

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋細胞内脂質代謝とGq蛋白共役型受容体シグナルの制御—

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

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

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

Gq 蛋白の α サブユニット活性型変異体を心臓に選択的に発現したトランスジェニックマウス(Gaq-TG)は、生後10～12週でうっ血性心不全に陥り、死亡する。

本研究では、DGK ζ がこの心不全モデルマウスにおける心機能低下と心不全の発症を抑制するか検討した。

B. 研究方法

Gaq-TG と DGK ζ -TG マウスを掛け合わせ、ダブルトランスジェニックマウス(Gaq/DGK ζ -TG)を作成した。12週後に心臓超音波検査を行い、左室壁厚、左室内径、左室壁運動を評価した。また、右内頸動脈からマイクロカテーテルを逆行性に左室へ挿入し、左室圧を測定した。検査後サクリファイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白とRNAを抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

Gaq-TG マウスでは著明な心拡大と心重量、左室重量の増加が認められたが、Gaq/DGK ζ -TGマウスでは心拡大と心重量の増加は抑制された。Gaq-TG マウスでは心エコー法で左室内腔の拡大、左室短縮率の低下が観察されたが、Gaq/DGK ζ -TGマウスではこれらの変化は認められず、心機能は正常に維持されていた。Gaq-TGマウスでは左室拡張末期圧の上昇を認めたが、Gaq/DGK ζ -TGマウスでは左室拡張末期圧は正常範囲であった。Gaq-TGマウスで認められた心筋細胞肥大と線維化は、Gaq/DGK ζ -TGマウスでは抑制された。Gaq-TGマウスで認められたPKCの活性化はGaq/DGK ζ -TGマウスでは抑制された。また、transforming growth factor- β 1, collagen type-1, collagen type-3の発現はGaq/DGK ζ -TGマウスでは抑制されていた。生存率はGaq-TGマウスに比較し、Gaq/DGK ζ -TGマウスで有意に高かった。

D. 考察

DGK ζ は細胞内脂質代謝を制御することで、Gaq-TGマウスの心機能低下を抑制し、心不全発症を抑制した。また、DGK ζ はGaq-TGマウスの生存率も有意に改善させた。この結果は、Gq蛋白共役型受容体シグナルの過剰な活性化が心不全の発症と進展に重要な役割を果たしており、DGKがこのシグナルを制御しうることを意味している。

E. 結論

DGK ζ はGq蛋白共役型受容体シグナルと細胞内脂質代謝の調節因子として機能し、心不全モデルマウスにおける心機能低下と心不全の発症を抑制した。DGK ζ は心不全治療の標的分子となる可能性が示唆された。

F. 研究危険状況

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Koyama Y, Walsh RA, Goto K, Kubota I: Diacylglycerol kinase ζ attenuates left ventricular remodeling and improves survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1105-1112, 2007
- Niizeki T, Takeishi Y, Kitahara T, Arimoto T, Koyama Y, Goto K, Mende U, Kubota I: Diacylglycerol kinase ζ rescues G α_q -induced heart failure. *Circ J* 2008 (in press)

2) 学会発表

- Niizeki T, Takeishi Y, Koyama Y, Kitahara T,

Suzuki S, Mende U, Kubota I: Diacylglycerol kinase- ζ rescues G α_q -induced heart failure. American Heart Association Scientific Sessions, November 2007/Orlando

- Niizeki T, Takeishi Y, Koyama Y, Kitahara T, Suzuki S, Kubota I: Diacylglycerol kinase- ϵ prevents cardiac hypertrophy and fibrosis induced by aortic banding: A new specific regulator of G α_q signaling cascade. American Heart Association Scientific Sessions, November 2007/Orlando
- Sasaki T, Takeishi Y, Kitahara T, Koyama Y, Niizeki T, Suzuki S, Kubota I: Diacylglycerol kinase α exacerbates cardiac injury after ischemia/reperfusion in transgenic mouse hearts. American Heart Association Scientific Sessions, November 2007/Orlando

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

竹石恭知

(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野)

特発性心筋症に関する調査研究

ー心筋炎による電氣的・構造的リモデリングと抗酸化剤による抑制作用の検討ー

分担研究者： 和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

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

A. 研究目的

我々は、これまでに実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の発生に関与する免疫的機序を検討し報告してきているが、当科の不整脈研究班は、同モデルにおける催不整脈性とその背景に存在する電氣的リモデリングについて検討してきた。今回は、これら電氣的リモデリングに関する研究成果を報告する。

心筋炎急性期には、心機能の急激な低下とともに多彩な不整脈が出現する。EAMにおいても、急性期にラットが突然死を来すことがあり、致死的不整脈が関与している可能性がある。これまでの検討で、我々はEAM(古典的実験的自己免疫性心筋炎モデル)では、初期感作21日目をピークとする催不整脈性の増大を確認し、その背景に一過性外向きカリウム電流の減少を機序とする心室筋活動電位の延長(電氣的リモデリング)と、撃発活動出現の関与があることを報告してきた(Circ J, 2002, Cardiovasc Res, 2004)。これらの電気生理学的変化は、心筋炎の進行とともに出現すると考えられるが、その発症機転の要因として組織酸化ストレスの過剰状態が関与している可能性がある。今回我々は、EAM初期の組織酸化ストレスを評価するとともに、抗酸化剤を投与することによる、心筋炎および心筋リモデリングの抑制作用について検討した。

B. 研究方法

6週齢のLewisラットにブタ心筋ミオシンを感作し、EAMを作成した。炎症の超急性期(効果期)に抗酸化剤を作用する目的で、感作10-11日目にN-acetylcysteine(NAC, 1, 10, 100 mg/kg/日)または感作10-13日目にnicaraven(300, 900 mg/kg/日)を腹腔内投与した。感作14日目に、以下の各項目を

評価した。

評価項目：①心筋炎と酸化ストレス評価のために、心体重比、心筋炎のマクロスコア、組織学的スコア、hexanoyl-lisine(HEL)染色による組織酸化ストレス評価を行った。②血行動態と電気生理学的指標として、左室拡張末期圧、体血圧、心拍数、心臓超音波による左室駆出分画、fraction shortening、心室筋有効不応期、活動電位持続時間を評価した。③左室心筋における以下の関連分子のmRNAをreal-time RT-PCRで評価した。すなわち、イオンチャネル関連分子としてKv4.2, Kv4.3, Kv1.4, Erg, L-type Ca^{2+} 、イオン交換系ないし Ca^{2+} handling関連分子としてSERCA2a, Ryanosine receptor, $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger, 炎症性サイトカインとしてTNF- α , IFN- γ , IL-10、心臓ホルモンとしてBNP、内部標準化物質としてcyclophilinを評価した。

C. 研究結果

1) 抗酸化剤投与による死亡数

表に抗酸化剤投与による死亡数を示した。Nicaraven投与による死亡は認められなかったが、NAC 100 mg/kg/日投与群では、EAM群で7/22、対照(非EAM)群で7/17で死亡が認められた。

表. 抗酸化剤投与による死亡数

NAC投与による死亡数

総数/死亡数 (n)	NAC 0 mg	NAC 1 mg	NAC 10 mg	NAC 100 mg
Non-EAM rat	18 / 0	10 / 0	10 / 0	17 / 7*
EAM rat	21 / 1	10 / 0	10 / 0	22 / 7*

* p<0.05 vs NAC 0mg

Nicaraven投与による死亡数

総数/死亡数 (n)	nicaraven 0 mg	nicaraven 300 mg	nicaraven 900 mg
Non-EAM rat	4 / 0	11 / 0	11 / 0
EAM rat	27 / 2	11 / 0	13 / 0

2) 心筋炎と組織酸化ストレスの評価

図1に各群の典型的なマクロ像と組織学的スコア、図2に典型的な組織像とHEL染色例を示した。EAM群では対照(非EAM)に比して、心臓の肥大と心表面の変色、組織学的に単核球細胞浸潤と間質の浮腫を認め、典型的な急性心筋炎像を示した。NAC 1 mg/kg/日投与群では明らかな心筋炎抑制は認められなかったが、NAC 10 mg, 100 mg,

nicaraven 300 mg, 900 mg群では用量依存的に心筋炎の抑制が認められた。EAM群では、心外膜側を中心にHEL陽性細胞が認められ、組織酸化ストレスの増大が推定されたが、NACはこれを用量依存的に抑制した。なお、感作10日後の組織においてもHEL陽性細胞が認められており、免疫反応の効果期からすでに酸化ストレスが増大していることが示唆された。

心筋炎マクロ所見

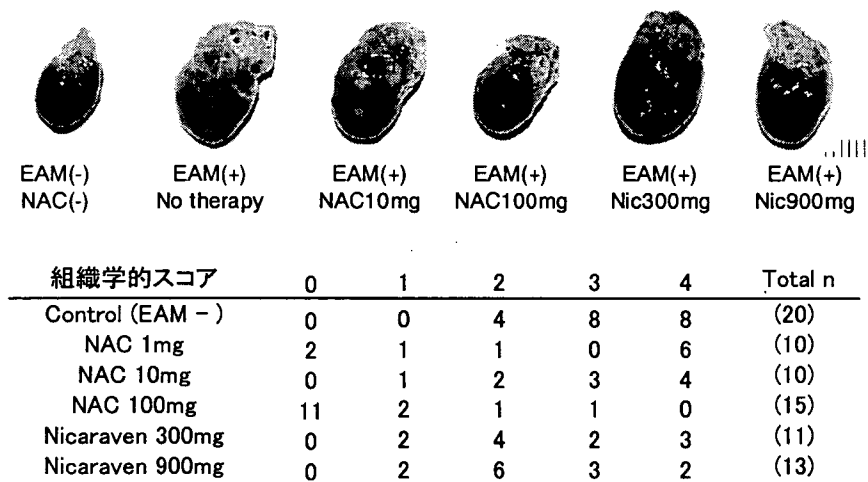


図1. 心筋炎のマクロ所見と組織学的スコア

EAM無治療群では、心筋の肥大、間質への細胞浸潤等に特徴づけられる急性心筋炎像を認めたが、NACないしニカラベンの投与により、心筋炎は抑制された。その抑制効果は用量依存的であった。NAC 100 mg投与群では、心筋炎が顕著に抑制され、マクロ像でも心拡大は軽度に留まった。詳細は本文参照。

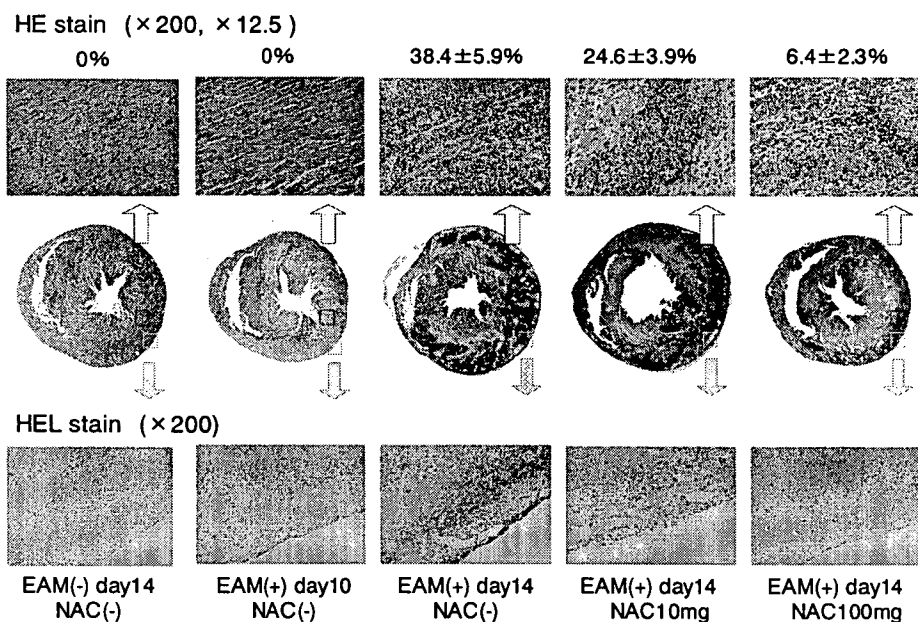


図2. HE染色とHEL染色による組織像比較

EAM(-)群ではday14において炎症所見は認められないが(左端)、EAM(+)群では単核球細胞浸潤と間質の浮腫を認め、浸潤細胞範囲も38.4%に及んだ(中央)。HEL染色では、心外膜側を中心とする染色が認められ、組織酸化ストレスの増大を示している。このHEL陽性化はday10においてもすでに軽度認められた(左端より2番目)。NAC投与により、day14の細胞浸潤は用量依存的に抑制され、HEL陽性範囲も縮小した(右2列)。詳細は本文参照。

3) 血行動態評価

EAM群では、対照に比して心体重比の増大、LVEDPの上昇、体血圧の低下、LVEFとFSの低下を認めたが、NAC 100 mg、nicaraven 900 mgはこれらの変化を抑制した。

4) 電気生理学的評価

図3に各群の活動電位持続時間を示した。左は典型的な単相性活動電位記録(MAP)、右はMAP90(90%電位回復時間)の平均を示している。EAM群では対照に比してMAPDが有意に延長していた。対照へのNAC投与はMAPDを変化させなかったが、EAM群ではNACないしnicaraven投与が用量依存的にMAPD延長を抑制した。この回復作用は少量であるNAC 1 mg群、nicaraven 300 mgにも認め

られ、必ずしも心筋炎の回復程度と並行しなかった。心室筋有効不応期は、ほぼMAPDに並行してEAM群で延長していたが、NACないしnicaravenの投与により延長が抑制された。

5) イオンチャネル・イオン交換系・ Ca^{2+} handling関連分子

今回検討した分子のうち、EAMで対照に比して有意な変化を示したのは、既報の如くKv4.2、Kv4.3、Kv1.5、SERCA2aであった。図4にKv4.2の定量結果を示した。EAM群では対照に比してKv4.2発現が有意に減少したが、NAC投与により用量依存性に低下が抑制された。他の分子についても同様な結果であった。

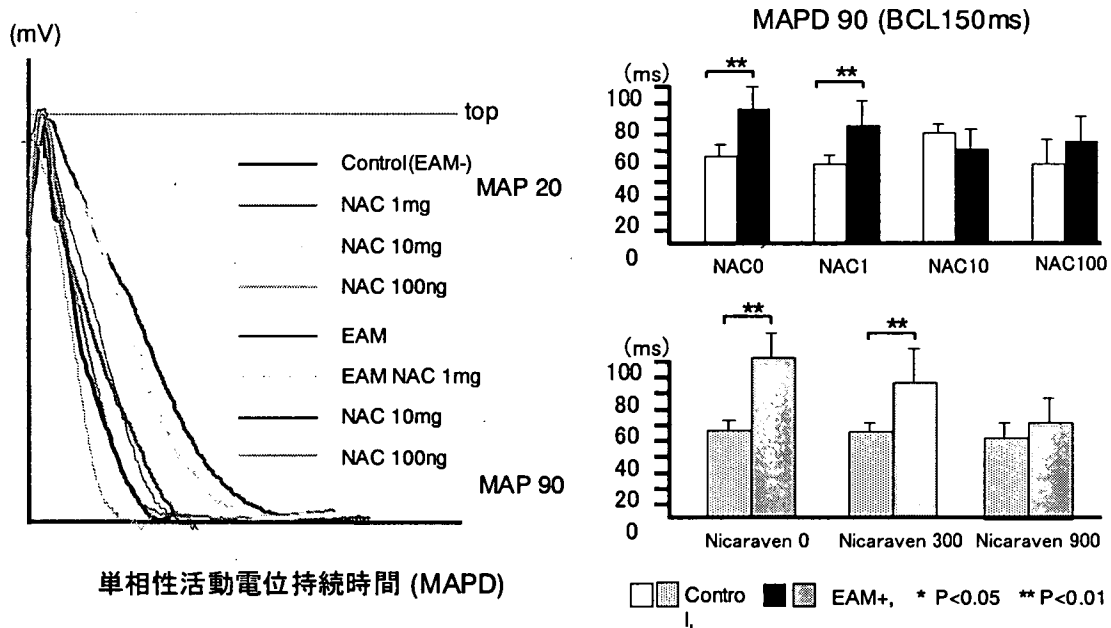


図3. 活動電位持続時間の比較

左は各群の単相性活動電位記録の例、右はMAP90(電位90%回復時間)の平均を示す。EAMのないControlに対し、EAM群ではMAPDの延長を認めたが、NACないしニカラベンはこの延長を用量依存性に抑制した。特に、NAC 1 mg群では組織学的変化が明らかに認められなかったにも関わらず、有意にMAP90の延長が抑制された。これはMAPD延長に特徴づけられる電気的リモデリングの抗酸化剤による抑制が、心筋炎の抑制にのみ依存していないことを示している可能性がある。詳細は本文参照。

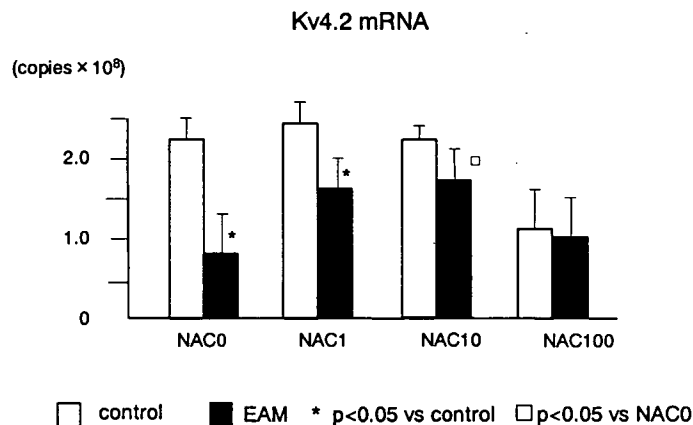


図4. Kv4.2 発現変化に対する NAC の効果

EAMのないControl群に比し、EAM群ではKv4.2 mRNAの発現が低下していたが(左端)、NACの投与によりその発現低下は用量依存的に抑制された。MAPDの変化(図3)と同様、NAC 1mg投与群においては、組織学的変化が明らかに認められなかったにも関わらず、Kv4.2発現の低下は抑制された。詳細は本文参照。

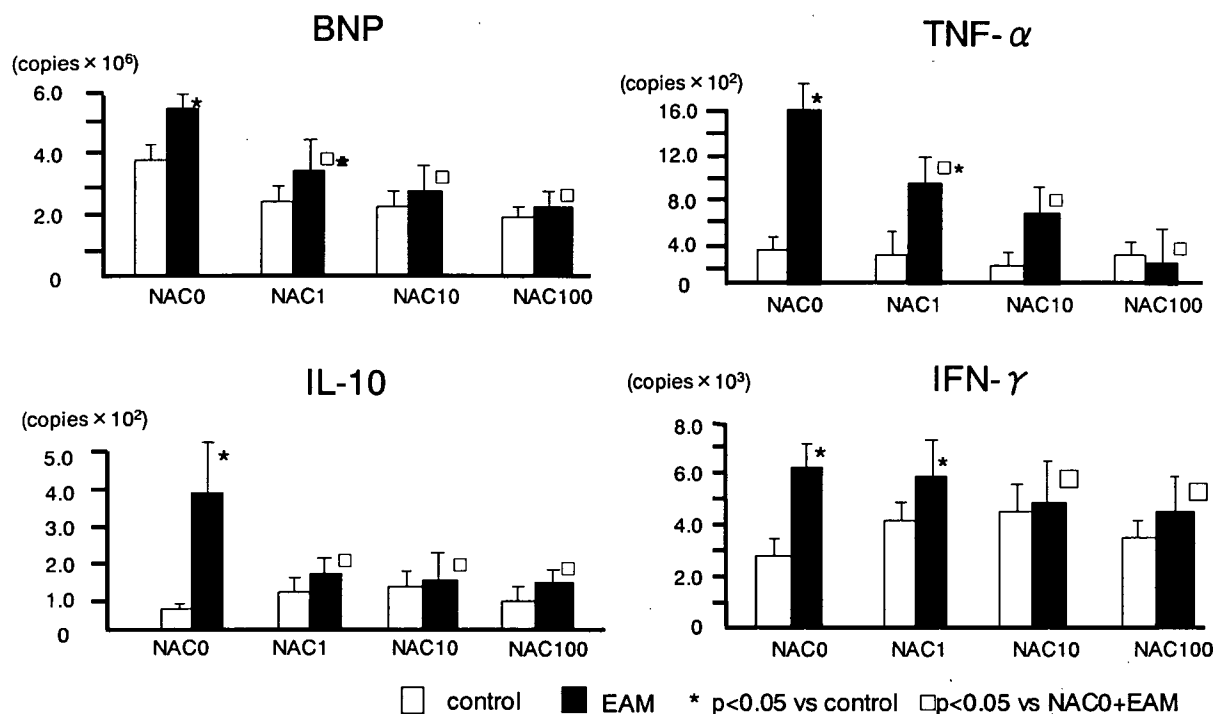


図5. BNP、サイトカイン発現変化に対するNACの効果

EAMのないControl群に比し、EAM群ではBNP、炎症性サイトカインとも有意に増加を認めたが(各パネル左端)、NACはこれらの増加を用量依存的に抑制した。NAC 10 mgおよび100 mg投与群では、これらの発現量の変化はControlと有意差を見ない程度まで抑制された。詳細は本文参照。

6) サイトカインとBNP

図5にBNPと炎症性サイトカインの発現定量結果を示した。EAMにおいて、これらはいずれも対照に比して有意に増加していたが、NACの投与は用量依存的にこれを抑制した。

D. 考察

今回の検討では、以下の事項が示された。すなわち、①EAMによって活動電位持続時間延長に特徴づけられる電気的リモデリングが生ずる、②炎症超急性期(効果期)である10日すでに組織酸化ストレスが増大している、③超急性期(10-13日)における抗酸化剤によって、心筋炎と電気的リモデリングが抑制される、④心筋炎と電気的リモデリングの抑制は低用量群で解離を認める、等の結果である。

感作10日の超急性期は、免疫反応の効果期であると考えられ、少なくとも組織学的に心筋炎の所見は明らかではない。しかし、今回の結果では心外膜側を中心とするHEL陽性細胞の出現を観察できることから、すでに組織酸化ストレスが増大していることが分かる。本報告内には示さなかったが、感作10日にはすでにTNF-αの上昇、心体重比の上昇を認めており、急性心筋炎によるリモデリングが始まっている可能性がある。

今回の検討では、抗酸化剤を感作10・11日(nicaravenは10-13日)という限定された時期に用いたプロトコールであったにも関わらず、特に高用量投与群では心筋炎と電気的リモデリングが顕著

に抑制された。このことは、少なくともEAMの超急性期(効果期)における酸化ストレスが、心筋炎と電気的リモデリングを進行させる上で重要な役割を果たしていることを示唆しており、適切な時期と用量を選択できれば、効果的に心筋炎を抑制できる可能性も示唆している。また、今回の報告には示さなかったが、10-14日を過ぎた後に抗酸化剤を投与した同様な検討では、心筋炎の発現はほとんど抑制されず、電気的リモデリングが軽度抑制されたのみであった。このことは、過剰酸化ストレスが心筋炎の進行機転に関与する時期が非常に限定されるという事実を示している可能性がある。

抗酸化剤により、電気的リモデリングが抑制された機序は複数推定される。電気的リモデリングの基礎たるイオンチャネルの変化が、炎症を機序として発生している以上、心筋炎自体が抑制されたことが電気的リモデリング抑制の主因である可能性が高い。しかし、特に低用量投与群においては、心筋炎のスコアがほとんど影響を受けなかったのに対し、電気生理学的指標やKv4.2発現の低下は抑制されており、炎症の程度とは独立した機序、すなわち酸化ストレスの抑制が炎症から電気的リモデリングを生ずる過程を直接的に抑制している可能性も推定される。このことは、今後酸化ストレスを独立して検討出来るモデルやin vitroの検討で明らかにしていく必要がある。

E. 結論

実験的自己免疫性心筋炎において、急性期の組織酸化ストレス過剰状態は心筋炎と心筋の電気的リモデリングを生ずる免疫反応(効果期)において、重要な役割を果たしていることが示唆された。特定の時期に、適切な量の抗酸化剤を投与することで、心筋炎の発症が有効に抑制される可能性がある。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

・第72回日本循環器学会総会・学術集会, 2008年3月/福岡(予定)

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

猪又孝元

<研究実施者>

庭野慎一・佐々木紗栄・庭野裕恵

特発性心筋症に関する調査研究

—重症拡張型心筋症患者に対する免疫吸着療法の試み—

分担研究者： 小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

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

A. 研究目的

心不全患者に対する薬物・非薬物治療の開発の進歩により、その生命予後は改善されつつある。しかし、あらゆる手を尽くしても改善しない難治性心不全例に遭遇することも稀ではない。末期心不全患者に対する心移植は行われているが、移植待機中のごく一部の患者がその恩恵に浴しているのが現状である。わが国ではこのような症例の約8割が拡張型心筋症(DCM)による心不全例である。DCM患者の多くは抗心筋自己抗体を有し、少なくともそのうちのいくつかは病態生理学的意義を持ち、その病態の増悪因子になることをわれわれは明らかにしてきた。このような抗心筋自己抗体を除去する方法として免疫吸着療法の開発に着手したので、その概要を紹介する。

B. 研究方法

2006年から重症DCM患者を対象とする免疫吸着療法の臨床応用に着手した。開始にあたり、当院倫理委員会の承認(16-98-1)を得、文書による同意を得た上で施行した。予め自己抗体のスクリーニングを行い、 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体あるいはムスカリンM2受容体抗体陽性例を対象とした。血漿分離にはプラスマフローを用い、抗体除去にはトリプトファン・カラムであるイムソーバTR-350(旭化成メディカル)を使用した。1回のセッションには2時間程度を費やし、血漿処理量は一回につき2Lとした。

C. 研究結果

第一例目は53歳、女性の重症DCM患者であった。 β 遮断薬を含む心不全治療薬と心臓再同期治療下に心不全増悪による入院を繰り返していた。心胸郭比は69%、左室拡張末期径8.0cm、収縮末期

径7.8cm、心プールシンチによる左室駆出率は僅か4%であった。血漿ナトリウム利尿ペプチド(BNP)濃度は1933pg/mlであった。 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体抗体ともに陽性であった。週1回のペースで、計3回免疫吸着を行った。IgGは1181mg/dlから709mg/dlに低下した。血漿フィブリノーゲン値は415 mg/dlから104mg/dlに低下したが、退院時には257mg/dlに回復した。 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体価は300倍から20倍に低下し、ムスカリンM2受容体抗体は50倍から陰性化した。BNP濃度は退院時には1058pg/mlとなった。心プールシンチによる左室駆出率は11%となった。

第3例目は19歳、男性のDCM例に本治療を行った。 β 遮断薬などの心不全治療に加えて、フォスフォジエステラーゼ阻害薬とヒト心房利尿ホルモンなどの静注心不全治療薬からの離脱困難な症例であった。両心室ペーシングによる心臓再同期治療の適応を検討したが、有効性は期待しがたいとの判断で、本治療を試みることにした。2例目までの検討で安全性に問題はなく、抗体価の低下度から3回の吸着では不十分と判断し、週3回で計5回の吸着を試みた。左室径や駆出率に変化はないものの、BNP濃度は1044pg/mlから507pg/mlに低下した。施行後心不全治療薬の静注から離脱して、退院可能となった。

現在までに計6例に本治療を行っており、安全性に問題はないことが確認された。BNP濃度は 838 ± 255 pg/mlから 446 ± 143 pg/mlに有意な低下を認めた。長期的な心機能の評価はまだ定まっていないが、諸データを治療終了後3ヶ月経過観察しえた症例においては、左室駆出率は10%から24%に増加し、その効果は3ヵ月後も持続していた。血漿BNP濃度は免疫吸着療法開始前には608pg/mlであったが、施行後は100pg/ml台を維持している。

D. 考察

計6例の免疫吸着療法の経験では安全性に問題はなく、重症例にも施行可能であった。短期的にはBNP濃度は低下し、有効性が確認された。長期的に心機能を改善するかについては今後の追跡が必要である。過去の報告では、血行動態は速やかに改善するが、心機能の改善には6ヶ月以上を要することが明らかにされている。

今回われわれは β 1アドレナリン受容体抗体あるいはムスカリンM2受容体抗体陽性例のみを対象としたが、どのような症例に有効なのかについても定説はない。初期の報告では β 1アドレナリン受容体抗体価が低下することから、同自己抗体の除去が重要との考えが提唱されていたが、除去された抗体の特徴を解析すると心抑制性作用を有し、必ずしも同自己抗体のみでは説明できない。Felixらはこのようなプロフィールを持つ自己抗体を“心抑制性抗体”と定義し、免疫吸着療法のレスポンス予測に有用としている。われわれは、ニワトリ有性卵を用いたスクリーニング系における検討で、心抑制性抗体存在の予測因子として β 1アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体陽性が重要との結果を得た。現在は暫定的にこれら二種類の自己抗体陽性例のみを選別しているが、安全性に問題がないのであれば対象基準を拡大する方向で検討したいと考えている。

治療プロトコルの確立も重要課題である。現在は血漿処理量2L/週3回を計5回を原則としているが、果たしてこの方法が良いのか更なる検証が必要である。過去の報告では1ヶ月ごとに各々3, 2, 2セッションを計4ヶ月という方法と、5日間連続という方法が報告されているが、両者を比較した試験では有効性に差はなかった。また感染のリスクに備え、終了時に免疫グロブリンを補充していることも多い。われわれのプロトコルでは重篤なIgGの低下は観察されず、免疫グロブリンは補充しなかった。

E. 結論

6例の重症DCM患者を対象に免疫吸着による自己抗体除去を試みた。安全性に問題はなく、短期的な有効性が確認された。長期効果の確認、有効例の予測、治療プロトコルの確立などが今後の課題である。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 学会発表(シンポジウム等のみ)

・吉川 勉, 馬場彰泰, 長友祐司, 内藤広太郎, 栗田康生, 門川俊明, 小川 聡: 重症拡張型心筋症患者における免疫吸着療法. 第28回日本アフエレス学会シンポジウム1「拡張型心筋症の

アフエレス治療」(2007年11月17日)

- ・吉川 勉, 馬場彰泰, 長友祐司, 内藤広太郎, 栗田康生, 熊谷裕生, 小川 聡: 重症心不全患者に対する免疫吸着療法. 第55回日本心臓病学会シンポジウム5「重症心不全の治療戦略」(2007年9月11日)
- ・安斎俊久, 上野耕嗣, 城 祐輔, 河野隆志, 河村朗夫, 吉川 勉, 小川 聡, 山田 稔, 田波穰, 佐藤浩三, 陣崎雅弘, 栗林幸夫: 不安定狭心症のトリアージにおけるMDCTの意義. 第55回日本心臓病学会ビジュアルワークショップ1「胸痛患者の診療におけるMDCTの位置づけ」(2007年9月11日)
- ・Yoshikawa T, Baba A, Iwata M, Naitoh K, Nagatomo Y, Miyoshi S, Ogawa S: A new therapeutic target to modulate autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy who are susceptible to sudden cardiac death. 71th Japanese Circulation Society Meeting, Symposium #3 <Heart failure and arrhythmia> (Mar. 15, 2007/Kobe)
- ・Yoshikawa T: Pharmacological and non-pharmacological therapy for chronic heart failure. 1st International Congress of Cardiomyopathies and Heart Failure, Morning seminar (Mar. 12, 2007/Kyoto)
- ・吉川 勉: レニン・アンジオテンシン系と交感神経系の接点から見た心不全の病態. 第34回日本臨床生理学会シンポジウム3「生体カルシウム輸送と心不全」(2006年11月/福岡)
- ・吉川 勉: 心不全の診断と治療の進歩. 日本内科学会信越支部第35回生涯教育講演会(2006年10月22日)
- ・馬場彰泰, 吉川 勉, 長友祐司, 栗田康生, 内藤広太郎, 吉澤彰宏, 家田真樹, 安斎俊久, 島田 恵, 松原 隆, 赤石 誠, 朝倉 靖, 岩永史郎, 熊谷裕生, 小川 聡: 液性免疫異常からみた心筋症の診断と治療. 第54回日本心臓病学会シンポジウム「心筋症の診断と治療up to date」(2006年9月)

2) 論文発表

- ・Kataoka M, Satoh T, Yoshikawa T, Nakamura I, Kohno T, Yoshizawa A, Anzai T, Ogawa S: Comparison of the effects of carvedilol and metoprolol on exercise ventilatory efficiency in patients with congestive heart failure. Circ J (in press)
- ・Nagatomo Y, Yoshikawa T, Kohno T, Yoshizawa A, Anzai T, Meguro T, Satoh T, Ogawa S: Effects of β -blocker therapy on high sensitivity C-reactive protein, oxidative stress, and cardiac function in patients with congestive heart failure. J Card Fail 2007;13(5):365-71
- ・Naito K, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y,

- Sugano Y, Kohno T, Mahara K, Okabe T, Asakura Y, Ogawa S: Increased body temperature following reperfused acute myocardial infarction is associated with adverse left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2007;13(1):25-33
- Kohno T, Anzai T, Ohno Y, Kaneko H, Li HC, Sugano Y, Maekawa Y, Iwanaga S, Asakura Y, Yoshikawa T, Ogawa S: Impact of serum C-reactive protein elevation on the left ventricular spherical change and the development of mitral regurgitation after anterior myocardial infarction. *Cardiology* 2007;107(4):386-94
 - Baba A, Yoshikawa T, Iwata M, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Ogawa S, Fu M: Antigen-specific effects of autoantibodies against sarcolemmal Na-K-ATPase pump in immunized cardiomyopathic rabbits. *Int J Cardiol* 2006;112:15-20
 - Mahara K, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Okabe T, Asakura Y, Satoh T, Mitamura H, Suzuki M, Murayama A, Ogawa S: Aging adversely affects postinfarction inflammatory response and early left ventricular remodeling after reperfused acute anterior myocardial infarction. *Cardiology* 2006;105:67-74
 - Kohno T, Yoshikawa T, Yoshizawa A, Nakamura I, Anzai T, Satoh T, Ogawa S: Carvedilol exerts more potent antiadrenergic effect than metoprolol in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:349-55
 - Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Satoh T, Iwanaga S, Hayashi T, Maekawa Y, Shimizu H, Yozu R, Ogawa S: Serum C-reactive protein elevation predicts poor clinical outcome in patients with distal type acute aortic dissection: Association with the occurrence of oxygenation impairment. *Int J Cardiol* 2005;102:39-45
 - Maekawa Y, Asakura Y, Anzai T, Ishikawa S, Okabe T, Yoshikawa T, Ogawa S: Relation of stent overexpansion to the angiographic no-reflow phenomenon in intravascular ultrasound-guided stent implantation for acute myocardial infarction. *Heart Vessels* 2005;20(1):13-8
 - Kataoka M, Satoh T, Manabe T, Anzai T, Yoshikawa T, Mitamura H, Ogawa S: Oral sildenafil improves primary pulmonary hypertension refractory to epoprostenol. *Circ J* 2005;69(4):461-5
 - Katada J, Meguro T, Saito H, Ohashi A, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: Persistent cardiac aldosterone synthesis in angiotensin II type 1A receptor knockout mice after myocardial infarction. *Circulation* 2005;111:2157-64
 - Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, Naito K, Ogawa S: Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005;65:446-56
- H. 知的財産権出願・登録状況
なし。
- <研究協力者>
吉川 勉・村田光繁

特発性心筋症に関する調査研究

—合成プロスタサイクリンアゴニストによる虚血性心疾患治療効果—

分担研究者： 永井 良三(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

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

A. 研究目的

合成プロスタサイクリンアゴニストONO-1301が成長因子(HGF、VEGF)誘導と血管新生に及ぼす効果に関して検討する。低分子化合物ONO-131投与が虚血性心疾患治療に有用かを検討する。

B. 研究方法

1)ONO-1301がヒト培養線維芽細胞(NHDF)のHGF、VEGF分泌に与える影響を検討する。10・1000nMのONO-1301をヒト培養線維芽細胞に投与、72時間後上清のHGF、VEGF濃度を測定。cAMP阻害剤であるRp-cAMPを同時投与することにより本効果がcAMPを介したものであるかどうか検討する。

2)ONO-1301下にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をNHDFと共培養し管腔構造形成を評価する。さらにHGFないしVEGFの中和抗体を同時投与することにより管腔形成効果に及ぼす影響を評価する。

3)ONO-1301をpoly(DL-lactic-co-glycolic acid)と混合して徐放製剤SR-ONOを作製し、このSR-ONOを左前下行枝結紮直後のマウス虚血心筋に直接注射。術後の生存をフォローアップした。術後7日目にRT-PCR法で虚血部心筋と非虚血部心筋のHGFおよびVEGF遺伝子の発現を評価。抗CD31抗体で免疫染色をおこない移行帯(梗塞周囲領域)のcapillary densityを評価。術後28日目に心エコー検査で心室拡張に関して検討した。さらにVEGFの中和抗体をSR-ONOと同時投与しcapillary densityを評価、心室拡張に関しても評価した。

(倫理面への配慮)

細胞培養実験および動物実験は学内での規定を遵守しておこなわれた。

C. 研究結果

1)ONO-1301はヒト培養線維芽細胞(NHDF)において用量依存性(10・1000nM)にHGF、VEGF分泌を促進。cAMP阻害剤であるRp-cAMPを同時投与することにより本効果が抑制されることから部分的にはcAMPを介した反応であることが示唆される。

2)ONO-1301下にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をNHDFと共培養すると管腔構造形成される。HGFないしVEGFの中和抗体を同時投与することによりこの管腔構造形成は抑えられる。

3)ONO-1301の徐放製剤SR-ONOを左前下行枝結紮直後のマウス虚血心筋に直接注射。SR-ONO投与群は対照群と比較して術後7日目に虚血部心筋でのHGFおよびVEGF遺伝子の発現促進、移行帯でのcapillary densityは増強、術後生存率は改善した。なお術後28日目の心室拡張は改善した。さらにVEGFの中和抗体をSR-ONOと同時投与すると移行帯でのcapillary densityは増強しないし、術後生存率も改善しない。徐放製剤SR-ONO投与による血管新生促進作用はVEGFを介した反応であることが示唆される。

D. 考察

本研究では低分子化合物である合成プロスタサイクリンアゴニストONO-1301がin vitroおよびin vivoでHGFおよびVEGF分泌を亢進し、血管新生を誘導することを明らかにした。In vitro実験のデータから、ONO-1301によるHGFおよびVEGF分泌は線維芽細胞から起こり、分泌されたHGFおよびVEGFがパラクライン様式で周囲の細胞に作用することが予想される。また虚血心筋への直接投与により血管新生を活性化させ心筋の病的リモデリングを抑えることができた。今後、虚血心の治療を考える上で有望な選択肢のひとつと言える。

E. 結論

合成プロスタサイクリンアゴニストONO-1301はin vitro、in vivoの系でHGF、VEGFを誘導し、その徐放製剤SR-ONOをマウス虚血心筋に直接投与すると血管新生を促進し急性虚血後心室拡張を予防することができる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 学会発表

なし。

2) 論文発表

- ・ Nakamura K, Sata M, Iwata H, Sakai Y, Hirata Y, Kugiyama K, Nagai R: A synthetic small molecule, ONO-1301, enhances endogenous growth factor expression and augments angiogenesis in the ischaemic heart. Clin Sci (Lond). 112(12):607-616, 2007.

H. 知的財産権出願・登録状況

1) 特許取得

- ・ 平成16年4月9日「症例検索システム」

発明者：瀬戸久美子，新谷隆彦，光山 訓，渡部生聖，今井 靖，林 同文，門前幸志郎，山崎 力，山崎 憲，永井良三

出願人：東京大学，日立製作所

特願2004-115828

- ・ 平成16年4月7日「健康状態の表示方法」

発明者：光山 訓，瀬戸久美子，新谷隆彦，渡部生聖，今井 靖，林 同文，門前幸志郎，山崎 力，永井良三，山崎 憲

出願人：東京大学，日立製作所

特願2004-112841

- ・ 平成16年3月30日「動脈硬化及び虚血性疾患の診断方法」

発明者・出願人：永井良三，今井 靖

特願2004-097464

- ・ 平成15年7月29日「KLF 5 遺伝子の発現を抑制するRNA」

発明者：石原 淳，鳥取恒彰，永井良三，眞鍋一郎

出願人：永井良三，眞鍋一郎，協和発酵工業株式会社

特願2003-202863

2) 実用新案登録

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

圧負荷や容量負荷などの血行力学的負荷がかかると、当初心臓は肥大という形態をとることで収縮力低下をきたすことなくその増大した負荷に適応する。しかし負荷が長時間持続すると、その適応が破綻し、心拡大、収縮力低下をきたして心不全が発症する。この適応から破綻に至る過程には、アポトーシスやネクローシスといった心筋細胞死がきわめて重要な役割を果たしている。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、ストレス応答性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。NF- κ Bはストレス応答性の遺伝子発現調節に重要な役割を果たしている転写因子であり、主要な活性化因子であるI κ B kinase β (IKK β)により活性の調節を受けている。このIKK β /NF- κ B経路は、多くの細胞種において細胞保護的な作用を有しているが、細胞種や刺激の種類によっては逆に細胞死を惹起することが知られている。我々はこれまでに、G蛋白質共役型受容体作動薬刺激による心筋細胞肥大にNF- κ Bが関与していることを報告したが、この経路の*in vivo*の心筋における役割は不明である。本研究では、*in vivo*の心筋における血行力学的負荷に対するこの経路の役割について検討した。

B. 研究方法

IKK β のfloxマウスとmyosin light chain 2V promoter依存性にCre recombinaseを発現するトランスゲニックマウスを交配し、心筋特異的IKK β ノックアウトマウス(flox/flox;Cre(+)), conditional knockout: CKO)を作成した。flox/flox;Cre(-)をコントロールマウスとした(CTRL)。10週齢のこれらのマウスを用いて、横行大動脈縮窄術(transverse

aortic constriction: TAC)による圧負荷モデルを作成し、その表現系を解析した。NF- κ BのDNA結合能はelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)にて、IKK活性はI κ B α を基質とする*in vitro* kinase assayにて評価した。タンパク質発現はウエスタンブロット法にて、mRNA発現はquantitative RT-PCR法もしくはdot blot法により評価した。心機能は心エコー法により評価した。アポトーシスは*in situ* TUNEL Assay kit (Takara製)および抗activated caspase 3抗体(Abcam製)を用いた免疫組織染色により評価した。心筋における酸化ストレスの評価には、抗8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)抗体を用いた免疫組織染色をおこなった。心筋細胞の脆弱性の評価のため、マウス成獣から心筋細胞を単離しイソプロテノール刺激に対する反応性を検討した。刺激後24時間における細胞死の程度をトリパンブルー染色で評価した。またMnSO₄ mimeticであるMnTBAP(Calbiochem製)の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

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

まず血行力学的負荷により心筋IKK β /NF- κ B経路が活性化されるかどうかを、野生型C57Bl6/Jマウスを用いたTAC圧負荷モデルにて検討した。このモデルはTAC後1週間で心肥大を呈し、4週間で心不全を呈する。IKK活性はTAC後2日から増加しており、4週間まで持続していた。またNF- κ B活性についても、ほぼ同様の経過を示した。

この活性化の役割を明らかにするため、心筋特異的IKK β 欠損マウスを作成し検討をおこなった。

定常状態におけるCKOマウスの心形態、心機能、組織学的所見はCTRLマウスと有意な差を認めなかった。またTAC後2日におけるIKK活性、NF- κ B活性は、CTRLマウスではTACにより増加していたが、CKOマウスではほとんど増加を認めなかった。TAC後1週間における心エコーでは、CTRL TAC群と比較しCKO TAC群において有意に左室短縮率の低下および左室拡張末期径の増大を認めた。また肺重量もCTRL TAC群と比較しCKO TAC群において有意に増加しており、CKOマウスは圧負荷により心不全を発症することがわかった。心筋リモデリングのマーカーである、ANFおよびBNP mRNAの発現は、心エコーでの結果と一致して、CTRL TAC群と比較してCKO TAC群で有意に増加していた。Azan-Mallory染色により心筋線維化を検討したところ、TACによりCTRL、CKO群ともに線維化の増加を認めたが、その程度はCKO TAC群でより高度であった。また、type Iおよびtype III collagen mRNAの発現は、CKO TAC群でCTRL TAC群よりも有意に増加していた。

TAC後1週間のマウス心筋に対し、TUNEL法および抗activated caspase 3抗体を用いた免疫組織染色にて心筋細胞アポトーシスを検討した。TUNEL陽性細胞およびactivated caspase 3陽性細胞はともにCTRL TAC群と比較してCKO TAC群で有意に増加していた。

心筋細胞アポトーシス増加のメカニズムを明らかにするため、NF- κ B依存性遺伝子のうち細胞保護作用を有する種々の遺伝子についてmRNA発現レベルを検討した。最終的にMnSODの発現に有意な変化が認められた。MnSOD mRNAの発現は、CTRL群、CKO群ともにTACにより減少したが、CKO TAC群ではCTRL TAC群よりも有意に減少していた。また、MnSODのタンパクレベルについても、mRNAの結果と同様、CKO TAC群においてCTRL TAC群よりも有意に減少していた。MnSODの減少を反映して、TAC1週間後の心筋における8-OHdG陽性細胞数は、CKO TAC群で明らかに増加していた。

次にこのMnSOD発現の変化が心筋細胞死に関与しているか否かを、マウス成獣単離心筋細胞で検討した。CKOマウス心筋細胞においては、CTRLマウス由来心筋細胞と比較し、イソプロテレノール刺激による有意な細胞死の増加を認めたが、その増加はMnTBAPの共処置により有意に抑制された。

D. 考察

心臓におけるIKK β /NF- κ B経路の欠損は、血行力学的ストレスに対する脆弱性を惹起した。これは、MnSOD発現の高度な低下により酸化ストレスが増加し、心筋細胞アポトーシスが亢進したためであると考えられた。

E. 結論

in vivo心筋におけるIKK β /NF- κ B経路は、血行力学的負荷に対する保護的な機構であることが明らかとなった。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- A Nakai, O Yamaguchi, T Takeda, Y Higuchi, S Hikoso, M Taniike, S Omiya, I Mizote, Y Matsumura, M Asahi, K Nishida, M Hori, N Mizushima, K Otsu: The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature Medicine*, 13: 619-624, 2007
- S Hikoso, Y Ikeda, O Yamaguchi, T Takeda, Y Higuchi, S Hirotsu, K Kashiwase, M Yamada, M Asahi, Y Matsumura, K Nishida, M Matsuzaki, M Hori, K Otsu: Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) via transcoronary gene transfer. *Journal of the American College of Cardiology*, 50:453-462, 2007
- M Taniike, O Yamaguchi, I Tsujimoto, S Hikoso, T Takeda, A Nakai, S Omiya, I Mizote, Y Nakano, Y Higuchi, Y Matsumura, K Nishida, H Ichijo, M Hori, K Otsu: Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation*, in press

2) 学会発表

- S Hikoso, K Otsu, O Yamaguchi, T Takeda, A Nakai, M Taniike, S Ohmiya, I Mizote, Y Matsumura, K Nishida, M Hori: IKK β /NF- κ B Pathway Protects Hearts from Hemodynamic Stress Mediated through Regulating MnSOD Expression. American Heart Association scientific sessions 2007 (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
- T Takeda, K Otsu, O Yamaguchi, S Hirotsu, S Hikoso, Y Higuchi, M Taniike, A Nakai, S Omiya, M Taneike, T Oka, K Nishida, M Hori: Cardiac-specific activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 leads to cardiac dysfunction with pathological hypertrophy. American Heart Association scientific sessions 2007 (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).

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

—拡張型心筋症の病態における心臓リンパ管の関与の解明—

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

ウイルス性心筋炎による拡張型心筋症モデルマウスを用い、心臓リンパ管の病態への関与を解明することを目的とした。一方、心筋梗塞モデルマウスにおける、心臓リンパ管の病態への関与をも解明し、リンパ管新生作用を持つVEGF-C^{156S}および抗リンパ管新生作用を持つVEGFR-3-Fcの効果を検討し、拡張型心筋症モデルマウスと比較検討した。

B. 研究方法

＜実験1＞4週齢のDBA/2マウスにEMCウイルスを接種し拡張型心筋症モデルを作成した(第0日)。第1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 90日に心臓を採取し、抗VEGFR-3抗体および抗podoplanin抗体にて免疫染色を行った。また、アデノウイルスベクターを用い、VEGF-C^{156S}とVEGFR3-Fcの心筋傷害、血行動態におよぼす効果を検討した。

＜実験2＞8週齢のC57BL6マウスを開胸し、冠動脈を結紮し心筋梗塞モデルを作成した(第0日)。第1, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 28, 56, 112, 140日に心臓を採取し、抗VEGFR-3抗体および抗podoplanin抗体にて免疫染色を行った。また、VEGF-C^{156S}とVEGFR3-Fcの心機能におよぼす効果を検討した。

(倫理面への配慮)

当実験は、京都大学動物実験規則に則り、倫理面に配慮し行われた。

C. 研究結果

＜実験1＞ウイルス接種後第3日より心臓リンパ管が認められた。第7日にはリンパ管管腔は拡大し、心膜が強く染色された。亜急性期および慢性期にはリンパ管は繊維化した間質にび慢性に認め

られた。リンパ管数およびリンパ管断面積はともに第3日から慢性期にかけ増大した。第3日に比し第90日では、リンパ管数は約14倍(142 ± 12.3 on day 90 vs. 10.4 ± 1.9 vessels/mm² on day 3, $p < 0.05$)、リンパ管断面積は約15倍(9.1 ± 1.6 on day 90 vs. 0.6 ± 0.2 % on day 3, $p < 0.05$)に増加した。また、抗リンパ管新生作用を持つVEGFR3-Fcは心筋傷害を軽減し、血行動態を改善した。

＜実験2＞結紮後第3日より心臓リンパ管が認められた。リンパ管管腔は亜急性期より拡大した。慢性期にはリンパ管は梗塞巣、右室および心膜に認められた。リンパ管数およびリンパ管断面積はともに第3日から慢性期にかけ増大した。第3日に比し第140日では、リンパ管数は約16倍(94 ± 6.8 on day 140 vs. 5.8 ± 0.6 vessels/mm² on day 3, $p < 0.05$)、リンパ管断面積は約18倍(7.3 ± 0.9 on day 140 vs. 0.4 ± 0.2 % on day 3, $p < 0.05$)に増加した。リンパ管新生作用を持つVEGF-C^{156S}は心筋傷害を軽減し、血行動態を改善した。

D. 考察

拡張型心筋症および心筋梗塞の病態では、心臓リンパ管の関与が予想された。また、拡張型心筋症の病態における心臓リンパ管の関与と心筋梗塞の病態における関与とは異なることが予想された。

E. 結論

拡張型心筋症および心筋梗塞の病態では、心臓リンパ管の関与が予想された。また、両疾患の病態における心臓リンパ管の関与はそれぞれ異なることが予想された。今後、これらの疾患において、リンパ管新生療法や抗リンパ管新生療法といった、新しい治療法に発展する可能性が示唆さ

れた。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Miyamoto S, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Wada H, Kawase Y, Matsumori A, Nishio R, Kita T, Hasegawa K: Histone acetyltransferase activity of p300 is required for the promotion of left ventricular remodeling after myocardial infarction in adult mice in vivo. *Circulation*. 113:679-90, 2006
- 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): 293-8, 2006

2) 学会発表

- Nishio R, Kubo H, Matsumori A: Role of

Lymphangiogenic Factors in Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2007 (Nov. 3-7, 2007/Orland, FL)

- : Nishio R, Kubo H, Matsumori A: Role of lymphangiogenesis in experimental ischemic heart failure. ESC Congress 2007 (Sep. 1-4, 2007/Wien).
- Nishio R, Kubo H, Matsumori A: Lymphangiogenesis in heart failure. E ESC Congress 2007 (Sep. 1-4, 2007/Wien)
- Nishio R, Matsumori A: Beneficial Effects of Arotinolol, a β -blocker, in Experimental Heart Failure. 第11回日本心不全学会学術集会 (Sep. 9-10, 2007/浦安)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

西尾亮介(京都大学医学部附属病院救急部)

特発性心筋症に関する調査研究

—不全心筋ゲノム研究から同定された新しい心不全関連遺伝子MLCK3の検討—

分担研究者： 北風 政史(国立循環器病センター臨床研究開発部部長)

＜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

心不全に対する様々な薬物治療、外科的治療の進歩により、近年その予後は改善してきた。しかしながら、依然として心不全の予後は不良であり、本邦における移植医療の普及が不十分であることから、新たな心不全治療の標的を見出すことは循環器領域にとって急務である。

B. 研究方法

重症心不全に対してDorあるいはBatista手術等の心筋切除術を受けた症例を対象として、その切除心筋組織からmRNAを抽出し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。正常心筋組織における遺伝子発現と比較してその発現が上昇もしくは低下している遺伝子を選択し、さらに各症例より得られた臨床データとの相関性を含めた解析を行った結果、不全心筋にてその発現が上昇し各症例の肺動脈圧と有意な相関を認める新規遺伝子を同定した。本遺伝子は心臓特異的に発現し、そのリコンビナントタンパクを新生ラット培養心筋細胞に強制発現させることにより、サルコメア構造形成の促進を含む心筋細胞の形態変化が認められた。また本遺伝子から合成されるタンパクはそのC端にセリン・スレオニンキナーゼドメインを持つことから心筋特異的なリン酸化酵素であると考えられたため、マウス心臓抽出物を基質としてIn vitroリン酸化反応を行い、基質として心室型ミオシン軽鎖(MLC2v)を同定した。

C. 研究結果

本遺伝子から合成されるタンパクのキナーゼドメインはこれまでに報告されていた平滑筋型(遺伝子名: MYLK)および骨格筋型(遺伝子名: MYLK2)のミオシン軽鎖キナーゼとの高い相同性

を認め、その基質としてMLC2vが同定されたため、cardiac-MLCK: 心臓型ミオシン軽鎖キナーゼ(遺伝子名: MYLK3)と命名した。新生ラット培養心筋細胞において、cardiac-MLCKを過剰発現することにより、サルコメア構造形成の促進とともにミオシン軽鎖のリン酸化が上昇することが認められ、さらにエピネフリン刺激によりミオシン軽鎖のリン酸化上昇とともにサルコメア構造形成が促進されることがしめされた。siRNAを用いたcardiac-MLCKの発現抑制により、エピネフリン刺激によるMLC2vのリン酸化およびサルコメア構造形成促進が抑制されることから、cardiac-MLCKはMLC2vリン酸化を介して心筋細胞におけるサルコメア構造形成を調節していることが示唆された。次にcardiac-MLCKはゼブラフィッシュを含め、脊椎動物において高度に保存されていたため、ゼブラフィッシュにおけるcardiac-MLCK遺伝子をクローニングし、in vivoにおける解析を行った。In situ hybridizationにより、cardiac-MLCK遺伝子がゼブラフィッシュにおいても心臓特異的に発現していることが確認された。さらにモルフォリノ・アンチセンスオリゴを用いた遺伝子発現抑制実験により、心室筋サルコメア形成異常を伴う心室の拡大が認められ、in vivoにおいてもcardiac-MLCKがサルコメア形成促進に関与することが示唆された。またラット心筋梗塞・心不全モデルにおいてはヒト不全心筋における遺伝子発現パターンと同様に心不全重症度に一致したcardiac-MLCK遺伝子の発現上昇を認めた。

D. 考察

今回我々は不全心筋においてその遺伝子発現が上昇する新規遺伝子として心臓型ミオシン軽鎖キナーゼ(cardiac-MLCK, 遺伝子名: MYLK3)を同定

した。その後の機能解析により、cardiac-MLCKは in vitro, in vivoにおいてMLC2vのリン酸化を介して心筋におけるサルコメア構造形成を促進することがしめされた。これまで拡張型心筋症例の不全心筋においてサルコメア構造の破綻とともにミオシン軽鎖リン酸化の低下が報告されており、不全心筋におけるcardiac-MLCKのmRNA発現上昇はこのようなMLC2vリン酸化低下に対する代償性の遺伝子発現上昇であると考えられた。

E. 結論

今後の展開として、哺乳動物におけるcardiac-MLCKの機能をより明らかにし、さらにはcardiac-MLCKを介したミオシン軽鎖リン酸化増強が不全心筋の機能改善に寄与する可能性について検討していく予定である。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M: A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin Invest* 2007;117:2812-2824.
 - Asanuma H, Nakai K, Sanada S, Minamino T, Takashima S, Ogita H, Fujita M, Hirata A, Wakeno M, Kim J, Asakura M, Sakuma I, Kitabatake A, Hori M, Komamura K, Kitakaze M: S-nitrosylated and pegylated hemoglobin, a newly developed artificial oxygen carrier, exerts cardioprotection against ischemic hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2007 Jan 16; [Epub ahead of print].
 - Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T and J-WIND Investigators: Human Atrial Natriuretic Peptide and Nicorandil as an Adjunct to Reperfusion Therapy for Acute Myocardial Infarction with ST-segment Elevation: The Randomised J-WIND (Japan-Working Groups of Acute Myocardial Infarction for the Reduction of Necrotic Damage) Trials. *Lancet* (in press).
- ##### 2) 学会発表
- Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Asakura M, Kim J, Minamino T, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M: (Abstract 565) The Activation of AMP-Activated Protein Kinase Ameliorates the Severity of Heart Failure in Dogs. *AHA2007*.
 - Takahama H, Asanuma H, Fujita M, Asakura M, Kim J, Wakeno M, Sasaki H, Takashima S, Minamino T, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M: (Abstract 569) The Blockade of Histamine H2 Receptors Ameliorates the Severity of Heart Failure Induced by Rapid Pacing in Dogs. *AHA2007*.
 - Asakura M, Kim J, Asanuma H, Myoishi M, Seguchi O, Shintani Y, Tomoike H, Kitakaze M, J-WIND Investigators: (Abstract 3381) Usefulness of Carperitide as an Adjunctive Therapy for Acute Myocardial Infarction in Patients with Chronic Kidney Disease: Subgroup Analysis of J-WIND-ANP trial. *AHA2007*.
 - Okazaki H, Minamino T, Wakeno M, Tsukamoto O, Kim J, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M: (Abstract 740) Statin Prevents Structural and Electrical Atrial Remodeling in Rat Hypertensive Heart Failure Induced by Chronic Inhibition of NO Synthesis. *AHA2007*.

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： 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で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。当センターにおける心臓移植登録例を検討した。

B. 研究方法

対象は、1997年10月以降2007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122例である。登録時年齢は8～57(平均36)歳で、基礎疾患は拡張型心筋症104例、拡張相肥大型心筋症4例、虚血性心筋疾患11例、弁膜症・右室低形成および再移植各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82例(67%)で、現在待機中は32例(うち14例がLVAS装着中、3例がLVAS離脱例)であった。また、国内移植が22例、渡航移植16例、取り消し10例、他施設移行3例、死亡39例であった。うち、当センターでの移植22例は、年齢14～61(平均41)歳、男性16例、女性6例、原疾患は拡張型心筋症21例、拡張相肥大型心筋症2例であった。待機状況は全例Status 1で、3例は強心薬持続投与で、他の19例はLVAS装着例であった。待機期間は、29～2743(平均699)日で、16例が1年以上の待機例であった。また、LVAS装着例では、補助期間は、39～1444日(平均706)日で、1年以上補助が15例であった。用いられたシステムは、東洋紡左室脱血型が15例で最も多く、また1例は最長の1444日補助例であった。他に東洋紡左房脱血型2例、植込み型

LVAS: HeartMate VE 2例であった。手術は、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例で抗CD3抗体製剤を、また最近の2例でバシリキシマブを併用した。Grade 3A以上の治療を要する拒絶反応を6例に認めたが、全例ステロイドパルス療法で軽快し、その後4例ではシクロスポリンをタクロリムスに変更した。現在移植後3ヶ月～8年7ヶ月を経過し、1例が感染症にて4年2ヶ月後に死亡したが、他は経過安定している。慢性期合併症に関しては、高血圧症4例、腎機能障害3例、高脂血症1例、糖尿病2例を認めているが、国際心肺移植学会レジストリーより頻度は低い。また、悪性腫瘍は発生していない。しかし、移植後冠動脈病変は、ドナー由来の1例を含め8例(38.1%)で認めており、ISHLTレジストリーと同程度である。2007年4月より移植後冠動脈病変にも効果が期待される新たな免疫抑制剤であるmTOR阻害剤が導入されており、今後の慎重なフォローアップが重要である。

D. 考察

我が国で2006年末までに施行された心臓移植は49例であるが、全例Status 1で、内40例がLVAS装着例であった。Status 1としての待機期間は平均744日、1年以上41例であった。また、LVAS補助期間も平均749日で、1年以上が33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8年10ヶ月に及び8年生存率

は91.9%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。また、わが国における心臓移植待機例はLVAS装着手術など移植手術前に多量の輸血を必要とする症例が多いため、HLA既存抗体を保有する症例も多く、抗体関連型拒絶反応への配慮を今後も続ける必要がある。

E. 結論

わが国においても心臓移植実施例が増加し、良好な成績を示し、重症心不全に対する治療選択として定着することが期待されている。また、長期の心臓移植待機に不可欠なLVASとして体格の小さい患者にも適応可能な植込み型LVASの臨床応用を積極的に進めていく必要がある。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- ・中谷武嗣：補助人工心臓(VAS). 日本臨牀 65 (増刊号5) : 217-221, 2007
- ・中谷武嗣：人工心臓. 胸部外科 60 : 365-371, 2007
- ・中谷武嗣, 加藤倫子, 眞野暁子, 船津俊宏：移植医療－機械的循環補助も含めて－. 循環器科 62(1) : 67-73, 2007
- ・Wada K, Takada M, Kotake T, Ochi H, Morishita H, Komamura K, Oda N, Mano A, Kato T, Hanatani A, Nakatani T: Limited sampling strategy for mycophenolic acid in Japanese heart transplant recipients: Comparison of cyclosporin and tacrolimus treatment. *Circ J* 71:1022-1028, 2007
- ・Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A, Nakatani T: Relationship between acute rejection and cyclosporine or mycophenolic acid levels in Japanese heart transplantation. *Circ J* 71:289-293, 2007
- ・Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A and Nakatani T: Drug interactions between tacrolimus and phenytoin I Japanese heart transplant recipients: 2 case reports. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 45: 524-528, 2007
- ・Saito S, Nakatani T, Niwaya K, Kobayashi J, Hanatani A, Tagusari O, Nakajima H, Miyatake K, Yagihara T, Kitamura S: Initial experiences with the HeartMate vented electric left ventricular assist system in Japan. *J Artif Organs* 10:118-121, 2007

2) 学会発表

- ・Mano A, Nakatani T, Oda N, Kato T.S., Niwaya K, Tagusari O, Nakajima H, Funatsu T, Komamura K, Hanatani A, Kitakaze M: Which factors predict the recovery of natural heart function after left ventricular assist system insertion. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions* (April 25-28, 2007/San Francisco, USA)
- ・Oda N, Kato T.S., Hashimoto K, Kamiya C, Hashimura K, Mano A, Ueda H.I., Kitakaze M, Nakatani T: Time lapse analysis of changes in Doppler-derived index of coronary flow reserve over time could reduce frequency of endomyocardial biopsy. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions* (April 25-28, 2007/San Francisco, USA)
- ・Kato TS, Hashimoto S, Oda N, Mano A, Nakatani T, Hashimura K, Ueda HI, Kitakaze M, Kitamura S: Clinical utility of coronary perfusion reserve and strain rate imaging obtained by echocardiography as a noninvasive evaluation for sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions* (April 25-28, 2007/San Francisco, USA)
- ・Wada K, Kato TS, Oda N, Ochi I, Maeda Y, Mano A, Kotake T, Nakatani T: Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil dose by twelve-hour-area under the curve to avoid acute rejection in heart transplant recipients. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions* (April 25-28, 2007/San Francisco, USA)
- ・Kamiya C, Kato TS, Oda N, Mano A, Hashimura K, Hashimoto S, Komamura K, Kitakaze M, Kitamura S: Reduced systolic strain and systolic strain rate could detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients. *International Society for Heart and Lung Transplantation 24th Annual Meeting and Scientific Sessions* (Poster) (April 25-28, 2007/San Francisco, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

加藤倫子・梁瀬正伸・小田 登

(国立循環器病センター臓器移植部)

船津俊宏(国立循環器病センター心臓血管外科)