

した梗塞サイズは有意に縮小した。G-CSF投与群では、再灌流15分後の心臓におけるJak2、STAT3、ERK、Akt、eNOSのリン酸化と30分後のNO産生量が有意に増加した。G-CSFによる梗塞サイズの縮小効果はLY294002、AG490、L-NAMEにより抑制されたが、PD98059では抑制されなかった。各阻害薬を用いた実験の結果、G-CSFによりJak2>PI3K>Akt>eNOSの順で活性化されるシグナルが心臓保護作用に関与していた。

2) 6ヵ月後のLVEFはG-CSF群においてのみ有意な改善効果が認められた。LVESVはG-CSF群においてのみ縮小傾向が認められた。LAD領域のdefect scoreはG-CSF群においてのみ有意な減少が認められた。6ヵ月後の再狭窄率は両群で有意な差はなかった。

#### D. 考察

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

臨床研究の結果では、まだ少数例での検討ではあるがG-CSFはインターベンション治療後の再狭窄を増加させることなく心機能の低下や心臓リモデリングを軽減した。今後はG-CSFの開始時間、投与量、投与期間、投与方法や評価方法、評価時期について、より適切なプロトコールによるランダム化大規模臨床試験による検証が必要である。

#### E. 結論

急性心筋梗塞後の心臓リモデリングや心不全に対するG-CSFの抑制効果が示唆された。

#### F. 研究危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

・Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y, Nakayama

T, Matsuno K, Miyazaki Y, Yamamoto M, Fujimoto Y, Okada H, Okubo S, Fujita M, Shindo S, Kobayashi Y, Komiyama N, Takekoshi N, Imai K, Himi T, Ishibashi I, Komuro I: Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 122: 41-7, 2007.

・Takano H, Ueda K, Hasegawa H, Komuro I: G-CSF therapy for acute myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci.* 28: 512-7, 2007.

・Takano H, Komuro I: Cytokines and heart remodeling. In: *Cardiovascular Regeneration and Stem Cell Therapy*, ed Leri A, Anversa P, Frishman WH, Malden, MA: Blackwell Publishing, Inc., 139-147, 2007.

##### 2) 学会発表

・Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Komuro I: Erythropoietin prevents cardiac remodeling after myocardial infarction through erythropoietin receptor-induced signaling pathways in cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions (Nov. 4-7, 2007/ Florida, USA).

・Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Komuro I: Erythropoietin prevents cardiac remodeling after myocardial infarction through erythropoietin receptor-induced signaling pathways in cardiomyocytes. The 24rd Annual Meeting of ISHR Japanese Section (June 21, 2007/ Ferrara, Italy)

・高野博之, 小室一成: Feasibility and safety of G-CSF treatment for left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction (GLEAM): A randomized controlled trial. 第71回日本循環器学会総会シンポジウム(2007年3月15-17日/神戸).

・高野博之, 小室一成: G-CSF therapy for left ventricular remodeling and heart failure. 第11回日本心不全学会学術集会シンポジウム(2007年9月9-10日/千葉).

・高野博之, 小室一成: 造血性サイトカインによる急性心筋梗塞の新たな再生医療. 第55回日本心臓病学会学術集会シンポジウム(2007年9月10-12日/千葉).

#### H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

#### <研究協力者>

高野博之・上田和孝・長谷川 洋

## 特発性心筋症に関する調査研究

—血清テネイシンCの臨床的意義について：新しい霊長類拡張型心筋症モデルの解析を中心に—  
研究協力者： 廣江 道昭(国立国際医療センター循環器科・第一専門外来部長)

＜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

心拡張は心血管リモデリングという概念で、組織の修復過程の異常や過剰と捉えられ、細胞外マトリックス(Extracellular Matrix, ECM)分子やその分解酵素であるマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)などが関与する分子機構が最近注目を浴びている。我々はこれまで、ECMに属するテネイシンCが種々の心疾患、たとえば心筋炎、心筋梗塞で発現し、心筋細胞と間質の接着を緩めたり、壊死組織の肉芽形成に重要な細胞である筋線維芽細胞の動員を促進していることを見出した。ELISA法によるテネイシンC測定系を開発し、急性心筋梗塞後の患者において血清テネイシンCは、左室リモデリングの発症を予測し得るバイオマーカーであり、心事故などの予後推定にも有用であることを報告した(JACC 47:2319-2325, 2006)。拡張型心筋症の病態把握や重症度判定(Circ J 71:327-330, 2007)、さらに予後の予測にも有用であることも確認した(論文投稿中)。

拡張型心筋症の病態解明、新規診断・治療法開発研究推進のためにはモデル動物が有用であることは言うまでもない。我々はテネイシンCをバイオマーカーとした拡張型心筋症の病態診断のシミュレーションをおこなうと同時にその分子基盤を解明目的として、ヒトに最も近縁な霊長類の大規模繁殖コロニーより拡張型心筋症モデルを用いてテネイシンCの動態解析おこなった。

### B. 研究方法

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センターで飼育している20才以上の高齢群(猿の寿命は約30歳)をふくむ1500頭規模のカニクイザル繁殖コロニーに心機能スクリーニングを行い、拡張型心筋症を疑う個体10頭を抽出した。心エコー図、心電

図、胸部レントゲン、血圧検査、MRI検査、ANPおよびBNP測定を行い、正常個体と比較した。剖検心筋組織の病理学的解析も行い、抗テネイシンC抗体による免疫染色を行い、テネイシンCの存在部位と病変との関連を解析した。

### C. 研究結果

10頭に心陰影の拡大、心室のびまん性拡張、FS、EFの低下、ANP、BNPの優位な上昇が認められた。10頭中5頭は心不全症状を示し、血縁関係にあることが確認された。重症心不全で死亡した2頭および、犠牲剖検した一部個体の心筋組織には、種々の程度および病期の心筋細胞の変性、脱落、間質に広範な線維化、活動性病巣周囲にテネイシンCの沈着などヒトの拡張型心筋症にきわめて類似した所見が見られた。

### D. 考察

今回の解析によってヒトに近縁なカニクイザル繁殖コロニーにおいて心不全症状を呈する拡張型心筋症が存在することを明らかにした。心エコー図、MRI、心電図、レントゲン検査、ANP、BNP測定により本疾患がヒト病態を反映する事が明らかとなった。さらに病理学的検索では種々の程度および病期の心筋細胞の変性、脱落、間質の広範な線維化、活動性病巣周囲にテネイシンCの沈着などヒトの拡張型心筋症に類似した所見が得られた。今後、本疾患の経時的保存血清などを用いて血中テネイシンCの測定とテネイシンCを利用したin vivoイメージングなども検討する。さらに本疾患には家系集積性も確認されているため、ヒトで報告のあるMutation解析やプロテオーム解析にも着手する予定である。

## E. 結論

ヒト病態を反映するカニクイザル拡張型心筋症家系の存在が明らかとなった。本モデルは心臓病態学ならびに拡張型心筋症の新規診断・治療法開発研究に多くの知見を与えるものと思われる。今後、テネイシンCを新しい炎症・リモデリングのバイオマーカーとして、カニクイザル拡張型心筋症の病期診断・炎症活性度、および治療効果判定の応用に期待できる。

## F. 研究危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- ・ Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, Hiroe M, and Imanaka-Yoshida K. Eplerenone Attenuates Myocardial Fibrosis in the Angiotensin II Induced Hypertensive Mouse: Involvement of Tenascin-C Induced by Aldosterone-Mediated Inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 49:261-268, 2007
- ・ 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* 71:327-330. 2007
- ・ Nishikubo, K, Imanaka-Yoshida K, Tamaki S, Hiroe M, Yoshida T, Adachi Y, Yasutomi Y. Th1-type immune responses by Toll-like receptor 4 signaling are required for the development of myocarditis in mice with BCG-induced myocarditis. *J Autoimmun* 29:146-153. 2007
- ・ 岡崎 修, 廣江道昭. 特発性心室細動に対するβ遮断薬と併用療法としてのソタロール治療. *Progress in Medicine* 26: 3398-3402, 2006
- ・ 檜田光夫, 田中由利子, 渡邊剛毅, 岡崎 修,

廣江道昭, 木村昭夫, 中村 茂, 円城寺由久, 小林智子, 上林大輔, 船津篤史, 横内 到, 溝渕正寛, 柴田兼作, 三木真司, 溝口 哲, 河野裕, 加藤雅史, 大野美紀子, 水谷 智, 坂本久. 特徴的な3種の心筋マーカー(ミオグロビン、CK-MB、心筋トロポニンI)の同時測定による急性心筋梗塞の早期診断の有用性. *心臓* 39: 520-527, 2007

- ・ 廣江道昭, 今中一吉田恭子, 吉田利通. 心筋間質の線維化 テネイシンC 心不全(上). *日本臨床(増刊号)* 65(Suppl 4): 206-213, 2007
- ・ 廣江道昭, 佐藤 明. 心臓カテーテル所見/造影所見. 心筋症, メディカルレビュー社, p52-55, 2007
- ・ 廣江道昭. 肥大型心筋症の臨床所見. 肥大型心筋症ハンドブック, 日本医事新報社, 東京, p97-107, 2007
- ・ 廣江道昭. 無症候性肥大型心筋症の管理; 10 心筋症を識る・診る・治す. 心・心臓病診療プラクテス, 文光堂, 東京, p154-155, 2007
- ・ 廣江道昭, 岡崎 修, 佐藤 明. 核医学検査で心不全を診る ビジュアルでわかる心不全の診断と治療. *CIRCULATION Up-to-Date* 2: 30-42, 2007

### 2) 学会発表

- ・ Fumio Terasaki, Michiaki Hiroe, Kyoko Imanaka-Yoshida, Bin Tsukada, Kaoru Otsuka, Takashi Katashima, Shuichi Fujita, Hiroaki Shimomura, Toshimichi Yoshida, Yasushi Kitaura. Enhanced Expression of Tenascin-C in Granulomas of Patients With Active Cardiac Sarcoidosis. *AHA2007* (November 4-7, 2007/Orland, USA/)

## H. 知的財産権出願・登録状況

なし。

## <研究許力者>

揚山直英・保富康宏

(医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター)

今中一吉田恭子・吉田利通

(三重大学大学院医学系研究科修復再生病理)

## 肥大型心筋症に見出されたオブスキュリン変異の解析

研究協力者 木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

**研究要旨** 家族性肥大型心筋症は常染色体性優性遺伝性疾患であり、これまでに種々の原因遺伝子が報告されているが、それらの原因遺伝子に変異が見出される症例は約半数に過ぎず、さらに別の原因遺伝子が存在すると考えられる。そこで本研究では、候補遺伝子アプローチとしてオブスキュリンに着目した。オブスキュリンはカルモジュリン結合タンパクであり、カルモジュリンを心筋Z-I帯にリクルートする機能があるとされていることから、遺伝子解析を行った結果、これまでに病因変異が同定されていなかった家族性肥大型心筋症症例に、互いに連鎖する Arg4344Glu と Ala4484Thr が見出された。これらの変異は進化学的に保存されたアミノ酸の置換であり、健常者集団には認められないため病因変異の可能性があるが、3D構造モデル解析を行ったところ、Arg4344Gln 変異は表面構造を大きく変化させることが示唆された。ついで2ハイブリッド法および pull-down 法を用いて検討したところ、Arg4344Gln はタイチン Z9/Z10 ドメインへの結合性を減少させることが判明した。一方、Ala4484Thr 変異はタイチン結合性には影響しなかった。さらに、myc-tag を付加したコンストラクトをラット心筋細胞に導入した解析の結果、Arg4344Gln 変異は心筋Z-I領域へのオブスキュリン分布を減少させた。以上のことから、オブスキュリン変異は肥大型心筋症の新たな原因となることが強く示唆された。

### A. 研究目的

これまでの研究で特発性心筋症、特に肥大型心筋症 (HCM) や拡張型心筋症 (DCM) では、心筋サルコメアないしZ帯構成要素の遺伝子異常が病因となることが明らかになっている。しかしながら、これまでに HCM では 15 種、DCM では 20 種を超える原因遺伝子が同定されているにも関わらず、それらの原因遺伝子に病因変異が見出される症例は家族性 HCM では約半数、家族性 DCM では約 15% に過ぎないため、さらに別の原因遺伝子が存在すると考えられる。そこで本研究では、HCM における新たな病因変異を同定することを目的として、カルモジュリン結合タンパクであり、Z-I帯に局在する機能不明のオブスキュリンに着目した候補遺伝子アプローチを行った。その結果、病因と考えられる変異が見出されたため、その機能変化を検討した。

### B. 研究方法

1) HCM 症例 144 名 (うち 96 名は家族性 HCM) を対象としてオブスキュリン遺伝子のタイチン結合ドメイン (exon 50-53) およびカルモジュリン結合ドメイン (exon 54-56) をダイレクトシーケンシングした。ラジン変異を検索した。また、ランダムに選択した健常者集団 288 名を対照とした。

2) オブスキュリン変異が見出された HCM 症例の父親 (非罹患者) について変異の有無を検索した。

なお、本症例の母親は罹患者であるが、血液サンプルが得られなかった。

3) 3-D 立体構造モデルは、タイチン構造をモデルとして SWISS-MODEL プログラムを用いて構築し、Pymol で描画した。

4) オブスキュリンはタイチン Z9/Z10 領域および novex-3 領域に結合することが報告されているため、動物細胞2ハイブリッド法ならびに pull-down 法を用いて、変異による結合性変化を検討した。すなわち、変異なし (WT)、Arg4344Gln (R4344Q) 変異単独、Ala4484Thr (A4484T) 変異単独、R4344Q+A4484T 両者を同時に含むそれぞれのオブスキュリンコンストラクト (タイチン結合ドメイン; Ig48/49、aa4334-4521) とタイチンの Z9/Z10 ドメイン (aa1657-1885) あるいは novex-3 ドメイン (aa4990-5187) との結合性を検討した。なお、タイチンは VP16、オブスキュリンは GAL4 との融合タンパクとした。

5) 上記オブスキュリンコンストラクトで GAL4 の代わりに mic-tag を付加し、これを新生児ラット培養心筋細胞に導入した後に、マウス anti- $\alpha$  アクチニン抗体あるいはウサギ anti-myc 抗体で染色し、これに Alexa fluor 568 anti-mouse IgG あるいは FITC-conjugated anti-rabbit IgG を作用させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 【倫理面への配慮】

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

## C. 研究結果

### 1) HCM 患者におけるオブスキュリン変異の検索

HCM 患者 144 名についてオブスキュリン変異を検索したところ、図1に示すような多数の変異が見出された。しかしながらそのほとんどは健常者コントロールにも観察される多型 (polymorphism) であった。Arg4381Cys (R4381C) 変異は家族性 HCM 患者に見出され、健常者コントロール 288 名には観察されなかったが、当該 HCM 家系内で疾患と共分離しなかったため、稀な多型であると結論した。

一方、家族性 HCM 患者1名に見出された R4344Q 変異および A4484T 変異は、健常コントロールにはなく、当該患者の父親 (非罹患) にも認められないため、患者である母親から遺伝したものと考えられた。なお、クローニングして解析した結果、これら2変異は同一染色体上に存在する (cis) ことが確認された。

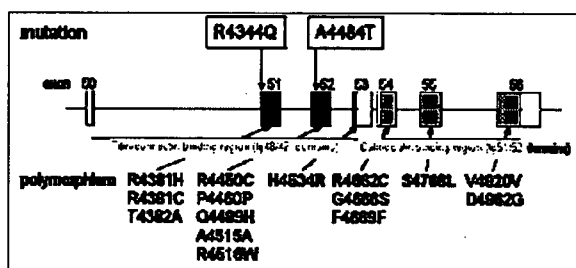


図1. HCM 患者に見出されたオブスキュリン変異

また、種々の種におけるオブスキュリン配列を比較したところ、図2に示す通り、R4344、A4484 はいずれも進化上よく保存されるアミノ酸であった。

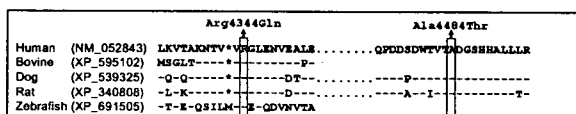


図2. オブスキュリン配列の進化的比較

ついでタイチン構造を基本モデルとしてオブスキュリンの 3-D 立体構造モデルを構築したところ、図3に示す通り、R4344Q は表面構造を変化させることが示唆された。一方、A4844T は表面構造には大きな変化をもたらさないと推定された。

以上のことから、R4344Q、または R4344Q と A4484T の両者が本症例の病因変異であることが示唆された。

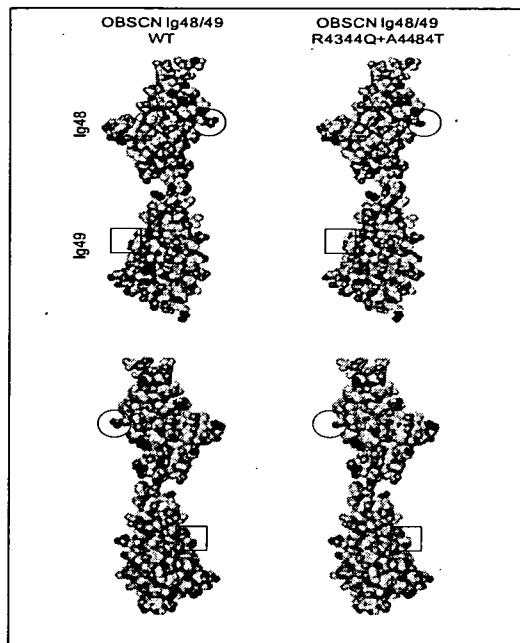


図3. オブスキュリン Ig48/49ドメインの 3D モデル

2) R4344Q および A4484T 変異による機能変化 (タイチン Z9/Z10 ドメインあるいは novex-3 ドメインへの結合性) を検討するために、動物細胞2ハイブリッド系を用いたアッセイを行った。その結果、図4に示す通り、R4344Q 変異はタイチン Z9/Z10 ドメインへの結合性を減弱するが、novex-3 ドメインへの結合性にはいずれの変異も影響を与えなかった。なお、オブスキュリンとの結合性は Z9/Z10 ドメインの方が novex-3 ドメインより強いことが示唆された。

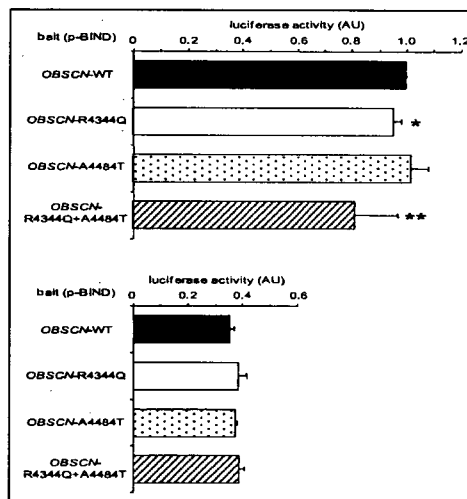


図4. 2ハイブリッド法による結合性変化の検討

2ハイブリッド法による結合性測定は定性的なものであるため、より定量的なアッセイとして、pull-down 法を行った。その結果、2ハイブリッド法と同様に、R4344Q はタイチン結合性を減弱させることが明らかとなった。図5に示す通り、R4344Q 単独でも約 60%の結合減少、R4344Q+A4484T 両者では約 75%の結合減少をもたらした。

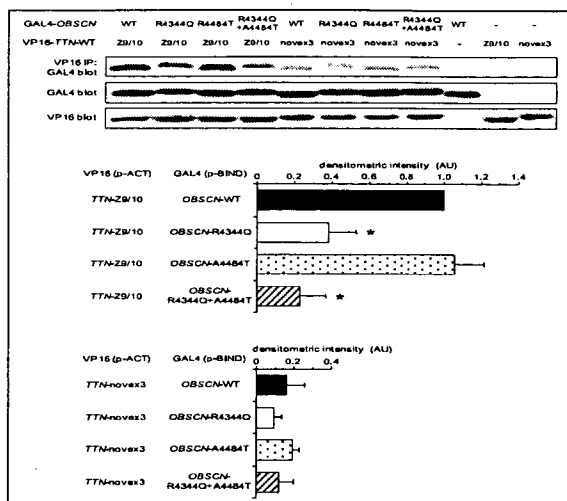


図5. Pull-down 法によるタイチン結合性の検討

3) 上記の検討から、オブスキュリン変異はタイチン結合性が減弱することが示された。そこで、ラット心筋細胞を用いて、オブスキュリン変異が存在する場合に、心筋Z-I領域への局在が減少するか否かを検討したところ、図6に示す通り、R4344Q 変異はオブスキュリン (myc-tag) のZ-I領域への局在を明らかに減少させた。

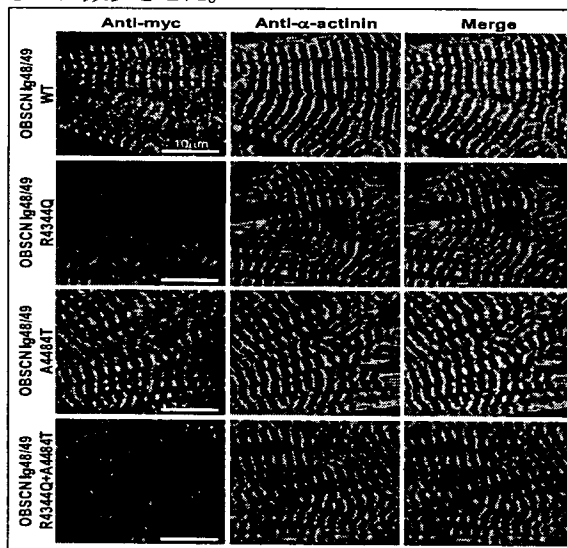


図6. 変異によるオブスキュリン局在変化

#### D. 考察

本研究で HCM 患者に見出されたオブスキュリン変異がタイチン結合性とZ-I帯へのオブスキュリン局在を減少させることが判明した。オブスキュリンはカルモジュリンを心筋Z-I帯にリクルートする機能を有するとされているが、本研究で明らかになった機能異常から、本症例ではカルモジュリンが心筋Z-I帯に適切に局在しないことが示唆される。そのような異常がいかなるメカニズムで心肥大をもたらすかは明らかではなく、今後の研究課題である。

#### E. 結論

オブスキュリン変異は肥大型心筋症の新たな原

因遺伝子であることが示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Arimura T, Hayashi T, Matsumoto Y, Shibata H, Hiroi S, Nakamura T, Inagaki N, Hinohara K, Takahashi M, Itoh-Satoh M, Bonne G, Schwartz K, Kimura A: Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357(1): 162-167.

2) Knöll R, Postel R, Wang J, Kraetzner R, Henneke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK, Dieter K, Gudrun K, Schaefer K, Hayashi T, Holm T, Kimura A, Schork N, Toliat MR, Nuernberg P, Schultheiss P, Schaper W, Schaper J, Bos E, Hertog JD, van Eeden F, Peters P, Hasenfuss G, Chien KR, Bakkens J: Laminin alpha 4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and in endothelial cells. *Circulation* 2007; 116(5):515-525.

3) Arimura T, Matsumoto Y, Okazaki O, Hayashi T, Takahashi M, Inagaki N, Hinohara K, Ashizawa N, Yano K, Kimura A: Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(2): 281-287.

4) Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Leibbrabdt A, Makovic M, Schwaighofer J, Beetz N, Musialek R, Neely GG, Komnenovic V, Kolm U, Metzler B, Ricci R, Hara H, Meixner A, Nghiem M, Chen X, Dawood F, Wong KM, Sarao R, Cukerman E, Kimura A, Hein L, Thalhammer J, Liu PP, Penninger JM: Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 2007; 101(4): e32-e42.

5) Nakano N, Hori H, Abe M, Shibata H, Arimura T, Sasaoka T, Sawabe M, Chida K, Arai T, Nakahara K, Kubo T, Sugimoto K, Katsuya T, Ogihara T, Doi Y, Izumi T, Kimura A: Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Card Physiol* 2007; Oct 5; [Epub ahead of print]

6) Shichi D, Matsuzawa Y, Ota M, Katsuyama Y, Matsumori A, Takahashi M, Naruse TK, Inoko H, Kimura A: HLA-DP beta chain may confer the susceptibility to hepatitis C virus-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Immunogenet*, in Press

##### 2. 学会発表

1) 木村彰方: 難治性循環器疾患の病因と病態形成機構の解明に向けて. 日本組織適合性学会第16回大会、京都、2007年9月。

G. 知的所有権の出願・登録状況  
該当なし

## 特発性心筋症に関する調査研究

—細胞シート工学を用いて作製した3次元組織の物質透過性の解析—

研究協力者： 岡野 光夫(東京女子医科大学先端生命医科学研究所教授)

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

## A. 研究目的

細胞シート工学は、細胞シートを直接積層化することで、細胞密度の高い3次元組織の構築を可能にする。しかし、再構築できる組織の厚みには限界がある。実際、4層以上に細胞シートを積層すると、細胞生存率の急激な低下が認められる。この原因は、再構築した3次元組織内での栄養素・酸素の供給不足が原因の一つと考えられる。しかし、細胞が密に存在する組織における栄養素・物質の供給状態を、実際に調べることは困難であり、その詳細についてはこれまで不明であった。そこで今回、新たに3次元組織の物質透過性を検出できるデバイスを作製し、積層化細胞シートにおける栄養素を含む様々な分子量の物質の透過性について調べ、そのことにより細胞が密に存在する組織内の物質の供給状態を明かにすることを目的に実験を行った。

## B. 研究方法

1)細胞：ヒト間葉系幹細胞(hMSC)

2)細胞シートの調製：hMSCを温度応答性培養皿に播種し、4日間37℃で培養後、培養皿を20℃で低温処理することによりシート状に細胞を脱着させ、細胞シートを作製した。それらの細胞シートをセルカルチャーインサート上に再播種し、さらに細胞シートを積層化し、以下の実験に用いた。

3)細胞シートの組織学的観察：セルカルチャーインサート上で24時間培養した細胞シートを、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片を作製した。それらの切片を、ヘマトキシリン・エオシン染色により観察し、細胞シートの厚さを光学顕微鏡で組織学的に観察した。

4)細胞シートの物質透過性の解析：セルカルチャーインサート上に細胞シートを積層し、上層

側に通常の培地あるいは透過性を調べる物質(クレアチニン、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、トランスフェリン)を添加した培地を、下層側にグルコースおよびビルビン酸欠損の培地あるいは添加物質を含まない培地を入れ培養した。そして24時間後に上下別々に培地を回収し、培地量、グルコース、ビルビン酸あるいは添加物質の濃度を測定することにより、それらの物質の3次元組織透過性を調べた。

## C. 研究結果

1)積層化細胞シートの組織学的観察：1層、2層、3層、4層、5層の細胞シートの厚さは、それぞれ、約20、45、65、90、130 $\mu$ mであった。

2)積層化細胞シートの低分子物質の透過性の解析：hMSCシートを介して透過するビルビン酸(分子量：88)、クレアチニン(分子量：131)、グルコース(分子量：180)量を調べた。グルコース、ビルビン酸の上層から下層への拡散は、1層の細胞シートにより60-70%程度阻害された。そして、その阻害効果は積層する細胞シートの枚数の増加に比例して増加し、4層以上の積層化細胞シートではグルコースおよびビルビン酸の透過はほとんど認められなかった。クレアチニンの拡散は、1層のhMSCシートにより50%程度阻害された。そして5層の積層化細胞シートを用いた場合でも、クレアチニンは、それぞれ20%程度透過した。hMSCシートによるグルコース、ビルビン酸の消費量は積層枚数に伴い増加したが、4層以上ではそれ以上の増加は認められなかった。4層以上の細胞シートで、グルコース消費量は40%程度、ビルビン酸消費量は70%程度であった。

3)積層化細胞シートの高分子物質の透過性の解析： $\beta$ 2-ミクログロブリン(分子量：11,800)の拡

散は、1層のhMSCシートにより75%程度阻害された。そしてさらに高分子量のトランスフェリン(分子量：78,000)では、1層のhMSCシートで、その拡散は90%程度阻害された。そして2層の積層化細胞シートにより、 $\beta$ 2-ミクログロブリンおよびトランスフェリンの拡散はほぼ完全に阻害された。一方、hMSCシートにより $\beta$ 2-ミクログロブリン、トランスフェリンともにほとんど消費されなかった。

#### D. 考察および結論

今回、細胞シート工学を用い作製した3次元組織における様々な物質の透過性を調べた。グルコースやビルビン酸の栄養素の拡散限界は90-100 $\mu$ m程度であることが確認された。これらの結果は、細胞が密に存在する厚い組織内では極端な栄養不足の状態であることを示しており、我々が以前に明らかにした4層以上の細胞シートにおける急激な細胞生存率の低下とよく一致している。一方、細胞シートに消費されないクレアチニンの場合、5層の積層化細胞シートを用いた場合でも、20%程度の物質移動が認められた。同程度の分子量でもグルコース、ビルビン酸では、4層以上の細胞シート

を介してほとんど移動が認められなかったことの違いは、それらの物質を細胞シートが消費したことにより説明できる。さらに、1万以上の高分子物質の場合、2層以上の細胞シートでも、ほとんど移動が認められなかったことから、サイトカイン・増殖因子等は比較的薄い組織でも供給不足の状態であることが考えられる。今後、このアッセイ法を用い、厚い3次元組織への栄養素の供給状態を改善させる培養方法(例えば血管様構造を付与することなど)を開発していきたいと考えている。

#### E. 研究危険情報

なし。

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### <研究協力者>

清水達也・原口裕次・関根秀一

## 特発性心筋症に関する調査研究

—心臓交感神経の幼若化～神経機能と心肥大の関連—

研究協力者： 福田 恵一(慶應義塾大学医学部再生医学教室教授)

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

### A. 研究目的

神経細胞機能と神経支配密度は被支配臓器から分泌される神経栄養因子によって制御されている。肥大型心ではエンドセリン-1やアンジオテンシンIIおよび白血病抑制因子などの様々な成長因子の発現が亢進するが、神経成長因子(NGF)の発現変化や心臓交感神経に及ぼす効果に関してはほとんど知られていない。この研究は、圧負荷心肥大モデルにおける心臓交感神経の支配密度とノルエピネフリン(NE)合成や再摂取などの神経細胞機能、および神経関連遺伝子の発現変化を解析することを目的とした。

### B. 研究方法(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学医学部動物実験委員会のガイドラインに準拠し、これを遵守した。

#### 1)モデル動物作成

5週齢の雄ウィスターラットに60mg/kgのモノクロタリン(MCT)を皮下注射し、肺高血圧モデルを作成し、大動脈圧、左右心室圧を測定した。安楽死後、心臓を摘出し重量測定を行った。新生児ラットについても同様に心臓摘出を行った。

#### 2)RNA抽出とpoly(A)<sup>+</sup>RNA Northern blot

凍結心臓組織サンプルからpoly(A)<sup>+</sup>RNAを分離した。Random priming法によりhybridizationを行った。

#### 3)ELISA

ELISAキット(Promega)を用いて、NGF蛋白量の測定を行った。

#### 4)免疫組織化学

パラホルムアルデヒドを用いて心臓組織を固定し、凍結切片を作成した。各種一次抗体、二次抗体を用いた。サンプルは、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

染色の一部は、DABを用いて染色を行った。免疫染色領域は、NIH imageを用いて定量化した。

#### 5)電子顕微鏡

心臓サンプルを固定し、包埋後二重染色し、電子顕微鏡で観察した。

#### 6)組織ノルエピネフリン(NE)およびドパミン(DA)含量

心臓組織サンプルをHPLC法で測定した。

#### 7)[<sup>125</sup>I]-Metaiodobenzylguanidine(MIBG)集積

[<sup>125</sup>I]-MIBGを注射後3時間でサンプルをガンマカウンターで計測し、一部はオートラジオグラフィを行った。

#### 8)Uptake 1機能解析

uptake 1の阻害剤であるデシプラミンを1時間前に投与した群と投与しない群に分け、[<sup>3</sup>H]-NE注射後15分で各組織を液体シンチレーションカウンターで測定した。デシプラミン投与群と非投与群における集積の差を群間で比較した。

#### 9)Western blot

心臓組織よりタンパク質の抽出を行い、THおよびPSA-NCAMに対する一次抗体、二次抗体の信号を、SuperSignal West Pico(PIERCE)で視覚化した。

#### 10)統計分析

全ての値は平均値±標準誤差で表示した。2群間の統計学的有意差は、Student's t-testで行った。3群間以上の多比較の検定にはANOVAを用いた。p<0.05を統計学的に有意とした。

### C. 研究結果

MCT投与30日後の心臓は、右室自由壁が著明に肥厚し、右室内腔の拡大を認めた。右室収縮期圧は59±4mmHgに達したが、左室内圧に有意差はみられなかった。また、右室重量と体重の比率は、

MCT群で1.6倍に増加した。左室重量と体重比に有意差は認めなかった。血中NE濃度は肺高血圧の進行で変化は観られなかった。

右室肥大の進行に伴い右室ではET-1およびBNPの発現増加に伴い、NGF mRNAの発現亢進が観察された。左室においては、BNPの発現亢進が観られたが、右室の発現レベルよりはるかに少なく、ET-1およびNGF mRNAの発現はほとんど認められなかった。ELISAによる肥大右室NGF蛋白の発現量も、4.8倍に増加した。

神経軸索マーカーである $\beta 3$ チューブリンと神経終末が成長する際に成長円錐で発現する蛋白であるGAP43の抗体を用いて免疫染色を行った。肥大右室では、神経線維の著明な増加を認めた。左室において変化は観られなかった。これらの所見から肥大右室では、NGFの発現亢進に伴い神経密度の増加を来すことがわかった。

NGFは、末梢神経において交感神経と神経堤由来の知覚神経に対する栄養作用を有することが知られている。連続切片においてGAP43とTHおよびGAP43とCGRP(知覚神経マーカー)の共免疫染色を行い、TH/GAP43とCGRP/GAP43の比率を検討した。TH/GAP43は82%を占め、CGRP/GAP43よりも有意に割合が高かった。さらに、電子顕微鏡で肥大右室において増加した神経線維を観察したところ、単一のシュワン細胞で囲まれた腫脹した軸索を複数有する交感神経終末を認め、神経芽芽を観察しているものと考えられた。

解剖学的に増加した右心室の交感神経の細胞機能を検討するため、NEと前駆体であるドパミン(DA)の組織中の含量を測定した。神経密度の増加した肥大右室ではNEが34%、DAが42%低下した。左室では変化が観られなかった。この原因として、交感神経終末からのNEの過剰分泌か、NE再摂取障害か、あるいはNE産生障害などが考えられた。肥大右室では $[^{125}\text{I}]$ -MIBG投与3時間後のオートラジオグラフィーで明らかな集積低下が観られた。 $[^{125}\text{I}]$ -MIBG投与3時間後の肥大右室内の低集積は、NEの再摂取障害と過剰分泌の両方を反映していると考えられたため、 $[^3\text{H}]$ -NE投与15分後のuptake-1機能を検討した。肥大右室では、著明な集積低下を認めた。これらの結果から、MIBGの集積低下はNE再摂取障害によるものと考えられた。

次に神経密度の増加した右室において、NE合成が低下しているか否かを検討した。THは、L-チロシンをL-DOPAに合成するNE合成律速酵素であるが、ウェスタンブロットでは、THの発現は肥大右室においてコントロールの21%に低下した。また、抗TH抗体による免疫染色でも、コントロールに比してMCT投与肥大右室では、THの発現が低下していた。さらにL-DOPA産生を測定したところTH酵素活性は肥大右室で35%減少した。

解剖学的な交感神経線維密度の増加と交感神経細胞の機能低下の矛盾を説明するために、解剖学

的に増加した交感神経線維が胎児型もしくは幼若な形態を取るかどうかを検討した。幼若神経マーカーとして知られているPSA-NCAMが、肥大右室においてGAP43と共染色された。PSA-NCAMは、新生児ラット心臓において明らかに発現していたが、成獣コントロールラット心臓では発現していなかった。興味深いことに、神経密度の増加した肥大右室においては、発現が16倍に亢進していた。ウェスタンブロットにおいても、発現が確認された。

#### D/E. 考察および結論

我々は、肺高血圧により右室においてET-1やNGFの発現が亢進し、それが心室特異的な交感神経密度の増加に関連していることを示した。然るに、この解剖学的な交感神経線維密度の増加は、NE再摂取障害と共に、TH活性の低下を介したNEの合成を著明に減少させ、組織NEおよびDA含量を著しく低下させた。増加した交感神経線維は、神経特異的な幼若化マーカーであるPSA-NCAMを強く発現しており、これは交感神経の幼若化を示すと考えられた。これにより、解剖学的な神経密度の増加と機能低下を説明することが可能であると考えた。

我々は以前、新生児ラット培養心筋細胞およびET-1遺伝子操作胎児マウスにおいてET-1が特異的にNGFの発現を誘導し、ET-1/NGFのシグナルは交感神経の成長に重要であることを報告した。一方、心筋細胞における機械的伸展刺激や圧負荷モデル動物の心臓においてET-1の発現が亢進することは既に報告されている。我々のモデルにおいても、心肥大によりET-1/NGFのシグナルが上昇し、これが交感神経密度の増加に関与した可能性がある。このことは、ET-1/NGF経路が胎生期における交感神経の成長だけではなく、成獣における交感神経の制御にも関与している可能性を示唆すると考えられた。しかしながら、圧負荷肥大心筋では、様々な成長因子やサイトカインの発現が亢進することが知られており、今後の検討課題として、NGF発現を制御する上流に存在する因子を同定することがあげられる。

神経成長円錐のマーカーであるGAP43発現の増加は、解剖学的な交感神経密度の増加が、肥大心筋細胞への神経芽であることを意味している。一方、PSA-NCAMは、幼若な神経のマーカーであり、発生、発育段階の神経や神経幹細胞からの再生神経に発現する。我々のモデルで観察された増加した交感神経線維は、幼若化した神経であり、肥大心筋細胞間における神経軸索の伸展と分枝を示していると考えられる。

肥大心筋細胞において、胎児型の遺伝子発現(幼若化)が生じることは様々な報告されている。肥大心筋細胞における形質変化は、収縮蛋白、イオンチャネル、SERCA-2aなどのカルシウム制御蛋白や

エネルギー産生分子などが含まれ、収縮機能低下や拡張速度の低下およびATP産生の減少などの機能低下をもたらす。これらの幼若化をもたらすメカニズムは未だ明らかではないが、恐らく心臓からのオートクライン/パラクラインの因子の関与が推定される。以上の知見と我々の研究からは、交感神経の幼若化が、NE合成や再摂取などの神経機能低下に重要な役割を担っている可能性が考えられた。

心不全では、前臨床段階において必ず心肥大を経由する。心筋NE含量は心不全では低下し、この現象はNEの過剰分泌によると説明されてきた。しかしながら、NE過剰分泌ではDA含量の減少やNE再摂取障害およびTH発現低下を説明することが出来ない。我々の知見からこの現象を説明することは可能である。

また、多くの研究で、重症心不全におけるMIBG集積低下を報告しており、心臓交感神経の除神経の結果であると説明されている。末期心不全において、NGFの発現が低下し、これが除神経の原因であるとする報告もある。それ故、部分的な除神経は我々のモデルにおいて観察されたMIBG集積低下やNE含量の低下を説明出来るかも知れないが、臨床において詳細に病理学的、機能的および分子メカニズムを解明した研究は存在しない。我々の研究結果は、この現象をも説明することが出来る。つまり、除神経と交感神経幼若化は、同じ表現型であり、臨床においてもこれらの現象が共存する可能性があると考ええる。本研究の成果が、今後の心不全の病態解明や治療にとって有用なものとなることを期待する。

## F. 研究危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

- Yuichi Tomita, Shinji Makino, Daihiko Hakuno, Naoichiro Hattan, Kensuke Kimura, Shunichiro Miyoshi, Mitsushige Murata, Masaki Ieda, Keiichi Fukuda: Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers. *Med Biol Engineering Computing* 45:209-220, 2007
- Kazunari Higa, Shigeo Shinmura, Naoko Kato, Tetsuya Kawakita, Hideyuki Miyashita, Yuji Itabashi, Keiichi Fukuda, Jun Shimazaki, Kazuo Tsubota: Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an aminiotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:597-604, 2007
- Jin Endo, Motoaki Sano, Jun Fujita, Kentaro Hayashida, Shinsuke Yuasa, Naoki Aoyama, Yuji Takehara, Osamu Kato, Shinji Makino, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: BM-derived cells contribute to the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *Circulation* 116:1176-84, 2007
- Kensuke Kimura, Yumeko Tanabe-Hayashi, Shigetaka Noma, Keiichi Fukuda: Rapid Formation of Left Ventricular Giant Thrombus with Takotsubo Cardiomyopathy. *Circulation* 115: 620-621, 2007
- Masaki Ieda, Hideaki Kanazawa, Kensuke Kimura, Fumiyuki Hattori, Yasuyo Ieda, Masahiko Taniguchi, Jong-Kook Lee, Itsuo Kodama, Keisuke Matsumura, Yuichi Tomita, Kouji Shimoda, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa<sup>2</sup>, Keiichi Fukuda: *Sema3a* maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nature Medicine* 13:604-612, 2007
- Yasushi Morisawa, Shinichiro Takayama, Kazuhiko Okushi, Toshiyasu Nakamura, Keiichi Fukuda, Yoshihiro Arakawa, Hiroyasu Ikegami, Yoshiaki Toyama: Quantitation of neurotrophin mRNA in skeletal muscle: Changes during the process of peripheral nerve regeneration. *J Musculoskeletal Res* 10:1-10, 2007
- Daihiko Hakuno, Keiichi Fukuda: Angiogenesis inhibitor chondromodulin-I is critical for maintaining normal cardiac valves. *Drug Discovery today*, 2007 (in press)
- Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda: The multiple roles of BMP signaling in cardiac development. *J Cell Mol Med*, 2007 (in press)
- Kensuke Kimura, MD Sung Han Yoon, Keiichi Fukuda, Tokuhiko Kimura, Kazushi Takahashi, Norihiro Suzuki, Akira Imai, Shigetaka Noma: Cardiac Bradykinesia in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 22:750-751, 2007
- Haruko Kawaguchi-Manabe, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Tomohiro Manabe, Satoru Miyatake, Hideaki Kanazawa, Makoto Suematsu, Keiichi Fukuda: A new cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically reduced in cardiac hypertrophy. *Life Sci* 2:81:385-392, 2007
- Kensuke Kimura, Masaki Ieda, Hideaki Kanazawa, Takashi Yagi, Makoto Tsunoda, Shinichi Ninomiya, Hiroyuki Kurosawa, Kenji Yoshimi, Hideki Mochizuki, Kazuto Yamazaki, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: Cardiac Sympathetic Rejuvenation: A Link between Nerve Function and Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 100:1755-1764, 2007
- Hirofumi Yada, Mitsushige Murata, Kouji Shimoda, Shinsuke Yuasa, Haruko Kawaguchi, Masaki Ieda, Takeshi Adachi, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: Dominant negative suppression Rad

- leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the heart. *Circ Res* 101:69-77, 2007
- Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K: Intramolecular control of protein stability, subcellular compartmentalization and coactivator function of PGC-1  $\alpha$ . *J Biol Chem* 82:25970-80, 2007
  - Fujita J, Mori M, Kawada H, Ieda Y, Tsuma M, Matsuzaki Y, Kawaguchi H, Yagi T, Yuasa S, Endo J, Hotta T, Ogawa S, Okano H, Yozu R, Ando K, Fukuda K: Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor after Myocardial Infarction Enhances the Recruitment of Hematopoietic Stem Cell-Derived Myofibroblasts and Contributes to Cardiac Repair. *Stem cell* 25:2750-9, 2007
  - Kinoshita M, Matsumura S, Sueyoshi K, Ogawa S, Fukuda K: Randomized trial of statin administration for myocardial injury: is intensive lipid-lowering more beneficial than moderate lipid-lowering before percutaneous coronary intervention? *Circ J* 71:1225-8, 2007
  - Takashi Kawakami, Hideaki Kanazawa, Toru Satoh, Masaki Ieda, Yasuyo Ieda, Kensuke Kimura, Hideki Mochizuki, Takashi Shimada, Chieko Yokoyama, Satoshi Ogawa, Tadashi Tanabe, Keiichi Fukuda: AAV-PGIS gene transfer improved hypoxia induced pulmonary hypertension in mice. *Biophys Biochem Res Comm* 363:656-661, 2007
  - Miyatake S, Manabe-Kawaguchi H, Watanabe K, Hori S, Aikawa N, Fukuda K: Prostaglandin E2 Induces Hypertrophic Changes and Suppresses  $\alpha$ -Skeletal Actin Gene Expression in Rat Cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:548-554, 2007
- 2) 学会発表
- Keiichi Fukuda: Origin of cardiac stem cells and myocardial homeostasis. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Keiichi Fukuda: How to identify a mesenchymal progenitor cell. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Keiichi Fukuda: BM-derived cells contribute to the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload. The 19<sup>th</sup> International Society of Heart Research (June 26, 2007/Bologna, Italy).
  - Keiichi Fukuda: Neural crest stem cells supply cardiomyocytes for physiological turnover and regeneration after myocardial infarction. Symposium of cardiac regeneration. The 24<sup>th</sup> International Society for Heart Research Japan Chapter (June 20, 2007/Ferrara, Italy)
  - Keiichi Fukuda: Regeneration of the heart using stem cell biology and tissue engineering. The 1<sup>st</sup> Oriental Congress of Cardiology (May 30-June 3, 2007/Shanghai, China).
  - Keiichi Fukuda: Keeping valves clear: Role of chondromodulin-I as a protective factor for maintaining cardiac valvular function. Symposium of the advanced cardiac therapy. The 16<sup>th</sup> Asean Congress of Cardiology (April 19-21, 2007/Bali, Indonesia).
  - Keiichi Fukuda: Regeneration of the heart using stem cell biology and tissue engineering. Symposium of the advanced cardiac therapy. The 16<sup>th</sup> Asean Congress of Cardiology (April 19-21, 2007/Bali, Indonesia).
  - Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Jin Endo, Hideaki Kanazawa, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: *Zac1* is an essential cardiac transcription factor. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Takashi Kawakami, Keiichi Fukuda: Adeno-associated virus-mediated Prostaglandin I synthase gene transfer improved the hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Jin Endo, Motoaki Sano, Takaharu Katayama, Satori Tokudome, Shinsuke Yuasa, Mitsushige Murata, Shinji Makino, Takeshi Adachi, Makoto Suematsu, Hiroki Nakanishi, Ryo Taguchi, Ikurou Ohsawa, Shigeo Ohta, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: Genetic mutation of *ALDH2* enhances cardiomyocyte tolerance to oxidative stress as a result of hormetic response to aldehydes. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Keisuke Matsumura, Keiichi Fukuda: Neural crest stem cells supply cardiomyocytes for the physiological turnover and the regeneration after myocardial infarction. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Naritaka Kimura, Daihiko Hakuno, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Ryohei Yozu, Keiichi Fukuda: The anti-angiogenic factor, Tenomodulin, has a pivotal role in maintaining avascularity of chordae tendineae cordis. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
  - Takeshi Onizuka, Keiichi Fukuda: *Wnt2* plays a key role in cardiac development via a non-canonical pathway. American Heart Association, 79<sup>th</sup>

Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).

- Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Masaharu Katayama, Takahide Arai, Fumiyuki Hattori, Mitsushige Murata, Daihiko Hakuno, Kensuke Kimura, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: The novel BTB/POZ protein, RhoBTB3, regulates mitochondrial function via the ubiquitin proteasome system. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).
- Kensuke Kimura, Masaki Ieda, Hideaki Kanazawa, Takahide Arai, Takashi Kawakami, Takeshi Onizuka, Toshimi Kageyama, Yohei Ohno, Sung Han Yoon, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: Characterization of the rejuvenation of cardiac sympathetic nerves in cardiac hypertrophy. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting

(Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).

- Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Keisuke Matsumura, Takashi Kawakami, Hirotaka Yada, Shinji Makino, Motoaki Sano, Shinsuke Yuasa, Haruko Manabe, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda: Heart failure causes cholinergic differentiation of cardiac sympathetic nerves through paracrine secreted factors. American Heart Association, 79<sup>th</sup> Scientific Meeting (Nov. 4-7, 2007/Orlando, USA).

#### H. 知的財産権出願・登録状況

- 心筋細胞の細胞塊作成方法および心筋細胞塊の用途(平成19年7月31日), 発明者: 服部文幸・福田恵一, 出願人: アスピオファーマ・学校法人慶應義塾(特願2007-200246)

#### <研究協力者>

木村謙介

## 特発性心筋症に関する調査研究

ーラミニン $\gamma$ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討ー

研究協力者： 武田 信彬(東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部教授)

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

## A. 研究目的

細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは、拡張型心筋症において心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的増加し、組織の硬化を招くとされている。我々はこれまでの研究でマウスとヒトのラミニン $\gamma$ 1鎖プロモーターの転写を促進する因子の存在を見出し報告した(J Biol Chem 1996, Am J Physiol, 1998)。また、yeastのone-hybrid systemを用いて、心筋に存在する新蛋白SmarcelrならびにSMARPをクローニングしその機能解析をおこなってきた。

今回、その一端として心筋症ハムスター(J-2-N)のマイクロアレイ解析を施行した。なお、我々は心筋症ハムスターJ-2-Nにおいて、心筋SRのphospholambanならびにSERCA2の活性低下を認めることを報告している(Am J Physiol, 2002)。

また、ヒトではlimb girdle type muscle dystrophyならびにDCMで、 $\beta$ -,  $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子変異が確認されており、心筋症ハムスターJ-2-Nにおいても $\delta$ -sarcoglycan 遺伝子変異が報告されているが、しかし、他の遺伝子情報については未知のことが多いため、今回J-2-Nにおいてlarge scale のgenomic approachを施行し、心筋症発症の解明につながり得るものはないかを調べた。

## B. 研究方法

6週齢の心筋症ハムスターJ-2-Nk およびそのコントロールハムスターJ-2-Nnそれぞれ3匹にマイクロアレイ解析をした。対称遺伝子は、NCBI Genbankに登録されているハムスターの1665遺伝子につきスタンダードのエクспRESSIONアレイを施行した。

## (倫理面への配慮)

実験動物に関して、東京慈恵会医科大学実験動

物取り扱い規約に従って実験を行った。

## C. 研究結果

検索した遺伝子のうち、約450個の遺伝子ではJ-2-Nkにてup-regulate(以下増加と表現)されており、うち約50個の遺伝子では40%以上の増加を示した。また、約250個の遺伝子ではdown-regulate(以下低下)されており、約40個の遺伝子では10%以上の低下を示した。

その内訳としては、

(1)Cell/organism defenseに関連する遺伝子のうち、DCMではHSP 70が増加することが知られているが、J-2-NkではJ-2-Nnに比べてheat shock protein B9の低下を認めるも、他の数種のHSPは増加していた。

(2)Signal transductionに関連する遺伝子のうち、DCMではSTAT7、STAT3の低下が知られているが、J-2-NkではJ-2-Nnに比べてSTAT3が低下していた。

(3)Apoptosisに関連する遺伝子のうち、DCMではp53、NOS3の低下が知られているが、J-2-NkでもJ-2-Nnに比べてこれらの遺伝子は低下し、J-2-Nkではさらにc-fos、caspase 3が低下していた。

(4)Cell signaling/communicationに関連する遺伝子のうち、ANPとBNPは心不全で増加、J-2-NkではJ-2-Nnに比べてANP、BNPともに変化しなかった。

(5)Cell signalingに関連する遺伝子のうち、DCMではcAMP-dependent protein kinaseが増加するが、J-2-NkではJ-2-Nnに比べて低下していた。calmodulinはDCMと同様にJ-2-Nkでも増加していた。

(6)Extracellular matrixに関連する遺伝子では、DCMではcollagen type XXI、type Iaが増加す

るが、J-2-Nkではcollagen type VII, type XVII, collagenase 2, 3, ICAM1などの低下を認めた。

(7)心筋サルコメアの構成遺伝子のうち、DCMでは $\alpha$ -myosin heavy chainと $\beta$  actin遺伝子が低下するが、J-2-Nnに比べてJ-2-Nkではいずれの遺伝子も増加していた。

(8)Sarcoglycan遺伝子では、DCMでは $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sarcoglycanに変化を認めず、 $\delta$ -sarcoglycanの増加が知られているが、J-2-NkではJ-2-Nnと比べて $\beta$ -sarcoglycanが不変以外DCMとは異なる結果を得た。

#### D. 考察

J-2-N心筋症ハムスターにマイクロアレイアッセイを施行し、心不全ならびにfibrosisの著明でないJ-2-Nkではサルコメア構成遺伝子、サルコグリカン遺伝子等の発現においてヒトのDCMとは必ずしも同じでない結果を得たが、種による違いか、病期による違いかは今回の研究では明らかでなく、今後検討する必要がある。ただ、心筋症発症のハムスターJ-2-NkとコントロールハムスターJ-2-Nnの違いは明らかで、同ハムスターを用いた従来の研究成果を合わせ考えてもこのハムスターが心筋症の実験モデル動物として今後の基礎研究にさらに貢献していくものと思われる。

#### E. 結論

心筋に発現する新タンパクSmarcelrならびにSMARPのクローニング、および心筋症ハムスター

J-2-Nkのマイクロアレイアッセイは心筋症の発症に関わる新しい遺伝子の解明の一助となると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1)論文発表

- ・ Suzuki H, Arakawa Y, Ito M, Saito S, Mochizuki S, Takeda N, Yamada H, Yamada JH. MLF1-interacting protein is mainly localized in nucleolus through N-terminal bipartite nucleolar localization signal. *Anticancer Res* 27:1423-30, 2007.

##### 2)学会発表

- ・ Suzuki H, Arakawa Y, Yamada H, Hokkyo K, Yamada J, Takeda N. Microarray gene expression profiles in the J2N-k cardiomyopathic hamster. *International Academy of Cardiovascular Sciences, Japan Section Meeting* (July 14-15, 2007/Kyoto, Japan).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### <研究協力者>

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

## 特発性心筋症に関する調査研究

—たこつぼ心筋症の予後全国調査—

研究協力者： 河合 祥雄(順天堂大学医学部循環器内科准教授)

＜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

たこつぼ心筋症(障害)死亡例の文献検索による死亡例の実態と全国アンケート調査によりたこつぼ心筋障害症例の死亡率、重度後遺症の頻度を明らかにする。

### B. 研究方法

日本循環器学会地方会、日本病理学会総会、医中誌Webなどにより、過去10年間のたこつぼ心筋障害死亡例・剖検例を検索した。一部は電話その他により、データを確認・取り寄せた。全国アンケート調査(2002年施行)における予後・死亡率を再集計した。

### C. 研究結果

集計された報告抄録、論文は35件、死亡例数は38例(女性28、男性3、記載なし7名)であった。神経性食思不振症の34歳を除き、死亡年齢は61歳から90歳まで(平均76歳)と高齢で、発病後1-33病日(平均10日、1週間以内15例)で死亡していた。症例の多くが日本循環器学会地方会報告例であり、日本病理学会総会症例報告はわずかに1例(別に病理地方会1例)に過ぎなかった。剖検は18例で行われていた。10例は剖検心の検鏡の機会を得ている。死因は肺炎、ARDS、敗血症、多臓器不全などの基礎疾患によるものと、心破裂(6例)、心タンポナーデ、心室不整脈によるものに二分された。全国のたこつぼ心筋障害報告施設に送付したアンケート調査79施設から回収されたアンケートの予後調査では、症例数618例中死亡は25(4.45%)、重度後遺症(壁運動不可逆化、心室瘤、完全房室ブロック、心不全反復など)は8(1.3%)にみられた。

### D. 考察

たこつぼ心筋症に対する一般医師の認知度の増加に伴い、循環器地方会以外の報告、循環器科以外での症例報告が増加する傾向にある。しかし、たこつぼ心筋症に対する認識・理解は病理専門医には周知されていない。たこつぼ心筋症で死亡・重度後遺症は5%程にみられ、死因として早期の心破裂および呼吸器不全が重要である。本病態は一過性であるので、死亡時(剖検時)には主病態でなく、日本病理剖検輯報に十分な記載がない可能性がある。また、法医学者にも本病態は十分には認知されておらず、「たこつぼ心筋症バンク」(仮称)を設立し、本疾患の病理形態を含めた知見を一般病理医、法医学者に広める必要がある。

### E. 結論

たこつぼ心筋症は決して予後良好な病態ではなく、5%弱が死亡している。改めての全国調査が必要である。

### F. 研究危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

- Kawai S, Kitabatake A, Tomoiike H, Takotsubo Cardiomyopathy Group: Guidelines for diagnosis of takotsubo (ampulla) cardiomyopathy. Circ J 71(6):990-992, 2007.
- Kawai S: Typical and atypical forms of takotsubo (ampulla) cardiomyopathy. Circ J 71(10):1665, 2007.
- 河合祥雄：いわゆるたこつぼ型心筋障害。山口徹，高本諄一，中澤 誠，小室一成編集，

「Annual Review循環器2007」, 中外医学社, 212-217, 2007年, 東京.

- ・河合祥雄: たこつぼ心筋症の病理. 診療と新薬 44: 358-359, 2007.

## 2) 学会発表

- ・Kawai S, Yamada A, Daida H: Takotsubo (ampulla) Cardiomyopathy in Japan Pathological characteristics. The 1st International Congress of Cardiomyopathies and Heart Failure (President:

Matsumori A, Chairpersons: Dr. Kasanuki, Dr. Horie/March 10-13, 2007/Kyoto, Japan).

- ・山田京志, 鈴木宏昌, 河合祥雄, 代田浩之: たこつぼ心筋症剖検例の病理組織学的検討. 第29回心筋生検研究会(会長: 森本紳一郎, 座長: 大川真一郎/2007年11月30日/名古屋).

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

—特発性拡張型心筋症における収縮予備能破綻評価に関するドブタミン負荷試験の有用性について—  
研究協力者： 室原 豊明(名古屋大学大学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

拡張型心筋症(DCM)は原因不明の難病で、本邦では、重症心不全や心移植の主な基礎心疾患である。一方、本邦では地域および職域での検診制度充実もあり心不全症状の無い軽症の段階でDCMと早期から診断される症例も数多く見受けられる。この時点で適切な治療・管理を開始することが、心不全進展の観点からも望ましいと考えられる。

近年、 $\beta$ 遮断薬の心不全に対する効果は確立されつつあるが、その機序の一つとして、不全心における $\beta 1$ 受容体のdown-regulationなどによる交感神経刺激に対する反応性低下の改善が示唆されている。 $\beta 1$ 受容体のdown-regulationは交感神経活性の亢進に対する防御反応とも考えられ、血清ノルエピネフリン濃度とは反比例することが示されている。従来の心筋収縮予備能と $\beta$ アドレナリン受容体に関する臨床研究では、移植摘出心など末期心不全患者を対象としたものが多く、軽症患者については十分に調べられていない。我々は昨年度までに、比較的軽症の不全心について収縮・弛緩予備能の研究を行い報告してきた。本年度は、NYHA I/IIの比較的軽症が軽症なDCM患者を対象とし、交感神経刺激に対する収縮予備能をドブタミン負荷試験を行うことで評価するとともに、心筋生検標本細胞における $\beta$ アドレナリン受容体刺激伝達系に関与する心筋収縮・弛緩関連タンパクmRNA発現量との関連について検討した。

### B. 研究方法

対象は比較的心不全症状が軽症(NYHAクラスIあるいはII)のDCM 46例(男性 34名、平均年齢  $51 \pm 12$ 歳)である。虚血性心疾患や心房細動症例、急性心不全症例は除外した。安定した状態で血液検査(血漿BNP濃度、血漿ノルエピネフリン濃度測

定)、心臓超音波検査、 $^{131}\text{I}$ -MIBG 心筋シンチグラム、右心カテーテル検査、冠動脈造影、左室造影を行った。また、マイクロマノメーター付きカテーテルを左室内に留置しドブタミン負荷試験を行った。マイクロマノメーターにより記録した左室内圧波形から左室収縮能の指標として $\text{LVdP/dt}_{\text{max}}$ を計算した。ドブタミン負荷試験のプロトコールは、ドブタミン静脈内投与を $5 \mu\text{g/kg/min}$ から開始し、5分経過した後に $10 \mu\text{g/kg/min}$ に増量、増量5分後の安定した状態で血行動態データを収集した。さらに左室後壁より心筋生検を施行した。心筋生検標本細胞における $\beta 1$ アドレナリン受容体、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、GRK2、Gs $\alpha$ 、Gi2 $\alpha$ 、SERCA2a、phospholamban、ryanodine受容体、calsequestrin、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchanger等の $\beta$ アドレナリン受容体刺激伝達系に関与する心筋収縮・弛緩関連タンパクmRNA発現量をリアルタイムRT-PCR法により測定した。

#### (倫理面への配慮)

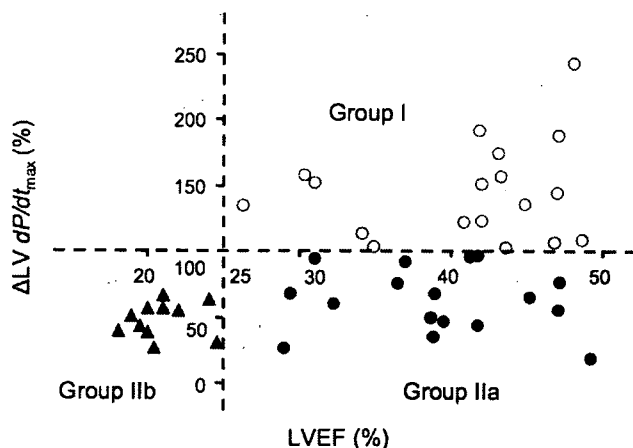
本研究内容は本学倫理委員会の承認の下で行った(承認番号359)。すべての患者において検査内容を説明し文書による同意を得て研究を行った。

### C. 研究結果

左室造影所見から求めた左室駆出率(LVEF)およびドブタミン投与前後の $\text{LVdP/dt}_{\text{max}}$ の変化量( $\Delta \text{LVdP/dt}_{\text{max}}$ )の値に基づき、対象を3つのグループに分類した(Group I(LVEF  $> 25\%$ ,  $\Delta \text{LVdP/dt}_{\text{max}} > 100\%$ ,  $n=18$ 例)、Group IIa(LVEF  $> 25\%$ ,  $\Delta \text{LVdP/dt}_{\text{max}} \leq 100\%$ ,  $n=17$ 例)、Group IIb(LVEF  $\leq 25\%$ ,  $\Delta \text{LVdP/dt}_{\text{max}} \leq 100\%$ ,  $n=11$ 例))。図に対象症例の分布を示す。

Group IとGroup IIaとではドブタミン投与前の血行動態指標には差が無かったが、Group IIbは他

グループと比較し、左室拡張末期容積は有意に大きくLVEF(Group I:  $41 \pm 7\%$ , Group IIa:  $39 \pm 6\%$ , Group IIb:  $21 \pm 2\%$ )が有意に低下していた。また、血漿ノルエピネフリン濃度はGroup Iと比較し、Group IIa および IIbは有意に上昇し、血漿BNP濃度はGroup IIbが他グループと比較し有意に上昇していたが、Group IとGroup IIaとの間には差を認めなかった。また、 $^{131}\text{I}$ -MIBG心筋シンチグラムにおけるdelayed H/MはGroup Iと比較し、Group IIa および IIbは有意に低値であった。



図

心筋生検標本細胞における、 $\beta 1$ アドレナリン受容体、SERCA2a、phospholambanのmRNA発現量が有意に低下していた。 $\beta 2$ アドレナリン受容体、GRK2、Gs $\alpha$ 、Gi2 $\alpha$ 、ryanodine受容体、calsequestrin、Na $^{+}$ -Ca $^{2+}$  exchangerのmRNA発現量は3グループ間で差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究の結果、LVEFが比較的保たれた( $25 < \text{LVEF} < 50\%$ )症例において、ドブタミン負荷試験による左室収縮応答は症例により大きな差異が認められることが明らかとなった。左室収縮予備能が低下した症例では心筋細胞における $\beta 1$ アドレナリン受容体、SERCA2a、phospholambanの遺伝子発現量低下を認めた。また、これらの症例では、血漿ノルエピネフリン濃度上昇および $^{131}\text{I}$ -MIBG心筋シンチグラムにおけるdelayed H/M低値を認め、交感神経活性の亢進が関与していることが示唆された。従来、心筋収縮関連タンパクの遺伝子発現異常に関しては、主として移植摘出心など末期不全心を対象に報告されてきた。今回の研究の結果から、心不全症状の軽い症例においても、ドブタミン負荷に対する収縮応答性の低下した症例では、既に心筋細胞内シグナル伝達異常を認めることが明らかとなった。ドブタミン負荷心エコーを

用いた研究では、慢性心不全に対する窿uロッカー治療の効果や予後との関連も報告されている。今回の研究結果から、ドブタミン負荷試験が比較的軽症のDCM症例におけるリスク層別化および治療方針決定に有用である可能性が示唆された。

#### E. 結論

DCMにおいて頻拍および交感神経刺激による心筋収縮予備能を評価することは、臨床的な心筋細胞傷害評価法として有用であり、軽症な段階での予後不良症例鑑別に応用可能であることが示唆された。ドブタミン負荷試験を用いた心筋収縮予備能の評価により、DCMにおける心筋細胞内シグナル伝達異常を、より早期に評価でき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

- Amano T, Matsubara T, Izawa H, Torigoe M, Yoshida T, Hamaguchi Y, Ishii H, Miura M, Hayashi Y, Ogawa Y, Murohara T. Impact of plasma aldosterone levels for prediction of in-stent restenosis. *Am J Cardiol.* 2006;97:785-788.
- Hirashiki A, Izawa H, Somura F, Obata K, Nishizawa T, Yamada A, Asano H, Ohshima S, Noda A, Iino S, Nagata K, Okumura K, Murohara T, Yokota M. Prognostic value of pacing-induced mechanical alternans in patients with mild to moderate idiopathic dilated cardiomyopathy in sinus rhythm. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1382-89.

##### 2) 学会発表

- Kobayashi M, Izawa H, Asano H, Obata K, Hirashiki A, Ohshima S, Kato T, Yamada T, Murase Y, Noda A, Nishizawa T, Nagata K, Isobe S, Inden Y, Murohara T, Yokota M. Contractile reserve revealed by beta1-adrenergic stimulation as a predictor of altered myocardial expression of contractile regulatory proteins in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. American Heart Association, Scientific Sessions 2006 (November 12-15, 2006/ Chicago, 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

—心臓特異的過剰発現マウスを用いたテネイシンCの分子機能解析—

研究協力者： 今中 恭子(三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学准教授)

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

## A. 研究の目的

テネイシンC(TN-C)は、正常な心臓には発現しないが、病的な心臓で組織障害と活動性炎症に伴って、特異的に一過性に発現する。我々は、ELISA法による測定系を開発し、拡張型心筋症患者の血中テネイシンCは正常より高く、そのレベルは心不全の重症度と相関し、血中TN-C濃度の高い患者は心室リモデリングをおこしやすく予後が悪いことが明らかになった。同様に、心筋梗塞患者でも急性期に血中TN-C値の高い患者は慢性期心室リモデリングをおこしやすく、TN-Cノックアウトマウスで心筋梗塞モデルを作成すると野性型マウスより心機能回復がよいこと、過剰なTN-Cは心筋傷害後の組織修復の際、生体に不利な作用を持つ可能性が示唆される。

そこで、本研究ではCre-lox系により、異なる時期および部位の心臓にTN-Cを過剰発現する3種類のマウスの作成を試み解析を行った。さらにこれらのマウスを用いて、心筋組織障害モデル、AngiotensinII(AngII)を投与による高血圧モデルを作製し、TN-Cの過剰状態での心筋組織リモデリングについて検討した。

## B. 研究方法

## 1) 心臓特異的テネイシンC過剰発現トランスジェニックマウス

C57BL系のマウス受精卵に、CAGプロモーターとマウスTN-C遺伝子の間にloxP配列ではさんだpolyAを挿入した遺伝子(TG)を導入したトランスジェニックマウス(*flox-TN-C*:TGマウス)を作製した。このマウスとNkx2.5 Cre-マウス、 $\alpha$ -smooth muscle actinプロモーターCrePRIマウス、 $\alpha$ -myosin heavy chain( $\alpha$ MHC)プロモーターCrePRIマウス(inducible  $\alpha$ MHC-Cre)とそれぞれ交配したF1で、TGとCreの両方の遺伝子を持つ個体(TG/Cre)で過剰発現を誘導した。

## 2) 組織解析

心臓を摘出2分割し4%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン切片を作成し、抗 $\alpha$ -SMA、TN-Cの免疫染色をおこなった。また、HE染色標本心筋細胞の大きさ、Sirius Red染色標本を画像解析により線維化率を計算した。また残りの組織よりRNAを抽出し、定量的RT-PCRでANP、BNP、collagen I, IIIの発現レベルを解析した。

## (倫理面への配慮)

動物実験は、三重大学動物実験委員会で承認されたプロトコールに従って行った。

## C. 研究結果

## 1) Nkx2.5-promotor Creマウスを用いた検討

野生型マウスでは、胎生7.5日の心臓予定領域中胚葉にTN-Cが発現するが心筋細胞の分化に伴い直ちに発現が消失する。*Nkx2.5-Cre<sup>Tg/+</sup>; flox-TN-C<sup>Tg/+</sup>*(TG/Cre)では、設計通り、胎生8.0日の胎児原始心筋細胞に本来なら発現しないTN-Cの高レベルの発現が誘導され、強い発現は少なくとも20週令まで確認できた。さらに、TN-Cノックアウトマウスと交配することにより、テネイシン発現が正常、全くない、正常+過剰発現、心臓のみ過剰発現の4種類のマウス胚を得たが、いずれも心臓を含み胎児に明らかな変化は見られなかった。しかし、冠動脈を抗PECAM染色して詳細に検討すると、TN-C過剰発現マウスで、冠動脈起始部の軽度異常が見られる個体が認められた。また、TN-C過剰発現マウスは生後20週令で、高度の心筋細胞肥大が認められた。

2)  $\alpha$ MHC-Cre PRIマウスを用いた検討

本来のタモキシフェン投与によりTN-Cが誘導可能な設計であったが、 *$\alpha$ MHC-Cre PRI<sup>Tg/+</sup>; flox-TN-C<sup>Tg/+</sup>*(TG/Cre)では、生後6週ころより自発的に発現が始まり、生後8週ではほぼ心臓全域の心筋細胞およびその周囲間質にTN-Cの沈着がみられるようになった。心筋組織の一部を電気メスで凝固壊死させ