

齢ウサギ血清)0.1 ml/10⁷ cellsを添加し、MHC class II 陽性細胞を除去。得られたリンパ節細胞(5×10⁵/ml)、照射下胸腺細胞(1×10⁷/ml)、CM2 (5mg/ml)の混合培養を行い、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。

C. 研究結果

1) *in vivo*実験

EPOを導入期のみ投与した群はPBS群に対し、肉眼的心筋炎スコアで軽度の改善をみせたのみであったが(2.9±0.7 vs. 3.9±0.4, *p*<0.05)、10日間の前投与期間を設けた群ではPBS群に対し有意に肉眼的心筋炎スコア(2.2±0.5 vs. 3.9±0.4: *p*<0.01)、顕微鏡的心筋炎スコア(2.2±0.7 vs. 3.4±0.5: *p*<0.01)、心・体重比(4.7±0.7 vs. 6.8±0.6 mg/g: *p*<0.01)が低値でありIFN-γ(3.0±4.2 vs. 6.2±3.0 copy ratio to GAPDH, *p*<0.01)とIL-10: 5.0±2.1 vs. 10.1±3.1 copy ratio to GAPDH, *p*<0.01)の発現を有意に抑制していた。

効果期におけるEPO投与では、PBS群に比べて、心筋炎は軽減されておらず、10日間の前投与群においてもPBS群に比べて、肉眼的、顕微鏡的心筋炎スコア、サイトカイン、ケモカインの発現ともに抑制効果は認められなかった。

2) *in vitro*実験

①各濃度のEPOはCM2-Tの増殖を抑制しなかった。

②EPO投与群におけるリンパ節細胞の増殖はPBS投与群に比べ抑制されなかった。

D. 考察

EPOの心筋保護効果として、心筋細胞のアポトーシスの抑制効果が既に知られている。EPOはラットの心筋梗塞モデルや虚血再灌流モデルにおいてPI-3K/Akt経路の活性化を通じてアポトーシスを抑制し、有意に心機能を保持することが報告された。またEAMにおいても、局所的に心筋虚血が存在し、心筋細胞傷害のメカニズムの一つとしてアポトーシスが関与することが知られている。従って虚血によるアポトーシスの抑制効果がEPOのEAMを抑制する一機序である可能性は高い。ただしこの効果は虚血発症の1時間後にEPOを投与した場合においても有効であったとされている。一

方、本実験においては、効果期のみを反映するtEAMモデルやaEAMにおける効果期のみ投与(データ非掲載)ではEPOの効果は認められなかった。すなわち心筋炎の発症後にEPOの投与を行っても効果は認められない。さらに導入期のみ投与に加え、その前10日間の投与を加えることで、有意な心筋炎抑制効果を呈した結果は、EPOの効果が心筋細胞のアポトーシス抑制効果のみでは説明できないことを示している。

以上の経過から、導入期にEPOの作用点が存在すると仮定し、*in vitro*実験を施行した。まずEPOの存在下でCM2-T細胞の増殖試験を試みたが、抑制効果はみられなかった。EPOの免疫担当細胞への作用報告を紐解くと、末梢血のリンパ球やマクロファージにEPOが直接作用をもつ報告はないが、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞がEPOの受容体を有し、高濃度のEPOが*in vitro*において、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞のコロニー形成と分化を抑制したとする報告が存在する。従ってEPOは長期の骨髄への作用を通じて、免疫担当細胞へ影響を持つ可能性があるため、EPOまたはPBSの長期投与を受けたラットでEAMを作成し、導入期のリンパ節細胞をT細胞原として用いて、再刺激試験を行った。しかしこの実験系においても有意な差は認められなかった。以上の結果から、EPOのEAM導入期への作用を解明するには至らなかった。ただし、*in vivo*実験における導入期+前投与での有効性や、骨髄の顆粒球・単球系前駆細胞へのEPOの抑制的な作用報告は、心筋炎惹起性T細胞の分化・増殖までのいずれかの段階にEPOが作用点を有する可能性を示している。

E. 結論

エリスロポエチンは、炎症性サイトカイン、ケモカインの減少とともにラット自己免疫性心筋炎の抑制効果を有する。その主な作用は 主に導入期における抗原感作の段階にあると推察される。

<研究協力者>

品川 弥人, 猪又 孝元, 中野 浩成, 大坂 勤, 竹内 一郎, 小坂 橋俊美, 西井 基継, 竹端 均
(北里大学医学部循環器内科学)

心不全発症・進展における細胞内情報伝達機構の解明

堀 正二(大阪大学)

A. 研究目的

心臓に圧負荷や容量負荷をはじめとする力学的負荷がかかると心臓は肥大という形態をとることでその増大した負荷に適応する。しかしその負荷が過大あるいは長時間持続するとその適応が破綻し心拡大、収縮力低下をきたし心不全が発症する。心不全の本態はストレスにより心筋細胞死が生じることである。われわれは心筋細胞死制御による心不全治療の開発を目指し、細胞死の分子機

構ならびに細胞死を惹起する細胞内情報伝達機構を検討している。心筋細胞死の形態にはアポトーシス、ネクロトーシスの2種が存在することが知られている。近年、第3の細胞死としてオートファジーによる細胞死が提唱されている。実際、不全心ではオートファジーが亢進していることが報告されている。しかしながらオートファジーが細胞保護に働いているのか細胞死に働いているのか明らかではない。本研究ではオートファジーの心臓にお

ける役割を検討することを目的にした。

B. 研究方法

オートファジー形成に必須分子であるAtg5のfloxマウスにタモキシフェン誘導性心筋特異的Cre recombinase発現トランスジェニックマウスを交配した(f/f:Ic(+))。10週齢f/f:Ic(+)マウスにタモキシフェンを7日間腹腔内注射し表現型を解析した。タンパク質発現はウエスタンブロット法にて、mRNA発現はquantitative RT-PCR法により評価した。心機能は心エコー法により評価した。プロテオソーム活性についてはCHEMICON社製Proteosome Activity Assay Kitを用いて測定した。アポトーシスはin situ TUNEL Assay kit(Takara製)を用いて評価した。

心筋細胞は生後1-2日のラット新生仔より単離した。Atg7に対するshRNAを発現するアデノウイルスを作成しMOI10にて心筋細胞に感染した。

(倫理面での配慮)

本研究は大阪大学遺伝子組み換えDNA実験委員会、大阪大学医学部医学科動物実験委員会の承認の上、行われた。

C. 研究結果

f/f:Ic(+)マウスにタモキシフェンを7日間投与すると心筋細胞内Atg5タンパク質量は約90%減少した。オートファジーの生化学的マーカーであるAtg5依存性microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-IからLC3-IIへの変換は抑制されていた。従ってf/f:Ic(+)においてオートファジーが抑制されていた。f/f:Ic(+)の心機能を心エコー法で評価したところ拡張期および拡張期左室径は増大し、左室短縮率は低下していた。さらに肺・体重量比は増加していた。即ちf/f:Ic(+)は心機能不全、心不全に陥っていた。また心・体重量および心筋細胞断面積は増加しており、心肥大を呈していることが示唆された。

オートファジーと心肥大の関係を明らかにする

ため、Atg7-shRNAを作成し心筋細胞に感染させた。shRNAの感染によりAtg7タンパク質発現は減少した。LC-IIタンパク質レベルも減少しshRNAによりオートファジーを抑制させることが明らかとなった。shRNAにより心筋細胞面積の増大、サルコメア形成の促進、ANFの発現の増加が認められた。従ってオートファジーの抑制は心筋細胞肥大に関わっていることが示唆された。

タンパク質分解系にはオートファジーとユビキチン-プロテオソーム系の2種類が存在する。f/f:Ic(+)心においてはユビキチン化タンパク質が増加していた。さらにプロテオソーム活性も増加していた。またタンパク質合成に重要な役割をしているS6キナーゼ活性も上昇していた。従ってf/f:Ic(+)においてはタンパク質合成系と分解系共に亢進していることが明らかとなった。

電子顕微鏡レベルでf/f:Ic(+)心を観察するとサルコメア構造が破壊されており、ミトコンドリアの整列異常、凝集が認められ、これはオートファジーの細胞内小器官のターンオーバーに重要な役割をしていることが示唆された。

ユビキチン化タンパク質は小胞体ストレスを惹起することが知られている。f/f:Ic(+)心では小胞体ストレスのマーカーであるGRP78とGRP94の発現が増加していた。また小胞体ストレス依存性カスパーゼであるcaspase-12の活性かも生じていた。さらにTUNEL陽性細胞も増加していた。

D. 考察

心臓におけるオートファジーの抑制は心筋機能障害、心不全、心肥大を引き起こすことが示された。これは異常タンパク質の蓄積による直接の機能障害、小胞体ストレスの増加を介したアポトーシスの増加によるものと考えられる。

E. 結論

オートファジーは心機能、心形態を保つ恒常性維持の機構であることが明らかとなった。

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 横山 光宏(神戸大学)

A. 研究目的

心不全では内皮依存性血管弛緩・拡張反応の低下が認められ、そのことは血管内皮障害の存在を意味する。内皮由来血管弛緩因子の本体は一酸化窒素(nitric oxide; NO)であるが、その作用減弱にはスーパーオキシドによるNOの不活性化の亢進と、内皮型NO合成酵素(eNOS; endothelial NOS)の活性化障害に基づくNO産生の減少の両者が関与する。NOは多彩な生物作用を有し、特にeNOS由来NOは心臓に保護的に作用すると想定されている。一方、eNOSは補酵素であるテトラヒドロbiopterin(BH4)が酸化により不足するような病的条件下では、NOよりもむしろスーパーオキシド

を産生することが最近明らかになってきた(eNOS uncoupling)。今回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。

B. 研究方法

左冠動脈前下行枝結紮によるラット心筋梗塞モデルを用いてBH4の慢性投与が左室リモデリングに及ぼす効果について検討した。

(倫理面への配慮)

ラットに対する実験は当大学の「動物実験における倫理の原則」に則って行った。

C. 研究結果

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。MI+BH4群ではMI群に比べ、心筋でのスーパーオキシド産生および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。

D. 考察

心筋梗塞後、おそらくミトコンドリア電子伝達系の機能低下に伴うスーパーオキシド増加によりBH4が酸化され、その結果生じたeNOS uncouplingがさらなる酸化ストレス増加を引き起こし、慢性期の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。eNOS由来のスーパーオキシドは直接心筋、あるいは血管内皮に障害的に働くとともに、NO自身も不活化するという悪循環を生じている可能性がある。現在、我々は実際に心不全患者でBH4の不足やビオプテリンバランスの不安定化がおこっているのか検討中である。

E. 結論

eNOS由来スーパーオキシドが心筋梗塞後の心臓リモデリングに関与していることが本研究より示唆された。eNOS uncouplingをターゲットとしたeNOS/NO系機能の改善が新たな心不全治療戦略となりうるのか、引き続き検討していく。

<研究協力者>

政野智也, 杜 隆嗣

(神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学)

川嶋成乃亮(大阪府済生会中津病院総合診療内科)

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

久保田 功(山形大学)

A. 研究目的

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、atrial natriuretic factor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。

B. 研究方法

1) 圧負荷心肥大の作成

圧負荷に対する心臓リモデリングへのDGK ζ の影響を検討するために、DGK ζ トランスジェニックマウス(DGK ζ -TG)と野生型マウス(WT)に大動脈狭窄を作成した。マウスを人工呼吸管理下に開胸し、大動脈弓部(腕頭動脈と左総頸動脈の間)を糸でバンディングを行い、狭窄を作成した。手術1週間後と4週後に心臓超音波検査を行い、左室壁厚、左室内径、左室壁運動を評価した。4週目の超音波検査後サクリファイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白とRNAを抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の

発現を検討した。

2) 心筋梗塞の作成

次に、DGK ζ -TGマウスとWTマウスを用い、気管切開後に人工呼吸管理下で開胸し、冠動脈左前下行枝を剥離、7-0 prolineで結紮した。左前下行枝灌流域の心筋が変色したことを梗塞作成の指標とした。手術1週間後と4週後に心臓超音波検査を行い、超音波検査後サクリファイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白とRNAを抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の発現を検討した。

すべての研究プロトコールは山形大学遺伝子組み換え実験安全委員会および山形大学動物実験委員会にて承認され、研究は山形大学遺伝子組み換え実験安全管理規則および山形大学医学部動物実験指針に従い行われた。

C. 研究結果

大動脈狭窄作成術後4週には、WTマウスでは圧負荷により心重量、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。

DGK ζ -TGマウスではWTマウスと比較し梗塞1週間後と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。

D. 考察

DGK ζ は細胞内脂質代謝を制御することで、圧負荷による心肥大や心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制した。また、DGK ζ は非梗塞部の線維化を抑制し、心機能を改善し、心筋梗塞後の生存率を改善した。DAG-DGK系は、各種のGq蛋白共役型受容体に共通するシグナル分子なので、DGKにより

脂質代謝を制御することは、個々の受容体レベルでブロックするよりも、より効果的に心臓リモデリングを抑制できる可能性がある。

E. 結論

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。DGK ζ は心肥大・心不全治療の標的分子となる可能性が示唆された。

<研究協力者>

竹石恭知

(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)

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

砂川 賢二(九州大学)

A. 研究目的

心不全は、種々の心疾患の終末像であり、 β 遮断薬およびレニン・アンジオテンシン系阻害薬が広く使用されているにもかかわらず、その予後は不良である。近年の虚血性心疾患の急性期治療の進歩に伴い、慢性心不全の新たな治療戦略の開発が求められている。近年、迷走神経刺激によって心筋梗塞後ラットにおいてリモデリングが抑制され、その生命予後が改善したことが報告されている(Li, et al, 2004)。しかし、そのメカニズムは明らかにされておらず、今後臨床応用されていく上でその作用点、作用機序を明らかにすることが必要である。本研究では、心筋梗塞後心不全モデルマウスを用いて迷走神経刺激が及ぼす短期的な効果について検討し、迷走神経刺激による抗リモデリング効果のメカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 麻酔、人工呼吸下を開胸し、マウス(CD-1)の左冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作成した。

2) 28日経過した心筋梗塞後心不全マウスに、麻酔下に右迷走神経に電極を装着し、約10%の心拍数減少を目安に迷走神経刺激を15分間行った。その後、活性酸素産生をin vivo ESRによって測定した。迷走神経に電極を巻き付け、刺激をしない群を対照群とした。

3) 心筋細胞におけるノルエピネフリン(NE)による活性酸素産生ならびに、in vivoにおける迷走神経刺激前後でのNEの産生量をmicrodialysisによって測定した。

4) NEによる心筋細胞内外における活性酸素産生をDCFアッセイにより測定し、アセチルコリン(Ach)による影響を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学総長および医学部動物実験委員会の承認を経て、関連法案ならびに「九州大学医学部における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 心筋梗塞後28日目のマウスは、心臓においてフリーラジカルが増加している。1回の迷走神経刺激を行い、その直後にin vivo ESRによってフリーラジカルを測定した。スピンプローブであるmethoxy-PROXYLの減衰速度は、梗塞後心不全マウスにおいて増大しており、迷走神経刺激群では、シャム刺激に比して、シグナル減衰速度が増大せず、正常マウスと同等であった。この結果から、迷走神経刺激は即時的に組織におけるフリーラジカルを消去する作用を有することが示唆された。さらに、この迷走神経刺激に先立ち、Achを前投与したマウスでは、迷走神経刺激によるフリーラジカル抑制効果は消去された。このことから、迷走神経刺激により即時的に活性酸素産生が抑制され、Achムスカリニック受容体を介していることが明らかとなった。

2) 次に、この迷走神経刺激が、心筋組織内のNEに対してどのような影響を与えるか、microdialysis法を用いて、直接的な組織内NE濃度を測定した。迷走神経刺激前に比して、刺激後は、心筋内NE濃度が有意に低下した($0.62 \pm 0.13 \mu\text{M}$ vs $0.37 \pm 0.09 \mu\text{M}$, $P < 0.05$)。

3) NEによって心筋細胞で活性酸素が産生されるかどうか検証するために、仔ラット心筋細胞を培養し、NEを投与したところ、濃度依存性にH₂O₂が増加し、これらはアセチルコリン投与(NE+Ach)により有意に減少し、さらに硫酸アトロピンの同時投与(NE+Ach+Atropine)により、抑制効果が消失した(0.85 ± 0.13 NE, 0.64 ± 0.02 NE

+Ach, $0.89 \pm 0.08 \mu\text{M}$ NE + Ach + Atropine)。

D. 考察

不全心ではレニン・アンギオテンシンといった液生因子に加え、交感神経活動が亢進し、リモデリングに関与していることが知られている。さらに、我々は、動物モデルにおいて、活性酸素が心不全において増加しており、リモデリング形成に重要な役割を果たしていること、これらの活性酸素抑制によって、リモデリングを抑制し、その予後を改善することを示してきた。

一方、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が報告されている(Circulation 109:120-4, 2004)。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。しかし、それ作用機序について、詳細な機序については不明である。心不全リモデリングを抑制するための慢性刺激では、血行動態の改善を伴うことから、迷走神経刺激による分子メカニズムを明らかにすることは困

難であった。そこで、本研究では、心筋梗塞後リモデリングに対する迷走神経の急性効果を明らかにすることで、その機序を解明することを主たる目的とした。その結果、迷走神経刺激は、即時的に活性酸素産生を抑制することが明らかとなり、Ach受容体、および交感神経伝達物質であるNEの抑制を介していることが示唆された。

E. 結論

以上の結果より、迷走神経刺激によって、活性酸素産生が抑制されることが明らかとなった。その機序として、①アセチルコリン受容体を介する系、ならびに、②交感神経からのNEの放出を抑制し、NEに依存した活性酸素産生の抑制、が考えられる。節前および節後神経繊維の相互作用により、活性酸素生成に寄与し、心不全のリモデリング進展、心不全の増悪機転に関与していると考えられる。急性期に活性酸素産生を抑制することが、迷走神経刺激によるリモデリング改善効果の機序の一つである可能性が示唆される。

<研究協力者>

井手友美

心筋細胞におけるGRおよびMRの役割

福田 恵一(慶應義塾大学)

A. 研究の目的

近年の大規模臨床試験の結果、ミネラルコルチコイド受容体(以下MR)の拮抗薬であるSpironolactoneやEplerenoneが慢性心不全患者(RALES試験, 1999)や左心機能低下を伴った心筋梗塞(EPHESUS試験, 2003)による死亡率を低下させることが明らかになった。この有用性の原因に関しては、MR拮抗薬の持つ左室リモデリングに対する直接の抑制効果に起因すると考えられているが、その詳細な分子機序は全く理解されていないのが現状である。

心筋におけるMRの作用を理解することの難しさは、グルココルチコイド受容体(以下GR)とMR機能のクロストークにある。心筋にはGR、MR両者が発現する。グルココルチコイドの血中濃度は、アルドステロンの 10^3 倍高いが、腎臓遠位尿管上皮などでは、 11β SD2によってグルココルチコイドを不活性化し、アルドステロンのみがMRに作用することが可能であると説明されている。一方、心筋では、グルココルチコイドを不活性化する 11β SD2の発現がほとんど認められない。これは、心筋細胞がグルココルチコイド(「アルドステロン」)の刺激に恒常的に暴露されていることを意味する。グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドは、各々の受容体であるGR、MRに結合しその作用を発現させるが、互いの受容体にも結合可能である。さらにGR、MRともに同一のDNA標的配列

(GR [MR]-responsive element: 以下GRE)を認識し、その作用にredundancyが存在していると考えられているため、各々の受容体の標的遺伝子やその発現制御機構の詳細は未だ不明である。

そこで、本研究では、GRとMRに特異的なリガンド、拮抗薬を用いて、GR依存性、MR依存性遺伝子を網羅的に解析し、心筋リモデリングにおける抗アルドステロン薬の有効性に関する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

①GRとMRの抗体の確認

②心筋細胞におけるGRとMRのリガンド刺激に伴う細胞局在の変化

③GR特異的な阻害剤RU486、MR特異的な阻害剤SpironolactoneおよびEplerenoneのGRおよびMRに対する特異性の確認

④各種リガンドによるGRE-lucレポーター遺伝子の活性化とRU486 SpironolactoneおよびEplerenoneによる抑制効果

⑤マイクロアレイ解析を用いたGR依存性、MR依存性遺伝子の網羅的解析

C. 研究結果

1)GRとMRの抗体の確認

抗GR抗体(BD Transduction Laboratories社611227、Santa Cruz Biotechnology社H300)はヒトGRを選択的に認識し、ラットやマウスGRに対する反応は非常に弱かった。一方、SC社M20抗体は、

ラットやマウスGRのみを選択的に認識し、ヒトGRには全く反応しないことが確認された。SC社M20抗体を用いてラット新生児培養心筋中のGRの発現がWB法および免疫染色法で確認できた。

一方、抗MR抗体(Santa Cruz Biotechnology社H300、Abcam社2774-100、Santa Cruz Biotechnology社N-17)は過剰発現させたヒトおよびラットMRのみに反応した。しかしながらいずれの抗体ともラット新生児培養心筋中のMRをWBおよび免疫染色で検出するだけの感度はなかった。

2) 心筋細胞におけるGRとMRのリガンド刺激に伴う細胞局在の変化

培養心筋細胞にアデノウイルスベクターを用いてFlagで標識したGR、MRを発現させ、Corticosterone(COR)、Cortivazol(CVZ)、Aldosterone(ALD)で刺激した。無刺激の状態では、主として細胞質に局在していた外因性のGRはS(1 μ M)、CVZ(1 μ M)、ALD(1 μ M)刺激後1時間以内に核へ移行することが免疫染色で確認された。同様に、内在性の心筋GRもS、CVZ、ALD刺激によって核に移行することが確認された。一方、無刺激の状態では、主として細胞質に局在していた外因性のMRはS(1 μ M)、ALD(1 μ M)刺激後1時間で核に移行したが、CVZ(1 μ M)刺激では細胞内局在に変化を認めなかった。以上の結果からCVZがGR特異的なリガンドとして作用することが確認された。同様な細胞内局在の変化は細胞質画分から核抽出液へのGRやMRの移行としてWB法でも確認された。

3) GR特異的な阻害剤RU486、MR特異的な阻害剤SpironolactoneおよびEplerononeのGRおよびMRに対する特異性の確認

これまでMRに対する特異的なリガンドは報告されていない。ALDはGRとMRの双方に作用する。そこでGRの作用をRU486で阻害した条件下でALDで刺激しMR特異的な遺伝子発現を見られるか否かに関して検討した。

まず、RU486がGR特異的な阻害剤であることを確認するために、異なったRU486濃度下におけるGRとMRの核内局在に関して検討した。これまでの報告からRU486はGRと結合してGRの核移行を促進させるがGR依存性の転写活性はごくわずかであり、他のグルコルチコイドのアゴニスト作用を競合的に阻害する。また、NF κ BやAP-1などの他の転写因子の抑制作用は誘導可能であることが知られている(Mao J, 1992)。GRの核移行はRU486の濃度を10 μ M、1 μ M、100nM、10nMと希釈させていっても観察されたが、MRの核移行はRU486の濃度が10 μ M、1 μ Mの状態では観察されたものの、100nM以下の濃度では観察されなくなりMRは細胞質に留まったままであった。Spironolactoneでは濃度10 μ M、1 μ MでGR、MRともに核移行が認められた。一方、Eplerononeは濃度10 μ MではGR、MRともに核移行が認められたものの濃度1 μ MではMRの核

移行だけが観察されGRは細胞質に留まったままであった。

4) 各種リガンドによるGRE-lucレポーター遺伝子の活性化とRU486 SpironolactoneおよびEplerononeによる抑制効果

次にラット培養心筋細胞におけるGRE-lucの活性を指標に各種リガンドおよび受容体拮抗薬の効果を検討した。

S刺激によって、controlの1.8倍(1nM)、3.2倍(10nM)、38倍(100nM)に活性が上昇した。CVZでは、controlの22倍(1nM)、220倍(10nM)、168倍(100nM)に上昇した。ALDではcontrolの1.3倍(1nM)、2.7倍(10nM)、5.7倍(100nM)に活性が上昇した。この結果から培養心筋細胞ではGRE-lucの活性化に関しては、ALDはCVZやSに比べても弱いことが分かった。

RU486(10mM)によって、S(1nM、10nM、100nM)、CVZ(1nM、10nM、100nM)、ALD(1nM、10nM、100nM)によるGRE-lucの活性は完全に抑制された。

そこでRU486の濃度(10 μ M、1 μ M、100nM、10nM)を変えて、CVZ(1nM)、ALD(100nM)によるGRE-lucの活性に及ぼす影響を検討した。CVZ(1nM)刺激によるGRE-lucの活性化はRU486濃度を100nMまで希釈させても245倍→2.3倍まで活性抑制効果が認められた。一方、ALD(100nM)刺激によるGRE-lucの活性化はRU486濃度を100nM以下に希釈すると全く観察されなくなった。以上の結果は、実験③の核への移行を見た実験結果と一致しており、この培養心筋細胞を用いた実験系では高濃度RU486(10mM、1 μ M)ではGR、MR作用ともに阻害するが、低濃度RU486(100nM、10nM)ではGR作用のみ選択的に阻害することが確認された。

Spironolactone(10mM)は、CVZ(1、10nM)によるGRE-lucの活性には全く影響を与えなかった。しかし、ALD(10nM、100nM、1mM)および低濃度のS(10nM、100nM)によるGRE-lucの活性化はSpironolactone(10mM)により完全に抑制された。

5) マイクロアレイ解析を用いたGR依存性、MR依存性遺伝子の網羅的解析

まず予備的な実験として培養心筋細胞をCVZ、S、Aldosterone(各100nM)で刺激して、3、6、12、24時間後にmRNAを抽出して既知のGR、MR標的遺伝子の発現変化を観察した。その結果、rat-SGKの発現がCVZ刺激後3時間をピークに5倍以上に上昇することが確認された。以上の結果をもとにラット培養心筋細胞をCVZ、S、Aldosterone(各100nM)で刺激し3時間後の遺伝子発現変化をGeneChip(Rat Genome 230 2.0 Array)により評価した。コントロールとしては、各リガンドを溶解したEtOHで刺激した心筋細胞を用意した。2倍以上に発現が増加した遺伝子、反対に2倍以下に減少した遺伝子群に関して現在詳細な検討中である。

D/E. 考察・結論

今回の培養心筋細胞を用いた実験結果からも、GRとMR作用のredundancyが確認された。さらにMRの拮抗薬であるSpironolactoneの作用も必ずしもGRあるいはMRに特異的ではなく、濃度次第によっては非選択的にGRとMRを抑制している可能性が考えられた(*CORの作用もSpironolactoneで完全に抑制されている)。しかしこれまでの実験結果からCVZがGR特異的に作用すること、低濃度RU486(100nM, 10nM)ではGR作用のみ選択的に

阻害することが明らかとなった。したがって、GR特異的な作用をCVZ刺激で、MR特異的な作用をRU486存在下でのAldosterone刺激によって、切り離して評価できる可能性が示唆された。

今後は、GRとMRの“activation”(活性化される遺伝子)および“transrepression”(抑制される遺伝子)の両方のgenomic actionに着目して解析を進め、複雑にクロストークした心臓におけるGRとMR作用を解明していきたいと考える。

細胞シート間の電氣的相互作用の解析

岡野 光夫(東京女子医科大学)

A. 研究目的

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いた様々な細胞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細胞シートは、支持体を用いることなく積層化が可能である。温度応答性培養皿を用い、得られた積層化筋芽細胞シートの心筋梗塞動物モデルへの移植実験では心機能の改善が認められた。一方で、*in vitro*で心筋細胞と筋芽細胞を共培養することにより不整脈が認められることが報告されている。本研究では、筋芽細胞シート移植による心筋組織の不整脈の出現の可能性の有無を*in vitro*で調べること、および不整脈が起こる可能性をゼロに近づけることを目的に、心筋シートと筋芽細胞シートが電氣的に結合するのか、また電気活動をする組織同士が相互作用しなくなる距離の限界を「細胞シート工学」を用いて調べた。

B. 研究方法

1)細胞シートの調製

新生仔ラット由来の心筋細胞、ヒト筋芽細胞、マウスNIH3T3線維芽細胞、ヒトHeLa細胞を温度応答性培養皿に播種した。そして3-5日間培養後、培養皿を20℃で低温処理することによりシート状に細胞を脱着させ、得られた細胞シートを以下の実験に用いた。

2)積層化細胞シート間の電氣的相互作用の解析

最初に心筋シートを64個の平面微小電極がパターンニングされたプローブ上に乗せ、さらにその上に筋芽細胞シート、線維芽細胞シートあるいはHeLa細胞シートを乗せた。そして最後にさらにもう1枚心筋シートを重ねた。すなわち2枚の心筋シートで非心筋細胞シートを挟む形になる。そして上下2枚の心筋シートが電氣的に結合するかどうかを、またもし結合するのならば結合するまでの時間を、多点細胞外電位記録システムで経時的に測定した。また1枚の心筋シートに電気刺激を与え、生じた誘発電位が非心筋細胞シートを伝播し、もう1枚の心筋シートに伝わるか観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関しては苦痛を伴わないよう正しく

取り扱い、適切な麻酔を行って研究を行った。

C. 研究結果

心筋シート-非心筋シート間の電氣的結合性の検出:最初に2枚の心筋シート間に1枚の筋芽細胞シート、線維芽細胞シートまたはHeLa細胞シートを挟んだ3次元組織内における細胞シート同士の電氣的相互作用を解析した。重層した直後の2次元電位分布を調べると、2枚の心筋シートは別々の周期の電気活動を示した。さらにこれらの組織の活動電位の経時的変化を解析したところ、筋芽細胞シートまたは線維芽細胞シートを挿入した場合、上下2枚の心筋シートはそれぞれ 90.4 ± 4.1 分($n=4$)、 113 ± 12 分($n=5$)で電氣的に結合した。次に1枚の心筋シートに電気刺激を与え、生じた誘発電位の伝播についても経時的に観察した。電気刺激により1枚の心筋シートで生じた誘発電位は積層直後には、もう1枚の心筋シートに伝わらなかった。しかし上下2枚の心筋シートの自発電位が同期した後は、1枚の心筋シートで生じた誘発電位はもう一方の心筋シートに伝播することが確認された。これらの結果は、心筋シートの電氣的興奮が、筋芽細胞シート、線維芽細胞シートを介して伝播されることを示している。一方、ギャップ結合を持たないHeLa細胞シートを心筋シート間に挟んだ場合は、2枚の心筋シートは24時間後でも電氣的に結合しなかった。次に心筋シートに挿入する筋芽細胞シートあるいは線維芽細胞シートの枚数を増やし、心筋シート同士が電氣的に結合できる限界を調べた。すると筋芽細胞シートは2枚、また線維芽細胞シートは3枚挿入すると上下2枚の心筋シートは電氣的に結合しなくなった。

D. 考察・結論

今回、心筋細胞は、筋芽細胞と電氣的に結合することを示す結果が得られた。これらの結果は、移植時において筋芽細胞は心筋細胞と電氣的に結合し、もし移植した筋芽細胞に自発活動電位が生じたら、心筋組織に不整脈を起こす可能性があることを示している。実際に、*in vitro*で心筋細胞と筋芽細胞を共培養することにより不整脈が認められることが報告されている。しかし臨床におい

て、筋芽細胞シートを心臓に移植する場合、結合組織等により心筋細胞とは物理的に距離がおかれることから、電氣的に結合し不整脈を起こる可能性は低い。実際に今回の結果において、電気活動をする組織同士は、電氣的に不活性と思われるHeLa細胞シートではシート1枚の距離で、また、活動電位を伝播できる細胞シート(筋芽細胞シート、線維芽細胞シート)でもシート2枚あるいは3枚の距離をおくことにより相互作用しなくなった。そこで筋芽細胞シートを移植する場合、電氣的に

不活性な細胞シートあるいは採取および培養が容易な線維芽細胞から作製した線維芽細胞シートを使うなどして心筋細胞と筋芽細胞シートの間に距離をさらに置くことにより、電氣的に結合させないようにすれば不整脈の起こる可能性をさらに低める事ができるものと思われる。

<研究協力者>

清水達也(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

原口裕次(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

関根秀一(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

拡張型心筋症の発症と進展機序に関する実験的検討

松崎 益徳(山口大学)

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) マウス再感染血清

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

2) 患者血清

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

(倫理面への配慮)

患者血清を使用した臨床研究に際しては、山口大学病院倫理委員会の審査を経たプロトコルに則り施行されている(H18-51: 心筋炎・心筋症における抗心筋自己抗体の研究)。臨床研究に当たって

は患者本人または代理人から研究同意書を取得した上で、倫理面は最大限に配慮し、厳格な個人情報管理の下で行った。ウイルスを使用した動物実験に際しては、山口大学医学部動物使用委員会の審査を受けたプロトコルに則り施行されている(23-S02: マウス慢性心筋炎心移植モデルを使った免疫学的解析)。

C. 研究結果

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

D. 考察

既報の心筋自己抗原の多くは、収縮蛋白などの心筋細胞内の構成蛋白であり、自己抗体とは免疫学的に隔絶されている点が問題であった。今回の解析で、疾患マウスと患者双方より細胞膜分画に自己抗原が同定されたことより、自己免疫機序による心筋細胞障害の可能性が示唆された。更に、同定された各種自己抗原とヒト CVB3との抗原相同性解析では有意なアライメントは検出されなかったことより、DCMの進展にはウイルスの持続感染の関与は少ないと予想された。

E. 結論

心筋細胞膜蛋白の一部を抗原とする自己免疫機序がDCMの進展機序に関与している可能性が示唆された。

<研究協力者>

中村浩士, 松嶋 敦

(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)

加藤智啓, 西岡久寿樹

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)

A. 研究目的

拡張型心筋症(DCM)の成因としてウイルス感染、遺伝子異常と共に自己免疫機序が挙げられる。自己免疫機序の傍証の一つとして、様々な抗心筋自己抗体が患者血清中から検出される。われわれは蛍光免疫染色法、イムノブロット法、ELISA法を駆使することにより85%の患者に何らかの抗心筋自己抗体が検出されることを明らかにした。今までの検討結果から、 $\beta 1$ アドレナリン受容体、ムスカリンM2受容体、トロポニンI、細胞膜Na-K-ATPaseなどに対する抗体がDCMの病態を修飾していることがわかった。このような抗心筋自己抗体を除去すべく、免疫吸着療法がドイツを中心に試みられている。その効果を予測する上ではin vitroで成熟ラット心筋細胞の収縮を障害する“心抑制性抗体”の検出が有用であると報告されている。本治療法をわが国で開発する上で、“心抑制性抗体”の検出システムを確立することが重要と考える。本研究は、ニワトリ有性卵を用いた心抑制性抗体のスクリーニング系を確立し、心抑制性抗体の吸着・除去が心機能に及ぼす影響を検証することを目的とする。

B. 研究方法

16日齢ニワトリ有性卵の気室に患者血清から精製したIgG 1mgを投与し、20分後に割殻し、心エコーにより左室駆出率を計測した。生理食塩水を添加した後に同様に計測した10例の左室駆出率から平均値 $\pm 2SD$ を計算し、IgG添加後の左室駆出率が平均値 $-2SD$ 未満の場合に心抑制性抗体陽性と判定した。対照として、DCM以外の原因による心不全例10例から抽出したIgG分画を用いて同様な検討を行った。心抑制性抗体陽性例と陰性例で患者背景の比較を行った。心抑制性抗体の存在と従来法による自己抗体との関連を検討する目的で、各々の抗体陽性例と陰性例において心抑制性抗体がどのくらい検出されるかを検討した。有意差を認めたものについては、さらに多変量解析を行った。

免疫吸着カラムによる心抑制性抗体の除去が心機能に及ぼす影響を検討する目的で、心抑制性抗体陽性DCM 42例(全て $\beta 1$ 受容体抗体あるいはムスカリンM2受容体抗体陽性、4例においては重複)、非DCM心不全例12例の血清(自己抗体全て陰性)をトリプトファン・カラムでろ過し、処理前後の血清添加下においてニワトリ有性卵の左室駆出率を計測した。

C. 研究結果

104例のDCMのうち本スクリーニング法によって心抑制性抗体陽性と判定されたのは65例(63%)であった。残る39例(37%)では心抑制性抗体陰性であった。非DCM心不全例全てが心抑制性抗体陰性

であった。心抑制性抗体陽性DCM例と陰性DCM例の間に、年齢、性別、NYHA心機能分類、左室駆出率、左室拡張末期径、左房径、心房細動・心房頻拍の合併頻度、血漿ノルエピネフリン濃度、心房ナトリウム利尿ペプチド濃度に差はなかった。心抑制性抗体陽性頻度は間接蛍光抗体法により検出された抗体陽性例と陰性例で差はなかった(64.1% vs. 61.5%)。イムノブロット法陽性例では陰性例に比べて心抑制性抗体を高頻度に認めた(81.6% vs. 51.5%, $p<0.05$)。ELISA法により検出された抗体については、抗 $\beta 1$ 抗体の有無(80.0% vs. 51.6%, $p<0.05$)、抗ムスカリンM2抗体の有無(83.3% vs. 48.4%, $p<0.05$)、および抗Na-K-ATPase抗体(84.6% vs. 55.1%, $p<0.05$)の有無について有意差を認めた。トロポニンI抗体の有無については差はなかった(56.3% vs. 63.6%)。多変量解析によって、抗 $\beta 1$ 抗体と抗ムスカリンM2抗体陽性が心抑制性抗体存在の予測因子となった。

心抑制性抗体陽性DCM例から採取した血清を添加した際のニワトリ有性卵の左室駆出率は、カラム処理前では65.5% $\pm 7.8\%$ であったが、カラム処理後においては86.3% $\pm 3.4\%$ であった($p<0.01$)。 $\beta 1$ 抗体陽性例においてはカラム処理前が65.6% $\pm 8.4\%$ に対して、カラム処理後が86.2% $\pm 3.5\%$ であった($p<0.01$)。ムスカリンM2抗体陽性例では各々65.7% $\pm 7.8\%$ と86.0% $\pm 3.1\%$ であった($p<0.01$)。両者重複例においても同様な差が見られた。これに対して、自己抗体のない非DCM心不全例の血清を用いた検討では、カラム処理前後で左室駆出率に変化はなかった。

D. 考察

ニワトリ有性卵を用いた心抑制性抗体の検出はラット心筋細胞を用いた細胞収縮とカルシウム・トランジェントの観察よりも実用性が高く、本方法を用いてより効率的に免疫吸着療法の適応例を検出することが可能である。心抑制性抗体の本体は未だ不明であるが、IgG分画に含まれており、サイトカインや神経体液性因子の混入はない。実際非DCM心不全患者のIgG分画にはこのような心抑制性因子は検出されなかった。したがって、本法によって検出されたこのような因子は心機能低下を惹起する何らかの抗心筋自己抗体であると考えられた。

従来法により同定された抗心筋自己抗体との関連では、 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体抗体が心抑制性抗体存在の予測因子となった。ムスカリンM2受容体抗体が徐拍化作用と心収縮抑制作用を有するのは理解しやすいが、 $\beta 1$ アドレナリン受容体抗体にそのような作用があるのかについては不明である。本自己抗体は内因性交感神経活性が低いときにはアゴニスト様作用を

有するとされる。しかし、心不全患者などのように交感神経活性が高いときにはアンタゴニストとして作用するとも言われる。βアドレナリン受容体作動薬は受容体の発現量に大きく依存する。健康心のように受容体数が多いときには陰性変力作用のない作動薬でも、不全心のように受容体数が低下しているときにはインパース・アゴニストとして作用することも指摘されている。実際に心移植の適応となるような重症心不全患者においてβ1アドレナリン受容体抗体の臨床的意義を検討すると、その存在は心機能低下と関連した。このようなことからβ1受容体抗体も重症心不全患者においては心機能低下に寄与する可能性も考えられる。本研究でも、ムスカリンM2抗体除去のみならず、β1アドレナリン受容体抗体除去によってもニワトリ有性卵の左室駆出率は改善した。

E. 結論

たこつば心筋症の病理学的研究

河合 祥雄（順天堂大学）

A. 研究目的

たこつば心筋障害の発症機序としての微小循環障害説を某県組織において確認し、また、心筋障害分布について明らかにする。

B. 研究方法

たこつば心筋障害(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。また、無収縮を呈した心線部付近心筋標本において、前壁、側壁、後壁、心室中隔を心内膜下・肉柱、内層、中層、外層に区分し、それぞれにおける心筋病変(心筋細胞障害、広義の線維化)の割合を計測した。データ処理に当たっては個人の特定ができないように配慮した。

C. 研究結果

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

ニワトリ有性卵を用いたスクリーニング系でDCM患者血清中の心抑制性抗体の検出を試みた。104例中65例(63%)に心抑制性抗体が検出された。従来から汎用されている方法によって検出された様々な抗心筋自己抗体との関連を検討した結果、β1アドレナリン受容体抗体とムスカリンM2受容体抗体が心抑制性抗体存在の予測因子となった。心抑制性抗体陰性患者の血清をトリプトファン・カラム処理してもニワトリ有性卵の左室駆出率に及ぼす影響に変化はなかったが、心抑制性抗体陽性患者の場合は同様なカラム処理によってニワトリ有性卵の左室駆出率は改善した。本スクリーニング系はDCM患者に対する免疫吸着療法を導入する際に有用な手がかりを供与することが予測される。

<研究協力者>

吉川 勉, 馬場彰泰

伴っていた。病変は基本的に、単一性心筋細胞障害像を呈し、周囲の微小血管の障害を伴わず、散見された。病変は、相対的に前壁に多く(前壁: 30.8、側壁: 24.9、後壁: 20.8、心室中隔: 25%)、層別では、内層、中層、外層(30.8%、33.5%、26.4%)に比して心内膜・肉柱層(35.6%)に多い傾向をみた。

D. 考察

心筋障害は心基部に比して、心尖部に多いが、微小血管数は差異がなく、血管破綻が心尖部に強いとは言えない。すなわち、血管障害は二次的病変である可能性を示すと考えられた。

心筋病変は単一性心筋細胞障害を基本とし、周囲の毛細血管破綻とは無関係に存在した。心基部付近の左心室横切面において、心筋障害は前壁に多い傾向を示し、病変が心尖部のほか、前壁に多いことと対応した。また、心内膜下の障害が多いことはMRIでのdelayed contrast enhancementが心内膜下またはびまん性に見られるとする報告に対応する所見と考えられた。

E. 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、心筋内微小血管障害説は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。心筋病変は前壁、心内膜下に多い傾向を示し、MRIによる病変程度の診断根拠となりうる。

A. 研究目的

サルコイドーシス(サ症)は非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を特徴とする全身性疾患で、一般に予後は良好である。しかし、心病変を有する心臓サルコイドーシス(心サ症)は例外で、心不全や致死性不整脈による突然死をきたす予後不良例が多く、サ症の死因の3分の2以上を占めている。従って、心病変の存在の有無はサ症の予後を左右する重要な規定因子といえる。治療に関して、サ症同様心サ症もステロイド治療が有効であり、早期に心サ症を診断しステロイド治療を開始することが予後の改善につながると考えられる。

心サ症の診断は、心内膜心筋生検にて特徴的な病理組織所見を得ることにより確定するが、確定診断を得るのは全体の約20%と報告されている。臨床的には、「サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き」¹⁾に従い総合的に診断を行う。手引きのなかにも記載されているごとく、心サ症診断のための検査として心エコー検査やthallium-201 chloride、Tc-99m methoxyisobutylisonitrile、Tc-99m tetrofosmin、およびGallium-67 citrateシンチグラムなどの心臓核医学が有用であるが、いずれの検査も感度や特異度の点で診断に十分とは言えず、より良い非侵襲的検査が望まれる。

近年、新しい核医学検査として、 ^{18}F -fluoro-2-deoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET)が、てんかん、虚血性心疾患、悪性腫瘍などに対して保険適応になったことから、臨床応用が増加し急速に普及している。 ^{18}F -FDG-PETは悪性腫瘍のみならず活動性炎症にも高い異常集積を示すと考えられ、心サ症においてもその診断に役立つ可能性がある。本研究の目的は心サ症における同検査の有用性と現状での問題点を検討することである。

B. 研究方法

被検者を5時間以上の絶食後、血糖値を測定し、施設内に設置されている小型サイクロトロンにて生成した ^{18}F -FDG 37MBq/kgを静注して、Siemens社製PET-CT装置Biograph2にて1時間後に90秒間で全身のCTを撮影し、3次元収集による14分間のPETスキャンを行った。CTにより吸収補正を行い2.5mm間隔の体軸横断像を得た。健常者の正常心における ^{18}F -FDG心筋長軸断層像を用いて、PET-CT融合画像を参照し心筋全体にROIを設定し、standardized uptake value (SUV)を算出した。正常のmean+2SD以上を示す部位を異常高集積とし、心サ症患者の心臓およびリンパ節のFDG集積を解析した。

C. 研究結果

以下に症例の一部を呈示する。

1) 症例1

45歳 男性。1998年、完全房室ブロックに対し恒久ペースメーカー植え込み術をうけた。その後、とくに胸部症状なく経過していたが、2006年10月より労作時呼吸困難、全身倦怠感を自覚するようになり、胸部レントゲン検査で心拡大、肺うっ血、胸水貯留を認めた。心エコー検査では著明な左室拡大[左室拡張末期径(Dd)80mm/左室収縮末期径(Ds)72mm]、びまん性の壁運動低下[左室駆出率(EF)=21%]、高度の僧帽弁逆流を認めた。 ^{67}Ga シンチグラム検査では心臓、縦隔、肺門部に異常集積を認めなかった。血中ACE濃度は15.8IU/Lと基準値内であった。冠動脈造影では冠動脈に有意狭窄は認めず。生検心筋組織像は非特異的炎症所見であり心サ症の確定に至らなかった。一方、 ^{18}F -FDG PETでは左室および縦隔リンパ節に高度異常集積を認めた。心不全が内科的治療のみでは限界となり、左室縮小形成術(SAVE術)および僧帽弁輪縫縮術が施行された。手術時に摘出した心筋組織に非乾酪性類上皮細胞性肉芽腫を認め心サ症と確定診断され術後よりステロイド治療を開始した。6ヵ月後の ^{18}F -FDG PETでは左室の異常集積の減少と縦隔リンパ節の異常集積の消失を認め、心不全症状が改善し順調に経過している。

2) 症例2

54歳 女性。生来健康であった。2003年に職場健診にて心電図異常(詳細不明)を指摘されたが無症状であったため放置していた。2006年7月に意識消失発作を2回きたし心電図で高度房室ブロックを認めた。心エコー検査では軽度左室拡大とびまん性壁運動低下(とくに前壁中隔が著明、Dd 53mm/Ds 39mm、EF 51%)、を認めた。冠動脈造影は正常冠動脈であり、心筋生検ではサ症に特異的な所見は認めなかった。血中ACE濃度は19.9 IU/Lと基準値内であった。本症例の ^{18}F -FDG PETでは、左室、右鎖骨上窩、右鎖骨下、縦隔リンパ節に異常集積を認めた。右鎖骨上窩リンパ節の生検により非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認め、サ症と確定診断しステロイド治療を開始した。ステロイド治療により心機能が改善し順調に経過している。

3) 症例3

67歳 女性。2000年、他院にて眼サルコイドーシス、両側肺門リンパ節腫張を指摘されており、心臓精査のため2005年2月紹介受診した。心エコー検査で心室中隔の一部に壁の菲薄化が認められた。心筋Tc-MIBIシンチグラムでは異常所見はなかった。全身Gaシンチグラムでは右上縦隔、右下肺野、肺門部に異常集積を認めたが心臓には集積を認めなかった。外来で経過観察されていたが、2006年9月より心電図で右脚ブロックが出現した。 ^{18}F -FDG PETを施行したところ、縦隔リンパ節、右室および左室に高度の異常集積像を認めた。

2006年10月心臓カテーテル検査を施行し冠動脈に異常を認めなかった。 ^{18}F -FDG PETで高度集積を認めた右室から心筋生検を施行した。組織所見では非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を認め心サ症と確定診断された。ステロイド治療を開始し順調に経過している。

D. 考察

1) 心サ症における ^{18}F -FDG PETの有用性

近年、心サ症における ^{18}F -FDG PETの有用性を示唆する報告がある。感度、特異度についてIshimaruらは感度100%、特異度81.5%と報告し²⁾、またOkumuraらは感度100%、特異度95.5%と報告している³⁾。症例1および症例2は心筋にサルコイド病変が証明されず特異性拡張型心筋症との鑑別に苦慮した症例であるが、このような症例においても左室や縦隔リンパ節、鎖骨上窩リンパ節などに異常集積を認め、心サ症の診断過程に大きく貢献した。また、症例1ではステロイド治療後に縦隔リンパ節の異常集積が消失し、左室の異常集積も減少傾向を認めたことから、治療効果の判定に役立つ可能性が示唆された。Yamagishiらも7人の心サ症患者にステロイド治療を行い、治療前と治療後1ヶ月の ^{18}F -FDG PETを比較したところ、5人の患者で異常集積部の大きさ、集積度ともに減少傾向を認め、残る2人は完全に異常集積が消失したと報告している⁴⁾。症例2および症例3では異常集積を認めた鎖骨上窩リンパ節や右室を生検することにより、サルコイド病変が証明された。このように ^{18}F -FDG PETは心サ症診断のための生検部位の決定や活動性の評価、治療効果の判定などに役立つと考えられる。

2) 心サ症における ^{18}F -FDG PETの問題点

健常人の心臓(特に側壁)にも ^{18}F -FDG集積を認めることが報告されており、心臓に ^{18}F -FDG集積を認めた場合、それが異常集積か否かの判定が最も重要で今後の大きな課題である。異常集積をどの

ように定義するかも議論が分かれており確立された方法がないのが現状である。集積度を表す指標の一つにstandardized uptake value (SUV)が広く用いられており、我々の症例でもSUVを用いて判定した。しかし、このSUVもPET撮像開始時間、血糖値、血中インスリン濃度などのさまざまな要因に左右されることが報告されており注意を要する。Ishimaruらは集積パターンをnone、diffuse、focal、focal on diffuseと分類し、focalおよびfocal on diffuseパターンを心サ症における異常集積としておりSUVを用いていない²⁾。また、同著者らは ^{18}F -FDG投与前に未分画ヘパリン(50 IU/kg)を投与することで、血中脂肪酸レベルを上昇させ、心筋の生理的 ^{18}F -FDG取り込みを抑制させる工夫なども報告している。今後、このように ^{18}F -FDG PETの特異性を検討するのみならず感受性についての検討も必要と考えられる。

1) サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き; 2006要約. サルコイドーシス/肉芽腫性疾患 26: 77-82, 2006.

2) Ishimaru S, Tsujino I, Takei T, et al: Focal uptake on ^{18}F -fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography images indicates cardiac involvement of sarcoidosis. Eur Heart J 26:1538-1543, 2005.

3) Okumura W, Iwasaki T, Toyama T, et al: Usefulness of fasting ^{18}F -FDG PET in identification of cardiac sarcoidosis. J Nucl Med 45:1989-1998, 2004.

4) Yamagishi H, Shirai N, Takagi M, et al: Identification of cardiac sarcoidosis with ^{13}N -NH₃/ ^{18}F -FDG PET. J Nucl Med 44:1030-1036, 2003.

E. 結論

^{18}F -FDG PETはサ症の検出に優れ、心サ症においても活動性病変の存在や広がり、診断、治療効果の判定に有用であると考えられる。ただし、心臓に関しては異常集積の判定基準の確立が今後の重要課題である。

<研究協力者>

寺崎文生, 大塚 薫(大阪医科大学内科学Ⅲ教室)
林田孝平(武田病院画像診断センター)

肥大心におけるLysyl oxidase familyの役割に関する検討

今泉 勉(久留米大学)

A. 研究目的

過剰な心肥大は予後不良の独立した因子である。ラットの圧負荷肥大心と容量負荷肥大心でDNA chipを用いて遺伝子発現の相違を検討したところ、lysyl oxidase like-protein-1(LOXL)という蛋白の発現が両肥大群で著明に亢進していた。Lysyl oxidase(LOX)は、銅依存性細胞外モノアミン酸化酵素であり、コラーゲンやエラスチンの架橋反応を担っている。LOXには少なくとも5つのアイソフォームがあり(LOX, LOXL, LOXL2, LOXL3, LOXL4)、架橋反応以外にも細胞の成長、発達などに関与すると推測されている。LOXLは広汎な臓器に発現しており心臓での発現も豊富であるが心臓

における役割はほとんどわかっていない。最近、LOXLノックアウトマウスが作成され、elastogenesisに深く関与していることが示されているが心臓の詳細な観察はなされていない。我々は心筋細胞におけるLOXLの発現制御を検討し、Gq依存性アゴニストやIGF-1など多様な肥大刺激により発現や酵素活性が増加することを報告した。今回の検討ではLOXLの心臓特異的過剰発現マウスを作成し、LOXLの心臓での機能や心肥大における役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

トランスジェニックマウス用のコンストラクトは、poly A tailを含むhuman LOXL cDNAの上流に

α ミオシン重鎖プロモーターを付加して作成した。マウス卵へのインジェクションはKAC社に委託し、27匹のマウスが産出された。これらのマウス尾を用いて遺伝子判定を行い、5つのラインを確立した。心エコーはVevo 660 (VisualSonics 社)と30 MHzトランスデューサーを用いて行い、血圧はTail-cuff法で測定した。

(倫理面への配慮)

研究は当大学の動物実験倫理基準に準拠して行った。

C. 研究結果

マウスの表現型を検索するために、まず3つのラインを用いて10週齢のマウス心の組織標本を作成した。マクロでは明らかな求心性肥大がみられ、HE染色では心筋細胞肥大、Azan染色では間質および血管周囲の線維化を認めた。左室/体重比はTGマウスで有意に増大しており、左室肥大が形成されていた。心エコーでは左室や右室の拡大は認めず収縮能も保持されていたが、左室壁厚の増大がみられた。以上から、TGマウスでは心筋線維化を伴う心筋肥大がみられることがわかった。さらにTail-cuff法による血圧測定では、TGマウスで収縮期血圧のわずかな低下がみられることが判明した。これらの変化は、3つのラインとも同じように観察された。LOX酵素反応においては、 H_2O_2 がby-productとして産生される。 H_2O_2 は心肥大の細胞内誘導因子であるため、LOX反応により産生される H_2O_2 が心筋細胞肥大に関与する可能性を推測した。そこでTGマウスに、活性酸素種を広汎に不活化するEUK-8を投与することにより、マウスの表現型に与える影響を検討した。その結果、EUK-8は有意にTGマウスの左室/体重比を減少させ、心肥大を抑制した。

D. 考察

LOXLノックアウトマウスは、子宮脱、肺気腫、皮膚の進展性増大などを来することが示されている。その原因は弾性線維の障害であり、LOXLはelastogenesisに関与する。しかしながら、この蛋白は弾性線維が特別豊富ではない心臓において多量に発現しており、その機能はelastogenesisだけでは十分説明できない。我々の今までの研究によりLOXLは、①容量負荷、圧負荷の両者による心肥大で増大する、②培養心筋細胞においてGq依存性アゴニストやIGF-1のような肥大刺激によりmRNA発現やLOX酵素活性が増大する、③心筋細胞と非心

筋細胞とで比較すると正常状態では非心筋細胞での発現が多いが、肥大刺激を受けると心筋細胞においてより強い発現亢進がみられる、ことなどが判明している。以上からLOXLは心肥大に関係し、特に心筋細胞肥大と強く関連する可能性が推測された。今回、心筋細胞特異的にLOXLを発現するマウスを作成したところ、心筋細胞肥大と共に心筋線維化がみられることがわかった。LOX蛋白は細胞内で産生された後、プロセッシングを受けpro-regionの切断により活性化された成熟フォームとして細胞外へ分泌される。LOXLも同様の機序により成熟することがわかっている。我々のTGマウスでは心筋細胞で特異的にLOXL蛋白が発現しているので、心筋細胞間質や血管周囲の線維化は心筋細胞から分泌された蛋白による変化と推測される。心筋細胞においては蛋白が細胞内でそのまま作用しているのか、あるいは一度分泌された蛋白がparacrine, autocrine的に作用しているのかは今回の検討のみでは結論できない。LOXLの発現が心筋細胞肥大を来す機序はいくつか可能性が考えられる。前述のようにLOXアイソフォームは、酵素反応過程でリシン残基の酸化により H_2O_2 を産生する。活性酸素種は心筋細胞肥大のシグナリングに関与することが示されているため、LOXLにより産生された H_2O_2 が心肥大を起こしているという仮説を立て、それを不活化させるEUK-8をTGマウスに投与してみた。その結果、EUK-8により心肥大が抑制されることが判明し、TGマウスの心肥大には H_2O_2 が関与する可能性がある。TGマウスでは、心筋細胞肥大と共に心筋線維化も出現していた。LOXアイソフォームが直接細胞外マトリックスの増生に関与することは証明されておらず、LOXLの新たな役割を示唆するものである。TGマウスで間質増生が起こる機序は不明であるが、心筋細胞肥大と同様に H_2O_2 が関与しているのかもしれない。

E. 結論

今回、心臓特異的発現LOXL TGマウスを作成した。このマウスでは左室/体重比が増大しており、心筋細胞肥大と心筋線維化がみられた。LOXLが肥大を起こす機序としては、活性酸素種が関与していると推測された。

<研究協力者>

岡 直樹, 安川秀雄, 大村治也

(久留米大学医学部心臓・血管内科)

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>

島田 俊夫(島根大学)

A. 研究目的

奥出雲地域の住民健康診断に循環器疾患のための早期発見プログラムを組み込み基本健康診断に

血清NT-proBNP、高感度CRP、HCV抗体らのバイオマーカーを循環器疾患の早期発見、特に左室拡張障害のスクリーニングの目的に使用できるか否

か検討した。血圧は全例同機種自動血圧計により測定した。最近クローズアップされているメタボリック症候群評価の目的で腹囲測定も併せて行なった。

B. 研究方法

地域健康診断受診者1545名の一部をボランティアとして募り180名を心エコー図の評価の対象として選択した。今回の発表は前回血漿BNPでの検討に引き続いて行った新しいバイオマーカーであるNT-proBNPと心エコー図の比較から一般住民健康診断での左室拡張機能障害につき検討を新たに行ったので続報として報告する。心エコー図の左室拡張障害の診断基準、対象者の臨床的背景は図1-3に示す。NT-proBNPは-30℃で保存しRocheのエクルーシスを用い化学発光法にて測定した。心エコーはGE社製のVivid Iにて左側臥位にて行なった。

(倫理面への配慮)

参加者全員に事前に循環器健康診断の意味を説明するためにパンフレットをお配りし、その趣旨に賛同していただける方から同意書をいただき個人情報管理には細心の配慮を行なった。

C. 結果

高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満、腎不全、貧血、心疾患の家族歴を全て認めない、いわゆる健康症例は1545名中235名で約15%であった1543名の血漿BNPレベルと年齢の関係を検討してみると年齢により緩徐ではあるが40歳未満では10.2pg/mlであったレベルが80歳以上の年齢では44.2pg/mlと明らかな高値を示した。血圧と血漿BNPのレベルを同様にみても血圧120mmHg未満では17.5pg/mlであったが血圧160mmHg以上では27.3pg/mlと明らかな高値を示した。危険因子を全く持たない群(235名)での血漿BNP、血清NT-proBNPレベルはそれぞれ15, 45pg/mlで少なくとも一つの危険因子を有する群(1310名)のレベルはそれぞれ23, 66pg/mlであり、有意に危険因子を有する群で高値を示した。心筋傷害を有する者(cTnT $\geq$ 0.02ng/ml)は1545名中15名(1%)に認めた。HCV抗体陽性は1545名中38名(2.5%)に認められた。血漿BNPと血

清NT-proBNPが同時に採血できた症例1367名で両者の単相関を解析してみるとR=0.9の非常に高い正の相関を認めた。ボランティア186名中血漿BNPが約20pg/mlを超える者が66名で超えない者が120名でそのうち僧帽弁血流波形から計測されたDCT $\leq$ 250msecかつE/A $<$ 1未満の左室拡張障害は40名に認められ、そのうち32名はBNPが20pg/ml(80%)以上で、拡張機能障害を持たなかった146名中34名がBNPが20pg/ml(23%)以上であった。血漿BNPによる左室拡張障害のカットオフ値、感度、特異度をROC曲線を用いて解析するとそれぞれ19.3pg/ml、0.800、0.767で統計上有意であった。全症例に対して血漿BNPのカットオフ値を用い多変量ロジスティック回帰分析を年齢、性別、収縮期血圧、BMI、HbA1c、高感度CRP、Hb、総コレステロール、血清クレアチニン、中性脂肪、cTnT、体温を組み込んだモデルで検討すると年齢、Hb、総コレステロールが有意な因子として残った。今回のNT-proBNPと心エコー図による検討例での血清NT-proBNPの値は対数変換により計算した値を通常の表記に戻し表記すると正常群(N)44.2 $\pm$ 1.12、境界群(A)51.9 $\pm$ 1.08、拡張機能障害群(D)80.6 $\pm$ 1.15pg/mlであった。正常に比し他の2群ではいずれも統計上有意に高値であった。また左房径、収縮期血圧は他の2群に比し左室拡張不全群でいずれも統計有意に高値を示した(N vs D:32 $\pm$ 0.7 vs 37 $\pm$ 0.9mm, A vs D:34 $\pm$ 0.7 vs 37 $\pm$ 0.9)、(N vs D:127 $\pm$ 2 vs 137 $\pm$ 4mm, A vs D:134 $\pm$ 2 vs 137 $\pm$ 4mmHg)。左室重量係数に関してはD群でN群に比しp<0.01で

To evaluate the relationship between diastolic LV function and plasma NT-pro-BNP level

Mass Screening Participants undergoing Doppler UCG (n=180)

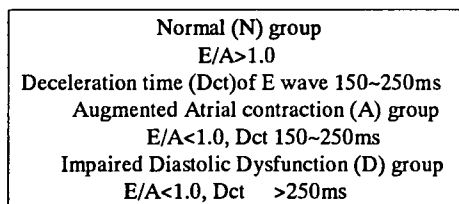


図2. Methods

One hundred and eighty persons who attended to annual health screening were studied. Clinical profiles of these were shown below.

Clinical Characteristics

n	180	Subjects with Medical Treatment	
age	62	hypertension	14
BMI(kg/m ²)	22	hyperlipidemia	9
SBP(mmHg)	132	diabetes(diet+medication)	5
GFR(ml/m)*	90	Old myocardial infarction	0
T Cholesterol(mg/dl)	209	Atrial fibrillation	0
Triglycelyde(mg/dl)	97		
HDL (mg/dl)	67		
Glycohemoglobin(%)	5		
plasma NT-pro-BNP (ng/ml)**	48		

* Cockcroft-Gault formula Mean values are shown except NT-pro-BNP (median)

図1. Study Subjects

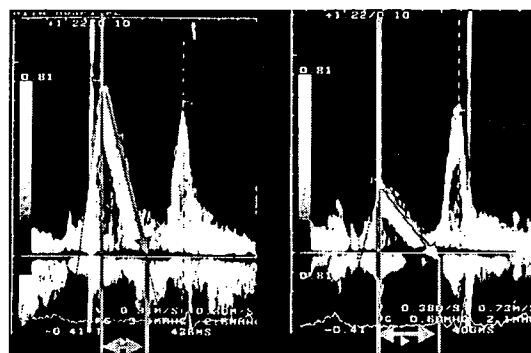


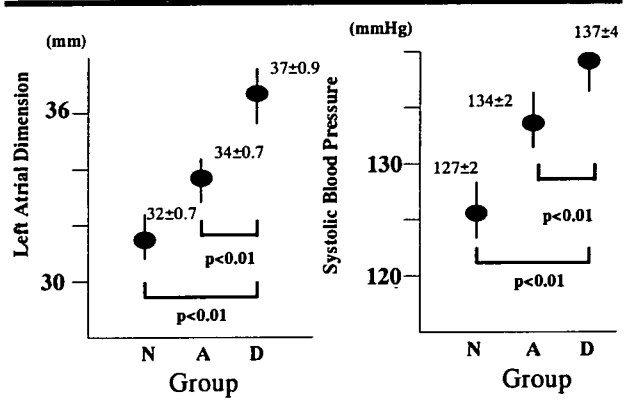
図3. Deceleration Time as a Parameter of Diastolic Ventricular Stiffness

統計上有意に大きかった(N vs D:90±3 vs 108±6g)。左室拡張障害に関してNT-proBNPを用いてROC曲線を描いてみると57pg/mlがcutoff値となった。このcutoff値を用いて多変量ロジスティック回帰分析を行うとGFR,DCT,LA径が有意な因子とし

て選択された。この検討の結果16%が左室拡張機能障害を持つと判断された(図4・5)。

血漿BNPと血清NT-proBNPの約20, 57pg/mlの cutoff 値を用いるとそれぞれ54%、51%での割合で cutoff 値を超える症例が認められた。

(1) Systolic Blood Pressure, Left Atrial Dimension vs Diastolic Dysfunction



(2) Systolic Blood Pressure, Left Atrial Dimension vs Diastolic Dysfunction

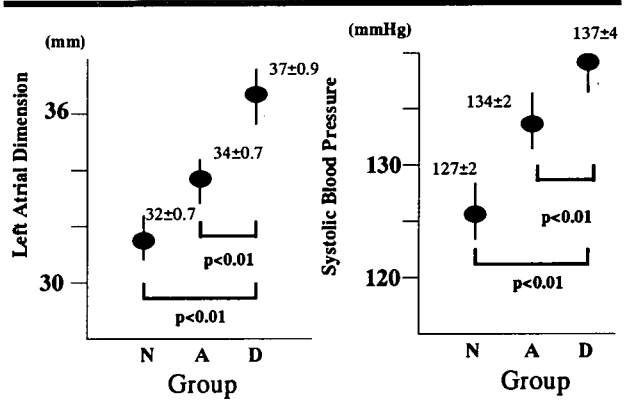


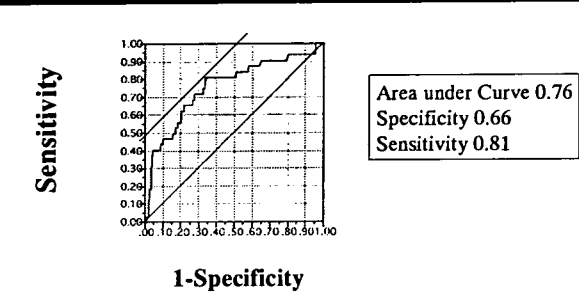
図4. Results

NT-pro-BNP is a sensitive biomarker of cardiac dysfunction.

Increasing level of NT-pro-BNP associated with Age and LV mass is partly reflecting **Diastolic Ventricular Dysfunction** in asymptomatic persons in the community.

図5. Conclusion

(3) ROC curve of NT-pro-BNP for Diastolic dysfunction



Discrimination Value of NT-pro-BNP is 57 pg/ml.

(4) Diastolic Dysfunction and Clinical, Functional Parameters

Twenty eight(16%) Persons showed diastolic dysfunction		
Parameters	Diastolic dysfunction(+)	Diastolic dysfunction (-)
log NT-proBNP	4.49±0.78**	3.84±0.83
Age	66±5**	62±6
Hemoglobin	13.7±1.2	13.1±1.3
GFR	80±26	81±21
SBP	138±20*	130±18
LA dimension	37±0.9**	33±0.5
BMI	23±3	22±2
E/A	0.73±0.18**	1.04±0.36
%FS	0.37±0.09	0.39±0.08
Deceleration Time	284±35 **	202±28
LVMI	108±27**	93±23

univariate Logistic Regression Analysis lnNT-pro-BNP
p=0.0008

D. 考察

高齢化社会の中でその医療費の増大は計り知れない状況である。高齢者の健康管理の質を高めることによりその増大を抑止するためには循環器疾患の早期発見が必要不可欠である。このためには労力の少ない形で質の高いマスクリーニングが必要である。この目的に新しいバイオマーカーである血清NT-proBNPを用いて心エコー図法と比較検討した結果測定安定性と左室拡張障害の評価力の観点からも優れた循環器疾患のスクリーニングツールとして使用できると思われた。今後はこのバイオマーカーの導入による循環器疾患の早期スクリーニングに期待したい。

E. 結論

血漿BNP同様に血清NT-proBNPは住民健康診断において簡易で有用な心臓の異常、特に拡張期障害スクリーニングのための有用なマーカーと考えられた。今後は経年的に血管イベントの追跡調査を併せ行なうことが重要と考えられる。さらに、今後は観察のみならず積極的薬物介入試験も必要と考えられる。

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 中谷 武嗣(国立循環器病センター)

A. 研究目的

内科的、外科的治療の進歩により、心不全の治療成績は向上してきた。しかし、心筋障害が高度な心不全例においては、心臓ポンプ機能の代替が必要となり、補助人工心臓(VAS)や心臓移植が考慮される。今回当センターにおける心臓移植登録待機例について検討した。

B. 研究方法

対象は、1997年10月以降2006年12月までに、心臓移植の適応として当センターより日本臓器移植ネットワークに登録された106例である。男性77例、女性29例で、登録時年齢は8-57(平均35)歳であり、基礎疾患は拡張型心筋症92例、拡張相肥大型心筋症3例、虚血性心筋疾患10例、再移植1例であった。

C. 研究結果

登録前あるいは待機中にLVAS装着を行った症例は71例(67%)で、現在待機中が26例(うち半数がLVAS装着中)である。また、国内移植が20例、渡航移植15例、取り消し10例、他施設移行3例、死亡32例であった。うち、取り消し10例中4例はLVAS装着例で、LVAS例を含む9例が心機能改善例であった。また、国内移植例20例においては、年齢14-61(平均40)歳、男性16例、女性4例、原疾患は拡張型心筋症19例、拡張相肥大型心筋症1例であった。待機状況は全例Status 1で、2例は強心薬持続投与で、他の18例はLVAS装着であった。待機期間は、29-2015(平均646)日で、15例が1年以上の待機例であった。また、LVAS装着18例では、補助期間は39-1444(平均687)日で、1年以上補助が14例であった。用いられたシステムは、東洋紡左室脱血型が14例で最も多く、また1例は最長の1444日補助例であった。他は東洋紡左房脱血型2例および植込み型LVAS: HeartMate VE 2例であった。脳死下臓器提供病院は3例が近畿地区で、他の17例は遠隔地であった。搬送手段は、小型ジェットが16例、ヘリコプターが2例で、他の2例は緊急自動車で、搬送時間は26-140(平均97)分であった。また、虚血時間は137-255(平均207)分で、1例以外4時間以内であった。手術術式は、1例目がLower-Shaumway法、2例目がBicaval法で、3例目からは右房後壁の一部を残すmodified Bicaval法を用いた。また、心筋保護液としては、当初はSt.

Thomas液を用い、7例目からはCelsior液を用いた。免疫抑制療法は、サイクロスポリンあるいはタクロリムス、ミコフェノール酸モフェチルおよびステロイドの3者併用療法を用い、6例で腎機能障害等で抗CD3抗体製剤を併用した。ISHLT Grade3A以上の治療を要する拒絶反応を5例に認めたが、全例ステロイドパルス療法で軽快した。現在移植後2ヶ月-7年9ヶ月(平均3年4ヶ月)を経過するが、最近の1例を除き退院した。1例が感染症にて移植後4年2ヶ月で死亡したが、他は経過安定しており、12例が社会復帰した。また冠動脈検査では1例においてドナー由来の病変を冠動脈造影(CAG)および血管内エコー(IVUS)で認めた。他の症例におけるCAGは正常範囲内であったが、6例にIVUS上Stanford Classification 3ないし4の病変を認めた。

D. 考察

我が国で2006年末までに施行された心臓移植は39例であるが、全例Status 1で、内31例がLVAS装着例であった。Status 1としての待機期間は平均698日、1年以上32例であった。また、LVAS補助期間も平均745日で、1年以上が25例であった。このようにわが国での心臓移植例は、重症例で、待機期間も長期に及んでいる。しかし、これまでの死亡例は2例のみで、最長例は移植後8年に及び7年生存率は90.3%と、国際心臓肺移植学会レジストリーより良好な成績を示している。今後良好な長期予後を得るために、冠動脈病変への配慮が必要であり、最近認可されたmTOR阻害薬RADが移植後冠動脈病変に対する新たな治療選択として期待されている。

E. 結論

わが国においても徐々にではあるが、心臓移植実施例が増加し、良好な成績を示している。今後心臓移植の定着が望まれると共に、長期補助を安定して行えるQOL良好なLVASの導入も必要である。

<研究協力者>

加藤倫子, 真野暁子, 小田 登

(国立循環器病センター臓器移植部)

国立循環器病センター臓器移植部

庭屋和夫, 船津俊宏

(国立循環器病センター心臓血管外科)

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

室原 豊明(名古屋大学)

A. 研究目的

数多くの大規模臨床試験の結果から β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬は非虚血性、虚

血性に関わらず慢性心不全の予後を改善することが確立されている。また、近年、 β 遮断薬の心不全に対する効果も確立されつつある。しかし、こ

れら薬物治療にても心不全が悪化する症例も数多く認められ、その様な症例は心臓移植の適応となるが、移植ドナー不足は我が国のみならず世界的にも深刻であり、心不全に対する新たな治療薬の開発が切望されている。特に我が国に多い特発性拡張型心筋症(DCM)に対して早急な対策が迫られている。

DCMにおける根治的治療法が未だ確立されていない現状では、予後不良の症例を軽症の段階から区別し、厳格な治療と管理を行うことが医療経済的にも重要であると考えられる。今回、我々は、心不全症状が軽症のDCMにおいて、収縮予備能を評価することにより心筋細胞傷害の進行度の評価、さらには予後予測が可能であるか検討した。また、抗アルドステロン薬が重症心不全患者の予後を改善することが最近報告された。動物モデルにおいて、アルドステロンが心筋線維化を促すことが報告されていることから、抗アルドステロン薬が不全心における心筋線維化を改善することが期待されるが、未だ、その効果は確立されていない。今回、我々は抗アルドステロン薬のspironolactoneの心筋線維化および左室拡張機能に及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

1) DCMにおける頻拍に対する収縮予備の評価と分子生物学的意義に関する検討

対象はNYHA I, IIの比較的軽症のDCM36例(平均年齢49歳)で、左室内に挿入した圧センサー付きカテーテルにより、左室圧を測定しながら右房ペーシングを行った。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。また、予後を追跡調査した。

2) DCMにおける交感神経刺激に対する収縮予備の評価と分子生物学的意義に関する検討

対象はNYHA I, IIの比較的軽症のDCM47例(平均年齢48歳)で、左室内に挿入した圧センサー付きカテーテルにより、左室圧を測定しながらdobutamine負荷試験を行った。dobutamineは末梢静脈より5γ 10分間、10γ 10分間投与し、各濃度の最後1分間のデータの平均を用いて解析を行った。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。

3) DCMにおける抗アルドステロン薬の効果に関する検討

DCM25例を対象として、抗アルドステロン薬のspironolactone 25mg/日投与前および約12ヶ月後に、血液中の線維化マーカーを計測した。また、組織ドップラー心エコー検査を行い、左室拡張機能(LV early diastolic strain rate)を評価した。さらに、圧センサー付きカテーテルを用いて左室内圧曲線を記録するとともに、左室造影を行った。左室心筋生検を行い、左室心筋線維化を定量評価

(collagen volume fraction: CVF)するとともに、生検標本におけるI型およびIII型コラーゲンmRNAレベルを定量的RT-PCR法により評価した。

(倫理面への配慮)

すべての患者において検査内容を説明し本学倫理委員会にて承認された文書による同意を得て検査を行った。

C. 研究結果

1) DCMにおける頻拍に対する収縮予備の評価と分子生物学的意義に関する検討

Baselineで機械的交互脈を認めたものは無く、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、両群間で比較検討した。対照群に比し、DCM群では、心筋におけるSERCA2、RyR-2 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レベルが低値であった。平均3.7年(0.8~7.5年)の観察により、A群2例、B群8例が心イベントを起こした。患者背景、血行動態データにおいて心イベントに影響を及ぼした因子を、stepwise法により多変量解析したところ、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($p=0.021$)。また、B群はA群に比し心イベントは有意に大であった($p=0.021$)。

2) DCMにおける交感神経刺激に対する収縮予備の評価と分子生物学的意義に関する検討

dobutamineによりLVdP/dtmaxが投与前の2倍以上に増加した19例(I群)と増加しなかった28例(II群)に分類した。I群と比較し、II群では末梢静脈血中ノルエピネフリン濃度は有意に低値であった。また、I群と比較し、II群ではβ1交感神経受容体、SERCA2a、PLBそれぞれの心筋におけるmRNAレベルが有意に低下していた。

3) DCMにおける抗アルドステロン薬の効果に関する検討

左室心筋生検標本のCVFと心筋線維化の血液マーカー(PIP/CITP比)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比)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spironolactoneの効果を検討した。spironolactoneの投与により、Group Bでは有意に血液中のPIP濃度が減少、CITP濃度が上昇した。また、I型およびIII型コラーゲンmRNAレベルもGroup Bでは有意に低下した。さらに、Group Bではspironolactone投与によりCVFが低下するとともに左室拡張末期stiffnessが有意に改善し、peak early diastolic strain rateも有意に改善した。しかし、これらspironolactoneの効果はGroup Aでは認められなかった。

D. 考察

本研究は、DCMにおける安静時の血行動態評価のみならず、右房ペーシングおよびdobutamine負荷による生理的ストレスに対する心筋収縮予備能

を評価し病態生理学への洞察を行った。頻拍誘発性機械的交互脈という生理学的現象が、細胞内 Ca^{2+} 動態および β_1 受容体刺激伝達に関する分子生物学異常を示唆し、それが臨床的に予後予測因子として有用な指標となりうることを報告した。

また、本研究では、血液中のPIP/CITP濃度比は左室心筋線維化の程度を示す臨床上有用な血液マーカーとなりうることを明らかにした。PIP/CITP>35のDCM症例において、spironolactoneが、心筋線維化を改善するとともに左室拡張機能をも

改善することを報告した。

E. 結論

DCMにおいて頻拍および交感神経刺激による心筋収縮予備能を評価することは、臨床的な心筋細胞傷害評価法として有用であり、軽症な段階での予後不良症例鑑別に応用可能であることが示唆された。また、抗アルドステロン薬はDCMにおける心筋線維化を改善し拡張機能障害を改善する可能性が示唆された。

心筋線維化と心室リモデリングにおけるテネイシンCの役割と発現調節

今中 恭子(三重大学)

A. 研究の目的

テネイシンCは、正常な心臓には発現しないが、病的な心臓で組織障害と活動性炎症に伴って、特異的に一過性に発現する。我々は、この性質を利用して、心筋生検組織診断、モノクローナル抗体を用いた心筋イメージングや、ELISA法によるテネイシンC測定系を開発し、心筋組織中の病変活動性のマーカーとする拡張型心筋症病態診断応用の可能性について検討してきた。特にELISA法により実際臨床の場で患者血中濃度を測定することが可能になり、拡張型心筋症患者の血中テネイシンCは正常より高く、そのレベルは心不全の重症度と相関することが明らかになった。その一方、これまでのin vitroの実験結果から病態診断の指標になるだけでなく、心筋組織リモデリングを制御することが理論的に予想される。実際、心筋梗塞後急性期に血中テネイシンC濃度の高い患者は、慢性期に心室リモデリングをおこすリスクが高い。さらに、最近我々は、拡張型心機能患者についても、同様な結果を得た。しかし、心不全が心筋でのテネイシンCの高発現状態を惹起しているのか、あるいは逆に何らかのメカニズムによりで発現誘導されたテネイシンCが線維化など心筋組織構築を改変し心室リモデリングをひきおこすのか、もしそうなら、どのような分子メカニズムを介するののかは未だ明らかでない。

本研究では、野生型マウス、テネイシンC欠損マウスおよびテネイシンC過剰発現マウスを用い、アンジオテンシンII負荷心臓線維化モデル、心筋梗塞モデルを作成し、線維化および心室リモデリングにおけるテネイシンCの機能、およびその発現制御機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 反応型心臓線維化マウスモデルの作成

BALB/C系メス7週令の野生型およびテネイシンノックアウトマウスの背部皮下に浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシンIIを持続的に投与し、軽症高血圧反応型線維化モデルを作製し、組織染色による画像解析、免疫組織化学、in situ hybridization、RT-

PCRにより解析した。

2) 心筋梗塞モデルの作成

BALB/C系オス10週令の野生型およびテネイシンノックアウトマウスの冠動脈を永久結紮して心筋梗塞モデルを作製し、28日後の心エコー、血行動態、生存率、組織学的変化を比較した。

3) 心臓特異的テネイシンC過剰発現トランスジェニックマウスを用いた解析

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た。このマウスとNkx2.5 Cre-マウス、 α -smooth muscle actin プロモーターCrePRIマウス、 α -myosin heavy chain(α MHC) プロモーターCrePRIマウス(inducible α MHC-Cre)とそれぞれ交配し、心臓でのテネイシンCを過剰発現させることを試み、発現状況を免疫組織化学、Western Blottingで確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、三重大学動物実験委員会で承認されたプロトコールに従って行った。

C. 研究結果

1-1) 反応型線維化病変進展におけるテネイシンCの関与

野生型マウスを用いた我々のモデルでは、心筋細胞の脱落はみられないが、コラーゲンI、IIIのmRNAレベルの2倍程度の有意な上昇、心筋内血管周囲に明らかな膠原線維の増加がみられる。テネイシンCのmRNAレベルはコントロールの10倍程度に著明に上昇し、免疫組織学的に、分子が血管周囲の線維化病巣部に沈着していることが明らかに認められた。in situ hybridizationにより、産生細胞は、血管の周囲に存在する線維芽細胞であることが明らかになった。また、血管周囲病変部にはMac3陽性マクロファージの集簇、PDGF-A、-Bの産生亢進が見られ、周囲間質細胞のPDGF受容体 α の発現が亢進していた。心筋中のIL-1 β 遺伝子発現には変化が見られなかったが、TGF β のmRNAの明らかな上昇が認められた。テネイシンCノックアウトマウスでは、アンジオテンシンIIに対する血圧反

応性、心筋肥大の程度には野性型と有意差は見られなかったが、線維化病巣の形成が有意に抑制され、プロテオグリカンの沈着、マクロファージの集簇がすくなく、PDGF-A、-Bの産生も抑制されていた。

1-2) 反応型線維化病変形成過程でのテネイシンC発現制御機構

選択的アルドステロン受容体拮抗薬エプレレノンは、野性型マウスの血圧に影響を及ぼさない量で、アンジオテンシンII負荷によるテネイシンCの発現をおさえ、線維化病変形成を有意に抑制した。マクロファージの集簇、TGFβ、PDGF-A、-Bの産生亢進も抑制された。培養系でアンジオテンシンII、TGFβ、とくにPDGFは心臓線維芽細胞を刺激し、テネイシンCの発現を著しく促進したが、アルドステロンは心臓線維芽細胞のテネイシンC発現を誘導せず、また、エプレレノンはアンジオテンシンIIによるテネイシンC発現誘導にも影響しなかった。

2) 心筋梗塞後の心室リモデリング、線維化におけるテネイシンCの役割

野性型マウスで心筋梗塞モデルを作成し、免疫組織化学的にテネイシンCの発現を検討すると、テネイシンCは急性期に梗塞巣と健康部の境界に沈着し、1日後には明らかに認められ、5-7日目にもっとも顕著となり14日には減少、28日後にはほぼ消失し、ラットモデルおよびヒト心筋梗塞とよく似た発現様式を示した。テネイシンCノックアウトマウスと野性型マウスでは28日後まで生存率に差は認められず、梗塞巣のサイズにも差を認めなかったが、野性型マウスのほうがテネイシンCノックアウトマウスに比べて、左室拡張終期径、左室収縮終期径、左室拡張終期圧は有意に大きく、左室駆出率も有意に低かった。

3) 心臓特異的テネイシンC過剰発現トランスジェニックマウスの発現に関する検討

我々の作製したトランスジェニックマウスで

は、いずれのCreマウスと交配したF1でも、組み替え発現効率に差は見られるが、ほぼ設計通りテネイシンCの発現をWestern Blotおよび免疫組織化学的に確認できた。

D. 考察

今回の我々の結果により、心臓の反応型線維化病巣の形成にテネイシンCが関与し促進的に働いている明らかになった。その過程でアルドステロンを介して惹起される血管周囲の炎症、特にマクロファージの浸潤が重要であり、それによって産生されたPDGF-A、-Bが血管周囲の線維芽細胞のPDGF受容体αを介してテネイシンCの産生を促進し、テネイシンCはさらにマクロファージ浸潤を促進することによりその炎症反応を増強すると考えられた。また、テネイシンCはコラーゲン線維形成の前段階である筋線維芽細胞の動員、プロテオグリカンPG-M/versicanの沈着を促進しを促進すると考えられる。

また、テネイシンCノックアウトマウスでは心室リモデリングをおこしにくく、血中テネイシンCレベルの高い患者で心室リモデリングをおこしやすいというヒト臨床データを実験的に裏付けるとともに、テネイシンCが心筋を構成する細胞に作用して結果的に心室リモデリングを増悪させていることを示唆した。さらに、Cre-Lox系を用いてマウスの心臓に発現時期および発現場所を変えてテネイシンCを過剰発現させることに成功し、現在のところ、テネイシンCを心臓過剰発現すると、心肥大と間質膠原線維の増加が見られるという予備的な結果を得ており、心臓の構築変化にテネイシンCが何らかの重要な役割を演じていることは明らかであり、今後の詳細な解析が待たれる。

E. 結論

心臓の線維化、心室リモデリングの進展でテネイシンCが促進因子として重要な役割を演じることが明らかになり、これらの進展防止のための治療標的分子となると考えられた。

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
廣江 道昭(国立国際医療センター)

研究の目的

臓器などに炎症が生じると細胞成分が主体となる再構築前期を経て、線維化が主体となる再構築後期へ向かうが、テネイシンCはこの一連の過程の再構築前期に特徴的に出現する細胞性基質タンパク(matricellular protein)であり、組織リモデリングの方向性と進行速度を決定づけると考えられている。ELISA法によるテネイシンC測定系を開発し、急性心筋梗塞後の患者において血清テネイシンCは、左室リモデリングの発症を予測し得るバイオマーカーであり、かつ心事故などの予後推定にも有用であることを報告した(JACC 47:2319-2325,

2006)。さらに拡張型心筋症患者(DCM)では、NYHA心機能分類の重症度、左室拡大・機能障害と関連してテネイシンCが有意に上昇していることも判明した(Circ J, 2007 (in press))。しかしながら、血清テネイシンCがDCM患者の予後を予測できるかどうかについてはいまだ検討されていない。

A. 研究目的

心不全にて入院したDCM患者において、入院時の血清テネイシンC値が、心不全増悪による再入院を予測できるかどうか検討する。

B. 研究方法

対象は三重大学附属病院に心不全の精査加療目的にて入院したDCM患者のうち、カテーテル検査を受け、書面によるインフォームドコンセントにて本研究に同意された連続60人であり、平均年齢は 58 ± 14 歳、男性が73%であった。右心カテーテル検査、冠動脈造影、左室造影、及び心筋生検後、2Frマイクロチップマノメーターと6Frコンダクタンスカテーテルを用いて左室機能と血行動態を評価し、血清テネイシンC値を測定した。退院後平均 39 ± 23 (4~82)月のフォローアップ期間の後に、ROC曲線を用いて心不全増悪による再入院に關してのカットオフ値を設定した。

C. 研究結果

検査時の平均左心駆出率は 0.31 ± 0.1 、平均BNPは 273 ± 304 pg/mlであった。ROC曲線を用いて、血清テネイシンCのカットオフ値を98ng/mlと設定した(感受性 88%、特異度 81%、AUC(曲線下面積) 0.81)。DCM患者を高テネイシンC群(126 ± 34 ng/ml, n=16)と低テネイシンC群(53 ± 22 ng/ml, n=44)の二群に分類した。高テネイシンC群の7例(44%)、低テネイシンC群の1例(2%)が心不全増悪により再入院した。右心カテーテルデータでは、収縮期肺動脈圧(42 vs. 29mm Hg, $P < 0.05$)、拡張期肺動脈圧(17 vs. 11mmHg, $P < 0.05$)、平均肺動脈圧(26 vs. 18mmHg, $P < 0.05$)、収縮期右室圧(41 vs. 29mmHg, $P < 0.05$)は高テネイシンC群が高値であったが、肺動脈楔入圧(16 vs. 10mmHg, $P = 0.06$)、右房圧(5 vs. 4mmHg, $P = \text{NS}$)には差を認めなかった。高テネイシンC群では、左室拡張末期容積(234 ± 79 vs. 186 ± 50 ml)と左室収縮末期容積(169 ± 70 vs. 130 ± 48 ml)が低テネイシンC群と比較して高値であった。しかしながら、一回拍出

量、左室駆出率や左室収縮末期エラストランスなど左室収縮能を反映する指標、左室弛緩の時定数や左室stiffnessや左室拡張末期圧のような左室拡張能を反映する指標、大動脈実効エラストランスや末梢血管抵抗のような後負荷を反映する指標には有意差を認めなかった。

D. 考察

今回、我々はDCMにおいて血清テネイシンの上昇と心機能及び血行動態と対比したところ、左室のリモデリングを反映していることが示唆された。血清テネイシン増加の機序に關しては、左室のリモデリングの進展に伴う因子だけではなく、肺うっ血による肺からの因子があげられ、今後の検討の余地が残る。しかし、血清テネイシンは心不全による再入院を血清BNPとは違う側面から予測でき、組み合わせあるいは区別化により、より精度の高い心不全の予後予測については、治療法の確立に寄与する可能性があると考えられる。

E. 結論

DCM患者において、血清テネイシンCは左室リモデリングの進展を反映し、心不全増悪による再入院を予測しうると考えられた。今後、テネイシンCは、新しい炎症・リモデリングのバイオマーカーとして、炎症性心筋症(急性・慢性心筋炎、心サルコイドーシス)の診断・炎症活性度の評価などに臨床応用が期待できる。

<研究許可者>

大西勝也

(三重大学大学院医学系研究科臨床検査医学)

今中一吉田恭子, 吉田利通

(三重大学大学院医学研究科修復病理学)

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

武田 信彬(東京慈恵会医科大学)

A. 研究目的

細胞外マトリックスの構成成分であるラミニンは、拡張型心筋症において心筋細胞や血管平滑筋細胞に病的増加し、組織の硬化を招くとされている。

我々はその病因の解明に、マウスとヒトのラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子を比較し、兩種に共通して存在し、プロモーターの転写を強く促進するDNA配列(bcn-1 element)を見出した(Suzuki H, J Biol Chem 271:18981-18988, 1996)。さらにbcn-1 elementに結合し、心筋の細胞に普遍的に発現する転写因子の存在を報告した(Suzuki H, Am J Physiol 275(44):F518-F526, 1998)。また、Yeastのone-hybrid systemを用いてライブラリーのスクリーニングを施行、bcn-1に結合する転写因子(Smarce-1rと命名)を同定しデータベースに登録した(Genebank Accession No. AF072836, Suzuki H. 1998)。

そこで本研究では、我々が同定したラミニンの転写を強く促進する転写因子Smarce-1rの機能を明らかにするとともに、心臓に発現する新規蛋白をひき続きクローニングし心筋症との因果関係を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

当初、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エレメントが、血管平滑筋細胞核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにてPMAやTGF- β などに誘導され、さらに、ラミニン γ 1鎖プロモーターの転写を強く促進することを報告した(Suzuki H, J Biol Chem, 1996)。そこで、そのbcn-1エレメントに結合する転写因子をクローニングするためにイーストのワンハイブリッドシステムを用いて心筋由来cDNAライブラリーのスクリーニングを施行し、Smarce-1rを同定した。さら