

特発性心筋症に関する調査研究

－拡張型心筋症の発症と進展機序に関する自己免疫学的検討－

分担研究者： 松崎 益徳(山口大学大学院医学研究科器官病態内科学教授)

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) マウス再感染血清

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

2) 患者血清

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

3) 心筋生検組織

研究同意を得た心筋炎及び心筋症患者に於ける心内膜心筋生検組織の蛋白電気泳動を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清を使用した臨床研究に際しては、山口大学病院倫理委員会の審査を経たプロトコールに則り施行されている(H17-12：心筋炎・心筋症における抗心筋自己抗体の研究)及び(H18-51：拡張型心筋症における疾患特異的蛋白の検索)。臨床研究に当たっては患者本人または代理人から研究同意書を取得した上で、倫理面は最大限に配慮し、厳格な個人情報管理の元で行った。ウイルスを使用した動物実験に際しては、山口大学医学部動物使用委員会の審査を受けたプロトコールに則り施行した(23-S02：マウス慢性心筋炎心移植モデルを使った免疫学的解析)。

C. 研究結果

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

D. 考察

マウスとヒトDCMの双方のプロテオーム解析を行った。ヒトDCM患者血清のからも動物モデルと同様に数種類の候補抗原(蛋白)が同定された。抗原蛋白とcoxsackievirus B3のシーケンスの解析から、高い相同性と抗原性を持つエピトープが心筋炎ウイルスや種を超えて検出された。心筋症に於いて、心筋組織中のflavoproteinの量とLVEDDに負の相関を認め、flavoproteinはDCMの進展機序に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

DCMの発症には、複数の心筋抗原エピトープによる“B-cell epitope spreading”が、進展機序には自己抗体による“mitochondria attack”が関与してい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

- Matsushima M, Nakamura H, Umemoto S, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibition following donor heart myocardial infarction after heterotopic transplantation in Tg mice. *Circulation Journal*, (in press) 2008.
- Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M: Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circulation Journal* 68(7):677-682, 2004.

2) 学会発表

- Nakamura H: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibitor following donor heart myocardial infarction with a novel heterotopic transplant-coronary ligation in Tg mice. 第71回日本循環器学会総会プレナリーセッション(2007年3月17日

／神戸)。

- Nakamura H, Matsushima A, Matsuzaki M: Isolated noncompaction of left ventricular myocardium in the elderly patients: New insights into pathological role of tenascin -c. 第3回日中心血管フォーラム(2007年10月11日／北京, 中国)

H. 知的財産の出願・登録状況

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

<研究協力者>

中村浩士・松嶋 敦

(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)

加藤智啓・西岡久寿樹

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)

特発性心筋症に関する調査研究

－心不全の病態における樹状細胞の役割に関する検討－

分担研究者： 今泉 勉(久留米大学医学部心臓・血管内科教授)

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

ヒト心不全症例の血中においてIL6やTNFなどの炎症性サイトカイン、様々な心筋自己抗体や潜在性の心筋傷害を示すトロポニンTなどの心筋生化学マーカーが上昇することが示されている。また、拡張型心筋症の組織においてはT細胞などの炎症細胞浸潤があることが報告されている。このように、免疫を介した炎症反応が心不全の病態の進展や組織障害に深く関わっていると考えられる。しかしながら、心臓に浸潤しているT細胞がどのような機序で活性化され組織障害に関与しているのかは不明な点が多い。樹状細胞(DC:dendritic cells)は最も強力な抗原提示細胞として獲得免疫応答を誘導するとともに様々なサイトカイン産生を通じて免疫応答を活性化する。本研究では、心不全症例において免疫を介した炎症反応を制御している樹状細胞の動態と機能を明らかにし、心不全の病態における樹状細胞の役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

1) ヒト末梢血樹状細胞の数と活性化の測定

a) 樹状細胞の数の測定法の確立：ヒト末梢血を採取し特異的表面抗原を用いた3カラーフローサイトメトリーにより、骨髄前駆細胞由来樹状細胞(myeloid DC:mDC)およびリンパ系前駆細胞由来樹状細胞(plasmacytoid DC:pDC)を同定し、数を測定する。

b) 樹状細胞の活性化測定法の評価：心不全症例の末梢血樹状細胞の数に加えて、活性化マーカー特異的抗原(CD80、CD86、CD40)、およびリンパ節へのhoming markerであるCCR7を4カラーフローサイトメトリーにより測定し、活性化・成熟したmDCおよびpDCを同定する。

2) 樹状細胞の動態と心不全の臨床パラメーターおよび予後の相関についての検討

心不全治療後にも同様に末梢血樹状細胞の数と活性化マーカーについて測定し、それらの変化と心不全のパラメーターである血清BNPや心エコーデータおよび心筋障害マーカーである血清トロポニンTの変化との相関について検証する。また、心不全の再発など予後との関連についても評価する。

C. 研究結果

1) 心不全の急性増悪期では、コントロール群に比べ末梢血のtotal DC数、mDC数、pDC数は減少していた。また、心不全治療後、総DC数、mDC数、pDC数のいずれも有意に増加していた。2) 心不全増悪時のDC活性化マーカーは、pDCのCD40、CD86、CCR7、およびmDCのCD40、CD83、CCR7が有意に増加していた。また、これらは治療により有意に低下した。3) 心不全の治療前後におけるDC数の変化は血清BNPの減少、血清トロポニンTの減少、EFの増加と有意に相関を認めた。4) 心不全治療後、総DC数が低いグループと高いグループに分け心不全再発の頻度を比較したところ、総DC数が低いグループで心不全再発が有意に多かった。

D. 考察

心不全では進行性の心筋障害によってトロポニンやミオシンなどの心筋タンパクの流出が起こると、これを血中の樹状細胞が認識し活性化し、活性化された樹状細胞はリンパ球に抗原を提示を行う。活性化されたリンパ球は心筋に浸潤したり、心筋タンパクに対する自己抗体を産生する。このような樹状細胞を介した免疫機構の悪循環が心不

全増悪に関与していると予想される。しかし、今回のデータは現象のみであり、動物実験などによってこれらの機序の心不全への関与を検証する必要がある。

E. 結論

心不全の病態の進行において抗原提示細胞である樹状細胞が重要な役割をはたしているかもしれない。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

(「Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表」参照)

2) 学会発表

- Enomoto M, Adachi H, Furuki K, Kumagae S, Otsuka M, Sigetoh Y, Satoh A, Imaizumi T: Impact of higher blood pressure on the risk of death in 27-year follow-up study. 76th Annual European Atherosclerosis Society Congress (June 10-13, 2007/Helsinki, Finland)
- Enomoto M, Adachi H, Furuki K, Kumagae S, Otsuka M, Sigetoh Y, Fukami A, Satoh A, Imaizumi T: Serum dehydroepiandrosterone sulfate levels predict longevity men (27-year follow-up study) 76th Annual European Atherosclerosis Society Congress (June 10-13, 2007/Helsinki, Finland)
- Kumagae S, Adachi H, Enomoto M, Satoh A, Fukami A, Otsuka M, Sigetoh Y, Furuki K, Imaizumi T: TGF- β 1 is a marker for left ventricular hypertrophy in hypertensive subjects in a general population. 76th Annual European Atherosclerosis Society Congress (June 10-13, 2007/Helsinki, Finland)
- Fukami A, Adachi H, Enomoto M, Kumagae S, Otsuka M, Shigetoh Y, Furuki K, Satoh A, Imaizumi T: The association between serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the metabolic syndrome. 76th Annual European Atherosclerosis Society Congress (June 10-13, 2007/Helsinki, Finland)
- Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, Yamakawa R, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor protects against AGE- or diabetes-induced retinal derangement through its anti-oxidative properties expression. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (September 17-21, 2007/Amsterdam, The Netherlands)
- Jinnouchi Y, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T: Atorvastatin not only decreases serum levels of AGE in diabetic patients, but also inhibits the AGE-induced C-reactive protein expression in hepatoma cells. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (September 17-21, 2007/Amsterdam, The Netherlands)
- Mizuta Y, Kai H, Mizoguchi M, Imaizumi T: Valsartan attenuated myocardial fibrosis and diastolic dysfunction of hypertensive hearts in humans. Assessments using integrated analysis. ESC Congress 2007 (September 1-5, 2007/Vienna, Austria)
- Takayama N, Kai H, Kudo H, Mori T, Fukui D, Takemiya K, Ikeda A, Imaizumi T: Simvastatin attenuates cardiac hypertrophy, but not myocardial fibrosis, in spontaneously hypertensive rats with and without large blood pressure variability. ESC Congress 2007 (September 1-5, 2007/Vienna, Austria)
- Takemiya K, Kai H, Takayama N, Tahara N, Imaizumi T: Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for monocrotaline-induced pulmonary hypertension. ESC Congress 2007 (September 1-5, 2007/Vienna, Austria)
- Arima K, Katsuda Y, Saito Y, Katsuki Y, Sasaki K, Yamagishi S, Ikeda H, Kai H, Imaizumi T: Role of PEDF in regulation of skeletal blood flow and neovascularization in ischemic limb via interaction with VEGF. The American Heart Association, The 80th Scientific Sessions (November 4-7, 2007/Orlando, USA)
- Futamata N, Yasukawa H, Sugi Y, Kai H, Fukui D, Mawatari K, Ohba T, Tahara N, Imaizumi T: Simvastatin suppresses dendritic cell-induced autoimmune myocarditis via inhibition of dendritic cell activation. The American Heart Association, The 80th Scientific Sessions (November 4-7, 2007/Orlando, USA)
- Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Mawatari K, Ohba T, Koga M, Imaizumi T: Circulating dendritic cells may play an important role in pathophysiology in heart failure in humans. The American Heart Association, The 80th Scientific Sessions (November 4-7, 2007/Orlando, USA)
- Enomoto M, Adachi H, Furuki K, Kumagae S, Otsuka M, Shigetoh Y, Fukami A, Satoh A, Imaizumi T: High serum dehydroepiandrosterone sulfate levels are strikingly associated with less mortality in men (27-year follow-up study). 第71回日本循環器学会学術集会: Featured Research Session 20 (2007年3月15日~17日/神戸)
- Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Satoh A, Fukami A, Kumagae S, Otsuka M, Matsuoka H, Ikeda H, Koga Y, Imaizumi T: Elevated

- plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and homocysteine (Hcy) are strongly associated with carotid atherosclerosis: An epidemiological study. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Yamamoto T, Yasukawa H, Koga M, Sugi Y, Fukui D, Futamata N, Kai H, Hoshijima M, Kataoka Y, Imaizumi T: Lacking the SOCS3 gene in macrophages prevents the development of atherosclerosis in ApoE deficient mice. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Fukami A, Adachi H, Furuki K, Kumagae S, Otsuka M, Shigetoh Y, Satoh A, Enomoto M, Imaizumi T: The association between serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the metabolic syndrome. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Shigetoh Y, Adachi H, Enomoto M, Satoh A, Fukami A, Kumagae S, Otsuka M, Furuki K, Imaizumi T: Heart rate is a predictor for development of abnormal glucose metabolism: Prospective study for 20 years in a general population. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Enomoto M, Adachi H, Furuki K, Kumagae S, Otsuka M, Shigetoh Y, Fukami A, Satoh A, Imaizumi T: Impact of higher blood pressure on the risk of death in 27-year follow-up study. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Katsuki Y, Sasaki K, Katsuda Y, Toyama Y, Imaizumi T: Neovascularization capacity of endothelial progenitor cells (EPC) in patients with buerger病 disease. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Arima K, Katsuda Y, Saitoh Y, Katsuki Y, Sasaki K, Yamagishi S, Ikeda H, Kai H, Imaizumi T: Inhibition of anti-angiogenic factor, pigment epithelium-derived factor, improves ischemic angiogenesis in klotho mice. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Koga M, Imaizumi T: Circulating dendritic cells numbers are associated with cardiac injury and prognosis in patients with decompensated heart failure. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Mizoguchi M, Tahara N, Yamagishi S, Mizuta Y, Osada K, Ishibashi M, Imaizumi T: The disparity in the determinant factors between atherosclerosis and vascular inflammation. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Matsumoto Y, Ueda S, Yamagishi S, Matsuoka H, Imaizumi T, Okuda S: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase prevents progression of renal dysfunction by inhibiting loss of peritubular capillaries and tubulointerstitial fibrosis. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Kumagae S, Adachi H, Enomoto M, Fukami A, Satoh A, Shigetoh Y, Otsuka M, Furuki K, Imaizumi T: TGF- β 1 is a marker for left ventricular hypertrophy in hypertensive subjects in a general population. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Futamata N, Yasukawa H, Koga M, Fukui D, Sugi Y, Kai H, Imaizumi T: Simvastatin suppresses dendritic cell-induced autoimmune myocarditis via inhibition of dendritic cell activation. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Jinnouchi Y, Yamagishi S, Nakamura K, Takenaka K, Ueda S, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits cold injury-induced brain edema in mice. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Takenaka K, Yamagishi S, Nakamura K, Jinnouchi Y, Ueda S, Imaizumi T: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits occlusive thrombus formation: Possible participation of reduced intraplatelet PEDF levels in acute coronary syndromes. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Mori T, Kai H, Kudo H, Sugi Y, Takayama N, Fukui D, Ikeda A, Koga M, Yasukawa H, Imaizumi T: Prolonged enhancement of perivascular inflammation and oxidative stress aggravates hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ovariectomized rats. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Ohmura H, Oka N, Miyazaki H, Ueda T, Imaizumi T: Roles of lysyl oxidase-like protein in heart. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
 - Tahara N, Mizoguchi M, Mizuta Y, Osada K, Ishibashi M, Yamagishi S, Imaizumi T: Efficacy of fasting 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the detection of cardiac sarcoidosis. 第71回日本循環器学会学術集会：一般演題(2007

年3月15日～17日／神戸)

- Takayama N, Kai H, Kudoh H, Sugi Y, Fukui D, Takemiya K, Ikeda A, Yasukawa H, Imaizumi T: Effect of simvastatin and telmisartan on hypertensive cardiac remodeling by exaggerated blood pressure variability in spontaneously hypertensive rats. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Nakamura K, Imaizumi T, Adachi H, Jinnouchi Y, Yamagishi S, Ueda S, Takenaka K: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits neointima formation by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Katsuda Y, Saitoh Y, Arima K, Katsuki Y, Toyama Y, Sasaki K, Ikeda H, Imaizumi T: Occlusion level of limb artery predicts the efficacy of bone marrow mononuclear cell implantation for critical limb ischemia. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Saitoh Y, Sasaki K, Katsuda Y, Murohara T, Takeshita Y, Okazaki T, Arima K, Katsuki Y, Shintani S, Shimada H, Akashi H, Ikeda H, Imaizumi T: Effect of autologous bone-marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with buerger's disease. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Arima K, Katsuda Y, Saitoh Y, Katsuki Y, Sasaki K, Yamagishi S, Ikeda H, Kai H, Imaizumi T: Role of anti-angiogenic factor, pigment epithelium-derived factor, in VEGF-induced angiogenesis in klotho mice. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Mizuta Y, Kai H, Tahara N, Osada K, Fukui M, Imaizumi T: Valsartan attenuated myocardial fibrosis and diastolic dysfunction of hypertensive hypertrophied hearts in humans. Assessments using integrated backscatter analysis. 第71回日本循環器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)
- Takemiya K, Kai H, Takayama N, Mori T, Kudoh H, Ikeda A, Sugi Y, Fukui D, Futamata N, Tahara N, Yasukawa H, Imaizumi T: Mesenchymal stem cell-transplantation improves endothelial function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats. 第71回日本循環

器学会学術集会: 一般演題(2007年3月15日～17日／神戸)

- 竹内智宏, 吉田輝久, 稲毛智仁, 権藤健樹, 福田裕次郎, 永元康嗣, 今泉 勉: 薬剤治療抵抗性の起立性低血圧に対する新たに開発されたペーシングアルゴリズムを用い治療に成功した1例. 第22回日本不整脈学会学術大会: 一般演題(2007年5月31日～6月2日／広島)
- 緒方綱歌, 田原宣広, 溝口ミノリ, 梅井秀和, 佐々木健一郎, 高城喜典, 浦部聡子, 杉 雄介, 工藤博司, 甲斐久史, 今泉 勉: 種々の肺動脈性高血圧症に対するエンドセリン拮抗薬の慢性効果. 第102回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年6月23日／宮崎)
- 浦部聡子, 高城喜典, 佐々木健一郎, 梅井秀和, 佐藤 晃, 斉藤 裕, 緒方綱歌, 板家直樹, 甲斐久史, 今泉 勉: 剖検で壊死性好酸球性心筋炎が判明した一例. 第102回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年6月23日／宮崎)
- 児玉紀洋, 高城喜典, 佐々木健一郎, 梅井秀和, 武宮清子, 金谷誠司, 甲斐久史, 今泉 勉, 加藤誠也: 急速に四肢末端壊死を来した皮膚型多発結節性動脈炎と考えられる. 第102回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年6月23日／宮崎)
- 今泉 勉: 酸化ストレスは血管(尿管?)内皮傷害をきたし血管(尿管?)を詰まらせる. 日本尿路結石症学会第17回学術集会: 特別講演(2007年8月25日／久留米)
- 知花英俊, 鬼塚一郎, 稲毛智仁, 杉 雄介, 原口 剛, 村山恭子, 平方佐季, 古荘 文, 南知子, 岩元美子, 中村実生, 新田良和, 青木祐司, 井星佐知子, 甲斐久史, 今泉 勉: 末端肥大症に大動脈弁閉鎖不全を合併した一症例. 第103回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年12月1日／別府)
- 新田良和, 杉 雄介, 青木祐司, 稲毛智仁, 鬼塚一郎, 甲斐久史, 今泉 勉: 消化管出血による貧血で誘発されたpostprandial syncopeの1症例. 第103回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年12月1日／別府)
- 原口 剛, 竹内智宏, 吉田輝久, 鬼塚一郎, 稲毛智仁, 杉 雄介, 永元康嗣, 権藤健樹, 福田裕次郎, 甲斐久史, 今泉 勉: 薬剤治療抵抗性の起立性低血圧に対して、新たなペーシングアルゴリズムを用いた1例. 第103回日本循環器学会九州地方会: 一般演題(2007年12月1日／別府)

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

—不全心筋に対する迷走神経刺激による心筋のレドックス変化に関する検討—

分担研究者： 砂川 賢二(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)

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

慢性心不全の病態と自律神経系とは密接に関連している。慢性心不全における自律神経系は、交感神経の過緊張と迷走神経活動の低下に特徴付けられる。不全心筋における活性酸素種(ROS)の過剰な生成が明らかとなっている。ROSは、心筋梗塞後心筋リモデリングの過程における、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系や、 β 受容体からのシグナル伝達に関わっている。近年、慢性心不全ラットに迷走神経刺激が、その予後を大きく改善し心筋リモデリングの過程を抑制することがLiらによって報告された。このことは、自律神経のバランスを積極的に介入し是正することが、新たな治療戦略となることを示唆していると考えられる。迷走神経刺激については、心機能の抑制効果や心臓交感神経活動の抑制を引き起こすことが知られているが、心筋リモデリング過程に対する効果についての詳細な検討は未だなされていない。

本研究では、以下の仮説を明らかにすることを目的とした。

1 ; 迷走神経刺激が不全心筋におけるROSの産生を抑制する。

2 ; その効果が、心臓交感神経抑制による心筋ノルエピネフリン減弱による間接的な作用と、迷走神経週末より遊離されるアセチルコリンによる心筋に対する直接的な作用を介している。

3 ; さらに、その過程には、心臓内のNADPHオキシダーズの抑制が関わっている。これらの仮説について、マウスの慢性心不全モデルを用いたin vivoの実験系と、胎児ラットの培養心筋細胞を用いたin vitroの実験によって検証した。

B. 研究方法

本研究プロトコルは九州大学動物実験規則に従い、動物実験委員会において承認のもとに行った。

動物は、8-10週齢のCD-1マウス(体重30-35g)を用いて麻酔開胸下に左冠動脈を結紮し、4週間生存したものをを用いた。コントロール群としては、左冠動脈を結紮しないシャム手術群を用意した。Avertinにて麻酔を行い、心エコー、ミラー社製カテーテルを用いて、心機能測定、圧記録を行った。

心不全マウス(CHF)および偽手術マウス(control)をおのおの、迷走神経刺激群(VNS)および偽刺激群(SS)($n=6$ ずつ)に無作為に分割した。麻酔下に、右迷走神経に刺激電極を植え込んだ後、10Hz、1msecの矩形波を用いて迷走神経を15分間刺激した。刺激電圧値は、おのおののマウスにおいて、心拍数が基準値の約10%減少するように最適化した。偽刺激群マウスに対しては、電極の植え込みのみ行った。心不全群においては、上記群とは別に、アトロピン群をおき、迷走神経刺激直前にアトロピン($1\mu\text{g/g BW}$)を尾静脈より投与した後に、上記刺激条件で、固定電圧値(500mV)で刺激を行った。刺激終了5分後より、in vivo ESRによる測定を行なった。

C. 研究結果

1) in vivo ESRによるROSの測定

プローブ剤であるメトキシカルボニルプロキシルのESRシグナルの減衰速度は、control群に比べCHF群で有意に亢進していた。さらにこの減衰速度の亢進が、タイロンおよびジメチルサイオウレアの前投与によってほぼ正常化することが観察された。迷走神経刺激に対する心拍数の減少反応は、controlおよびCHF群において概ね同等であった。アトロピン群に対する固定電圧値(500mV)での迷走神経刺激は、心拍数減少をきたさなかった。CHF群(CHF+SS, $n=6$)におけるESRシグナル減衰速度の亢進は、迷走神経刺激(CHF+VNS, $n=6$)によってほぼ正常化していることが観察され

た。一方、control群(control, control+VNS, n = 6 each)に対する迷走神経刺激は、シグナル減衰速度に影響を与えなかった。さらに、アトロピンの前投与によって、この迷走神経刺激の効果が消去された。(CHF+VNS+Atropine, n = 5)これらのことより、迷走神経刺激は、ムスカリン受容体を介し不全心における過剰なROS産生を抑制することで、心臓におけるレドックス状態を変化させることが示唆された。さらに、迷走神経刺激中に心房ペースングによって心拍数を一定にさせると、迷走神経刺激によるレドックス変化の程度が若干減少する傾向にあった。さらに、L-NAMEで前処置したCHFマウスでも同様に、迷走神経刺激の効果が減少する傾向にあった。

2) 低分子チオールおよびNADPHオキシデース活性

CHF群から採取した心筋サンプル中の還元型低分子チオールは、control群に比し有意に上昇していたが、CHF+VNS群では有意に抑制されていた。このことは、迷走神経刺激による心筋レドックスの変化を示唆し、in vivo ESRの結果を支持するものと考えられる。

さらに、迷走神経刺激の心臓におけるNADPHオキシデースに与える影響について検討した。ウェスタンブロッティング法でNADPHオキシデースの構成要素であるp47phoxの発現量を解析してみたところ、先行研究と合致し、controlと比しCHF群においてp47phoxの発現量は上昇していたが、迷走神経刺激による発現量の変化は認めなかった。一方、チトクロームc還元アッセイによってNADPHオキシデース活性を測定すると、controlに比しCHF群においてNADPHオキシデース活性の亢進を認めた。さらに、CHF+VNS群の心筋では、その亢進したNADPHオキシデース活性は正常化される傾向を認めた。

3) 心筋間質中ノルエピネフリン

心不全マウスにおける、心筋中のノルエピネフリン濃度は、迷走神経刺激によって有意に減少した(0.25 ± 0.07 ng/mL 迷走神経刺激中 vs. 0.61 ± 0.12 ng/mL 迷走神経刺激なし, $P < 0.05$)。また、迷走神経刺激を中止後、ノルエピネフリン濃度は基準値へ復した(0.43 ± 0.07 ng/mL 迷走神経刺激中止後 vs. 0.25 ± 0.07 ng/mL 迷走神経刺激中, $P < 0.05$)。controlマウスでも同様に、迷走神経刺激中のノルエピネフリン濃度の減少を認めたが、こちらは統計学的な有意差には至らなかった(0.47 ± 0.06 ng/mL 迷走神経刺激なし, 0.36 ± 0.08 ng/mL 迷走神経刺激中, 0.42 ± 0.02 ng/mL 迷走神経刺激中止後, $P > 0.05$)。これらのことは、既知の迷走神経刺激による節前繊維レベルにおける交感神経活動の抑制を意味し、さらに心不全動物でよりこの効果が顕在化することを示していると思われる。

4) 心筋細胞の β 刺激に対するROS産生

心筋細胞に対するノルエピネフリン($10\mu\text{mol/L}$)による β 刺激30分後、DCFの蛍光度の亢進が観察された。また、細胞外 H_2O_2 濃度も、ノルエピネフ

リン濃度依存性に増加し、 β 刺激に対する心筋細胞からのROS産生が観察された。さらに、ノルエピネフリン($10\mu\text{mol/L}$)に対する細胞内のROS産生ならびに細胞外 H_2O_2 の放出は、アセチルコリン($10\mu\text{mol/L}$)によって一部抑制された。

D. 考察

本研究によって示されたことは、短時間の迷走神経刺激によって、不全心でのレドックス異常が正常化しうることと、さらにこの現象には、交感神経活動の抑制と心臓に対するアセチルコリンの直接作用の双方が関与している可能性が示唆されたことである。さらに、これらの細胞内メカニズムの一つとして、NADPHオキシデース活性や一酸化窒素(NO)、酸素消費量など様々な因子が関与していると考えられる。心臓副交感神経は、様々な心疾患の進展を抑制する可能性がある。先行研究によると、迷走神経刺激は急性虚血時ならびに慢性心不全期の致死性不整脈の発生を抑制し、さらに心筋梗塞後リモデリングの過程を改善し予後を著明に改善することがすでに報告されている。これらの効果に加え、今回我々は、不全心におけるROSの過剰産生が迷走神経刺激によって抑制されることを報告した。ROSは心筋細胞のアポトーシスなど様々な不適切なカスケードを活性化し、それらは更に心筋リモデリングを促進させるという悪循環の形成に一因を担っている。それゆえ、迷走神経刺激がROSを抑制することは、迷走神経刺激による抗心筋リモデリング効果の一端を説明できる可能性がある。

E. 結論

迷走神経刺激は急性に心臓における酸化ストレス産生を低下させ、レドックス状態を変化させる。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. Cardiovascular Research 2008, in press.

2) 学会発表

- 第71回日本循環器学会(2007年3月15-17日/神戸)
- 第11回日本心不全学会(2007年9月9-10日/千葉)
- 米国心臓病学会(Nov. 4-7, 2007/Orland, USA)

H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

井手友美・堤 孝樹

特発性心筋症に関する調査研究

－慢性心不全に対する和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果－

分担研究者： 鄭 忠和(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

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

A. 研究目的

慢性心不全患者では酸化ストレスが増加しており、増加した酸化ストレスは左心機能低下ならびに心不全の重症度と相関することが報告されている。また、心不全で増加した酸化ストレスは、ACE阻害剤・カルベジロール・アミオダロン・スタチン等の薬剤ならびに適切な運動により軽減されることも報告されている。一方、酸化ストレス物質は心筋の肥厚や、心収縮力の低下をもたらし、さらに血管拡張物質であるNO(一酸化窒素)の分解を促進することが知られている。

これまで我々は、慢性心不全患者における低温サウナ治療室を用いた和温療法の効果を多方面から検討し、心不全症状の改善のみならず心機能・末梢血管機能・神経体液性因子・交感神経系・不整脈に対する改善効果を明らかにしてきた。さらに、動物実験により和温療法による血管内皮機能の改善にeNOS(血管内皮型NO合成酵素)の合成亢進が寄与し、更に心不全発症マウスの生命予後を改善させることも明らかにした。

そこで本研究の目的は、慢性心不全患者における和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果を急性期・慢性期のそれぞれで比較検討することである。

B. 研究方法

拡張型心筋症および虚血性心筋症を基礎疾患にもち、NYHA分類II～III度の症状の安定している慢性心不全患者20名(64±7歳)を対象に検討した。全患者は心不全に対する従来の内服加療はなされており、本研究期間内、その処方を変えないことを前提とした。

和温療法は、遠赤外線均等低温(60℃)乾式サウナ治療室を用い、1日1回15分間の均等低温サウナ

浴と出浴後30分間の安静保温を一回の治療とし、週5回、4週間施行した。

初回和温療法の前後、和温療法2週・4週後のそれぞれで、酸化ストレスのマーカーである血中ヒドロキシペルオキシドをFree Radical Analytical System(FRAS4,WisnerII社)を用いて測定し比較検討した。

C. 研究結果

全例、脱落なく和温療法を4週間施行することができた。

慢性心不全患者では、酸化ストレスのマーカーである血中ヒドロキシペルオキシド濃度は、健常人と比較し、有意に増大していた(心不全: 442±18 U vs 健常者: 416±23 U, $p<0.05$)。

血中ヒドロキシペルオキシド濃度は、45分間の初回温熱療法前後では有意な変化を認めなかったが、和温療法2週後には有意な減少が認められ(442±18 U to 406±30 U, $p<0.01$)、和温療法4週後には更に有意な減少が認められた(442±18 U to 364±30 U, $p<0.01$)(図)。

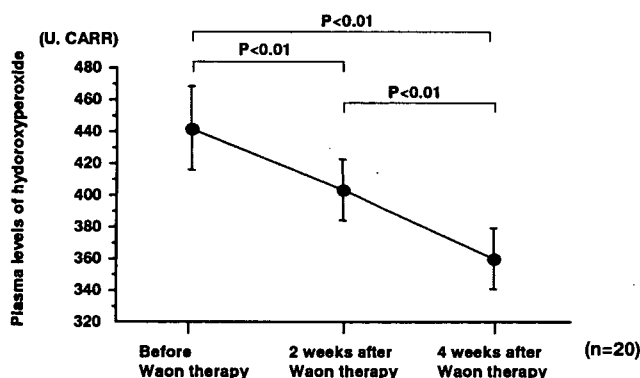


図1. 心不全患者に対する和温療法の酸化ストレスに対する経時的効果

D. 考察

本研究で、慢性心不全患者に遠赤外線均等低温サウナ治療室を用いた和温療法を2～4週間施行し、経時的に酸化ストレスのマーカーである血中ヒドロキシペルオキシドの有意な低下を認めることが明らかとなった。

これまで我々は、心不全発症ハムスターを用いた実験で、和温療法が末梢血管においてeNOSの発現を亢進させ、心不全により障害された内皮依存性血管拡張反応を改善し、さらには心不全進展を抑制し予後を改善することを明らかにしてきた。

一方、酸化ストレス物質はNOの分解促進に働くことが報告されている。NOには酸化ストレス抑制作用があり、和温療法により大量に産生されたNOの分解に酸化ストレス物質が消費され、心不全の酸化ストレスの改善につながった可能性が考えられる。

和温療法の心不全に対する効果発現のメカニズムとして、血管内皮におけるeNOSの合成亢進およびNOの産生増加の関与を我々は明らかにし、その結果、和温療法の血管病に対する適応拡大がもたらされた。今回、和温療法の心不全に対する改善効果のメカニズムの一つとして酸化ストレスの改善が関与していることが明らかにされた。これにより、和温療法の適応疾患がさらに広がる可能性が期待される。

酸化ストレスが亢進している疾患群として、(1)動脈硬化をはじめとした加齢に伴う生体変化、(2)慢性疲労症候群といった一連のストレス関連疾患、(3)慢性関節リウマチをはじめとした膠原病関係など多くの疾患群が、和温療法の新しい適応疾患として挙げられる。実際、このような症例に和温療法を施行してみると、症状の著明な改善に加え、炎症所見の改善、NK細胞の活性化に伴う免疫機能の改善効果が得られることも明らかにされている。

和温療法は、軽症心不全から重症心不全まで、動脈硬化の初期像である血管内皮機能障害から重症閉塞性動脈硬化症まで、安全に施行できかつ有効性の高い治療法である。加えて、患者に対するリラクゼーション効果を有し、多くの慢性病で苦しむ患者に心地よい発汗をもたらす、笑顔と安心と、なにより症状軽減をもたらす患者に優しい治療法である。このように、疾患の重症度に関わらず、かつ多くの疾患に有用性の高い和温療法が日本の医療に幅広く、かつ深く浸透し、患者救済の大きな福音になることを希望してやまない。

E. 結論

和温療法は、慢性心不全患者で増大した酸化ス

トレスを減少させる効果を有する。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Tei C: Waon therapy: Soothing warmth therapy. J Cardiol 2007; 49: 301-4.
- Tei C, Shinsato T, Miyata M, Kihara T, Hamasaki S: Waon therapy improves peripheral artery disease. J Am Coll Cardiol 2007; 50: 2169-71.
- Anan R, Niimura H, Takenaka T, Hamasaki S, Tei C: Mutations in the genes for sarcomeric proteins in Japanese patients with onset sporadic hypertrophic cardiomyopathy after age 40 years. Am J Cardiol 2007; 99: 1750-4.
- Kawano M, Takenaka T, Otsuji Y, Teraguchi H, Yoshifuku S, Yuasa T, Yu B, Miyata M, Hamasaki S, Minagoe S, Kanmura Y, Tei C: Significance of asymmetric basal posterior wall thinning in patients with cardiac Fabry's disease. Am J Cardiol 2007; 99: 261-3.

2) 学会発表

- Fujita S, Kihara T, Miyata M, Fukudome T, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamasaki S, Tei C: Effect of thermal therapy on oxidative stress in patients with chronic heart failure. 第71回日本循環器学会総会(2007年3月/神戸)
- 藤田祥次, 木原貴士, 宮田昌明, 福留 剛, 池田義之, 新里拓郎, 桑波田 聡, 窪菌琢郎, 濱崎秀一, 鄭 忠和: 慢性心不全における温熱療法の抗酸化作用に及ぼす効果. 第13回心臓リハビリテーション学会(2007年7月/東京)
- Fujita S, Kihara T, Miyata M, Fukudome T, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamasaki S, Tei C: Effect of Waon Therapy (Thermal Therapy) on Oxidative Stress in Patients with Chronic Heart Failure. 第11回日本心不全学会(2007年9月/東京)
- 藤田祥次, 木原貴士, 宮田昌明, 福留 剛, 池田義之, 新里拓郎, 桑波田 聡, 窪菌琢郎, 濱崎秀一, 鄭 忠和: 慢性心不全における和温療法の酸化ストレスに及ぼす効果(優秀ポスター受賞). 第55回日本心臓病学会(2007年9月/東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—骨格筋芽細胞移植による拡張型心筋症の治療開発：心筋再生医療の基礎検討—

分担研究者： 豊岡 照彦(東北大学先進医工学研究機構生命機能分野教授)

＜研究要旨＞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. 背景および目的

拡張型心筋症(Dilated cardiomyopathy, DCM)は進行性に心筋変性を来とし、予後が不良で、る^{1, 2)}。その最終治療としての心移植にも問題が山積している。近年、細胞移植による治療は、ドナーの出現を待つ必要が無い、自己移植(*autologous*)の場合、拒絶反応が無く、また経済的にも負担が少ない。心筋梗塞後の瘢痕部に骨格筋芽細胞(skMbl)^{3, 5)}初め多種類の細胞移植が試みられている⁶⁻⁸⁾。我国は欧米と比較して虚血性心疾患の発生頻度が少なく、心筋梗塞後の重症心不全患者は少ないが、DCMによる重症心不全の症例は遥かに多く、実施された心移植症例は全例がDCMであった。心不全治療としてDCMを目標とする事は我国の国情に合う。

DCMモデルのハムスターは、その原因が不明のまま、病態がヒトと酷似する事から病態生理解析や治療薬の開発に頻用されて来た⁹⁾。筆者らはTO-2系ハムスターの先天性DCMの責任遺伝子の δ -sarcoglycan(SG)の欠損を同定した¹⁰⁾。同じ δ -SG遺伝子の変異により心不全と重篤な不整脈を示すヒト4家系が報告され、その中の1人は心移植が必要であった¹¹⁾。次いで遺伝子治療として、長期遺伝子発現に有用なrAAVベクターを用い、*in vivo*心筋に δ -SG遺伝子を強制発現させて、最終的に動物がrescueされる事も報告した¹²⁻¹⁴⁾。

上記研究の過程で心筋変性が起る前に遺伝子治療を行えば生命予後も改善するが、心筋細胞変性や線維化が進み、末期の心不全状態では、その治療効果を期待し難い。この状況を越える為に、我々は自家skMblの移植による再生医療を考えた。成熟筋細胞と異なり、skMblは*in vitro*で増殖し、最終的に成熟型の筋細胞に分化する¹⁵⁾。この性質を応用して、*ex vivo*でskMblに治療用遺伝子を

transfectさせて遺伝子を正常化した後に、変性心筋に移植して、心筋を再生させる試みが期待される。今回の研究目標は、その予備検討として、①正常の同種異型のgoldenハムスターから採取したskMblがDCMの心筋に生着可能か、②可能な場合、移植後の細胞の特性を組織学的に検討して、移植の最適条件を探る事を目的とした。

B. 方法

皮膚移植による拒絶反応の予備検討、skMblの採取と心筋層内投与、骨格筋への移植、心筋への移植、心筋の免疫組織染色、Western blottingと心機能に関する方法は発表論文¹⁶⁾に詳述したので、参考にして頂きたい。

(倫理面への配慮)

事前に文部科学省大臣許可、(独)霊長類研究センターの承認を得た後に、以上の実験を日本実験動物学会と国立大学医学部附属動物実験施設協議会の実験指針に準拠して行った。

C. 結果

移植されたdonor細胞とrecipient細胞との識別には以下の外因性、または内因性の3種のマーカーを用いた。①細胞核の染色にDAPI、②細胞膜染色にはDiI、③donor細胞内因性の δ -SG蛋白を細胞膜染色として用いた。各マーカーに一長一短があり、必要に応じて使い分けた。分離後のskMbはほぼ均一の紡錘形の細胞で占められ、desmin陽性で筋源性で、他の結合組織や成筋の混入は認められなかった。

1) 皮膚移植による拒絶反応の検討

詳細を割愛するが、同種異型間の皮膚移植(*allograft*)が成功し、TO-2とgolden hamsterの間で拒絶反応を認めず、移植可能であることが示された。

2) 移植用細胞の*in vitro*の特徴

分画採取した細胞は分化培養により*in vitro*で大型のmyotubeを形成し、 δ -SGの抗体で細胞膜全体が染色された(図略)。また、この δ -SGの免疫染色は下記の細胞膜のDiI蛍光染色と、核のDAPI蛍光ラベルにも影響しなかった。

3) 心臓への細胞移植

DiIラベルされた細胞は主に左室に存在し、このラベルは移植後15週後も確認され、長期間TO-2の心筋層内に生着する事が示された(図略)。一方DAPIで核をラベルした場合、移植5週後の心臓でDiI陽性細胞の他に、その周辺にもDAPI陽性細胞が多数確認された(図略)。

4) 移植されたdonor細胞の組織学的評価

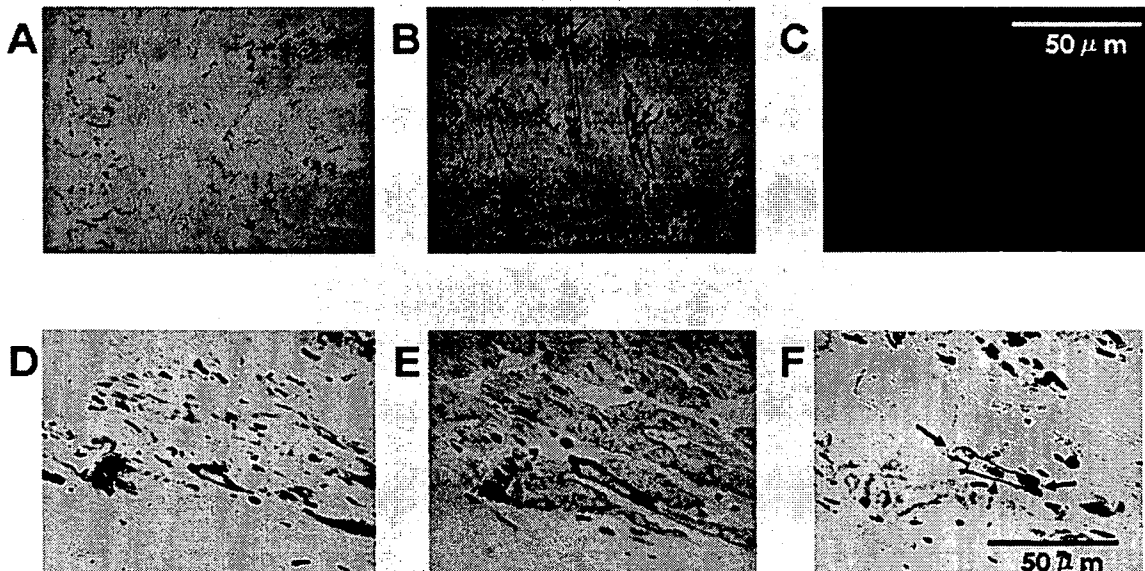
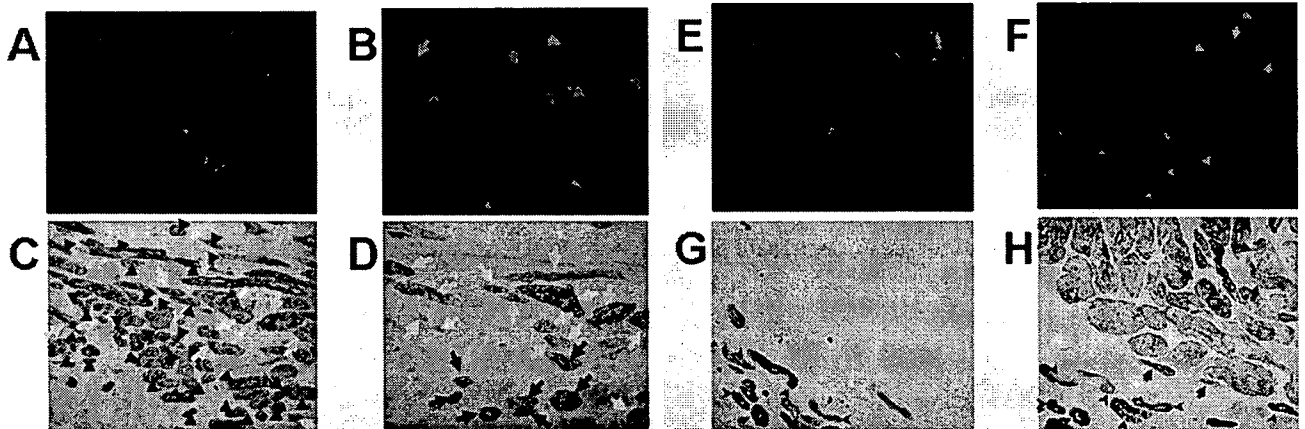
skMb1とrecipientの心筋細胞とは δ -SGにより区別した。移植5週後ではDiIまたはDAPI(図上B, C)でラベルされ、かつ δ -SGも発現する細胞(A, B)の中で抗体染色の結果、70~80%が速筋型骨格筋ミオン重鎖陽性で(C)、また10~30%が遅筋型だった(D: 青矢印)。また3~5%の細胞は両方で染色された(C, D: 黄矢印)。しかし、移植15週後では移植5週後と比較して δ -SG陽性細胞の発現数は減少した(E)。その80%が遅筋型(H)で、速筋型細胞は殆ど観察されなかった(G)。

更に、 δ -SG蛋白抗体(図下A, B)、DiI(D, F)、DAPI(D, F)およびconnexin43抗体(A, E, F)による4重染色の結果、 δ -SGを発現していた細胞の1~3%がconnexin 43で染色され、その細胞は骨格筋型速筋ではなく(F)、遅筋のMHCのみを選択的に発現していた(E)。

6) 生理機能との関連

この細胞移植の効果を慢性期の15週目に心臓カテーテルによる血行動態、心エコー検査による心筋収縮能と心電図への影響で観察した。これらの検査後に動物を剖検してskMbの生着状況を検討した結果、skMbがdonor心筋内に局所性に移植密度が高い時は多くの細胞がapoptosisを起していた。一方、心筋層内に、均質に播種された時はapoptosisを示さず、最大左室圧増加速度(dP/dt_{max})、最大左室圧減少速度(dP/dt_{min})と左室拡張末期圧(LVEDP)が改善した。また、心筋収縮能の改善傾向は有っても有意差には至らなかった¹⁷⁾。

skMbの移植により心筋の興奮伝導速度が大きく異なる速筋と遅筋が共存すると、不整脈の基質となって重症不整脈を来すことが懸念されたが¹⁸⁾、今回用いたDCMハムスターには麻酔状態とtelemetryによる覚醒状態でも不整脈を認めなかった。更に、カテコラミン誘発による不整脈も考



慮して出血性ショック状態を作って検討したが、不整脈は誘発されなかった。

D. 考察および結論

以上からskMbは心筋へ移植後に生着したが、その効率は時間依存性に変化し、移植直後は速筋が、移植後期には遅筋が主体となった。この変化が、速筋から遅筋に分化するのか、速筋が選択的に淘汰されて、遅筋のみが残るのか不明である。印象としては、上記のapoptosisから淘汰される可能性が強いが、現状で確定は難しい。今後はskMbの中で、遅筋を選別して移植する方策を目指したい。

(参考文献)

1. Shaw T, Elliott P, McKenna WJ: Dilated cardiomyopathy: A genetically heterogeneous disease. *Lancet* 360:654-5, 2002.
2. Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, et al: Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 168:386-97, 2006.
3. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al: Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4:929-33, 1998.
4. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-80, 2001.
5. Hagege AA, Carrion C, Menasche P, et al: Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361:491-2, 2003.
6. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264:98-101, 1994.
7. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al: Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 106:1294-9, 2002.
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5, 2001.
9. Bajusz E. Hereditary cardiomyopathy: a new disease model. *Am Heart J* 77:686-96, 1969.
10. Sakamoto A, Ono K, Abe M, et al., Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, α -sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13873-8, 1997.
11. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, et al: Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 106:655-62, 2000.
12. Kawada T, Sakamoto A, Nakazawa M, et al: Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 284:431-5, 2001.

13. Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, et al: Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:901-6, 2002.
14. Toyo-oka T, Kawada T, Nakata J, et al: Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: A scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7381-5, 2004.
15. Cossu G, Tajbakhsh S, Buckingham M: How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* 12:218-23, 1996.
16. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, et al: Long-lasting plasticity of slow-twitch skeletal myoblasts for the efficient engraftment in DCM Heart. *Proceedings of the 13th World Congress on Heart Disease*, Medimond Publ (in press).
17. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, et al: Which skeletal myoblasts and how to be transplanted?: Slow-twitch skeletal myoblast as a new generation cell-source and its dissemination for cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
18. Menasche P: First randomized placebo-controlled myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial. AHA Scientific Meetings Late-breaking Clinical Trial Session (Nov. 15, 2006/Chicago, USA).

E. 研究危険情報

なし。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, et al: Long-lasting plasticity of slow-twitch skeletal myoblasts for the efficient engraftment in DCM Heart. *Proceedings of the 13th World Congress on Heart Disease*, Medimond Publ (in press).
- Toyo-oka T, Aoyagi T, Tomaru T, et al., Pitavastatin improves cardiac function in heart failure with or without Ischemic origins. *Proceedings of the 13th World Congress on Heart Disease*, Medimond Publ (in press).
- Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, et al: Which skeletal myoblasts and how to be transplanted?: Slow-twitch skeletal myoblast as a new generation cell-source and its dissemination for cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
- Toyo-oka T, Kumagai H: Cardiac troponin levels as a preferable biomarker of myocardial cell degradation (Review). *Adv Exp Med Biol* 592:241-249, 2007.
- Honda H, Masui F, Kanzawa N, et al: Specific knockdown of m -calpain blocks myogenesis with cDNA deduced from the corresponding RNAi (in subm).

- Honda M, Hosoda S, Kanzawa N, et al: Specific knockdown of d-sarcoglycan gene in C₂C₁₂ in vitro causes post-translational loss of other sarcoglycans without mechanical stress (in subm).
 - Karino S, Okuda T, Uehara Y et al: Breastfeeding and prevalence of allergic diseases in Japanese university students (in subm).
 - 豊岡照彦, 鈴木順一: 循環器疾患の主要症状, 内科学書, 577-581, 医学書院, 東京, 2007.
 - 豊岡照彦, 増井藤子: 心筋細胞のジストロフィンと, その関連蛋白. 日本臨床 65(増刊号4): 132-142, 2007.
- 2)学会発表
- Toyo-oka T, Tezuka A, Kawada T, et al: Long-lasting plasticity of slow twitch skeletal myoblasts for selective engraftment and functional improvement of failing heart (Invited Lecture). The 13th World Congress on Heart Disease (July 28-30, 2007/Vancouver, Canada).
 - Toyo-oka T: Advanced Heart Failure: Pathogenesis and Treatment. The 1st International Society of Cardiomyopathy and Heart Failure (March 10-13, 2007/Kyoto, Japan).
 - Aoyagi T, Nakamura F, Tomaru T, Toyo-oka T: Pitavastatin Improves Cardiac Function in Heart Failure. 第71回日本循環器学会総会 (2007年3月15日/神戸).
 - Nakamura F, Aoyagi T, Tomaru T, Toyo-oka T: Pitavastatin and Cardiac Function in Heart Failure. 日本心不全学会総会 (2007年9月9-10日/千葉).
- G. 知的財産権出願・登録状況
なし。
- <研究協力者>
手塚あさき(東京大学器官病態内科)
河田登美江(新潟大学薬剤部)
中澤幹夫(新潟大学医用工学)
金野 聡・仁田新一
(東北大学加齢医学研究所臨床医工学)

特発性心筋症に関する調査研究

—治療抵抗性の肥大型閉塞性心筋症に対するジソピラミド・DDDペーシング併用療法の急性効果—

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。

A. 研究目的

肥大型心筋症(HCM)は形態学的にも自然歴も多様性を有する遺伝性の心疾患である。このうち、僧帽弁の収縮期前方運動により発生する左室流出路圧較差(LVOT-PG)はHCMの20-25%に存在し、生活制限をきたすような自覚症状の発生や心血管イベントにかかわる独立した因子であることが示されている。

以前より陰性変力作用を有する薬物：β遮断薬、Ca拮抗薬、そしてジソピラミドが肥大型閉塞性心筋症(HOCM)のLVOT-PGを減少させることから広く使用されてきた。

1980年代中期にdual-chamber(DDD)ペーシングがHOCMの治療に提唱された。初期の成績ではDDDペーシングはLVOT-PGを減少させて自覚症状を改善することが報告されたが、その後のランダム化比較試験ではそれらの効果は小さいことが示され最近ではあまり行われなくなっている。

しかしながら、陰性変力作用を持つ薬剤とDDDペーシングの併用療法の効果についてはこれまで検証されていない。そこで今回我々は、治療抵抗性のHOCMに対して、ジソピラミドとDDDペーシング併用療法の急性効果をそれぞれの単独療法と比較検討した。

B. 研究方法

1) 対象

東京女子医科大学病院における連続484例のHCMのうち、109例が著明な中隔肥大と安静時の有意なLVOT-PG(>30mmHg)を示した。このうち49例が種々の内科治療に抵抗性であったが、心室中隔切除術を施行された10例と急性期評価を行わずにDDDペースメーカーが挿入され

た7例を除く、計24例を対象とした。

24例の入院時服薬状況は、β遮断薬22例、クラスI抗不整脈薬20例、Ca拮抗薬8例、アミオダロン3例であった。さらに24例中21例(88%)は2剤以上の併用療法となっており、とくにβ遮断薬+クラスI抗不整脈薬の組み合わせが19例(79%)と最も多かった。

2) 診断基準

HCMの診断は心臓超音波検査で左室腔拡大のない求心性肥大とこれをきたすような心疾患・全身疾患の存在しないことで診断した。LVOT閉塞は、連続波ドプラー心臓超音波検査で最大LVOT-PGが安静時で30mmHg以上で僧帽弁収縮期前方運動があるものとした。左室中部閉塞例は対象から除外した。

3) 一時的DDDペーシング試験とジソピラミド投与試験

まず、対象例全例に対して、一時的DDDペーシング試験を施行した。48時間以上薬物投与を中止した後、空腹時に心臓カテーテル検査を行った。一時的ペーシングは、右房・右室心尖部にペーシングリードを留置して、何種類かのAV間隔でDDDペーシングを行い、最もLVOT-PGが低いAV間隔を採用した。

DDDペーシングでLVOT-PGが30mmHg未満に低下しなかった例には、ジソピラミド(1.0mg/kg)静注を行い、LVOT-PGの変化を測定した。

すべての症例に対して試験施行前に検査内容について説明し、文書で同意取得後心臓カテーテル検査を施行した。

C. 研究結果

1) 臨床背景

対象24例中、男女比は1:1、平均年齢は59歳

(25～80歳)であった。平均LVOT-PGは 89 ± 38 mmHg (40-195)であった。心臓超音波検査による心室中隔壁厚は平均 21 ± 5.3 mmHgであった。非対称性心室中隔肥大は全例で見られた。僧帽弁逆流は18例で軽度、1例で中等度みられた。平均左房径は 41 ± 6.5 mmHgであった。

2) 一時的DDDペーシングのみによる急性効果

24例中、DDDペーシングのみによりLVOT-PGが30 mmHg未満になったのは7例のみであった。この7例のLVOT-PGは平均 58 ± 20 から 19 ± 13 mmHgに低下した($p=0.0003$)。従ってこの7例については、ジソピラミド静注試験は施行しなかった。

3) DDDペーシングとジソピラミド静注併用療法の急性効果

DDDペーシングで効果不十分であった17例について、引き続いてジソピラミド静注を行った。LVOT-PGはDDDペーシングのみの場合 102 ± 35 から 74 ± 25 mmHgまでの低下、ジソピラミドのみの場合 102 ± 35 から 64 ± 21 mmHgまでの低下にとどまった。

DDDペーシングとジソピラミド併用療法を施行したところ、LVOT-PGは 102 ± 35 から 28 ± 23 mmHg ($p<0.05$)と劇的に低下し、LVOT-PG低下率は 72 ± 21 %であった。17例中15例がLVOT-PG <30 mmHgまたはLVOT-PG低下率>50%を達成した。

従って、全対象24例のうち22例がDDDペーシングまたはこれとジソピラミド併用療法により、LVOT-PG <30 mmHgまたはLVOT-PG低下率>50%を得ることができた。

D. 考案

本研究で、HOCM治療におけるDDDペーシングとジソピラミド併用療法の相乗効果を心カテ室における急性効果の検討で明らかにすることができた。17例のDDDペーシングとジソピラミド併用療法を行った例ではLVOT-PG低下は72%、102から28 mmHgへの低下と著明な効果が認められた。

過去の研究から、ジソピラミドはLVOT-PGを低下させるもののその効果は限定的であり、米国では効果不十分の場合には標準的治療として心室中

隔切除術が施行されてきた。またDDDペーシングについては、ランダム化クロスオーバー試験でLVOT-PG低下は28-49%みられたものの、自覚症状改善はコントロール群と差がなくplacebo効果と結論されている。その後、ヨーロッパを中心に心室中隔アブレーションが開発されて、最近ではHOCM治療にDDDペーシングが行われることがきわめて少なくなっている。

しかしながら、今回の研究によりDDDペーシングとジソピラミド併用療法は著明なLVOT-PG低下効果をもたらすことが明らかになった。心室中隔切除術は手術成績が安定してきたといってもかなり侵襲的であること、心室中隔アブレーションはいまだに議論の多い治療であることを考えると、より侵襲が少ないDDDペーシングとジソピラミド併用療法は手術を決定する前の有力な治療オプションになる可能性がある。

E. 結論

DDDペーシングとジソピラミド併用は、薬物治療抵抗性のHOCMに対して相乗的に作用してLVOT-PGを著明に減少させた。今回急性効果のみの検討であり、今後はこの治療法の長期効果、予後に関する検討が必要である。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

・2007年ACC学術集会

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青山病院循環器内科)

南雄一郎・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

—酸化ストレス誘導性の早期老化による心筋細胞障害の機序についての検討—

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

難治性の病態である心不全を克服するためには、その詳細な機序を解明する必要がある。これまでに心筋細胞の壊死・肥大・アポトーシスなどと心不全の病態との関わりについて多くの研究が行われているが、未だ十分に解明されているわけではない。我々は以前から非増殖細胞である心筋細胞に存在している細胞周期制御因子の役割について注目し、これらが心筋細胞の肥大やアポトーシスに深く関わっていることを明らかにしてきた。近年、細胞の老化が様々な外的刺激により短期間のうちに誘導されることが増殖細胞において明らかにされた。この現象は早期老化と呼ばれ、細胞周期が強制的にかつ不可逆性に停止されることで起こる。我々は早期老化が心筋細胞でも細胞周期制御因子の変化を介して起こっており、心不全の病態機序の一要素を担っている可能性があると考えた。本研究では動物実験モデルを用いて加齢に伴う変化と酸化ストレスによる心筋細胞の変化を比較することで心不全の病態に心筋細胞の早期老化が関わっているかどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験(1)：若年ラットと高齢ラットより心臓を摘出し、心筋細胞の性状を病理学的検査(細胞老化のマーカーであるsenescence-associated β -galactosidase(SA β -gal)染色、*in situ* hybridization)や分子生物学的手法(western blotting, northern blotting, TRAP assay)を用いて解析した上で比較し、加齢に伴う心筋細胞の変化を評価した。

実験(2)：増殖細胞に酸化ストレスを与えると早期老化が誘導されることが知られているが、新生仔ラット由来の初代培養心筋細胞に過酸化水素

(10^{-5} mol/L)やDoxorubicin(DOX, 10^{-7} mol/L)を用いて酸化ストレスを加え、上記の実験で認められた加齢による心筋細胞の変化と共通の変化が誘導されているか否かについて病理学的検査及び分子生物学的手法を用いて解析した上で検討する。検討項目はcdk抑制因子(p16, p21)などの細胞周期制御因子やtelomerase活性など増殖細胞の早期老化の研究で行われているものの他に、心筋特異的蛋白であるTroponin I(TnI)のリン酸化の変化や心筋に特異的な遺伝子の発現の変化について検討した。

実験(3)：心筋細胞におけるDOXにより誘導された早期老化のメカニズムを検討する目的で、我々はp53の制御因子に着目した。DOXを添加した新生仔ラット由来培養心筋細胞にp53転写阻害剤であるpifithrin- α やp53アセチル化阻害剤であるresveratrolを加え、細胞周期制御因子の発現、SA β -gal染色、TnIのリン酸化、TRAP assayの変化について検討した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は東京医科歯科大学動物実験委員会において、その実験目的や実験方法などが検証され、倫理面より問題がないとの判定を受けた上で実験に着手した。

C. 研究結果

DOX 10^{-6} mol/Lを加えた心筋細胞ではアポトーシスが誘導されたが、低濃度のDOX(10^{-7} mol/L)を加えてもアポトーシスは誘導されなかった。しかし、培養心筋細胞を低濃度DOXで刺激すると、SA β -gal陽性の心筋細胞数が有意に増加し、cdk抑制因子の発現が上昇していた。また、成獣ラットの心筋組織においても加齢に伴ってSA β -gal陽性の心筋細胞が有意に増加し、cdk抑制因子の蛋白発現量は加齢と共に増加していた。加齢ラットの心筋では

TnIのリン酸化が低下するが、低濃度DOXを添加した心筋細胞のTnIのリン酸化もまた著明に低下していた。更に、Isoproterenol刺激によるTnIリン酸化の反応も有意に反応が低下していた。加齢に伴う心筋細胞における各種遺伝子の発現レベルの変化についても検討したが、GATA4、Nkx2.5、 α -MHCなどは発現低下、ANP、Angiotensin II、 β -MHCなどの発現は増加しており、低濃度DOX刺激心筋細胞においても同様の変化がみられた。Telomerase活性は加齢とともにその活性が低下するが、低濃度DOX刺激心筋細胞のTelomerase活性も低下していた。増殖細胞において早期老化が誘導される際にはp53がアセチル化され、さらにこれがPML蛋白と複合体を形成し、その結果p21^{cip1/waf1}蛋白の誘導が促進されることが知られているが、DOXで刺激された心筋細胞にも表記の現象が起こっていることが観察された。

D. 考察

近年、心不全の機序としてオートファジーなど新規の心筋細胞障害のメカニズムの存在が確認されるようになったが、早期老化もまたこれらのひとつであると考えられる。我々はDOX添加により培養心筋細胞には加齢による心筋細胞の変化と同様の現象が誘導されることを見いだした。早期老化に関する研究について他の分野に目を向けると、癌研究の分野では早期老化の誘導が抗癌治療の新しい標的として注目されている。循環器分野では血管構成細胞の早期老化が動脈硬化の進展に関与していることが知られており、新しい抗動脈硬化治療の標的として期待されている。しかし、心筋細胞に関する研究はこれらに比べると立ち遅れている。増殖細胞の早期老化の機序のひとつとして、今までに酸化ストレスによる抑制的な細胞周期制御因子の活性化を介した不可逆的な細胞周期の停止が示されている。今回我々は加齢やDOX刺激により心筋細胞においてPML蛋白の増加とp53のアセチル化促進が起こることを見いだした。この結果は心筋細胞における早期老化の機序を解明する上で一つの鍵になりうると考える。

E. 結論

本研究の結果より、心筋細胞にも早期老化が誘導され、心筋障害の一因となっている可能性が示唆された。心筋の早期老化現象は心不全の機序のうち今まで不明であった部分を補完するもののひとつと考えられ、その制御因子を解明することにより従来の知見では説明不能であった心不全の原因の解明、ひいては新規の治療法の開発につながるものと考えられる。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

- Suzuki J, Ogawa M, Maejima Y, Isobe K, Tanaka H, Sagesaka YM, Isobe M: Tea catechins attenuate chronic ventricular remodeling after myocardial ischemia in rats. *J Mol Cell Cardiol* 42: 432-440, 2007.
- Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Kosuge H, Sagesaka YM, Isobe M: Tea catechins improve left ventricular dysfunction, suppress myocardial inflammation, fibrosis, and alter cytokine expression in rat autoimmune myocarditis. *Eur J Heart Fail* 9: 152-159, 2007.
- Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Muto S, Itai A, Isobe M: Inhibition of NF- κ B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol* 292: H530-538, 2007.
- Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Nitta N, Asahara T, Isobe M: Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cells dependent and independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 512-8, 2007.
- Kato T, Inoue T, Inagaki H, Hashimoto S, Hikichi Y, Tanaka A, Isobe M, Node K: Remnant-like lipoprotein particle level and insulin resistance are associated with in-stent restenosis in patients with stable angina. *Coron Art Dis* 18: 319-322, 2007.
- Suzuki J, Koga N, Kosuge H, Ogawa M, Haraguchi G, Maejima Y, Saiki H, Isobe M: Pitavastatin suppresses acute and chronic rejection in murine cardiac allografts. *Transplantation* 83(8):1093-7, 2007.
- Horikawa-Tanami T, Hirao K, Furukawa T, Isobe M: Mechanism of conversion of a pulmonary vein tachycardia to atrial fibrillation in normal canine hearts: Role of autonomic nerve stimulation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 1-8, 2007.
- Ebana Y, Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Lwin H, Saito S, Mizuno H, Takahashi A, Nakamura T, Miyamoto Y, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Kamatani N, Hori M, Isobe M, Nakamura Y, Tanaka T: A functional SNP in *ITIH3* is associated with susceptibility to myocardial infarction. *J Human Genetics* 52: 220-229, 2007.
- Isobe K, Maejima Y, Isobe M: Endostatin attenuates postinfarction ventricular remodeling by inhibiting matrix metalloproteinase activity. *J Mol Cell Cardiol* 42: S151, 2007.
- Okada H, Suzuki J, Futamatsu H, Maejima Y, Hirao K, Isobe M: Attenuation of autoimmune myocarditis in rats by mesenchymal stem cell transplantation through enhanced expression of

hepatocyte growth factor. *Int Heart J* 48: 649-661, 2007.

- Nakamura H, Kurokawa J, Bai CX, Asada K, Vaknin R, Xu J, Clancy CE, Isobe M, Furukawa T: Non-genomic regulation of cardiac repolarization by progesterone: Protective mechanism against long QT-related arrhythmias. *Circulation*, in press.

- Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M: Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell*, in press.

2) 学会発表

- Isobe K, Maejima Y, Isobe M: Endogenous endostatin attenuates postinfarction ventricular remodeling by inhibiting matrix metalloproteinase activity. 第19回国際心臓研究学会世界総会 (2007年6月).

- Maejima Y, Adachi S, Ito H, Isobe M: Combined treatment of HMG-CoA reductase inhibitor and angiotensin receptor blocker synergistically inhibits heart failure in dahl-salt sensitive rats. 第11回日本心不全学会学術集会 (2007年9月)

- Komura M, Adachi S, Takahashi A, Otomo K, Nitta J, Obayashi T, Sato Y, Suzuki J, Hirao

K, Isobe M: Prognosis of 25 Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) in the ICD era. 第11回日本心不全学会学術集会 (2007年9月)

- Okada H, Suzuki J, Maejima Y, Onai Y, Hirao K, Isobe M: Telmisartan improves left ventricular remodeling after myocardial infarction through peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ activation. 第11回日本心不全学会学術集会 (2007年9月).

- Suzuki J, Isobe M: Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 receptor 4 activation in murine cardiac transplantation. 第11回日本心不全学会学術集会 (2007年9月)

- Suzuki J, Isobe M: Meloxicam suppresses acute autoimmune myocarditis in rats. 第11回日本心不全学会学術集会 (2007年9月).

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

(参考文献)

1. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M: Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell* 2007 Nov 21; [Epub ahead of print].

特発性心筋症に関する調査研究

—心不全に対するG-CSF治療の作用機序の解明と臨床応用—

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

我々はこれまで動物を用いた基礎研究により顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)が急性心筋梗塞後の心臓リモデリングや心不全を抑制することを明らかにしてきた。マウス、ウサギ、ブタを用いた急性心筋梗塞モデル、虚血再灌流モデル、慢性虚血モデルにおいてG-CSFは発症後より投与した場合でも有意な心臓保護効果を示す。他の研究グループからはG-CSFにより心筋細胞や血管細胞が再生される結果が報告がされたが、我々は心筋細胞にG-CSF受容体が存在しG-CSFは直接、心筋細胞に作用して様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化し細胞保護的に作用することを報告した。また、G-CSFは血管傷害モデルに対して再内皮化を促進することにより新生内膜の増殖を抑制した。

G-CSFが幹細胞や前駆細胞の動員作用以外に心臓に対する直接作用をもつことを明らかにするために、生体から取り出したラットの心臓をランゲンドルフ装置を用いて灌流し虚血再灌流モデルを作製し、G-CSFの急性効果とその機序を検討した。また、急性心筋梗塞後の症例を対象に臨床研究をおこなった。

B. 研究方法

1)ランゲンドルフ装置を用いてラット心臓を灌流し、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。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。

2)2003年より急性心筋梗塞後の心臓リモデリングと心機能低下に対するG-CSFの効果を検討する臨床研究を開始した(G-CSF treatment for left ventricular dysfunction after AMI; GLEAM trial)。発症12時間以内に入院しインターベンション治療(ステント留置術)によりTIMI flow grade 3の再灌流が認められた急性心筋梗塞の40症例(男女)を対象とした。画像検査による評価がより明確にできるよう左前下行枝(LAD)1枝の完全閉塞による急性心筋梗塞で他に有意狭窄病変を有さない症例とした。その後の血行動態が安定しておりインフォームドコンセントが得られた症例を最小化法による無作為割付により、2群(G-CSF群とコントロール群)に分けた。薬剤の投与は単盲検法により実施した。登録症例は発症24時間以内に1回目のG-CSFか同量の生理食塩水を皮下注射した。G-CSFの1回の投与量は2.5 mg/kg(急性心筋梗塞後に用いても白血球数が40000を超えない量をシミュレーションし投与量を設定)とした。1日1回で計5日間連続投与した。発症4日後と6ヵ月後にSPECT(QGS)により心機能(LVEF)、サイズ(LVESV, LVEDV)、虚血領域(defect score)を評価した。また、6ヵ月後にも冠動脈造影検査(QCA)を施行した。

C. 研究結果

1)G-CSF(10, 50, 300 ng/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