* 98: 372-379.
 8. Yoshida,K., Kim-Mitsuyama,S., Wake,R., Izumiya,Y., and Izumi,Y., Yukimura,T., Ueda,M., Yoshiyama,M. and Iwao, H. (2005) Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertens Res.* 28, 447-455.
 9. Kim-Mitsuyama,S., Yamamoto,E., Tanaka,T., Zhan,Y., Izumi,Y., Izumiya,Y. Ioroi,T., Wanibuchi,H., and Iwao, H. (2005) Critical role of angiotensin II in excess Salt-Induced brain oxidative stress of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 36: 1077-1082.

2. 学会発表

1. 第 79 回日本薬理学会年会 2006 年 3 月 8 日～10 日 横浜
 トロンボポエチンは転写因子を Foxo3a を不活性化することにより巨核球造血を促進する
 中尾 隆文、三浦 克之、岩尾 洋、Kaushansky Kenneth
2. 第 109 回日本薬理学会近畿部会 2006 年 6 月 16 日 岡山
 血管内皮細胞におけるスタチンの Akt 機能の与える影響
 塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋
3. Effect of Statins on Activation of Akt in Vascular Endothelial Cells
 The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension
 October 15-19, Fukuoka
 Shiota,M., Izumi,Y., Nakao,T. and Iwao,H.
4. 第 110 回日本薬理学会近畿部会 2006 年 11 月 10 日 京都
 プラバスタチンは PI3K/Akt/mTOR/p70S6 kinase 経路を介して血管内皮細胞の増殖を促進する
 中尾 隆文、塩田 正之、泉 康雄、岩尾 洋
5. 第 16 回日本循環薬理学会 2006 年 12 月 1 日 東京
 スタチンの多面的作用発現における PI3K/Akt 経路の関与
 塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願
 該当なし
2. 実用新案登録
 該当なし

臨床データと遺伝子データの照合・解析

分担研究者 岡本 洋 北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学

研究要旨：心不全における β 遮断薬治療を取り上げ、ファーマコゲノミクスに基づいた効率的・個別的治療方法を確立する

A. 研究目的

心不全における β 遮断薬治療を取り上げ、ファーマコゲノミクスに基づいた効率的・個別的治療方法を確立することを目的としている。

B. 研究方法

1) J-CHF 試験を継続し、参加施設・医師・対象患者の登録業務を行い、約330名の患者の登録を行った。任意でゲノム解析用の血液採取を行い、サンプルの集積を行った。

2) 心不全の新規候補遺伝子として、オステオポンチンを取り上げ意義を検討した。

（倫理面への配慮）

IC を用い患者の人権および福祉を守り、試験の科学的な質と信頼性および安全性を確保するためにGCPの理念に準拠、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針等のガイドラインを遵守の上実施する。

C. 研究結果

1) 今年度は患者登録の推進、任意にICを取得した患者から抹消血液を採取、ゲノム集積を行い、約110症例からのサンプルを回

収した。

2) アンジオテンシン負荷モデルにおいて遺伝子チップを作成、発現レベルの亢進を確認し、オステオポンチンは、心筋構造維持ばかりではなく、サイトカイン・液性因子として細胞間ネットワーク統合に参画することを明らかにした。

D. 考察

オステオポンチンは、マクロファージやTリンパ球、NKT細胞で産生され、IL-12 およびIL-10を発現しT細胞の極性をTh1タイプへ変換させる。オステオポンチンはアンジオテンシン負荷に対し、発現が亢進し、線維化進展に関与する。スタチンの投与は、線維化や拡張機能抑制ばかりでなく、オステオポンチン発現を抑制する。本来、心筋リモデリング機構における線維化は、傷害を受けた心筋がその構造を維持するために合目的的に作動するシステムと考えられ、新たな標的遺伝子となる。

E. 結論

1) J-CHF 試験を継続し、遺伝子ゲノムサンプルから心不全標的遺伝子の解析を行

うことの科学的合理性を得た。

2) AII 負荷モデルマウスでの遺伝子発現をマイクロ・アレイにより網羅的に解析し、オステオポンチンを新規関連遺伝子として同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 岡本 洋 (2006) 佐古田論文に対する Editorial Comment

心臓 38(8) : 84

2. 岡本洋、秋野正敏、筒井裕之、今重之、上出利光 (2006) Osteopontin 発現のリモデリングと心機能における意義

循環器科 59(3) : 304-305

3. 寺崎文生、下村裕章、塚田敏、大塚宏治、片嶋隆、大塚薫、浮村聡、

北浦泰、今中恭子、吉田利通、廣江道昭、岡本洋 (2006) 心サルコイドーシス心筋では matricellular proteins と I 型ヘルパー T 細胞関連サイトカインの発現が亢進する

循環器科 59(3) : 298-299

4. 森本 紳一郎、植村 晃久、平光 伸也、中谷 敏、土田 哲人、矢崎善一、和泉徹、松森昭、後藤敏司、廣江道昭、寺崎文生、鈴木忠、岡本 洋、徳田衡、菱田仁 (2006) サルコイドーシスの心病変の診断の手引き (改定)

循環器科 59(3) : 300

5. 岡本 洋 (2006) アドレナリン受容体 $\alpha 1 B$ (G 5 4 9 A) とノルエピネフリントランスポーター (T-1 8 2 C) の遺伝子多型は拡張型心筋症患者の β 遮断薬治療への反応性と相関する

AHA2006 第79回米国心臓病学会学術集会

(報告集) , PROUS SCIENCE (Barcelona) : 9-11

6. Yoh Takekuma, Toru Takenaka, Masami, Kiyokawa, Koujiro, Yamazaki, Hiroshi Okamoto, Akira Kitabatake, Hiroyuki Tsutsui, Mitsuru Sugawara

(2006) Contribution of Polymorphisms in UDP-Glucuronosyltransferase and CYP2D6 to the Individual Variation in Disposition of Carvedilol

J Pharm Pharmaceut Sci

(www.cspsCanada.org) 9(1) : 101-112

7. Hiroshi Okamoto (2006) Osteopontin and Cardiovascular System

Molecular and Cellular Biochemistry, Epub ahead of print

8. Hiroshi Okamoto, Shinpei Nonen, Yasushi Fujio, Yasuhiko Takemoto, Minoru Yoshiyama, Tomoyuki

Hamaguchi, Yutaka Matsui, Junichi Yoshikawa, Akira Kitabatake, Junichi Azuma (2006) Adrenoceptor Alpha 1B and norepinephrine transporter

polymorphisms are associated with the beta-blocker response in patients with dilated cardiomyopathy.

Circulation 114 (18) : II-443

9. Fumio Terasaki, Hiroshi Okamoto, Michiaki Hiroe, Kyoko Imanaka-Yoshida, Katsuya Onishi, Akira Sato, Hiroaki

Shimomura, Bin Tsukada, Toshimichi Yoshida, Yasushi Kitaura, Akira Kitabatake, and Study Group for

Intractable Diseases by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. (2006) Higher serum tenascin-C

levels reflect the severity of heart failure,
left ventricular dysfunction and
remodeling in patients with dilated
cardiomyopathy
Circ J. 71(3) : 327-30

2. 学会発表

1. 2nd IACS(International Academy of
Cardiovascular Science) Sapporo, July 16,
2006

2. American heart association 80th.
scientific session, Chicago November 13,
2006

3. The 21st Scientific Meeting of the
International Society of Hypertension
(ISH2006) October 2006, Fukuoka

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願

特願 2005-185355

特願 2006-293062

国際出願 PCT/JP2006/312519

2. 実用新案登録

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術研究事業）
分担研究報告書

動物モデルの新機能の超音波学的および生物学的解析と
ヒト臨床データに基づく心不全関連遺伝子の抽出

分担研究者 葭山 稔 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨: 心不全に対する薬物治療に関する重要なパラダイムシフトのひとつは、かつて心不全に対し禁忌とされていたβ遮断薬が、心不全に対する第一選択薬となったことにある。大規模臨床試験の結果から、β遮断薬の心不全に対する有用性に疑いの余地はないが、その薬効の個体差に驚きを感じざるを得ない。β遮断薬の効果の確認に約6ヶ月の時間を要することを考慮すると、投与前に無効症例（ノンレスポnder）を予測するためのパラメーターを明らかにすることは、個々の患者に安全にまた効率的にβ遮断薬を導入する上で不可欠であろう。本研究は、このような薬効予測パラメーターとなりうる遺伝子情報を検索することを目的とする。平成18年度は、動物実験モデルから、心筋リモデリングに関与する遺伝子群を抽出し、それら遺伝子及びそれに関連した遺伝子の遺伝子多型と、β遮断薬に対する反応性を検討した。その結果、NFAT5 遺伝子の遺伝子多型が、β遮断薬に対する反応性と相関を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

心臓移植、両心ペーシングをはじめ、さまざまな侵襲的な治療が導入されるようになった今日においても、心不全治療の主流は薬物治療である。かつて強心剤を中心とした心不全治療は、心筋リモデリングのメカニズムが分子生物学的に明らかにされるに従って、神経体液性因子を標的とした治療に変貌しつつある。中でも、数十年前まで心不全に対して禁忌とされていたβ遮断薬が、心不全治療に導入されたことは、心不全に対する薬物治療の歴史の上で重大なパラダイムシフトと言えよう。

従来は、β遮断薬は、交感神経系の抑制の結果として陰性変力作用を示し、心筋収縮力を低下させるため、心筋収縮力が低下した心不全患者への投与は、患者の予後が悪化すると考えられてきた。しかしながら、近年の大規模臨床試験により、β遮断薬が心不全患者の生命予後を改善するのみならず、心筋の収縮力を投与後一過性に悪化させるものの、数ヶ月後に改善することが明らかになった。さらに、最近、β遮断薬が、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)と同程度の効果を示すことが報告され、ACEIと同様に心不全治療の第一選択薬となりつつある。

β遮断薬療法の問題点は、β遮断薬を投与された心不全患者の約30~40%に無効例

が存在することにある。一般に、β遮断薬の効果が確認されるのに6ヶ月の観察が必要とされている。また、通常、β遮断薬導入のプロトコールでは、少量から徐々に『心不全が悪化しない最大用量』まで増量して、各患者の最適用量を設定する。従って、無効例では、6ヶ月間、『心不全の悪化がおこるかもしれない、ぎりぎりの状態』にさらされることとなる。このことは、β遮断薬投与前に無効例を予測することが可能になれば、β遮断薬治療の安全性が増すことを意味する。

本研究は、β遮断薬の薬効を予測する遺伝子多型を検索し、その判定機器を作製することを研究全体の目的とする。この目的を達成するために、平成18年度、分担研究達成目標として、

- 1) 動物モデルに基いた解析遺伝子多型の選出
 - 2) β遮断薬治療への反応性の臨床評価と遺伝子多型との関連に関する解析
- を挙げた。

B. 研究方法

ラットを用いて慢性心筋梗塞モデルを作製し、アンジオテンシンII受容体ブロッカー(ARB)オルメサルタンもしくは、β遮断薬カルベジロールによる薬物介入を行なった。