

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

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学
磯部 光章

【背景】急性拒絶反応は心移植後の最も深刻な合併症である。現在用いられている免疫抑制剤の有効性は高いが、感染、悪性腫瘍など深刻な副作用が問題である。その克服には免疫寛容誘導が望まれる。CTLA4と免疫グロブリンIgG(Fc部分)の融合蛋白であるCTLA4IgGは、抗原提示細胞のB7と結合し、CD28を介するTリンパ球の副刺激阻害による強力な免疫抑制作用を有する。免疫寛容の誘導が可能であることが示されており、臨床応用も始まっている。アデノウイルスベクターを用いたCTLA4IgG遺伝子導入は、単回投与で血中CTLA4IgG濃度を長期間維持できることから、その臨床的有用性が示唆されているが、長期間にわたるCTLA4IgG遺伝子発現は、過剰な免疫抑制効果による副作用が懸念されるため、任意に遺伝子発現を停止する発現制御機構の開発が期待される。本研究では、Cre/LoxP遺伝子組換えシステムを応用したCTLA4IgG遺伝子のon-off発現制御を、マウス心移植モデルを用いて検討した。

【方法と結果】BALB/cドナーから移植心を摘出し、MHCフルミスマッチであるC3H/Heレシピエントの腹部に異所性に移植し、急性拒絶モデルを作成した。LoxP配列に挟み込まれたCTLA4IgG遺伝子を組込んだアデノウイルスベクターを移植直後に尾静注により投与した結果、移植心は120日以上長期生着した。移植後30日にCre変換酵素遺伝子を導入したところ、血中CTLA4IgG濃度は有意に低下したが、同じく移植心は長期生着した。レシピエントマウスは、CTLA4IgG遺伝子の発現停止後の外来抗原刺激に対し、正常マウスと同等の抗体産生を認めた。また移植心の長期生着後に皮膚移植片は拒絶された。

【結論】CTLA4IgG遺伝子の導入は急性拒絶反応を抑制し、移植心は長期生着した。Cre変換酵素遺伝子の導入により、LoxP配列で挟まれたCTLA4IgG遺伝子をon-off発現制御することが可能であり、移植片の長期生着には影響しなかった。CTLA4IgGの発現停止後、外来抗原に対する免疫応答が保たれ、過剰な免疫抑制効果は回避されたと考えられた。Cre/LoxP遺伝子組換えシステムを応用し、任意の時期に免疫調節因子を発現制御することから、心移植後の免疫抑制法として有用である可能性が示された。

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

大阪大学医学系研究科循環器内科学¹⁾／東京都老人総合研究所²⁾

山口 修¹⁾／大津 欣也¹⁾／渡部 徹也¹⁾／武田 理宏¹⁾／樋口 義治¹⁾／堀 正二¹⁾／白澤 卓二²⁾

【目的】慢性心不全治療における目的の一つはquality of life(QOL)の改善である。QOLは運動耐容能により規定されている。強心薬による心機能の亢進は運動耐容能を著明に改善するが予後を悪化する。本研究ではHbの酸素親和性を低下させることにより心機能に影響を与えることなく慢性心不全マウスの運動耐容能を改善しうるかどうかが検討した。

【方法】8週令雄性マウスの左冠動脈を結索し心筋梗塞(MI)を作成した。(実験1)4週後このマウスに放射線照射後、低酸素親和性変異Hb(Presbyterian型, Pres)を発現するトランスゲニックマウスより単離した骨髓細胞を移植(Bone marrow cell transplantation, BMT)した。BMT 4週後にトレッドミルにて運動耐容能を評価した。(実験2)MI後4週後にガン放射線治療補助薬として使用されているHb酸素親和性低下剤を静注し、運動耐容能を同様に評価した。

【結果】BMT後のマウスより単離したHbの逆相HPLC解析において変異型Hbが検出され、また酸素飽和曲線は有意に右方移動していた。心筋梗塞作成後4週後のBMT施行前およびBMT 4週後(心筋梗塞作成後8週後)において著明な心機能低下、心拡大を呈したがその程度はPres BMTとWild-type(WT)BMT群間に有意差を認めなかった。また血球数、動脈血pH、PaCO₂、PaO₂レベルに両群間で差を認めなかった。さらに骨格筋の生化学的特性も差を示さなかった。しかしながら酸素電極で測定した骨格筋酸素濃度は低酸素状態でWT BMTでは時間とともに低下を示すのに対し、Pres BMTでは酸素濃度は保たれていた。トレッドミル走行で検討した走行距離はPres BMT群で有意に長かった。予後は両群間で差を認めなかった。またHb酸素親和性低下剤投与によっても同様の効果が観察された。

【総括】Hb酸素親和性の低下は慢性心不全において運動耐容能の改善をきたし、新たな心不全治療薬の標的となりうる。

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

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学
杜 隆嗣／川嶋成乃亮／政野 智也／横山 光宏

【背景】酸化ストレス存在下では、NO産生に不可欠な補酵素であるテトラヒドロバイオプテリン(BH4)の相対的欠乏により血管内皮型NO合成酵素(eNOS)のuncouplingが惹起され、酸化ストレスの産生源となりうる。我々は心筋梗塞後の心室リモデリング過程にeNOS uncoupling由来のスーパーオキシドが影響を及ぼすかについて検討した。

【方法】左冠動脈前下行枝結紮によりラット心筋梗塞モデルを作成した。心筋梗塞作成3日前よりBH4の経口投与を行った群(10mg/Kg/day, MI+BH4群)およびコントロール群(MI群)を作成し、4週間後に解析を行った。

【結果】MI+BH4群ではMI群に比べ、心筋でのROS産生およびBH4/BH2比の低下が抑制され、左室リモデリングも有意に抑制されていた(拡張期左室径; MI群 11.1 ± 0.1 , MI+BH4群 10.4 ± 0.2 mm、後壁壁厚; MI群 1.65 ± 0.04 , MI+BH4群 1.37 ± 0.06 mm)。左心機能も血行力学的にMI+BH4群で有意に保持されていた(左室拡張末期圧; MI群 19.6 ± 1.0 , MI+BH4群 12.3 ± 2.4 mmHg, LV dP/dt max; MI群 4885 ± 305 , MI+BH4群 7838 ± 559 mmHg/s)。非梗塞領域(左室後壁)における心筋細胞横断面積を計測したところ、MI+BH4群ではMI群に比べ約25%の減少を認めた。一方、リモデリング抑制効果がBH4自身の抗酸化作用による可能性があるため、BH4類似の構造と抗酸化作用を有するもeNOSの補酵素としては作用しないテトラヒドロネオプテリン(NH4)を投与した群でも同様の検討を行った。NH4投与群での左室リモデリング抑制効果はBH4投与群に比し軽微であった。

【結語】心筋梗塞後に増加した酸化ストレスによりBH4の酸化が生じ、その結果生じたuncoupled eNOSが、さらなる酸化ストレス増加を生じ、心室リモデリング悪化の一因となっていると推測される。BH4によるeNOS機能改善は心不全治療にも有用であると示唆された。

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

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⁾／堰本 晃代¹⁾／吉田 利通¹⁾／廣江道昭²⁾

拡張型心筋症の心筋組織には、種々の原因による心筋組織障害とそれに対する組織修復反応が見られるが、実際に組織所見として認識できるのは多彩な段階の間質線維化反応である。一般に心臓の線維化は拡張能を低下させ心機能不全を来すと考えられているが、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、線維化を適切に制御し過剰な線維化を抑制することが、心筋疾患の根本的治療の一つの選択肢である。我々は、間質の細胞外マトリックス分子の一つテネイシンCに注目し、いくつかの動物実験に基づいて、心筋組織での発現が拡張型心筋症の病期、活動性評価の指標となりうるとともに、テネイシンCが多くの機能を持ち、心筋病変形成初期の線維化促進因子の一つであり、実際、テネイシンCノックアウトマウスではマクロファージの集簇、コンドロインチン硫酸プロテオグリカンの生成、沈着が抑制され、反応型線維化病変ができにくいことを明らかにした。その一方、テネイシンCは、理論的に、心臓に対して生体内で保護的、障害的の両面の作用をもち、必要な時期、必要な場所に適量発現することが心筋の望ましい組織修復に必要であると思われる。そこで、テネイシンCの心筋病変進展での役割を明らかにするため、Cre-lox制御系による生体内過剰発現の誘導を試みた。すなわち、CAGプロモーターとマウステネイシンC遺伝子の間にloxではさんだstopを挿入したトランスジェニックマウスを作成し、Nkx2.5 Cre-マウス、 α -myosin heavy chain(α MHC)プロモーターCrePRIマウス(inducible α MHC-Cre)あるいは α -smooth muscle actinプロモーターCreマウスを交配し得られたF1で、3種類の異なる条件でテネイシンCの過剰発現マウスを作成した。発現状況を免疫組織化学で解析し、ほぼ、設計通りの発現制御の成功を確認したが、予備的な解析結果では、負荷のない状態では、少なくとも31週令までは、過剰な線維化など著明な表現型を認めていない。現在、さらに、このマウスを用いて心筋障害後組織修復モデルやアンジオテンシン負荷モデルなどを作成し、線維化病変形成の詳細な分子メカニズムに関する解析を行っている。

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。

一方、心不全を発症する、Dahl食塩感受性ラットに生後7週より高食塩食で飼育すると、CACN1H遺伝子は対象ラットより有意に高発現し、T型Caチャンネルブロッカーである、エフォニジピンを投与すると、心室のリモデリングが抑制された。

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

京都大学大学院医学研究科循環器内科学¹⁾／北海道大学名誉教授²⁾／金沢医科大学健康増進予防医学³⁾
松森 昭¹⁾／北畠 顕²⁾／三浦 克之³⁾／中川 秀昭³⁾

わが国の心筋症の予後および予後規定要因を明らかにするために、1999年に実施した全国疫学調査対象症例の5年後の予後調査を実施した。

1) 拡張型心筋症

全国疫学調査2次調査症例1,932例のうち医療機関からの協力が得られた1,554例について5年後の予後を追跡した。原則として医療機関からの予後情報の提供を受けたが、追跡中断例では市町村への住民票請求により確認を行った。

追跡を行った1,554例中、追跡期間中に420例が死亡し、全体での5年生存率は73%であった。1998年中に初めて診断された390例での5年生存率は78%であった。

予後関連要因に関する単変量解析においては、加齢、低肥満度、NYHA、左脚ブロック、心胸比、左室拡張期径、左室駆出率、長い診断後経過年数が、予後不良の要因であった。

重要な要因をモデルに含むCox比例ハザードモデルによる多変量解析では、男性、加齢、家族歴、左室径、左室駆出率が、互いに独立して有意に高いハザード比を示し予後不良要因と考えられた。

左室径係数の1標準偏差上昇あたりの多変量調整ハザード比は1.33(95%信頼区間1.07-1.65)、左室駆出率の1標準偏差低下あたりのハザード比は1.26(95%信頼区間1.02-1.55)であった。

2) 肥大型心筋症

全国疫学調査2次調査症例2,134例のうち医療機関からの協力が得られた1,605例について5年後の予後を追跡した。原則として医療機関からの予後情報の提供を受けたが、追跡中断例では市町村への住民票請求により生死の確認を行った。

追跡を行った1,605例中、追跡期間中に241例が死亡し、全体での5年生存率は84%であった。1998年中に初めて診断された342例での5年生存率は86%であった。

予後関連要因に関する単変量解析においては、加齢、低肥満度、糖尿病既往、NYHA、心房細動、左脚ブロック、心胸比、左室駆出率、病床数が少ない病院が、予後不良の要因であった。心尖部肥大の存在は良好な予後を示した。

重要な要因をモデルに含むCox比例ハザードモデルによる多変量解析では、加齢、NYHA、左脚ブロック、心尖部肥大の欠如、心胸比、左室駆出率が、互いに独立して有意に高いハザード比を示し、予後不良要因と考えられた。とくに左室駆出率の低下と心胸比の増大との関連が最も強く、左室駆出率の1標準偏差低下あたりの多変量調整ハザード比は1.42(95%信頼区間1.20-1.69)、心胸比の1標準偏差上昇あたりのハザード比は1.61(95%信頼区間1.26-2.05)であった。

3) まとめ

本調査により医療機関による偏りのないわが国での心筋症の予後が明らかとなった。1983年に実施された心筋症研究班の調査による予後と比較すると、拡張型心筋症ではかなりの改善がみられた(73%対54%)が、肥大型心筋症ではむしろ悪化傾向を示した(84%対93%)。拡張型心筋症では左室径、左室駆出率、肥大型心筋症では心胸比、左室駆出率がそれぞれ独立して重要な予後予測要因であると考えられた。

なお、今後も調査を継続し、10年後の予後調査を行う予定である。

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

東京女子医科大学附属成人医学センター循環器内科¹⁾／東京女子医科大学循環器内科²⁾／
東京女子医科大学附属青山病院循環器内科³⁾
梶本 克也¹⁾／河原井浩孝²⁾／萩原 誠久²⁾／川名 正敏³⁾／笠貫 宏²⁾

【背景・目的】肥大型心筋症(HCM)症例の突然死評価における心電図学的評価法は、ホルター心電図による非持続性心室頻拍以外には報告が無く、これまでに十分評価されていない。このため、今回我々はHCM症例の突然死評価におけるMicrovolt-level T-Wave Alternans(M-TWA)と血清B-type natriuretic peptide(BNP)値の臨床的意義について検討した。

【方法】当施設でHCMと診断された連続36症例にM-TWA(Cambridge Heart社製CH2000)と血清BNP値を測定後、突然死(心肺蘇生例と植込み型除細動器(ICD)の正常作動症例も含む)の頻度について検討した(平均観察期間=24±7ヶ月)。

【結果】36症例のうち、M-TWA陽性は19症例、M-TWA非陽性は17例(陰性; 14例)であり、M-TWA陽性19症例中突然死は9例であった。一方、M-TWA非陽性17例では突然死は1例のみであった。M-TWA陽性19症例中突然死を認めた10例と認めなかった9例における血清BNP値では、突然死症例のBNPが有意に高値であった(515 vs. 130 pg/mL, $p=0.004$)。さらに、M-TWA陽性と血清BNP ≥ 250 pg/mLの2つを併用した評価法の突然死症例の予測率は、感度: 80%、特異度: 100%、陽性的中率: 100%、陰性的中率: 93%であった。

【結語】HCM症例において、M-TWAと血清BNP値を併用した評価法はHCM突然死症例を鑑別するのに有用であると考えられた。

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

北海道大学循環病態内科学

筒井 裕之／絹川真太郎／後藤 大祐／真茅一土橋みゆき／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「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)」として、全国レベルで2612例の患者登録データベースを構築した。患者の平均年齢は71歳で、65歳以上の高齢者が70%を占めた。特に女性の高齢者の占める割合が高かった。心不全の原因となる基礎心疾患は、虚血性心疾患が32%と最も多く、弁膜症、高血圧、拡張型心筋症が続いた。心臓超音波にて測定した左室駆出率の内訳では、40%以下の収縮不全が59%を占めるのに対し、50%以上と比較的保たれた患者も25%であった。このような患者は、近年拡張不全による心不全として注目されているが、収縮不全に比し、より高齢で、女性に多かった。収縮不全では、虚血性心疾患と拡張型心筋症が主たる基礎疾患であるのに対し、拡張不全は、高血圧性心疾患を基礎疾患とする患者が約半数を占めた。また、拡張不全では約40%に心房細動をみとめた。院内死亡率は、収縮不全と拡張不全で差をみとめなかった(3.9% vs 5.8%)。

わが国の患者の臨床的特徴を、米国における同様の登録観察研究ADHEREと比較すると、両者には共通点が多く、慢性心不全の急性増悪の臨床像そのものには、わが国と欧米との間に大きな差はないと考えられた。今後、これらの登録患者の長期予後(死亡および心不全増悪による再入院)を検討する予定である。

【背景】従来、耐糖能異常は動脈硬化の原因となり虚血性心疾患を引き起こすことにより、心不全の悪化因子であると考えられてきた。しかし、近年一時的な血糖レベルの増加が酸化ストレスなどを介し生体に様々な悪影響を及ぼすことが報告されていることから、我々は耐糖能異常(糖尿病・IGT)が心不全の病態を悪化させる直接的な原因の一つではないかと考えこの研究を行った。

【方法】マウス大動脈縮窄モデル(TACモデル)において、ボグリボースがTAC 4週後の心不全を改善できるかを検討した。また、糖尿病の治療薬として広く使われているαグルコシダーゼ阻害薬であるボグリボースを慢性心不全症例28人(NYHA II-III)に無作為に投与し、3ヶ月～半年後の症状と血中BNP濃度について検討した。

【結果】TACモデルにおいては、随時血糖値の上昇を認めボグリボース投与により血糖の上昇は抑えられた。心重量/体重比はボグリボース群において有意に低下していた($P=0.026$)。また、肺重量/体重比、左室短縮率、左室拡張末期径、肺動脈楔入圧の各心不全指標も有意に改善していた($P<0.05$)。ヒト心不全症例においてボグリボース投与群と非投与群において3ヶ月～半年後の血中BNP濃度は、ボグリボース投与群においてのみ有意に低下していた。

【考察】ヒト心不全症例においては、耐糖能異常の出現が対照群に比し有意に高値であった。耐糖能異常の内訳を見ると、糖尿病・IGTの頻度は慢性心不全で増加していたが、一過性高血糖の少ないと考えられるIFGの頻度は逆に減少していた。さらに経口血糖負荷による血糖の上昇量が血中BNP濃度と相関を持つことから、一過性高血糖が心不全に直接大きな影響を与えていることが示唆された。さらに、マウスTACモデルおよび慢性非虚血性心不全症例においてボグリボースが心不全を改善することが示唆された。このことから一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、αグルコシダーゼ阻害剤は心不全の新しい治療薬となると考えられた。

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

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内科学講座循環器内科²⁾

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

佐藤 秀俊¹⁾／坂根 健志¹⁾／高橋 伸幸¹⁾／平野 能文¹⁾／菅森 峰¹⁾／

國沢 良嗣¹⁾／徳丸 睦¹⁾／若林 景子¹⁾／石橋 豊¹⁾／松森 昭²⁾

【目的】地域住民健康診断における早期循環器疾患スクリーニングを目的とした労力のかからない方法としてのバイオマーカの臨床的有用性を検討することである。

【方法・対象】住民健康診断1545名(平均年齢 66.7 ± 11.4 , 男性/女性537/1008)を対象として基本健診の測定項目(血圧、BMI、腹囲、血清脂質、クレアチニン、血糖、HbA1C、肝機能、CBCら)に加え血清トロポニンT(cTnT)、血漿BNP、血清NT-proBNP、高感度CRP、HCV抗体らをバイオマーカとして測定した。そのうち194名を心エコー検査の対象として選択し心機能を評価した。血清、血漿は全て測定まで30℃にて保存した。BNP、NT-proBNP、トロポニンTは免疫化学発光法にて測定した。

【結果】収縮期高血圧者(140mmHg)554(36%)、拡張期高血圧者(90mmHg)174(11.3%)、HbA1Cが5.8%を超える糖尿病患者が239名(15.5%)、血漿BNPの範囲は2-1040pg/ml、血清NT-proBNPの範囲は7.9-4692pg/mlであった。心エコー検査を194名で行った。E/A>1かつDCT>250msecを超えるものを左室拡張機能障害と診断した。左室肥大は24/194(12.4%)の頻度に認められた。左室拡張機能障害の有無を従属変数として血漿BNP、血清NT-proBNPを自然対数に変換し、年齢、血圧、性別等を組み込み、多変量ロジスティック回帰分析を行った。その結果、血漿BNP、血清NT-proBNPが有意な因子として残った。それで左室拡張不全の有無で自然対数BNP、NT-proBNPにつき各々ROC 曲線を描いてみるとcutoff値は各々19.3pg/ml、56.7pg/mlであった。この各々のcutoff値を用いて1542名(BNP)、1369名(NT-proBNP)の対象者を分類してみるとBNP 19.3pg/mlを超える者が54%、NT-proBNP 56.7pg/mlを超える者が51%に認められた。また、自然対数BNPと自然対数NT-proBNPの単回帰分析の結果相関係数は0.88と有意な正の相関を認めた。両ペプチドとも加齢、貧血、性差の影響を受け、さらにNT-proBNPでは血圧、コレステロールの影響を受けることが判明した。cTnTは0.01<を示すものが15/1543で0.01%の頻度で認められ、その15名中14名(93%)がBNP19.3pg/mlより高値を示した。HCVは38/1545で2.5%で陽性であった。

【結論】以上から住民健康診断におけるBNP、NT-proBNPの上昇は高頻度に認められ、特に高齢者では顕著であった。BNP、NT-proBNPの上昇に左室拡張障害の関与が示唆されることから両ペプチドともに心血管疾患のスクリーニングに有用であると考えられた。

我々は転写伸長反応促進因子P-TEFbが様々な肥大刺激の“final common pathway”として活性化されることを世界で初めて報告した(*Sano et al, Nat Med, 2002*)。さらにP-TEFbの持続的活性化は心筋細胞肥大(細胞容積の増大)を惹起するのみならず、ミトコンドリアに局在する機能タンパクの発現を転写レベルで選択的に抑制することによって心筋収縮力の低下(ATP産生能低下)、またストレス下における心筋細胞のアポトーシスに対する抵抗性低下を引き起こし心不全への進展にも深く関わっている(*Sano et al, EMBO J, 2004*)。以上の研究結果はP-TEFb自身あるいはP-TEFb活性化を引き起こす上流の情報伝達経路を遮断することが新しい心臓病治療の標的となりうる可能性を強く示唆する。

ここで、HEXIM-1は血管平滑筋細胞を分化誘導剤hexamethylene-bis-acetamideで刺激したときに誘導される遺伝子としてクローニングされた。その後、HEXIM1が7SK低分子RNAとの結合を足場としてP-TEFbを抑制していること、様々なストレス刺激によってHEXIM1と7SK低分子RNAがP-TEFbから離れることによってP-TEFbが活性化されるが報告された(*Yik JH et al, Mol Cell, 2003*)。さらにHEXIM1のマウスホモログであるClp1のノックアウトマウスが心肥大を呈して死亡することが報告された(*Huang F et al, Mech Dev, 2004*)。この報告はP-TEFbが心肥大の病態形成における鍵分子であるとした申請者の実験結果を支持するものであり、かつHEXIM1がP-TEFbの内因性抑制分子として心肥大抑制分子として生理的に機能していることを支持する。

プロテオミクスを用いた解析の結果、HEXIM1が7SK 低分子を介した転写伸長因子P-TEFb抑制に加えて、glucocorticoid受容体と7SK snRNA非依存性に結合してglucocorticoid受容体依存性転写を抑制することを見出した。さらに、HEXIM1と7SK 低分子RNA、glucocorticoid受容体の結合部位を明らかにし、P-TEFbとの結合のみを選択的に欠失させたHEXIM1変異体の作製に成功した。この変異体がP-TEFb非依存性にglucocorticoid受容体依存性転写活性を抑制することを確認した。

新しい心筋症モデルマウス

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学
小室 一成

【目的】特発性拡張型心筋症は一部の原因遺伝子が解ってきたものの大部分は原因不明であり、また原因遺伝子が判明したものでも、その遺伝子の変異により収縮不全をきたす分子機序については未だ不明である。そこで本研究では拡張型心筋症の収縮不全をきたす分子機序を解明するために、マウス拡張型心筋症モデルを作成し、そのモデルマウスを用いて心機能不全発症の分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト拡張型心筋症の原因遺伝子として報告がある変異型心筋αアクチンを心臓特異的に強発現させたマウス(Tg)を作成する。まずTgマウスの生命予後と心機能を検討する。

【結果】Tgマウスでは生後8ヶ月より死亡するマウスを認めた。心エコー検査では、Tgマウスでは野生型マウスと比較し、2ヶ月令より次第に左室内腔は拡大し、心収縮力も低下した。ANP mRNAレベル、α-sarcoglycanやβ-dystroglycanの蛋白レベルはTgマウスで増加した。

【結語】ヒト拡張型心筋症の原因遺伝子を用いて、拡張型心筋症モデルマウスを作成し得た。今後このマウスを用い、遺伝子変異からどのような機序で心不全に至るのか詳細に検討する予定である。

鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学
阿南隆一郎、濱崎秀一、尾辻 豊、鄭 忠和

【背景】不整脈源性右室心筋症(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: ARVC)は突然死を来たしかつ遺伝性を有する心筋疾患である。ARVCの分子遺伝学的検討により、現在までに10の遺伝子座が報告されており、6種類の病因遺伝子が明らかとなっている。すなわちcardiac ryanodine receptor-2遺伝子、plakoglobin遺伝子、desmoplakin遺伝子、plakophilin-2遺伝子、transforming growth factor β -3遺伝子あるいはdesmoglein-2遺伝子がARVCの病因であることが報告されている。これらのうちdesmosomeに関連する遺伝子が4種類(plakoglobin遺伝子、desmoplakin遺伝子、plakophilin-2遺伝子、desmoglein-2遺伝子)であり、ARVCの病因には細胞接着因子の異常が深く関わっていると考えられる。これまでのARVCに関する遺伝子異常の報告は、欧米の家系、症例におけるものがほとんどである。

【目的】本研究の目的は鹿児島大学において診療したARVC症例の病因を明らかにすることである。

【方法】鹿児島大学病院で診断し、遺伝子解析研究に協力が得られた5名のARVC症例(男性3名、女性2名、平均年齢 59.4 ± 13.7 歳)とその家族を対象とした。ARVCの診断はMcKennaの診断基準に従った。血液よりDNAを抽出し解析を行った。一家系において連鎖解析を試みた。今回はdesmoplakin遺伝子とplakophilin-2遺伝子の解析を、PCR法による直接塩基配列決定法を用いて行った。

【結果】47歳の女性を発端者とする一家系においてはARVC3(14q12-22)への連鎖が示唆された。1名のARVC症例においてdesmoplakin遺伝子のexon 8におけるTyr494Phe変異を認めた。症例は49歳の男性で心室頻拍に対してICDの植え込みを行われた症例であった。

【結論】ARVCの一家系においてARVC3への連鎖が示唆された。またARVCの一例においてdesmoplakin遺伝子のTyr494Phe変異を認めた。鹿児島県のARVCにおいてもdesmoplakin遺伝子変異が病因となる症例が存在すると考えられた。またARVCの病因は多様であることが確認された。

治療抵抗性拡張型心筋症に対する免疫吸着療法

慶應義塾大学医学部循環器内科¹⁾／慶應義塾大学医学部中央透析室²⁾／
北里研究所付属病院内科³⁾／平塚市民病院循環器科⁴⁾
吉川 勉¹⁾／内藤広太郎¹⁾／家田 真樹¹⁾／安斉 俊久¹⁾／
熊谷 裕生²⁾／馬場 彰泰³⁾／栗田 康生⁴⁾／小川 聡¹⁾

【背景】拡張型心筋症(DCM)の患者において約85%に何らかの抗心筋自己抗体が存在する。われわれは β 1アドレナリン受容体に対する自己抗体は心機能障害と致死的心室性不整脈の発生素地となることを明らかにした。ムスカリンM2受容体に対する自己抗体は心房細動と関連した。さらにDCM患者の26%に未知の自己抗体が存在し、Na-K-ATPaseを標的とすることが判明した。本自己抗体は突然死の強力な予測因子となった。トロポニンIに対する自己抗体は細胞内カルシウム過負荷を誘導することも知られている。

【目的】免疫吸着療法により抗心筋自己抗体を除去し、その有効性・安全性を確立する。

【方法】われわれが独自に開発した心抑制性抗体検出システムを用いて、抗心筋自己抗体をスクリーニングした。十分量の β 遮断薬を含む薬物治療を行ってもNYHAⅢ／Ⅳ度、左室駆出率30%未満のDCM例を対象とした。

【結果】第一例目として、53歳、女性の重症DCMを対象として免疫吸着療法を行った。同患者は2004年11月から両心室ペーシングによる心臓再同期治療を受けているにも拘わらず、左室内径8.0/7.8cm、駆出率4%、血漿BNP濃度1933pg/mlであった。心抑制性抗体のみならず、ELISA法により β 1自己抗体およびムスカリンM2自己抗体共に陽性であった。2006年1月27日より計3回の免疫吸着を行った。 β 1自己抗体価は300倍から20倍に、ムスカリンM2自己抗体価は50倍から検出不能となった。血漿BNP値は1058pg/ml、左室駆出率は8%となった。引き続き現在経過観察中である。

【結論】重症末期DCM患者に対し、免疫吸着療法を行った。心抑制性抗体の存在を指標に症例をスクリーニングし、検討を重ねていく予定である。

細胞シート工学による拍動心筋チューブの作製

東京女子医科大学先端生命医科学研究所
清水 達也／関根 秀一／岡野光夫

我々はこれまでに重症心不全に対する新たな治療法として、細胞シート工学の技術により全体が同期して自律拍動するパッチ状3次元心筋組織の作製を可能とし、またその移植による有効性を示してきた。より効果的な治療法の開発を目的とし、細胞シートによる組織再構築法の新たな展開として補助ポンプとなりうるチューブ状心筋組織の構築を試みた。温度応答性培養皿を用いて新生仔ラットの心筋細胞を培養し、温度処理のみで心筋細胞シートを回収した。ラットの胸部大動脈を採取したのち、その血管上へ心筋細胞シートを6層巻付けることにより管状の心筋組織の作製を行った。作製したチューブ状心筋組織をマイクロサージェリー(カフ法)を用いて8週齢ヌードラット腹部大動脈へ置換移植した。電気生理学解析と血管内圧測定にて機能評価を行い、組織学的解析として透過電子顕微鏡、HE、Azan染色、さらにTroponin-T、Connexin43、IsolectinB4により免疫組織染色を行った。またBNP、Myosin heavy chain (MHC)の遺伝子発現を腹腔内に移植したコントロール群と比較した。置換移植後4週間において観察した結果、肉眼レベルでチューブ全体が同期して自律拍動することを確認した。このグラフトの内圧測定では平均 5.9 ± 1.7 mmHgの圧較差が計測された。組織切片では動脈の外周すべてに心筋組織の生着を認めた。また高度に分化した心筋細胞、組織内の毛細血管および細胞間のギャップジャンクションの形成が観察された。腹腔内移植群と大動脈置換移植群で比較したところ、その厚さは腹腔内において 70 ± 10 mmに対し大動脈置換の場合では 165 ± 15 mmと増大し、またBNP、MHCの遺伝子発現量も有意に増大することが確認された。このことは拍動負荷により移植したチューブ状心筋組織が肥大したものと考えられた。細胞シート工学により拍動心筋チューブの作製に成功し、さらにin vivo拍動条件下に移植することで高機能化できる可能性が示唆された。本研究は再生組織移植から再生臓器移植への展開における先駆けとなるものと期待できる。

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

名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学
井澤 英夫／平敷安希博／室原 豊明

【背景・目的】拡張型心筋症(DCM)の予後予測指標として従来より、左室駆出率やBNPなどの有用性が報告されている。しかしながら、NYHAⅢ以上の重症拡張型心筋症を対象とした報告が多く、症状の軽いDCM患者における予後予測指標は未だ確立されていない。機械的交互脈は、重症不全心でしばしば認められる生理的現象であり、特に頻脈下で出現しやすいことが知られている。本研究の目的は、右房ペーシングにより誘発される機械的交互脈の軽症DCMにおける予後予測指標としての有用性について検討することである。

【対象】対象はNYHAⅠ、Ⅱの比較的症状が軽いDCM36例(平均年齢49歳)、および非典型的胸痛と心電図異常を認めるものの心エコー図、冠動脈造影及び左室造影により異常を認めなかった対照群8例である。

【方法】左室内に挿入したカテ先型マイクロマノメーター付きピッグテールカテーテルにより、左室圧を測定しながら右房ペーシングを行った。WenckebachⅡ度房室ブロックの出現または心拍数が140/分まで、心拍数を10bpmずつ漸増した。また、左室自由壁より心内膜心筋生検を行い、心筋生検標本から定量的RT-PCR法により筋小胞体Ca²⁺関連蛋白のmRNAレベルを評価した。DCMのうち、右房ペーシングにより機械的交互脈が誘発されなかった22例(A群)と誘発された14例(B群)に分類し、両群間で予後を比較検討した。

【結果】A、B群間で、年齢、性別、LVdp/dtmax、T_{1/2}、左室駆出率、末梢BNP濃度に差を認めなかった。対照群に比し、DCM群では、SERCA2、RyR-2のmRNAレベルは有意に低く、特にB群はA群に比し有意にSERCA2 mRNAレベルは低値であった。平均3.7年(0.8~7.5)の観察により、B群はA群に比し有意に心イベントの発生率が高かった($p=0.021$)。stepwise法による多変量解析の結果、右房ペーシングによる頻拍誘発性機械的交互脈の出現が、唯一独立した予後予測因子であった($p=0.021$)。

【結語】頻拍誘発性機械的交互脈の出現は、軽症DCMにおける心イベント発生の予測因子であることが示唆された。

たこつぼ心筋障害における血管病変の病理学的検討

順天堂大学¹⁾／島根医科大学²⁾／東京医科歯科大学³⁾

河合 祥雄¹⁾／山田 京志¹⁾／鈴木 宏昌¹⁾／島田 俊夫²⁾／長崎 真琴²⁾／磯部 光章³⁾／磯部 和哉³⁾

【背景】心尖部壁運動低下・無収縮と心基部の過収縮・正常収縮を特徴とするたこつぼ心筋障害の発症機序として、当初考えられた心筋気絶は、心筋虚血の非証明(慢性期誘発率、非再現性)から否定的と考えられるが、微小循環障害説は十分には否定されていない。

【目的】全国諸施設症例剖検例を用い、部位による心筋微小血管病変の差位について検討した。

【対象と方法】たこつぼ心筋障害(心尖部を中心とした広範な収縮障害、心電図異常など)が疑われ死亡した7剖検例の心室微小血管病変、心筋病変を検討した。心尖部ならびに心基部付近の左心室横切面前壁切片上(顕微鏡下で心筋の横断面が見られる部位心外膜側、心内膜側)において、相対的毛細血管密度とその病的性状(破綻、血栓形成、血球成分付着)を計測した。毛細血管数は接眼レンズ内に挿入されている計測用グリッド(42-point “Weibel” test grid)を用い、グリッド内の21線分上に落ちた毛細血管数をそれぞれ10視野計測した。心筋病変として心筋間質における出血、小円形細胞浸潤に注目した。

【結果】障害心筋細胞数の割合は検索例において心尖部で高率であったが、相対的毛細血管密度は心基部 7.1 ± 1.01 に対し心尖部 6.5 ± 0.96 と有意な差を認めなかった。毛細血管破綻像は2例に見られ、出血を伴っていた。心筋間質における細胞浸潤は障害心筋細胞に伴い局所性に見られ、ウイルス性あるいは特発性心筋炎に見られる心筋障害に先行するびまん性小円形細胞浸潤像は見られなかった。

【結論】剖検例の検討では心基部と心尖部の微小血管密度は有意な差を認めず、障害心筋細胞の部位差ならびに壁運動の部位差を説明しない。

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

国立国際医療センター腎臓・循環器科¹⁾／三重大学大学院修復再生病理学²⁾／

大阪医科大学第三内科³⁾／北海道大学大学院循環病態内科学⁴⁾／横須賀共済病院心臓センター⁵⁾

廣江 道昭¹⁾／今中—吉田 恭子²⁾／吉田 利通²⁾／寺崎 文生³⁾／

北浦 泰³⁾／岡本 洋⁴⁾／筒井 裕之⁴⁾／佐藤 明⁵⁾

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(Matrix Metalloproteinase, 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。特に血中テネイシンC値が急性心筋梗塞症の心イベント予測可能な炎症マーカーとして有用であることが証明できた。そこで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テネイシンCの性質を利用して、心筋症の病態・予後評価について検討した。

1)拡張型心筋症の病態分類や重症度判定、心臓リモデリングのための指標、2)サルコイドーシスにおける心臓病変の診断および治療効果判定、の可能性が示唆された。

これらの結果より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などに新しい炎症マーカーとしてテネイシンCが役立つと考えられる。

A. 研究目的

心不全において、酸化ストレスが増加しており、その制御によって心筋梗塞後リモデリングが改善することが知られている。本研究の目的は、心不全およびリモデリングの伸展に、酸化ストレスが具体的にどこに作用しているのか、どのような時間経過で関与しているのかを明らかにすることである。

B. 研究方法

マウスに麻酔下に開胸、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成後、28日まで、経時的に心エコー、心筋組織および血清における脂質過酸化・抗酸化能の評価、ならびに心臓におけるラジカル産生を*in vivo*電子スピン共鳴法(ESR)で評価した。

C. 研究結果

心筋梗塞作成後、1日目より徐々に心エコーにて左室内径の拡大、駆出率の低下を認め、心筋リモデリングの形成を認めた。リモデリングに伴い、組織における脂質過酸化の指標であるTBARSが増加し、HEL陽性細胞も増加した。また、*in vivo* ESRによって測定したフリーラジカル産生もリモデリングの進展に伴って次第に増加を示した。一方で、血中TBARSおよび抗酸化酵素(SOD, Catlase, GPx)は、手術後1日目は増加したが、その後はsham群と変わりなく、リモデリングとは無関係であった。

D. 考察

不全心では活性酸素の産生が亢進している。また活性酸素を種々の遺伝子改変モデルによって抑制することで、リモデリングの抑制につながることも明らかであるが、その詳細なメカニズムと臨床への適応は未だ不透明である。今回我々は、リモデリング経過中における活性酸素産生を*in vivo* ESRで評価し、血中マーカーおよび心筋での脂質過酸化および抗酸化酵素プロファイルの相違をまとめた。心筋リモデリングの進行に伴って心筋でのラジカル産生は増加しているにもかかわらず、それらは末梢血には反映されず、今後は心臓組織でのラジカル産生の検出の必要性和心筋をターゲットとした抗酸化ストレス療法が必要であることが示唆される。

E. 結論

心筋梗塞後不全心筋において、活性酸素はリモデリングの進行に伴って増加する。しかし、全身性の脂質過酸化、抗酸化酵素活性には反映されない。左室リモデリングに対しては、臓器特異的な抗酸化療法が必要である。

樹状細胞は心不全の病態に関与しているか？

久留米大学循環器病研究所、久留米大学医学部心臓・血管内科

安川 秀雄／杉 雄介／今泉 勉

樹状細胞(dendritic cells: DC)はT細胞を活性化する唯一のプロフェッショナル抗原提示細胞であり、生体の免疫応答の司令塔としてきわめて重要な役割を担っている。免疫反応を介した炎症が心不全の病態において重要な役割を果たしていると考えられているが、心不全の病態における免疫反応の起源や誘因についてはよく知られていない。われわれは心不全急性増悪症例の臨床経過と末梢血中のDCの数や活性化との関連について検証した。NYHAクラスⅢもしくはNYHAクラスⅣの心不全急性増悪症例とコントロール症例の末梢血を採取し、マルチカラーフローサイトメトリーによって末梢血中のmyeloid DC(mDC)とplasmacytoid DC(pDC)を同定し、これらの数を測定した。また、DCの活性化マーカーであるCD40、CD83、CD86、CCR7も同時に測定した。入院時の心不全症例における末梢血中のmDCとpDCの数はコントロールに比べ優位に減少していた。一方、活性化マーカーの陽性率は心不全症例で優位に増加していた。治療後に末梢血中のmDCとpDCの数を測定したところ、これらの数は優位に増加していた。次に心不全症例の治療前後における末梢血DC数の増加と心機能のパラメーターとの相関について調べた。その結果、末梢血DC数の増加はBNPの減少率、および左心室の駆出率の増加と優位に相関することがわかった。これらの結果は、末梢血DCの数の変化や活性化が心不全の病態に関与していることを示唆している。

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

北里大学医学部循環器内科学

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

●背景と目的

交感神経β受容体刺激は、これまで主に心動態の観点から心不全の病態形成での研究が展開されてきた。一方、最近では心不全を炎症という視点から解析しようとの試みが行われてきたが、心筋そのものの炎症に及ぼすβ受容体刺激の役割は必ずしも明らかにされていない。

我々はこれまで、β1受容体刺激・遮断は実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の重症度に影響を与えない一方で、β2受容体に関しては刺激薬でEAMを軽快させ、遮断薬で増悪させることを報告した。

そこで、β2受容体に特異的に存在するGi蛋白に着目し、Gi蛋白選択的阻害薬(百日咳菌毒素; PTX)によるEAMへの病態修飾効果と機序解明を試みた。

●方法

既報のごとく5週齢雌Lewisラットを用い、心筋ミオシン免疫(active EAM: aEAM)もしくは心筋炎惹起性T細胞株CM2-Tの移入(transfer EAM: tEAM)により心筋炎を作成した。1) aEAMでの導入期(day 0)もしくは効果期(day 14)におけるPTX in vivo投与による治療効果、2) tEAMでの細胞移入期のPTX in vivo投与による治療効果、3) PTX暴露下CM2-Tの細胞移入によるEAM発症の修飾効果、を検討した。さらに各現象の機序解明を目的に、心筋ホモジネートおよびPTX暴露下CM2-Tからの抽出RNAに基づくサイトカイン(IFN-γ, TNF-α, IL-10)・ケモカイン(MCP-1, MIP-1α)の発現を検討した。

●結果

1) aEAM導入期におけるPTX in vivo投与では、PTXは濃度依存的にEAMを増悪させた。

2) aEAM効果期およびtEAMでのPTX in vivo投与では、PTXは濃度依存的にEAMを軽減させた。心筋内での各種サイトカイン・ケモカイン発現は、EAM重症度と相関傾向にあった。

3) CM2-T細胞移入前PTX暴露は2)と同様に濃度依存的にtEAMを軽減させたが、心筋内での各種サイトカイン・ケモカイン発現はむしろ増加した。一方、PTX暴露下CM2-Tから抽出した各種サイトカイン・ケモカイン発現も、類似の傾向を示した。

●結語

1) Gi蛋白阻害は、その投与時期によってEAM発症を両方向性に修飾する。

2) 効果期におけるGi蛋白抑制によるEAM抑制効果は、心筋炎惹起性T細胞の免疫修飾を介して行われるが、その他の炎症細胞の関与の可能性も否定できない。

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

大阪医科大学第三内科¹⁾／京都大学医学部保健学科²⁾
寺崎 文生¹⁾／塚田 敏¹⁾／下村 裕章¹⁾／大塚 薫¹⁾／
片嶋 隆¹⁾／北浦 泰¹⁾／池本 正生²⁾／藤田 正俊²⁾

【研究の背景と目的】Myeloid-related protein(MRP)complex(MRP8/14)は、MRP8とMRP14の2つのサブユニットから成るS100ファミリー蛋白である。ヒトにおいてMRP8とMRP14は活性化したマクロファージや好中球に発現し、ヘテロダイマーであるMRP8/14を形成する。MRP8/14は炎症に関与すると予測されるが、炎症性疾患におけるMRP8/14の動態は明らかでない。サルコイドーシス(サ症)はモノサイト/マクロファージ系を主体とする肉芽腫性疾患である。サ症において心臓サルコイドーシス(心サ症)は死因として重要であるが、特発性拡張型心筋症(DCM)との鑑別が困難で、活動性や治療効果の判定も確立されていない。我々は、MRP8/14がモノサイト/マクロファージ系を主体とする炎症の形成に関与し、かかる疾患の診断マーカーになると考え、心サ症患者におけるMRP8/14の病変部における発現および血中濃度を検討した。

【方法】サ症患者31例、DCM患者23例、および健常人30例について、血清MRP8/14濃度をELISA法を用いて測定した。また、拡張型心筋症様の病態を呈した活動性心サ症患者12例(左室縮小形成術切除心筋7例、僧帽弁形成術時術中生検2例、剖検心筋2例、生検心筋1例)およびDCM患者10例(左室縮小形成術切除心筋)について、心筋の免疫組織化学染色を行いMRP8/14の発現および局在を検討した。

【結果】血清MRP8/14濃度は、健常人群に比較してサ症群で高値であった(525 ± 581 (SD) ng/ml vs. 230 ± 115 ng/ml, $p=0.006$)。また、サ症群中明らかな心病変を有する心サ症群(9例)で血清MRP8/14濃度が高かった(1025 ± 872 ng/ml vs. 320 ± 203 ng/ml, $p=0.001$)。血清MRP8/14濃度は、心サ症群でDCM群に比較して高値で(vs. 252 ± 108 ng/ml, $p<0.001$)、心筋における肉芽腫のマクロファージおよび巨細胞に特徴的にMRP8/14の発現が認められた。

【結論】心サ症患者心筋における肉芽腫形成に、MRP8/14が重要な役割を果たしていることが示唆された。血清MRP8/14の測定はサ症の診断や活動性の評価に有用と考えられ、血清MRP8/14が高い症例では心サ症の存在が疑われる。

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

岐阜大学大学院医学研究科循環病態学(第二内科)¹⁾／京都女子大学家政学部食物学科²⁾
竹村 元三¹⁾／李 一文¹⁾／岡田 英志¹⁾／宮田 周作¹⁾／江崎 正泰¹⁾／丸山 留美¹⁾／
李 龍虎¹⁾／金森 寛充¹⁾／荻野 敦史¹⁾／湊口 信也¹⁾／藤原 久義¹⁾／藤原 兎子²⁾

【背景】心筋梗塞急性期のエリスロポエチン投与は梗塞後心不全を軽減することが知られているが、最近、心筋梗塞慢性期に投与を開始した場合でもそれ以後の心機能が改善することが報告された。本研究ではエリスロポエチンの慢性期投与における有効性の分子機構について検討した。

【方法と結果】10週齢C57BL/6雄マウスにて左冠動脈結紮により大型心筋梗塞を作製し、6週間後からエリスロポエチン1,500 U/kg、1週間に2回皮下注射を開始し、4週間後に評価した。エリスロポエチン投与群ではコントロール(生食)群に比し心拡大の軽減と心機能の改善がみられ、かつ非梗塞部心筋組織における炎症細胞浸潤と線維化の減少、血管密度の増加がみとめられた。心筋組織内インターロイキン-1 β 、同-6、tumor necrosis factor- α 、transforming growth factor- β 1は梗塞心において上昇していたが、これらはエリスロポエチン投与によりほぼ正常レベルまで低下した。同様に残存心筋細胞の酸化傷害もエリスロポエチン投与により軽減がみられた。エリスロポエチン受容体は梗塞心において過剰発現していたがエリスロポエチン投与群ではさらにその発現は増大しており、かつその下流シグナルであるStat3、Stat5ならびにAktの活性上昇がみられた。培養線維芽細胞と心筋細胞を用いたin vitroにおける検討で、エリスロポエチンの抗炎症作用と抗酸化作用にはそれぞれStatならびにAkt活性が関与することが示唆された。

【結論】大型心筋梗塞に伴う心不全に対するエリスロポエチンの慢性期投与の有効性には、Stat活性を介する炎症ならびにサイトカイン産生の軽減とAkt活性を介する酸化ストレスの軽減が関与することが示唆された。



**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
＜友誼班＞**

2006年度第2回総会・研究報告会

2007年2月23日(金)
国立循環器病センター図書館講堂

■プログラム■

9:00-9:10	総括	2
	(主任研究者： 友池 仁暢)	
9:10-9:40	セッション1：神経・体液性因子	3
	(座長：藤原 久義)	
9:10	永井 良三(東京大学大学院循環器内科)	3
	心筋炎における酸化ストレスの関与： 一酸化ストレス応答を媒介する液性因子ORAIP/ORAIP-receptorの発現	
9:20	藤原 久義(岐阜大学大学院再生医科学循環・呼吸病態学)	4
	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	
9:30	和泉 徹(北里大学循環器内科学)	5
	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に関する研究	
9:40-10:10	セッション2：細胞内シグナル	6
	(座長：堀 正二)	
9:40	堀 正二(大阪大学大学院循環器内科学)	6
	心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明	
9:50	横山 光宏(神戸大学大学院循環呼吸器病態学)	7
	放射光X線回折法による心不全病態評価の試み： 拡張型心筋症モデルでの検討	
10:00	久保田 功(山形大学第一内科)	8
	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	
10:10-10:50	セッション3：治療－基礎－	9
	(座長：砂川 賢二)	
10:10	砂川 賢二(九州大学大学院循環器内科)	9
	迷走神経刺激によるリモデリング改善効果のメカニズムの解明： 単回の迷走神経刺激により心筋活性酸素が減少する	
10:20	福田 恵一(慶應義塾大学再生医学)	10
	心筋細胞におけるGRおよびMRの役割	
10:30	岡野 光夫(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)	12
	細胞シート間の電氣的相互作用の解析	
10:40	松崎 益徳(山口大学大学院循環病態内科学)	13
	拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討	
10:50-11:20	セッション4：いろいろな心筋症	14
	(座長：北浦 泰)	
10:50	小川 聡(慶應義塾大学循環器内科)	14
	心筋症の自己免疫機序： ムスカリンM2受容体を介する自己免疫性心筋症モデル	
11:00	河合 祥雄(順天堂大学循環器内科)	15
	たこつぼ心筋症の病理学的研究	
11:10	北浦 泰(大阪医科大学第三内科)	16
	心臓サルコイドーシスにおける ¹⁸ F-FDG PETの有用性と問題点	

11:20-12:00	セッション5：治療－早期治療と非薬物治療－	17
	(座長：今泉 勉)	
11:20	今泉 勉(久留米大学第三内科)	17
	肥大心におけるLysyl oxidase familyの役割に関する検討	
11:30	島田 俊夫(島根大学循環器内科)	18
	住民健康診断における新しいバイオマーカーによる心機能障害の早期発見に 関する臨床研究<奥出雲臨床研究第3報>	
11:40	中谷 武嗣(国立循環器病センター臓器移植部)	21
	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	
11:50	室原 豊明(名古屋大学大学院分子総合医学)	21
	特発性拡張型心筋症における収縮予備能破綻と治療戦略	
13:00-13:40	セッション6：遺伝子	23
	(座長：今中 恭子)	
13:00	今中 恭子(三重大学大学院病理学第一)	23
	心筋線維化と心室リモデリングにおけるテネイシンCの役割： 遺伝子改変動物を用いた解析	
13:10	廣江 道昭(国立国際医療センター腎臓・循環器科)	24
	血清テネイシンCの臨床的意義について： 拡張型心筋症患者における心不全増悪による入院との関連	
13:20	武田 信彬(東京慈恵会医科大学青戸病院総合診療部)	25
	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	
13:30	木村 彰方(東京医科歯科大学難治疾患研究所)	27
	拡張型心筋症の遺伝子解析	
13:40-14:20	セッション7：心筋症の病態・予後	29
	(座長：筒井 裕之)	
13:40	筒井 裕之(北海道大学大学院循環病態内科学)	29
	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	
13:50	松森 昭(京都大学大学院循環器内科学)	30
	わが国の特発性心筋症の予後と予後要因：全国疫学調査5年後の予後調査より	
14:00	豊岡 照彦(東北大学先進医工学研究機構)	30
	ヒト拡張型心筋症のジストロフィン関連タンパク(DAP)の発現解析(I)	
14:10	齊藤 能彦(奈良県立医科大学第一内科)	31
	心不全における2次性アルドステロン症発症の新しい機序	
14:20-15:00	セッション8：治療－臨床遺伝子導入など－	32
	(座長：川名 正敏)	
14:20	小室 一成(千葉大学大学院循環病態医科学)	32
	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	
14:30	川名 正敏(東京女子医科大学付属青山病院)	33
	肥大型心筋症の突然死における心房細動の臨床的意義	
14:40	磯部 光章(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学)	34
	心拒絶反応におけるPPAR γ の役割と治療への応用	
14:50	鄭 忠和(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学)	35
	慢性心不全に対する温熱療法の酸化ストレスに及ぼす効果	

特発性心筋症に関する調査研究

友池 仁暢(国立循環器病センター)

A. 研究目的

1974年、旧厚生省特定疾患調査研究班を中心として特発性心筋症の疫学・病因・病態・診断・治療について基礎的、臨床的検討が始った。研究は今日に至るまで継続しており、この領域での進歩・発展に大きな貢献を果して来た。特発性心筋症の診断基準については、1980年のWHO/ISFC合同心筋症定義分類委員会の勧告を受け、1986年旧厚生省特定疾患調査研究班において「特発性心筋症診断の手引き」として作成された。心筋症とその病態に関する研究は世界的に長足の進展歩を遂げ、診断や治療法は日進月歩の革新が続いている。その背景の下、1995年WHO/ISFC合同委員会で再改訂が行われた。ヒトゲノムの解読、ナノテクノロジーの幕開け、コンピューターサイエンスの進歩による画像診断の精度向上と情報量の多面化は、本研究班の①診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの改訂、②遺伝子解析や免疫学的解析に基づいた病因の解析による予防法の革新、③心筋再生医療を実施・臨床へ展開するといった研究事項に抜本的見直しを迫りつつある。また、1998年から本研究班と疫学研究班とが共同で行なっている特発性心筋症の全国疫学調査はEBMの充実とコホート研究としてのデータの質の向上も期待される。心臓移植待機患者の正確な把握は重症例に対する医療をシステム化する上での不可欠な作業となってきた。以上が本研究の概要である。目標を効率よく具体化するため、冒頭掲出の組織構成に加え、研究協力者を重点的に組織する分担・共同研究を計画した。

B. 研究方法

1) 具体的方針として、従来からの病因・病態・診断・治療における我が国最先端の研究を継続するとともに、以下の4項目を研究の中心課題に据える。①特発性心筋症の診療マニュアルの作成：ことに、診断基準の見直し／②横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)／③心筋再生医療の基礎的・臨床的検討／④免疫学的解析、遺伝子他型解析による病因的解析を進め病態、重症度、治療効果の指標を探索。

2) 前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)、②診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの作成拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ARVC、二次性心筋症(含たこつぼ型)、ミトコンドリア病、Fabry病、家族性突然死症候群、虚血性心筋症、新たな遺伝・遺伝子に関する研究心筋炎後を含めた免疫学的解析、③新たな治療法開発再生医療、遺伝子治療、外科的治療再生医療、遺伝子治療、外科的治療上記目的を達成するため、本年度は下記の臨床研究を立案実施した。

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。同時にその他の心筋症(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)についても同様に検討する。

①各病態の転帰を追跡する。これらのデータを連結可能匿名化して臨床診断・治療の際の対比情報として活用できるようにする。

②転帰(生存曲線、心事故発生、心不全再燃・重症化、QOLを含む概念として)を規定する臨床指標、検査指標の探索と精度評価と前向き検討。

③最終年度には発症登録と転帰調査を全国規模で展開すべき要件を明らかにし、ネットワークを提案・構築をする。

(研究デザイン)

本研究は、特発性拡張型心筋症、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、サルコイドーシスと新規に診断された症例およびその他の心筋症症例において、診療において測定されている詳細な臨床指標、検査指標のうちいかなる因子または因子の組み合わせが、これらの心筋症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ものである。エントリー時の臨床指標、検査指標を投薬内容と合わせてデータベースに登録し、心事故の有無を5年間フォローアップし、心事故の発生と登録された因子の関連について従来の統計法とともにデーターマニング手法を用いて解析する。

C. 研究結果

1) 具体的方針として、従来からの病因・病態・診断・治療における我が国最先端の研究を継続するとともに、以下の4項目を研究の中心課題に据える。①特発性心筋症の／②横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)／③心筋再生医療の基礎的・臨床的検討4)免疫学的解析、遺伝子他型解析による病因的解析を進め病態、重症度、治療効果の指標を探索。

2) 前期の具体的方針に基づき班構成を組み立てる。

①横断的基盤研究(国内各班との連携、臨床調査研究)

②診断基準の見直しを含めた診療マニュアルの作成拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症、ARVC、二次性心筋症(含たこつぼ型)、ミトコンドリア病、Fabry病、家族性突然死症候群、虚血性心筋症、新たな遺伝・遺伝子に関する研究心筋炎後を含めた免疫学的解析

③新たな治療法開発再生医療、遺伝子治療、外科的治療再生医療、遺伝子治療、外科的治療上記目的を達成するため、本年度は下記の臨床研究を立案実施した。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。同時にその他の心筋症(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)についても同様に検討する。

さらに多施設共同の観察研究として「心筋症の予後を予知する因子の同定に関する研究」(CCMM研究)の研究計画を策定した。

①各病態の転帰を追跡する。これらのデータを連結可能匿名化して臨床診断・治療の際の対比情報として活用できるようにする。

②転帰(生存曲線、心事故発生、心不全再燃・重症化、QOLを含む概念として)を規定する臨床指標、検査指標の探索と精度評価と前向き検討。

③最終年度には発症登録と転帰調査を全国規模

で展開すべき要件を明らかにし、ネットワークを提案・構築をする。

上記の研究遂行に必要な手順を班会議で話し合い、登録の必要項目等について詳細を決定した。

D. 考察

各心筋症の病態を基礎医学的及び臨床医学的に検討するとともに「心筋症の予後を予知する因子の同定に関する研究」(CCMM研究)の研究計画を策定し、国立循環器病センターをはじめとした各参加施設で倫理委員会に提出した。国立循環器病センターでは、倫理委員会の承認を得て実際に登録を開始した。

E. 結論

特発性心筋症の病態・疫学について本研究班において多方面から検討を行った。

心筋炎・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

永井 良三(東京大学)

A. 研究目的

拡張型心筋症は難治性で心臓移植の最大の適応疾患であり、その発症を予防したり内科的に治療することは社会的に大きな課題となっている。PD-1/PD-1 ligandsを介する経路はT細胞の活性化に抑制的に作用することが知られている。我々はこれまでに、マウスのウイルス性心筋炎において抗PD-1抗体のin vivo投与によりPD-1/PD-1 ligands pathwayを(阻害または刺激)すると心筋障害が(増強または抑制)されることを報告した。さらに、同様のnegative costimulatory signalであるCTLA-4/B7 pathwayとPD-1/PD-1 ligands pathwayを同時に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、を報告した。今回、①その機序として、慢性心筋炎のマウスの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か否かを検討する。また、②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、③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。さらに、④それらの自己抗体をin vitroで筋肉細胞に作用させることにより細胞機能に対する障害が誘導されるか否かについても解析した。

B. 研究方法

1) マウスの慢性心筋炎における検討

C3H/Heマウスに抗PD-1/CTLA-4抗体をin vivo投与するとともにCoxsackievirus B3(CVB3)を接種し8週後に屠殺、HE染色にて心筋障害を評価するとともに、血清を用いて正常のマウスの心筋組織を蛍光抗体染色で解析した。

2) 拡張型心筋症患者血清を用いた検討

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(#1. neonatal lupus erythematosus,

#2. peripartum cardiomyopathy, #3. polymyositis, primary biliary cirrhosis, #4. peripartum cardiomyopathy)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1次元および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拡張型心筋症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。

3) ウズラの筋肉細胞に対する抗Annexin A6抗体／拡張型心筋症患者血清の作用の解析

ウズラの筋肉細胞(ATCC, CRL-1962)にAdrenaline(5 μ M)を負荷することにより細胞内Ca濃度の変化をFlexStation system(Molecular Devices社)で解析した。この時、細胞を予め抗Annexin A6抗体または拡張型心筋症患者血清(コントロールとしてgoat IgGまたはhuman IgG)と1時間preincubationすることによる細胞内Ca濃度の変化に対する効果を解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物は麻酔下に屠殺しており、動物愛護上特に倫理面の問題はないと判断した。患者血清を用いた研究は東京大学医学部の倫理委員会の承認のもと、文書によるインフォームドコンセントを取得して行った。

C. 研究結果

1) CVB3によるマウスの急性心筋炎に抗PD-1/CTLA-4抗体をin vivo投与することにより炎症は遷延し、Rat IgGを投与したコントロール群では炎症がほぼ癒着化する8週後においても有意の炎症が持

続していた(慢性心筋炎化した)。また、正常のマウス心筋組織はコントロール群のマウス血清を用いた免疫組織染色によってほとんど反応を認めなかったのに対し、抗PD-1/CTLA-4抗体投与群のマウス血清により心筋細胞膜上に明らかな反応を認めた。

2)ラット培養心筋細胞より抽出した細胞膜・核・細胞質画分を1次元電気泳動し拡張型心筋症患者の血清を用いてWestern blotを行ったところ、拡張型心筋症患者の血清中に心筋細胞膜由来の抗原と反応する自己抗体が存在することが示された。また、ラット培養心筋細胞膜画分の2次元電気泳動と拡張型心筋症患者血清を用いたWestern blotの結果より、コントロールの健常者血清とは反応を認めず4例の拡張型心筋症患者に共通して反応するスポットが認められた。このスポットを質量分析計にて解析したところAnnexin A6であることが判明した。さらに、健常コントロールや拡張型心筋症患者心筋組織を用いた免疫組織染色により、心筋細胞膜上にAnnexin A6が構成的に発現していることが確認された。

3)Adrenaline(5 μ M)をウズラの筋肉細胞に負荷すると、細胞内Ca濃度は10秒以内をピークとして著明に上昇した。この時、細胞を予め抗Annexin A6抗体とpreincubation(1時間)した群ではRabbit IgGとpreincubationしたコントロール群に比べて、細胞内Ca濃度のピーク値が5~10%有意に抑制された。同様に、拡張型心筋症患者血清とpreincubationした群ではhuman IgGとpreincubationしたコントロール群と比べ細胞内Ca濃度のピーク値が低下する傾向が見られた。

D . 考察

今回、急性ウイルス性心筋炎のモデルマウスにおいてnegative costimulatory signalを阻害することにより慢性心筋炎を惹起できること、その時、何らかの心筋細胞膜抗原に対する自己抗体が誘導されることが明らかになったことから、遷延する心筋障害に自己抗体を介する機序が関与する可能性が示唆された。また、自己免疫的な心筋障害機序が示唆される4例の拡張型心筋症患者血清中

に、心筋細胞膜上に発現するAnnexin A6に対する自己抗体が共通して認められることをはじめ明らかにした。Annexin familyはメンバー毎に異なるN末領域と保存された繰り返し配列から成るC末領域を有するCa結合蛋白で、CaイオンがC末領域に結合すると立体構造が変化することにより重合して細胞膜へと挿入され、そこで細胞内へのCaイオンの流入を調節すると考えられている。今回、ウズラの筋肉細胞を用いた実験でAdrenaline負荷による細胞内Ca濃度の上昇に対して抗Annexin A6抗体が抑制的に作用していたことから、拡張型心筋症患者血清中に存在する抗Annexin A6抗体が心筋細胞へのCaイオンの流入を抑制することにより心機能を障害している可能性が示唆された。このことは、Adrenaline負荷によるウズラの筋肉細胞内Ca濃度の上昇に対して拡張型心筋症患者血清も同様に抑制的に作用していたことによっても支持された。Annexin A6の心筋transgenicマウスの心筋細胞は脱分極による細胞内Ca濃度の上昇が抑制され収縮・弛緩が障害されており、やがて拡張型心筋症様の病態を呈することが報告されており、本研究の仮説を強く裏付けるものと考えられた。以上より、血清中にAnnexin A6に対する自己抗体の存在が確認されるような少なくとも一部の拡張型心筋症においては、その作用を阻害するような治療法が有効である可能性が示された。

E . 結論

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。

<研究協力者>

世古義規(東京大学大学院医学系研究科循環器内科)
藤村 務, 高 ひかり, 峯木礼子, 村山季美枝

(順天堂大学生体分子)

八木田秀雄, 奥村 康

(順天堂大学医学部免疫)

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

藤原 久義(岐阜大学)

A. 研究目的

心筋梗塞急性期のエリスロポエチン投与は梗塞後心不全を軽減することが知られているが、最近、心筋梗塞慢性期に投与を開始した場合でもそれ以後の心機能が改善することが報告された。本研究ではエリスロポエチンの慢性期投与における有効性の分子機構について検討した。

B. 研究方法

10週齢C57BL/6雄マウスにて左冠動脈結紮によ

り大型心筋梗塞を作製し、6週間後からエリスロポエチン 1,500 U/kg、1週間に2回皮下注射を開始し、4週間後に評価した。屠殺直前に心エコー並びに心臓カテーテル検査にて心機能を評価した。心臓にて病理組織学的検討、ELISA、Western blottingに用いられた。

(倫理面への配慮)

手術は吸入麻酔下に行い、屠殺は大量の麻酔薬注射にて行い、動物への苦痛は極力軽減した。

C. 研究結果

エリスロポエチン投与群ではコントロール(生食)群に比し心拡大の軽減と心機能の改善がみられ、かつ非梗塞部心筋組織における炎症細胞浸潤と線維化の減少、血管密度の増加がみとめられた。心筋組織内インターロイキン-1 β 、同-6、tumor necrosis factor- α 、transforming growth factor- β 1は梗塞心において上昇していたが、これらはエリスロポエチン投与によりほぼ正常レベルまで低下した。同様に残存心筋細胞の酸化傷害もエリスロポエチン投与により軽減がみられた。エリスロポエチン受容体は梗塞心において過剰発現していたがエリスロポエチン投与群ではさらにその発現は増大しており、かつその下流シグナルであるStat3、Stat5ならびにAktの活性上昇がみられた。培養線維芽細胞と心筋細胞を用いた *in vitro* における検討で、エリスロポエチンの抗炎症作用と抗酸化作用にはそれぞれStatならびにAkt活性が関与するこ

とが示唆された。

D. 考察

EPOは心筋梗塞発症から6週間後という慢性期から投与開始してもその後の心機能を改善することが確認され、梗塞後心不全の慢性期における予防あるいは治療法となることが示唆された。

EPOの梗塞後心不全に対する有効性の作用機序として以前従来血管新生作用とミオシン重鎖のフェノタイプ移行が見出されたが、今回我々はEPOの梗塞後不全心に対する抗炎症作用と抗酸化作用を見出した。

E. 結論

大型心筋梗塞に伴う心不全に対するエリスロポエチンの慢性期投与の有効性には、Stat活性を介する炎症ならびにサイトカイン産生の軽減とAkt活性を介する酸化ストレスの軽減が関与することが示唆された。

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に関する研究 和泉 徹(北里大学)

A. 研究目的

造血系サイトカインであるエリスロポエチン(EPO)は近年様々な多面的作用が報告され、心筋においても虚血性傷害からの保護効果が注目されている。

これまで我々はラット自己免疫性心筋炎(EAM)モデルにおいて、EPOを全経過中投与すると、心筋炎の発症が有意に抑制される結果を報告してきた。しかしEAMモデルに対する作用時期や機序は明らかにされておらず、我々はその解明にあたった。

B. 研究方法

1) *in vivo* 実験

1-1. EAMモデルの作成

ブタ心筋ミオシン 250 μ g/完全Freundアジュバント 625 μ g H73RA混和液0.25mlをルイスラット(5週令、雌)の両側足底に皮下投与し、ミオシン免疫EAM(Active EAM: aEAM)を作成した。また、CM2(心筋ミオシンaa.1539-1555)を用いて作成した既樹立の心筋炎惹起性特異的T細胞株(CM2-T)1 $\times$ 10⁷の静脈内投与にてtransfer EAM: tEAMを作成した。本モデルはaEAMの効果期のみを反映するモデルである。

1-2. EPO投与

EPO(3,000 U/kg)、または同量のPBSをプロトコルに従って、連日皮下投与を行った。

1-3. 心筋炎の評価

aEAMはday21、tEAMはday9に屠殺し、以下の項目で心筋炎の重症度の評価を行なった。①ラット心体重比②肉眼的な心筋炎スコア③心筋病理組織での顕微鏡的心筋炎スコア

1-4. 心筋におけるサイトカイン、ケモカイン mRNAの定量

心筋ホモジネート組織からの抽出RNAをcDNAに逆転写し、定量的RT-PCR法にてサイトカイン(IFN- γ , TNF- α , IL-10)およびケモカイン(MCP-1, MIP-1 α) mRNAの発現を定量し、GAPDHとの比を測定した。

1-5. 薬剤投与プロトコル

(1) aEAM導入期に限局させた検討: aEAMモデルにおいて、導入期(day0~8)のみEPOを投与(day-10~-1はPBS)する群(n=6)、10日間の前投与+導入期(day-10~8)にEPOを投与する群(n=6)、PBS投与群(day-10~8)(n=6)にて検討を行った。

(2) tEAMを用いた効果期へ限局させた検討: tEAMモデルにおいてday0~8までEPOを投与(day-10~-1はPBS)する群(n=6)、10日間の前投与期間を設け、day-10~8までEPOを投与する群(n=6)、PBS投与群(day-10~8)(n=6)にて検討を行った。

2) *in vitro* 実験

2-1. EPO存在下でのCM2-Tを用いた細胞増殖試験

CM2-T(5 $\times$ 10⁵/ml)、照射下胸腺細胞(1 $\times$ 10⁷/ml)、CM2(100 μ g/ml)をEPO(0.001-100U/mL: log dilution)または同量の生理食塩水を添加し、48時間後に³H-サイミジン取り込みを測定し、細胞増殖能の評価を行った。

2-2. EPO投与下のラットリンパ節細胞を用いた細胞増殖試験

10日間の前投与+導入期(day-10~8)にEPOまたはPBS投与を行ったCM2作成EAMモデルより、day9に腋窩リンパ節を摘出。ホモジナイズ後ISCR3(抗MHC class II抗体)1ml/10⁷ cellsと補体(3週