

113(4):535-543, 2006.

- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. Cardiovasc Res 71(4):

684-694, 2006.

- 2)学会発表
なし。

H. 知的財産権出願・登録状況
なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明—

分担研究者： 堀 正二(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学教授)

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

A. 研究目的

心臓に圧負荷や容量負荷をはじめとする力学的負荷がかかると心臓は肥大という形態をとることでその増大した負荷に適応する。しかしその負荷が過大あるいは長時間持続するとその適応が破綻し心拡大、収縮力低下をきたし心不全が発症する。心不全の本態はストレスにより心筋細胞死が生じることである。われわれは心筋細胞死制御による心不全治療の開発を目指し、細胞死の分子機構ならびに細胞死を惹起する細胞内情報伝達機構を検討している。心筋細胞死の形態にはアポトーシス、ネクローシスの2種が存在することが知られている。近年、第3の細胞死としてオートファジーによる細胞死が提唱されている。実際、不全心ではオートファジーが亢進していることが報告されている。しかしながらオートファジーが細胞保護に働いているのか細胞死に働いているのか明らかではない。本研究ではオートファジーの心臓における役割を検討することを目的にした。

B. 研究方法

オートファジー形成に必須分子であるAtg5のfloxマウスにタモキシフェン誘導性心筋特異的Cre recombinase発現トランスジェニックマウスを交配した(f/f:Ic(+))。10週齢f/f:Ic(+))マウスにタモキシフェンを7日間腹腔内注射し表現型を解析した。タンパク質発現はウェスタンブロット法にて、mRNA発現はquantitative RT-PCR法により評価した。心機能は心エコー法により評価した。プロテオソーム活性についてはCHEMICN社製Proteosome Activity Assay Kitを用いて測定した。アポトーシスはin situ TUNEL Assay kit(Takara製)を用いて評価した。

心筋細胞は生後1-2日のラット新生仔より単離し

た。Atg7に対するshRNAを発現するアデノウイルスを作成しMOI10にて心筋細胞に感染した。

(倫理面での配慮)

本研究は大阪大学遺伝子組み換えDNA実験委員会、大阪大学医学部医学科動物実験委員会の承認の上、行われた。

C. 研究結果

f/f:Ic(+))マウスにタモキシフェンを7日間投与すると心筋細胞内Atg5タンパク質量は約90%減少した。オートファジーの生化学的マーカーであるAtg5依存性microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I からLC3-IIへの変換は抑制されていた。従ってf/f:Ic(+))においてオートファジーが抑制されていた。f/f:Ic(+))の心機能を心エコー法で評価したところ拡張期および拡張期左室径は増大し、左室短縮率は低下していた。さらに肺・体重量比は増加していた。即ちf/f:Ic(+))は心機能不全、心不全に陥っていた。また心・体重量および心筋細胞断面積は増加しており、心肥大を呈していることが示唆された。

オートファジーと心肥大の関係を明らかにするため、Atg7-shRNAを作成し心筋細胞に感染させた。shRNAの感染によりAtg7タンパク質発現は減少した。LC-IIタンパク質レベルも減少しshRNAによりオートファジーを抑制させることが明らかとなった。shRNAにより心筋細胞面積の増大、サルコメア形成の促進、ANFの発現の増加が認められた。従ってオートファジーの抑制は心筋細胞肥大に関わっていることが示唆された。

タンパク質分解系にはオートファジーとユビキチン-プロテオソーム系の2種類が存在する。f/f:Ic(+))心においてはユビキチン化タンパク質が増加していた。さらにプロテオソーム活性も増加していた。

またタンパク質合成に重要な役割をしているS6キナーゼ活性も上昇していた。従ってf/f:Ic(+)においてはタンパク質合成系と分解系共に亢進していることが明らかとなった。

電子顕微鏡レベルでf/f:Ic(+)心を観察するとサルコメア構造が破壊されており、ミトコンドリアの整列異常、凝集が認められ、これはオートファジーの細胞内小器官のターンオーバーに重要な役割をしていることが示唆された。

ユビキチン化タンパク質は小胞体ストレスを惹起することが知られている。f/f:Ic(+)心では小胞体ストレスのマーカであるGRP78とGRP94の発現が増加していた。また小胞体ストレス依存性カスパーゼであるcaspase-12の活性かも生じていた。さらにTUNEL陽性細胞も増加していた。

D. 考察

心臓におけるオートファジーの抑制は心筋機能障害、心不全、心肥大を引き起こすことが示された。これは異常タンパク質の蓄積による直接の機能障害、小胞体ストレスの増加を介したアポトーシスの増加によるものと考えられる。

E. 結論

オートファジーは心機能、心形態を保つ恒常性維持の機構であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

• Mizuno H, et al: Impact of atherosclerosis-related gene polymorphisms on mortality and recurrent events after myocardial infarction. *Atherosclerosis* 185:400-405, 2006.

2) 学会発表

• Watanabe T, Otsu K, Higuchi Y, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Shimizu T, Nishida K, Imai K, Shirasawa T, Hori M: Reduction of hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure. *American Heart Association Scientific Sessions 2006 (Chicago, USA/November 12-15, 2006)*

• Nakai A, Otsu K, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Nishida K, Mizushima N, Hori M: Autophagy in cardiomyocyte is essential for maintenance of cardiac function and response to external stress. *American Heart Association Scientific Sessions 2006 (Chicago, USA/November 12-15, 2006)*

H. 知的財産権出願・登録状況
なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 松森 昭(京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授)

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

わが国の特発性心筋症患者の予後(5年生存率)および予後規定要因を明らかにするために、1999年実施の全国疫学調査2次調査対象症例の5年後の予後調査を実施した。

B. 研究方法

1999年に実施した全国疫学調査2次症例、拡張型心筋症1,932例、肥大型心筋症2,134例のうち医療機関から協力の得られた前者の1,554例、後者の1,605例について5年後の予後を追跡した。原則として医療機関からの予後情報の提供を受けたが、追跡中断例では市町村への住民票請求により生死の確認を行った。

C/D. 研究成果・考察

1) 拡張型心筋症

追跡を行った1,554例中に420例が死亡し、全体での5年生存率は73%であった。1998年中に初めて診断された390例での5年生存率は78%であった。予後関連要因に関する単変量解析においては、患者の加齢、低い肥満度、高いNYHA分類、左脚ブロック、高い心胸比、高い左室拡張期径、高い左室径指数、低い左室駆出率、長い診断後経過年数が、予後不良の要因であった。重要な要因をモデルに含むCox比例ハザードモデルによる多変量解析では、男性、患者の加齢、家族歴、高い左室径指数、低い左室駆出率が、互いに独立して有意に高いハザード比を示し、予後不良要因と考えられた。左室径係数の1標準偏差上昇あたりの多変量調整ハザード比は1.33(95%信頼区間1.07-1.65)、左室駆出率偏差低下あたりのハザード比は1.26(95%信頼区間1.02-1.55)であった。以前のわが国からの報告と比べると、本症の予後はかなり改善してきている

と考えられた。また、医療機関による偏りのないわが国での本症患者の予後が明らかになった。予後要因の中では、左室径と左室駆出率がそれぞれ独立して有用な予後予測要因であると考えられた。

2) 肥大型心筋症

追跡を行った1,605例中、追跡期間中に241例が死亡し、全体での5年生存率は84%であった。1998年中に初めて診断された342例での5年生存率は86%であった。予後関連要因に関する単変量解析においては、患者の加齢、低い肥満度、糖尿病既往、高いNYHA分類、心房細動、左脚ブロック、心尖部肥大がない、高い心胸比、低い左室駆出率、病床数が少ない病院が、予後不良の要因であった。重要な要因モデルに含むCox比例ハザードモデルによる多変量解析では、患者の加齢、高いNYHA分類、左脚ブロック、心尖部肥大がない、高い心胸比、低い左室駆出率、互いに独立して有意に高いハザード比を示し、予後不良要因と考えられた。中でも低い左室駆出率と高い心胸比との関連が最も強く、左室駆出率の1標準偏差低下あたりの多変量調整ハザード比は1.42(95%信頼区間1.20-1.69)、心胸比の1標準偏差上昇あたりのハザード比は1.61(95%信頼区間1.26-2.05)であった。医療機関による偏りのないわが国での本症患者の予後が明らかになった。わが国での本症予後は欧米からの報告とほぼ同様と考えられた。予後要因であると考えられた。

E. 結論

本調査により医療機関による偏りのないわが国での心筋症の予後が明らかとなった。

1983年に実施された心筋症研究班の調査による予後と比較すると、拡張型心筋症ではかなりの改善がみら

れた(76%対54%)が、肥大型心筋症ではむしろ悪化傾向を示した(86%対93%)。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Matsumori A, Shimada T, Chapman NM, Tracy SM, Mason JW: Myocarditis and heart failure associated with hepatitis C virus infection. J Card Fail 12(4):293-298, 2006.
- Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H, Matsumori A, Maruyama T, Komoda T, Nagata A: Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. Clin Chem Lab Med 44(5):522-532, 2006.

2) 学会発表

- Nakagawa H, Miura K, Matsumori A: Five-year survival rates and prognostic factors of dilated cardiomyopathy in Japan; results from a nationwide study. Circ J 70(Suppl 1):138.
- Miura M, Nakagawa H, Matsumori A: Five-year survival rates and prognostic factors of hypertrophic cardiomyopathy in Japan; results from a nationwide study. Circ J 70(Suppl 1):139.
- Matsumori A: Etiology of diastolic vs systolic failure. American Heart Association 2006 (East vs West. Joint AHA/APSC Congestive Heart Failure East vs West. Scientific Sessions)(Chicag, USA/ November 14, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 松森 昭：心疾患及びウイルス性疾患治療薬 (PCT/JP2006/316419)(出願日：2006年8月22日)

特発性心筋症に関する調査研究

—特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究—

分担研究者： 中谷 武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)

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

A. 研究目的

内科的、外科的治療の進歩により、心不全の治療成績は向上してきた。しかし、心筋障害が高度な心不全例においては、心臓ポンプ機能の代替が必要となり、補助人工心臓(VAS)や心臓移植が考慮される。今回当センターにおける心臓移植登録待機例について検討した。

B. 研究方法

対象は、1997年10月以降2006年12月までに、心臓移植の適応として当センターより日本臓器移植ネットワークに登録された106例である。男性77例、女性29例で、登録時年齢は8-57(平均35)歳であり、基礎疾患は拡張型心筋症92例、拡張相肥大型心筋症3例、虚血性心筋疾患10例、再移植1例であった。

C. 研究結果

登録前あるいは待機中にLVAS装着を行った症例は71例(67%)で、現在待機中が26例(うち半数がLVAS装着中)である。また、国内移植が20例、渡航移植15例、取り消し10例、他施設移行3例、死亡32例であった。うち、取り消し10例中4例はLVAS装着例で、LVAS例を含む9例が心機能改善例であった。また、国内移植例20例においては、年齢14-61(平均40)歳、男性16例、女性4例、原疾患は拡張型心筋症19例、拡張相肥大型心筋症1例であった。待機状況は全例Status 1で、2例は強心薬持続投与で、他の18例はLVAS装着であった。待機期間は、29-2015(平均646)日で、15例が1年以上の待機例であった。また、LVAS装着18例では、補助期間は39-1444(平均687)日で、1年以上補助が14例であった。用いられたシステムは、東洋紡左室脱血型が14例で最も多く、また1例は最長の1444日補助

例であった。他は東洋紡左房脱血型2例および植込み型LVAS: HeartMate VE 2例であった。脳死下臓器提供病院は3例が近畿地区で、他の17例は遠隔地であった。搬送手段は、小型ジェットが16例、ヘリコプターが2例で、他の2例は緊急自動車で、搬送時間は26-140(平均97)分であった。また、虚血時間は137-255(平均207)分で、1例以外4時間以内であった。手術術式は、1例目がLower-Shaunway法、2例目がBicaval法で、3例目からは右房後壁の一部を残すmodified Bicaval法を用いた。また、心筋保護液としては、当初はSt. Thomas液を用い、7例目からはCelsior液を用いた。免疫抑制療法は、サイクロスポリンあるいはタクロリムス、ミコフェノール酸モフェチルおよびステロイドの3者併用療法を用い、6例で腎機能障害等で抗CD3抗体製剤を併用した。ISHLT Grade3A以上の治療を要する拒絶反応を5例に認めしたが、全例ステロイドパルス療法で軽快した。現在移植後2ヶ月-7年9ヶ月(平均3年4ヶ月)を経過するが、最近の1例を除き退院した。1例が感染症にて移植後4年2ヶ月で死亡したが、他は経過安定しており、12例が社会復帰した。また冠動脈検査では1例においてドナー由来の病変を冠動脈造影(CAG)および血管内エコー(IVUS)で認めた。他の症例におけるCAGは正常範囲内であったが、6例にIVUS上Stanford Classification 3ないし4の病変を認めた。

D. 考察

我が国で2006年末までに施行された心臓移植は39例であるが、全例Status 1で、内31例がLVAS装着例であった。Status 1としての待機期間は平均698日、1年以上32例であった。また、LVAS補助期間も平均745日で、1年以上が25例であった。この

ようにわが国での心臓移植例は、重症例で、待機期間も長期に及んでいる。しかし、これまでの死亡例は2例のみで、最長例は移植後8年に及び7年生存率は90.3%と、国際心臓肺移植学会レジストリーより良好な成績を示している。今後良好な長期予後を得るために、冠動脈病変への配慮が必要であり、最近認可されたmTOR阻害薬RADが移植後冠動脈病変に対する新たな治療選択として期待されている。

E. 結論

わが国においても徐々にではあるが、心臓移植実施例が増加し、良好な成績を示している。今後心臓移植の定着が望まれると共に、長期補助を安定して行えるQOL良好なLVASの導入も必要である。

F. 研究危険情報

なし。

H. 研究発表

1) 論文発表

- ・中谷武嗣：臓器移植の現状と展望；心臓および心肺移植. 外科治療 94(2)：50-51, 2006.
- ・Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T: Pharmacokinetic study and limited sampling strategy of cyclosporine in Japanese heart transplant recipients. Circ J 70:1307-1311, 2006.
- ・中谷武嗣：補助人工心臓の現況. 循環器専門医 13：27-31, 2006.
- ・中谷武嗣：心臓移植. 総合臨牀 55：2053-2062, 2006.

2) 学会発表

- ・Nakatani T, Niwaya K, Hanatani A, Kobayashi J,

Bando K, Tagusari O, Nakajima H, Kato T, Mano A, Hashimura K, Yagihara T, Kitamura S: Over one year support by using extracorporeal left ventricular assist system. American Society for Artificial Internal Organs 52nd Annual Conference (Panel Discussion)(Chicago, USA/June 8-10, 2006)

・Nakatani T, Niwaya K, Kobayashi J, Kato T, Kato T, Mano A, Tagusari O, Nakajima H, Funatsu T, Tsuda E, Hashimura K, Yagihara T, Kitamura S: Current status of left ventricular assist systems and heart transplantation at National Cardiovascular Center. The 14th Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Surgery (Panel Discussion)(Osaka, Japan/June 1-3, 2006)

・Hashimoto S, Kato T, Nakatani S, Sumita Y, Masuda Y, Tanaka N, Kamiya C, Hashimura K, Komamura K, Mano A, Oda N, Hanatani A, Ueda H, Kitakaze M, Kitamura S, Nakatani T: Reduced myocardial perfusion reserve and systolic strain could detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. American Heart Association Scientific Sessions 2006 (Chicago, USA/November 12-15, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

加藤倫子, 真野暁子, 小田 登
(国立循環器病センター臓器移植部)
国立循環器病センター臓器移植部
庭屋和夫, 船津俊宏
(国立循環器病センター心臓血管外科)

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋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—
分担研究者： 横山 光宏(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学教授)

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

A. 研究目的

心不全では内皮依存性血管弛緩・拡張反応の低下が認められ、そのことは血管内皮障害の存在を意味する。内皮由来血管弛緩因子の本体は一酸化窒素(nitric oxide; NO)であるが、その作用減弱にはスーパーオキシドによるNOの不活性化の亢進と、内皮型NO合成酵素(eNOS; endothelial NOS)の活性化障害に基づくNO産生の減少の両者が関与する。NOは多彩な生物作用を有し、特にeNOS由来NOは心臓に保護的に作用すると想定されている。一方、eNOSは補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH4)が酸化により不足するような病的条件下では、NOよりもむしろスーパーオキシドを産生することが最近明らかになってきた(eNOS uncoupling)。今回我々は心筋梗塞後の心室リモデリング過程にeNOS uncoupling由来のスーパーオキシドが影響を及ぼすかについて検討した。

B. 研究方法

左冠動脈前下行枝結紮によるラット心筋梗塞モデルを用いてBH4の慢性投与が左室リモデリングに及ぼす効果について検討した。

(倫理面への配慮)

ラットに対する実験は当大学の「動物実験における倫理の原則」に則って行った。

C. 研究結果

心筋梗塞作成3日前よりBH4の経口投与を行った群(10mg/kg/day, MI+BH4群)およびコントロール群(MI群)を作成し、4週間後に解析を行った。MI+BH4群ではMI群に比べ、心筋でのスーパーオキシド産生およびBH4/BH2比の低下が抑制され、左室リモデリングも有意に抑制されていた(拡張期左室径; MI群 11.1 ± 0.1 , MI+BH4群 10.4 ± 0.2

mm、後壁壁厚; MI群 1.65 ± 0.04 , MI+BH4群 1.37 ± 0.06 mm)。左心機能もMI+BH4群で有意に保持されていた(左室拡張末期圧; MI群 19.6 ± 1.0 , MI+BH4群 12.3 ± 2.4 mmHg, LV dP/dt max; MI群 4885 ± 305 , MI+BH4群 7838 ± 559 mmHg/s)。非梗塞領域(左室後壁)における心筋細胞横断面積を計測したところ、MI+BH4群ではMI群に比べ約25%の減少を認めた。一方、リモデリング抑制効果がBH4自身の抗酸化作用による可能性があるため、BH4類似の構造と抗酸化作用を有するもeNOSの補酵素としては作用しないテトラヒドロネオプテリン(NH4)を投与した群でも同様の検討を行った。NH4投与群での左室リモデリング抑制効果はBH4投与群に比し軽微であった。

D. 考察

心筋梗塞後、おそらくミトコンドリア電子伝達系の機能低下に伴うスーパーオキシド増加によりBH4が酸化され、その結果生じたeNOS uncouplingがさらなる酸化ストレス増加を引き起こし、慢性期の心室リモデリング悪化の一因となっていると推測される。eNOS由来のスーパーオキシドは直接心筋、あるいは血管内皮に障害的に働くとともに、NO自身も不活化するという悪循環を生じている可能性がある。現在、我々は実際に心不全患者でBH4の不足やピオプテリンバランスの不安定化がおこっているのか検討中である。

E. 結論

eNOS由来スーパーオキシドが心筋梗塞後の心臓リモデリングに関与していることが本研究より示唆された。eNOS uncouplingをターゲットとしたeNOS/NO系機能の改善が新たな心不全治療戦略となりうるのか、引き続き検討していく。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(「Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表」参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

政野智也, 杜 隆嗣

(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学)

川嶋成乃亮(大阪府済生会中津病院総合診療内科)

特発性心筋症に関する調査研究

- 拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討 -

分担研究者： 松崎 益徳(山口大学大学院医学研究科器官病態内科学教授)

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

A. 研究目的

拡張型心筋症(DCM)の発症と進展機序には、歴史的にウイルス性心筋炎後の慢性化機序や自己免疫機序が主に想定されてきた。心筋炎からDCMへの進展機序には諸説があるが、主に①ウイルス持続感染説、②自己免疫説、③ウイルス再感染説が提唱されている。我々は本班会議でマウスウイルス性心筋炎・慢性期において、同種同量のCoxsackie virus B3(CVB3)を再接種することにより、再感染が成立し、抗体価の上昇と著明な心拡大を来すことを報告し、ウイルス再感染が何らかの抗心筋抗体産生を引き起こし、自己抗体がDCMの発症に関与している可能性を示唆している。そこでマウスとヒトDCM患者のそれぞれの血清を用いて自己抗原のプロテオミクスを行い、ヒトDCMの進展機序を免疫学的に解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) マウス再感染血清

CVB3にて再感染させたマウス血清を2-dimensional Western blottingにて展開した正常マウス心筋(膜分画)と反応させた。Anti-Mouse IgM抗体処理にて得られたドットをLC-MS/MS法にて質量解析を行い同定した。

2) 患者血清

研究同意を得たDCM患者(4名：平均年齢55.3歳)の血清を2-dimensional Western blottingにて展開したヒト心筋蛋白(膜分画)と反応させた。二次抗体処理にて得られたドットをMALDI-TOF/MSにて蛋白同定を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清を使用した臨床研究に際しては、山口大学病院倫理委員会の審査を経たプロトコールに則り施行されている(H18-51：心筋炎・心筋症における抗心筋自己抗体の研究)。臨床研究に当たっては患者本人ま

たは代理人から研究同意書を取得した上で、倫理面は最大限に配慮し、厳格な個人情報管理の元で行った。ウイルスを使用した動物実験に際しては、山口大学医学部動物使用委員会の審査を受けたプロトコールに則り施行されている(23-S02：マウス慢性心筋炎心移植モデルを使った免疫学的解析)。

C. 研究結果

マウス再感染モデルの血清から、心筋細胞膜蛋白の自己抗原として hsp60、また細胞質蛋白より Thrombomyosin、ATPase β chain、 α -cardiac actin が同定された。DCMの患者血清からは、aconitase、succinate dehydrogenase、acyl-Coenzyme A dehydrogenase や voltage-dependent anion channel が同定された。

D. 考察

既報の心筋自己抗原の多くは、収縮蛋白などの心筋細胞内の構成蛋白であり、自己抗体とは免疫学的に隔絶されている点が問題であった。今回の解析で、疾患マウスと患者双方より細胞膜分画に自己抗原が同定されたことより、自己免疫機序による心筋細胞障害の可能性が示唆された。更に、同定された各種自己抗原とヒトCVB3との抗原相同性解析では有意なアライメントは検出されなかったことより、DCMの進展にはウイルスの持続感染の関与は少ないと予想された。

E. 結論

心筋細胞膜蛋白の一部を抗原とする自己免疫機序がDCMの進展機序に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M: Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circulation Journal* 68(7):677-682, 2004.
 - Nakamura H, Takata S, Umemoto S, Naik G, Moe G, Liu P, Matsuzaki M: Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart following donor heart myocardial infarction; new insights into the pathological role of tumor necrosis factor- α from a novel heterotopic cardiac transplant-coronary ligation rat model. *Journal of the American College of Cardiology* 42(1):173-181, 2003.
- ### 2) 学会発表
- Matsushima A, Nakamura H, Ikeda Y, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibitor following donor heart myocardial infarction with heterotopic transplant-coronary ligation model. 第70回日本循環器学会総会(名古屋/2006年3月26日)
 - Matsushima A, Nakamura H, Ikeda Y, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibitor following donor heart myocardial infarction with a heterotopic transplant-coronary

ligation Model. The 11th La Jolla-Capri-Yamaguchi-Seoul Research Conference (Hagi, Japan/October 6-8, 2006)

- Matsushima A, Nakamura H, Ikeda Y, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibitor following donor heart myocardial infarction with a heterotopic transplant-coronary ligation Model. The 2nd China-Japan Cardiovascular Forum (CJCF)(Beijing, China/November 4, 2006)

H. 知的財産の出願・登録状況

- 中村浩士, 松崎益徳, 吉田 勉, 山口TLO: 広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法(特開: 2002-209473)
- Nakamura H, Matsuzaki M, Yoshida T: An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine(米国特許出願: 10/141608)
- 中村浩士, 松崎益徳, 山口TLO: 分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法(特願2004-044096)

<研究協力者>

中村浩士, 松嶋 敦

(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)

加藤智啓, 西岡久寿樹

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)

特発性心筋症に関する調査研究

—肥大心におけるLysyl oxidase familyの役割に関する検討—

分担研究者： 今泉 勉(久留米大学医学部心臓・血管内科教授)

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

A. 研究目的

過剰な心肥大は予後不良の独立した因子である。ラットの圧負荷肥大心と容量負荷肥大心でDNA chipを用いて遺伝子発現の相違を検討したところ、lysyl oxidase like-protein-1 (LOXL)という蛋白の発現が両肥大群で著明に亢進していた。Lysyl oxidase (LOX)は、銅依存性細胞外モノアミン酸化酵素であり、コラーゲンやエラスチンの架橋反応を担っている。LOXには少なくとも5つのアイソフォームがあり(LOX, LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4)、架橋反応以外にも細胞の成長、発達などに関与すると推測されている。LOXLは広汎な臓器に発現しており心臓での発現も豊富であるが心臓における役割はほとんどわかっていない。最近、LOXLノックアウトマウスが作成され、elastogenesisに深く関与していることが示されているが心臓の詳細な観察はなされていない。我々は心筋細胞におけるLOXLの発現制御を検討し、Gq依存性アゴニストやIGF-1など多様な肥大刺激により発現や酵素活性が増加することを報告した。今回の検討ではLOXLの心臓特異的過剰発現マウスを作成し、LOXLの心臓での機能や心肥大における役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

トランスジェニックマウス用のコンストラクトは、poly A tailを含むhuman LOXL cDNAの上流に α ミオシン重鎖プロモーターを付加して作成した。マウス卵へのインジェクションはKAC社に委託し、27匹のマウスが産出された。これらのマウス尾を用いて遺伝子判定を行い、5つのラインを確立した。心エコーはVevo 660(VisualSonics社)と30 MHzトランスデューサーを用いて行い、血圧はTail-cuff法で測定した。

(倫理面への配慮)

研究は当大学の動物実験倫理基準に準拠して行っ

た。

C. 研究結果

マウスの表現型を検索するために、まず3つのラインを用いて10週齢のマウス心の組織標本を作成した。マクロでは明らかな求心性肥大がみられ、HE染色では心筋細胞肥大、Azan染色では間質および血管周囲の線維化を認めた。左室/体重比はTGマウスで有意に増大しており、左室肥大が形成されていた。心エコーでは左室や右室の拡大は認めず収縮能も保持されていたが、左室壁厚の増大がみられた。以上から、TGマウスでは心筋線維化を伴う心筋肥大がみられることがわかった。さらにTail-cuff法による血圧測定では、TGマウスで収縮期血圧のわずかな低下がみられることが判明した。これらの変化は、3つのラインとも同じように観察された。LOX酵素反応においては、 H_2O_2 がby-productとして産生される。 H_2O_2 は心肥大の細胞内誘導因子であるため、LOX反応により産生される H_2O_2 が心筋細胞肥大に関与する可能性を推測した。そこでTGマウスに、活性酸素種を広汎に不活化するEUK-8を投与することにより、マウスの表現型に与える影響を検討した。その結果、EUK-8は有意にTGマウスの左室/体重比を減少させ、心肥大を抑制した。

D. 考察

LOXLノックアウトマウスは、子宮脱、肺気腫、皮膚の進展性増大などを来すことが示されている。その原因は弾性線維の障害であり、LOXLはelastogenesisに関与する。しかしながら、この蛋白は弾性線維が特別豊富ではない心臓において多量に発現しており、その機能はelastogenesisだけでは十分説明できない。我々の今までの研究によりLOXLは、①容量負荷、圧負荷の両者による心肥大で増大する、②培養心筋細胞においてGq依存性アゴニストやIGF-1のような肥大刺

激によりmRNA発現やLOX酵素活性が増大する、③心筋細胞と非心筋細胞とで比較すると正常状態では非心筋細胞での発現が多いが、肥大刺激を受けると心筋細胞においてより強い発現亢進がみられる、ことなどが判明している。以上からLOXLは心肥大に関係し、特に心筋細胞肥大と強く関連する可能性が推測された。今回、心筋細胞特異的にLOXLを発現するマウスを作成したところ、心筋細胞肥大と共に心筋線維化がみられることがわかった。LOX蛋白は細胞内で産生された後、プロセッシングを受けpro-regionの切断により活性化された成熟フォームとして細胞外へ分泌される。LOXLも同様の機序により成熟することがわかっている。我々のTGマウスでは心筋細胞で特異的にLOXL蛋白が発現しているの、心筋細胞間質や血管周囲の線維化は心筋細胞から分泌された蛋白による変化と推測される。心筋細胞においては蛋白が細胞内でそのまま作用しているのか、あるいは一度分泌された蛋白がparacrine, autocrine的に作用しているのかは今回の検討のみでは結論できない。LOXLの発現が心筋細胞肥大を来す機序はいくつか可能性が考えられる。前述のようにLOXアイソフォームは、酵素反応過程でリシン残基の酸化によりH₂O₂を産生する。活性酸素種は心筋細胞肥大のシグナリングに関与することが示されているため、LOXLにより産生されたH₂O₂が心肥大を起こしているという仮説を立て、それを不活化させるEUK-8をTGマウスに投与してみた。その結果、EUK-8により心肥大が抑制されることが判明し、TGマウスの心肥大にはH₂O₂が関与する可能性がある。TGマウスでは、心筋細胞肥大と共に心筋線維化も出現していた。LOXアイソフォームが直接細胞外マトリックスの増生に関与することは証明されておらず、LOXLの新たな役割を示唆するものである。TGマウスで間質増生が起こる機序は不明であるが、心筋細胞肥大と同様にH₂O₂が関与しているのかもしれない。

E. 結論

今回、心臓特異的発現LOXL TGマウスを作成した。このマウスでは左室/体重比が増大しており、心筋細胞肥大と心筋線維化がみられた。LOXLが肥大を起こす機序としては、活性酸素種が関与していると推測された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1)論文発表

- Miyazaki H, Oka N, Koga A, Ohmura H, Ueda T, Imaizumi T: Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats. *Hypertens Res* 29(12):1029-1045, 2006.
- Kai H, Mori T, Tokuda K, Takayama N, Tahara N, Takemiya K, Kudo H, Sugi Y, Fukui D, Yasukawa H, Kuwahara F, Imaizumi T: Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. *Hypertens Res* 29(9):711-718, 2006.
- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Inagaki Y, Takenaka K, Jinnouchi Y, Yoshida Y, Matsuura T, Narama I, Motomiya Y, Takeuchi M, Inoue H, Yoshimura Y, Bucala R, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular heperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 281(29):20213-20220, 2006.

2)学会発表

- Kudo H, Kai H, Takayama N, Mori T, Sugi Y, Fukui D, Takemiya K, Tahara N, Ikeda A, Futamata M, Yasukawa H, Koga M, Kawai Y, Hirooka Y, Imaizumi T: Exaggerated blood pressure variability aggravates hypertensive cardiac remodeling through the angiotensin II-mediated inflammation in rats. *American Heart Association 2006 (Chicago, USA/November 12-15, 2006)*

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

岡 直樹, 安川秀雄, 大村治也
(久留米大学医学部心臓・血管内科)

特発性心筋症に関する調査研究

— 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—

分担研究者： 砂川 賢二(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)

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

A. 研究目的

心不全は、種々の心疾患の終末像であり、 β 遮断薬およびレニン・アンジオテンシン系阻害薬が広く使用されているにもかかわらず、その予後は不良である。近年の虚血性心疾患の急性期治療の進歩に伴い、慢性心不全の新たな治療戦略の開発が求められている。近年、迷走神経刺激によって心筋梗塞後ラットにおいてリモデリングが抑制され、その生命予後が改善したことが報告されている(Li, et al, 2004)。しかし、そのメカニズムは明らかにされておらず、今後臨床応用されていく上でその作用点、作用機序を明らかにすることが必要である。本研究では、心筋梗塞後心不全モデルマウスを用いて迷走神経刺激が及ぼす短期的な効果について検討し、迷走神経刺激による抗リモデリング効果のメカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 麻酔、人工呼吸下に開胸し、マウス(CD-1)の左冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作成した。

2) 28日経過した心筋梗塞後心不全マウスに、麻酔下に右迷走神経に電極を装着し、約10%の心拍数減少を目安に迷走神経刺激を15分間行った。その後、活性酸素産生をin vivo ESRによって測定した。迷走神経に電極を巻き付け、刺激をしない群を対照群とした。

3) 心筋細胞におけるノルエピネフリン(NE)による活性酸素産生ならびに、in vivoにおける迷走神経刺激前後でのNEの産生量をmicrodialysisによって測定した。

4) NEによる心筋細胞内外における活性酸素産生をDCFアッセイにより測定し、アセチルコリン

(Ach)による影響を観察した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 心筋梗塞後28日目のマウスは、心臓においてフリーラジカルが増加している。1回の迷走神経刺激を行い、その直後にin vivo ESRによってフリーラジカルを測定した。スピンプローブであるmethoxy-PROXYLの減衰速度は、梗塞後心不全マウスにおいて増大しており、迷走神経刺激群では、シャム刺激に比して、シグナル減衰速度が増大せず、正常マウスと同等であった。この結果から、迷走神経刺激は即時的に組織におけるフリーラジカルを消去する作用を有することが示唆された。さらに、この迷走神経刺激に先立ち、Achを前投与したマウスでは、迷走神経刺激によるフリーラジカル抑制効果は消去された。このことから、迷走神経刺激により即時的に活性酸素産生が抑制され、Achムスカリニック受容体を介していることが明らかとなった。

2) 次に、この迷走神経刺激が、心筋組織内のNEに対してどのような影響を与えるか、microdialysis法を用いて、直接的な組織内NE濃度を測定した。迷走神経刺激前に比して、刺激後は、心筋内NE濃度が有意に低下した($0.62 \pm 0.13 \mu\text{M}$ vs $0.37 \pm 0.09 \mu\text{M}$, $P < 0.05$)。

3) NEによって心筋細胞で活性酸素が産生されるかどうか検証するために、仔ラット心筋細胞を培養し、NEを投与したところ、濃度依存性に

H₂O₂が増加し、これらはアセチルコリン投与(NE+Ach)により有意に減少し、さらに硫酸アトロピンの同時投与(NE+Ach+Atropine)により、抑制効果が消失した(0.85±0.13 NE, 0.64±0.02 NE + Ach, 0.89±0.08μM NE+Ach+Atropine)。

D. 考察

不全心ではレニン・アンジオテンシンといった液生因子に加え、交感神経活動が亢進し、リモデリングに関与していることが知られている。さらに、我々は、動物モデルにおいて、活性酸素が心不全において増加しており、リモデリング形成に重要な役割を果たしていること、これらの活性酸素抑制によって、リモデリングを抑制し、その予後を改善することを示してきた。

一方、迷走神経刺激によって心筋梗塞後の心室リモデリングが有意に抑制され、生命予後の改善が得られることが報告されている(Circulation 109:120-4, 2004)。近年、敗血症モデルにおいて、迷走神経刺激が炎症性サイトカインの産生を抑制し、ショックの発症を防止することが報告され、アセチルコリンのニコチン型受容体を介した抗炎症作用が注目を集めている。しかし、それ作用機序について、詳細な機序については不明である。心不全リモデリングを抑制するための慢性刺激では、血行動態の改善を伴うことから、迷走神経刺激による分子メカニズムを明らかにすることは困難であった。そこで、本研究では、心筋梗塞後リモデリングに対する迷走神経の急性効果を明らかにすることで、その機序を解明することを主たる目的とした。その結果、迷走神経刺激は、即時的に活性酸素産生を抑制することが明らかとなり、Ach受容体、および交感神経伝達物質であるNEの抑制を介していることが示唆された。

E. 結論

以上の結果より、迷走神経刺激によって、活性酸素産生が抑制されることが明らかとなった。その機序として、①アセチルコリン受容体を介する系、ならびに、②交感神経からのNEの放出を抑制し、NEに依存した活性酸素産生の抑制、が考えられる。節前および節後神経繊維の相互作用により、活性酸素生成に寄与し、心不全のリモデリング進展、心不全の増悪機転に関与していると考えられる。急性期に活性酸素産生を抑制することが、迷走神経刺激によるリモデリング改善効果の機序の一つである可能性が示唆される。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Matsusaka H, Kinugawa S, Ide T, Matsushima S,

Shiomi T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H: Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates exacerbated left ventricular remodeling and failure in diabetes-associated myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol 48:95-102, 2006.

・ Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohata Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H: Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:H2237-H2245, 2006.

・ Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H: Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. Circulation 113:1779-1786, 2006.

・ Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H: Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. Cardiovasc Res 70:457-465, 2006.

・ Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H: Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. Hypertension 47:711-717, 2006.

・ Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H: Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorate mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. Circulation 112:683-690, 2005.

・ Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Feldman AM, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H: Selective disruption of matrix metalloproteinase-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:H1858-H1864, 2005.

2) 学会発表

・ Ide T, Yamato M, Yoshida M, Utsumi H, Ikeuchi M, Tsutsumi T, Inoue T, Shiba T, Tsutsui H, Sunagawa K: Non-invasive analysis of oxidative stress in myocardial remodeling in mice using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy. 第70回日本循環器学会総会(心不全:基礎)(名古屋/2006年3月24-26日)

・ Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K: Tumore necrosis factor is toxic via receptor 1 and

- protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. 第10回日本心不全学会(サイトカイン)(東京/2006年10月13-15日)
- Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kamiya A, Utsumi H, Hirooka Y, Sunagawa K: Vagal Nerve Stimulation Acutely Decreases the Generation of Free Radicals in Failing Myocardium. 第10回日本心不全学会(リモデリング:基礎)(東京/2006年10月13-15日)
 - Inoue T, Ide T, Yamato M, Yoshida M, Seri N, Tsutsumi T, Tsutsui H, Sunagawa K: Time-dependent activation of myocardial and peripheral oxidative stress is dissociated after myocardial infarction. 第10回日本心不全学会(リモデリング:基礎)(東京/2006年10月13-15日)
 - Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K: Tumore necrosis factor is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. 第23回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会(千葉/2006年12月1-2日)
 - Ide T, Yamato M, Yoshida M, Utsumi H, Ikeuchi M, Tsutsumi T, Inoue T, Shiba T, Tsutsui H, Sunagawa K: Non-invasive analysis of oxidative stress in myocardial remodeling in mice using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy. 第23回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会(千葉/2006年12月1-2日)
 - Ide T, Yamato M, Yoshida M, Utsumi H, Ikeuchi M, Tsutsumi T, Inoue T, Shiba T, Tsutsui H, Sunagawa K: Non-invasive analysis of oxidative stress in myocardial remodeling in mice using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy. AHA (Poster: Heart failure; basic)(Chicago, USA/November 11-15, 2006)
 - Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K: Tumore necrosis factor is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction, AHA (Oral: Heart Failure; basic)(Chicago, USA/November 11-15, 2006)
- H. 知的財産権出願・登録状況
なし。
- <研究協力者>
井手友美

特発性心筋症に関する調査研究

—不整脈源性右室心筋症の分子遺伝学的研究—

分担研究者： 鄭 忠和(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

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

A. 研究目的

不整脈源性右室心筋症(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: ARVC)は突然死を来たしかつ遺伝性を有する心筋疾患である。ARVCの分子遺伝学的検討により、現在までに10の遺伝子座が報告されており、6種類の病因遺伝子が明らかとなっている。すなわちcardiac ryanodine receptor-2遺伝子、plakoglobin遺伝子、desmoplakin遺伝子、plakophilin-2遺伝子、transforming growth factor β -3遺伝子あるいはdesmoglein-2遺伝子がARVCの病因であることが報告されている。これらのうちdesmosomeに関連する遺伝子が4種類(plakoglobin遺伝子、desmoplakin遺伝子、plakophilin-2遺伝子、desmoglein-2遺伝子)であり、ARVCの病因には細胞接着因子の異常が深く関わっていると考えられる。これまでのARVCに関する遺伝子異常の報告は、欧米の家系、症例におけるものがほとんどである。

本研究の目的は鹿児島大学において診療したARVC症例の病因を明らかにすることである。

B. 研究方法

鹿児島大学病院で診断し、遺伝子解析研究に協力が得られたARVC症例とその家族を対象とした。ARVCの診断はMcKennaの診断基準(Br Heart J 71:215, 1994)に従った。

臨床的に家族歴、病歴、現症、心電図、胸部レントゲン写真、心臓超音波検査、Holter心電図、心臓カテーテル検査、心筋生検などを評価し、McKennaの基準を満たすものをARVCと診断した。

ARVCの発端者と、家系の構成員の末梢血を採取した。血液よりDNAを抽出した。発端者に対しては、PCR法を用いて遺伝子をエクソン毎に増幅し直接

塩基配列決定を行い、解析を行った。今回はdesmoplakin遺伝子とplakophilin-2遺伝子の解析を施行した。また構成員の血液が採取できた一家系においては、PCR法を用いて連鎖解析を施行した。

(倫理面への配慮)

本研究の遺伝子解析に関しては鹿児島大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認を受けている(No. 33, 57, 76 遺伝性心疾患の遺伝子解析)。患者およびその家族には文書を用いて説明を行い、文書による同意を得たうえで遺伝子解析研究を行った。倫理面への配慮は十分されていると考えられた。

C. 研究結果

当院で診断したARVC症例は5名であり、男性3名、女性2名で平均年齢は59.4+13.7歳であった。47歳の女性を発端者とする家系においてはさらに2名のARVC症例が確認され、計7名の構成員の臨床評価と血液の採取を施行した。

desmoplakin遺伝子の解析においてはエクソン1からエクソン23までRampazzoら(Am J Hum Genet 71:1200, 2002)によるプライマーを用いてPCRを行い、直接塩基配列決定を行った。1名のARVC症例においてdesmoplakin遺伝子のexon 12におけるY494F変異を認めた。この変異は正常者50名において確認されなかった。またこのアミノ酸はヒト、マウス、ラットにおいて保存されているアミノ酸である。症例は49歳の男性であり、心室頻拍に対してICDの植え込みを行われている。

plakophilin-2遺伝子の解析においてはエクソン1からエクソン14までGerullら(Nat Genet 36:1162, 2004)によるプライマーを用いてPCRを行い、直接塩基配列決定を行った。エクソン12の前のイントロンに

挿入変異を、後のイントロンに欠失変異を認める症例が存在したが、この変異は対照症例にも認められ遺伝子多型であると考えられた。

また47歳の女性を発端者とする一家系において、7名の構成員(うち3名がARVC症例)の血液を用いて連鎖解析を施行した。ARVC1から7までの7箇所の遺伝子座について既報のマーカーを用いてPCR法により連鎖解析を施行した。ARVC1, 2, 4, 5, 6, 7においては連鎖は確認できなかった。ARVC3(14q12-22)に関しては連鎖を示唆する結果が得られさらに周辺のマーカーを用いて解析を施行し連鎖がさらに示唆された。

D. 考察

今回の研究でdesmoplakin遺伝子の新規の変異であるY494F変異を一例のARVC症例に確認した。desmoplakin遺伝子変異は拡張型心筋症、wooly hair、皮膚角化を呈し劣性遺伝をとる家系で報告され(Human Molecular Genetics 9:2761, 2000)、その後劣性遺伝のARVC家系(J Am Coll Cardiol 42:319, 2003)や、優性遺伝のARVC家系(Am J Hum Genet 71:1200, 2002)が報告された。優性遺伝のARVCの病因遺伝子変異はV30M、Q90R、W233X、S299R、R1775I、R1255K、R2834H、c.423-1G>Aの8種類が報告されている。今回新規の変異として報告するY494F変異はplakophilin やplakoglobinと結合する部位に存在し生理的に重要であると考えられる。

plakophilin-2遺伝子はARVCの11から27%に認められると報告されておりARVCの病因として頻度が高いものと考えられる。今回の検討ではplakophilin-2遺伝子変異が見られた症例はなかった。欧米と日本では病因遺伝子変異の特徴が異なる可能性がある。

ARVC3は14番染色体の14q12-q22にマップされているARVCの遺伝子座である。近傍の14q23-24にはARVC1がマップされ、その病因遺伝子は

transforming growth factor β -3遺伝子であることが明らかになっているが、ARVC3の病因遺伝子は未だに明らかではない。我々の一家系においてARVC3に連鎖が示唆されたことでARVC3の病因遺伝子を明らかにできる可能性がある。この付近に存在する候補遺伝子としてはMAP3K12-binding inhibitory protein遺伝子、kinectin遺伝子 β -spectrin遺伝子、 α -actinin遺伝子などがあり、解析を進める必要がある。

E. 結論

ARVCの一例においてdesmoplakin遺伝子のY494F変異を認めた。またARVCの一家系においてARVC3への連鎖が示唆された。

鹿児島県のARVCにおいてもdesmoplakin遺伝子変異が病因となる症例が存在すると考えられた。またARVCの病因は多様であることが確認された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

なし。

2) 学会発表

- ・阿南隆一郎, 浜崎秀一, 尾辻 豊, 鄭 忠和: 不整脈源性右室心筋症の分子遺伝学的研究. 日本人類遺伝学会第51回大会(ポスターセッション)(米子/2006年10月17-20日)
- ・Anan R, Takenaka T, Hamasaki S, Tei C: A novel missense mutation in desmoplakin gene that causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. 第71回日本循環器学会総会(Cardiomypathy, basic/clinical-6)(神戸/2007年3月15-17日)

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—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—

分担研究者： 豊岡 照彦(東北大学先進医工学研究機構生命機能分野教授)

＜研究要旨＞拡張型心筋症(DCM)の病態に関して、筆者らは心筋細胞のジストロフィン(Dys)の断裂後に脱落、変性・壊死に至る重症化機構を提言してきた(Toyooka, et al: PNAS, 2004; Kawada, et al: BBA, 2005)。今回はDysに限定せず、Dysと複合体を形成して細胞膜を強化していると予想される α 、 β 、 γ および δ -sarcoglycan(SG)の発現も含めて、重症心不全で心移植に至った症例の心筋試料を用いて検討した。その結果、Dysと、その関連タンパク(DAP)が全例で分断・減少して筆者らが報告した各種動物モデルでと同様の機序で心不全に至ることが示された。

A. 研究目的

心不全の重症化機構は未だ不明な部分が多く、その解明は拡張型心筋症の病態解明と治療開発に極めて重要である。従来、筆者らが用いた各種の心不全モデルについてDysと、その関連タンパク(DAP)が心不全の重症化とともに崩壊して行く病態を示したが、このプロセスがヒトにも共通した現象か厳密に検証する。

B. 研究方法

共同研究者が液体窒素下に保管していたヒト症例で心移植に至ったNYHA分類Ⅲ～Ⅳ度の最重症DCM(n=14)、虚血性心筋症(ICM, n=4)および重症心筋炎(n=6)患者の心摘出後に液体窒素保存の心筋標本の中で倫理委員会の承認が得られた試料を供与頂いた。平均年齢50.5才、対照には何らかの理由で移植に至らなかったドナー(n=3)からの心標本を用い、また正常ラット心筋を内部標準として、各タンパクの発現量を補正した。解析には筆者らが各SGの遺伝子をクローニングして塩基配列を決定後(Sakamoto, et al: PNAS, 1997)、演繹したアミノ酸配列のユニーク配列部分から作製したsite-directed antibodyと市販抗体を用いた。

C. 研究結果・考案

privacyの保護も有り、個別データの公表を控えるが、平均年齢はDCM群、ICM群、myocarditis群と対照群で、 48.9 ± 11.4 、 58.2 ± 6.2 、 42.3 ± 11.9 、 61.7 ± 4.2 才と若年者に心筋炎後の移植患者が多く、比較的高齢者のdonorも多い点が注目された。移植直前のLVEFは各群平均、 17.0 ± 5.0 、 11.7 ± 4.7 、 23.3 ± 11.7 、 60.0 ± 3.3 %とDCM群とICM群は低下が目立った。LVDdは各群平均、 71.5 ± 9.3 、

68.2 ± 10.0 、 64.5 ± 14.0 、 45.0 ± 6.0 mmとDCM群とICM群は拡大が顕著であり、LVEDPは各群平均、 30.9 ± 9.9 、 29.0 ± 3.7 、 30.0 ± 14.7 、 16.3 ± 9.8 mmHgと予想通りだったが、donorも脳死状態からの蘇生術施行後のためか、やや高めな場合が散見された。

免疫組織染色の検討は1人から約20箇所について行ない、Dysの崩壊した心筋細胞では現在進行中であるが、前回の班会議報告と同様、Dysの崩壊像がパッチ状に認められた(図1)。

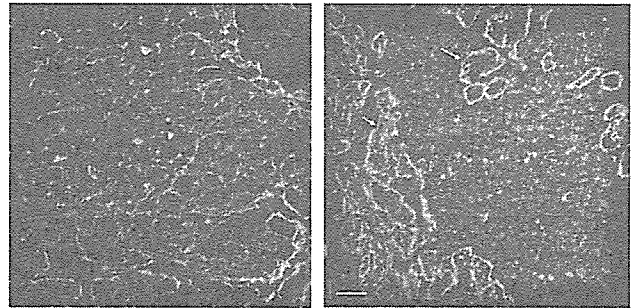


図1. 心筋標本の免疫組織染色像
(左：正常donor/右：虚血性心筋症の症例)

また、Western blottingによる発現量の検討結果、心不全症例の全例にDysの断裂と断片化が認められその像は必ずしも各SGの発現量とは相関しなかった。一部の症例はDysを全く発現せず、Duchenne、またはBecker型筋ジストロフィーとの合併を考えさせる興味深い所見を得た。

D. 結論

末期重症心不全では他のモデル動物と同様にDysと、その関連タンパクの崩壊が認められ筆者らが提唱する図2のschemeを支持する。

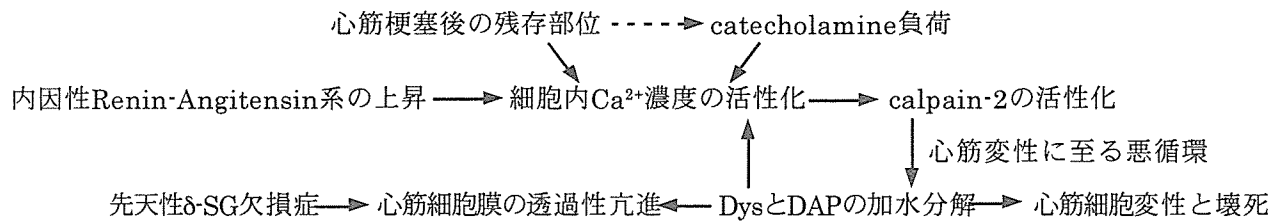


図 2

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, Toyo-oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 168:386-397, 2006.
- Yamazaki T, Suzuki J, Shimamoto R, Tsuji T, Ohmoto Y, Toyo-oka T, Omata M, Ohtomo K, Nagai R: Focalized contractile impairment at

hypertrophied myocardium proven in consideration of wall stress in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int Heart J* 47:247-258, 2006.

2) 学会発表

- Kumagai H, Toyo-oka T: A final common pathway for the progression of heart failure *via* dystrophin breakdown; a vicious circle involving calpain-2. International Academy of Cardiovascular Research (札幌/2006年7月14-16日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 豊岡照彦：calpain類の選択的RNAiノックダウン用cDNAによる医療・生物研究用ベクター(国際特許出願)(出願日：2007年1月5日/出願人：東北大学知財部)