

ミトコンドリア膜透過性遷移はアポトーシスではなくネクローシスに関与している

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学¹⁾／大阪大学大学院医学系研究科遺伝子学²⁾

大津 欣也¹⁾／山口 修¹⁾／渡部 徹也¹⁾／堀 正二¹⁾／辻本 賀英²⁾

【目的】心不全発症・進展には心筋細胞死が関与している。apoptosisやnecrosisにはミトコンドリア膜透過性遷移(mitochondrial permeability transition, mPT)が重要だと報告されているが、細胞死における詳細な役割は不明である。mPTが生じるとミトコンドリアの膨化、膜電位(Dy)の破綻、機能不全を来とし細胞死に至る。mPTにはCyclophilin D (CypD)依存性のPermeability Transition Pore (PT pore)と呼ばれる非特異的チャンネルが関与している。

【方法】CypDノックアウトマウス(KO)を作成し、様々な細胞死刺激に対する反応性を*in vitro*および*in vivo*で検討した。

【結果】CypD KOマウスは正常発育した。心エコーで評価した心機能も正常であった。単離ミトコンドリアを用いた検討で、CypD KOミトコンドリアはCa²⁺ overloadに際してもmPTを生じず、Dyも保たれた。MEF、thymocyte、hepatocyteを用いた検討では各種薬剤やBH3 only protein、X線照射によるapoptosis誘導にCypD KOとWT間で有意差を認めなかった。更にH₂O₂やA23187(Ca²⁺ ionophore)を用いて誘導されるnecrotic cell deathがCypD KO MEF、hepatocyteで抑制され、その際に膜電位Dyは保たれていた。*in vivo*における検討では活性酸素種やCa²⁺ overloadが関与していると考えられている心臓虚血再灌流障害モデルにおいてCypD KOマウスでは虚血再灌流による心筋梗塞サイズは有意に減少した。

【総括】CypD依存性ミトコンドリア膜透過性遷移はapoptosisには関与していないことが明らかとなった。CypDは細胞死から臓器不全に至る経路において新たな治療ターゲットとなりうることを示唆された。

myocardinはBcl-2の転写活性を制御し、β受容体刺激による心筋細胞のアポトーシスを抑制する

神戸大学大学院医学研究科循環呼吸器病態学

小林 成美／上山 知己／河合 美樹／杜 隆嗣／政野 智也／川嶋成乃亮／横山 光宏

myocardinは胎生7.75日目から心臓形成領域に発現が認められ、serum response factor (SRF)と結合しserum response element (SRE)依存性プロモーターを活性化し、心筋、平滑筋に特異的な転写因子である。我々はこれまで、myocardinが心筋分化や肥大に重要であること、またアポトーシスを抑制することを報告してきた。今回、ラット新生仔培養心筋細胞において、心不全の成因に重要と考えられているβ受容体刺激によるアポトーシスに対して、myocardinの抑制効果を検討した。Isoproterenol刺激(ISO)(10 μM、48時間)により、TUNEL陽性細胞は増加し、細胞内caspase-3活性は上昇した。また、ウェスタンブロッティングにてBcl-2/Bax比は低下した。myocardinをアデノウイルスにより過剰発現させるとISOによるアポトーシスは有意に抑制された。その機序として、myocardinがanti-apoptoticな蛋白の転写活性を調節する可能性を考えた。myocardinを過剰発現させた培養心筋細胞において、Bcl-2の蛋白発現は増加したが、Bax、FLIP、IAPは変化しなかった。そこで、Bcl-2のプロモーター解析を行うと、Bcl-2のプロモーター領域には2つのSREが存在し、変異SREでは、myocardinによるBcl-2プロモーターの活性化は抑制された。また、myocardinの抗アポトーシス作用はBcl-2阻害薬により抑制された。

すなわち、myocardinはBcl-2の発現を転写レベルから制御することによって、抗アポトーシス作用を発揮すると考えられた。以上の所見はmyocardinが心筋細胞の肥大や生存に関わり、心不全の成因における重要な因子である事を示唆する。

心筋線維化進展の分子メカニズム

三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学¹⁾／国立国際医療センター腎臓循環器科²⁾

今中 恭子¹⁾／西岡 朋弘¹⁾／鈴木 舞子¹⁾／吉田 利通¹⁾／廣江 道昭²⁾

【背景】拡張型心筋症の代表的な病理組織所見のひとつは心筋線維化である。心筋線維化は、一般に心筋細胞の壊死・脱落を膠原線維で置き換える置換型線維化と、心筋細胞の脱落を伴わず細胞間の膠原線維が増える反応型線維化にわけて考えられるが、その進展機序は明らかではない。我々はこれまでの研究成果に基づき、線維化病巣が何種類もの細胞外マトリックスの産生、沈着、分解を繰り返して形成され、その中でもテネイシンCは、病変進展の初期に線維化促進因子として働く分子の一つであると予想する。実質細胞の再生能に乏しい心臓では、組織修復・構築改変の主体は間質線維化反応であるため、線維化病巣の性質の変化を正確に把握することは、拡張型心筋症の病期、活動性を診断する上で有用であり、線維化の制御は心機能改善治療の標的になると考える。

【目的】テネイシンCによる線維化促進の分子機構を解明する。

【方法と結果】野生型マウス、テネイシンCノックアウトマウスを用いて、我々の確立したアンジオテンシンⅡ投与による反応型線維化モデルを作製し比較すると、血圧上昇、心肥大の程度には差が見られないが、ノックアウトでは、心筋内の血管周囲にマクロファージの浸潤、プロテオグリカンの沈着、膠原線維の増加が有意に少なかった。精製テネイシンCをラット動脈瘤モデル内に局所投与すると膠原線維形成を著しく促進するが、培養心臓線維芽細胞に作用させても、コラーゲンⅠ、ⅢのmRNA発現レベルに変化は見られず、生体内でテネイシンCはコラーゲン産生形成より前の段階で線維化反応を促進すると考えられる。

【今後】テネイシンCノックアウトマウスに加え、過剰発現トランスジェニックマウスを用いたモデルにより、生体内の線維化進展過程におけるテネイシンCの役割の解明と、培養系を用いた分子機能解析を継続し、さらに線維化病変の可逆性、治療の可能性についても検討する。

早期老化による心筋細胞障害の機序についての検討

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学¹⁾／秋田大学医学部第2内科²⁾

前嶋 康浩¹⁾／安達 進¹⁾／伊藤 宏²⁾／磯部 光章¹⁾

【背景】以前に私たちは培養心筋細胞に低濃度のDoxorubicin (DOX) 添加による酸化ストレス刺激を与えるると加齢に伴う変化と類似した変化(早期老化)が誘導されることを見だし、この現象が心筋障害の一因になっている可能性があることを報告した。本研究では心筋細胞における早期老化の機序について検討し、さらに心機能障害にはどのような形で関与しているのかについて検討することを目的とする。

【方法および結果】新生仔ラット由来の培養心筋細胞を低濃度のDOX (10^{-7} mmol/L) で刺激すると、Senescence-associated β -galactosidase陽性の心筋細胞数が有意に増加した(対照群: $0.33 \pm 0.15\%$ 、DOX添加群: $2.43 \pm 0.8\%$, $n=3$, $p<0.05$)。また、cdk抑制因子のうちp21^{cip1/waf1}蛋白とp27^{kip1}蛋白の発現が経時的に上昇していた。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 (Promyelocytic Leukemia)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。また、培養心筋細胞を低濃度のDOXで刺激した際に壊死やアポトーシスが誘導される比率は低い、その一方で多くの細胞において細胞質量の低下(萎縮)が観察された。骨格筋細胞が萎縮する際には筋細胞特異的Ubiquitin ligaseであるAtrogin-1の活性が上昇し、サルコメア蛋白のユビキチン化が亢進していることが知られているが、DOXで刺激した培養心筋細胞においてもAtrogin-1の発現が上昇していた。また、Atrogin-1発現を制御している転写因子であるFoxo1の脱リン酸化もすすんでおり、心筋細胞においてDOX刺激は少なくとも転写レベル以上でAtrogin-1の発現を上昇させる方向に作用していることが示唆された。

【総括】心筋細胞の早期老化では細胞周期制御因子の一部がその機序に関与していることと、ユビキチン化の亢進による心筋細胞の萎縮が起こっており、これが心筋障害の一因になっている可能性が示された。今後はFoxo1の脱リン酸化を促すシグナル伝達路の探索を通じて、早期老化による心筋障害のメカニズムを解明するべく研究を継続していく方針である。

心不全時に観察される胎児型遺伝子の再発現現象はよく知られた事実であるが、その分子機序はよく分かっていない。我々は、胎児特異的遺伝子の代表であるナトリウム利尿ペプチド研究を一貫して行ってきたが、ANP・BNPがあらゆる胎児遺伝子の中で心不全や心肥大時における再発現現象が最も鋭敏でしかも再現性の高いことを考慮すると、ANP・BNPの転写調節機序は心不全の発症と密接に関連しているとの仮説を立てていた。

我々は、培養心筋細胞が細胞外マトリックスであるフィブロネクチン刺激により、細胞面積の増大やANP・BNP遺伝子発現の亢進させることから、レポーターアッセイを用いてBNP遺伝子上のフィブロネクチン応答領域検討した結果、BNP遺伝子5'転写調節領域に存在するneuron-restrictive silencer element (NRSE)が、その発現亢進に関与していることを突き止めた。すなわち、正常状態ではNRSEには強力なサプレッサーであるNRSF(Neuron restrictive silencer factor)が結合し、NRSEを含む遺伝子の発現を強力に転写抑制しているが、刺激下ではNRSFとNRSEの結合が解離しNRSFによる転写抑制が回避される結果、NRSEを含む遺伝子の転写が亢進することを証明した。さらに興味深いことにはNRSEはBNPのみならず多くの胎児型遺伝子に存在していた。

NRSFの心臓での働きを確かめるために、NRSFのdominant negative変異体を心筋細胞特異的に強制発現するマウスを作成すると、そのマウスは拡張型心筋症に似た形態を示し、心室性不整脈で突然死を来すことが明らかになった。cDNAアレイを用いてこの遺伝子変異マウスで発現亢進している遺伝子を検索すると、ANP、BNP、 α 骨格筋型アクチン等の胎児遺伝子の他、T型カルシウムチャンネルの一つであるCACN1H、ペースメーカー電位に関連しているHCN2、HCN4の遺伝子発現が亢進していた。

この様に、NRSF/NRSE系は胎児型遺伝子を統合的に転写調節するばかりでなく正常の心筋構築や機能を維持する上にも重要な働きを担っている可能性が示唆された。

エリスロポエチンによるラット実験的自己免疫性心筋炎における免疫調整作用の検討

【背景】エリスロポエチン(EPO)は主にアポトーシスの抑制効果による虚血性心筋障害からの保護効果が報告されているが、心筋組織での炎症における免疫調整作用については検討されていない。

【方法】5週齢雌ルイスラットをブタ心筋ミオシンで免疫し、EPO 1500U/kg又は生食を連日皮下投与し、21日後に組織学的検討を行った。EPOは心筋組織中での炎症性サイトカイン、ケモカインmRNAの減少とともに実験的自己免疫性心筋炎(EAM)を軽減させた。即ち、macroscopic score (MaS) 2.3 ± 0.3 vs. 3.7 ± 0.8 ; microscopic score (MiS) 1.6 ± 0.6 vs. 3.0 ± 1.0 ; IFN- γ /トロポニンT (TNT)比 5.1 ± 2.0 vs. 12.3 ± 7.0 , IL-10/TNT比 14.8 ± 3.1 vs. 39.2 ± 37.6 ; MIP-1 α /TNT比 88.6 ± 50.4 vs. 307.6 ± 218.5 ; MCP-1/TNT mRNA比 25.6 ± 9.6 vs. 41.3 ± 29.7 ($\times 10^6$ copy ratio)であった。in vitro実験系において、EPOは心筋炎惹起性ミオシン特異的T細胞株の増殖を抑制しなかった。しかし、効果期のみを反映するモデルと考えられる同T細胞トランスファーによる実験的自己免疫性心筋炎は、同様のEPO連日皮下注により抑制された(MaS 2.8 ± 0.5 vs. 1.1 ± 0.3 ; MiS 2.4 ± 0.8 vs. 1.4 ± 0.8)。

【結論】EPOは心筋組織中のサイトカインやケモカインの減少とともに、EAMの炎症抑制効果をもっている。

特発性拡張型心筋症における組織リモデリングと慢性炎症に関する研究 —テネイシンC血中濃度と臨床検査指標との関連性の検討 第2報—

大阪医科大学第三内科¹⁾／三重大学医学部病理学²⁾／三重大学臨床検査医学³⁾／横須賀共済病院⁴⁾
／国立国際医療センター腎臓循環器内科⁵⁾／北海道大学医学部付属病院循環器科⁶⁾／カレス札幌⁷⁾
寺崎 文生¹⁾／下村 裕章¹⁾／北浦 泰¹⁾／今中—吉田恭子²⁾／吉田 利通²⁾／大西 勝也³⁾
／佐藤 明⁴⁾／廣江 道昭⁵⁾／岡本 洋⁶⁾／筒井 裕之⁶⁾／北畠 顕⁷⁾

【背景】細胞外マトリックス蛋白のうち線維や基底膜などの構造物を形成せず、多彩な生物活性により細胞と細胞外の物質との相互作用を仲介する蛋白をmatricellular proteinと呼ぶ。テネイシンC(TNC)はこのカテゴリーに属し、炎症や組織リモデリングに伴って発現する。特発性拡張型心筋症(DCM)では、成因および病態に組織リモデリングや慢性炎症が重要な役割を果たし、心筋にTNC発現がみられる。しかし、DCM患者におけるTNCの血中濃度は明かにされておらず、今回はTNC血中濃度と諸種臨床検査指標との関連を検討し、TNC血中濃度と心不全重症度との相関が示唆される成績を得た。そこで、今回は他施設も加え、症例数を増して検討した。

【方法】1)大阪医科大学第三内科、三重大学医学部附属病院、横須賀共済病院に通院加療中、または入院精査、加療を行ったDCM患者のべ97例の末梢血血清TNC濃度を測定した。2)DCM患者の各種臨床指標の観察項目には特定疾患特発性拡張型心筋症調査票に記載された項目を原則として採用し、検討した。3)上記1)2)の結果につきを集計と統計解析を行った。

【結果】末梢血TNC濃度はNYHA心機能分類($p<0.001$)、血中BNP濃度($p<0.001$)、心胸郭比($p<0.01$)、左室拡張終期径($p<0.05$)、左室収縮終期径($p<0.01$)と有意の正相関を示した。また、左室駆出率($p<0.01$)とは有意の負の相関を示した。

【考案および結論】末梢血TNC濃度は、DCM患者において左室機能低下と左室リモデリングの程度、および心不全の重症度を反映する。なお、末梢血TNCの由来については今後検討が必要である。

血圧変動の増大は炎症反応を惹起し心筋障害を助長する—血圧変動高血圧モデルを用いた検討—

久留米大学第三内科
甲斐 久史／今泉 勉

【目的】血圧変動が大きい高血圧症例では心肥大・動脈硬化が促進される。しかし、血圧変動が心血管リモデリングを助長する機序は知られていない。我々はラット大動脈縮窄による急激な昇圧が冠血管周辺に炎症を惹起し、反応性心筋線維化・拡張障害を引き起こすことを報告した。本研究では炎症変化が血圧変動増大に伴う心リモデリングに関与するかにつき検討した。

【方法】12週令の自然高血圧発症ラット(SHR)に両側sino-aortic denervation(SAD)を施行。7週間後、テレメトリ法にて自由行動下24時間血圧を測定後、心臓の形態学的・免疫組織学的検討およびRT-PCR法を施行。

【結果】SAD群において、平均血圧はsham群と変わらないが、血圧変動指標(平均血圧の共変動)が有意に増加。SAD群はsham群に比べて、左室重量・心筋細胞径が約1.5倍増大。Sham群では軽度の血管周囲線維化のみ見られたが、SAD群では血管周囲線維化の著しい拡大に加え、心筋細胞脱落を置換する間質線維化が認められ、心筋線維化率は約5倍と増大。単球走化性因子MCP-1発現はSham群では見られないが、SAD群では著明に亢進。SAD群では著明な血管周囲マクロファージ(Mf)浸潤を認めたが、sham群ではまれであった。非降圧量アンジオテンシン(angII)受容体遮断薬(ARB)連日投与により、SADによる左室/心筋細胞肥大、心筋線維化増大、Mf浸潤、MCP-1発現誘導が抑制。正常血圧WKYラットにおいてもSADは、同様の心リモデリング、Mf浸潤、MCP-1発現亢進を引き起こした。

【総括】平均血圧が同じでも血圧変動が増大すると、心リモデリング特に心筋線維化が助長される。その機序として、繰り返される血圧上昇が、angII・Mfを介した血管周囲炎症を慢性的に反復性に引き起こすことが示唆された。高血圧性心不全の治療には、平均血圧低下のみならず血圧変動を減少させ、angII・MCP-1などの向炎症因子を抑制する戦略が必要である。

アンギオテンシン II タイプ 1 受容体のシグナル阻害は心筋梗塞巣の組織動態を改変する

岐阜大学大学院医学研究科循環病態学(第二内科)¹⁾／京都女子大学²⁾

竹村 元三¹⁾／李 一文¹⁾／岡田 英志¹⁾／宮田 周作¹⁾／丸山 留美¹⁾／江崎 正泰¹⁾／Ngin Cin Khai¹⁾
／金森 寛充¹⁾／李 龍虎¹⁾／荻野 敦史¹⁾／湊口 信也¹⁾／藤原 久義¹⁾／藤原 兎子²⁾

【背景】アンギオテンシン II タイプ1受容体 (AT1) のシグナル阻害は心筋梗塞 (MI) 後の左室リモデリングならびに心不全を軽減するが、梗塞巣自体の形態変化あるいは分子機序は必ずしも明らかではない。

【方法と結果】AT1ノックアウトマウス (AT1KO) ならびにワイルドマウス (WT) にてMIを作製し慢性期 (MI 4週後) ならびに亜急性期 (MI 1週後) に両者を比較した。従来の報告通り慢性期においてWTに比較しAT1KOで梗塞後左室リモデリングと心不全の軽減がみられ、非梗塞巣の線維化の減少がみられた。WTに比しAT1KOでは梗塞瘢痕が短縮かつ梗塞壁厚の増大がみられた。AT1KOの梗塞巣の細胞数は有意に増加しており、特に血管内皮細胞と血管外の α -平滑筋アクチン陽性細胞が増加していた。電顕下、後者の一部は収縮型の平滑筋細胞であった。亜急性期の検討にてAT1KOでは梗塞巣肉芽組織細胞のアポトーシスならびにDNAの酸化傷害の減少、細胞増殖活性の増大がみられた。また、AT1KOではAkt活性の上昇がみられた。以上より、AT1KOでは亜急性期における肉芽組織細胞の増殖活性増加と細胞死抑制により慢性期梗塞巣における細胞数の増加、瘢痕組織の形態変化がもたらされて壁ストレスが減少することにより、左室拡大軽減・左心機能の改善の一因をなしていることが推測された。

【結論】AT1シグナルは心筋線維化に加え、梗塞巣の組織動態を改変することにより梗塞後左室リモデリングならびに心機能に悪影響を及ぼす。

炎症制御にもとづく新たな心筋症・心不全治療戦略の開発： サイトカイン誘発性心筋症におけるMMP-2の役割

九州大学大学院医学研究院循環器内科学¹⁾／北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学²⁾

久保田 徹¹⁾／松坂 英徳¹⁾／砂川 賢二¹⁾／筒井 裕之²⁾

【目的】不全心では腫瘍壊死因子(TNF)- α をはじめとする種々の炎症性サイトカインの発現が亢進している。本研究の目的は、心不全の発症と進展における炎症性サイトカインの役割を明らかにし、炎症制御にもとづく新たな心筋症・心不全治療戦略を開発することである。今回、TNF- α 誘発性心筋症におけるマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)-2の役割について検討したので報告する。

【方法】MMP-2活性化を長期的・選択的に抑制するため、心筋特異的TNF- α 過剰発現(TG)マウスにMMP-2遺伝子欠損マウスを交配した。12週齢において、生存率、心エコー、心臓カテーテル検査、病理組織学的解析、MMP/TIMP発現、サイトカイン発現を比較検討した。

【結果】TGマウスにおける心筋のMMP-2活性の上昇は、MMP-2遺伝子を欠損させることにより完全に抑制されており、他のMMPおよびTIMPに有意な影響はなかった。TGマウスは、MMP-2遺伝子の欠損により生存率がさらに低下し、心機能低下がさらに増悪した。TGマウスでは心筋細胞肥大と間質線維化を認めたが、MMP-2遺伝子の欠損により有意な変化は認めなかった。TGマウス心筋ではTNF- α が増加していたが、この増加はMMP-2遺伝子の欠損により有意な変化は認めなかった。さらに、その他の炎症性サイトカインの発現にも影響しなかった。一方、TGマウスにおける炎症細胞浸潤の程度は、MMP-2遺伝子の欠損により有意に増強した。

【総括】サイトカイン誘発性心筋症モデルにおいて、MMP-2遺伝子を選択的に欠損させることにより、心筋炎症さらには心不全が増悪し、生存率が低下した。MMP-2は、これまで細胞外マトリックスのリモデリングにおいて促進的に作用していると考えられてきたが、サイトカイン誘発性心筋症においては心保護的に作用している可能性が示唆された。

GAP junctionタンパクCx43を発現する舌組織由来組織幹細胞を用いた心筋再生

山口大学大学院医学研究科器官病態内科学

三浦 俊郎／渋谷 正樹／王 瑞鵬／深川 靖浩／河村 修二／松嶋 敦／中村 浩士／松崎 益徳

【背景】近年、心臓、骨髄、骨格筋、脂肪組織などより相次いで心筋に分化する組織幹細胞が同定された。しかし心筋への分化の効率はきわめて低く実用性には問題がある。一方、骨格筋芽細胞はその増殖性において有望な細胞供給源であるが、GAP junctionタンパクCx43が発現せず、レシピエント細胞との電氣的協調性がなく、不整脈の原因となる可能性が指摘されている。そこで、GAP junctionタンパクCx43を発現し、自己拍動する心筋細胞に効率よく取りうる新たな幹細胞供給源が望まれている。

【目的】心筋に分化しうる新しい幹細胞供給源を探索し、その心筋への分化能、遺伝子発現、細胞内カルシウム動態、自己拍動について検討すること。

【方法】6-8週齢のオスC57/BL6マウスの舌筋、大腿筋、心筋をコラゲナーゼ(0.2%)溶液内で30分間振盪し、単離した細胞をstem cell antigen(SCA-1)、CD38にて標識しcell sorterを用いて各フラクションに分離採集した。これらの細胞をDMEM+10%FBSに成長因子を加えた培地で培養し、1週間後および2週間後の時点で心筋特異的マーカーであるNKX2.5、connexin 43、ANPの発現についてRT-PCRおよび免疫染色法で検討した。また、細胞の自己拍動の有無、細胞内カルシウムトランジェント、隣接する細胞との電氣的協調について検討した。

【結果】マウス舌筋由来細胞のみから高率に自律拍動する細胞が得られた。分画として、SCA1(+)/CD38(-)およびSCA1(-)/CD38(-)に含まれる細胞群であった。マウス舌筋由来の拍動する細胞は、NKX2.5、connexin 43、ANPを0 Wには発現しなかったが、1-2 W後にはこれらの発現を認めた。また、細胞の収縮は、細胞内カルシウムトランジェントの検討から、隣接細胞と同期している可能性が示された。

【結論】舌筋由来組織幹細胞は心筋特異的マーカーを発現し、心筋にきわめて類似した細胞に分化することが示され、新たな心筋再生の細胞源となる可能性が示された。

心筋細胞内脂質代謝とGq蛋白共役型受容体シグナルの制御

山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野

竹石 恭知／久保田 功

Gq 蛋白共役型受容体シグナルの持続的かつ過剰な活性化が、心肥大・心不全の発症と進展に重要な役割を演じていることが多くの研究から明らかになった。受容体刺激によりホスホリパーゼCが活性化され、ジアシルグリセロール(DAG)が生じる。DAGはprotein kinase C(PKC)を活性化し、PKCは核内の遺伝子発現調節、蛋白リン酸化など多様な作用を有し、心肥大と心不全の発症に深く関与している。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DAGをリン酸化(不活性化)してホスファチジン酸へ変換し、細胞内DAG量を調節することで、PKC活性を制御しようと考えられている。

エンドセリン(ET-1)による細胞内シグナル活性化へのDGK ζ の影響について検討した。ET-1によりPKCの活性化を認めたが、アデノウイルスベクターを用いてDGK ζ 遺伝子を導入した培養心筋細胞では、ET-1によるPKCの活性化は抑制された。また、ET-1による転写因子AP1のDNA結合活性の増加、ANF遺伝子の発現、蛋白合成の増加、心筋細胞面積の増大もDGK ζ により抑制された。

次に、DGK ζ の機能を*in vivo*で検討するため、DGK ζ 遺伝子を心臓にのみ過剰発現したトランスジェニックマウス(DGK ζ -TG)を作成した。DGK ζ -TGマウスは野生型マウスと比較してフェノタイプに異常を認めなかった。野生型マウスで認められたアンジオテンシンIIとフェニレフリンの持続投与によるPKCの活性化は、DGK ζ -TGマウスでは抑制された。また、アンジオテンシンIIとフェニレフリンによるANF遺伝子の発現と左心室重量の増加は、DGK ζ -TGマウスでは抑制された。

DGK ζ は心筋細胞においてGq蛋白共役型受容体シグナルの調節因子として機能することが明らかになり、心肥大・心不全治療の標的分子となる可能性が示唆された。

ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討

東京慈恵会医科大学内科学(青戸病院総合診療部)¹⁾／東京慈恵会医会大学DNA研究所²⁾

鈴木 英明¹⁾／武田 信彬¹⁾／荒川 泰弘²⁾

【目的】細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは、拡張型心筋症において心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的増加し、組織の硬化を招くとされている。我々はその病因の解明の一助として、心筋に特異的に存在するタンパクならびに相互分子をクローニングし、心筋症との関連を明らかにすることを目的に検討している。

【方法】ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子に存在するDNAモチーフ(BCN-1)を用いて、イーストのハイブリッドシステムによるスクリーニングを繰り返し施行した。

【結果】今回、酵母のツーハイブリッドスクリーニングを施行し、トロポニンI(cTnI)のアイソフォーム(STN)をクローニングした。STNは119個のアミノ酸からなり、cTnIのエクソン5,6を欠損した構造を示していた。ノーザンブロットでは、mRNAは脳、肝、腎臓、精巣には発現せず、cTnIと同様に心臓に特異的に発現を示した。また、GFP融合蛋白の細胞内分布を共焦点顕微鏡にて調べたところ、COS7細胞では、STNはcTnIとは異なる分布を示した。STNは、構造上トロポニンT(TnT)との結合部位(アミノ酸40-98)を欠損していたため、In cellのツーハイブリッドアッセイにてその結合を確認したところ、STNはTnTの結合力がcTnIに比較して著明に低下していた。

【結語】TnTとの結合力を欠き、心臓に特異的に発現するトロポニンIのアイソフォームをクローニングした。今後の心筋症家系などにおけるSTNの発現検索などが心筋症等におけるラミニン増加への関与を解明する一助となりうることが示唆された。

拡張型心筋症に見出された α Bクリスタリン変異の機能解析

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野¹⁾／久留米大学医療センター²⁾

木村 彰方¹⁾／稲垣 夏子¹⁾／林 丈晴¹⁾／有村 卓朗¹⁾／古賀 義則²⁾

【目的】拡張型心筋症(DCM)の約20-30%は遺伝性であり、その多くは常染色体優性遺伝形式をとるが、既知の原因遺伝子(タイチン、デスミン、サルコグリカン、ディストロフィンなど)に変異が見出される症例は遺伝性DCMの約10%に過ぎず、さらに未知の原因遺伝子の同定が必要である。本研究では、心筋特異的に発現するタイチンN2-Bドメインに結合する α Bクリスタリンの遺伝子(CRYAB)を原因候補遺伝子として、DCM患者における変異検索とその機能解析を実施した。

【方法】家族性DCM症例34例についてCRYAB遺伝子変異を検索した。見出された変異について、哺乳動物細胞2ハイブリッド(M2H)法を用いてタイチンN2-B領域との結合性を検討した。さらに、他の拡張型DCM患者に以前見出されたタイチンN2-B変異(Gln4053ter)によるCRYAB結合性変化をM2H法で検討した。

【結果】家族性DCM症例1例にArg157His変異を見出した。この変異は、 α Aクリスタリンおよび α Bクリスタリンのいずれでも進化上よく保存されたアミノ酸の置換であり、一般健常者200名には認められないため、本症例のDCM病因と関連することが示唆された。なお、本症例は高齢発症(71才)例であるが、同胞6名中2名が突然死(60才および72才時)、2名がDCM(56才および66才)であった。 α Bクリスタリンは虚血による心筋障害への抵抗性を担うことが知られているsmall heat shockタンパクであるが、タイチンN2-B領域およびI26/I27領域(いずれもサルコメアI帯に対応)に結合することが最近報告された。そこで、M2H法を用いて変異による機能変化を検討したところ、N2Bへの結合性は正常の約半分に結合性が低下していたが、I26/I27への結合性は変化していなかった。一方、タイチンN2-B変異では α Bクリスタリン結合性が約40%まで低下していた。これらのことから、 α Bクリスタリン・タイチン連関の異常は、サルコメアにおける虚血障害抵抗性を減弱させることで、高齢発症DCMの病因となることが強く示唆された。

【総括】CRYAB変異は新たな拡張型心筋症の原因遺伝子である。

転写因子Hypoxia Inducible Factorの心筋リモデリングにおける役割の検討

東京大学大学院医学系研究科循環器内科

前村 浩二／原田 智浩／永井 良三

【背景・目的】転写因子Hypoxia Inducible Factor (HIF)は低酸素への細胞応答に重要な役割を果たす。最近HIFが低酸素への反応のみでなく、アンジオテンシンⅡやサイトカイン、酸化ストレスによる臓器障害にも関与していることが提唱されている。本研究では、HIFの心筋リモデリングでの役割について検討するために心筋特異的にHIFの作用を抑制したマウスを樹立し、このマウスに低酸素およびアンジオテンシンⅡを負荷し、その効果を検討した。

【方法】 α MHCプロモーターの下流にドミナントネガティブEPAS1 cDNAを結合したコンストラクトを作成しトランスジェニックマウス(dn-EPAS1 Tgm)を作成した。10%酸素に設定したhypoxic chamberで右室肥大モデルを、また浸透圧ポンプを用いたアンジオテンシンII負荷にて両室肥大モデルを作成した。

【結果】(1)低酸素負荷により、右心室重量/体重比の増大は野生型マウスに認められたが、dn-EPAS1 Tgmでは抑制されていた。しかし、生存率はdn-EPAS1過剰発現マウスで低下していた。(2)アンジオテンシンII負荷により、野生型では心肥大と、冠動脈周囲、心筋間質の線維化を認めたが、dn-EPAS1 Tgmではこれらの変化は軽度であった。酸化ストレスのマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)+ 4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)の心筋での産生量は野生型で多く、dn-EPAS1 Tgmにおいて抑制されていた。

【総括】以上より、(1)HIFは低酸素による心リモデリングと関連し、これは適応現象の一つとして重要であることが示された。(2)HIFはアンジオテンシンによる心リモデリングに関与し、この機序として酸化ストレスの関与が示唆された。

重症心不全症例に対する補助人工心臓および心臓移植の適応の現況

国立循環器病センター

中谷 武嗣／友池 仁暢／北村惣一郎

【目的】従来の治療法の限界となった心不全において、心臓移植対象例に対しては、補助人工心臓(VAS)の適応が考慮される。今回我々の経験を報告する。

【対象】1)VAS症例：1994年以降重症心不全で心臓移植が考慮され、VAS装着を必要とした67例。2)移植症例：原病は、拡張型心筋症12例、拡張相肥大型心筋症1例で、平均39歳。

【成績】1)使用したLVAは、体外設置東洋紡LVA56例(左房脱血11例、左室脱血45例)、体内設置携帯型6例(HeartMate VE3例、Novacor3例)および両心補助5例である。装着期間は施行中を含め平均411日で、内19例(国内11例、渡航8例)が平均523日後に移植された。30例は平均395日後に死亡したが、主な死因は感染・脳血管障害であった。8例で心機能改善を認め平均149日後に離脱し、計画的に離脱した7例は長期生存している。10例は補助継続中である。2)全例status 1での待機で、内11例がLVA装着、2例がカテコラミン持続投与中であった。最長LVA補助期間は1227日で、待機期間は2015日に及んだ。1例を4年2ヵ月後に失ったが、9例が社会復帰している。

【考察・結語】心臓移植対象例においてLVAによる3年以上の長期補助が可能となり、心機能回復例も認めている。また心臓移植例の成績は良好であった。心臓移植の定着化とともに、QOLに優れたLVAの臨床導入が望まれる。また、今後、LVAによるdestination therapyについても検討が必要と思われる。

慢性心不全における温熱療法の効果：血中グレリン濃度と食欲に関する検討

鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学

福留 剛／宮田 昌明／木原 貴士／新里 拓郎／池田 義之／増田 彰則／尾辻 豊／鄭 忠和

【目的】慢性心不全(CHF)患者に対する温熱療法の効果を、心機能と血中グレリン濃度及び食欲に関して検討すること。

【方法】NYHA分類Ⅱ～Ⅲ度のCHF患者25名(平均年齢 68 ± 7 才、男性15名・女性10名、拡張型心筋症19名・虚血性心筋症6名)を温熱療法群14名、対照群11名に割付けた。温熱療法群は 60°C 15分間の乾式サウナ浴と出浴後30分の安静保温、対照群は 24°C 45分間の安静臥床を、それぞれ1日1回、週5回、2週間実施した。前後で経胸壁心エコーによる左室拡張末期径(LVDd)、左室駆出率(EF)、左室及び右室のTei index、胸部X線による心胸郭比(CT)、血中グレリン及び成長ホルモン(GH)、ANP(心房性利尿ペプチド)、BNP(脳性利尿ペプチド)、ノルアドレナリン(NAD)を測定し、比較検討した。また、食欲に関する5つの質問事項を設定し、それぞれ0～2点で点数化し、合計0～10点でappetite scoreとして評価した(高点であるほど食欲低下重症)。

【結果】2週間の温熱療法で、LVDd及びCTRは有意に縮小し($62 \pm 9 \rightarrow 59 \pm 10 \text{ mm}$, $58 \pm 8 \rightarrow 55 \pm 7\%$, $p < 0.01$)、EF及び左室Tei indexは有意に改善されたが($31 \pm 8 \rightarrow 36 \pm 8$, $0.86 \pm 0.32 \rightarrow 0.70 \pm 0.21$, $p < 0.01$)、右室Tei indexは有意な変化を認めなかった。血中ANP、BNP及びNADは有意に低下し($149 \pm 63 \rightarrow 118 \pm 57 \text{ pg/ml}$, $207 \pm 96 \rightarrow 145 \pm 65 \text{ pg/ml}$, $p < 0.01$, $432 \pm 208 \rightarrow 310 \pm 154 \text{ pg/ml}$, $P < 0.05$)、血中グレリン及びGHは有意に増加した($197 \pm 95 \rightarrow 240 \pm 101 \text{ fmol/ml}$, $1.9 \pm 1.2 \rightarrow 2.9 \pm 2.0$, $P < 0.01$)。質問票によるappetite scoreも有意に改善した($2.0 \pm 0.7 \rightarrow 1.1 \pm 0.6$)。対照群では、いずれも有意な変化を認めなかった。

【結論】CHF患者に対する温熱療法によって血中グレリン濃度は上昇し、左心機能及び食欲の改善がみられた。温熱療法はCHF患者に対する包括的治療として期待される。

本邦の拡張型心筋症患者に対して免疫吸着療法を実施するための基礎的検討

北里研究所病院内科¹⁾／慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科²⁾

馬場 彰泰¹⁾／吉川 勉²⁾／島田 恵¹⁾／赤石 誠¹⁾／土本 寛二¹⁾／小川 聡²⁾

【背景】拡張型心筋症に対する治療法として病因論的アプローチがなされている。われわれは本症の体液性免疫異常の検討を通じて、本邦患者の約65%の症例で免疫吸着療法が有用である可能性について報告した。血液中に存在する心臓にとって"toxic"な免疫グロブリンGを除去することで心機能改善を目的とする本治療法は、急性の血行動態効果のみならず慢性の予後改善効果も報告されつつあり、本邦においても実施が望まれている。

【目的】本邦で臨床汎用されている免疫吸着剤によって、拡張型心筋症患者血中に存在する「心抑制性心筋抗体」の陰性変力作用が消失するか検証する。あわせて各自己抗原($\beta 1$ アドレナリン受容体およびM2ムスカリン受容体)によって、この効果に差がないかも検討する。

【方法】「心抑制性心筋抗体」陽性の拡張型心筋症患者保存血清を使用した。このうち、ELISA法によって $\beta 1$ アドレナリン受容体あるいはM2ムスカリン受容体に対する自己抗体が陽性であった42例において、以下の実験を実施した。まずトリプトファン免疫吸着剤(イムソーバ、旭メディカル)と患者血清を同量(500 μ L)ずつ混合し、37℃下で2時間反応させた。遠心分離し吸着剤を沈殿させ、その上清を『吸着後血清』とした。『吸着前血清50 μ L+生理食塩水50 μ L』と『吸着後血清100 μ L』を、それぞれ16日齢の有性鶏卵の気室より添加して、その左室駆出率を心エコー図検査によって測定した。対照群として、健常者10名と非DCM心不全患者(自己抗体陰性)12名の血清を使用した。さらに、 $\beta 1$ 受容体抗体・M2受容体抗体陽性の慢性心筋炎患者1例についても、同様の実験を行った。

【結果】全42例において、 $\beta 1$ 受容体抗体は26例、M2受容体抗体は20例が陽性であった。健常者10名の左室駆出率は、吸着前血清 $83.6 \pm 1.7\%$ 、吸着後血清 $86.5 \pm 1.2\%$ と有意な変化は認めなかった。非DCM心不全患者12名においても同様であった(吸着前血清 $88.1 \pm 1.1\%$ 、吸着後血清 $87.2 \pm 4.7\%$)。しかし全42例の左室駆出率は、吸着前血清 $65.6 \pm 7.8\%$ から吸着後血清 $86.4 \pm 3.4\%$ と有意に増加した。この陰性変力作用の消失効果は、 $\beta 1$ 抗体陽性者($65.7 \pm 8.5\%$ 、 $86.3 \pm 3.6\%$)ならびにM2抗体陽性者($65.9 \pm 8.0\%$ 、 $86.0 \pm 3.2\%$)においても同等に認められた。さらに慢性心筋炎患者においても左室駆出率は吸着前血清 62.5% から吸着後血清 85.7% と改善を認めた。

【総括】トリプトファン免疫吸着剤によって、拡張型心筋症患者血清が有する陰性変力作用は消失した。この効果は患者血中の薬剤・サイトカインなどの他の液性因子の影響ではなく、「心抑制性心筋抗体(免疫グロブリン)」除去によるものと考えられた。また自己抗原種にかかわらず効果が認められたことから、免疫吸着療法が有効な症例は $\beta 1$ 受容体抗体陽性者に限定されないと考えられた。

積層化心筋細胞シートにおける電気生理学的解析

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

清水 達也／原口 裕次／岡野 光夫

【目的】我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いシート状の心筋細胞(心筋シート)の作製に成功している。細胞外マトリクスが無傷で存在する心筋シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。積層化心筋シートは電氣的に結合し、同期して拍動することが明らかとなっている。本研究では、積層化心筋シートを電気生理学的に解析し、2枚の心筋シートが積層後電氣的に結合するまでの時間を測定し、またその結合メカニズムを解明することを目的とした。

【方法と結果】新生仔ラット由来の心筋細胞を温度応答性培養皿に播種し、数日間培養後、温度降下処理により心筋シートを得た。重層した心筋シートが電氣的に結合するまでの時間を、多点細胞外電位記録システムで測定したところ、2枚の心筋シートは積層後 34 ± 2 分で電氣的に同期することが分かった。この時点では各々の電極上に到達する電位には時間差があったが徐々に短縮し 46 ± 3 分後に完全に同期した。次に低分子蛍光物質カルセインを一方の心筋細胞シートに導入して重層化したところ、30分以内にカルセインが他方の細胞シートに移動することが明らかとなった。さらに免疫組織学的解析により重層化心筋細胞シート間には1時間以内にギャップ結合構成蛋白質であるコネキシン43が発現していることが示された。この時コネキシン40ならびに45の発現は認めなかった。

【総括】2枚の心筋シートは重層後、極めて早期にコネキシン43を介したギャップ結合を形成し、電氣的に結合することが明らかとなった。温度応答性培養皿を用い蛋白分解酵素を用いずに回収した心筋シートにはギャップ結合前駆体が存在し、さらに細胞シート同士が直接接着することにより速やかな電氣的結合が可能になると考えられた。

特発性心筋症における頻度依存性心筋収縮弛緩予備能の破綻

名古屋大学大学院器官制御内科学

井澤 英夫／室原 豊明

非閉塞性肥大型心筋症(HCM)および拡張型心筋症(DCM)を対象にカテ先型マノメーターを左室内に留置し、仰臥位運動負荷試験および右房ペースング負荷試験中の心筋収縮弛緩特性を評価するとともに、心筋生検を行い、心筋細胞内筋小胞体 Ca^{2+} 調節蛋白の発現を解析した。さらに、DCM症例の予後との関連について検討した。

【結果】HCM患者をペースングによる心拍数(HR)増加に伴い $\text{LVdp/dt}_{\text{max}}$ が持続的に増大する症例(7例)と $\text{HR-LVdp/dt}_{\text{max}}$ 関係が二相性を呈する症例(7例)との二群に分類した。左室肥大の程度は二相性を呈する症例の方が重症であった。SERCA2mRNAレベルは二相性を呈する症例が有意に低値であった。一方、Ryanodine受容体、Phospholamban、Calsequestrin、および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体のmRNAレベルに両群間で差はなかった。拡張相にあるHCM症例は、収縮機能が正常な症例と異なり、頻脈による $\text{LVdp/dt}_{\text{max}}$ 増大に対する運動による増幅効果は認めなかった。次に、NYHA IまたはIIの比較的軽症なDCM患者(36例)を対象にペースング負荷試験を行った。全例で頻脈による $\text{LVdp/dt}_{\text{max}}$ 増大応答が抑制されていた。また、Baselineでは認めなかった機械的交互脈がペースングにより誘発される症例(14例)が存在することを見いだした。ペースングにより機械的交互脈が誘発された症例は、誘発されなかった症例と比較し、EFやBNP濃度に差はなかったが、平均3.7年間の追跡調査にて心事故発生率が有意に増大していた。また、心筋のSERCA2mRNAレベルが有意に低下していた。

【結論】HCMでは頻度依存性左室収縮予備能の低下を示す症例が存在し、SERCA2発現の減少が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。DCMでは頻脈誘発機械的交互脈の出現する症例が存在し、SERCA2発現の減少が関与している可能性が示唆されるとともに、臨床上有用な、予後予測因子であることが明らかとなった。

【背景】典型的拡張型心筋症(DCM)は内腔拡張、収縮の低下、典型的肥大型心筋症(HCM)は壁肥厚、収縮力低下のないことを前提とする。HCMとDCMとは独立した病態と理解されてきたが、拡張相肥大型心筋症(d-HCM)の存在、DCMのreverse remodelingが意味することは、DCM、HCMのいずれでもない形態(中間型もしくは型不明型心筋症)が存在することを意味する。

【目的】型不明型心筋症の相対的位置付けを中間型の偏位ベクトル(拡張、肥厚)から検討した。

【方法】心筋症の左室形態は、心エコー図計測値の壁肥厚(>12mm)、左室拡張期内径拡大(>55mm)、収縮低下の有無で8型に分類できる。+/+で表すと、正常は[- - -]、肥大型心筋症(HCM)は[+ - -]、拡張型心筋症(DCM)は[- + +]。残りの5型はHCM、DCMのいずれでもない型不明型心筋症(中間型)となる。心筋症連続心筋生検1388例より、拘束型心筋症、不整脈源性右室異形成症、特定心筋疾患を除外した471症例における中間型の経時的な左室形態の変化、組織所見などを検討した。

【結果】HCM 240、DCM 120、中間型111例。経過追跡した61例中、拡張例14(HCM→中間型:3、中間型→DCM:10、HCM→中間型→DCM:1)、肥厚例13(DCM→中間型:5、中間型→HCM:8)が存在した。高度錯綜配列、ミトコンドリア心筋症類似の空胞変性、心疾患家族歴は、それぞれ14:15:6%、14:31:19%、29:15:13%に存在した。

【総括】典型的HCMとDCMとの狭間にある型不明型心筋症は、狭義の心筋症の約1/4を占め、d-HCMの途中経過のみならずHCMに伸展する例も含む、多様な形態を示した。空胞変性の頻度が高く、単なるHCMからの移行例、いわゆるreverser emodelingでない可能性がある。

放射性同位元素(RI)標識抗テネイシンC抗体による炎症性心疾患の画像診断

国立国際医療センター腎臓・循環器科¹⁾／神戸薬科大学生命分析化学²⁾
／千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学³⁾／放射線医学総合研究所画像医学部分子トレーサ開発室⁴⁾
／三重大学大学院修復再生病理学⁵⁾

廣江 道昭¹⁾／小林 典裕²⁾／上原 知也³⁾／小高 謙一⁴⁾／今中一吉田 恭子⁵⁾／吉田 利通⁵⁾

心筋組織での炎症が、心室リモデリングの進展に大きく影響することは、よく知られている。従って、心筋局所の炎症を正確に把握することは、拡張型心筋症と慢性心筋炎やサルコイドーシスといったいわゆる炎症性心筋疾患の鑑別診断のみならず、治療法の最適化や予後予測に極めて重要であると考えられる。我々はこれまで、テネイシンCが正常心筋に発現せず、組織障害・炎症に伴って特異的に発現するという性質を利用すれば、拡張型心筋症の病態分類のための指標の一つになるのではないかと考えて、研究をすすめてきた。実際、拡張型心筋症患者の心筋組織では、テネイシンCの発現が見られる例があり、その程度は多彩である。また、心不全の程度を反映して血中テネイシンC濃度が上昇している症例も多い。しかしながら、テネイシンCは心筋組織特異的に発現する分子ではなく、肺、肝を始め全身の組織で産生されるため、心筋組織局所での発現をとらえることが必要である。我々は、病的な心筋でテネイシンC分子が免疫組織化学的に簡単に認識できるほど十分量発現すること、細胞外マトリックス分子であるため生体内で抗体がアクセスしやすいこと、特に炎症部位は血管透過性の亢進あるいは破壊されているため血管内へ投与された抗体が近づきやすいことから、RI標識抗テネイシンC抗体による免疫シンチグラフィを検討し、心筋炎や心筋梗塞などラットモデル心での画像診断が可能であることを報告した。しかし、ヒトへの臨床応用には、組織細部への浸透性、標識および抗体分子自身の生体内での安定性の改善による診断精度の向上のみならず、分子の抗原性を可能な限り低くするなど安全性の確保、さらに分子の安定大量供給法の確立といった医療経済性をも考慮する必要がある。現在我々は、抗体のヒト化、リコンビナント蛋白の作製など、実際に臨床で利用できる体内診断薬の開発を試みている。

1. 心筋症の予後調査

1999年の全国疫学調査2次調査をもとに5年後の予後調査を実施した最終の予後解析対象症例3,317人の内訳は、拡張型心筋症1,627例、肥大型心筋症1,693例、拘束型心筋症22であり、追跡実施状況は以下の通りであった。

- ①2003年12月31日までの生存確認：1,565例 ②転院などによる観察打ち切り：1,075例
③死亡にて観察打ち切り：442例 ④途中観察打ち切りにてその後不明：235例

転院などにより観察打ち切りとなっている1,075例については、住民票(除票)請求にて生死確認調査を実施した。今後、各種の要因ごとの5年生存率算出による予後規定要因の分析を実施する予定である。

2. C型肝炎ウイルス (HCV) による心筋症の発症機序に関する研究

心筋炎多施設治療試験(Myocarditis Treatment Trial)におけるC型肝炎ウイルス感染頻度の研究で、HCV抗体は、1,355例中59例(4.4%)で陽性であり、米国における一般住民のHCV感染率の1.8%と比較すると患者群で有意に高い陽性頻度を示した。HCV抗体陽性頻度は各施設により差が大きく最高15.4%を示し、9施設で5%以上が陽性であった。

NT-proBNPは、HCV抗体陽性例42例全例で高値(55pg/ml)を示し、HCV抗体陰性例($n=1,276$)に比較し有意に高値を示した($10,000\pm5,860\text{pg/ml}$ vs $2,508\pm160\text{pg/ml}$)。

また、広島大学により実施された住民検診におけるHCV抗体陽性例では、NT-proBNPは50例中42例で高値を示し(平均値 $186\pm29\text{pg/ml}$)、HCVによる心筋障害の存在が示唆された。

今後、国際共同研究により、世界各国における調査を実施するとともに、新しく開発した免疫組織染色法によりHCV心筋症の病態をさらに明らかにする。

3. 心筋症における炎症、免疫に関する研究

これまでの実験的研究によって得られた心筋症の病態におけるマスト細胞およびそのメディエータの役割、抗心筋トロポニンI抗体などに関する知見をもとに、臨床例におけるこれらの意義を検討する。

拡張相肥大型心筋症の長期予後

東京女子医科大学病院循環器内科¹⁾／東京女子医科大学附属青山病院循環器内科²⁾

梶本 克也¹⁾／河原井浩孝¹⁾／川城 直美¹⁾／寺嶋 豊¹⁾／八代 文¹⁾／今井 拓¹⁾／弓野 大¹⁾
／水野 雅之¹⁾／志賀 剛¹⁾／松田 直樹¹⁾／萩原 誠久¹⁾／川名 正敏²⁾／笠貫 宏¹⁾

【背景・目的】肥大型心筋症(HCM)の約10-15%の症例が拡張型心筋症様の病態(拡張相肥大型心筋症；D-HCM)へと移行すると報告されているが、そのD-HCMの臨床像および長期予後について未だ十分検討されていない。今回我々は、D-HCMの臨床像および長期予後について検討した。

【方法】当院でHCMと診断された連続467例(平均年齢 $=46\pm15$ 歳；非閉塞型HCM； $n=361$ 、閉塞型HCM； $n=106$)を対象とした。この467例のHCM症例のうち、臨床経過中に心エコーにて左室拡張末期径(LVDd) $>55\text{mm}$ または左室駆出率(LVEF) $<50\%$ を認めた症例をD-HCMと定義して、その発現頻度、臨床像、および心臓死の頻度について評価した。平均観察期間は、 17 ± 7 年であった。

【結果】HCMと診断された467例中、34例(7.3%)でD-HCMと診断された(D-HCM診断時の平均年齢 $=43\pm16$ 歳)。D-HCM診断時の平均LVDdおよびLVEFは、それぞれ $58\pm6\text{mm}$ 、 $37\pm12\%$ であった。また、34例のD-HCM症例中、HCMおよび突然死の家族歴を有する症例は、それぞれ13例(38.2%)、9例(26.5%)であった。HCMと診断後平均17年の観察期間中、34例中19例(56%)で心臓死を認めた。この心臓死の内訳は、心不全死が5例、突然死が14例(心臓突然死； $n=8$ 、植込み型除細動器適切作動； $n=5$ 、心肺蘇生既往； $n=1$)であった。

【結語】我々の施設におけるHCM症例において、D-HCMへ移行する頻度は必ずしも高くはなかったが、D-HCMと診断された症例の心臓死、特に突然死の頻度が高いことが明らかになった。以上より、D-HCMと診断された症例に対して、心不全死のみでなく突然死に対しても今後積極的な治療戦略を検討する必要があることが示唆された。

わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像 ～JCARE-CARD研究の中間集計結果より～

北海道大学循環病態内科学
筒井 裕之/JCARE研究班

わが国では循環器領域における疫学研究データが極めて乏しいため、慢性心不全の臨床像、治療、予後などの実態は不明である。欧米で行われた研究結果をそのままわが国にあてはめることができないのは言うまでもなく、わが国独自の研究が必要である。さらに、大規模臨床試験の患者は、年齢や基礎疾患など実際の患者(Real world)とは大きく異なっており、一部の患者しか反映していないことから、臨床試験と並行して観察研究が必要である。

我々は、7年前より福岡市において慢性心不全にて入院治療を受けた患者を対象とした登録観察研究を行ってきた。さらに、平成16年より全国レベルで患者登録を行う「慢性心不全の増悪のため入院治療を要する患者を対象とした調査研究(JCARE-CARD研究)」を開始した。本研究は、わが国の慢性心不全患者の基礎疾患、合併症、重症度などの臨床像や治療、予後などの実態、さらに予後の規定因子を明らかにするものである。また、実際の患者で治療法の有効性を解析することによって、無作為コントロール試験では得られないわが国独自のエビデンスを創出していくことを目標としている。さらに、将来にわたって継続し、循環器領域における登録観察研究のモデル研究となることも目指している。

JCARE-CARD研究によると、拡張型心筋症は慢性心不全の原因心疾患の18%をしめた。JCARE-CARD研究の中間集計であきらかとなった拡張型心筋症を基礎とする慢性心不全患者の臨床的特徴を報告する。

新しい心不全治療薬としてのヒスタミンH2受容体遮断薬

国立循環器病センター
金 智隆/北風 政史/友池 仁暢

【背景】心不全に対してACE I や β 遮断薬など様々な薬が臨床応用されているが、心不全は未だに繰り返す入院や死亡原因の主たる理由の内の一つである。心不全状態ではカテコラミンやサイトカイン、アンギオテンシンIIなどの神経体液性因子が上昇することが知られている。ヒスタミンは胃潰瘍の原因となることで知られており、そのレセプターであるH2レセプターのブロッカーは潰瘍治療薬として臨床応用されている。我々は以前の論文で、データマイニング手法を用いることにより、ヒスタミンH2レセプターブロッカーが心不全の病態改善に有効であるとのデータを示したが、ヒスタミンH2レセプターは心筋に発現しており β 受容体と同様にGs蛋白に結合していることが知られている。実際にヒスタミンがcAMPを介して陽性変力作用を惹起することやヒスタミンH2レセプターブロッカーが心拍出量を低下させることが報告されている。もしそうであるならば、ヒスタミンH2レセプターブロッカーは β 遮断薬と同様に心不全に有効であることは容易に想像できる。我々はヒスタミンH2レセプターブロッカーのファモチジンを用いて、かかる薬剤が心不全の病態改善に有用であるかを検討した。

【方法】はじめに後ろ向き研究として、159人のファモチジン投与を受けている有症状の心不全症例を選び、年齢・性別・基礎疾患をマッチングさせたファモチジン投与を受けていない心不全症例をランダムに選び出し血中BNP値や心臓超音波検査による心機能について比較検討した。また、前向き介入研究として50人の心不全症例をファモチジン群と以内服保護剤で治療をしたコントロール群の二群に無作為に群分けを行い投薬後の血中BNP値や心臓超音波検査による心機能、NYHA心機能分類の変化及び再入院の有無について観察した。

【結果】後ろ向き研究において、ファモチジン群は対照群に比し左室短縮率の有意な変化は認めなかったものの、収縮期血圧・拡張期血圧・左室拡張末期径・左室収縮末期径・血中BNP値が有意に低値であった。(各群に投薬内容の差は認めなかった。)

前向き研究において、ファモチジン群ではNYHA心機能分類・血中BNP・LVDd・LVDsが有意に改善すると共に再入院率はコントロール群に比し有意に低値であった。(4% 対24%)

【結論】ファモチジンは β 遮断薬など従来治療を既に受けている心不全症例において自覚症状と左室のリモデリングを改善し、新しい心不全治療薬として有効であることが示唆された。

奥出雲における臨床疫学研究第1報

血清心筋トロポニンTを用いての潜在する心筋傷害の探知の試み

島根大学医学部附属病院循環器内科¹⁾／京都大学大学院医学研究科循環器内科²⁾
公受 伸之¹⁾／島田 俊夫¹⁾／村上 陽¹⁾／佐藤 秀俊¹⁾／石橋 豊¹⁾／松森 昭²⁾

基本健康診断受診者に血清心筋トロポニンT(cTnT)を測定することにより、潜在する心筋傷害を探知すること。奥出雲地方における健康診断受診者585人を対象とした。心筋傷害スクリーニングとしてcTnTを、心臓負荷マーカーとして血漿BNPを測定した。血清cTnT、血漿BNPともに化学発光法を用いて測定した。血清cTnTは584名中54名(9.2%)で陽性であった。血漿BNPを584名で測定。測定値の範囲は0.4～158.2pg/mlであった。584名中58名(14.6%)が血漿BNPレベルが40pg/ml以上。血漿BNPレベルが20pg/mlを越えた受診者は584名中274名(46.4%)。HCVの陽性率についても検討したが2%であった。cTnTについてはカットオフ値を0.01ng/ml以上を陽性とし従属変数にcTnTを選びロジスティック回帰分析を行った。その結果心電図による心肥大が唯一独立した統計上の有意な因子として評価された。心筋トロポニン高値の要因についてはさらなる検討が必要と思われる。

ノギンによるBMPシグナルの一過性の抑制はマウス胚性幹細胞を心筋細胞に分化させる

慶應義塾大学医学部再生医学
湯浅 慎介／福田 恵一

胚性幹細胞は心筋細胞に分化しえる魅力的な幹細胞である。胚性幹細胞より心筋細胞を分化誘導する方法は現在まで様々なものが報告されているが、そのどれも満足のいくものではない。心筋細胞の発生は全身の臓器の中でも最も早期、すなわち原腸陥入が始まり三胚葉が形成され始めるマウスの胎生7.0日に始まる。心筋細胞の初期発生における重要な因子は過去に様々なものが報告されており、BMP、Wnt、FGF、IGF-1などがあるが、これらを胚性幹細胞に添加しても、心筋細胞への分化誘導効率の上昇を確認しえなかった。さらに心筋細胞発生に最も重要な因子と考えられているBMPを添加した際には心筋細胞への分化誘導効率が若干低下することが確認された。我々はまず心筋細胞の発生過程を見直す必要があると考え、過去に報告されている因子とは別の様々な因子の発現状態を調べることにした。この結果、心筋細胞の発生領域においてBMP antagonistのNogginが一過性であるが非常に強く発現していることが分かった。これは心筋細胞の発生自体にBMPを阻害するNogginが必要であるが、発生後の心筋細胞の成熟と維持にはNogginの存在は不都合であると考えられる。心筋予定領域の発生過程におけるNogginの発現状況を参考に、胚性幹細胞から心筋(前駆)細胞への分化誘導条件について種々検討を重ねた結果、培養時の初期にNogginを添加することにより、自律拍動能を有する心筋細胞が、選択的かつ高率に産生されることを見いだした。過去のBMP signalの心筋細胞発生における重要性の検討から、当初NogginはBMP signalをブロックする以外の機能があるのではないかと考えた。しかしながら、胚性幹細胞の分化過程ではNoggin存在下においてBMPを添加すると心筋細胞の発生は著明に抑制された。これより、Nogginによる心筋発生促進作用はBMPを阻害することによると考えられた。また、免疫染色、RT-PCR、Western blot等の手法を用い、本方法により胚性幹細胞から作製された拍動性細胞は、典型的な心筋細胞の特徴を有する細胞であることが確認された。これらの結果より、胚性幹細胞を用いた心筋再生療法が躍進的に進歩することが期待される。

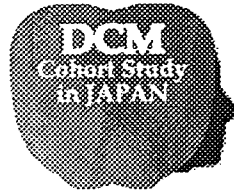
心筋梗塞後の心臓リモデリングに対する G-CSF の作用機序の解明

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学¹⁾ / 山形大学医学部第一内科²⁾
小室 一成¹⁾ / 原田 睦生²⁾ / 秦頤 潔¹⁾ / 高野 博¹⁾ / 南野 徹¹⁾

我々はマウスやブタの急性心筋梗塞モデルを用いて、造血系サイトカインである G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) が急性心筋梗塞後の心機能低下や心臓リモデリングを抑制することを報告した。G-CSF 投与群の心臓では虚血領域における Akt の活性化や VEGF (vascular endothelial growth factor) の発現増加が認められ、コントロール群の心臓と比較すると血管数は増加しアポトーシス細胞数は減少していた。

G-CSF が心筋梗塞後の心臓リモデリングや心不全を抑制する機序として心臓に対する直接作用もあるのではないかと考え、心筋細胞に対する効果を検討した。マウスおよびラットの培養心筋細胞において G-CSF 受容体が発現しており、心筋梗塞後にその発現が増加することが確認された。G-CSF は心筋細胞に直接作用し、Jak-STAT などの細胞内シグナルを活性化した。また、G-CSF は過酸化水素 (H₂O₂) により惹起される心筋細胞のアポトーシスを抑制した。さらに G-CSF の心臓保護作用における STAT の関与を調べるために、STAT3 の機能を欠失した dominant negative (DN)-STAT3 を心筋細胞で過剰発現するマウス (TG マウス) を用いて実験をおこなった。その結果、TG マウスに G-CSF を投与しても心臓リモデリングや心機能低下に対する抑制効果は認められなかった。これらの実験結果から、G-CSF は従来より報告されている骨髓細胞の動員作用以外にも、心筋細胞に直接作用して生存シグナルを活性化することにより心臓保護的に作用している可能性が示唆された。

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 治療は非常に簡易で、かつ侵襲を伴わない治療法として今後の発展が期待される。



**厚生労働省難治性疾患克服研究事業
特発性心臓症に関する調査研究
＜友池班＞**

2005年度第2回報告書

2005年度第2回総会

2005年12月15日(木)／グランキューブ大阪

【背景】心不全に対してACEIや β 遮断薬など様々な薬が臨床応用されているが、心不全は未だに繰り返す入院や死亡原因の主たる理由の内の一つである。心不全状態ではカテコラミンやサイトカイン、アンギオテンシンⅡなどの神経体液性因子が上昇することが知られている。ヒスタミンは胃潰瘍の原因となることで知られており、そのレセプターであるH₂レセプターのブロッカーは潰瘍治療薬として臨床応用されている。我々は以前の論文で、データマイニング手法を用いることにより、ヒスタミンH₂レセプターブロッカーが心不全の病態改善に有効であるとのデータを示したが、ヒスタミンH₂レセプターは心筋に発現しており β 受容体と同様にG_s蛋白に結合していることが知られている。実際にヒスタミンがcAMPを介して陽性変力作用を惹起することやヒスタミンH₂レセプターブロッカーが心拍出量を低下させることが報告されている。もしそうであるならば、ヒスタミンH₂レセプターブロッカーは β 遮断薬と同様に心不全に有効であることは容易に想像できる。我々はヒスタミンH₂レセプターブロッカーのファモチジンを用いて、かかる薬剤が心不全の病態改善に有用であるかを検討した。

【方法】はじめに後ろ向き研究として、159人のファモチジン投与を受けている有症状の心不全症例を選び、年齢・性別・基礎疾患をマッチングさせたファモチジン投与を受けていない心不全症例をランダムに選出し血中BNP値や心臓超音波検査による心機能について比較検討した。また、前向き介入研究として50人の心不全症例をファモチジン群と胃内粘膜保護剤で治療をしたコントロール群の二群に無作為に群分けを行い投薬後の血中BNP値や心臓超音波検査による心機能、NYHA心機能分類の変化及び再入院の有無について観察した。

【結果】後ろ向き研究において、ファモチジン群は対照群に比し左室短縮率の有意な変化は認めなかったものの、収縮期血圧・拡張期血圧・左室拡張末期径・左室収縮末期径・血中BNP値が有意に低値であった。(各群に投薬内容の差は認めなかった。)

前向き研究において、ファモチジン群ではNYHA心機能分類・血中BNP・LVDd・LVDsが有意に改善すると共に再入院率はコントロール群に比し有意に低値であった。(4%対24%)

【結論】ファモチジンは β 遮断薬など従来治療を既に受けている心不全症例において自覚症状と左室のリモデリングを改善し、新しい心不全治療薬として有効であることが示唆された。

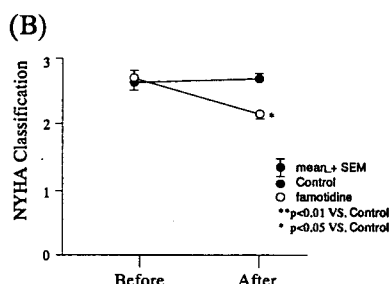
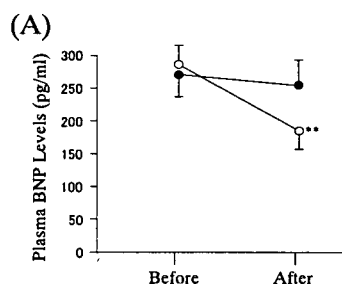


図1. 前向き研究における血中BNP値とNYHA心機能分類の変化
ファモチジン群では投与後有意に両指標とも改善している。

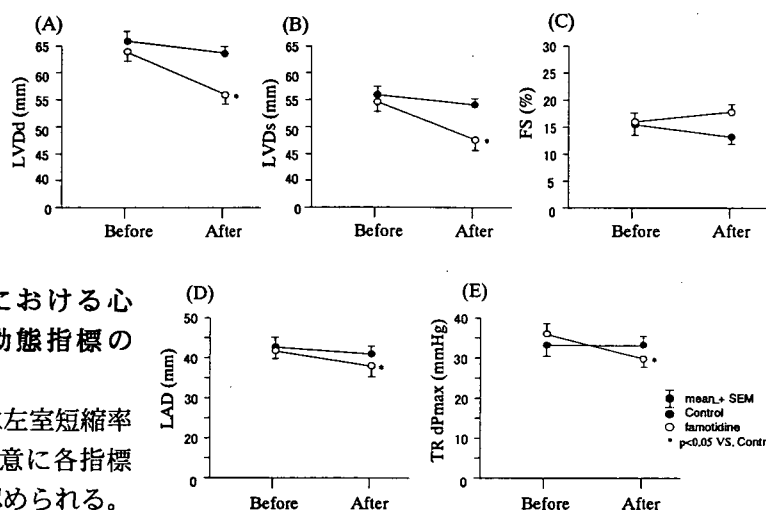


図2. 前向き研究における心機能・血行動態指標の変化
ファモチジン群では左室短縮率(FS)を除き投与後有意に各指標が低値となり改善が認められる。

わが国における拡張型心筋症を基礎疾患とした慢性心不全患者の臨床像

～JCARE-CARD研究の中間集計結果より～

北海道大学循環病態内科学

筒井 裕之/JCARE研究班

わが国では循環器領域における疫学研究データが極めて乏しいため、慢性心不全の臨床像、治療、予後などの実態は不明である。欧米で行われた研究結果をそのままわが国にあてはめることができないのは言うまでもなく、わが国独自の研究が必要である。さらに、大規模臨床試験の患者は、年齢や基礎疾患など実際の患者(Real world)とは大きく異なっており、一部の患者しか反映していないことから、臨床試験と並行して観察研究が必要である。

我々は、7年前より福岡市において慢性心不全にて入院治療を受けた患者を対象とした登録観察研究を行ってきた。さらに、平成16年より全国レベルで患者登録を行う「慢性心不全の増悪のため入院治療を要する患者を対象とした調査研究(JCARE-CARD研究)」を開始した。本研究は、わが国の慢性心不全患者の基礎疾患、合併症、重症度などの臨床像や治療、予後などの実態、さらに予後の規定因子を明らかにするものである。また、実際の患者で治療法の有効性を解析することによって、無作為コントロール試験では得られないわが国独自のエビデンスを創出していくことを目標としている。さらに、将来にわたって継続し、循環器領域における登録観察研究のモデル研究となることも目指している。

JCARE-CARD研究によると、拡張型心筋症は慢性心不全の原因心疾患の18%をしめた。拡張型心筋症は、虚血性心筋症とともに慢性心不全の主要基礎疾患である。拡張型心筋症は、虚血性心筋症に比し若年で、合併疾患(高血圧、糖尿病、高脂血症、脳血管疾患、貧血)が少ないが、心房細動はより多かった。心不全増悪の誘因は、両者とも塩分・水分制限の不徹底や過労などが多かったが、虚血性心筋症では誘因として虚血が最も多いのに対し、拡張型心筋症では不明のことも多かった。入院中の粗死亡率は、両者に差を認めなかった。今後、長期予後やその規定因子の解析もふくめ、さらに詳細な検討を進めていく予定である。

ジアシルグリセロールキナーゼは心筋梗塞後リモデリングを抑制する

山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野

竹石 恭知/久保田 功

Gq蛋白共役型受容体刺激によりホスホリパーゼCが活性化され、ジアシルグリセロール(DAG)が生じる。DAGは protein kinase C(PKC)を活性化し、PKCは核内の遺伝子発現調節、蛋白リン酸化など多様な作用を有し、心肥大と心不全の発症に深く関与している。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、DAGをリン酸化(不活性化)してホスファチジン酸へ変換し、細胞内DAG量を調節することで、PKC活性を制御しようと考えられている。DGKz遺伝子を心臓にのみ選択的に発現したトランスジェニックマウス(DGKz-TG)では、アンジオテンシンⅡとフェニレフリンの持続投与によるDAGの細胞内蓄積、PKCの活性化、ANF遺伝子の発現、心筋細胞肥大が抑制された。本研究では、DGKzが心筋梗塞後のリモデリングを抑制するかを検討した。

DGKz-TGと野生型(WT)マウスの冠動脈左前下行枝を結紮し、心筋梗塞を作成した。術後1週と4週に心エコーを行い、エコー後屠殺し心臓を摘出した。TGマウスではWTマウスと比較し梗塞1週後と4週後の左室拡張末期径は小さく、左心室重量、右心室重量、肺重量は低値で、梗塞後リモデリングは抑制された。また、TGマウスでは左室短縮率は高値で、4週後の生存率も有意に高かった。WTマウスで認められた左室非梗塞部の PKC α 、PKC ϵ の活性化はTGマウスでは抑制された。心筋梗塞後の左室線維化率はTGマウスで低く、TGF- β 1、collagen type-1、collagen type-3の発現は抑制されていた。

DGKz はGq蛋白共役型受容体シグナルと細胞内脂質代謝の調節因子として機能し、心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制し、生存率を改善した。

北里大学医学部循環器内科学

品川 弥人／猪又 孝元／中野 浩成／竹内 一郎／小板橋俊美
／大坂 勤／西井 基継／竹端 均／和泉 徹

【背景】エリスロポエチン(EPO)は主にアポトーシスの抑制効果による虚血性障害からの心筋保護効果が報告されているが、心筋炎における免疫調整作用については未だ検討されていない。

【方法】5週齢・雌・ルイスラットをブタ心筋ミオシンで免疫し、EPO3000 U/kg、又は生食を連日皮下投与し、21日後に組織学的検討を行った。

【結果】EPOは心筋組織中の炎症性サイトカイン、ケモカインm-RNAの減少とともに、実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の重症度を有意に軽減させた。macroscopic score: 1.8 ± 0.4 vs. 3.7 ± 0.6 ($P < 0.01$)、microscopic score: 1.4 ± 0.5 vs. 3.3 ± 0.7 ($p < 0.01$)、心体重比: 5.1 ± 1.0 vs. $6.8 \pm 1.7 (\times 10^{-3}; p < 0.01)$ 、IFN- γ 、IL-10、MIP-1 α 、MCP-1 mRNA: 1.4 ± 1.0 vs. 2.3 ± 7.0 、 4.7 ± 2.8 vs. 16.1 ± 7.6 、 16.1 ± 11.9 vs. 42.8 ± 30.2 、 54.3 ± 3.08 vs. $135.0 \pm 88.7 (\times 10^3 \text{ copy}/10\text{ng total RNA}; \text{それぞれ} p < 0.01)$ 。in vitroにおけるEAMの導入期の検討として、EPOは心筋炎惹起性ミオシン特異的T細胞株の増殖を抑制せず、抗原提示細胞(照射下胸腺細胞)の抗原提示能を抑制しなかった。また、同細胞の静脈内投与により作成されるEAMの効果期のみを反映するモデルを用いた実験系でも、EPOは心筋炎症の有意な抑制効果を持たなかった。

【結論】EPOは心筋組織中のサイトカインやケモカインの減少を通じてEAMを抑制する。

家族性突然死症候群

慶應義塾大学循環器内科

村田 光繁／小川 聡

突然死は、発症から24時間以内の予測不可能な死亡と定義され、中でも心臓突然死は全体の7割を占め、年間約5万人にのぼると言われている。

家族性突然死症候群は、遺伝性疾患であり突然死の予測および予防が可能な数少ない疾患である。なかでも器質的心疾患を有さない若年者の突然死では不整脈を原因とするものが含まれているといわれている。そのような症例に対し遺伝子解析や電気生理学的解析がなされ、イオンチャネルや細胞膜蛋白などの異常が明らかとなってきた。特に遺伝性不整脈疾患として、先天性QT延長症候群と特発性心室細動(Brugada症候群を含む)が有名である。

先天性QT延長症候群は、心電図上QT時間延長を認め、Torsade de pointesによる失神、突然死をきたす疾患である。先天的聾を有するJervell-Lange-Nielsen症候群と有さないRomano-Ward症候群に大別され、その原因遺伝子により現在までそれぞれ2つおよび8つのサブタイプに分類されている。これらは、機能障害をうけるチャネル及び細胞膜蛋白の種類により、心電図変化や不整脈発作を起こす状況などの臨床症状が異なることが知られており、その原因遺伝子解明により遺伝子型特異的な治療が実践されつつある。

Brugada症候群は、器質的心疾患を伴わず心室細動を生じるいわゆる特発性心室細動のうち、右脚ブロックと右胸部誘導のST上昇を特徴とする疾患である。本症は基礎心疾患を有さない突然死の約20%をしめると推定されており、わが国ではぼっくり病との関連が指摘されている。一部の症例は家族性を示し、心筋ナトリウムチャネル(SCN5A)の遺伝子変異が報告されている。植え込み型除細動器(ICD)が現在最も信頼できる治療法であるが、無症候例の治療に関してはいまだ議論を有する。