



厚生労働省難治性克服研究事業  
特発性心筋症に関する調査研究  
＜友池班＞

2006年度報告書

## ■CONTENTS

### I. 総括研究報告

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

### II. 分担研究報告

[筒井 裕之]わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像 .....	3
[久保田 功]心筋細胞内脂質代謝とGq蛋白共役型受容体シグナルの制御 .....	6
[和泉 徹] エリスロポエチンによるラット実験的自己免疫性心筋炎における免疫調整作用に関する研究 .....	8
[小川 聡]心筋症の自己免疫機序：心抑制性抗体の意義 .....	10
[永井 良三]心筋炎・拡張型心筋症における血清中自己抗体によって惹起される心筋障害機序 .....	13
[藤原 久義]エリスロポエチン慢性期投与による心筋梗塞後心不全軽減の分子機構 .....	16
[堀 正二]心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明 .....	18
[松森 昭]わが国の特発性心筋症の予後と予後要因：全国疫学調査5年後の予後調査より .....	20
[中谷 武嗣]特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究 .....	22
[横山 光宏] 心筋梗塞後の左室リモデリングにおけるeNOS uncoupling由来の酸化ストレスの役割についての検討 .....	24
[松崎 益徳]拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討 .....	26
[今泉 勉]肥大心におけるLysyl oxidase familyの役割に関する検討 .....	28
[砂川 賢二] 迷走神経刺激によるリモデリング改善効果のメカニズムの解明：単回の迷走神経刺激により心筋活性酸素が減少する .....	30
[鄭 忠和]不整脈源性右室心筋症の分子遺伝学的研究 .....	33
[豊岡 照彦]ヒト拡張型心筋症のジストロフィン関連タンパク(DAP)の発現解析 .....	35
[川名 正敏]肥大型心筋症の突然死に関する研究 .....	37
[磯部 光章]心拒絶反応におけるPPAR $\gamma$ の役割と治療への応用 .....	39
[小室 一成]心筋虚血再灌流障害に対するG-CSFの心臓保護作用についての検討 .....	41
[廣江 道昭] 血清テネイシンCの臨床的意義について：拡張型心筋症患者における心不全増悪による入院との関連 .....	43
[木村 彰方]拘束型心筋症に見出されたミオパラジン変異の解析 .....	45
[岡野 光夫]細胞シート間の電気的相互作用の解析 .....	48
[福田 恵一]心筋細胞におけるGRおよびMRの役割 .....	50
[武田 信彬]ラミニン $\gamma$ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討 .....	54
[河合 祥雄]たこつぼ心筋症の病理学的研究 .....	56
[室原 豊明]特発性拡張型心筋症における収縮予備能破綻と治療戦略 .....	58
[今中 恭子]心筋線維化と心室リモデリングにおけるテネイシンCの役割と発現調節 .....	61
[北浦 泰]心臓サルコイドーシスにおける $^{18}\text{F}$ -FDG PETの有用性と問題点 .....	64
[斎藤 能彦]心不全における2次性アルドステロン症発症の新しい機序 .....	67
[島田 俊夫] 住民健康診断における新しいバイオマーカーによる心機能障害の早期発見に関する臨床研究 .....	70

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	74
Ⅳ. [資料]研究成果の刊行物・別冊	
Clinical characteristics and outcome of hospitalized patients with heart failure in Japan: Rationale and design of Japanese cardiac registry of heart failure in cardiology (JCARE-CARD) Circulation Journal 70:1617-1623, 2006 .....	100
Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase $\xi$ prevents Gq protein-coupled receptor agonist-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice Circulation 113:60-66, 2006 .....	107
$\beta$ 2-Adrenergic agonists suppress rat autoimmune myocarditis: Potential role of $\beta$ 2-adrenergic stimulants as new therapeutic agents for myocarditis Circulation 114:936-944, 2006 .....	114
Antigen-specific effects of autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase pump in immunized cardiomyopathic rabbits International Journal of Cardiology 112:15-20, 2006 .....	124
A case of neonatal lupus erythematosus presenting delayed dilated cardiomyopathy with circulating autoantibody to annexin A6 International Heart Journal, 2007 (in press) .....	130
Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in clonic heart failure Cardiovascular Research 71:684-694, 2006 .....	139
Impact of atherosclerosis-related gene polymorphisms on mortality and recurrent events after myocardial infarction Atherosclerosis 185:400-405, 2006 .....	150
Myocarditis and heart failure associated with hepatitis C virus infection Journal of Cardiac Failure 12(4):293-298, 2006 .....	156
心臓移植 総合臨牀 55 : 2053-2062, 2006 .....	162
Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice Journal of Clinical Investigation 110:331-340, 2002 .....	172
Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy Circulation Journal 68(7):677-682, 2004 .....	182
Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats Hypertension Research 29(12):1029-1045, 2006 .....	188
Significance of asymmetric basal posterior wall thinning in patients with cardiac Fabry's Disease American Journal of Cardiology 99:261-263, 2007 .....	205
Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor American Journal of Pathology 168:386-397, 2006 .....	208
Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy Journal of Cardiac Failure 12:527-532, 2006 .....	220
Pioglitazone prevents acute and chronic cardiac allograft rejection Circulation 113:2613-2622, 2006 .....	226
Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction Journal of Molecular Medicine 84:185-193, 2006 .....	237
Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction Journal of American College of Cardiology 47:2319-2325, 2006 .....	246

$\alpha$ B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy	
Biochemical and Biophysical Research Communication 342:379-386, 2006 .....	282
Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis	
Nature Medicine 12:1151-1159, 2006 .....	290
たこつぼ心筋症の成因と診断	
Cardiac Practice 17(1) : 59-64, 2006 .....	299
Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy; a pilot study	
Circulation 112:2940-2945, 2006 .....	306
Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II induced hypertensive mouse: Involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation	
J Cardiovasc Pharmacol, 2007 (in press) .....	313
Cardiac sarcoidosis underlies idiopathic dilated cardiomyopathy: Importance of mediastinal lymphadenopathy in differential diagnosis	
(投稿中) .....	322
Inhibitory effect of efonidipine on aldosterone synthesis and secretion in human adrenocarcinoma (H295R) cells	
Journal of Cardiovascular Pharmacology 47:133-138, 2006 .....	338

# I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業)

総括研究報告書

## 特発性心筋症に関する調査研究

総括研究者： 友池 仁暢(国立循環器病センター院長)

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

### ＜分担研究者＞

筒井裕之(北海道大学循環病態内科学教授)

久保田 功

(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野教授)

和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

永井良三

(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

藤原久義

(岐阜大学大学院医学研究科循環病態学教授)

堀 正二

(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学教授)

松森 昭

(京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授)

中谷武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)

横山光宏

(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学教授)

松崎益徳

(山口大学大学院医学研究科器官病態内科学教授)

今泉 勉(久留米大学医学部第三内科教授)

砂川賢二

(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)

鄭 忠和

(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

### A. 研究目的

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

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

### B. 研究方法

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

2) 前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査

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

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

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

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

#### (研究デザイン)

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

### C. 研究結果

1) 具体的方針として、従来からの病因・病態・診断・治療における我が国最先端の研究を継続するとともに、以下の4項目を研究の中心課題に据える。①特発性心筋症の／②横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)／③心筋再生医療の基礎的・臨床的検討④免疫学的解析、遺伝子他型解析による病因的解析を進め病態、重症度、治療効果の指標を探る。

2) 前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。

①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)

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

③新たな治療法開発(再生医療、遺伝子治療、外科的治療再生医療、遺伝子治療、外科的治療)上記目的を達成するため、本年度は下記の臨床研究を立案実施した。詳細な臨床指標、検査指標のうち、いかなるパラメータが、拡張型心筋症の予後規定因子になるのかを前向きに多施設で検討する。同時にその他の心筋症(肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群)についても同様に検討する。

さらに多施設共同の観察研究として「心筋症の予後を予知する因子の同定に関する研究」(CCMM研究)の研究計画を策定した。

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

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

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

上記の研究遂行に必要な手順を班会議で話し合い、登録の必要項目等について詳細を決定した。

### D. 考察

各心筋症の病態を基礎医学的及び臨床医学的に検討するとともに「心筋症の予後を予知する因子の同定に関する研究」(CCMM研究)の研究計画を策定し、国立循環器病センターをはじめとした各参加施設で倫理委員会に提出した。国立循環器病センターでは、倫理委員会の承認を得て実際に登録を開始した。

### E. 結論

特発性心筋症の病態・疫学について本研究班において多方面から検討を行った。

### F. 健康危機情報

なし。

### G. 研究発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## Ⅱ. 分担研究報告

### 厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業) 分担研究報告書

#### 特発性心筋症に関する調査研究

－わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像－

分担研究者： 筒井 裕之(北海道大学循環病態内科学教授)

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

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

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

##### (倫理面への配慮)

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

1)倫理委員会の審査：研究対象患者のプライバシー保護を確実にするために、倫理委員会において倫理面に対する配慮が十分に行なわれているか審査を受けたうえ承認を得て実施している。倫理委員会が設置されていない施設の参加を可能にするために、各々の地域の中核施設(大学病院など)の倫

理委員会に審査を依頼する。

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

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

#### C. 研究結果

全国の日本循環器学会研修施設から登録された慢性心不全2564例の患者基礎データベースを確立した。患者の男女比は6：4であった。平均年齢は71歳で、65歳以上の高齢者が70%を占めた。特に女性の高齢者の占める割合が高かった。心不全の原因となる主たる基礎心疾患は、虚血、弁膜症、高血圧、拡張型心筋症であった。左室駆出率40%以下の収縮不全が60%を占めるのに対し、50%以上と比較的保たれた患者も23%であった。このような患者は、近年拡張不全による心不全として注目されているが、収縮不全に比し、高齢者、女性、高血圧、心房細動をより多くみとめた。院内死亡率は、収縮不全3.9%、拡張不全6.8%であった。わが国の慢性心不全患者を、米国における同様の登録研究であるADHEREの登録患者と比較すると、臨床像には共通点が多いことが明らかと

なった。さらに、院内死亡(収縮不全)の規定因子を多変量解析により検討すると、貧血、心不全増悪による入院の既往、BNP高値が独立したリスクであった。特に、貧血は長期予後リスクとなることも知られており、慢性心不全治療における新たな治療ターゲットとなるかどうか今後さらなる研究が必要である。

慢性心不全患者の実態をさらに明らかにするために、地域住民の中で外来治療を受けている患者を対象とした調査も実施した。地域の循環器科病院と一般開業医で治療を受けている患者を登録し、追跡を行った。一般開業医に通院する慢性心不全患者は、さらに高齢であり、基礎疾患として虚血と高血圧がより多かった。特に高血圧性心疾患は、開業医に通院する慢性心不全患者の47%を占め、心不全の発症・進展を予防するためには、高血圧の治療・管理の重要性が示された。

#### D. 考察

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

#### E. 結論

全国多施設データベースを用いて、わが国における慢性心不全患者の臨床像を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Tsutsui H, Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, Goto D, Takeshita A, The JCARE-CARD Investigators: Clinical characteristics and outcome of hospitalized patients with heart failure in Japan: rationale and design of Japanese cardiac registry of heart failure in cardiology (JCARE-CARD). *Circ J* 70:1617-1623, 2006.
- Tsutsui H, Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, Goto D, Takeshita A, The JCARE-GENERAL Investigators: Characteristics and outcomes of

patients with heart failure in general practices and hospitals: Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in General Practice (JCARE-GENERAL). *Circ J*, 2007 (in press).

- 筒井裕之: 高齢者の拡張期心不全. 日本老年医学会雑誌 43: 169-171, 2006.
- 筒井裕之: 臨床疫学から見たわが国における慢性心不全の特徴. *Heart Failure Today* 55: 2-5, 2006.
- 筒井裕之: わが国における収縮不全・拡張不全の頻度・予後. *心臓* 38: 1001-1002, 2006.
- 筒井裕之, 眞茅みゆき: わが国における慢性心不全の特徴; 臨床疫学研究によるエビデンスから. *循環器専門医* 14: 290-297, 2006.
- 眞茅みゆき, 筒井裕之: わが国における収縮不全・拡張不全の実態と治療の現状. *医学と薬学* 55: 809-813, 2006.
- 眞茅みゆき, 筒井裕之: 慢性心不全治療における疾病管理. *循環器専門医* 14: 304-308, 2006.
- 眞茅みゆき, 筒井裕之: 拡張不全の頻度と予後. *循環器科* 60: 312-316, 2006.
- 網川真太郎, 筒井裕之: 拡張不全は予後不良か? (2)不良. *Cardiovascular Med-Surg* 8: 388-392, 2006.
- 網川真太郎, 筒井裕之: 高血圧性心疾患と心不全. *medicina* 44: 130-135, 2007.
- 筒井裕之: 慢性心不全の疫学と予後. 新目でみる循環器シリーズ9心不全; 診断・治療・管理(企画: 木全一心/編集: 堀 正二), p. 218-225, メジカルビュー社, 東京, 2006.
- 眞茅みゆき, 筒井裕之: 予防活動の評価法. 心不全を予防する 発症させない再発させないための診療ストラテジー(編著: 猪又孝元, 東條美奈子, 眞茅みゆき/監修: 和泉 徹, 筒井裕之), p. 214-219, 中山書店, 東京, 2006.
- 筒井裕之, 眞茅みゆき: 慢性心不全におけるチーム医療. 心不全を予防する 発症させない再発させないための診療ストラテジー(編著: 猪又孝元, 東條美奈子, 眞茅みゆき/監修: 和泉 徹, 筒井裕之), p. 352-358, 中山書店, 東京, 2006.
- 筒井裕之: 慢性心不全. 循環器疾患最新の治療2006-2007(編: 山口 徹, 堀 正二), p. 243-224, 南江堂, 東京, 2006.
- 筒井裕之: 慢性心不全. 今日の治療指針(2006年版)(編: 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢), p. 282-285, 医学書院, 東京, 2006.
- 網川真太郎, 筒井裕之: 心不全を伴う高血圧. THE ARB(編: 堀内正嗣), p. 334-340, メディカルレビュー社, 東京, 2006.

##### 2) 学会発表

- Tsutsui H, Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, Takeshita A, Investigators JCARE :



Nationwide registry of patients with chronic heart failure in Japan ; JCARE study. 第70回日本循環器学会学術集会(名古屋/2006年3月26日)

- Makaya M, Tsutsui H, Chishaki A, Takeshita A : Impact of socioenvironmental and emotional factor for readmission and quality of life in patients with heart failure. 第70回日本循環器学会学術集会(名古屋/2006年3月26日)
- 筒井裕之 : 全国患者数登録データから見たわが国における慢性心不全患者の臨床像. 第54回日本心臓病学会学術集会(教育講演)(鹿児島/2006年9月25日)
- Tsutsui H, Tsuchihashi M, Kinugawa S, Goto D, Takeshita A, JCARE Investigators : National registry of patients with chronic heart failure in Japan ; JCARE study. 第10回心不全学会学術集会(パネルディスカッション)(東京/2006年10月15日)
- Tsutsui H: Clinical characteristics and patterns

of  $\beta$ -blocker use in patients with heart failure in Japan; results from JCARE study. The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension)(Fukuoka, Japan/2006.10.16)

- 筒井裕之 : わが国における慢性心不全に対する薬物治療の現状と課題. 第27回日本臨床薬理学会年会(東京/2006年11月29日)

H. 知的財産権出願・登録状況  
なし。

#### <研究協力者>

JCARE研究班

眞茅みゆき

(国立国際医療センター研究所医療情報解析研究部ゲノム疫学研究室・室長)

絹川真太郎, 南部忠詞, 小浅真由美, 本間貴子, 會田晶子

(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)

## 特発性心筋症に関する調査研究

-心筋細胞内脂質代謝とGq蛋白共役型受容体シグナルの制御-

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

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほか肥大型心筋症・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

Gq蛋白共役型受容体シグナルの過剰な活性化が心肥大と心不全の発症に深く関与している。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、ジアシルグリセロール(DAG)をリン酸化(不活性化)してホスファチジン酸へ変換し、細胞内DAG量を調節することで、protein kinase C(PKC)活性を制御しうると考えられている。DGK $\zeta$ 遺伝子を心臓にのみ選択的に発現したトランスジェニックマウス(DGK $\zeta$ -TG)では、アンジオテンシンIIとフェニレフリンの持続投与によるDAGの細胞内蓄積、PKCの活性化、atrial natriuretic factor遺伝子の発現、心筋細胞肥大が抑制された。本研究では、DGK $\zeta$ がmechanical overloadによる心臓リモデリングを抑制するかを検討した。

## B. 研究方法

## 1) 圧負荷心肥大の作成

圧負荷に対する心臓リモデリングへのDGK $\zeta$ の影響を検討するために、DGK $\zeta$ トランスジェニックマウス(DGK $\zeta$ -TG)と野生型マウス(WT)に大動脈狭窄を作成した。マウスを人工呼吸管理下に開胸し、大動脈弓部(腕頭動脈と左総頸動脈の間)を糸でバンディングを行い、狭窄を作成した。手術1週後と4週後に心臓超音波検査を行い、左室壁厚、左室内径、左室壁運動を評価した。4週目の超音波検査後サクリファイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白とRNAを抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の発現を検討した。

## 2) 心筋梗塞の作成

次に、DGK $\zeta$ -TGマウスとWTマウスを用い、気管切開後に人工呼吸管理下で開胸し、冠動脈左前下行枝を剥離、7-0 prolineで結紮した。左前下行枝灌

流域の心筋が変色したことを梗塞作成の指標とした。手術1週後と4週後に心臓超音波検査を行い、超音波検査後サクリファイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白とRNAを抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の発現を検討した。

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

## C. 研究結果

大動脈狭窄作成術後4週には、WTマウスでは圧負荷により心重量、左室重量の増加が認められたが、DGK $\zeta$ -TGでは重量の増加は抑制された。WTマウスでは心エコー法で左室壁厚の増加、左室内腔の拡大、左室短縮率の低下が観察されたが、DGK $\zeta$ -TGマウスではこれらの変化は認められず、圧負荷によるリモデリングは抑制された。

DGK $\zeta$ -TGマウスではWTマウスと比較し梗塞1週後と4週後の左室拡張末期径は小さく、左心室重量、右心室重量、肺重量は低値で、梗塞後リモデリングは抑制された。また、DGK $\zeta$ -TGマウスでは左室短縮率は高値で、4週後の生存率も有意に高かった。WTマウスで認められた左室非梗塞部のPKC $\alpha$ 、PKC $\epsilon$ の活性化はDGK $\zeta$ -TGマウスでは抑制された。心筋梗塞後の左室線維化率はDGK $\zeta$ -TGマウスで低く、transforming growth factor- $\beta$ 1、collagen type-1、collagen type-3の発現は抑制されていた。

## D. 考察

DGK $\zeta$ は細胞内脂質代謝を制御することで、圧負荷

による心肥大や心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制した。また、DGK $\zeta$ は非梗塞部の線維化を抑制し、心機能を改善し、心筋梗塞後の生存率を改善した。DAG-DGK系は、各種のGq蛋白共役型受容体に共通するシグナル分子なので、DGKにより脂質代謝を制御することは、個々の受容体レベルでブロックするよりも、より効果的に心臓リモデリングを抑制できる可能性がある。

#### E. 結論

DGK $\zeta$ はGq蛋白共役型受容体シグナルと細胞内脂質代謝の調節因子として機能し、mechanical overloadによる左室リモデリングを抑制した。DGK $\zeta$ は心肥大・心不全治療の標的分子となる可能性が示唆された。

#### F. 研究危険情況

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Arimoto T, Takeishi Y, Takahashi H, Shishido T, Tsunoda Y, Niizeki T, Koyama Y, Shiga R, Nakajima O, Nishimaru K, Endoh M, Walsh RA, Goto K, Kubota I: Cardiac-specific overexpression of diacylglycerol kinase  $\zeta$  prevents Gq protein coupled receptor agonists-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*

113:60-66, 2006.

- Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Koyama Y, Walsh RA, Goto K, Kubota I: Diacylglycerol kinase  $\zeta$  attenuates left ventricular remodeling and improves survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, in press.

##### 2) 学会発表

- Niizeki T, Harada M, Koyama Y, Kitahara T, Arimoto T, Takeishi Y: Diacylglycerol kinase- $\zeta$  prevents cardiac hypertrophy induced by continuous administration of phenylephrine: A new specific regulator of Gq $\alpha$  signaling cascade. American Heart Association Scientific Sessions 2006 (Chicago, USA/November, 2006)
- Harada M, Arimoto T, Takeishi Y: DGK $\zeta$  prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy and progression to heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2006 (Chicago, USA/November, 2006)

#### H. 知的財産権の出願・登録情況

なし。

#### <研究協力者>

竹石恭知

(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野)

## 特発性心筋症に関する調査研究

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

分担研究者： 和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

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

## A. 研究目的

造血系サイトカインであるエリスロポエチン(EPO)は近年様々な多面的作用が報告され、心筋においても虚血性傷害からの保護効果が注目されている。

これまで我々はラット自己免疫性心筋炎(EAM)モデルにおいて、EPOを全経過中投与すると、心筋炎の発症が有意に抑制される結果を報告してきた。しかしEAMモデルに対する作用時期や機序は明らかにされておらず、我々はその解明にあってきた。

## B. 研究方法

1) *in vivo* 実験

## 1-1. EAMモデルの作成

ブタ心筋ミオシン 250 $\mu$ g/完全Freundアジュバント 625 $\mu$ g H73RA混和液0.25mlをルイスラット(5週令、雌)の両側足底に皮下投与し、ミオシン免疫EAM(Active EAM: aEAM)を作成した。また、CM2(心筋ミオシンaa.1539-1555)を用いて作成した既樹立の心筋炎惹起性特異的T細胞株(CM2-T)  $1 \times 10^7$ の静脈内投与にてtransfer EAM: tEAMを作成した。本モデルはaEAMの効果期のみを反映するモデルである。

## 1-2. EPO投与

EPO(3,000 U/kg)、または同量のPBSをプロトコルに従って、連日皮下投与を行った。

## 1-3. 心筋炎の評価

aEAMはday21、tEAMはday9に屠殺し、以下の項目で心筋炎の重症度の評価を行なった。①ラット心体重比②肉眼的心筋炎スコア③心筋病理組織での顕微鏡的心筋炎スコア

## 1-4. 心筋におけるサイトカイン、ケモカイン mRNAの定量

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

## 1-5. 薬剤投与プロトコル

(1) aEAM導入期に限局させた検討: aEAMモデルにおいて、導入期(day0~8)のみEPOを投与(day-10~-1はPBS)する群(n=6)、10日間の前投与+導入期(day-10~8)にEPOを投与する群(n=6)、PBS投与群(day-10~8)(n=6)にて検討を行った。

(2) tEAMを用いた効果期へ限局させた検討: tEAMモデルにおいてday0~8までEPOを投与(day-10~-1はPBS)する群(n=6)、10日間の前投与期間を設け、day-10~8までEPOを投与する群(n=6)、PBS投与群(day-10~8)(n=6)にて検討を行った。

2) *in vitro* 実験

2-1. EPO存在下でのCM2-Tを用いた細胞増殖試験  
CM2-T( $5 \times 10^5$ /ml)、照射下胸腺細胞( $1 \times 10^7$ /ml)、CM2(100 $\mu$ g/ml)をEPO(0.001-100U/mL:log dilution)または同量の生理食塩水を添加し、48時間後に $^3$ H-サイミジン取り込みを測定し、細胞増殖能の評価を行った。

## 2-2. EPO投与下のラットリンパ節細胞を用いた細胞増殖試験

10日間の前投与+導入期(day-10~8)にEPOまたはPBS投与を行ったCM2作成EAMモデルより、day9に腋窩リンパ節を摘出。ホモジナイズ後ISCR3(抗MHC class II抗体)1ml/ $10^7$  cellsと補体(3週齢ウサギ血清)0.1 ml/ $10^7$  cellsを添加し、MHC class II陽性細胞を除去。得られたリンパ節細胞( $5 \times 10^5$ /ml)、照射下胸腺細胞( $1 \times 10^7$ /ml)、CM2(5mg/ml)の混合培養を行い、48時間後に $^3$ H-サイミジン取り込み

を測定し、細胞増殖能の評価を行った。

## C. 研究結果

### 1) *in vivo*実験

EPOを導入期のみ投与した群はPBS群に対し、肉眼的心筋炎スコアで軽度の改善をみせたのみであったが(2.9±0.7 vs. 3.9±0.4,  $p<0.05$ )、10日間の前投与期間を設けた群ではPBS群に対し有意に肉眼的心筋炎スコア(2.2±0.5 vs. 3.9±0.4;  $p<0.01$ )、顕微鏡的心筋炎スコア(2.2±0.7 vs. 3.4±0.5;  $p<0.01$ )、心・体重比(4.7±0.7 vs. 6.8±0.6 mg/g;  $p<0.01$ )が低値でありIFN- $\gamma$ (3.0±4.2 vs. 6.2±3.0 copy ratio to GAPDH,  $p<0.01$ )とIL-10: 5.0±2.1 vs. 10.1±3.1 copy ratio to GAPDH,  $p<0.01$ )の発現を有意に抑制していた。

効果期におけるEPO投与では、PBS群に比べて、心筋炎は軽減されておらず、10日間の前投与群においてもPBS群に比べて、肉眼的、顕微鏡的心筋炎スコア、サイトカイン、ケモカインの発現ともに抑制効果は認められなかった。

### 2) *in vitro*実験

①各濃度のEPOはCM2-Tの増殖を抑制しなかった。

②EPO投与群におけるリンパ節細胞の増殖はPBS投与群に比べ抑制されなかった。

## D. 考察

EPOの心筋保護効果として、心筋細胞のアポトーシスの抑制効果が既に知られている。EPOはラットの心筋梗塞モデルや虚血再灌流モデルにおいてPI-3K/Akt経路の活性化を通じてアポトーシスを抑制し、有意に心機能を保持することが報告された。またEAMにおいても、局所的に心筋虚血が存在し、心筋細胞傷害のメカニズムの一つとしてアポトーシスが関与することが知られている。従って虚血によるアポトーシスの抑制効果がEPOのEAMを抑制する一機序である可能性は高い。ただしこの効果は虚血発症の1時間後にEPOを投与した場合においても有効であったとされている。一方、本実験においては、効果期のみを反映するtEAMモデルやaEAMにおける効果期のみ投与(データ非掲載)ではEPOの効果は認められなかった。すなわち心筋炎の発症後にEPOの投与を行っても効果は認められない。さらに導入期のみ投与に加え、その前10日間の投与を加えることで、有意な心筋炎抑制効果を呈した結果は、EPOの効果は心筋細胞のアポトーシス抑制効果のみでは説明できないことを示している。

以上の経過から、導入期にEPOの作用点が存在すると仮定し、*in vitro*実験を施行した。まずEPO

の存在下でCM2-T細胞の増殖試験を試みたが、抑制効果はみられなかった。EPOの免疫担当細胞への作用報告を紐解くと、末梢血のリンパ球やマクロファージにEPOが直接作用をもつ報告はないが、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞がEPOの受容体を有し、高濃度のEPOが*in vitro*において、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞のコロニー形成と分化を抑制したとする報告が存在する。従ってEPOは長期の骨髄への作用を通じて、免疫担当細胞へ影響を持つ可能性があるため、EPOまたはPBSの長期投与を受けたラットでEAMを作成し、導入期のリンパ節細胞をT細胞原として用いて、再刺激試験を行った。しかしこの実験系においても有意な差は認められなかった。以上の結果から、EPOのEAM導入期への作用を解明するには至らなかった。ただし、*in vivo*実験における導入期+前投与での有効性や、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞へのEPOの抑制的な作用報告は、心筋炎惹起性T細胞の分化・増殖までのいずれかの段階にEPOが作用点を有する可能性を示している。

## E. 結論

エリスロポエチンは、炎症性サイトカイン、ケモカインの減少とともにラット自己免疫性心筋炎の抑制効果を有する。その主な作用は主に導入期における抗原感作の段階にあると推察される。

## 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

- ・Shinagawa H, Inomata T, Osaka O, Koitabashi T, Nakano H, Takeuchi I, Nishii M, Takehana H, Izumi T: Erythropoietin ameliorates the experimental autoimmune myocarditis of rats through the immunomodulatory effects on the induction phase. 第10回日本心不全学会学術集会(東京/2006年10月13-15日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## <研究協力者>

品川弥人, 猪又孝元, 中野浩成, 大坂 勤, 竹内一郎, 小坂橋俊美, 西井基継, 竹端 均  
(北里大学医学部循環器内科学)

## 特発性心筋症に関する調査研究

—心筋症の自己免疫機序：心抑制性抗体の意義—

分担研究者： 小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・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(DCM)の成因としてウイルス感染、遺伝子異常と共に自己免疫機序が挙げられる。自己免疫機序の傍証の一つとして、様々な抗心筋自己抗体が患者血清中から検出される。われわれは蛍光免疫染色法、イムノプロット法、ELISA法を駆使することにより85%の患者に何らかの抗心筋自己抗体が検出されることを明らかにした。今までの検討結果から、 $\beta 1$ アドレナリン受容体、ムスカリンM2受容体、トロポニンI、細胞膜Na-K-ATPaseなどに対する抗体がDCMの病態を修飾していることがわかった。このような抗心筋自己抗体を除去すべく、免疫吸着療法がドイツを中心に試みられている。その効果を予測する上ではin vitroで成熟ラット心筋細胞の収縮を障害する“心抑制性抗体”の検出が有用であると報告されている。本治療法をわが国で開発する上で、“心抑制性抗体”の検出システムを確立することが重要と考える。本研究は、ニワトリ有性卵を用いた心抑制性抗体のスクリーニング系を確立し、心抑制性抗体の吸着・除去が心機能に及ぼす影響を検証することを目的とする。

## B. 研究方法

16日齢ニワトリ有性卵の気室に患者血清から精製したIgG 1mgを投与し、20分後に割殻し、心エコーにより左室駆出率を計測した。生理食塩水を添加した後に同様に計測した10例の左室駆出率から平均値 $\pm 2SD$ を計算し、IgG添加後の左室駆出率が平均値 $-2SD$ 未満の場合に心抑制性抗体陽性と判定した。対照として、DCM以外の原因による心不全例10例から抽出したIgG分画を用いて同様な検討を行った。心抑制性抗体陽性例と陰性例で患者背景の比較を行った。心抑制性抗体の存在と従来法に

よる自己抗体との関連を検討する目的で、各々の抗体陽性例と陰性例において心抑制性抗体がどのくらい検出されるかを検討した。有意差を認めたものについては、さらに多変量解析を行った。

免疫吸着カラムによる心抑制性抗体の除去が心機能に及ぼす影響を検証する目的で、心抑制性抗体陽性DCM 42例(全て $\beta 1$ 受容体抗体あるいはムスカリンM2受容体抗体陽性、4例においては重複)、非DCM心不全例12例の血清(自己抗体全て陰性)をトリプトファン・カラムでろ過し、処理前後の血清添加下においてニワトリ有性卵の左室駆出率を計測した。

## C. 研究結果

104例のDCMのうち本スクリーニング法によって心抑制性抗体陽性と判定されたのは65例(63%)であった。残る39例(37%)では心抑制性抗体陰性であった。非DCM心不全例全てが心抑制性抗体陰性であった。心抑制性抗体陽性DCM例と陰性DCM例の間に、年齢、性別、NYHA心機能分類、左室駆出率、左室拡張末期径、左房径、心房細動・心室頻拍の合併頻度、血漿ノルエピネフリン濃度、心房ナトリウム利尿ペプチド濃度に差はなかった。心抑制性抗体陽性頻度は間接蛍光抗体法により検出された抗体陽性例と陰性例で差はなかった(64.1% vs. 61.5%)。イムノプロット法陽性例では陰性例に比べて心抑制性抗体を高頻度に認めた(81.6% vs. 51.5%,  $p < 0.05$ )。ELISA法により検出された抗体については、抗 $\beta 1$ 抗体の有無(80.0% vs. 51.6%,  $p < 0.05$ )、抗ムスカリンM2抗体の有無(83.3% vs. 48.4%,  $p < 0.05$ )、および抗Na-K-ATPase抗体(84.6% vs. 55.1%,  $p < 0.05$ )の有無について有意差を認めた。トロポニンI抗体の有無については差はなかった(56.3% vs. 63.6%)。多変量解析によって、抗 $\beta 1$ 抗体と抗ムスカリンM2抗体陽性が心抑制性抗体存在の

予測因子となった。

心抑制性抗体陽性DCM例から採取した血清を添加した際のニワトリ有性卵の左室駆出率は、カラム処理前では65.5%±7.8%であったが、カラム処理後においては86.3%±3.4%であった(p<0.01)。β1抗体陽性例においてはカラム処理前が65.6%±8.4%に対して、カラム処理後が86.2%±3.5%であった(p<0.01)。ムスカリンM2抗体陽性例では各々65.7%±7.8%と86.0%±3.1%であった(p<0.01)。両者重複例においても同様な差が見られた。これに対して、自己抗体のない非DCM心不全例の血清を用いた検討では、カラム処理前後で左室駆出率に変化はなかった。

#### D. 考察

ニワトリ有性卵を用いた心抑制性抗体の検出はラット心筋細胞を用いた細胞収縮とカルシウム・トランジェントの観察よりも実用性が高く、本方法を用いてより効率的に免疫吸着療法の適応例を検出することが可能である。心抑制性抗体の本体は未だ不明であるが、IgG分画に含まれており、サイトカインや神経体液性因子の混入はない。実際非DCM心不全患者のIgG分画にはこのような心抑制性因子は検出されなかった。したがって、本法によって検出されたこのような因子は心機能低下を惹起する何らかの抗心筋自己抗体であると考えられた。

従来法により同定された抗心筋自己抗体との関連では、β1アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体抗体が心抑制性抗体存在の予測因子となった。ムスカリンM2受容体抗体が徐拍化作用と心収縮抑制作用を有するのは理解しやすいが、β1アドレナリン受容体抗体にそのような作用があるのかについては不明である。本自己抗体は内因性交感神経活性が低いときにはアゴニスト様作用を有するとされる。しかし、心不全患者などのように交感神経活性が高いときにはアンタゴニストとして作用するとも言われる。βアドレナリン受容体作動薬は受容体の発現量に大きく依存する。健康心のように受容体数が多いときには陰性変力作用のない作動薬でも、不全心のように受容体数が低下しているときにはインパース・アゴニストとして作用することも指摘されている。実際に心移植の適応となるような重症心不全患者においてβ1アドレナリン受容体抗体の臨床的意義を検討すると、その存在は心機能低下と関連した。このようなことからβ1受容体抗体も重症心不全患者においては心機能低下に寄与する可能性も考えられる。本研究でも、ムスカリンM2抗体除去のみならず、β1アドレナリン受容体抗体除去によってもニワトリ有性卵の左室駆出率は改善した。

#### E. 結論

ニワトリ有性卵を用いたスクリーニング系で

DCM患者血清中の心抑制性抗体の検出を試みた。104例中65例(63%)に心抑制性抗体が検出された。従来から汎用されている方法によって検出された様々な抗心筋自己抗体との関連を検討した結果、β1アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体抗体が心抑制性抗体存在の予測因子となった。心抑制性抗体陰性患者の血清をトリプトファン・カラム処理してもニワトリ有性卵の左室駆出率に及ぼす影響に変化はなかったが、心抑制性抗体陽性患者の場合は同様なカラム処理によってニワトリ有性卵の左室駆出率は改善した。本スクリーニング系はDCM患者に対する免疫吸着療法を導入する際に有用な手がかりを供与することが予測される。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

- Baba A, Yoshikawa T, Iwata M, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Ogawa S, Fu M: Antigen-specific effects of autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase pump in immunized cardiomyopathic rabbits. *Int J Cardiol* 112:15-20, 2006.
- Mahara K, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Okabe T, Asakura Y, Satoh T, Mitamura H, Suzuki M, Murayama A, Ogawa S: Aging adversely affects postinfarction inflammatory response and early left ventricular remodeling after reperfused acute anterior myocardial infarction. *Cardiology* 105:67-74, 2006.
- Kohno T, Anzai T, Ohno Y, Kaneko H, Li HC, Sugano Y, Maekawa Y, Iwanaga S, Asakura Y, Yoshikawa T, Ogawa S: Impact of serum C-reactive protein elevation on the left ventricular spherical change and the development of mitral regurgitation after anterior myocardial infarction. *Cardiology*, in press.
- Naito K, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Sugano Y, Kohno T, Mahara K, Okabe T, Asakura Y, Ogawa S: Increased body temperature following reperfused acute myocardial infarction is associated with adverse left ventricular remodeling. *J Card Fail*, in press.

##### 2) 学会発表

- 馬場彰泰, 吉川 勉, 長友祐司, 栗田康生, 内藤広太郎, 吉澤彰宏, 家田真樹, 安斎俊久, 島田 恵, 松原 隆, 赤石 誠, 朝倉 靖, 岩永史郎, 熊谷裕生, 小川 聡: 液性免疫異常からみた心筋症の診断と治療, 第54回日本心臓病学会シンポジウム「心筋症の診断と治療 up to date」(鹿児島/2006年9月)
- 馬場彰泰, 吉川 勉, 島田 恵, 高橋路子, 赤

石 誠, 小川 聡: 抗心筋自己抗体は拡張型心筋症患者の予後規定因子となるか?, 第54回日本心臓病学会(鹿児島/2006年9月)

- Nagatomo Y, Yoshikawa T, Kohno T, Yoshizawa A, Baba A, Anzai T, Meguro T, Sato T, Ogawa S: Presence of autoantibody against  $\beta$ 1-adrenergic receptors is associated with amelioration of cardiac function during  $\beta$ -blocker therapy for congestive heart failure. 第12回日本心不全学会(東京/2006年10月)
- Kohno T, Anzai T, Yoshikawa T, Takahashi T, Ogawa S: Blockade of angiotensin receptor reduces myocardial MCP-1 expression and macrophage infiltration in post-infarction ventricular remodeling. 第12回日本心不全学会(東京/2006年10月)
- Nagatomo Y, Yoshikawa T, Kohno T, Yoshizawa A, Baba A, Anzai T, Meguro T, Sato T, Ogawa S: Presence of autoantibody directed against  $\beta$ -adrenergic receptors is associated with amelioration of cardiac function during  $\beta$ -blocker therapy for congestive heart failure. American Heart Association Meeting 2006
- Nagatomo Y, Meguro T, Saito H, Katada J, Anzai

T, Ogawa S, Yoshikawa T: Genetic ablation of angiotensin II type 1 $\alpha$  receptor ameliorates cardiac diastolic function induced by diabetes mellitus through the improvement of calcium handling. American Heart Association Meeting 2006

- Meguro T, Yoshikawa T, Katada J, Saito H, Anzai T, Nagatomo Y, Ogawa S: Mineralocorticoid receptor blockade arrests pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and preserves cardiac function in angiotensin II type 1 $\alpha$  receptor knockout mice. American Heart Association Meeting 2006
- Naito K, Anzai T, Maekawa Y, Sugano Y, Kohno T, Yoshikawa T, Ogawa S: Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling and myocardial infarction. American Heart Association Meeting 2006

H. 知的財産権出願・登録状況  
なし。

<研究協力者>

吉川 勉, 馬場彰泰



## 特発性心筋症に関する調査研究

一心筋炎・拡張型心筋症における血清中自己抗体によって惹起される心筋障害機序—  
分担研究者： 永井 良三(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

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

### A . 研究目的

拡張型心筋症は難治性で心臓移植の最大の適応疾患であり、その発症を予防したり内科的に治療することは社会的に大きな課題となっている。PD-1/PD-1 ligandsを介する経路はT細胞の活性化に抑制的に作用することが知られている。我々はこれまでに、マウスのウイルス性心筋炎において抗PD-1抗体のin vivo投与によりPD-1/PD-1 ligands pathwayを(阻害または刺激)すると心筋障害が(増強または抑制)されることを報告した。さらに、同様のnegative costimulatory signalであるCTLA-4/B7 pathwayとPD-1/PD-1 ligands pathwayを同時に阻害することによってマウスの急性ウイルス性心筋炎が遷延化して慢性心筋炎へと移行すること、を報告した。今回、①その機序として、慢性心筋炎のマウスの血清中に何らかの心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が存在するか否かを検討する。また、②拡張型心筋症患者の血清中に心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が存在するか否かを検討するとともに、③それらの自己抗体が認識する心筋細胞膜抗原を同定すること、を目的とした。さらに、④それらの自己抗体をin vitroで筋肉細胞に作用させることにより細胞機能に対する障害が誘導されるか否かについても解析した。

### B . 研究方法

#### 1)マウスの慢性心筋炎における検討

C3H/Heマウスに抗PD-1/CTLA-4抗体をin vivo投与するとともにCoxsackievirus B3(CVB3)を接種し8週後に屠殺、HE染色にて心筋障害を評価するとともに、血清を用いて正常のマウスの心筋組織を蛍光抗体染色で解析した。

#### 2)拡張型心筋症患者血清を用いた検討

自己免疫的な心筋障害機序が示唆される拡張型

心筋症患者4例(#1. neonatal lupus erythematosus, #2. peripartum cardiomyopathy, #3. polymyositis, primary biliary cirrhosis, #4. peripartum cardiomyopathy)と性と年齢を一致させた健常コントロール4例を対象とした。ラットの培養心筋細胞を凍結融解して超遠心することによって細胞膜、細胞質、核の各成分を分離抽出した。心筋細胞膜成分を1次元および2次元電気泳動により展開しメンブレンに転写した後、患者および健常コントロールより採取した血清とincubateすることによりWestern blotを行なった。健常コントロールに認められず拡張型心筋症患者に特異的に認められるspotを質量分析計にて解析することにより、患者血清中の自己抗体が認識する抗原を同定した。

#### 3)ウズラの筋肉細胞に対する抗Annexin A6抗体／拡張型心筋症患者血清の作用の解析

ウズラの筋肉細胞(ATCC, CRL-1962)にAdrenaline(5 μM)を負荷することにより細胞内Ca濃度の変化をFlexStation system(Molecular Devices社)で解析した。この時、細胞を予め抗Annexin A6抗体または拡張型心筋症患者血清(コントロールとしてgoat IgGまたはhuman IgG)と1時間preincubationすることによる細胞内Ca濃度の変化に対する効果を解析した。

#### (倫理面への配慮)

実験動物は麻酔下に屠殺しており、動物愛護上特に倫理面の問題はないと判断した。患者血清を用いた研究は東京大学医学部の倫理委員会の承認のもと、文書による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)CVB3によるマウスの急性心筋炎に抗PD-1/CTLA-4抗体をin vivo投与することにより炎症は遷

延し、Rat IgGを投与したコントロール群では炎症がほぼ癒痕化する8週後においても有意の炎症が持続していた(慢性心筋炎化した)。また、正常のマウス心筋組織はコントロール群のマウス血清を用いた免疫組織染色によってほとんど反応を認めなかったのに対し、抗PD-1/CTLA-4抗体投与群のマウス血清により心筋細胞膜上に明らかな反応を認めた。

2)ラット培養心筋細胞より抽出した細胞膜・核・細胞質画分を1次元電気泳動し拡張型心筋症患者の血清を用いてWestern blotを行ったところ、拡張型心筋症患者の血清中に心筋細胞膜由来の抗原と反応する自己抗体が存在することが示された。また、ラット培養心筋細胞膜画分の2次元電気泳動と拡張型心筋症患者血清を用いたWestern blotの結果より、コントロールの健常者血清とは反応を認めず4例の拡張型心筋症患者に共通して反応するスポットが認められた。このスポットを質量分析計にて解析したところAnnexin A6であることが判明した。さらに、健常コントロールや拡張型心筋症患者心筋組織を用いた免疫組織染色により、心筋細胞膜上にAnnexin A6が構成的に発現していることが確認された。

3)Adrenaline(5  $\mu$ M)をウズラの筋肉細胞に負荷すると、細胞内Ca濃度は10秒以内をピークとして著明に上昇した。この時、細胞を予め抗Annexin A6抗体とpreincubation(1時間)した群ではRabbit IgGとpreincubationしたコントロール群に比べて、細胞内Ca濃度のピーク値が5~10%有意に抑制された。同様に、拡張型心筋症患者血清とpreincubationした群ではhuman IgGとpreincubationしたコントロール群と比べ細胞内Ca濃度のピーク値が低下する傾向が見られた。

#### D . 考察

今回、急性ウイルス性心筋炎のモデルマウスにおいてnegative costimulatory signalを阻害することにより慢性心筋炎を惹起できること、その時、何らかの心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が誘導されることが明らかになったことから、遷延する心筋障害に自己抗体を介する機序が関与する可能性が示唆された。また、自己免疫的な心筋障害機序が示唆される4例の拡張型心筋症患者血清中に、心筋細胞膜上に発現するAnnexin A6に対する自己抗体が共通して認められることをはじめ明らかにした。Annexin familyはメンバー毎に異なるN末領域と保存された繰り返し配列から成るC末領域を有するCa結合蛋白で、CaイオンがC末領域に結合すると立体構造が変化することにより重合して細胞膜へと挿入され、そこで細胞内へのCaイオンの流入を調節すると考えられている。今回、ウズラの筋肉細胞を用いた実験でAdrenaline負荷による細胞内Ca濃度の上昇に対して抗Annexin A6抗体が抑制的に作用していたことから、拡張型心筋症

の患者血清中に存在する抗Annexin A6抗体が心筋細胞へのCaイオンの流入を抑制することにより心機能を障害している可能性が示唆された。このことは、Adrenaline負荷によるウズラの筋肉細胞内Ca濃度の上昇に対して拡張型心筋症の患者血清も同様に抑制的に作用していたことによっても支持された。Annexin A6の心筋transgenicマウスの心筋細胞は脱分極による細胞内Ca濃度の上昇が抑制され収縮・弛緩が障害されており、やがて拡張型心筋症様の病態を呈することが報告されており、本研究の仮説を強く裏付けるものと考えられた。以上より、血清中にAnnexin A6に対する自己抗体の存在が確認されるような少なくとも一部の拡張型心筋症においては、その作用を阻害するような治療法が有効である可能性が示された。

#### E . 結論

拡張型心筋症において、心筋細胞膜上に発現するAnnexin A6に対する血清中の自己抗体がAnnexin A6と結合し心筋細胞内へのCaイオンの流入を抑制することにより、収縮に抑制的に作用していることが強く示唆された。このことが少なくとも一部の拡張型心筋症の心筋障害に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

#### F . 健康危険情報

なし。

#### G . 研究発表

##### 1)論文発表

•Seko Y, Matsumoto A, Fukuda T, Imai Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Hirata Y, Nagai R: A case of neonatal lupus erythematosus presenting delayed dilated cardiomyopathy with circulating autoantibody to annexin A6. Int Heart J, 2007 (in press).

##### 2)学会発表

•Seko Y, Yagita H, Okumura K, Nagai R : Development of murine chronic active myocarditis through modulation of negative costimulatory pathways. 第69回日本循環器学会(横浜/2005年3月19日)

•Seko Y, Fujimura T, Taka H, Yagita H, Okumura K, Nagai R : Autoantibody-mediated impairment of calcium handling induces cardiac myocyte injury in patients with dilated cardiomyopathy. 第70回日本循環器学会(Myocarditis, basic/clinical-1)(名古屋/2006年3月26日)

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

##### 1)特許取得

•瀬戸久美子, 新谷隆彦, 光山 訓, 渡部生聖, 今井 靖, 林 同文, 門前幸志郎, 山崎 力,

山崎 憲, 永井良三: 症例検索システム(特願2004-115828)(出願日: 2004年4月9日/出願人: 東京大学, 日立製作所)

・光山 訓, 瀬戸久美子, 新谷隆彦, 渡部生聖, 今井 靖, 林 同文, 門前幸志郎, 山崎 力, 永井良三, 山崎 憲: 健康状態の表示方法(特願2004-112841)(出願日: 2004年4月7日/出願人: 東京大学, 日立製作所)

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

・石原 淳, 鳥取恒彰, 永井良三, 眞鍋一郎: KLF 5 遺伝子の発現を抑制するRNA(特願2003-202863)(出

願日: 2003年7月29日/出願人: 永井良三, 眞鍋一郎, 協和発酵工業株式会社)

2) 実用新案登録

なし。

3) その他

なし。

#### <研究協力者>

世古義規(東京大学大学院医学系研究科循環器内科)

藤村 務, 高 ひかり, 峯木礼子, 村山季美枝

(順天堂大学生体分子)

八木田秀雄, 奥村 康

(順天堂大学医学部免疫)

## 特発性心筋症に関する調査研究

- エリスロポエチン慢性期投与による心筋梗塞後心不全軽減の分子機構 -

分担研究者： 藤原 久義(岐阜大学大学院医学研究科循環病態学教授)

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

## A. 研究目的

心筋梗塞急性期のエリスロポエチン投与は梗塞後心不全を軽減することが知られているが、最近、心筋梗塞慢性期に投与を開始した場合でもそれ以後の心機能が改善することが報告された。本研究ではエリスロポエチンの慢性期投与における有効性の分子機構について検討した。

## B. 研究方法

10週齢C57BL/6雄マウスにて左冠動脈結紮により大型心筋梗塞を作製し、6週間後からエリスロポエチン 1,500 U/kg、1週間に2回皮下注射を開始し、4週間後に評価した。屠殺直前に心エコー並びに心臓カテーテル検査にて心機能を評価した。心臓にて病理組織学的検討、ELISA、Western blottingに用いられた。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

エリスロポエチン投与群ではコントロール(生食)群に比し心拡大の軽減と心機能の改善がみられ、かつ非梗塞部心筋組織における炎症細胞浸潤と線維化の減少、血管密度の増加がみとめられた。心筋組織内インターロイキン-1 $\beta$ 、同-6、tumor necrosis factor- $\alpha$ 、transforming growth factor- $\beta$ 1は梗塞心において上昇していたが、これらはエリスロポエチン投与によりほぼ正常レベルまで低下した。同様に残存心筋細胞の酸化傷害もエリスロポエチン投与により軽減がみられた。エリスロポエチン受容体は梗塞心において過剰発現していたがエリスロポエチン投与群ではさらにその発現は増大しており、かつその下流シグナルであるStat3、

Stat5ならびにAktの活性上昇がみられた。培養線維芽細胞と心筋細胞を用いた *in vitro* における検討で、エリスロポエチンの抗炎症作用と抗酸化作用にはそれぞれStatならびにAkt活性が関与することが示唆された。

## D. 考察

EPOは心筋梗塞発症から6週間後という慢性期から投与開始してもその後の心機能を改善することが確認され、梗塞後心不全の慢性期における予防あるいは治療法となることが示唆された。

EPOの梗塞後心不全に対する有効性の作用機序として以前従来血管新生作用とミオシン重鎖のフェノタイプ移行が見出されたが、今回我々はEPOの梗塞後不全心に対する抗炎症作用と抗酸化作用を見出した。

## E. 結論

大型心筋梗塞に伴う心不全に対するエリスロポエチンの慢性期投与の有効性には、Stat活性を介する炎症ならびにサイトカイン産生の軽減とAkt活性を介する酸化ストレスの軽減が関与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

・ Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*