

200707029A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

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

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩尾 洋

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ有効に導入 するための統合的ゲノム薬理学研究	-----	1
岩尾 洋		
II. 分担研究報告		
1. 心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理的検討 に関する研究	-----	13
岩尾 洋		
2. 臨床データと遺伝子データの照合・解析に関する研究	-----	17
岡本 洋		
3. 動物モデルの心機能の超音波学的および生物学的解析と ヒト臨床データに基づく心不全関連遺伝子の抽出 に関する研究	-----	20
葭山 稔、竹本恭彦		
4. 臨床情報の集積・臨床情報解析に関する研究	-----	25
寺崎文生		
5. ヒトゲノムを用いた統合的ゲノム薬理学的研究	-----	28
藤尾 慈		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	33

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

統括研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：様々な大規模臨床試験により、心不全治療に対するβ遮断薬の有効性が示され、今や、β遮断薬は心不全治療の第一選択薬となった。しかしながら、同時に、β遮断薬が本来有する陰性変力作用により、投与された心不全患者の一部に、心不全の悪化をきたす症例（ノンレスポonder）が存在することも明らかになった。本研究は、β遮断薬療法の個別適正化を実現するために、慢性心不全患者においてβ遮断薬に対する薬効を規定する遺伝的因子をゲノム疫学的アプローチにより検索すること、その遺伝的因子の意義を分子薬理学的アプローチにより解明することを目的とした統合的ゲノム薬理学研究であり、遺伝情報に基づいてβ遮断薬への反応性を予測し、心不全に対するβ遮断薬療法を個別適正化することを目的とする。

まず患者背景として、投与前の左室内径短縮率(FS)が、β遮断薬反応性と逆相関することが明らかになり、β遮断薬は心筋収縮能が低下している症例に、より大きな有効性が期待できる。本研究の中心課題であるβ遮断薬反応性を規定する遺伝的要因の検討としては、以下のように研究を進めた；平成18年度、心不全に関連する91遺伝子210遺伝子多型とβ遮断薬に対する反応性との相関を検討した。相関を示した54遺伝子多型に関し、平成19年度、独立した新たな患者集団を対象に、相関の再現性を検討した。その結果、7遺伝子多型が、再現性をもってβ遮断薬の有効性と相関を示すことが明らかになった。以上の結果から、心不全患者に対するβ遮断薬の反応性を予測するアルゴリズムを作成した。心不全に対するβ遮断薬療法の薬理学的機序の解明にむけて、カニクイザルを用いた“たこつぼ型”心筋症モデルを作成し、β遮断薬投与により、カテコールアミンにより低下した心機能が改善することを確認するとともに、心不全関連遺伝子の発現変化について解析を行った。また、本年度、臨床現場でこれらの遺伝子多型を判定するために、等温増幅法を用いた遺伝子判定機器の作製に着手した。

A. 研究目的

心不全は、さまざまな心疾患の終末像であり、その患者数は、生活習慣の欧米化と社会の高齢化に伴い今後ますます増加すると推測されている。これまで、CIBIS study、US Carvedilol studyをはじめ、さまざまな大規模臨床試験で、心不全に対するβ遮断薬の有効性が確認された。しかしながら、心不全に対するβ遮断薬療法の問題点としては、患者の約30%がβ遮断薬に対して無効（ノンレスポonder）であり、そのような症例では、β遮断薬の陰性変力作用により

心不全が悪化することが挙げられる。従って、β遮断薬投与前に薬効の予想が可能になれば、心不全におけるβ遮断薬の有用性はさらに向上すると期待されるが、現状では、β遮断薬の抗心不全薬としての薬理機序すら不明であり、臨床現場における薬効の予測は実現されていない。

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

① ゲノム疫学的アプローチにより、β遮断薬の薬効に影響を与える遺伝子多型を検索すること

② 分子薬理学的アプローチにより、心不全に対するβ遮断薬の効果の機序を解明し、①で検索された遺伝子多型の生物学的妥当性を検証すること

①、②の結果を臨床現場へ導入し、β遮断薬の薬効の予測を行なうために、ベッドサイドで遺伝子多型の判定を行なう遺伝子判定装置を作製すること

を目的とする。

平成19年度は、

①独立した新たな患者集団を対象に、これまでの研究からβ遮断薬の薬効との相関が示唆された遺伝子多型の妥当性の確認を行うこと、

②①で確認した遺伝子多型を用いた、β遮断薬の有効性を予測するためのアルゴリズムを作成すること、

③これらの研究と並行して、ベッドサイドで使用可能な遺伝子多型判定機器の作製に着手すること、を目的とする。

B. 研究方法

本研究は、ゲノム疫学的アプローチと分子薬理学的アプローチを並行して行なった。(詳細は、研究分担の記載を参照。)

B-1. ゲノム疫学的アプローチ

1) β遮断薬の薬効を決定する遺伝子多型候補の選出

平成18年度、92遺伝子210遺伝子多型とβ遮断薬への反応性との相関を、平成18年までに同意を得ていた症例群(第1集団、80名)を対象として解析した。それらの遺伝子多型のうち、p値が0.1以下を示した、44遺伝子54遺伝子多型について、2)に示した独立した症例群(第2集団、63例)を対象に、β遮断薬に対する反応性との相関を検討した。

多型判定は、各多型部位をPCRで増幅し、シーケンス法により行った。

2) 心不全患者を対象とした、β遮断薬治療

への反応性と遺伝子多型との相関に関する解析

2-1) β遮断薬治療の結果、心臓超音波検査上、左室内径短縮率(FS)が3%以上改善した患者をレスポンドー(responder)、3%未満の患者をノンレスポンドー(nonresponder)とし、これら遺伝子多型との相関を検討した。レスポンドー、ノンレスポンドーの判定は、β遮断薬投与後6ヶ月以上経過した症例について行った。

2-2) 平成19年度、新たに、拡張型心筋症患者ですでにβ遮断薬治療をうけている患者67名について、本研究への参加、遺伝子多型判定に関する同意を得た(第2集団)。そのうち、63例は、本研究成果報告時、すでに投与後6ヶ月が経過しており、臨床データ解析の対象とした。

3) ベッドサイドで利用可能な遺伝子多型判定機器の作製

FUJI FILMとの共同研究として、等温増幅法を用いた、遺伝子多型判定機器の作製に着手した。

B-2. 分子薬理学的アプローチ

心不全では、交感神経をはじめとした神経体液性因子の亢進が心機能に影響を与えている。特に、心不全におけるβ遮断薬療法の分子メカニズムを解明するためには、カテコールアミン過剰による心不全モデルの作製は特に重要である。そこで、雄性カニクイザルにエピネフリンを投与しカテコラミン心不全モデルを作製した。また、この心不全モデルに対し、β遮断薬を投与した。効果の解析は、

①心エコー図、②血液生化学的検査、③網羅的遺伝子発現解析、④組織化学的解析、⑤定量RT-PCR法による遺伝子発現解析、を行った。

(倫理面での配慮)

ゲノムDNAの収集 各医療機関倫理委員会の承認のもと実施した。医療機関受診中の患者から文書にて承諾書を得たのち採血を行った。承諾書は倫理委員会の同意に基

づき作成した。採取した患者検体は、医療機関で匿名化したのち大阪大学に発送した。

遺伝子解析 大阪大学ゲノム倫理委員会の承認のもと実施した。各医療機関で匿名化した血液サンプルから DNA を精製し多型判定を行った。精製した DNA は大阪大学大学院薬学研究科で管理保存している。

動物実験 各研究機関の実験動物取扱指針に基づいて行った。

C. 研究結果

C-1. ゲノム疫学的アプローチ

1) β 遮断薬の反応性を決定する遺伝子以外の患者背景の検討

β 遮断薬投与開始後 6 ヶ月以上経過した 143 例（第 1 集団、第 2 集団の合計）に関し、投与前の患者背景と β 遮断薬に対する反応性の相関を検討した。その結果、年齢、性別などは、β 遮断薬に対する反応性と関連しないが、β 遮断薬投与前の FS は、β 遮断薬の反応性の決定因子であり、FS 値が低値を示す症例は、β 遮断薬の有効性が期待されることが示された。

2) β 遮断薬の反応性を決定する遺伝子の検討

第 1 集団および第 2 集団で共通して、β 遮断薬の薬効と相関を示した遺伝子多型を以下に記す；

アドレナリン関連遺伝子

ノルエピネフリントランスポーター(NET) T-182C : C アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

アドレナリン β₂ 受容体 (ADRB2) Arg16Gly : Arg アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

アドレナリン α_{2C} 受容体 (ADR2C) Del322-325 : 野生型アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

レニン・アンジオテンシン系関連遺伝子

アンジオテンシノーゲン (AGT) A-20C : A アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) CT4656 ins/del : CT アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

アンジオテンシン受容体 2 (AGTR2) A-29G : A アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

その他

pleckstrin Lys340Arg : Lys アレルの保有がノンレスポonder のリスクとある。

3) ベッドサイドで使用可能な遺伝子判定機器の作製

本研究申請当時は、PCR をベースにした高感度検出法による遺伝子判定装置が注目を浴びていたが、開発が具体化するに伴い、判定過程で PCR 反応を行うことが以下の重大な問題をはらむことが次第に明らかになってきた；すなわち、PCR 反応では、反応温度を 3 段階に変化させることから、

- ・温度を変化させるための装置が必要となり、コストが高くなる。
- ・同時に、小型化が困難である。
- ・複数の多型を同時に増幅する条件を設定せねばならず、同時に判定することは困難である。

このような背景から、SMAP 法をはじめとした、等温増幅法が主流となると予想されている。本研究では、β 遮断薬反応性予測遺伝子多型判定を行うための機器作製のために、FUJI FILM との共同研究として、等温増幅法を用いた遺伝子多型判定機器の開発に着手した。

C-2. 分子薬理学的アプローチ

正常状態カニクイザルに対し、エピネフリンの静脈内投与を行うと、“たこつぼ型”様の心尖部領域の壁運動低下が生じることを 3D 心エコーにて確認した。駆出率も正常サルに比して有意に低下した。この“たこつぼ型”心不全モデルに対してメトプロロール (0.3mg/kg/10min 静脈内投与) は駆出率を有意に改善した。

エピネフリン投与群では心筋逸脱酵素 (GOT, CPK など)の上昇が見られたが、メトプロロールによりこれらの逸脱酵素は改善

しなかった。

マイクロアレイ法（各群 n=3 をプール）の結果、コントロール群心尖部に比べてエピネフリン投与群心尖部における遺伝子発現が2倍以上のものは約2500遺伝子、0.5倍以下のものは約600遺伝子であった。その中で、基部で同様に変動している遺伝子を除くと、それぞれ約2000遺伝子、約550遺伝子となった。基部に比べて心尖部では、エピネフリン投与による発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。

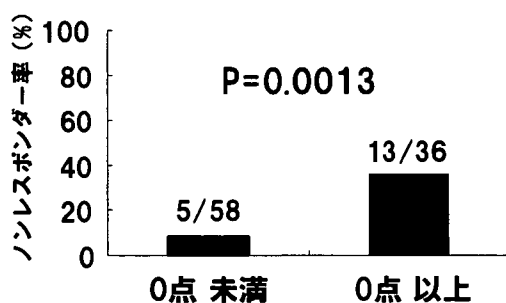
D. 考察

FS<20%の症例に関して、以下の式を用いてβ遮断薬の薬効を予測することを提案するに至った。

この数式をこれまでの症例に当てはめると、

多型スコア = -6.321 + a SNP A + b SNP B + c SNP C + d SNP D + e SNP E + f SNP F + g SNP G		
係数	a: 1.121	SNP A; ADRA2C del322-325 : wild allele
	b: 0.995	SNP B; NETT-182C : C allele
	c: 0.626	SNP C; Pleckstrin Lys340Arg : Lys allele
	d: 0.597	SNP D; AGT A-20C : A allele
	e: 0.560	SNP E; AGTR2 intron1 A-29G : A allele
	f: 0.508	SNP F; ACE CT4656 ins/del : CT allele
	g: 0.321	SNP G; ADRB2 Arg16Gly : Arg allele
各SNPを判定し、係数及びアレルの数を上の式に当てはめ多型スコアを計算する。		

多型スコアが0未満の場合、90%以上の確率でレスポンドであると予測される。



これまで、さまざまな心不全モデルが報告されているが、それらのモデルでβ遮断薬が、ヒトの場合と同様の有効性（すなわち、心不全の発症を予防するのではなく、心不全を発症した動物に投与し心不全を改善させる効果）を示す例は、我々の知る限り、今回のカニクイザルエピネフリン心不全モデルが初めてであり、心不全に対する

β遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。実際、ゲノム疫学的にβ遮断薬の薬効と相関することが明らかにされた遺伝子は、壁運動異常を認めた心尖部においてのみその発現が大きく変動しており、引き続き検討していく必要がある。

E. 結論

2つの独立した患者集団を対象に、β遮断薬に対する反応性と相関を示す遺伝子多型の検索を行った結果、7個の遺伝子の遺伝子多型とβ遮断薬に対する反応性との間に相関を見た。これらの遺伝子多型の組み合わせにより、β遮断薬に対する反応性を予測する数式を作成した。次年度は、他の患者集団で、この数式の妥当性を確認しつつ、これらの多型を判定する遺伝子判定機器を作製することを計画している。

また、分子薬理学的アプローチの結果として、ヒト心不全に対するβ遮断薬療法をmimicするカニクイザルエピネフリン心不全モデルを確立するとともに、心不全に関連した遺伝子の発現変動について、部位別に検討を行った。次年度は検体数を増やして、分子薬理学的アプローチを引き続き行っていく。

F. 健康危険情報

特に認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(岩尾洋)

1. Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y, Iwao H. (2008) Molecular network analysis in pleiotropic effects of statin.

J Pharmacol Sci in press.

2. Iwai T, Kitamoto K, Teramoto K, Machida Y, Tamada S, Yukimura T, Iwao H, Nakatani T, Miura K. (2008) Cobalt Protoporphyrin Attenuates Rat Obstructive Nephropathy: Role of Cellular Infiltration.

Urology in press.

3. Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwai T,

Iwao H, Okamura M, Miura K. (2008) Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis.

J Pharmacol Sci 106:56-67.

4. Tanaka F, Tominaga K, Shiota M, Ochi M, Kuwamura H, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Iwao H, Arakawa T. (2008) Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity.

Cancer Gene Ther 15:51-59.

5. Nakao T, Shiota M, Tatemoto Y, Izumi Y, Iwao H. (2007) Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/ p70 S6 kinase signaling.

J Pharmacol Sci 105:334-341.

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

Oncology Reports 17:781-786.

7. Nishiya D, Enomoto S, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Izumi Y, Iwao H, Takeuchi K, Yoshiyama M. (2007) The long-acting Ca²⁺-channel blocker azelnidipine prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

J Pharmacol Sci 103:391-397.

8. Tsusaki H, Yonamine H, Tamai A, Shimamoto M, Kuwano K, Iwao H, Nagata R, Kito G. (2007) Left Ventricular Volume and Function in Cynomolgus Monkeys using Real-Time Three-Dimensional Echocardiography.

J Med Primatol 36:39-46.

(岡本洋)

1. Fumio Terasaki, Hiroshi Okamoto, Michiaki Hiroe, Kyoko Imanaka-Yoshida,

Katsuya Onishi, Akira Sato, Hiroaki Shimomura, Bin Tsukada, Toshimichi Yoshida, Yasushi Kitaura, Akira Kitabatake, and Study Group for Intractable Diseases by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy.

Circ J 2007 71(3):327-330.

2. Hiroshi Okamoto. Osteopontin and cardiovascular system.

Mol Cell Biochem 2007 300:1-7.

3. S Nonen, H Okamoto, Y Fujio, Y Takemoto, M Yoshiyama, T Hamaguchi, Y Matsui, J Yoshikawa, A Kitabatake, J Azuma Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor 1D are associated with the response to β -blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008 8, 78-84.

4. Xu Z, Okamoto H, Akino M, Onozuka H, Matsui Y, Tsutsui H.

Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling and Diastolic Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice.

J Cardiovasc Pharmacol 2008 51(1):62-70.

5. 平林 鑑, 山田 聡, 石見かおり, 絹川 真太郎, 蒔田直昌, 岡本 洋, 筒井裕之, 杉木宏司, 村下十志文, 中川雄太: 左室補助装置から離脱しえた巨細胞性劇症型心筋炎の1例, 日本内科学会雑誌, 96(2): 139-141, 2007 総説

6. 岡本 洋 拡張型心筋症 経過と予後 新目でみる循環器病シリーズ 15 「心筋症」、95-100, 2007

7. 岡本 洋、筒井 裕之

心不全の疫学 概要

日本臨床 心不全上 49-54, 2007

8. 岡本 洋、南畝晋平、東 純一

心不全における遺伝子多型

日本臨床 心不全上 278-284, 2007

9. 岡本 洋、北畠 顕、筒井 裕之、J-CHF Investigators

J-CHF (カルベジロール概要) 日本臨床 心

不全上 537-542, 2007

10. 岡本 洋 医学・医療の個人史的考察
21世紀の臨床心臓病学を担う若き医師への
メッセージ 78-79, 2007年 8月 メデ
イカルレビュー社

鄭 忠和 編

11. 岡本 洋 β 遮断薬は全ての心不全
(NYHAI~IVまで)に必要か?

E B M循環器疾患の治療 2006-2007

12. 岡本 洋 心疾患における浮腫
診断と治療 95(5):31-36 2007

13. 岡本 洋 日本人初のARBのエビデ
ンス 35 日経メデイカル 2007 6月号

14. 岡本 洋 拡張型心筋症の生命予後
治療学「suggestion」2008

(葭山稔、竹本恭彦)

1. Sugioka K, Hozumi T, Iwata S, Oe H, Okuyama T, Shirai N, Yamashita H, Ehara S, Kataoka T, Yoshikawa J, Ueda M, Yoshiyama M. Morphological But Not Functional Changes of the Carotid Artery Are Associated With the Extent of Coronary Artery Disease in Patients With Preserved Left Ventricular Function.

Stroke 2008 in press.

2. Hirata K, Pulerwitz T, Sciacca R, Otsuka R, Oe Y, Fujikura K, Oe H, Hozumi T, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Di Tullio M, Homma S. Clinical Utility of New Real Time Three-Dimensional Transthoracic Echocardiography in Assessment of Mitral Valve Prolapse.

Echocardiography 2008 in press.

3. Oe H, Hozumi T, Murata E, Matsuura H, Negishi K, Matsumura Y, Iwata S, Ogawa K, Sugioka K, Takemoto Y, Shimada K, Yoshiyama M, Ishikura Y, Kiso Y, Yoshikawa J. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid supplementation increases coronary flow velocity reserve in Japanese elderly individuals.

Heart 2008;94:316-321.

4. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Polymorphisms of norepinephrine transporter

and adrenergic receptor alpha1D are associated with the response to beta-blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008; 8:78-84.

5. Takemoto Y, Hozumi T, Sugioka K, Takagi Y, Matsumura Y, Yoshiyama M, Abraham TP, Yoshikawa J. Beta-blocker therapy induces ventricular resynchronization in dilated cardiomyopathy with narrow QRS complex.

J Am Coll Cardiol 2007;49:778-783.

6. Ehara S, Kobayashi Y, Kataoka T, Yoshiyama M, Ueda M, Yoshikawa J. Quantification of coronary calcification by intravascular ultrasound.

Circ J 2007;71:530-535.

7. Wake R, Fukuda D, Yoshiyama M, Shimada K, Yoshikawa J. The effect of the gravitation of the moon on acute myocardial infarction.

Am J Emerg Med 2007;25:256-258.

8. Okura H, Taguchi H, Kubo T, Toda I, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Yoshida K. Impact of arterial remodelling and plaque rupture on target and non-target lesion revascularisation after stent implantation in patients with acute coronary syndrome: an intravascular ultrasound study.

Heart 2007;93:1219-1225.

9. Nishiya D, Enomoto S, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Izumi Y, Iwao H, Takeuchi K, Yoshiyama M. The long-acting Ca²⁺-channel blocker azelnidipine prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

J Pharmacol Sci 2007;103:391-397.

10. Okura H, Taguchi H, Kubo T, Toda I, Yoshida K, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Atherosclerotic plaque with ultrasonic attenuation affects coronary reflow and infarct size in patients with acute coronary syndrome: an intravascular ultrasound study.

Circ J 2007;71:648-653.

11. Yamashita H, Ehara S, Yoshiyama M, Naruko T, Haze K, Shirai N, Sugama Y, Ikura Y, Ohsawa M, Itabe H, Kataoka T, Kobayashi Y, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. Elevated

plasma levels of oxidized low-density lipoprotein relate to the presence of angiographically detected complex and thrombotic coronary artery lesion morphology in patients with unstable angina.

Circ J 2007;71:681-687.

12. Ueda H, Hayashi T, Tsumura K, Kaitani K, Yoshimaru K, Nakayama Y, Yoshiyama M. QT dispersion and prognosis after coronary stent placement in acute myocardial infarction.

Clin Cardiol 2007;30:229-233.

13. Hirata K, Kadirvelu A, Kinjo M, Sciacca R, Sugioka K, Otsuka R, Choy A, Chow SK, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Homma S, Lang CC. Altered coronary vasomotor function in young patients with systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum 2007;56:1904-1909.

14. Takagi M, Tatsumi H, Yoshiyama M. Approach to the asymptomatic patients with Brugada syndrome.

Indian Pacing Electrophysiol J 2007;7:73-76.

15. Sugioka K, Hozumi T, Takemoto Y, Ehara S, Ogawa K, Iwata S, Oe H, Matsumura Y, Otsuka R, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Relation of early improvement in coronary flow reserve to late recovery of left ventricular function after beta-blocker therapy in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.

Am Heart J 2007;153:1080.e1-e6.

16. Adachi T, Naruko T, Itoh A, Komatsu R, Abe Y, Shirai N, Yamashita H, Ehara S, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, Ohsawa M, Yoshiyama M, Haze K, Ueda M. Neopterin is associated with plaque inflammation and destabilisation in human coronary atherosclerotic lesions.

Heart 2007;93:1537-1541.

17. Wake R, Takeuchi M, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of gender on prognosis of patients with known or suspected coronary artery disease undergoing contrast-enhanced dobutamine stress echocardiography.

Circ J 2007;71:1060-1066.

18. Okajima K, Abe Y, Fujimoto K, Fujikura K,

Girard EE, Asai T, Kwon SH, Jin Z, Nakamura Y, Yoshiyama M, Homma S. Comparative study of high-resolution microimaging with 30-MHz scanner for evaluating cardiac function in mice.

J Am Soc Echocardiogr 2007;20:1203-1210.

19. Nagakura T, Takeuchi M, Yoshitani H, Nakai H, Nishikage T, Kokumai M, Otani S, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Hypertrophic cardiomyopathy is associated with more severe left ventricular dyssynchrony than is hypertensive left ventricular hypertrophy.

Echocardiography 2007;24:677-684.

20. Okura H, Takada Y, Kubo T, Asawa K, Taguchi H, Toda I, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Yoshida K. Functional Mitral Regurgitation Predicts Prognosis Independent of Left Ventricular Systolic and Diastolic Indices in Patients with Ischemic Heart Disease.

J Am Soc Echocardiogr 2007 in press.

21. Okura H, Asawa K, Kubo T, Taguchi H, Toda I, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Yoshida K. Impact of statin therapy on systemic inflammation, left ventricular systolic and diastolic function and prognosis in low risk ischemic heart disease patients without history of congestive heart failure.

Intern Med 2007;46:1337-1343.

22. Tanaka H, Shimada K, Yoshida K, Jissho S, Yoshikawa J, Yoshiyama M. The simultaneous assessment of aortic valve area and coronary artery stenosis using 16-slice multidetector-row computed tomography in patients with aortic stenosis comparison with echocardiography.

Circ J 2007;71:1593-1598.

23. Tanaka S, Yoshiyama M, Imanishi Y, Teragaki M, Kasayuki N, Shimizu N, Nakahira K, Hanaki T, Naito Y, Tanaka M, Inoue Y. Measuring visceral fat with water-selective suppression methods (SPIR, SPAIR) in patients with metabolic syndrome.

Magn Reson Med Sci 2007;6:171-175.

24. Ehara S, Naruko T, Kobayashi Y, Kataoka T, Nakagawa M, Shirai N, Ishii H, Okuyama T,

Oe H, Sugioka K, Hozumi T, Haze K, Yoshikawa J, Yoshiyama M, Ueda M. Comparison of clinical characteristics and arterial remodeling by intravascular ultrasonic imaging in three age groups (< or =55, 56 to 69 and > or =70 years) of Japanese patients with acute myocardial infarction.

Am J Cardiol 2007;100:1713-1717.

25. Nishitani Y, Yoshiyama M, Hosaka K, Tagami J, Donnelly A, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Use of Hoy's solubility parameters to predict water sorption/solubility of experimental primers and adhesives.

Eur J Oral Sci 2007;115:81-86.

26. Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From AH, Zhang J. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Stem Cells 2007;25:612-620.

(寺崎文生)

1. Miyamoto S, Ueda M, Ikemoto M, Naruko T, Itoh A, Tamaki S, Nohara R, Terasaki F, Sasayama S, Fujita M. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina.

Heart 2008 in press.

2. Hatakeyama M, Imaizumi T, Terasaki F, Mori F, Tanji K, Sato F, Kijima H, Suma H, Wakabayashi K, Yoshida H, Fukuda I, Satoh K. Interferon-gamma upregulates retinoic acid-inducible gene-1 in human pericardial mesothelial cells.

Acta Cardiol 2007;62:553-557.

3. Otsuka K, Terasaki F, Eishi Y, Shimomura H, Ogura Y, Horii T, Isomura T, Suma H, Kitaura Y. Cardiac sarcoidosis underlies idiopathic dilated cardiomyopathy: Importance of mediastinal lymphadenopathy in differential diagnosis.

Circ J 2007;71:1937-1941.

4. Terasaki F, Okamoto H, Onishi K, Sato A, Shimomura H, Tsukada B, Imanaka-Yoshida K,

Hiroe M, Yoshida T, Kitaura Y, Kitabatake A, and 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;71:327-330.

5. Terasaki F, Fujita M, MD, Shimomura H, Tsukada B, Otsuka K, Otsuka K, Katashima T, Ikemoto M, Kitaura Y. Enhanced expression of myeloid-related protein complex (MRP8/14) in macrophages and multinucleated giant cells in granulomas of patients with active cardiac sarcoidosis.

Circ J 2007;71:1545-1550.

6. Otsuka K, Terasaki F, Iimori A, Tonari S, Shimomura H, Ito T, Kitaura Y, Kanki-Horimoto S, Katsumata T. Right atrial blood cyst with total occlusion of the right coronary artery.

Heart Vessels 2007;22: 208-210.

7. Tanaka T, Sohmiya K, Kono T, Terasaki F, Horie R, Ohkaru Y, Muramatsu M, Takai S, Miyazaki M, Kitaura Y. Thiamine attenuates the hypertension and metabolic abnormalities in CD36-defective SHR: Uncoupling of glucose oxidation from cellular entry accompanied with enhanced protein O-GlcNAcylation in CD36 deficiency.

Mol Cell Biochem 2007;299:23-35.

(藤尾慈)

1. Tougou, K., Fukuda, T., Ito, T., Yamazaki, H., Fujio, Y., Azuma, J. (2007) Genetic polymorphism of bile acid CoA: Amino acid N-acetyltransferase in Japanese individuals. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22, 125-128.

2. Kuroda, T., Masaki, M., Sugiyama, S., Hiramoto, Y., Shioyama, W., Okamoto, K., Fujio, Y., Hirota, H., Hori, M., Yamauchi-Takahara, K. (2007) Carbacyclin induces carnitine palmitoyltransferase-1 in cardiomyocytes via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ independent of the

IP receptor signaling pathway.

J. Mol. Cell. Cardiol. 43, 54-62.

3. Nakaoka, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Kamiya, A., Minami, T., Sawa, H., Maeda, M., Fujio, Y., Koyama, T., Yamasaki, S., Sone, M., Arai, Y., Koh, G.-Y., Kodama, T., Hirota, H., Otsu, K., Hirano, T., Mochizuki, N. (2007) Gab family scaffolding adaptor proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling.

J. Clin. Invest. 117, 1771-1781.

4. Ito, T., Asakura, K., Tougou, K., Fukuda, T., Kubota, R., Nonen, S., Fujio, Y., Azuma, J. (2007) Regulation of cytochrome P450 under hypertonic environment through TonEBP in human hepatocytes.

Mol. Pharmacol. 72, 173-181.

5. Kimura, R., Maeda, M., Arita, A., Oshima, Y., Obana, M., Ito, T., Yamamoto, Y., Mohri, T., Kishimoto, T., Kawase, I., Fujio, Y., Azuma, J. (2007) Identification of cardiac myocytes as targets of interleukin-11, a cardioprotective cytokine.

Cytokine 38, 107-115.

6. Nonen, S., Yamamoto, I., Liu, J., Maeda, M., Motomura, T., Igarashi, T., Fujio, Y., Azuma, J. (2008) Adrenergic β 1 receptor polymorphism (Ser49Gly) is associated with obesity in type 2 diabetic patients.

Biol. Pharm. Bull. 35, 295-298.

7. Myrand, S. P., Sekiguchi, K., Man, X., Lin, X., Tzeng, R.-Y., Teng, C.-H., Hee, B., Kikkawa, H., Lin, C.-Y., Eddy, S. M., Dostalík, J., Mount, J., Azuma, J., Fujio, Y., Jang, I.-J., Shin, S.-G., Bleavins, M. R., Williams, J. A., Paulauskis, J. D., Wilner, K. (2008) Pharmacokinetics/ Genotype association for major cytochrome P450 enzymes in native, 1st, and 3rd generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations.

Clin. Pharmacol. Ther. In press.

8. Nonen, S., Okamoto, H., Fujio, Y., Takemoto, Y., Yoshiyama, M., Hamaguchi, T., Matsui, Y., Yoshikawa, J., Kitabatake, A.,

Azuma, J. (2008) Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor α 1D are associated with the response to β -blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J. 8, 78-84.

9. Maeda, M., Yamamoto, I., Fukuda, M., Motomura, T., Nishida, M., Nonen, S., Fujio, Y., Kasayama, S., Azuma, J. (2008) MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients.

J. Diabetes. Complications. 22, 119-125.

10. Ito, T., Kimura, Y., Uozumi, Y., Takai, M., Muraoka, S., Matsuda, T., Ueki, K., Yoshiyama, M., Ikawa, M., Okabe, M., Schaffer, S. W., Fujio, Y., Azuma, J. (2008) Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy.

J. Mol. Cell. Cardiol. In press.

11. Yamamoto, Y., Hoshino, Y., Ito, T., Nariai, T., Mohri, T., Obana, M., Hayata, N., Uozumi, Y., Maeda, M., Fujio, Y., Azuma, J. (2008) Atrogin-1 ubiquitin ligase is upregulated by doxorubicin via p38 MAP kinase in cardiac myocytes.

Cardiovas. Res. In press.

2. 学会発表

(岩尾洋)

1. 第 80 回日本薬理学会年会シンポジウム
2007 年 3 月 14 日～16 日 名古屋
スタチンによる血管保護作用の分子ネットワーク解析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、
中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

2. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 2007
年 6 月 15 日 名古屋

プラバスタチンはラット大動脈内皮細胞に
おいて FGF-2 の産生を増加させる

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、
泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋

3. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10
月 25-27 日 沖縄

心臓特異的な MAT1 遺伝子欠失マウスは劇

的な心不全を引き起こす

泉 康雄、塩田 正之、三浦 克之、岩尾 洋

4. 第30回日本高血圧学会総会 2007年10月25-27日 沖縄

HSP70はスタチンによるAktの活性化を制御し、血管内皮細胞遊走および脈管形成に関与する

日下部 裕美、塩田 正之、疋田 優子、泉 康雄、岩尾 洋

5. 第30回日本高血圧学会総会 2007年10月25-27日 沖縄

プラバスタチン依存的FGF-2発現は血管新生作用に関与する

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、泉 康雄、岩尾 洋

6. 第112回日本薬理学会近畿部会 2007年11月16日 大阪

スタチンの多面的作用発現の分子機序の解析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

7. 第11回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2007年11月16-17日 東京

Menage-a-trois 1は心筋のミトコンドリア機能に不可欠である

泉 康雄、岩尾 洋

8. 第17回日本循環薬理学会 2007年11月30日 大阪

Menage-a-trois 1は心筋の代謝機能保持に不可欠である

泉 康雄、塩田 正之、中尾 隆文、岩尾 洋

(岡本洋)

1. Xu ZJ, Okamoto H, Akino M, Tsutsui H: The Effect of Pravastatin on ROCK1 in Angiotensin \square -Induced Cardiac Fibrosis.

The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2007.3.17 Kobe

2. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A: Pharmacogenomics of β -blocker Therapy in

Chronic Heart Failure.

The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2007.3.17 Kobe

3. 岡本 洋 呼吸困難を主訴とし、繰り返す心不全のため心移植を施行した症例

第243回日本内科学会北海道地方会

2007.6.2 札幌

4. 東 純一、岡本洋、北畠顕

慢性心不全における β 遮断薬による治療法確立のための大規模臨床試験(J-CHF)

第28回日本臨床薬理学会 シンポジウム5 2007. 11. 28 栃木

5. 南畝 晋平、岡本 洋、藤尾 慈、竹本 恭彦、濱口 智幸、吉川 純一、北畠 顕、東 純一

α 2Cアドレナリン受容体De1322-325、ノルエピネフリン トランスポーターT182C遺伝子多型と心不全治療における β 遮断薬反応性個人差との関連

第28回日本臨床薬理学会

2007. 11. 28 栃木県総合文化センター国際学会

6. Zhujie Xu, Hiroshi Okamoto, Masatoshi Akino, Hisao Onozuka, Hiroyuki Tsutsui Pravastatin attenuates left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy ISHR June 21, 2007 Ferrara, Italy

(葭山稔)

1. Acute Hemodynamic Benefits of Atrial Septal Pacing with the Optimal Atrioventricular Delay. Tatsumi H, Takagi M, Maeda K, Nakagawa E, Yamashita H, Yoshiyama M. Japanese Circulation Society, Kobe, Japan, 15-17, Mar., 2007.

2. Persistent High Levels of Plasma Oxidized Low Density Lipoprotein at 6 Months after Acute Myocardial Infarction Predict Future Cardiovascular Events. Nakagawa M, Ehara S, Ikura Y, Kitabayashi C, Shirai N, Yamashita H, Ohsawa M, Yoshiyama M, Ueda M, Naruko T, Abe Y, Komatsu R, Itoh A, Haze K. Japanese Circulation Society, Kobe, Japan, 15-17, Mar.,

2007.

3. Impact of Body Mass Index and Framingham Risk Score on Coronary Atherosclerotic Disease. Takeshita H, Shimada Y, Kobayashi Y, Kataoka T, Ehara S, Ishii H, Matsumoto R, Shirai N, Nishioka H, Yamashita H, Yoshiyama M. Japanese Circulation Society, Kobe, Japan, 15-17, Mar., 2007.

4. The Reduction on the Myocardial Infarction Volume in Patients With TIMI-3 before PCI Assessed by Delayed Enhanced MRI. Yoshitani H, Kaji S, Yamamuro A, Tanabe K, Kinoshita M, Tamita K, Yoshiyama M, Kihara Y. Japanese Circulation Society, Kobe, Japan, 15-17, Mar., 2007.

5. Improvement in Coronary Flow Reserve is Associated With Late Recovery of Left Ventricular Function After Carvedilol Therapy in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Sugioka K, Takemoto Y, Ehara S, Ogawa K, Iwata S, Oe H, Matsumura Y, Otsuka R, Yoshitani H, Yoshikawa J, Yoshiyama M.

American Heart Association. Orland, USA, 4-7, Nov., 2007.

6. Assessment of Daily Fluctuations in 12-Lead Electrocardiogram and Signal Averaged Electrocardiogram at Risk for Life-threatening Arrhythmic Events in Brugada Syndrome. Doi A, Takagi M, Maeda K, Tatsumi H, Nakagawa E, Yamashita H, Yoshiyama M. American Heart Association. Orland, USA, 4-7, Nov., 2007.

7. Comparative Diagnostic Accuracy Between Tri-plane and full volume Three-Dimensional Dobutamine Stress Echocardiography for Detecting Coronary Artery Disease. Yoshitani H, Takeuchi M, Sugioka K, Otsuka R, Takagi Y, Oe H, Ogawa K, Iwata S, Takemoto Y, Yoshiyama M. American Heart Association. Orland, USA, 4-7, Nov., 2007.

(藤尾慈)

1. 南畝晋平, 前田頼伸, 平原志保, 原正彦,

西野雅巳, 山本明子, 増永結子, 大野雅子, 藤尾慈, 東純一 第28回日本臨床薬理学会年会, 2007年11月28日~12月1日(宇都宮)

Warfarin 維持投与量に対する遺伝子多型のインパクト ~維持投与量が高い症例における検討~第28回日本臨床薬理学会年会, 2007年11月28日~12月1日(宇都宮)

2. 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 濱口智幸, 吉川純一, 北島顕, 東純一 α 2C アドレナリン受容体 Del322-325、ノルエピネフリントランスポーター T-182C 遺伝子多型と心不全治療における β 遮断薬反応性個人差との関連 第28回日本臨床薬理学会年会, 2007年11月28日~12月1日(宇都宮)

3. 前田真貴子, 有田惇之, 尾花理徳, 山本泰弘, 毛利友美, 岩倉智彦, 早田望, 端山明子, 松田浩一, 藤尾慈, 東純一 血小板減少症治療薬インターロイキン(IL)-11を用いた心不全に対するサイトカイン療法 I—急性モデルを用いた検討— 第28回日本臨床薬理学会年会, 2007年11月28日~12月1日(宇都宮)

4. 藤尾慈, 尾花理徳, 有田惇之, 山本泰弘, 毛利友美, 岩倉智彦, 早田望, 端山明子, 松田浩一, 前田真貴子, 東純一 血小板減少症治療薬インターロイキン(IL)-11を用いた心不全に対するサイトカイン療法 II—慢性モデルを用いた検討— 第28回日本臨床薬理学会年会, 2007年11月28日~12月1日(宇都宮)

5. Ito, T., Kimura, Y., Takai, M., Fujio, Y., Azuma, J. Taurine is essential for cellular osmoregulation in the Heart. The American Heart Association Scientific Sessions 2007, November 4-7, 2007 (Orlando, Florida, USA)

6. Mohri, T., Fujio, Y., Iwakura, T., Obana, M., Matsuda, K., Maeda, M., Ito, T., Yamamoto, Y., Hayata, N., Azuma, J. Signals through glycoprotein 130 promote the endothelial differentiation of cardiac Sca-1+ cells. The American Heart Association Scientific Sessions 2007, November 4-7, 2007 (Orlando, Florida, USA)

7. Obana, M., Maeda, M., Yamamoto, Y., Ito, T., Mohri, T., Iwakura, T., Hayata, N., Takai, M., Hayama, A., Matsuda, K., Yamashita, K., Fujio, Y., Azuma, J. Interleukin-11 prevents cardiac remodeling after myocardial infarction with neovascularization in murine model. The American Heart Association Scientific Sessions 2007, November 4-7, 2007 (Orlando, Florida, USA)
8. 藤尾慈, 東純一 Cytokine Signaling and its Clinical Implications in Heart Failure 第11回日本心不全学会学術集会, 2007年9月9日~10日 (千葉県浦安)
9. Yamamoto Y., Oshima Y., Ito T., Qiu Z., Mohri T., Uozumi Y., Kimura Y., Maeda, M., Fujio Y., Azuma J. Cardiac overexpression of mineralocorticoid receptor contributes to cardiac remodeling after myocardial infarction. The 3rd China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology, Aug. 23-24, 2007 (Dalian, China)
9. 前田真貴子, 有田惇之, 尾花理徳, 山本泰弘, 毛利友美, 岩倉智彦, 松田浩一, 端

- 山明子, 山下朋美, 藤尾慈, 東純一. 血小板減少症治療薬インターロイキン 11 の心不全発症予防薬としての可能性と研究意義. 医療薬学フォーラム 2007/第15回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2007年7月14日~15日 (山形)
10. 増永結子, 植木理紗, 谷口智子, 船本全信, 三浦源太, 蓮沼智子, 山本明子, 丹下悦子, 久保田智子, 前田真貴子, 福田剛史, 藤尾慈, 東純一. 科学的根拠に基づいた禁煙支援に向けて~ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニット (CHRNA4) 多型はニコチン依存性に影響を及ぼす~ 医療薬学フォーラム 2007/第15回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2007年7月14日~15日 (山形)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理的検討

分担研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：我々は正常のカニクイザルにエピネフリンを投与し、左室基部の壁運動に比べて心尖部での著明な壁運動異常が認められる“たこつぼ型”心筋症の病態モデルを作成した。心機能評価（左室容量および駆出率）はリアルタイム three-dimensional echocardiography (RT3D 心エコー)を用いて行った。心筋症モデル作成後にβ受容体遮断薬のメトプロロール (0.3mg/kg/10min 静脈内) 投与を行うと、左室駆出率は30%から40%へ有意に改善した。β受容体遮断薬が有効であったことから、その分子機序解明を行った。まず、エピネフリン投与により左室心尖部のみ壁運動低下を引き起こすことから、左室を3部位（基部・中部・心尖部）に分け、それぞれのmRNAを抽出し、遺伝子発現レベルをマイクロアレイ法および定量PCR法により評価した。コントロール群心尖部に比べてエピネフリン投与群心尖部における遺伝子発現が2倍以上あるいは0.5倍以下のものをリストアップし、その中で、基部で同様に変動している遺伝子を除いた。その結果、約2500もの候補遺伝子が含まれた。この中で、さらにメトプロロールによって改善された遺伝子群が治療関連候補遺伝子となり得ると考えた。

A. 研究目的

現在、わが国の死因の第2位が心疾患であり、高齢化と生活習慣の欧米化により心疾患の最終段階である心不全はますます増加すると推測されている。心疾患に対する治療薬としては様々な薬剤が存在するが、種々の心疾患の終末像である慢性心不全の治療において、β受容体遮断薬は不可欠な薬剤である。事実、近年数多くの大規模臨床試験の結果から、β受容体遮断薬が慢性心不全の死亡率を改善させることが報告されている。しかしながら、β受容体遮断薬がなぜ有効なのかを説明する作用機序に関しては未だに不明の点が多く存在する。特に、β受容体遮断薬の心筋に対する陰性変力作用により約30%のノンレスポnder患者においては、心不全を悪化させるという欠点をもつことも知られている。一方では、大多数の心不全患者の心臓の駆出率 (ejection fraction) を増加し、心機能を改善することが報告されている。

本研究は、β受容体遮断薬の薬物反応性

がヒトと類似するサル心不全モデルを用いて、心機能評価とともにβ受容体遮断薬の作用機序を遺伝子発現様式や免疫組織化学による解析を行うことにより明らかにする試みである。

β受容体遮断薬の薬物反応性が良い拡張型心不全モデルの一つであるカテコールアミン心筋症による心不全を作成する。心不全時の遺伝子発現解析、免疫組織化学による解析を行い、β受容体遮断薬メトプロロール投与による駆出率改善時の遺伝子発現解析、免疫組織化学による解析を比較検討することにより、①β受容体サブタイプの変化やnorepinephrine transporterなどのアドレナリン関連遺伝子の関与、②リアノジン受容体、Sarcoendoplasmic reticulum ATPase (SERCA)、adenyl cyclase、phosphodiesteraseなど細胞内カルシウム調節関連遺伝子の関与、③angiotensinogen や angiotensin II receptor などレニン・アンジオテンシン系関連遺伝子の関与④superoxide dismutase 2 や cytochrome c、proliferator-activated receptor

gamma coactivator-1 (PGC-1)など、酸化ストレスや代謝関連遺伝子の関与などについて調べる。この研究により心不全での β 受容体遮断薬の作用を包括的に解析することで作用機序を解析し、治療関連候補遺伝子を探索することが出来る。

B. 研究方法

エピネフリン心不全モデルの作成

使用動物は検疫済みの雄性カニクイザル(3~8才, 中国産)を使用し、実験動物安全指針に従い研究を進めた。飼育はケージ(63cmx76cmx76cm)で行い、室温26度、湿度50%、照明時間は午前時から午後6時でおこなった。なお、カニクイザルの飼育は新日本科学鹿児島本社安全性研究所にておこなった。カニクイザルは、イソフルラン吸入麻酔下にてRT3D心エコー(SONOS 7500, Philips Med. Sys., USA)を行う。同時に循環動態をモニターしながら、エピネフリン(10 μ g/kg/min)を24時間間隔で3時間持続静脈内投与を2回行うことで作製する。モデルの成否は、エピネフリンの2回目投与後24時間目の左室駆出率をRT3D心エコーで測定し、40%以下の動物を心不全モデルとする。左心室の機能測定には、RT3D心エコーで左心室の容積変化を求める。イメージデータは、専用解析ソフトを用いて、左心室の拡張末期容積、収縮末期容積、1回拍出量および駆出率を求め、さらに心拍出量を算出する。

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

<解析項目>

①心エコー図

エピネフリン投与前、メトプロロール投与直後、および投与24時間後までについて経時的に測定する。

②血液生化学的検査項目

心エコーの測定直前に10mlの静脈血を採血し、正常時、エピネフリン投与後、メトプロロール投与後に採血し、カテコールアミン、心房性利尿ペプチドANP、脳性利尿ペプチドBNPを測定する。更に、心臓からの逸脱酵素の血中レベルを測定する。

③網羅的遺伝子発現解析

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

gamma coactivator-1 (PGC-1)などの遺伝子発現について検討する。上述の遺伝子については定量リアルタイム PCR 法により、各個体における発現を調べる。

④組織化学的解析

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

C. 研究結果

心エコー図

正常状態のサルにエピネフリンを静脈内投与すると“たこつぼ型”様の心尖部領域の壁運動低下が生じることを3D心エコーを用いて検討した。駆出率も正常サルに比して有意に低下した。この“たこつぼ型”心不全モデルに対してメトプロロール(0.3mg/kg/10min 静脈内投与)は駆出率を有意に改善した。

血液生化学的検査項目

エピネフリン投与群では心筋逸脱酵素(GOT, CPKなど)の上昇が見られたが、メトプロロールによりこれらの逸脱酵素は改善しなかった。

網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイ法(各群 n=3)の結果、コントロール群心尖部に比べてエピネフリン投与群心尖部における遺伝子発現が2倍以上のものは約2500遺伝子、0.5倍以下のものは約600遺伝子であった。その中で、基部で同様に変動している遺伝子を除くと、それぞれ約2000遺伝子、約550遺伝子となった。基部に比べて心尖部では、エピネフリン投与による発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。

D. 考察

心不全モデルとしてのサル病態は確立できたと考えている。今回作製したカニクイザルカテコールアミン心不全モデルは、心不全に対するβ遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。心尖部においてエピネフリンで2倍以上あるいは0.5倍以下に変動した遺伝子の中で、メトプロロールによって改善された遺伝子群の中に、治療関連候補遺伝子が含まれていると考えられる。今後、各群の個体数を追加してn=4-5で個々の検体を用いた遺伝子解析を行う。

E. 結論

“たこつぼ型”心筋症に対してβ遮断薬が有効であることがわかった。今後は、β遮断薬の有効性と遺伝子多型との中で候補として見つかってきている遺伝子と我々の結果とを関連づけて検討していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y, Iwao H. (2008) Molecular network analysis in pleiotropic effects of statin.

J Pharmacol Sci in press.

2. Iwai T, Kitamoto K, Teramoto K, Machida Y, Tamada S, Yukimura T, Iwao H, Nakatani T, Miura K. (2008) Cobalt Protoporphyrin Attenuates Rat Obstructive Nephropathy: Role of Cellular Infiltration.

Urology in press.

3. Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwai T, Iwao H, Okamura M, Miura K. (2008) Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis.

J Pharmacol Sci 106:56-67.

4. Tanaka F, Tominaga K, Shiota M, Ochi M, Kuwamura H, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Iwao H, Arakawa T. (2008) Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the

peritoneal cavity.

Cancer Gene Ther 15:51-59.

5. Nakao T, Shiota M, Tatemoto Y, Izumi Y, Iwao H. (2007) Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/ p70 S6 kinase signaling.

J Pharmacol Sci 105:334-341.

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

Oncology Reports 17:781-786.

7. Nishiya D, Enomoto S, Omura T, Matsumoto R, Kusuyama T, Izumi Y, Iwao H, Takeuchi K, Yoshiyama M. (2007) The long-acting Ca²⁺-channel blocker azelnidipine prevents left ventricular remodeling after myocardial infarction.

J Pharmacol Sci 103:391-397.

8. Tsusaki H, Yonamine H, Tamai A, Shimamoto M, Kuwano K, Iwao H, Nagata R, Kito G. (2007) Left Ventricular Volume and Function in Cynomolgus Monkeys using Real-Time Three-Dimensional Echocardiography.

J Med Primatol 36:39-46.

2. 学会発表

1. 第 80 回日本薬理学会年会シンポジウム
2007 年 3 月 14 日～16 日 名古屋
スタチンによる血管保護作用の分子ネットワーク解析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、
中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

2. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 2007
年 6 月 15 日 名古屋

プラバスタチンはラット大動脈内皮細胞において FGF-2 の産生を増加させる

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、

泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋

3. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10
月 25-27 日 沖縄

心臓特異的な MAT1 遺伝子欠失マウスは劇
的な心不全を引き起こす

泉 康雄、塩田 正之、三浦 克之、岩尾
洋

4. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10
月 25-27 日 沖縄

HSP70 はスタチンによる Akt の活性化を制
御し、血管内皮細胞遊走および脈管形成に
関与する

日下部 裕美、塩田 正之、疋田 優子、
泉 康雄、岩尾 洋

5. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10
月 25-27 日 沖縄

プラバスタチン依存的 FGF-2 発現は血管新
生作用に関与する

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、
泉 康雄、岩尾 洋

6. 第 112 回日本薬理学会近畿部会 2007
年 11 月 16 日 大阪

スタチンの多面的作用発現の分子機序の解
析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、
中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

7. 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術
総会 2007 年 11 月 16-17 日 東京

Menage-a-trois 1 は心筋のミトコンドリア機
能に不可欠である

泉 康雄、岩尾 洋

8. 第 17 回日本循環薬理学会 2007 年 11
月 30 日 大阪

Menage-a-trois 1 は心筋の代謝機能保持に不
可欠である

泉 康雄、塩田 正之、中尾 隆文、岩尾
洋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

臨床データと遺伝子データの照合・解析に関する研究

分担研究者 岡本 洋 北海道大学大学院准教授 医学研究科循環病態内科学

研究要旨：心不全領域におけるテーラー・メード医療を具現化するために、 β 遮断薬の有効性を規定する遺伝的因子をゲノム疫学的アプローチにより検索すること、その遺伝的因子の意義を分子薬理学的アプローチにより解明することを目的とした統合的ゲノム薬理学研究の分担研究を行った。平成19年度は、拡張型心筋症患者からIC取得後に血液資料を得目的とする遺伝子多型性解析を行った。また、前向き研究としてJ-CHF試験を遂行し今後の遺伝子解析のための妥当性の検討を行った。

A. 研究目的

心不全の多くは生活習慣病を基礎として発症し、心疾患が辿る終末的な状態と考えられる。 β 遮断薬は、Negative Inotropism 故、当初心不全には使用禁忌と考えられていた。しかし、1975年 Waagstein らにより拡張型心筋症患者治療における有効性が報告されて以来、慢性心不全へも適応が拡大され、ことに、CIBIS II、MERIT-HF、COPERNICUS 一連の RCTs によって、軽症～重症心不全患者で、生命予後を改善するとのコンセプトが確立した。一方で、心不全における β 遮断薬の作用機序を含め、その投与方法は確立したとは言いがたい。その理由の一つとして、 β 遮断薬に対し non-responder、responder が存在し、個々人により反応性が異なることが上げられる。従来からの報告結果からは、心筋が viable で、交感神経活性が亢進している症例で β 遮断薬の効果が期待しやすいことを示唆するが、同時に β 遮断薬に対する responder の予測は困難な状況にある。本研究は、 β 遮断薬治療を取り上げ、心不全治療におけるテーラー・メード医療を考察した。

B. 研究方法

当科における拡張型心筋症患者において、基礎的背景に関し検討を行った。また、J-CHF試験を遂行し、心不全患者登録、中間評価を行った。

C. 研究結果

1) 当科を初診し、心エコー図上、 $\%FS < 23\%$ かつ $LVDd > 50mm$ さらに冠動脈造影上有意な狭窄病変が認められず2次性心筋症が除外された136例が拡張型心筋症として登録された。平均年齢は 57 ± 13 歳（19歳から88歳）、男性103例、女性33例、初診時 NYHA I : II : III : IV 23 : 64 : 9 : 4%、経過中24例が死亡し、その内訳は心臓死、19例、内心不全死14例、突然死5例であった。 β 遮断薬導入群は84例（導入率62%、死亡12例）、 β 遮断薬非導入群は52例（死亡12例）であった。 β 遮断薬としては、metoprolol 28例（平均35.3mg）、carvedilol 43例（平均12.7mg）、bisoprolol 8例（平均3.4mg）であった。

β 遮断薬投与群84例と非投与群52例について、平均2461日観察し、多変量解析に引き続き、カプラン-マイヤー解析を行った結果、 β 遮断薬投与による生命予後改善効果が示された。心エコー上、 $\%FS$ の改善3%以上増加を改善、3%以内を不変、-3%以上減少を悪化とした場合、 β 遮断薬非投与群で、改善9.6%、不変86.5%、悪化3.8%であったのに対し、 β 遮断薬投与群では改善36.3%、不変55.8%、悪化7.8%と β 遮断薬投与群で心機能改善が多く認められた。心機能の改善は、臨床症状の改善、血漿 ANP、BNP 値の低下と相関したが、必ずしも投与前の心機能、心拍数、血漿 ANP、BNP 値と

は相関せず、長期的に responder を予測することは困難であった。一方で心機能非改善群においても臨床症状は改善された。また、心機能改善群、非改善群における死亡はそれぞれ、1 例、11 例と β 遮断薬投与による responder 群で有意な予後改善が示された。また、responder 群で心機能、心拍数、血漿 ANP、BNP 値の有意な変化が観察された。血漿中 metoprolol 及び carvedilol の平均薬剤血中濃度は、responder 群 non-responder 群の間に差を認めなかった。

J-CHF 試験に関しては、平成 19 年 12 月末日まで症例登録を行い、計 364 症例の登録を行った。その後、イベント評価解析を行った結果、約 40 症例で心不全悪化による入院、総死亡の primary endpoint に達した。今後、追跡調査を実施することとなった。

D. 考察

β 遮断薬の投与量における著しい個体差は原疾患の病態や重症度だけでなく、遺伝的素因に基づく薬物動態的あるいは薬力学的な個体差の関与することが想定される。実際、 β_1 受容体では 145 番目の塩基置換 (Ser49Gly) のない心不全患者で予後が短縮すること、 β_2 受容体では、Thr164Ile、Arg16Gly、Glu27Gln などが運動耐容能改善や心不全の経過に影響を及ぼすことなどが報告されている。今回、後ろ向きおよび前向き解析研究により、 β 遮断薬の responder 解析を行うことを目的に検討を行った。その結果、後ろ向き研究結果では SNPs 解析によりいくつかの候補遺伝子を探索できた。今後前向き研究により解析を加え、精度の高い研究を推進するための rationale が示唆された。

E. 結論

平成 19 年度、後ろ向き臨床研究の結果として、遺伝子多型が、 β 遮断薬の薬効と相関を示すことが明らかになった。今後、前向き研究においても検証を加える必要が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fumio Terasaki, Hiroshi Okamoto, Michiaki Hiroe, Kyoko Imanaka-Yoshida, Katsuya Onishi, Akira Sato, Hiroaki Shimomura, Bin Tsukada, Toshimichi Yoshida, Yasushi Kitaura, Akira Kitabatake, and Study Group for Intractable Diseases by a Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. Higher serum tenascin-C levels reflect the severity of heart failure, left ventricular dysfunction and remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J* 2007 71(3):327-330.

2. Hiroshi Okamoto. Osteopontin and cardiovascular system.

Mol Cell Biochem 2007 300:1-7.

3. S Nonen, H Okamoto, Y Fujio, Y Takemoto, M Yoshiyama, T Hamaguchi, Y Matsui, J Yoshikawa, A Kitabatake, J Azuma Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor 1D are associated with the response to β -blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008 8, 78-84.

4. Xu Z, Okamoto H, Akino M, Onozuka H, Matsui Y, Tsutsui H. Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling and Diastolic Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice.

J Cardiovasc Pharmacol 2008 51(1):62-70.

<邦文>

1. 平林 鑑, 山田 聡, 石見かおり, 絹川 真太郎, 蒔田直昌, 岡本 洋, 筒井裕之, 杉木宏司, 村下十志文, 中川雄太: 左室補助装置から離脱しえた巨細胞性劇症型心筋炎の 1 例, 日本内科学会雑誌, 96(2): 139-141, 2007 総説

2. 岡本 洋 拡張型心筋症 経過と予後 新目でみる循環器病シリーズ 15 「心筋症」、95-100, 2007

3. 岡本 洋, 筒井 裕之

心不全の疫学 概要

日本臨床 心不全上 49-54, 2007

4. 岡本 洋, 南畝晋平, 東 純一
心不全における遺伝子多型