

特発性心筋症に関する調査研究

—肥大型心筋症の突然死に関する研究—

分担研究者： 川名 正敏(東京女子医科大学附属青山病院循環器内科教授)

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

肥大型心筋症における突然死は临床上重要な問題である。今年度はこの問題について、2つのポイントから予後予測に関する研究を行ったので報告する。

研究1：肥大型心筋症の突然死評価におけるT-Wave Alternansの有用性について

A. 研究目的

肥大型心筋症(HCM)症例の突然死評価におけるT-Wave Alternans(TWA)と血清B-type natriuretic peptide(BNP)値の臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

当施設でHCMと診断された連続36症例にTWA(Cambridge Heart社製CH2000)と血清BNP値を測定後、突然死(心肺蘇生例と植込み型除細動器(ICD)の正常作動症例も含む)の頻度について検討した(平均観察期間=22±7ヶ月)。図1にTWA陽性の代表例を示す。

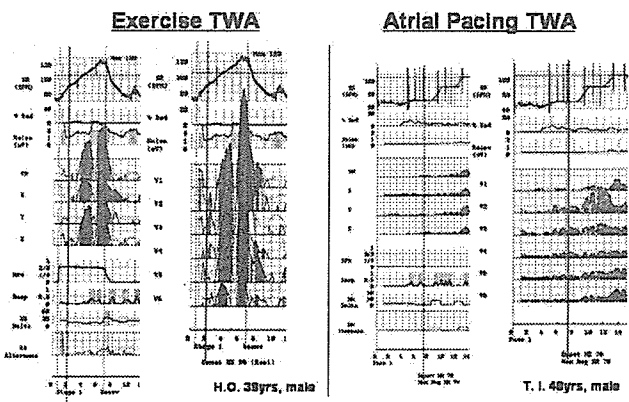


図1. Representative TWA Recordings in HCM Patients with Positive TWA

C. 研究結果

36症例のうち、TWA陽性は19症例、TWA非陽性は17例(陰性; 14例)であり、TWA陽性19症例中突然死は9例であった。一方、TWA非陽性17例では突然死は1例のみであった。図2にTWA陽性例、陰性例の突然死回避率の比較を示す。

TWA陽性19症例中突然死を認めた10例と認めなかった9例における血清BNP値では、突然死症例のBNPが有意に高値であった(515 vs. 130 pg/mL, p=0.004)。

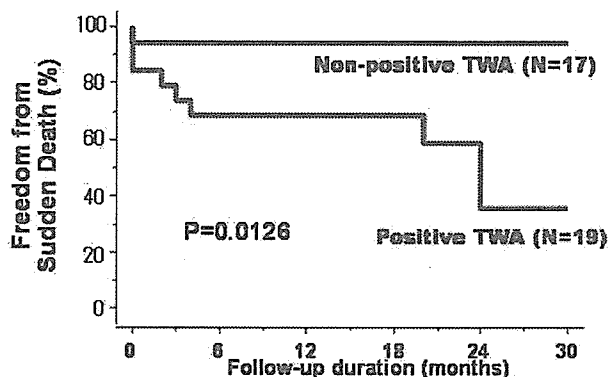


Figure: HCM patients with positive TWA-results (red line) had a significantly higher rate of sudden death than those with non-positive TWA-results (black line).

図2. Kaplan-Meier Survival Curves for Sudden Death in HCM Patients: A Comparison Between Positive TWA and Non-positive TWA

さらに、TWA陽性と血清BNP≥50 pg/mLの2つを併用した評価法の突然死症例の予測率は、感度: 80%、特異度: 100%、陽性的中率: 100%、陰性的中率: 93%であった(図3)。

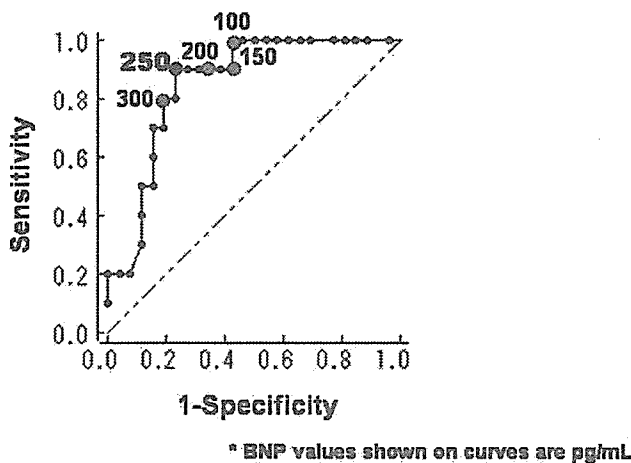


図 3. ROC Curve of BNP for Discriminating HCM Patients with Sudden Death from Without Sudden Death

D. 考察

突然死に対する精度の高いリスク評価は、現在その適用が急速に広がっている植え込み型除細動器の適応基準を決める上でも極めて重要な事項である。これまでは侵襲的な電気生理学的検査と心機能が主な評価項目になっていたが、ごく最近虚血性心疾患におけるTWAの有用性もいくつか報告されており、今後他の病態についても検討していく必要がある。

E. 結論

HCM症例において、TWAと血清BNP値を併用した評価法はHCM突然死症例を鑑別するのに有用であると考えられた。

F. 研究発表

・ American Heart Association Scientific Sessions 2006

G. 知的財産権出願・登録状況

なし。

研究 2：肥大型心筋症の突然死における心房細動の臨床的意義

A. 背景

肥大型閉塞性心筋症では心房細動AFの存在は心血管死のリスクが高まることが報告されているが、肥大型非閉塞性心筋症N-HCMにおける心房細動の臨床的意義については不明な点が多い。

B. 研究目的

N-HCMにおけるAFの長期予後に対する影響を明らかにすること。

C. 研究方法

当施設で観察した350例のN-HCM(診断時平均年

齢49歳)について、平均13年の追跡期間中のHCM関連イベント(脳卒中、失神、心不全)、HCM関連死亡(突然死、心不全死、脳卒中による死亡)を調査して、AFがN-HCMの長期予後、特に突然死関わる影響について解析した。

D. 研究結果

350例のN-HCMのうちAFが104例(30%)に認められた(発作性AF:87例、持続性・永続性AF:17例、平均年齢51歳)。残りの246例では追跡期間中にAFは見られなかった(平均年齢48歳)。AFが認められた例は認められなかった例に比べて、有意にHCM関連イベント・死亡が多かった(順に60.6% vs. 19.9%; $p < 0.001$, 13.5% vs. 6.9%; $p = 0.025$)。さらに、図4に示すように突然死を起こす確率はAF群で有意に高かった($p = 0.027$)。

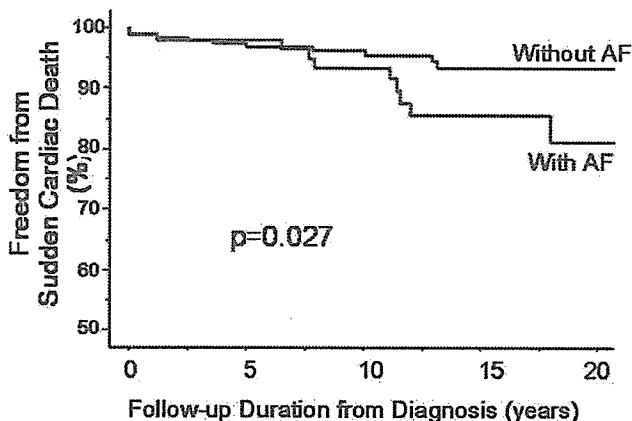


図 4. Probability of Sudden Cardiac Death in HCM Patients with and Without AF

E. 考察

AFがHCM症例の予後、特に心不全・脳卒中発症に関わることはこれまで報告されていたが、今回の検討でAFがN-HCMにおいても突然死発症に関わる事が明らかになった。

F. 結論

N-HCMでは、AFの存在は突然死を含む長期予後の重要な予測因子である。

G. 研究発表

・ Heart Rhythm Scientific Sessions 2006

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

梶本克也

(東京女子医科大学附属成人医学センター)

河原井浩孝

(東京女子医科大学附属八千代医療センター)

八代 文, 寺島 豊, 石塚尚子, 萩原誠久, 笠貫 宏

(東京女子医科大学循環器内科)

特発性心筋症に関する調査研究

—心拒絶反応におけるPPAR γ の役割と治療への応用—

研究協力者： 磯部 光章(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学教授)

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

A. 研究目的

治療に奏効しない重症心不全に対して心臓移植が施行され、良好な成績をもたらしているが、一方で拒絶反応は大きな問題として残っている。さらなる予後の改善には急性拒絶反応だけではなく、冠動脈硬化を特徴とする慢性拒絶反応の制御が重要である。また、PPAR γ (ペルオキシゾーム増殖剤活性化型受容体のサブタイプ)が炎症反応制御に重要な役割を果たしており、PPAR γ アゴニストの投与により粥状硬化、自己免疫性心筋炎、血管傷害後内膜肥厚の進展を抑制することが報告されている。我々は、慢性および急性拒絶反応の病態におけるPPARの働きを検討し、さらにその作用増強に治療、予防効果があるか否かについて、PPAR γ アゴニストを用いて検討した。

B. 研究方法

急性拒絶反応としてフルミスマッチ(B6とBalb/c)、慢性拒絶反応である冠動脈硬化を検討するためにクラスIIミスマッチ(B6とbm12)の組合せを用いてマウス異所性心移植モデルを行った。PPAR γ アゴニストとしてピオグリタゾンを用い、経口投与した。普通食群とピオグリタゾン投与群(3mg/kg/day)に分け、ピオグリタゾン投与群では、移植後1日前からピオグリタゾン投与を開始した。移植心を用いて免疫染色、RNA protection assayを行い、炎症細胞浸潤やサイトカイン産生について検討した。In vitroでのピオグリタゾンの効果を検討するため、リンパ球混合試験(MLR)、平滑筋増殖試験を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

急性拒絶モデルにおいて、ピオグリタゾン投与群(34.6 \pm 7.8日)は普通食群(8.4 \pm 0.4日)と比較し著明な移植心生着の延長を認めた。ピオグリタゾンは、移植後5日目の移植心におけるCD4, CD8, CD11b陽性細胞の浸潤を抑制した。また、ピオグリタゾン投与マウスでは、移植後5日目の移植心におけるIFN- γ 、MCP-1の発現を抑制した。心移植後のマウスの脾細胞を用いたMLRでは、濃度依存性にピオグリタゾン投与によりT細胞増殖は有意に抑制された。MLRの上清を用いてサイトカインを測定したところ、ピオグリタゾン添加によりIFN- γ 、MCP-1の産生は抑制された。慢性拒絶モデルにおいてピオグリタゾンは冠動脈の新生内膜肥厚を著明に抑制したが(血管閉塞率：25.1 \pm 8.8% versus 65.8 \pm 7.3%;)、線維化領域は両群に差はみられなかった。ピオグリタゾンは移植心におけるCD4, CD8, CD11b陽性細胞の浸潤を抑制し、IFN- γ 、IL-10、MCP-1の発現を抑制した。活性化脾細胞と平滑筋細胞の共培養により平滑筋の増殖が誘導されるが、ピオグリタゾンはこの平滑筋増殖反応を抑制した。また、培養上清を用いたサイトカイン測定では、ピオグリタゾン添加によりIFN- γ 、MCP-1の産生は抑制されていた。

D. 考察

炎症は、接着因子の発現やマクロファージやT細胞などの炎症細胞浸潤などで特徴づけられる。PPAR γ アゴニストが炎症制御に重要な役割を果たしていることが多く報告されている。In vitroにおいて接着因子の発現低下、サイトカイン産生低下がみられるのみならず、粥状硬化、自己免疫性心筋炎、血管傷害後内膜肥厚の進展を抑制する。今回の検討により心移植後の拒絶反応に対しても、PPAR γ

アゴニストが効果的であることが示された。拒絶反応は炎症反応に伴い接着因子増強、サイトカイン産生増加により悪化がみられるが、ピオグリタゾンはIFN- γ 、MCP-1産生低下により炎症を抑制して拒絶反応を制御していると考えられた。しかし、慢性拒絶モデルではTh2サイトカインであるIL-10の産生低下もみられた。Th2サイトカインは移植臓器の生着延長や免疫寛容に重要な役割を果たすことが知られているが、IL-10活性の阻害が新生内膜肥厚を抑制しない報告もあり、今後の検証が必要である。

ピオグリタゾンは現在臨床において抗糖尿病薬として使用されている薬剤であるが、今回の検討での投与量では血糖への影響は見られなかった。今後移植医療への応用を進めるため、更なる検討が必要となる。

E. 結論

ピオグリタゾンは、免疫反応や平滑筋増殖反応抑制を通じて移植心生着延長、新生内膜肥厚抑制を誘導すると考えられた。移植後拒絶反応の制御にピオグリタゾンが有用であ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

- Isobe M, Kosuge H, Suzuki J: T cell costimulation in the development of cardiac allograft vasculopathy; potential targets for therapeutic interventions. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 26:1447-1456, 2006.
- Isobe M, Futamatsu H, Suzuki J: Hepatocyte growth factor; effects on immune-mediated heart diseases. *Trend Cardiovasc Med* 16:188-193, 2006.
- Izawa A, Sano K, Takehara M, Inobe M, Suzuki J, Oka T, Imamura H, Kubo K, Takahashi M, Ikeda U, Amano J, Isobe M, Uede T: Adenovirus vector containing CTLA4IgG induces clinically relevant immunosuppression via Cre/LoxP-mediated gene recombination. *Cardiovasc Res* 69:289-297, 2006.
- Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kinoshita N, Yazaki Y, Isobe M: Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 47:2319-2325, 2006.
- Kosuge H, Haraguchi G, Koga N, Maejima Y, Suzuki J, Isobe M: Pioglitazone prevents acute and chronic cardiac allograft rejection. *Circulation*

113:2613-2622, 2006.

- Futamatsu H, Suzuki J, Koga N, Adachi S, Kosuge H, Maejima Y, Haga T, Hirao K, Horuk R, Isobe M: A CCR1 antagonist prevents the development of experimental autoimmune myocarditis in association with T cell inactivation. *J Moll Cell Cardiol* 40:853-861, 2006.
- Kosuge H, Suzuki J, Haraguchi, Koga N, Maejima Y, Inobe M, Isobe M, Uede T: Critical role of inducible costimulator (ICOS) in the development of arteriosclerosis and atherogenesis. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 26:2660-2665, 2006.
- Suzuki J, Koga N, Isobe M: Pitavastatin suppresses acute and chronic rejection in murine cardiac allografts. *Transplantation*, 2007 (in press).

2) 学会発表

- Isobe M: Role of T cell activation in vascular remodeling. 2nd World Congress 2006 International Academy of Cardiovascular Sciences (Symposium 12: Atherosclerosis and Coronary Heart Diseases)(Sapporo, Japan/ July 15, 2006)
- Suzuki J, Kawauchi M, Ogawa M, Isobe M: Accurate and early diagnosis of acute and chronic rejection by expression of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in cardiac allografts of non-human primates. *World Transplantation Congress (Boston, USA/July 24, 2006)*
- Okada H, Ogawa M, Isobe M: Increased growth factors are associated with attenuation of experimental autoimmune myocarditis by transplantation of bone marrow cells in rats. *AHA Scientific Meeting 2006 (Chicago, USA/November, 2006)*
- Maejima Y, Adachi S, Ito H, Isobe M: Induction of premature senescence in cardiomyocytes by oxidative stress as a novel mechanism of myocardial dysfunction. *AHA Scientific Meeting 2006 (Chicago, USA/November, 2006)*
- Kosuge H, Maejima Y, Suzuki J, Adachi S, Isobe M: Telmisartan attenuates chronic allograft rejection via PPAR γ activity. *AHA Scientific Meeting 2006 (Chicago, USA/November, 2006)*

H. 知的財産権出願・登録状況

- Derived piperazine inhibitors of chemokines and their use for it treats the myocarditis (米国特許本出願中: 60/497,380/ヨーロッパ特許出願中: 04781936.2-2123-US2004027343/アルゼンチン・チリ・ペルー・ベネズエラ出願中)

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋虚血再灌流障害に対するG-CSFの心臓保護作用についての検討—

研究協力者： 小室 一成(千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授)

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

ランゲンドルフ装置を用いてラット心を灌流し、35分間の虚血後120分間の再灌流を行った。左室内にバルーンを留置し左室収縮期圧と拡張期圧を測定した。梗塞サイズはtriphenyltetrazolium chloride(TTC)染色にて計測した。G-CSFによるシグナル伝達経路を検討するため、再灌流15分後の心臓を用いウエスタンブロット法にて解析した。また、G-CSFにより活性化されるシグナル経路の役割を検討するため、PI3K(LY29002, 5 μ M)、Jak2(AG490, 5 μ M)、MEK(PD98059, 10 μ M)、NOS(L-NAME 30 μ M)の各阻害薬を再灌流前より投与してからG-CSFを投与し梗塞サイズを調べた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

G-CSF(10, 50, 300ng/mL)の投与により濃度依存的に再灌流後のleft ventricular developed pressure(LVDP)は有意に改善し、TTC染色で計測した梗塞サイズは有意に縮小した。G-CSF投与群では、再灌流15分後の心臓におけるJak2、STAT3、ERK、Akt、eNOSのリン酸化とNOの産生量が有意に増加した。G-CSFによる梗塞サイズの縮小効果はLY294002、AG490、L-NAMEにより抑制されたが、

PD98059では抑制されなかった。G-CSFによりJak2>PI3K>Akt>eNOS、の順で活性化されるシグナルが心臓保護作用に関与していた。

D. 考察

我々はこれまでG-CSFを急性心筋梗塞後から投与することにより、その後の心臓リモデリングや心不全を抑制することを報告してきた。その機序の1つとして、心筋細胞に対する直接作用が特に重要であることを明らかにした。マウスの急性心筋梗塞モデルを用いた研究により、G-CSFは心筋細胞内のJak2-STAT3経路を活性化することによりアポトーシスを抑制した。今回の研究では灌流心を用いることにより、幹細胞の動員作用等が関与しない実験系で心臓に対する直接作用を調べることができた。今回の研究結果から、G-CSFは虚血再灌流後の心臓にも直接作用することや、再灌流後からの投与でも心臓保護作用(postconditioning-like effect)をおよぼすことが示された。また、虚血再灌流後の急性期におけるG-CSFの心臓保護作用にはAkt-eNOSの活性化を介したnon-genomicな作用も重要である可能性が示唆された。

E. 結論

虚血再灌流障害に対し、G-CSFは再灌流後からの投与でも直接的な心臓保護作用をおよぼすことが明らかになった。G-CSFによる急性の心臓保護作用はnon-genomicであり、特にAkt-eNOSシグナル伝達経路の活性化が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Takano H, et al: Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 84:185-193, 2006.
- Hasegawa H, et al: Intracoronary injection of G-CSF ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J* 70:942-944, 2006.
- Hasegawa H, et al: G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 344:370-376, 2006.
- Hasegawa H, et al: Cardioprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor in swine with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 47:842-849, 2006.
- Ueda K, et al: G-CSF directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:108-113, 2006.
- Takano H, et al: Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006 (in press).

2) 学会発表

- Hasegawa H, et al: Granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of

atherosclerosis. 3rd Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences-Translation of Basic Insights Into Clinical Practice (Keystone)(USA/July 31-August 4, 2006)

- Ueda K, et al: G-CSF directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS pathway. 3rd Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences-Translation of Basic Insights Into Clinical Practice (Keystone)(USA/July 31-August 4, 2006)
- Niitsuma Y, et al: Erythropoietin (Epo) has direct cardioprotective effects on post-MI hearts through Epo-Epo receptor system in cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions (Dallas, USA/November 13-16, 2006)
- Takano H, et al: Cardioprotective effects and molecular mechanisms of G-CSF on LV remodeling and dysfunction after AMI. 23rd Annual Meeting, Japanese Section of the International Society for Heart Research (Chiba, Japan/December 1-2, 2006)

H. 知的財産権出願・登録状況
なし。

<研究協力者>

高野博之, 上田和孝, 長谷川 洋, 新妻ゆり子
(千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究協力者： 廣江 道昭(国立国際医療センター腎臓・循環器科部長)

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

研究の目的

臓器などに炎症が生じると細胞成分が主体となる再構築前期を経て、線維化が主体となる再構築後期へ向かうが、テネイシンCはこの一連の過程の再構築前期に特徴的に出現する細胞性基質タンパク(matricellular protein)であり、組織リモデリングの方向性と進行速度を決定づけると考えられている。ELISA法によるテネイシンC測定系を開発し、急性心筋梗塞後の患者において血清テネイシンCは、左室リモデリングの発症を予測し得るバイオマーカーであり、かつ心事故などの予後推定にも有用であることを報告した(JACC 47:2319-2325, 2006)。さらに拡張型心筋症患者(DCM)では、NYHA心機能分類の重症度、左室拡大・機能障害と関連してテネイシンCが有意に上昇していることも判明した(Circ J, 2007 (in press))。しかしながら、血清テネイシンCがDCM患者の予後を予測できるかどうかについてはいまだ検討されていない。

A. 研究目的

心不全にて入院したDCM患者において、入院時の血清テネイシンC値が、心不全増悪による再入院を予測できるかどうか検討する。

B. 研究方法

対象は三重大学附属病院に心不全の精査加療目的にて入院したDCM患者のうち、カテーテル検査を受け、書面によるインフォームドコンセントにて本研究に同意された連続60人であり、平均年齢は58±14歳、男性が73%であった。右心カテーテル検査、冠動脈造影、左室造影、及び心筋生検後、2Frマイクロチップマンメーターと6Frコンダクタンスカテーテルを用いて左室機能と血行動態を評価し、血清テネイシンC値を測定した。退院後平均39±23(4~82)月のフォローアッ

プ期間の後に、ROC曲線を用いて心不全増悪による再入院に関してのカットオフ値を設定した。

C. 研究結果

検査時の平均左心駆出率は 0.31 ± 0.1 、平均BNPは 273 ± 304 pg/mlであった。ROC曲線を用いて、血清テネイシンCのカットオフ値を98ng/mlと設定した(感受性88%、特異度81%、AUC(曲線下面積)0.81)。DCM患者を高テネイシンC群(126 ± 34 ng/ml, n=16)と低テネイシンC群(53 ± 22 ng/ml, n=44)の二群に分類した。高テネイシンC群の7例(44%)、低テネイシンC群の1例(2%)が心不全増悪により再入院した。右心カテーテルデータでは、収縮期肺動脈圧(42 vs. 29mmHg, $P < 0.05$)、拡張期肺動脈圧(17 vs. 11mmHg, $P < 0.05$)、平均肺動脈圧(26 vs. 18mmHg, $P < 0.05$)、収縮期右室圧(41 vs. 29mmHg, $P < 0.05$)は高テネイシンC群が高値であったが、肺動脈楔入圧(16 vs. 10mmHg, $P = 0.06$)、右房圧(5 vs. 4mmHg, $P = \text{NS}$)には差を認めなかった。高テネイシンC群では、左室拡張末期容積(234 ± 79 vs. 186 ± 50 ml)と左室収縮末期容積(169 ± 70 vs. 130 ± 48 ml)が低テネイシンC群と比較して高値であった。しかしながら、一回拍出量、左室駆出率や左室収縮末期エラストランスなど左室収縮能を反映する指標、左室弛緩の時定数や左室stiffnessや左室拡張末期圧のような左室拡張能を反映する指標、大動脈実効エラストランスや末梢血管抵抗のような後負荷を反映する指標には有意差を認めなかった。

D. 考察

今回、我々はDCMにおいて血清テネイシンの上昇と心機能及び血行動態と対比したところ、左室のリモデリングを反映していることが示唆された。血清テネイシン増加の機序に関しては、左室のリモデリングの進展に伴う因子だけではなく、肺うっ血による肺からの

因子があげられ、今後の検討の余地が残る。しかし、血清テネイシンは心不全による再入院を血清BNPとは違う側面から予測でき、組み合わせあるいは区別化により、より精度の高い心不全の予後予測については、治療法の確立に寄与する可能性があると考えられる。

E. 結論

DCM患者において、血清テネイシンCは左室リモデリングの進展を反映し、心不全増悪による再入院を予測しうると考えられた。今後、テネイシンCは、新しい炎症・リモデリングのバイオマーカーとして、炎症性心筋症(急性・慢性心筋炎、心サルコイドーシスな)の診断・炎症活性度の評価などに臨床応用が期待できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1)論文発表

- Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, Hiroe M, and Imanaka-Yoshida K: 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).
- Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Tsukada B, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T, Kitaura Y, Kitabatake A,

Study Group for Intractable Diseases by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan: Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J*, 2007 (in press).

- Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Isobe M, Kawase D, Kinoshita N, Yazaki Y, Hiroe M: Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 47:2319-2325, 2006.

2)学会発表

- Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Katashima T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Kitaura Y: Tenascin-C is a novel marker of ongoing inflammation in idiopathic dilated cardiomyopathy. The American Heart Association Scientific Session (Chicago, USA/November 12-15, 2006)

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

<研究許力者>

大西勝也

(三重大学大学院医学系研究科臨床検査医学)

今中一吉田恭子, 吉田利通

(三重大学大学院医学研究科修復病理学)

拘束型心筋症に見出されたミオパラジン変異の解析

研究協力者 木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨 拘束型心筋症は特発性心筋症の一病型であり、その病態には肥大型心筋症や拡張型心筋症との類似性があるが、心筋サルコメア・Z帯異常との関連が明らかになっている肥大型心筋症や拡張型心筋症と比較すると、その病因には不明な点が多い。本研究では、拘束型心筋症の病因を解明するために、心筋サルコメア・Z帯の構成要素であるミオパラジンに特に着目した変異検索を行った。その結果、いずれも心臓移植を受けた拘束型心筋症の同胞発症例に終止変異(Gln529ter)を見出した。同胞発症の2名のいずれもが変異のヘテロ接合体であったが、当該変異は一般集団中には認められないため、これらの症例の病因であることを示唆する。ミオパラジン異常はこれまでに報告がないことから、正常あるいは変異ミオパラジンを作製しラット心筋細胞に導入したところ、変異ミオパラジンによって心筋サルコメアの整合性異常が生じることが判明した。また、この変異ミオパラジンの効果は正常ミオパラジンの機能を dominant-negative に抑制するものであった。さらに、心筋サルコメア整合性異常はこれらの拘束型心筋症症例の心筋組織にも観察された。これらのことから、ミオパラジン変異は家族性拘束型心筋症の病因であると考えられた。

A. 研究目的

これまでの研究で特発性心筋症、特に肥大型心筋症(HCM)や拡張型心筋症(DCM)では、心筋サルコメアないしZ帯構成要素の遺伝子異常が病因となることが明らかになっている。一方、拘束型心筋症(RCM)においても一部の多発家系で遺伝子異常が報告されている。すなわち、RCM様の病態を呈するDCM多発家系におけるデスミン遺伝子異常、HCM様の病態を呈するRCM多発家系における心筋トロポニンI異常などである。しかしながら、我々はわが国におけるRCM患者集団の遺伝子解析を行ったが、それらの原因遺伝子には変異が見出されず、病因が不明のままである。そこで本研究では、RCMにおける病因変異を同定することを目的として、家族性RCM症例を対象とした心筋サルコメアないしZ帯構成要素群の遺伝子変異検索を行った。ことに、新規の原因候補遺伝子として、最近サルコメアの整合性維持に関わる新規要素として報告されたミオパラジンに着目した研究を行った。また、HCMおよびDCMにおいてもミオパラジン変異を検索した。

B. 研究方法

1) RCM症例6名を対象として既知の家族性心筋症原因遺伝子であるサルコメア構成要素遺伝子群についてSSCP法を用いて変異を検索した。異常SSCPパターンが観察された場合にはダイレクトシーケンシングによって変異を確認した。また、ミオパラジン遺伝子については、ダイレクトシーケンシ

ングによって変異を検索した。さらに、既知の心筋症原因遺伝子群に変異が見出されないHCM症例96名、DCM症例48名についてもミオパラジン変異を検索した。なお、ランダムに選択した健常者集団320名を対照とした。

2) ミオパラジン変異が見出されたRCM症例の心臓組織におけるミオパラジンの遺伝子レベルおよびタンパクレベルでの発現をRT-PCR法および免疫組織染色でそれぞれ検討した。

3) ミオパラジン変異による機能変化を検討するために、正常および変異ミオパラジンをラット心筋培養細胞に導入し、サルコメア形成を免疫組織染色法によって検討した。

【倫理面への配慮】

本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。[研究課題「肥大型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」、「拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」(いずれも平成16年4月23日研究計画承認、および平成18年7月6日継続研究承認)]

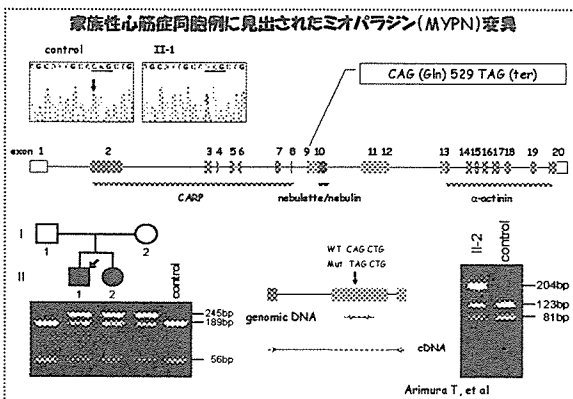
C. 研究結果

1) RCM患者における既知の心筋症原因遺伝子群における変異の検索

RCM 発端患者6名について既知の心筋症原因遺伝子群の変異を検索した結果、1例にミオシン重鎖遺伝子 (*MYH7*) のミスセンス変異 (Asn444Ser) を見出した。この変異は一般健常者集団には認められないが、ミオシン重鎖の進化上よく保存されたアミノ酸残基の変異であり、また発端患者の子 (HCM) に遺伝していた。このことから、*MYH7* ミスセンス変異は HCM 様病態を呈する RCM の病因となることが強く示唆された。一方、他の5名の RCM 発端患者には変異が検出されなかった。

2) RCM 患者におけるミオパラジン変異の検索

既知の心筋症原因遺伝子群に変異が検出されなかった RCM 患者5名、HCM 患者96名、DCM 患者48名を対象としてミオパラジン遺伝子変異を検索した。その結果、RCM のため心臓移植を受けた発端患者1名に終止変異 (Gln529ter) を見出した。この変異は発端患者の同胞で、やはり RCM のため心臓移植を受けている患者にも見出された。家系解析の結果、この変異は母親由来であることが判明したが、母親には大動脈閉鎖不全はあるが心筋症病態は認められなかった。一方、終止変異のあるアリルは同胞 RCM 患者の摘出心で発現していた。このことから、本終止変異は nonsense-mediated decay を起こすような変異ではないことが明らかとなった。



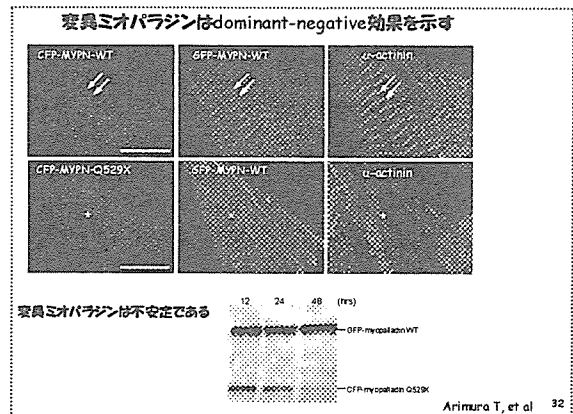
3) 変異ミオパラジンによる機能異常の検討

ミオパラジンは心筋におけるサルコメア整合性維持重要な役割を果たすことが報告されている。

そこで、ミオパラジン終止変異による心筋の構造あるいは機能異常を検討するために、正常ミオパラジンおよび変異ミオパラジンを作製し、ラット心筋初代培養細胞に遺伝子導入した。その結果、変異ミオパラジン遺伝子を導入した心筋細胞ではサルコメア形成が著しく阻害されたが、正常ミオパラジン遺伝子を導入した場合にはそのような変化は認められなかった。

さらに、RCM 患者がいずれもミオパラジン変異のヘテロ接合であったことから、正常ミオパラジン遺伝子と変異ミオパラジン遺伝子を1:1の割合で混ぜてラット心筋細胞に導入したところ、サルコメア形成異

常が認められた。また、ウエスタンブロッティングにより、変異ミオパラジンタンパクは正常ミオパラジンと比較して不安定であることが判明した。このことから、本終止変異は dominant-negative にミオパラジン機能を抑制することが強く示唆された。



D. 考察

本研究でわが国の RCM の発端患者6名中2名にミオシン重鎖変異あるいはミオパラジン変異を検出した。いずれの変異とも家系内で疾患と共分離していることから RCM の病因変異であると考えられたが、特にミオパラジン変異についてはラット心筋細胞への遺伝子導入実験によって、これがサルコメア整合性異常をもたらすことを明らかにした。なお、本変異は心筋症を発症していない母親に由来するものであったが、母親がなぜ発症していないのかについては不明である。RCM の発症にはミオパラジン変異に加えて、さらになんらかの要因が必要である可能性が示唆される。

E. 結論

家族性 RCM 患者2名に見出されたミオパラジン終止変異はサルコメアの整合維持を障害することによって RCM の病因となることが強く推定される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Aizawa Y, Mitsuma W, Ikrar T, Komura S, Hanawa H, Miyajima S, Miyoshi F, Kobayashi Y, Chinushi M, Kimura A, Hiraoka M, Aizawa Y: Human cardiac ryanodine receptor mutations in ion channel disorders in Japan. *Int J Cardiol*, in press (Jul. 13 Epub ahead of print)

3) Kimura A, Takahashi M, Choi B-Y, Bae S-W, Hohta S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Naruse T, Izumi T, Park J-E: Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and

myocardial infarction in Japanese and Korean populations. *Tissue Antigens*, in press

2. 学会発表

1) Kimura A: Molecular etiologies and functional alterations found in hypertrophic cardiomyopathy and related diseases. The 2nd World Congress 2006 International Academy of Cardiovascular Sciences, Welcity Sapporo, Sapporo, July, 2006.

2) Kimura A, Hinohara K, Nakajima T, Shibata H, Tanaka Y, Takahashi M, Yasunami M, Honda S, Sasaoka T, Izumi T: Genome-wide microsatellite association study to identify the disease-related loci for myocardial infarction in Japanese. The 9th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Samsung Medical Center, Seoul, September, 2006.

2) Kimura A: Molecular Pathogenesis of Cardiomyopathies. The 3rd Nikko International Symposium 2006. Frontier Medical Science: from Bench to Clinic, MU Information and In-service Training Center, Shimosuke, October, 2006.

3) Kimura A: Human genome diversity in etiology and pathogenesis of cardiomyopathy and heart failure. The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Nagoya Congress Center, Nagoya, March, 2006.

4) Wu LM, Ueda K, Kurokawa J, Yasunami M, Kimura A, Hiraoka M, Fukukawa T: Protein tyrosine kinase, c-Src, regulates gating properties and membrane trafficking of the HERG channel via different mechanisms. The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Nagoya Congress Center, Nagoya, March, 2006.

5) Arimura T, Takahashi M, Nunoda S, Kimura A: Identification of a novel disease gene for restrictive cardiomyopathy. The 70th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Nagoya Congress Center, Nagoya, March, 2006.

6) 大谷仁志、安波道郎、有村卓朗、寺崎文生、北浦泰、清水賢巳、木村彰方: 家族性肥大型心筋症 (FHCM) の新しい原因遺伝子座は HLA 領域にマップされる。第 15 回日本組織適合性学会大会、東京、2006 年 9 月。

7) 中島敏晶、高橋めぐみ、陣智勇、太田正穂、勝山善彦、成瀬妙子、岩井武尚、木村彰方: HLA 領域内バリエーション病感受性遺伝子のマッピング。第 15 回日本組織適合性学会大会、東京、2006 年 9 月。

8) 有村卓朗、布田伸一、寺崎文生、北浦泰、木村彰方: ミオパラディン変異は心筋 Z 帯/サルコメア整合性異常を介して拘束型心筋症を引き起こす。日本人類遺伝学会第 51 回大会、鳥取、2006 年 10 月。

9) 稲垣夏子、有村卓朗、柴田宏樹、林丈晴、高橋めぐみ、日野原邦彦、寺岡邦彦、近森大志郎、山科章、木村彰方: 拡張型心筋症に関連する

Cypher/ZASP 変異の機能異常。日本人類遺伝学会第 51 回大会、鳥取、2006 年 10 月。

10) 木村彰方: 心不全・心筋症の分子病因と病態形成機序。ゲノム創薬フォーラムシンポジウム、東京、2006 年 11 月。

G. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

特発性心筋症に関する調査研究

-細胞シート間の電気的相互作用の解析-

研究協力者： 岡野 光夫(東京女子医科大学先端生命医科学研究所教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返して行われてきた。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

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いた様々な細胞シートの作製に成功している。細胞外マトリクスが無傷で存在する細胞シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。温度応答性培養皿を用い、得られた積層化筋芽細胞シート的心筋梗塞動物モデルへの移植実験では心機能の改善が認められた。一方で、*in vitro*で筋細胞と筋芽細胞を共培養することにより不整脈が認められることが報告されている。本研究では、筋芽細胞シート移植による心筋組織の不整脈の出現の可能性の有無を*in vitro*で調べることで、および不整脈が起こる可能性をゼロに近づけることを目的に、心筋シートと筋芽細胞シートが電気的に結合するのか、また電気活動をする組織同士が相互作用しなくなる距離的限界を「細胞シート工学」を用いて調べた。

B. 研究方法

1)細胞シートの調製

新生仔ラット由来の心筋細胞、ヒト筋芽細胞、マウスNIH3T3線維芽細胞、ヒトHeLa細胞を温度応答性培養皿に播種した。そして3 - 5日間培養後、培養皿を20℃で低温処理することによりシート状に細胞を脱着させ、得られた細胞シートを以下の実験に用いた。

2)積層化細胞シート間の電気的相互作用の解析

最初に心筋シートを64個の平面微小電極がパターンニングされたプローブ上に乗せ、さらにその上に筋芽細胞シート、線維芽細胞シートあるいはHeLa細胞シートを乗せた。そして最後にさらにもう1枚心筋シートを重ねた。すなわち2枚の心筋シートで非心筋細胞シートを挟む形になる。そして上下2枚の心筋シートが電気的に結合するかどうか

を、またもし結合するのならば結合するまでの時間を、多点細胞外電位記録システムで経時的に測定した。また1枚の心筋シートに電気刺激を与え、生じた誘発電位が非心筋細胞シートを伝播し、もう1枚の心筋シートに伝わるか観察した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

心筋シート-非心筋シート間の電気的結合性の検出:最初に2枚の心筋シート間に1枚の筋芽細胞シート、線維芽細胞シートまたはHeLa細胞シートを挟んだ3次元組織内における細胞シート同士の電気的相互作用を解析した。重層した直後の2次元電位分布を調べると、2枚の心筋シートは別々の周期の電気活動を示した。さらにこれらの組織の活動電位の経時的変化を解析したところ、筋芽細胞シートまたは線維芽細胞シートを挿入した場合、上下2枚の心筋シートはそれぞれ 904 ± 41 分($n=4$)、 113 ± 12 分($n=5$)で電気的に結合した。次に1枚の心筋シートに電気刺激を与え、生じた誘発電位の伝播についても経時的に観察した。電気刺激により1枚の心筋シートで生じた誘発電位は積層直後には、もう1枚の心筋シートに伝わらなかった。しかし上下2枚の心筋シートの自発電位が同期した後は、1枚の心筋シートで生じた誘発電位はもう一方の心筋シートに伝播することが確認された。これらの結果は、心筋シートの電気的興奮が、筋芽細胞シート、線維芽細胞シートを介して伝播されることを示している。一方、ギャップ結合を持たないHeLa細胞シートを心筋シート間に挟んだ場合は、2枚の心筋シートは24時間後でも電気的に結合しなかった。次に心筋シートに挿入する筋芽細

胞シートあるいは線維芽細胞シートの枚数を増やし、心筋シート同士が電氣的に結合できる限界を調べた。すると筋芽細胞シートは2枚、また線維芽細胞シートは3枚挿入すると上下2枚の心筋シートは電氣的に結合しなくなった。

D. 考察・結論

今回、心筋細胞は、筋芽細胞と電氣的に結合することを示す結果が得られた。これらの結果は、移植時において筋芽細胞は心筋細胞と電氣的に結合し、もし移植した筋芽細胞に自発活動電位が生じたら、心筋組織に不整脈を起こす可能性があることを示している。実際に、*in vitro*で心筋細胞と筋芽細胞を共培養することにより不整脈が認められることが報告されている。しかし臨床において、筋芽細胞シートを心臓に移植する場合、結合組織等により心筋細胞とは物理的に距離がおかれることから、電氣的に結合し不整脈を起こる可能性は低い。実際に今回の結果において、電気活動をする組織同士は、電氣的に不活性と思われるHeLa細胞シートではシート1枚の距離で、また、活動電位を伝播できる細胞シート(筋芽細胞シート、線維芽細胞シート)でもシート2枚あるいは3枚の距離をおくことにより相互作用しなくなった。そこで筋芽細胞シートを移植する場合、電氣的に不活性な細胞シートあるいは採取および培養が容易な線維芽細胞から作製した線維芽細胞シートを使うなどして心筋細胞と筋芽細胞シートの間

離をさらに置くことにより、電氣的に結合させないようにすれば不整脈の起こる可能性をさらに低める事ができるものと思われる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1) 論文発表

なし。

2) 学会発表

- ・原口裕次，清水達也，大和雅之，岡野光夫：心筋細胞シートと非心筋細胞シート間の電氣的結合性の解析，第9回日本組織工学会(京都/2006年9月7-8日)
- ・原口裕次，清水達也，大和雅之，岡野光夫：心筋細胞シートと非心筋細胞シート間の電氣的結合性の解析，第28回日本バイオマテリアル学会(東京/2006年11月27-28日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

清水達也(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)
原口裕次(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)
関根秀一(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋細胞におけるGRおよびMRの役割—

研究協力者： 福田 恵一(慶應義塾大学医学部再生医学教室教授)

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

A. 研究の目的

近年の大規模臨床試験の結果、ミネラルコルチコイド受容体(以下MR)の拮抗薬であるSpironolactoneやEplerenoneが慢性心不全患者(RALES試験, 1999)や左心機能低下を伴った心筋梗塞(EPHESUS試験, 2003)による死亡率を低下させることが明らかになった。この有用性の原因に関しては、MR拮抗薬の持つ左室リモデリングに対する直接の抑制効果に起因すると考えられているが、その詳細な分子機序は全く理解されていないのが現状である。

心筋におけるMRの作用を理解することの難しさは、グルココルチコイド受容体(以下GR)とMR機能のクロストークにある。心筋にはGR、MR両者が発現する。グルココルチコイドの血中濃度は、アルドステロンの 10^3 倍高いが、腎臓遠位尿管上皮などでは、 11β SD2によってグルココルチコイドを不活性化し、アルドステロンのみがMRに作用することが可能であると説明されている。一方、心筋では、グルココルチコイドを不活性化する 11β SD2の発現がほとんど認められない。これは、心筋細胞がグルココルチコイド(αアルドステロン)の刺激に恒常的に暴露されていることを意味する。グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドは、各々の受容体であるGR、MRに結合しその作用を発現させるが、互いの受容体にも結合可能である。さらにGR、MRともに同一のDNA標的配列(GR [MR]-responsive element: 以下GRE)を認識し、その作用にredundancyが存在していると考えられているため、各々の受容体の標的遺伝子やその発現制御機構の詳細は未だ不明である。

そこで、本研究では、GRとMRに特異的なリガンド、拮抗薬を用いて、GR依存性、MR依存性遺伝子を網羅的に解析し、心筋リモデリングにおける抗アルドステロン薬の有効性に関する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

- ①GRとMRの抗体の確認
- ②心筋細胞におけるGRとMRのリガンド刺激に伴う細胞局在の変化
- ③GR特異的な阻害剤RU486、MR特異的な阻害剤SpironolactoneおよびEplerenoneのGRおよびMRに対する特異性の確認
- ④各種リガンドによるGRE-lucレポーター遺伝子の活性化とRU486 SpironolactoneおよびEplerenoneによる抑制効果
- ⑤マイクロアレイ解析を用いたGR依存性、MR依存性遺伝子の網羅的解析

C. 研究結果

1) GRとMRの抗体の確認
抗GR抗体(BD Transduction Laboratories社 611227, Santa Cruz Biotechnology社H300)はヒトGRを選択的に認識し、ラットやマウスGRに対する反応は非常に弱かった。一方、SC社M20抗体は、ラットやマウスGRのみを選択的に認識し、ヒトGRには全く反応しないことが確認された。SC社M20抗体を用いてラット新生児培養心筋中のGRの発現がWB法および免疫染色法で確認できた。

一方、抗MR抗体(Santa Cruz Biotechnology社 H300, Abcam社2774-100, Santa Cruz Biotechnology社N-17)は過剰発現させたヒトおよびラットMRのみに反応した。しかしながらいずれの抗体ともラット新生児培養心筋中のMRをWBおよび免疫染色で検出するだけの感度はなかった。

2) 心筋細胞におけるGRとMRのリガンド刺激に伴う細胞局在の変化
培養心筋細胞にアデノウイルスベクターを用いてFlagで標識したGR、MRを発現させ、Corticosterone (COR)、Cortivazol (CVZ)、Aldosterone (ALD)で刺

激した。無刺激の状態では、主として細胞質に局在していた外因性のGRはS(1 μ M)、CVZ(1 μ M)、ALD(1 μ M)刺激後1時間以内に核へ移行することが免疫染色で確認された。同様に、内在性の心筋GRもS, CVZ, ALD刺激によって核に移行することが確認された。一方、無刺激の状態では、主として細胞質に局在していた外因性のMRはS(1 μ M)、ALD(1 μ M)刺激後1時間で核に移行したが、CVZ(1 μ M)刺激では細胞内局在に変化を認めなかった。以上の結果からCVZがGR特異的なリガンドとして作用することが確認された。同様な細胞内局在の変化は細胞質画分から核抽出液へのGRやMRの移行としてWB法でも確認された。

3) GR特異的な阻害剤RU486, MR特異的な阻害剤SpironolactoneおよびEplerononeのGRおよびMRに対する特異性の確認

これまでMRに対する特異的なリガンドは報告されていない。ALDはGRとMRの双方に作用する。そこでGRの作用をRU486で阻害した条件下でALDで刺激しMR特異的な遺伝子発現を見られるか否かに関して検討した。

まず、RU486がGR特異的な阻害剤であることを確認するために、異なったRU486濃度下におけるGRとMRの核内局在に関して検討した。これまでの報告からRU486はGRと結合してGRの核移行を促進させるがGR依存性の転写活性はごくわずかであり、他のグルココルチコイドのアゴニスト作用を競合的に阻害する。また、NF κ BやAP-1などの他の転写因子の抑制作用は誘導可能であることが知られている(Mao J, 1992)。GRの核移行はRU486の濃度を10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nMと希釈させていっても観察されたが、MRの核移行はRU486の濃度が10 μ M, 1 μ Mの状態では観察されたものの、100nM以下の濃度では観察されなくなりMRは細胞質に留まったままであった。Spironolactoneでは濃度10 μ M, 1 μ MでGR, MRともに核移行が認められた。一方、Eplerononeは濃度10 μ MではGR, MRともに核移行が認められたものの濃度1 μ MではMRの核移行だけが観察されGRは細胞質に留まったままであった。

4) 各種リガンドによるGRE-lucレポーター遺伝子の活性化とRU486 SpironolactoneおよびEplerononeによる抑制効果

次にラット培養心筋細胞におけるGRE-lucの活性を指標に各種リガンドおよび受容体拮抗薬の効果を検討した。

S刺激によって、controlの1.8倍(1nM)、3.2倍(10nM)、38倍(100nM)に活性が上昇した。CVZでは、controlの22倍(1nM)、220倍(10nM)、168倍(100nM)に上昇した。ALDではcontrolの1.3倍(1nM)、2.7倍(10nM)、5.7倍(100nM)に活性が上昇した。この結果から培養心筋細胞ではGRE-lucの活性化に関しては、ALDはCVZやSに比べても弱いことが分かった。

RU486(10mM)によって、S(1nM, 10nM, 100nM)、CVZ(1nM, 10nM, 100nM)、ALD(1nM, 10nM,

100nM)によるGRE-lucの活性は完全に抑制された。

そこでRU486の濃度(10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM)を変えて、CVZ(1nM)、ALD(100nM)によるGRE-lucの活性に及ぼす影響を検討した。CVZ(1nM)刺激によるGRE-lucの活性化はRU486濃度を100nMまで希釈させても245倍→2.3倍まで活性抑制効果が認められた。一方、ALD(100nM)刺激によるGRE-lucの活性化はRU486濃度を100nM以下に希釈すると全く観察されなくなった。以上の結果は、実験③の核への移行を見た実験結果と一致しており、この培養心筋細胞を用いた実験系では高濃度RU486(10mM, 1 μ M)ではGR, MR作用ともに阻害するが、低濃度RU486(100nM, 10nM)ではGR作用のみ選択的に阻害することが確認された。

Spironolactone(10mM)は、CVZ(1, 10nM)によるGRE-lucの活性には全く影響を与えなかった。しかし、ALD(10nM, 100nM, 1mM)および低濃度のS(10nM, 100nM)によるGRE-lucの活性化はSpironolactone(10mM)により完全に抑制された。

5) マイクロアレイ解析を用いたGR依存性、MR依存性遺伝子の網羅的解析

まず予備的な実験として培養心筋細胞をCVZ, S, Aldosterone(各100nM)で刺激して、3, 6, 12, 24時間後にmRNAを抽出して既知のGR, MR標的遺伝子の発現変化を観察した。その結果、rat-SGKの発現がCVZ刺激後3時間をピークに5倍以上に上昇することが確認された。以上の結果をもとにラット培養心筋細胞をCVZ, S, Aldosterone(各100nM)で刺激し3時間後の遺伝子発現変化をGeneChip(Rat Genome 230 2.0 Array)により評価した。コントロールとしては、各リガンドを溶解したEtOHで刺激した心筋細胞を用意した。2倍以上に発現が増加した遺伝子、反対に2倍以下に減少した遺伝子群に関して現在詳細な検討中である。

D / E. 考察・結論

今回の培養心筋細胞を用いた実験結果からも、GRとMR作用のredundancyが確認された。さらにMRの拮抗薬であるSpironolactoneの作用も必ずしもGRあるいはMRに特異的ではなく、濃度次第によっては非選択的にGRとMRを抑制している可能性が考えられた(*CORの作用もSpironolactoneで完全に抑制されている)。しかしこれまでの実験結果からCVZがGR特異的に作用すること、低濃度RU486(100nM, 10nM)ではGR作用のみ選択的に阻害することが明らかとなった。したがって、GR特異的な作用をCVZ刺激で、MR特異的な作用をRU486存在下でのAldosterone刺激によって、切り離して評価できる可能性が示唆された。

今後は、GRとMRの“activation”(活性化される遺伝子)および“transrepression”(抑制される遺伝子)の両方のgenomic actionに着目して解析を進め、複雑にクロストークした心臓におけるGRとMR作用を解明していきたいと考える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S: Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* 98:705-712, 2006.
- Yoshida S, Shinmura S, Nagoshi N, Matsuzaki Y, Fukuda K, Okano H, Tsubota K: Isolation of multipotent neural crest derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells*, 2007 (in press).
- Ieda Y, Fujita J, Ieda M, Yagi T, Kawada H, Ando K, Fukuda K: G-CSF and HGF; combination of vasculogenesis and angiogenesis synergistically improves recovery in murine hind limb ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 2007 (in press).
- Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. *Circulation* 114: 2351-2363, 2006.
- Nagaoka M, Koshimizu U, Yuasa S, Hattori F, Chen H, Tanaka T, Okabe M, Fukuda K, Akaike T: ES cells cultured on an E-cadherin protein-coated surface proliferate without aggregation and retain full pluripotency in mice. *PLoS ONE*, 2007 (in press).
- Miyagawa S, Sawa Y, Fukuda K, Hisaka Y, Taketani S, Memon IA, Matsuda H: Angiogenic gene cell therapy using suicide gene system regulates the effect of angiogenesis in infarcted rat heart. *Transplantation* 81:902-7. 2006.
- Tomita Y, Makino S, Hakuno D, Hattan N, Kimura K, Miyoshi S, Murata M, Ieda M, Fukuda K: Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers. *Med Biol Engineering Computing*, 2007 (in press).
- Higa K, Shinmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K: Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an aminotoc membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007 (in press).
- Kimura K, Yoon SH, Kimura T, Takahashi K, Imai A, Noma S, Suzuki N, Fukuda K: Cardiac 'pradykinesia' in advanced Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 2007 (in press).
- Yoshioka M, Yuasa S, Kimura K, Kimura N, Matsumura K, Shiomi T, Shukunami C, Okada Y, Mukai M, Shin H, Yozu R, Sata M, Ogawa S,

Hiraki Y, Fukuda K: Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 12:1151-1159, 2006.

- Fukuda K, Yuasa S: Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 98:1002-1013, 2006.
- Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K, Takagi S, Okano H, Ando K, Hotta T: Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 113:701-710, 2006.

2) 学会発表

- Fukuda K: Keeping valves clear; role of chondromodulin-I as a protective factor for maintaining cardiac valvular function. The 2nd IREIIMS Symposium (Tokyo, Japan/2006.12.4)
- Fukuda K: Cardiac and vascular repair by stem cells: find them and apply them. The World Congress of Cardiology 2006; European Society of Cardiology (Symposium)(Barcelona, Spain/September, 2006)
- Fukuda K, Tomita Y, Matsumura K: Cardiac neural crest cells as a dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. The Annual Meeting of the Chinese Medical Association (Taipei, Taiwan/June 24, 2006)
- Matsumura K, Tomita Y, Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Neural crest-derived stem cells in the heart proliferate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
- Endo J, Sano M, Fujita J, Hayashida K, Yuasa S, Makino S, Fukuda K, Ogawa S: Contribution of bone marrow-derived cells on pressure overload-induced cardiac hypertrophy and perivascular fibrosis in mice. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
- Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Ieda Y, Matsumura K, Tomita Y, Makino S, Sano M, Ogawa S, Fukuda K: Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
- Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Matsumura K, Tomita Y, Makino S, Sano M, Ogawa S, Fukuda K: Sema3A induces a cardiac ventricular repolarization gradient via sympathetic innervation patterning. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/

- November 12-15, 2006)
- Hattori F, Chen H, Li W, Fujita J, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Sasaki E, Oikawa S, Ogawa S, Fukuda K: Mitochondrial membrane potential measurement dye is applicable for purification of mouse and marmoset embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
 - Makino S, Keating M, Sano M, Kimura K, Ieda M, Tomita Y, Murata M, Yada H, Kanazawa H, Yuasa S, Fukuda K: Heat-shock protein 60 is required for cardiac regeneration in zebrafish. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
 - Kimura N, Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shukunami C, Hiraki Y, Yozu R, Fukuda K: Disruption of chondromodulin-1 gene, a potent angioinhibitory factor, causes aortic valve stenosis in mice. American Heart Association 78th Scientific Meeting (Chicago, USA/November 12-15, 2006)
 - Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Nerve growth factor rescues cardiac sensory innervation and silent myocardial ischemia in diabetic hearts. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Nerve growth factor is critical for cardiac sensory nerve development. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Matsumura K, Tomita Y, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Sema3A produces a cardiac ventricular repolarization gradient via sympathetic innervation patterning. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Hattori F, Chen H, Li W, Yuasa JS, Onizuka T, Shimoji K, Sasaki E, Ogawa S, Oikawa S, Fukuda K: Mitochondrial membrane potential measurement dye is applicable for the purification of mouse and marmoset embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Hakuno D, Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Kimura N, Yozu R, Okada Y, Shukunami C, Hiraki Y, Ogawa S, Fukuda K: Pathological angiogenesis in human cardiac valves is accompanied by decreased ChM-I and augmented VEGF-A and MMP expression. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Yada H, Murata M, Yuasa S, Kawaguchi H, Ieda M, Adachi T, Ogawa S, Fukuda K: Dominant negative suppression of Rad prolongs QT interval and causes ventricular arrhythmias in mice. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Kimura K, Yoon SH, Noma S, Ogawa S, Fukuda K: Evidence that advanced parkinson's disease reveals complete cardiac sympathetic denervation leading to cardiovascular collapse. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Kimura K, Kanazawa H, Ieda M, Kawaguchi H, Kawakami T, Onizuka T, Kageyama T, Ohno Y, Yoon SH, Makino S, Sano M, Ogawa S, Fukuda K: Acute cardiac hypertrophy causes sympathetic nerve dysfunction by inducing immature and fetal gene expression. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Kimura K, Kanazawa H, Ieda M, Kawaguchi H, Makino S, Sano M, Ogawa S, Fukuda K: Cardiac hypertrophy induces sympathetic hyperinnervation concomitant with the elevation of endothelin-1 and nerve growth factor. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Matsumura K, Tomita Y, Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Ogawa S, Makino S, Sano M, Fukuda K: Neural crest-derived stem cell in the heart proliferate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Makino S, Sano M, Kimura K, Hakuno D, Ieda M, Tomita Y, Murata M, Yuasa S, Kanazawa H, Yada H, Onizuka T, Matsumura K, Endo J, Kimura N, Kawakami T, Shimoji K, Kageyama T, Katayama T, Han YS, Hattori F, Fukuda K: Heat-shock protein 60 is required for cardiac regeneration in zebrafish. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
 - Kimura N, Yuasa S, Hakuno D, Kimura K, Matsumura K, Yozu R, Fukuda K: Disruption of chondromodulin-1 gene, a potent angioinhibitory factor, causes aortic valve stenosis in mice. The 71th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Kobe, Japan/March 15-17, 2007)
- 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

ーラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討ー

研究協力者： 武田 信彬(東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部教授)

＜研究要旨＞心筋症は難治性で予後不良であり5年生存率は重篤な“がん疾患”よりも低い。心筋症には特発性拡張型心筋症のほかに肥大型心筋症・拘束型心筋症・ミトコンドリア病(心筋症)・ファブリー病・家族性突然死症候群が生命を脅かす病態として難治性疾患に挙げられている。2次性心筋症も重篤な心不全をきたす疾患群であり、特発性心筋症研究班では心サルコイドーシスを課題として取り上げてきた。これら心筋症の予後については河合班が昭和年に発足以来の課題であり詳細な断面調査が繰り返して行われてきた。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

細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは、拡張型心筋症において心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的増加し、組織の硬化を招くとされている。

我々はその病因の解明に、マウスとヒトのラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子を比較し、両種に共通して存在し、プロモーターの転写を強く促進するDNA配列(bcn-1 element)を見出した(Suzuki H, J Biol Chem 271:18981-18988, 1996)。さらにbcn-1 elementに結合し、心筋の細胞に普遍的に発現する転写因子の存在を報告した(Suzuki H, Am J Physiol 275(44):F518-F526, 1998)。また、Yeastのone-hybrid systemを用いてライブラリーのスクリーニングを施行、bcn-1に結合する転写因子(Smarce-1rと命名)を同定しデータベースに登録した(Genbank Accession No. AF072836, Suzuki H, 1998)。

そこで本研究では、我々が同定したラミニンの転写を強く促進する転写因子Smarce-1rの機能を明らかにするとともに、心臓に発現する新規蛋白をひき続きクローニングし心筋症との因果関係を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

当初、ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子に存在するDNAモチーフbcn-1エレメントが、血管平滑筋細胞核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにてPMAやTGF- β などに誘導され、さらに、ラミニン γ 1鎖プロモーターの転写を強く促進することを報告した(Suzuki H, J Biol Chem, 1996)。そこで、そのbcn-1エレメントに結合する転写因子をクローニングするためにイーストのワンハイブリッドシステムを用いて心筋由来cDNAライブラリーのスクリーニングを施行し、Smarce-1rを同定した。さら

に、本研究ではSmarce-1rをベイトにイーストのハイブリッドシステムによるスクリーニングを繰り返し、成果により柱1-3につき研究計画を作成検討している。

柱1：Smarce-1r、柱2：SMARP、柱3：トロポニンI r につきそれぞれ機能解析、心筋症との因果関係の解析、ならびに分子間相互因子のクローニングを目的とし検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関しては東京慈恵会医科大学実験動物取り扱い規約に従って実験を行った。

C. 研究結果

1)柱1：Smarce-1rの機能解析

①Smarce-1r遺伝子の調節、発現についての検討：Smarce-1r-GFPならびにDsRed融合蛋白を作製し、HeLaならびにCOS-7培養細胞にトランスフェクトし、強制発現してConfocal Microscopyにて細胞内局在を調べたところSmarce-1r融合タンパクは核に局在して発現することが判明した。

②Smarce-1rの疾患との因果関係についての解明：Smarce-1rと心筋症の関連を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスターJ2Nk、J2Ncを用いてmRNAからcDNAを合成しシーケンシングを行ないcoding lesionにおけるSNPsを見つける仕事を行った。

③前述のように、Smarce-1r転写因子の分子間相互因子見出すために、イーストのツーハイブリッドシステムを用いスクリーニングを施行した。心筋細胞由来のcDNAライブラリーから、coding lesionの全長1263bpの蛋白が得られ、ロインジッパー構造を有する新規蛋白であったためSMARP(Smarce1r-related protein)と命名した。

2)柱2：SMARPの機能解析

①SMARP遺伝子の調節、発現についての検討：新規タンパクSMARPの組織発現を調べるために、SMARP mRNAの発現をノーザンブロットにて検討した。脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、精巣のTotal RNAを用いて、ブロットしたところ、心臓に強く発現し、また、精巣にも発現することが判明した。次に、SMARPの細胞内局在を調べたところ、SMARPは核内にはSpeckledに存在するが、核小体により強く発現がすることが判明した。さらに、SMARPのdeletion mutantを作製し、N末端の核小体移行シグナルの存在を見出した。

②SMARPの疾患との因果関係についての説明：Smarcelrと同様に、心筋症の関連を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスターJ2Nk、J2Ncを用いてSNPsを見つける仕事を行った。

③SMARPの分子間相互因子のクローニング：SMARPの分子間相互因子見出すために、同様にSMARP cDNAをベイトにイーストのツーハイブリッドシステムを用い心筋細胞由来のcDNAライブラリーのスクリーニングを施行したところ、129個アミノ酸の蛋白が得られ、トロポニンI類似構造を認めていたため、Troponin I-related (Troponin-Ir) と命名した。

3)トロポニンIrの機能解析

①トロポニンIr遺伝子の調節、発現についての検討：SMARPの分子間相互因子見出すために、同様にイーストのツーハイブリッドシステムを用いスクリーニングを施行し、トロポニンI(cTnI)の新しいアイソフォームトロポニンIrをクローニングした。ノーザンブロットでは、mRNAは脳、肝、腎臓、精巣には発現せず、cTnIと同様に心臓に特異的に発現を示した。また、GFP融合蛋白の細胞内分布を共焦点顕微鏡にて調べたところ、COS7細胞では、トロポニンIrはcTnIとは異なる分布を示した。構造上は、119個のアミノ酸からなり、cTnIのエクソン5,6アミノ酸42-132の領域を欠損しており、トロポニンC、トロポニンTとの結合領域のC末端を欠損し、また、アクチン結合部位のN末端の一部を欠損することになっていた。そこで、本来トロポニンIの機能としての、トロポニンC、トロポニンT、アクチンとの結合する機能を有するかを検討した。ところ、GST-融合蛋白を用いた、Pull-down assay, In vitroの免疫沈降反応を施行し、アッセイにてIn cellでの分子間結合力を測定したところ、トロポニンTとの結合は認めず、アクチンの結合能も低下していた。現在では心筋細胞にて発現し、免疫沈降反応を施行する段階である。

②トロポニンIrの疾患との因果関係についての説明：Smarcelr、SMARPと同様に、心筋症の関連

を明らかにする目的で、心筋症患者数名と心筋症ハムスターJ2Nk、J2Ncを用いてSNPsを見つける仕事を合わせて行っている。

D. 考察

研究の成果の国内外での位置付けについては、1)本研究を進め、2種の新規蛋白 Smarcelr、SMARPを見いだす成果を得た。いずれも国内外で報告はない。2)また、本研究事業によりクローニングしたトロポニンIのアイソフォームは国内外で報告がなく、本研究が初めてである。3)SMARPのN末端に核小体移行シグナルの存在を新たに見出したが、これは新たな核小体移行シグナルである。

E. 結論

分子間相互作用を用いて、心筋に特異的に発現する新規蛋白SMARPならびにTnTとの結合力を欠くトロポニンIの新しいアイソフォームをクローニングした。これらの蛋白の心筋症家系などにおける発現検索などが心筋症におけるラミニン増加ならびに病態解明の一助となりう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

• Suzuki H, Imanishi A, Shikata C, Nishiyama A, Takeda N: Potential of screening for cardiac myosin-binding protein C gene mutations. Trends Cell Mol Biol 1:89-91, 2006.

2)学会発表

• Suzuki H, Takeda N: Basic approach for therapy of failing heart models. 83rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Maebashi, Japan/March, 2006)

• Suzuki H, Arakawa Y, Takeda N: Cloning of a newly identified heart-specific troponin I isoform, which lacks the troponin T binding site using the yeast two-hybrid system. IACS Japan Section 6th Annual Meeting (Sapporo, Japan/July, 2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

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

特発性心筋症に関する調査研究

—たこつぼ心筋症の病理学的研究—

研究協力者： 河合 祥雄(順天堂大学医学部循環器内科助教授)

＜研究要旨＞たこつぼ心筋症発症に関する形態的裏付け、特に筋層内微小血管の役割、心筋病変の部位・層別の分布については明らかではない。剖検例の心室部位による血管病変の差異、および心尖部標本における病変分布を検討した。障害心筋細胞数の割合は検索例において心尖部で高率で、相対的毛細血管密度は心基部、心尖部に有意な差を認めなかった。心筋細胞障害、線維化病変はびまん性に見られたが、相対的に前壁に多く、層別では、内層、中層、外層に比して心内膜下層・肉柱層に多い傾向をみた。

A. 研究目的

たこつぼ心筋障害の発症機序としての微小循環障害説を某県組織において確認し、また、心筋障害分布について明らかにする。

B. 研究方法

たこつぼ心筋障害(心尖部を中心とした広範な収縮障害、心電図異常など)が疑われ死亡した7剖検例の心室微小血管病変、心筋病変を検討した。心尖部ならびに心基部付近の左心室横切面前壁切片上(顕微鏡下で心筋の横断面が見られる部位心外膜側、心内膜側)において、相対的毛細血管密度とその病的性状(破綻、血栓形成、血球成分付着)を計測した。毛細血管数は接眼レンズ内に挿入されている計測用グリッド(42-point "Weibel" test grid)を用い、グリッド内の21線分上に落ちた毛細血管数をそれぞれ10視野計測した。また、無収縮を呈した心線部付近心筋標本において、前壁、側壁、後壁、心室中隔を心内膜下・肉柱、内層、中層、外層に区分し、それぞれにおける心筋病変(心筋細胞障害、広義の線維化)の割合を計測した。データ処理に当たっては個人の特定ができないように配慮した。

C. 研究結果

障害心筋細胞数の割合は検索例において心尖部で高率であったが、相対的毛細血管密度は心基部 7.1 ± 1.01 に対し心尖部 6.5 ± 0.96 と有意な差を認めなかった。毛細血管破綻像は2例に見られ、出血を伴っていた。病変は基本的に、単一性心筋細胞障害像を呈し、周囲の微小血管の障害を伴わず、散見された。病変は、相対的に前壁に多く(前壁：30.8、側壁：24.9、後壁：20.8、心室中隔：25%)、層別では、内層、中層、外層(30.8%、33.5%、26.4%)に比して心内膜・肉柱層(35.6%)に多い傾向をみた。

D. 考察

心筋障害は心基部に比して、心尖部に多いが、微小血管数は差異がなく、血管破綻が心尖部に強いとは言えない。すなわち、血管障害は二次的病変である可能性を示すと考えられた。

心筋病変は単一性心筋細胞障害を基本とし、周囲の毛細血管破綻とは無関係に存在した。心基部付近の左心室横切面において、心筋障害は前壁に多い傾向を示し、病変が心尖部のほか、前壁に多いことと対応した。また、心内膜下の障害が多いことはMRIでのdelayed contrast enhancementが心内膜下またはびまん性に見られるとする報告に対応する所見と考えられた。

E. 結論

剖検例の検討では心基部と心尖部の微小血管密度は有意な差を認めず、心筋内微小血管障害説は障害心筋細胞の部位差ならびに壁運動の部位差を説明しない。心筋病変は前壁、心内膜下に多い傾向を示し、MRIによる病変程度の診断根拠となりうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究報告

1)論文発表

- 山田京志, 河合祥雄: たこつぼ心筋症の成因と診断. *Cardiac Practice* 17(1): 59-64, 2006.
- 上野めぐみ, 河合祥雄, 三野大來, 鴨下 博: 本邦における在宅生活高齢者の転倒関連因子についてのSystematic Review(メタアナリシス手法を用いて). *日本老年医学会雑誌* 43(1): 92-101, 2006.
- 星本正姫, 小山良治, 小池 朗, 加藤祐子, 丸山麻子, 中島宣行, 河合祥雄, 高山重光: 職域での食事・運動療法およびFAXを用いた双方向の生活習慣修正プログラムの効果; 高コレステ