

キレーターによるアンジオテンシンⅡ投与ラットの心血管障害の改善

東京大学附属病院循環器内科

石坂 信和／永井 良三

【背景および目的】以前われわれは、アンジオテンシンⅡによる心筋障害の増悪因子として、局所における鉄動態の異常が存在している可能性を指摘した。今回われわれは、アンジオテンシンⅡ投与ラットに鉄キレーターを投与し、(1)心臓におけるTGF- β 発現亢進、(2)血管機能の低下、に対する影響を検討した。

【結果】アンジオテンシンⅡは浸透圧ポンプを用いて7日間投与した。アンジオテンシンⅡ投与ラットでは、心臓におけるTGF- β 1の発現葉コントロールの約1.7倍に増加していた。Prussian blue染色により、心筋壊死/肉芽腫様病変部において鉄沈着を認めた。In situ hybridizationによる検討では、これらの部位に加え、間質の炎症細胞、および冠動脈壁でTGF- β 1の発現が亢進していることが明らかになった。一方、鉄キレーションはアンジオテンシンⅡによる心TGF- β 1の発現亢進を抑制した。

アンジオテンシンⅡ投与ラットから摘出した大動脈を用いて血管張力スタディを行ったところ、内皮依存性および非依存性血管弛緩反応が減弱していたが、この現象は鉄キレーションにより血行動態非依存性に部分的に抑制された。また、アンジオテンシンⅡの連続30日間投与によって生じた大動脈のリモデリング(血管壁の肥厚、外膜の線維増生)についても、鉄キレーションは部分的に改善した。

【結論】鉄のキレーションはアンジオテンシンⅡによる心TGF- β 1の発現を亢進を抑制し、血管リモデリング、血管機能を改善した。アンジオテンシンⅡによる鉄動態の異常は、血管機能障害、繊維化関連遺伝子発現亢進を介して心筋障害の増悪因子として働くことが示唆された。

1) Kan Saito, Nobukazu Ishizaka, Toru Aizawa, Masataka Sata, Naoyuki Iso-o, Eisei Noiri, Ichiro Mori, Minoru Ohno, Ryoza Nagai: Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF- β 1 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1836-H1843, 2005.

2) Nobukazu Ishizaka, Kan Saito, Ichiro Mori, Gen Matsuzaki, Minoru Ohno, Ryoza Nagai: Iron Chelation Suppresses the Ferritin Upregulation and Attenuates Vascular Dysfunction in the Aorta of Angiotensin II-Infused Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2282-2288, 2005 (in press).

アンジオテンシンⅡタイプ1受容体阻害薬オルメサルタン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⁾／金森 寛充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 Kha¹⁾／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】前回の総会で我々は、アンジオテンシンⅡタイプ1受容体(AT1)シグナルによる梗塞巣の組織動態改変が梗塞後左室リモデリングならびに心機能悪化のメカニズムである可能性をAT1ノックアウトマウスを用いた検討で報告した。今回、AT1阻害薬がその悪化を予防できるか否かを検討した。

【方法と結果】12週齢C57BL/6雄マウスにてMIを作製し、AT1阻害薬オルメサルタン(Olm, 10 mg/kg/day)をMI第3病日より皮下に持続投与し慢性期(MI 4週後)ならびに亜急性期(MI 1週後)に生存率、血行動態、心筋組織を調べた。対象群は生食またはヒドララジンを投与した。4週後、Olm群では他群に比較し有意に生存率、梗塞後左室リモデリングならびに心不全の改善がみられ、非梗塞巣の線維化の減少がみられた。対照群に比しOlm群では梗塞瘢痕が短縮しかつ梗塞壁厚の増大がみられた。Olm群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。亜急性期の検討にてOlm群では梗塞巣肉芽組織細胞のアポトーシスの減少かつ細胞増殖活性の増大がみられた。以上より、Olm群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、梗塞長が短縮することにより、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阻害薬オルメサルタンの梗塞後左室リモデリングならびに心不全改善効果は、少なくとも一部は、梗塞巣の組織動態を改変することによる。

ASK1 は心不全治療の分子標的となりうる

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学¹⁾

／山口大学大学院医学研究科器官病態内科学・分子脈管病態学²⁾

大津 欣也¹⁾／彦惣 俊吾¹⁾／山口 修¹⁾／武田 理宏¹⁾／堀 正二¹⁾／池田 安宏²⁾／松崎 益徳²⁾

【目的】心不全発症・進展には心筋細胞死が関与している。我々は心筋細胞死にmitogen-activated protein kinase kinase kinaseであるapoptosis signal regulating kinase 1(ASK1)が心臓リモデリングに重要な役割を果たしていることをin vitroの検討およびASKノックアウトマウスを用いたin vivoの検討により明らかにしてきた。本研究ではASK1が心不全治療の創薬ターゲットになりうるか検討した。

【方法】10週令の自然発症心筋症ハムスターBIO TO-2 hamster心筋に経冠動脈的にdominant negative 体ASK1を組み込んだadeno-associated viral vector (rAVV/ASKDN)を感染させ、経時的に、心機能を評価した。

【結果】LacZを感染させた対照群においてはASK1の活性化が認められたがrAVV/ASKDNを感染させた治療群ではASK1の活性化は有意に抑制されていた。遺伝子導入後心エコーで評価したところ対照群ではFSは低下、LVDdは増大していたがその変化は治療群では有意に抑制されていた。カテーテル法を用いて評価したmax dP/dtあるいはmin dP/dtにおいても治療群においてその低下は有意に抑制されていた。また対照群において認められたBNP mRNAの発現亢進も治療群において抑制されていた。また線維化やアポトーシスの亢進も治療群で有意に抑制されていた。

【総括】ASK1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が示唆された。

心筋症の予後および心筋症におけるC型肝炎ウイルス感染、炎症、免疫に関する研究

京都大学大学院医学研究科循環器内科学

松森 昭

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。最終の予後解析対は、拡張型心筋症1,932例、肥大型心筋症2,134例であった。拡張型心筋症の5年生存率は73%であり、新規症例390例では、78%であった。肥大型心筋症の5年生存率は84%で、新規症例342例では86%であった。

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

新しく開発した免疫組織染色法によりHCV抗原の組織内分布を検討した。HCV肝炎の肝臓では主として浸潤細胞が陽性で、一部の内皮細胞に陽性所見が見られた。HCV感染陽性の拡張型心筋症の心臓でも肝臓と同様に浸潤細胞を中心に陽性所見が見られ、内皮細胞の一部が陽性であった。

3. 心筋症における炎症、免疫に関する研究：

免疫グロブリン遊離軽鎖－心不全の新しいバイオマーカー

近年、われわれは心不全および心筋炎の発症にマスト細胞が重要な役割を果たすことを見出し、今回、マスト細胞機能と関連が深いと考えられる免疫グロブリン遊離軽鎖(FLC)と心不全の関連について検討した。心不全群での血中FLCカップ鎖は 41 ± 39 mg/ml($n=63$, 平均 $\pm$ SD、 $17-334$ mg/ml)で正常人 28 ± 5 mg/ml($n=17$, $21-40$ mg/ml)に比し有意に高値を示した($p<0.0001$)。血中FLCラムダ鎖は、 93 ± 68 mg/ml($36-429$ mg/ml)で正常人 44 ± 9 mg/ml($27-57$ mg/ml)に比し、有意に上昇した($p<0.0005$)。FLCカップ鎖／ラムダ鎖の比は 0.46 ± 0.14 と正常人 0.66 ± 0.16 と有意に低下した($p<0.0001$)。また、血中NT-proBNPとFLCカップ鎖($r^2=0.51$, $p<0.005$)、およびラムダ鎖($r^2=0.81$, $p<0.0001$)は正の相関を示した。

本研究により、心不全においてBリンパ球が活性化され、FLCの生産が増加することが明らかとなった。今後、心筋症、心筋炎などの、心不全の病因によりFLCの差異がみられるかを検討する予定である。

内科的治療限界となった心臓移植対象の重症心不全例に対する左補助人工心臓(LVAS)の適応について検討した。対象は、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75例で、用いたLVASは、体外設置東洋紡LVAS 62例(左房脱血11例、左室脱血51例)、体内設置携帯型8例(HeartMate VE 3例、Novacor 4例、EvaHeart 1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404日で、内21例(国内13例、渡航8例)が平均575日後に移植された。33例は平均388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。13例は補助継続中である。また、当センターでの心臓移植15例中13例がLVAS症例であったが、移植後の成績は良好で、最近施行した2例以外は退院し、最長は6年6ヵ月に及んでいる。心臓移植対象例においてLVASによる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。現在、QOLの高いLVASの臨床導入を開始している。

心筋細胞に対するmyocardinの抗アポトーシス作用の機序について

神戸大学大学院医学研究科循環呼吸器病態学¹⁾／京都大学医学部附属病院探索医療センター探索医療開発部²⁾
小林 成美¹⁾／河合 美樹¹⁾／杜 隆嗣¹⁾／政野 智也¹⁾／横山 光宏¹⁾／川嶋成乃亮¹⁾／上山 知己²⁾

myocardinは胎生期より成人期を通じて心臓に発現が認められ、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。我々は前回の班会議において、 β 受容体刺激によるアポトーシスにおけるmyocardinの役割を報告した。すなわち、ラット新生仔培養心筋細胞にisoproterenol刺激はアポトーシスを誘導し、それはmyocardinの強制発現により抑制された。レポーターアッセイを用いた検討にて、myocardinはBcl-2の発現を転写レベルから増加させることによりその抗アポトーシス作用を発揮すると考えられた。

今回我々は、isoproterenolによるmyocardinの細胞内の動態変化について検討した。ウェスタンブロッティングにて、定常状態ではmyocardinは核内に多くが存在し、細胞質内の発現は少なかった。isoproterenolの刺激により、核内のmyocardinは12時間後より減少し、24時間後には殆ど確認できなくなった。逆に細胞質内では12時間後より著明な増加がみられた。このことより、isoproterenolによるmyocardinの核内での減少が心筋細胞のアポトーシス感受性を高めていると考えられた。また、核内のmyocardinは細胞質内のものより分子量が高く、脱リン酸化による核内からのexportや、分解などの関与が予想された。

myocardinは心筋細胞の生存に関わる、心不全の成因において重要な因子であると考えられ、今後はin vivoのモデルを用い、心不全における役割の検討も行っていきたい。

リアノジン受容体を標的としたダントロレンによる新しい心不全治療

山口大学器官制御医科学講座循環病態内科学

小林 茂樹／矢野 雅文／立石裕樹／望月 守／野間 利至
／小田 哲朗／徳久 隆弘／小林 正和／山本 健／松崎 益徳

【背景】悪性高熱症(MH)やArrhythmic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)、Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)においては、リアノジン受容体(RyR)を構成している1アミノ酸の突然変異により、RyRからCa²⁺露出が生じる。この多くの突然変異の分布は、RyR内のある特定の部位(N-terminal domainとCentral domain)に局限しており、これらのdomainが、チャネルの開閉を調節する制御ドメインとして働いている。最近、我々は、MHの治療薬であるダントロレンは、RyR1内の制御ドメイン内(Leu⁵⁹⁰-Cys⁶⁰⁹)に結合し、これらのチャネル制御ドメインの連関障害を是正することによりチャネル異常を改善させることを報告した。

【目的】ダントロレンが、心不全においてもRyR2内のチャネル制御ドメイン連関を強めて、RyR2からCa²⁺漏出を抑制し、心不全を改善させるか否かについて検討した。

【方法・結果】ビーグル犬に心内膜下リードを挿入し240/minで4週間ペースングし、心不全モデルを作成し、左室心筋から心筋筋小胞体(SR)および心筋細胞を単離精製し、以下の実験を行った。

a) 不全心筋SRからのCa²⁺漏出に対するダントロレンの効果： Ca²⁺ indicatorのfluo-3を用い、SR vesicle外のCa²⁺濃度の変化を分光光度計でモニターし、SRからのCa²⁺露出を測定した。不全心筋SRでは、SRからのCa²⁺漏出が観察されたが、ダントロレン存在下では不全心筋SRからのCa²⁺漏出は濃度依存性に抑制された(EC₅₀=0.3 μM)。

b) 蛍光消滅実験によるドメイン連関状態の定量化： 合成ペプチド(Gly²⁴⁶⁰-Pro²⁴⁹⁵ of RyR2)をsite-specific carrierとして用い、RyR2上のN-terminal domainを特異的にmethylcoumarine acetamide (MCA)で蛍光ラベルした。この蛍光に対する大きな蛍光Quencherのaccessibilityを評価することで、チャネル制御ドメインのzippering-unzippering状態を定量化した。正常心筋では、RyRチャネル制御ドメインは、zippering状態であったが、心不全心筋ではすでにRyRはunzippering状態であった。ダントロレンは、不全心筋RyR2において、濃度依存性にドメイン連関をunzippering→zipperingに修復した(EC₅₀=0.3 μM)。このダントロレンのドメイン連関の修復効果は、SRからのCa²⁺ leak assayの実験と同様、EC₅₀が0.3 μMであることから、ドメイン連関障害(unzippering程度)の是正がSRからのCa²⁺漏出の抑制につながることが示唆された。

c) 単離心筋細胞のcell shortening, Ca²⁺ transientに及ぼすダントロレンの効果： 1 μMのダントロレンは正常心筋細胞のcell shorteningやCa²⁺ transientに影響を与えなかったが、不全心筋細胞のcell shorteningとCa²⁺ transientを著明に改善した。

d) 単離心筋細胞の生存率に及ぼすダントロレンの効果： 不全心筋より単離した心筋細胞を培養し、生存細胞数をcountし生存率を求め、ダントロレン投与群、ダントロレン非投与群の比較検討を行った。不全心筋細胞の生存率は、4日後には、約15%にまで低下するが、ダントロレン投与群では、約80%まで改善した。

【結語】不全心筋において、ダントロレンは、N-terminal domainとCentral domain間の連関障害を是正することにより、RyRからのCa²⁺漏出を抑制し、心筋細胞機能異常を改善させることが示された。このように、ダントロレンは、RyR2をターゲットとした新しい心不全治療薬になる可能性があることが示唆された。

肥大型心筋症の成因に関する研究は、ここ20年ほどの間に目覚ましい進展がみられた。すなわち原因不明の遺伝性心疾患から、サルコメア関連蛋白を主とする心筋構成蛋白の遺伝子異常に起因する心筋疾患であることが判明した。さらにはサルコメア蛋白遺伝子異常が心筋線維のカルシウム感受性の異常を引き起こし、直接的に心筋収縮や拡張能に変化をもたらすことにより病態が形成されることもわかってきた。一方、薬物治療は未だ進展が乏しく、アミオダロンを用いる機会が増えたこと以外20年前から大きな変化がない。他方、非薬物療法としてはICDが導入されることにより、突然死予防が可能となってきた。さらに閉塞性肥大型心筋症の難治例では、心筋切除術という有効性は高いが医療側の熟練と大きな侵襲を伴う治療に代わって、心室中隔アブレーション術が導入され一般的な治療となりつつある。したがって現在では、ICDや心室中隔アブレーション術の適応決定が重要であり、そのためには予後の多様な本症患者の中からハイリスク群を見抜く必要がある。予後規定因子に関しては膨大な研究がなされ知見は蓄積されつつあるが、未だ正確に予後を判定することはできない。また治療薬として頻用されるβ遮断薬やカルシウム拮抗薬、あるいは心室中隔アブレーション術の長期有用性や予後改善効果に関しては証明されていない。これらを明らかにするためには日本で登録研究を行う必要がある。今回は、今までなされてきた肥大型心筋症研究を総括し、成因、予後規定因子、治療に関する研究の現況および今後の展望について発表する。

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

～心筋梗塞後リモデリングに対するニコチンの効果～

九州大学大学院医学研究院循環器内科学
久保田 徹／堤 孝樹／井手 友美／砂川 賢二

【目的】我々は、これまで、迷走神経刺激によって心筋梗塞後の心室リモデリングが有意に抑制され、生命予後の改善が得られることを明らかにしてきたが、その機序については不明の点が少ない。近年、敗血症モデルにおいて、迷走神経刺激が炎症性サイトカインの産生を抑制し、ショックの発症を防止することが報告され、アセチルコリンのニコチン型受容体を介した抗炎症作用が注目を集めている。そこで、本研究では、心筋梗塞後リモデリングに対するニコチンの効果について検討した。

【方法】①マウスの腹腔内にニコチンを前投与し、LPS刺激に対する心筋での炎症性サイトカインの発現を検討した。②マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成後、浸透圧ミニポンプを用いてニコチンを持続投与し(400 mg/kg/day)、28日間観察した。

【結果】①ニコチンの前投与によって、LPSに対する心筋での炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1、RANTES)の発現は有意に抑制された。②ニコチンを持続投与したマウスでは、生食群と比較して、心拍数および血圧に有意な変化を認めなかったものの、心筋梗塞後28日目における左室の拡大と収縮能の低下が有意に抑制されていた。28日間の死亡率は、生食群と比べニコチン群で有意に低く、主に心不全死が抑制されていた。

【総括】ニコチンの持続投与は心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制し、生存率を有意に改善した。心筋梗塞後リモデリングに対する迷走神経刺激の改善効果の一部は、アセチルコリンのニコチン型受容体を介した作用である可能性が示唆された。

心Fabry病に対するレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の検討

鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学

/Division of Experimental Therapeutics, Ontario Cancer Institute, University Health Network²⁾

吉満 誠¹⁾/竹中 俊宏¹⁾/樋口公嗣¹⁾/J.A. Medin²⁾/尾辻 豊¹⁾/鄭 忠和¹⁾

【目的】心Fabry病を含むFabry病は、リソソーム加水分解酵素のひとつである α -galactosidase A (α -gal A)活性の遺伝的欠損により、基質であるglobotriaosylceramide (Gb3)が心臓をはじめとする臓器に進行性に蓄積することにより生ずる。我々は、本症の原因療法の開発に向けて、骨髓単核細胞に対するレンチウイルスベクターを用いた α -gal A遺伝子導入が、臓器、特に心臓において α -gal A活性を上昇させ、さらに蓄積基質であるGb3を減少させ得るかを、Fabry病モデル動物である α -gal A欠損マウス(Fabryマウス)を用いて検討した。

【方法】Fabryマウスから骨髓単核細胞を分離、レンチウイルスベクターpHR'-cPPT-EF1 α -gal A妨PRE-SINを用いて α -gal A遺伝子を導入し、放射線全身照射を行ったレシピエントFabryマウスに移植した。移植後、経時的に血漿 α -gal A活性を測定した。さらに、移植24週後に、心臓、骨髓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、脳を採取し、各臓器の α -gal A活性測定およびGb3の定量的測定を行った。

【結果】 α -gal A遺伝子導入Fabryマウスの血漿 α -gal A活性は、移植後24週に渡り未治療Fabryマウスおよび野生型C57Bl/6マウスに比し有意に高値で経過した。移植24週後に解析した遺伝子導入Fabryマウスの心臓、骨髓、肝臓、脾臓の α -gal A活性も、未治療Fabryマウスおよび野生型マウスに比し有意に高値であった。また、肺、腎臓、脳の α -gal A活性も、未治療Fabryマウスに比し有意に上昇していた。一方、蓄積基質であるGb3は、遺伝子導入Fabryマウスの心臓では、未治療Fabryマウスの1.5%にまで低下していた。

【結論】Fabryマウスに、レンチウイルスベクターを用いて α -gal A遺伝子を導入した骨髓単核細胞を移植することにより、心臓をはじめとする臓器の α -gal A活性の上昇およびGb3蓄積の低下を認めた。

閉塞性肥大型心筋症に対するI群抗不整脈薬と β 遮断剤の併用療法の長期有効性について

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⁾/南 雄一郎¹⁾/今井 拓¹⁾/川城 直美¹⁾

/石塚 尚子¹⁾/萩原 誠久¹⁾/川名 正敏²⁾/笠貫 宏¹⁾

【背景・目的】閉塞性肥大型心筋症(HOCM)の左室流出路圧較差(LVOT-PG)に対する薬物療法として、I群抗不整脈薬(I-AD)、 β 遮断剤(B-B)、またはCa拮抗剤などが広く用いられているが、これらの併用療法の長期有効性については未だ検討されていない。今回我々は、HOCM症例に対するI-ADとB-Bの併用療法の長期有効性について、その単剤療法と比較検討した。

【方法】当院でHOCMと診断された連続108例(LVOT-PG>30 mmHg at rest, mean LVOT-PG=75 mmHg)のうち、長期的に薬物療法がなされた71例(66%)を対象とした。I-ADとB-B併用療法群(n=40)と単剤療法群(n=31)の両群において、LVOT-PGの改善率、NYHA-class、心血管事故(不整脈、心不全、脳卒中)および心臓死の頻度について比較検討した。平均観察期間は、7.2 $\pm$ 5.0年であった。

【結果】LVOT-PGの改善率は、併用療法群では有意な改善を認めたが(83 to 37 mmHg, p<0.0001)、単剤療法群は有意な改善を示さなかった(65 to 54 mmHg, p=NS)。NYHA-classにおいても同様に併用療法群は有意に改善を認めたが(2.8 to 1.9, p<0.0001)、単剤療法群は有意な改善を示さなかった(2.2 to 2.1, p=NS)。また、心臓死においては両療法群間に有意差を認めなかったが、心血管事故率では併用療法群が単剤療法群と比較して有意に低かった(7.5% vs. 25.8%, p<0.05)。

【結語】左流出路型のHOCM症例において、I-ADとB-Bの併用療法は単剤療法と比較して、LVOT-PGおよびNYHA-classを有意に改善させ、また心血管事故率を有意に減少させた。以上より、I-ADとB-Bの併用療法がHOCMに対して長期的有効性を示すことが示唆された。

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】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てきた。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やMuRF1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とMuRF1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の脱リン酸化が上流のPI3-K-Akt経路とは非依存性に起こっていた。このことから、心筋細胞においてDOX刺激によりFoxo1の脱リン酸化が起こり、その結果Atrogin-1およびMuRF1の発現が上昇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、筋細胞特異的Ubiquitin ligaseの発現上昇を介した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。

心筋虚血再灌流障害に対するG-CSFの心臓保護作用についての検討

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学
小室 一成／高野 博之／上田 和孝／長谷川 洋／新妻ゆり子

【目的】G-CSFは急性心筋梗塞後の心臓リモデリングや心機能低下に対する抑制効果をもつ。今回、我々は心筋虚血再灌流モデルにおいて再灌流開始時よりG-CSFを投与した際の心臓に対する急性効果を検討した。

【方法】ランゲンドルフ装置を用いてラット心を灌流し、35分の虚血後120分の再灌流を行った。G-CSF(300 ng/ml)を再灌流開始時より投与した群とControl群で検討した(ともに $n=5$)。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7分後の心臓を用いWestern blot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を投与した。

【結果】G-CSF投与によりTTC染色で計測した梗塞サイズは有意に縮小した(G-CSF群: $34.7 \pm 4.5\%$ 、Control群: $58.6 \pm 3.6\%$, $P<0.001$)。G-CSF投与群では、再灌流7分後の心臓におけるJak2、STAT3、ERK、Akt、eNOSの活性化は有意に増加した。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。

【結論】G-CSFは虚血再灌流障害に対し心筋に直接作用し、再灌流後からの投与でも心保護作用を持つこと(postconditioning作用)が示された。G-CSFによる急性の心臓保護作用はnon-genomicであり、特にAkt-eNOSシグナル伝達経路の活性化が重要であると考えられた。

放射性同位元素標識抗テネイシンC抗体による炎症性心疾患の画像診断法の開発

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⁴⁾
／三重大学大学院修復再生病理学⁵⁾／千葉大学循環病態医科学⁶⁾／大阪医科大学第三内科⁷⁾
廣江 道昭¹⁾／小林 典裕²⁾／上原 知也³⁾／秋澤 宏行³⁾／荒野 泰³⁾／小高 謙一⁴⁾／棚田 修二⁴⁾
／入江 俊章⁴⁾／今中－吉田 恭子⁵⁾／吉田 利通⁵⁾／小室 一成⁶⁾／寺崎 文生⁷⁾／北浦 泰⁷⁾

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。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など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、テネイシン(TN)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と考え、研究してきた。実際、拡張型心筋症患者の心筋組織ではTNCの発現のみならず、心不全の程度を反映して血中TNC濃度が上昇している。我々は、病的な心筋でTNC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、In-111標識抗TNC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。

高血圧性心筋症に見出されたBMP10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⁾／北里大学循環器内科²⁾／東京都老人医療センター病理³⁾
木村 彰方¹⁾／中野 記嗣¹⁾／堀 久枝¹⁾／安部美奈子¹⁾／柴田宏樹¹⁾
／有村 卓朗¹⁾／笹岡 大史²⁾／和泉 徹²⁾／沢辺 元司³⁾

【目的】高血圧が存続すると圧負荷によって心肥大を来すが、高血圧患者の5%程度ではさらに拡張型心筋症様の病態(高血圧性心筋症)を呈するに至る。我々はZ帯構成要素の異常がストレッチ反応の低下を通じて特発性拡張型心筋症(DCM)の原因となることを明らかにして来たが、ストレッチ反応に関わる分子と高血圧性心筋症との関連は明らかではない。そこで、ストレッチ反応に関わる候補遺伝子としてBMP10に着目した変異検索を行った。

【方法】DCM症例128名、一般健常者288名を対象としてBMP10変異を検索した。ついで連続剖検例1400例でのBMP10変異との関連解析を行い、高血圧性心筋症と関連する変異について、GFP融合遺伝子を用いた細胞内分布の検討、酵母2ハイブリッド(Y2H)法、免疫沈降法を用いたTcap結合性の検討、さらにBMP10による心筋細胞肥大効果を検討した。

【結果】若年で高血圧性心筋症を発症した症例にThr326Ile変異を見出した。この変異は、BMP10の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288名中1名にしか認められなかった。ついで連続剖検例を検討したところ、高血圧性心筋症患者7名中1名にこの変異が認められたが、高血圧のみの患者では677名中2名、高血圧がない例では766名中0名であったため、本変異は高血圧性心筋症と関連することが示唆された。GFP融合コンストラクトをラット心筋細胞にトランスフェクトした後に、共焦点レーザー顕微鏡でGFPシグナルの分布を観察したところ、BMP10はTcapと同様にZ帯に分布した。一方、Y2H法および免疫沈降法を用いた検討から、BMP10はTcapに結合すること、変異によってTcap結合性が約半分に低下すると同時に細胞外分泌が亢進すること判明した。さらにBMP10はラット心筋細胞の肥大とサルコメア整合性の促進を来すことを明らかにした。これらのことから、BMP10変異は高血圧性心筋症の病態形成に関与することが示唆された。

【総括】BMP10は高血圧性心筋症の病態促進因子である。

内皮－心筋共培養細胞シートによる血管新生の促進

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

清水 達也／関谷佐智子／岡野 光夫

【目的】我々はこれまでに細胞シート工学により心筋細胞シートを重層化することで同期して拍動する心筋組織の再生に成功しているが、より機能的な心筋組織の再生には再生組織内における血管新生を促進することが極めて重要である。そこで本研究では心筋単独の細胞シートおよび血管内皮細胞と心筋細胞を共培養した細胞シートを作製しその血管新生能力を比較検討するした。これにより血管内皮細胞導入の有用性を検証することを目的とした。

【方法】新生仔ラット心臓の心室よりコラゲナーゼを用いて単離した細胞を、抗CD31抗体を用いた磁気細胞分離システム(MACS)により血管内皮細胞分画および心筋細胞分画に分離した。温度応答性培養皿上に心筋細胞分画単独あるいは内皮細胞分画と心筋細胞分画を混合した細胞を播種し4日間培養した。固定後CD31免疫抗体染色による血管内皮細胞の有無を確認した。また低温処理にて回収したそれぞれの細胞シートを3層に積層化後のラット皮下組織への移植を行った。1週間後移植したグラフトを固定しその切片像を作製、血管新生量を比較検討した。

【結果】CD31免疫抗体染色の結果、内皮細胞分画と心筋細胞分画を混合した場合はin vitroにおいて既に血管内皮細胞が網目構造を形成していることが明らかとなった。また移植したグラフトの組織像に関しては共培養細胞シート群では心筋細胞単独群に比べグラフト内に有意に多くの血管が新生していることが明らかとなった。

【総括】以上の研究により心筋組織再生において血管内皮細胞を導入することにより血管新生を促進しより血管床の豊富な心筋組織の再生が可能となった。今後、心筋細胞シートに導入する血管内皮細胞のソースの違いや心筋と血管内皮細胞の混合量の違いによる効果を比較検討し最適化を行う。

心筋組織幹細胞の発生学的由来と性質の解析

慶應義塾大学医学部再生医学

福田 恵一

【目的】心筋組織内に存在する組織幹細胞を同定し、その多分化能、細胞学的性質、発生学的由来を明らかにする。

【方法】(1)ラットおよびマウスの心筋細胞を初代培養し、FACSにてside population(SP)細胞を分離した。SP細胞よりsphere cultureを行い、心筋幹細胞を増幅した後、分化誘導を行い、いかなる細胞に分化するかを観察した。(2)この細胞をニワトリ胚神経堤に移植し、細胞の遊走能分化能を解析した。(3)神経堤細胞を標識するため、P0-CREマウスとFlox-EGFPマウスを交配し、心臓内における神経堤由来の細胞の動態を確認した。

【結果】(1)SP法とneurosphere法を組み合わせにより得られたcardiosphere細胞はNestin、Musashi-1、p75の発現を認め、神経堤幹細胞と類似の遺伝子発現をすると同時に、神経、グリア、平滑筋、心筋に分化することを確認した。(2)これらの細胞をニワトリ早期胚の神経堤に移植すると、腹側経路、背外側経路に沿って移動し、神経、グリアに分化した。また、一部の細胞は血管に取り込まれ、平滑筋に分化した。(3)神経堤由来の細胞は心臓流出路の構築に寄与した。一部の細胞は、心臓内に分布し、幹細胞として分布すると同時に心筋細胞に分化した。

【結論】心臓組織幹細胞の発生学的由来の一部が解明された。

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総合診療部¹⁾／東京慈恵会医科大学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】スクリーニングにより、心筋由来のライブラリーから二つの新規タンパクSmarelrならびにSMARP(Smarelr-related protein)をクローニングした。Smarelr、SMARPは共にノーザンブロットにて心臓にmRNAが強く発現していた。また、SMARPの細胞内局在を調べたところ、核小体内に移行することが判明した。そこで、N-末端およびC-末端のDeletion Constructを作製し検討したところ、N-末端の30塩基内に核小体移行シグナル(Nucleolar Localization Signal; NoLS)が存在する可能性が示されたため、さらにその領域のMutant proteinを作製し、NoLSを同定した。

【結語】心臓に特異的に発現する新規タンパクSMARPの細胞内局在を調べたところ、核小体内に移行することが判明した。さらに、N-末端に存在する核小体移行シグナルNoLSを同定した。SMARPの核小体内での機能のさらなる検討は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を示唆された。

HCM/DCMの狭間にある中間型心筋症の病理動態

順天堂大学循環器内科

河合 祥雄／鈴木 宏昌／山田 京志／代田 浩之

【背景】肥大型心筋症(HCM)と拡張型心筋症(DCM)とは独立した病態であるが、それら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。

【目的】特発性心筋症の左室形態は、心エコー図計測値の壁肥厚(>12 mm)、左室拡張期内径拡大(>55 mm)、収縮低下の有無で8型に分類できる。+/-で表すと、正常は[- - -]、典型的肥大型心筋症(HCM)は[+ - -]、典型的張型心筋症(DCM)は[- + +]と表せ、残りの5型はHCM、DCMのいずれでもない中間型心筋症である。中間型心筋症の病理動態を検討した。

【方法】肥大、変性、錯綜配列、繊維症の程度を判定的に0から3+までの4段階とし、4項目の合計が8を超えた症例を有病理所見症例とした。

【方法】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組織所見、臨床経過を検討した。

【結果】471例の内訳はHCM 240、DCM 120、中間型111例であった。大きな不定形空胞変性を有する肥大心筋細胞はHCM 34 (14%)、中間型34 (31%)、DCM 23 (19%)に認められた。有病理所見例28例中、左心室駆出率が50%を超えるか、左心室拡張終期径が55 mm以下に改善した改善群は6例、不変7例で、左心室駆出率が50%未満に低下するか、左心室拡張終期径が55 mm超に拡張した悪化群は15例(58%)と有意に多かった。正常病理例は改善例14(70%)と有意に多く、不変例8、悪化例11であった。正常病理例での死亡は1(7%)に対し、悪化群の死亡は7(33%)と高率であった。

【総括】中間型心筋症は異様な形態の空胞変性の頻度が高く、複合する有病理所見を有する症例は臨床病態の増悪を来しやすい。

【背景】従来、抗アルドステロン薬のspironolactoneはNYHA III・IVの重症心不全の予後を改善することが報告されている。しかし、その機序は明らかではなく、また、NYHA I・IIの症状が軽い心不全症例に対するspironolactoneの効果も明らかではない。動物モデルではアルドステロンが心筋線維化を促し、spironolactoneにより、この線維化は抑制されることが報告されている。

【目的】軽症(NYHA I・II)の特発性拡張型心筋症(DCM)患者におけるspironolactoneの心機能および心筋線維化に対する効果を検討すること。

【方法】対象はDCM25例(NYHA I: 17例、NYHA II: 8例)で、spironolactone 25mg/日投与前および12ヶ月後に、血液中の線維化マーカー(Carboxyl-terminal propeptide of procollagen type I (PIP)、Carboxyl-terminal telopeptide of collagen type I (CITP)など)を計測するとともに、組織ドップラー心エコー検査、左室心筋生検を含む心臓カテーテル検査を施行した。

【結果】左室心筋生検組織のcollagen volume fraction (CVF)と心筋線維化の血液マーカー(PIP/CITP)との間には強い正相関を認めた($r=0.67$)。心筋線維化の血液マーカー(PIP/CITP)の値が低い12例($PIP/CITP \leq 35$)をGroup A、高い13例($PIP/CITP > 35$)をGroup Bとした。Spironolactoneの投与により、Group Aと比較しGroup Bでは有意にCVFは低下するとともに左室拡張機能の指標であるpeak early diastolic strain-rate、および左室stiffnessも有意に改善した。

【結論】SpironolactoneはDCMにおいて、左室心筋線維化を改善することにより左室拡張機能を改善する可能性が示唆された。この効果は、血液中の線維化マーカーが高い症例において、より顕著である可能性がある。

反応型線維化病変進行におけるテネイシンCの役割

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】心筋線維化は、心臓の間質に膠原線維がふえた病態をさし、心機能に大きな影響を与えることが知られている。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られるが、置換型線維化は、実質細胞の再生能に乏しい心臓にとって組織修復のために必須の生体反応であり、反応型線維化だけを抑制するのが望ましい治療法と考えられる。しかし、現在、この2種類の線維化進展の分子機構が同一かどうかすら不明である。

【目的】我々は、細胞外マトリックス蛋白の一つテネイシンCが置換型線維化進展の初期に重要な働きをすることを明らかにしたが、今回は、反応型線維化促進の分子機構とテネイシンCの関与を明らかにすることを目的とした。

【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、心筋内の反応型線維化の程度が有意に軽かった。さらに詳細に検討すると、血管周囲のヒアルロン酸の沈着には明らかな差が認められなかったが、ノックアウトでは膠原線維形成に先行するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンversicanの沈着が少ないことが明らかになった。また、この反応型線維化病巣には野生型マウスでも、置換型線維化の際、主要な役割を演ずると考えられる筋線維芽細胞がほとんどみられなかった。

【考察と今後】反応型線維化病巣の形成にもテネイシンCが、プロテオグリカンversicanの発現あるいは沈着を促進することにより、強く関与することが明らかになった。また、反応型線維化病変形成に関与する細胞は、置換型反応のそれとは若干異なる可能性が示唆された。現在、培養細胞を用いて、線維芽細胞の抗原線維形成の分子機構を解析中である。

大阪医科大学第三内科
寺崎 文生／北浦 泰

【疫学】心臓サルコイドーシス(心サ症)は心臓を選択的に侵すサルコイドーシス(サ症)を指すが、診断が困難であるため、疫学、臨床像など現在も不明な点が多い。また、我が国では欧米に比較して心サ症の頻度が特に高いと考えられるため、全国的な疫学調査および病因などの究明が急務と考えられる。

【病因・病態】サ症の病因は不明であるが、*Propionibacterium acnes*(*acnes*)の潜在感染との関連が注目されている。また、宿主の原因抗原に対する1型ヘルパーT細胞(Th1)有意の過剰な免疫応答が重要な発症要因と考えられる。そこで、心サ症患者の生検心筋、心臓手術時の切除心筋や剖検心を用いて*acnes*を検索する。また、心サ症患者の免疫、特に細胞性免疫やその遺伝子多型について検索する。さらに、*acnes*やその抗原と、Th1優位動物などの組み合わせによる動物実験によりサ症や心サ症発症を試みる。

【診断】心サ症の診断は、心筋生検、心エコー、Gaシンチグラフィ、MRIなどにより行われているが感受性、特異性共に低く、心臓手術や剖検で初めて診断されることも多い。拡張型心筋症との鑑別が重要で、よりの確な心サ症の診断方法の開発が必要である。今後、病因・病態の解明に基づいて新たな診断方法や活動性の評価方法開発に努力する。即ち、諸種炎症マーカーについて心サ症診断の有用性について検討し、画像診断に応用できる可能性も検討する。

【治療】心サ症による心ブロック、心室頻拍、心不全などに対しては薬物療法、ペースメーカー植え込み、ICD植え込みなどによる対症療法が行われている。また、活動性心サ症に対しては副腎皮質ステロイドを中心とする免疫抑制療法が行われている。しかし、至適なステロイド療法は不明で、的確な免疫抑制療法の確立が必要である。また、原因療法として*acnes*の除菌療法やTh1優位を是正するごとくの抗サイトカイン療法などを試みるべきである。

心不全とT型カルシウムチャンネル～新しい作用・意義～

奈良県立医科大学第1内科
斎藤 能彦

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に関わる基礎的な分子基盤を共通しているとの仮説を立てて研究を遂行してきた。

この過程で、ANP・BNP遺伝子の再発現に関わる興味深い転写調節系NRSE/NRSF系を同定した。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ANP・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CACNA1H、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。

現在心筋細胞特異的に発現するCACNA1H過剰発現マウスを作製しているほか、T型Caチャンネルブロッカーを心不全モデルであるDahl食塩感受性ラットに投与し、T型Caチャンネルブロッカーの心室リモデリング抑制効果、生命予後改善効果を確認している。

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⁾
島田 俊夫¹⁾／公受 伸之¹⁾／村上 陽¹⁾／吉富 裕之¹⁾／小谷 暢宏¹⁾／松森 昭²⁾

【背景】血漿BNPはこれまで心不全の病態評価、予後の予測に有用であるとの多くの報告がある。今回、我々は予防医学的側面から住民健康診断における心機能障害の早期発見へのバイオマーカ(血漿BNP)の役割について検討を行った。この前の班会議で奥出雲臨床研究の1次の結果については報告済みである。今回は2次検診の結果について報告する。

【目的・対象】症状のない585名の健康診断受診者に基本健診と血漿、血清を用いたバイオマーカ(血漿BNP、血清心筋トロポニンT、高感度CRPら)を測定し、血漿BNPが30 pg/mLを越える場合は異常高値と判断しまたは心筋トロポニンTが0.01<超える場合は異常と判断し2次検診対象者として125名選択しドップラー心エコー検査による心精査を行った。拡張機能障害はE/Aが1.0未満でE波のdeceleration timeが250 msec以上に延長している場合を障害有りと判定した。

【結果】1)585名の検討で血漿BNPは加齢と伴に増加した。30才をコントロールとして分散分析多重比較を行った。数値はメディアン(レンジ)で表記した。30才代9.3 pg/mL(0.52-36)、40才代17.1 pg/mL(1.17-36.8)、50才代17 pg/mL(1.29-133)、60才代21.7 pg/mL(0.28-131) 30才代 VS 40才代($p<0.01$)、30才代 VS 50才代($p<0.001$)、30才代 VS 60才代($p<0.001$)。

2)125名のドップラー心エコー検査の結果受診対象者の30%が拡張機能障害を有していた。拡張機能障害を有する群(A群)と有しない群(N群)では血漿BNPレベル、左室重量係数、年齢に関して統計上有意な差を認めた。血漿BNPレベルはA群 VS N群(43.8 ± 4.6 VS 22.5 ± 1.7 pg/mL)、左室重量係数はA群 VS N群(109 ± 4.3 vs 105 ± 9.0)、年齢はA群 VS N群(66 ± 1.0 vs 62 ± 0.7)いずれも統計学上有意であった。

3)多変量によるロジスチック回帰分析を行った結果、血漿BNPレベルが左室拡張機能障害の有意な因子と判断された。

【結論】以上から血漿BNPレベルの上昇に左室拡張機能障害の関与が示唆された。血漿BNPレベルは心血管疾患のマス・スクリーニングにも有用と考えられた。症例を追加しさらなる臨床研究が必要と考えられる。

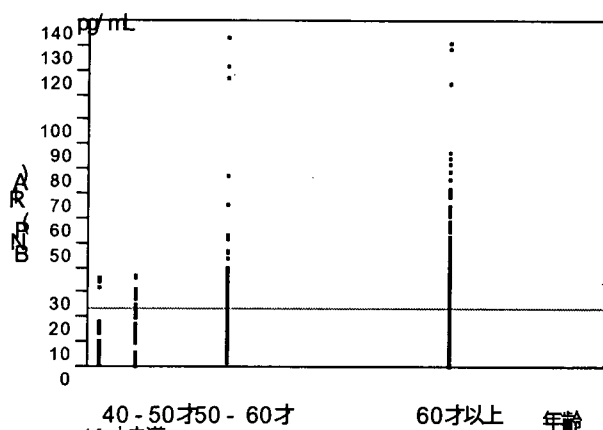


図1. 加齢と血漿BNPレベル

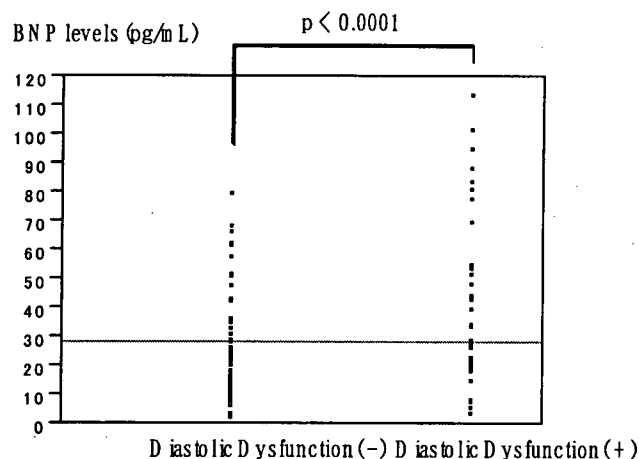


図2. 心エコー図による拡張機能障害と血漿BNPレベル



**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＞**

2006年度第1回総会・研究報告会

2005年6月8日(木)

慶應義塾大学(信濃町キャンパス)新棟11F大会議室

■ プログラム

● ご挨拶

主任研究者： 友池 仁暢(国立循環器病センター)

セッション1<座長：松崎 益徳(山口大学)>

10:05	武田 信彬(東京慈恵会医科大学)	2
	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	
10:15	木村 彰方(東京医科歯科大学)	2
	拘束型心筋症の遺伝子解析：ミオパラチン変異は新規の心筋症原因遺伝子か？	
10:25	永井 良三(東京大学)	3
	拡張型心筋症における血清中自己抗体によって惹起される心筋障害機序	
10:35	豊岡 照彦(東北大学)	4
	各種の原因による心不全重症化に関する共通機構：Calpain活性化によるdystrophin関連タンパクの崩壊仮説の検証	
10:45	中谷 武嗣(国立循環器病センター)	4
	特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究	
10:55	松崎 益徳(山口大学)	5
	リアノジン受容体を標的としたダントロレンによる新しい心不全治療	
11:05	久保田 功(山形大学)	5
	Diacylglycerol kinase とはmechanical overloadによる心臓リモデリングを抑制する	

セッション2-1<座長：横山 光宏(神戸大学)>

11:20	磯部 光章(東京医科歯科大学)	6
	Cre/LoxP組換えシステムを応用したCTLA4IgG遺伝子のon-off発現制御による至適免疫抑制療法の開発	
11:30	堀 正二(大阪大学)	6
	慢性心不全における運動耐容能改善に向けた新規治療法の開発	
11:40	横山 光宏(神戸大学)	7
	心筋梗塞後の左室リモデリングにおけるeNOS uncoupling由来の酸化ストレスの役割についての検討	

● ご挨拶

牧野 友彦(厚生労働省健康局疾病対策課係長)

セッション2-2<座長：横山 光宏(神戸大学)>

12:00	今中 恭子(三重大大学)	7
	遺伝子改変動物を用いた細胞外マトリックス分子テネイシンCの生体内機能解析	
12:10	斎藤 能彦(奈良県立医科大学)	8
	心不全とT型カルシウムチャンネル：新しい作用・意義	

<12:25-13:15 総会>

セッション3<座長：松森 昭(京都大学)>

13:20	松森 昭(京都大学)	9
	わが国の心筋症の予後と予後要因：全国疫学調査5年後の予後調査より	

13:30	川名 正敏(東京女子医科大学)	10
	肥大型心筋症の突然死評価におけるMicrovolt-level T-Wave Alternans の有用性について	
13:40	筒井 裕之(北海道大学)	10
	全国患者登録データから見たわが国における慢性心不全患者の特徴	
13:50	友池 仁暢(国立循環器病センター)	11
	心不全発症・増悪因子としての耐糖能異常	
14:00	島田 俊夫(島根大学)	11
	地域住民健康診断における心血管疾患スクリーニングとしてのバイオマーカ の有用性に関する検討：住民の一部を選択対象とした拡張機能障害の研究を 基礎として	
14:10	福田 恵一(慶應義塾大学)	12
	新規心肥大抑制因子としてのHEXIM1の機能解析	
14:20	小室 一成(千葉大学)	12
	新しい心筋症モデルマウス	

セッション4<座長：今泉 勉(久留米大学)>

14:35	鄭 忠和(鹿児島大学)	13
	不整脈源性右室心筋症の分子遺伝学的研究	
14:45	小川 聡(慶應義塾大学)	13
	治療抵抗性拡張型心筋症に対する免疫吸着療法	
14:55	岡野 光夫(東京女子医科大学)	14
	細胞シート工学による拍動心筋チューブの作製	
15:05	室原 豊明(名古屋大学)	14
	軽症拡張型心筋症における頻拍誘発性機械的交互脈の予後予測意義	
15:15	河合 祥雄(順天堂大学)	15
	たこつぼ心筋障害における血管病変の病理学的検討	
15:25	廣江 道昭(国立国際医療センター)	15
	新しい炎症マーカー—血中テネイシンCによる心筋症の病態評価	

セッション5<座長：藤原 久義(岐阜大学)>

15:40	砂川 賢二(九州大学)	16
	リモデリング成立機序における酸化ストレスの役割	
15:50	今泉 勉(久留米大学)	16
	樹状細胞は心不全の病態に関与しているか？	
16:00	和泉 徹(北里大学)	17
	Gi蛋白阻害による実験的自己免疫性心筋炎の免疫修飾効果とその機序の 解明	
16:10	北浦 泰(大阪医科大学)	18
	心臓サルコイドーシスにおけるMRP8/14の発現に関する研究	
16:20	藤原 久義(岐阜大学)	18
	エリスロポエチン慢性期投与による心筋梗塞後心不全軽減の分子機構	

●ご挨拶

主任研究者： 友池 仁暢(国立循環器病センター)

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青戸病院総合診療部¹⁾／東京慈恵会医科大学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報告されている。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新規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、STNは核小体内に移行できず、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)を欠損しており、In vitroでのpull-down assayおよびIn vivoでのIn cell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。STNのRT-PCRによる発現検索では正常心筋、心筋症にて微量であるが同様に発現しており、生理的に発現しているアイソフォームの可能性が示唆された。

【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。今後の心筋症家系等におけるSTNのさらなる発現検索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。

拘束型心筋症の遺伝子解析：ミオパラジン変異は新規の心筋症原因遺伝子か？

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野¹⁾／東京女子医大第二病院内科²⁾／大阪医大第三内科³⁾
木村 彰方¹⁾／有村 卓朗¹⁾／布田 伸一²⁾／寺崎 文生³⁾／北浦 泰³⁾

【目的】近年の分子遺伝学的解析により、心筋サルコメア構成要素やZ帯構成要素の遺伝子異常が家族性心筋症、特に肥大型心筋症(HCM)や拡張型心筋症(DCM)の原因となることが判明している。現時点までに明らかとなったHCM原因遺伝子は15種、DCM原因遺伝子は20種であるが、拘束型心筋症(RCM)における遺伝子異常については不明な点が多い。そこで家族性RCMを対象として、心筋サルコメア構成要素およびZ帯構成要素の遺伝子群における変異を検索した。

【方法】家族性RCMの6家系を対象として、既知のHCM原因遺伝子群およびdesmin遺伝子の変異を検索した。また、新規の原因候補遺伝子としてミオパラジン遺伝子(MYPN)に着目した解析を行った。MYPN変異が検出された症例について、心筋標本を用いた遺伝子発現解析ならびにZ帯構成要素抗体を用いた免疫組織染色を行った。

【結果】RCM多発6家系中1家系に心筋ミオシン重鎖遺伝子ミスセンス変異(Asn444Ser)を見出した。この変異は、健常者には認められず、アクチン結合ドメイン内の進化的によく保存されたアミノ酸の荷電置換をもたらすことから、RCMの原因変異と考えられた。一方、RCM同胞発症例に、健常者、HCM患者、DCM患者には認められないMYPN終止変異(Gln529ter)を見出した。ミオパラジンはCARP、アクチニン、ネブレットに結合するZ帯タンパクであるが、本終止変異はアクチニンおよびネブレット結合ドメインの欠損をもたらすと考えられた。同胞症例はいずれも小児期発症のRCMで心臓移植を受けたが、光顕および電顕レベルでの病理所見は、片方は心筋錯綜配列等HCM様、他方は心筋細胞脱落、線維化およびZ帯異常等DCM様であった。後者の心筋標本について変異MYPNがmRNAレベルで発現していることを確認し、また免疫組織染色を行ったところ、ミオパラジン分布異常とZ帯およびサルコメア構造異常が認められた。このような異常所見は他のDCM症例には認められず、本RCM症例に特徴的な所見であると考えられた。

【総括】MYPN変異は新たな心筋症原因遺伝子であることが示唆される。

拡張型心筋症における血清中自己抗体によって惹起される心筋障害機序

東京大学循環器内科¹⁾／順天堂大学生体分子²⁾／順天堂大学免疫³⁾

世古 義規¹⁾／永井 良三¹⁾／藤村 務²⁾／高 ひかり²⁾／

峯木 礼子²⁾／村山季美枝²⁾／八木田秀雄³⁾／奥村 康³⁾

【目的】我々は先に、negative costimulatory signalであるPD-1/PD-1 ligandsおよびCTLA-4/B7 pathwayを阻害することによってマウスの急性ウイルス性心筋炎が遷延化して慢性心筋炎へと移行すること、この時、血清中に何らかの心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が存在すること、を報告した。今回、拡張型心筋症患者の血清中に心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が存在するか否かを検討するとともに、それらの自己抗体が認識する心筋細胞膜抗原を同定することを目的とした。

【方法】自己免疫的な心筋障害機序が示唆される拡張型心筋症患者4例と性と年齢を一致させた健常コントロール4例を対象とした。ラットの培養心筋細胞を凍結融解して超遠心することによって細胞膜、細胞質、核の各成分を分離抽出した。心筋細胞膜成分を2次元電気泳動により展開しメンブレンに転写した後、患者および健常コントロールより採取した血清とincubateすることによりWestern blotを行なった。健常コントロールに認められず患者に特異的に認められるspotを質量分析計にて解析することにより、患者血清中の自己抗体が認識する抗原を同定した。

【結果】Annexin familyの蛋白Annexin A6がこれらの患者に共通に同定された。また、ヒトの心筋細胞膜上に構成的にAnnexin A6の強い発現が認められた。Annexin A6はCaチャンネルを調節しCaイオンの細胞内への流入を抑制することが知られている。そこで、筋肉細胞のcell lineを患者血清とincubateした後、adrenaline 2.5 μ Mを負荷することにより細胞内Ca濃度を測定したところ、細胞内Ca濃度の上昇が抑制される傾向が認められた。

【結論】以上より拡張型心筋症において、心筋細胞膜上に発現するAnnexin A6に対する血清中の自己抗体がAnnexin A6と結合し心筋細胞内へのCaイオンの流入を抑制することにより、収縮に抑制的に作用していることが強く示唆された。このことが少なくとも一部の拡張型心筋症の心筋障害に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

各種の原因による心不全重症化に関する共通機構：Calpain活性化によるdystrophin関連タンパクの崩壊仮説の検証

東北大学先進医工学研究機構生命機能分野¹⁾／東北大学加齢医学研究所²⁾／東京薬科大学薬理³⁾
豊岡 照彦¹⁾／熊谷 啓之¹⁾／金野 敏²⁾／仁田 新一²⁾／高橋 正也³⁾／小清水美希³⁾／竹尾 聡³⁾

【目的】当研究グループでは先天性d-sarcoglycan(SG)遺伝子欠損によるDCMハムスター(Sakamoto *et al.*, *PNAS* 1997)、イソプロテレノール大量負荷(Xi *et al.*, *J. CV. Pharmacol.*, 2000)および原因不明だったヒトDCMで共通して細胞膜の透過性亢進、心筋細胞内因性のCa²⁺感受性タンパク分解酵素(calpain)の活性化によるdystrophin(Dys)と、その関連タンパク複合体(DAP)の2次的な断裂による心不全の重症化機構を提唱してきた(Kawada *et al.*, *PNAS* 2002; Toyo-oka *et al.*, *PNAS*, 2004)。またcalpainは*in vitro*でDAPの中のDysとα-とβ-SGを選択的に分解する(Yoshida *et al.*, *CV Res.*, 2003)。今回は①広範囲陳旧性心筋梗塞後の重症心不全でも、この機構が働くか、急性期(術後2週)と慢性期(8週)で検討し、次に②ACE I(trandacryl, Tra)とARB(candesartan, Can)の作用をsham手術(SO)群と比較する。

【方法および結果】雄性Wister系ラットのLCXを結さつ(CL)し、2-8週後に両心カテーテル検査により各種血行動態指標を測定し、心不全状態を確認した。術後2週でLVSPが軽度低下し、LVEDPとRVSPが増加した。術後8週目ではMAP、LVSPが低下し、LVEDPとRVSPが著増した。残存心筋内のDys、α-, β-, γ-とδ-SGのタンパク量とmRNA量を各々の特異抗体によるWestern blottingとRT-PCRで、μ-calpain(capn1)、m-calpain(capn2)の活性を測定した。結果を右図に纏める。①術後2週で各SGとDysのタンパク量は不変だったが、capn1とcapn2のタンパク量と活性が著増した。またDysとα-, β-SGのmRNA量は4倍増加したが、γ-とδ-SGのmRNA量は変らなかった。②しかし術後8週で心不全が進行すると、Dysとα-SGのタンパク量が40-60%程減少したが、capn1とcapn2のタンパク量と活性は増加状態が続き、前記のタンパク分解を示唆した。一方他のSGは変化しなかった。またDAPのmRNA量は減少してSOと変わらず、合成能が低下してタンパク分解を代償しなかった。③興味有る事にACE IまたはARBの慢性投与により、前記のタンパク減少は改善され、実際capn1とcapn2の活性化が正常化した。

【結語】当研究室が提唱した細胞膜透過性の亢進→細胞内Ca²⁺濃度の増加→calpainの活性化→細胞構成成分の非代償性分解→細胞変性による悪循環仮説を支持する。

治療	2w non-	8w non-	Tra	Can
<タンパク量>				
α-SG	→	↓↓	→	→
β-SG	→	→	→	→
γ-SG	→	→	→	→
δ-SG	→	→	→	→
Dys	→	↓	→	→
Capn1	↑	↑	→	→
Capn2	↑↑	↑	→	→
Calpastatin	→	→	→	→
<mRNA量>				
α-SG	↑	→	→	→
β-SG	↑	↑	→	→
γ-SG	→	→	→	→
δ-SG	→	→	→	→
Dys	↑	↑	→	→
<タンパク分解活性>				
Capn1	↑	↑	→	→
Capn2	↑↑	↑	→	→

* 上記の増減は全て1-5%以下の有意差を示す。

特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究

国立循環器病センター臓器移植部
中谷 武嗣

当センターでは、1994年以降心臓移植が考慮される重症心不全で従来の治療法の限界となった72症例に対し、補助人工心臓(VAS)装着を行ってきた。用いたLVASには、体外設置型の東洋紡LVAS(左房脱血および左室脱血)、体内埋込み携帯型LVASのHeartMate VE、NovacorおよびEVAHEARTがある。今回、主に体格の小さな症例や緊急例に用いてきた東洋紡LVAS装着72例中、1年以上の補助を行なった33例を検討した。1例がICM、3例がdHCMで、他はDCMであった。年齢は8~58(平均37)歳、体重は33~70(51)kgであった。脱血方式は、左房(LA)2例、左(LV)27例で、LAの1例は両心補助例であった。補助期間は371~1427(711)日で、1例以外は心臓移植待機患者であった。13例は397~1227(720)日後に移植(NCVC11例、米国4例)された。うち1例はLAによる964日の補助例であった。14例は371~1245(750)日の補助後死亡したが、死因は感染6例、脳障害5例、両者の合併2例および右心不全1例であった。他の6例は377~1427(599)日で補助を継続中である。以上よりToyobo LVAS特にLVは、比較的体格の小さな患者においても1年以上の長期補助に有用であった。

リアノジン受容体を標的としたダントロレンによる新しい心不全治療

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学

小林 茂樹／矢野 雅文／大野 誠／徐 曉娟／内海 仁志／
立石 裕樹／望月 守／野間 利至／山本 健／松崎 益徳

【背景】悪性高熱症(MH)、Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy、Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia、心不全においては、リアノジン受容体(骨格筋型: RyR1、心筋型: RyR2)内のN-terminal domain(1-600)とCentral domain(2000-2500)のドメイン連関障害が、RyRsからのCa²⁺漏出の原因と考えられている。最近、我々は、MHの治療薬であるダントロレンが、RyR1のN-terminal domainに結合し、これらのドメイン連関障害を是正することによりRyR1からのCa²⁺漏出を抑制することを報告した。

【目的】ダントロレンが、心不全においてもRyR2内のドメイン連関障害を是正することにより、心不全を改善させるか否かについて検討した。

【方法・結果】犬心不全モデルを作成し、左室心筋から筋小胞体(SR)および心筋細胞を単離精製し、以下の実験を行った。a)Ca²⁺漏出実験: Ca²⁺蛍光指示薬であるfluo-3を用い、SRからのCa²⁺漏出を測定した。不全心筋SRでは、SRからのCa²⁺漏出が観察されたが、ダントロレン存在下では不全心筋SRからのCa²⁺漏出は濃度依存性に抑制された(IC₅₀=0.3μM)。b)蛍光消退実験: 合成ペプチドDPc10(Gly²⁴⁶⁰-Pro²⁴⁹⁵ of RyR2)をcarrierとして用い、RyR2のN-terminal domainを特異的にMCAで蛍光標識した。この蛍光に対するQuencherのaccessibilityを評価することでチャネル制御ドメインのzipping-unzipping状態を定量化した。正常心筋では、ドメイン連関は、zipping状態であったが、心不全心筋ではすでにunzipping状態であった。ダントロレンは、不全心筋RyR2のドメイン連関を濃度依存性にunzipping→zippingに修復した(IC₅₀=0.3μM)。c)単離心筋細胞の機能評価: 1μMのダントロレンは、不全心筋細胞のcell shorteningとCa²⁺ transientを著明に改善し、diastolic Ca²⁺ sparkを抑制した。d)単離心筋細胞の生存率: 培養不全心筋細胞の生存率は、4日後には、15%にまで低下したが、ダントロレン投与群では、80%まで改善した。

【結語】不全心筋において、ダントロレンは、RyR2のドメイン連関障害を是正することにより、RyR2からのCa²⁺漏出を抑制し、心筋細胞機能異常を改善させることが示唆された。

Diacylglycerol kinase ζ はmechanical overload による心臓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 蛋白共役型受容体シグナルの過剰な活性化が心肥大と心不全の発症に深く関与している。ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、ジアシルグリセロール(DAG)をリン酸化(不活性化)してホスファチジン酸へ変換し、細胞内DAG量を調節することで、protein kinase C(PKC)活性を制御しようと考えられている。DGK ζ 遺伝子を心臓にのみ選択的に発現したトランスジェニックマウス(DGK ζ -TG)では、アンジオテンシンIIとフェニレフリンの持続投与によるDAGの細胞内蓄積、PKCの活性化、ANF遺伝子の発現、心筋細胞肥大が抑制された。本研究では、DGK ζ がmechanical overloadによる心臓リモデリングを抑制するかを検討した。

DGK ζ -TGと野生型(WT)マウスに大動脈狭窄手術を行い、圧負荷モデルを作成した。術後4週でWTマウスでは心重量、左室重量の増加が認められたが、DGK ζ -TGでは重量の増加は抑制された。WTマウスでは心エコー法で左室壁厚の増加、左室内腔の拡大、左室短縮率の低下が観察されたが、DGK ζ -TGマウスではこれらの変化は認められず、圧負荷によるリモデリングは抑制された。

次に冠動脈左前下行枝を結紮し心筋梗塞を作成した。DGK ζ -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、DGK ζ -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DGK ζ -TGマウスでは抑制された。心筋梗塞後の左室線維化率はDGK ζ -TGマウスで低く、transforming growth factor- β 1、collagen type-1、collagen type-3の発現は抑制されていた。

DGK ζ はGq蛋白共役型受容体シグナルと細胞内脂質代謝の調節因子として機能し、mechanical overloadによる左室リモデリングを抑制した。