

200807007A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ
有効に導入するための統合的ゲノム薬理学研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩尾 洋

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ有効に導入 するための統合的ゲノム薬理学研究	-----	1
岩尾 洋		
II. 分担研究報告		
1. 心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理的検討 に関する研究	-----	15
岩尾 洋		
2. 臨床データと遺伝子データの照合・解析に関する研究	-----	21
岡本 洋		
3. 動物モデルの心機能の超音波学的および生物学的解析と ヒト臨床データに基づく心不全関連遺伝子の抽出 に関する研究	-----	26
葭山 稔		
4. 臨床情報の集積・臨床情報解析に関する研究	-----	33
寺崎文生		
5. ヒトゲノムを用いた統合的ゲノム薬理学的研究	-----	37
藤尾 慈		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	44

心不全に対し β 遮断薬療法を安全かつ有効に導入するための統合的ゲノム薬理学研究

総括研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：数々の大規模臨床試験の結果、 β 遮断薬は、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬と並んで心不全治療の第一選択薬の一つとなった。しかしながら、他の薬物治療の例にもれず、心不全に対する β 遮断薬療法においても反応不良例（ノンレスポンド）が20-30%存在する。 β 遮断薬は本来、陰性変力作用を有するため、こういった反応不良例への投与は心不全を悪化させる可能性があり、従って、投与前に β 遮断薬療法の反応性を予測するためのバイオマーカーを探索する必要がある。

本研究は、遺伝子多型をバイオマーカーに薬効を予測し、心不全における β 遮断薬療法を個別適正化することを目的とする。最終年度である本年度は、 β 遮断薬療法の薬理機序を解析するために重要なカニクイザル心不全モデルを完成し、心不全心筋におけるアドレナリンシグナルを解析した。また、臨床的検討から、ノルエピネフリントランスポーター(NET)T-182C、アドレナリン α 2C受容体(ADR α 2C) Del322-325、SOD2 Val16Ala、lymphotoxin (LT) α G-380T、トロンボスポンジン(TSP)1 Thr523Ala、オステオポンチン (OPN) G-156Delが β 遮断薬の反応性予測に有用な遺伝子多型であることを見出した。

A. 研究目的

ライフスタイルの変化と社会の高齢化の結果、心不全患者が増加している。心不全に対する薬物治療のトピックスのひとつは、ガイドラインにおいて、 β 遮断薬がアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬と並んで心不全の第一選択薬の一つとなったことにある。このことは、心不全治療の選択肢が増えたと言う意味では福音ではあるが、同時に、これら二剤を個々の症例に対して使い分けるための科学的根拠、具体的には、バイオマーカーの必要性を提起することと

なった。

すべての症例に対して有効な薬物治療は存在しないが、心不全に対する β 遮断薬療法も例外ではなく、約20-30%に反応不良例（ノンレスポンド）が存在する。 β 遮断薬療法では、特に β 遮断薬が陰性変力作用を有することから、ノンレスポンドへの投与は心不全を悪化させる可能性が高い。

このような背景から、ゲノム情報に基づいて β 遮断薬に対する反応性を予測する技術の確立を本研究の目的とした。最終年度である本年度の目標は以下の2点；

① カニクイザルエピネフリン心不全モデルの確立と解析。

② β 遮断薬の反応性を予測する遺伝子多型の抽出とその意義の解析。

B. 研究方法

① カニクイザルエピネフリン心不全モデルの確立と解析

カニクイザルにエピネフリンを2回静脈投与し、エピネフリン心筋症を作製した。このモデルに β 遮断薬を投与し、心不全心における β 遮断薬の作用を検討した。

- 心機能の評価には心臓超音波検査を行った。
- 心筋の傷害を組織染色により検討した。
- 心機能正常部位と機能低下部位より心筋組織を採取、RNA を精製し DNA アレイで発現遺伝子プロファイルを検討した。その結果を real time PCR で確認した。

② β 遮断薬の反応性を予測する遺伝子多型の抽出とその意義の解析

β 遮断薬治療をすでに受けている心不全患者 144 名に関し、 β 遮断薬投与前後の心エコー所見から、 β 遮断薬に対する反応性を検討し、患者をレスポナー、ノンレスポナーに分類した。

患者血液サンプルからゲノム DNA を抽出し 91 遺伝子 210 遺伝子多型について多型判定を行い、 β 遮断薬の反応性と関連する遺伝子多型を選出した。

選出した遺伝子多型のうち、遺伝子多型による機能変化が不明のものに関しては、その意義を以下の方法で検討した；

- 遺伝子多型がプロモーター領域にあり

ものに関しては、プロモーター・リポーター遺伝子アッセイを行った。

- 遺伝子多型が coding region のエクソンに存在するものに関しては、発現ベクターを作製し、RNA の安定性、蛋白の安定性、in vitro translation による翻訳効率の検討を行った。
- 心筋の炎症反応における意義を検討するため、ラット自己免疫性心筋炎モデルを作製した。

C. 研究結果

① カニクイザルエピネフリン心不全モデルの確立と解析

カニクイザルにエピネフリンを2回静脈注射することにより、心尖部に限局した心不全（たこつぼ型心不全）を発症させることを得た。このモデルによって以下のことが明らかになった；

- β 遮断薬は正常心筋と不全心筋では作用が異なる。
- エピネフリン心不全において、心機能低下部位と心機能正常部位で発現する遺伝子のプロファイルが異なる。

② β 遮断薬の反応性を予測する遺伝子多型の抽出とその意義の解析

β 遮断薬に対する反応性ととの相関が期待された遺伝子多型は次の通りであった；ノルエピネフリントランスポーター (NET) T-182C、アドレナリン α 2C 受容体 (ADRA2C) Del322-325、SOD2 Val16Ala、lymphotoxin (LT) α G-380T、トロンボスポンジン(TSP)1 Thr523Ala、オステオポンチン (OPN) G-156Del。

遺伝子多型情報を臨床現場で用いるため

の判定機器を作製するには、判定対象とする遺伝子多型を限定する必要がある。そこで、臨床統計学的有意性に加え、生物学的妥当性、多型の表現型に対する影響の明確さを考慮し、ADRa2C Del322-325、NET T-182C、TSP1 Thr523Ala、OPN G-156Delを反応性予測に特に有用な遺伝子多型と位置づけた。これら4遺伝子多型についての概要を、さらに詳細に行った研究結果を含めて以下に述べる。

ADRa2C Del322-325：交感神経シナプス終末よりノルエピネフリンに遊離を促進する遺伝子多型である。この多型を有する症例はレスポonder率が高くなるという結果を得た。この多型はノルエピネフリンの過負荷を惹起することから、 β 遮断薬の反応性を改善するという結果は生物学的に妥当である。

NET T-182C：NETはノルエピネフリンの再取り込みを担う遺伝子である。シナプス間隙のノルエピネフリン量を調節する。この多型の生物学的意義は不明であるため、この多型およびその周辺多型を含めハプロタイプ解析を行った。次に、各ハプロタイプについてプロモーター・リポーター遺伝子を作製し、プロモーター活性を検討したが有意な差は得られなかった。

TSP1 Thr523Ala：TSP1は、NOの機能を抑制することが知られている。Ala/Ala型を有する症例でレスポonderが多かった。これまで、この遺伝子多型の機能解析に関する報告はなかった。本研究では、Alaを有する遺伝子型は、mRNA、蛋白の安定性には影響を与えないが、mRNAからの翻訳が低下することが明らかになった。このことはAla/Ala型では、TSP1の発現が抑制され血

管機能が改善することが予想される。

OPN G-156Del:Del/Del型で β 遮断薬反応性が改善した。OPNは炎症を誘発することが知られている。本多型は転写因子の結合サイトに位置することから、Del/Del型では炎症反応が抑制される傾向にあると理解される。また、OPN Del/Del型の患者検体では、心筋の線維化が抑制されていることを確認した。自己免疫性心筋炎モデルを用いて炎症の抑制が心機能の改善につながることを示した。

これら遺伝子多型情報に基づいた個別化医療を実現するためには、遺伝子判定機器の作製が必要となる。技術的には、等温増幅法により多型を含む部位を増幅するためのプライマー設定が重要であり、上記の遺伝子多型に関して設定を行っている。

以上の研究に加えて、本研究期間中、大規模臨床試験J-CHFの遺伝子多型に関するサブスタディーに参加した症例123例について91遺伝子210遺伝子多型の判定を行った。

D. 考察

ADRa2C Del322-325、NET T-182C、TSP1 Thr523Ala、OPN G-156Delが、 β 遮断薬の有効性と相関を示し、 β 遮断薬の効果を予測する上で有用であることを示した。

心不全に対する β 遮断薬の作用機序は、現在のところ不明ではあるが、 β 遮断薬の有効性と相関を示す遺伝子多型が、ノルエピネフリンのturnoverに関連した遺伝子、炎症に関連した遺伝子、血管機能制御に関連した遺伝子など多岐にわたっている点は興味深い。このことは、 β 遮断薬が心機能

を回復させる過程においては、アドレナリン受容体動態の改善に加えて、炎症抑制および血管機能改善が重要なステップであることを示しているかもしれない。

本研究では、カニクイザルを用いたエピネフリン心不全モデルを作製した。このモデルでは、心尖部において心機能が低下するが、心基部では心機能が正常である。興味深いことに、上記の β 遮断薬に対する反応性予測に有用な遺伝子多型のうち、OPN、TSP は心機能低下部位においてのみ発現増強していた。カニクイザルエピネフリン心不全モデルは、 β 遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で極めて有益なツールとなるであろう。

本研究では、 β 遮断薬を徐々に増量し、副作用が認められない最大容量をもって、 β 遮断薬の反応性を判定した。このことは、 β 遮断薬療法における心機能の改善には、用量依存性が存在することを示した MUCHA 試験を根拠としている。投与量によって遺伝子多型間の貢献度に差があるかどうかは本研究結果からは不明である。この点に関しては、大規模臨床試験 J-CHF のサブスタディの結果が待たれる。

E. 結論

心不全に対する β 遮断薬療法の効果予測に有用な遺伝子多型として ADR α 2C Del322-325、NET T-182C、TSP1 Thr523Ala、OPN G-156Del を挙げた。これら遺伝子多型の判定機器作製のための基盤技術を確立しつつある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(岩尾洋)

1. Izumi Y, Okatani H, Shiota M, Nkao T, Ise R, Kito G, Miura K, Iwao H. Effects of Metoprolol on Epinephrine-Induced Takotsubo-Like Left Ventricular Dysfunction in Non-Human Primates.

Hypertens Res 2009 in press.

2. Toyo-oka K, Mori D, Yano Y, Shiota M, Iwao H, Goto H, Inagaki M, Hiraiwa N, Muramatsu M, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A, Hirotsune S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation.

J Cell Biol 2008;6:1133-1147.

3. Yoshikawa T, Akiyoshi Y, Susumu T, Tokado H, Fukuzaki K, Nagata R, Samukawa K, Iwao H, Kito G. Ginsenoside Rb1 reduces neurodegeneration in the peri-infarct area of a thromboembolic stroke model in non-human primates.

J Pharmacol Sci 2008;107:32-40.

4. Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y, Iwao H. Molecular network analysis in pleiotropic effects of statin.

J Pharmacol Sci 2008;107:15-19.

5. Tanaka F, Tominaga K, Shiota M, Ochi M, Kuwamura H, Tanigawa T, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Iwao H, Arakawa T. Interleukin-10 gene transfer to peritoneal mesothelial cells suppresses peritoneal dissemination of gastric cancer cells due to a persistently high concentration in the peritoneal cavity.

Cancer Gene Ther 2008;15:51-59.

6. Iwai T, Kitamoto K, Teramoto K, Machida Y, Tamada S, Yukimura T, Iwao H, Nakatani T, Miura K. Cobalt Protoporphyrin Attenuates Rat Obstructive Nephropathy: Role of Cellular Infiltration.

Urology 2008;72:432-438.

7. Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwai T, Iwao H, Okamura M, Miura K. Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis.

J Pharmacol Sci 2008;106:56-67.

(岡本洋)

1. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor $\alpha 1D$ are associated with the response to beta-blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008; 8: 78-84.

2. Xu Z, Okamoto H, Akino M, Onozuka H, Matsui Y, Tsutsui H. Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling and Diastolic Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice.

J Cardiovasc Pharmacol 2008; 51: 62-70.

3. Arimura T, Martijn Bos J., Sato A, Toru Kubo, Okamoto H, Doi Y, Michael J, Ackerman, Kimura A. Cardiac ankyrin repeat protein mutations in hypertrophic cardiomyopathy.

J Am Coll Cardiol 2009 In press.

4. 北畠 顕, 岡本 洋 V. うっ血性心不全: 新臨床内科学 コンパクト版 第3版 150頁-154頁 監修: 高久史麿, 尾

形悦郎 コンパクト版編集: 和田 攻, 橋本信也 編集: 大藤正雄, 沖田 極, 柏崎 禎夫, 春日雅人, 木村 健, 吉良枝郎, 黒川清, 西元寺克禮, 齋藤 厚, 篠原幸人, 貫和敏博, 細田 瑛一, 溝口秀昭, 矢崎義雄 医学書院, 東京, 2008

5. 北畠 顕, 岡本 洋 「うっ血性心不全」, 406頁-418頁 (高久文麿, 尾形 悦郎: 『新臨床内科学』第8版 (株) 医学書院, 東京), 2008

6. 岡本 洋 重症肺疾患を伴う虚血性心筋症に β -blocker を導入し得た一例: 西岡論文に対する Editorial Comment 心臓 40;9: 780, 2008

7. 抗結核薬とステロイドの併用が著効した結核性心膜炎の1症例

渡辺武史, 神垣光徳, 伊藤直史, 横田美紀, 渡辺安寿香, 池田大輔, 坂上慎二, 辻野一三, 徳原教, 岡本 洋, 筒井裕之, 西村正治

心臓 40巻 983-988, 2008

8. 岡本 洋 拡張型心筋症の生命予後 治療学 「suggestion」 121-126, 2008

9. 岡本 洋 日本人の高血圧治療に新たな可能性を拓く選択的アルドステロンブロッカー (SAB) Medical Tribune 1-3, 2008年 10月2日号

10. 岡本 洋 「BNPガイド下での循環器疾患の診断・治療」 1-6, 2008年

(葭山稔)

1. Ehara S, Naruko T, Shirai N, Itoh A, Hai E, Sugama Y, Ikura Y, Ohsawa M, Okuyama T, Shirai N, Yamashita H, Itabe H, Haze K, Yoshiyama M, Ueda M. Small coronary calcium deposits and elevated plasma levels of

oxidized low density lipoprotein are characteristic of acute myocardial infarction.

J Atheroscler Thromb 2008; 15: 75-81.

2. Hirata K, Pulerwitz T, Sciacca R, Otsuka R, Oe Y, Fujikura K, Oe H, Hozumi T, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Di Tullio M, Homma S. Clinical utility of new real time three-dimensional transthoracic echocardiography in assessment of mitral valve prolapse.

Echocardiography 2008; 25: 482-488.

3. Hyodo E, Hirata K, Hirose M, Kamimori K, Kawarabayashi T, Shimada K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Clinical use of Doppler echocardiography and Doppler tissue imaging in the estimation of myocardial ischemia during dobutamine stress echocardiography.

J Am Soc Echocardiogr 2008; 21: 331-336.

4. Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, Takai M, Muraoka S, Matsuda T, Ueki K, Yoshiyama M, Ikawa M, Okabe M, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy.

J Mol Cell Cardiol 2008; 44: 927-937.

5. Maeda K, Takagi M, Tatsumi H, Nakagawa E, Yoshiyama M. The effects of nifekalant hydrochloride on the QT dispersion after direct-current defibrillation.

Osaka City Med J 2008; 54: 11-19.

6. Matsumura Y, Saracino G, Sugioka K, Tran H, Greenberg NL, Wada N, Toyono M, Fukuda S, Hozumi T, Thomas JD, Yoshikawa J, Yoshiyama M, Shiota T. Determination of regurgitant orifice area with the use of a new three-dimensional flow convergence geometric assumption in functional mitral regurgitation.

J Am Soc Echocardiogr 2008; 21: 1251-1256.

7. Nakagawa E, Takagi M, Tatsumi H, Yoshiyama M. Successful radiofrequency catheter ablation for electrical storm of ventricular fibrillation in a patient with Brugada syndrome.

Circ J 2008; 72: 1025-1029.

8. Nakata S, Yokoi Y, Matsumoto R, Shirai N, Otsuka R, Sugioka K, Yoshitani H, Ehara S, Kataoka T, Yoshiyama M. Long-term cardiovascular outcomes following ischemic heart disease in patients with and without peripheral vascular disease.

Osaka City Med J 2008; 54: 21-30.

9. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor alpha1D are associated with the response to beta-blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008; 8: 78-84.

10. Oe H, Hozumi T, Murata E, Matsuura H, Negishi K, Matsumura Y, Iwata S, Ogawa K, Sugioka K, Takemoto Y, Shimada K, Yoshiyama M, Ishikura Y, Kiso Y, Yoshikawa J. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid supplementation increases coronary flow velocity reserve in Japanese elderly individuals.

Heart 2008; 94: 316-321.

11. Ogawa K, Hozumi T, Sugioka K, Iwata S, Otsuka R, Takagi Y, Yoshitani H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Automated assessment of left atrial function from time-left atrial volume curves using a novel speckle tracking imaging method.

J Am Soc Echocardiogr 2009; 22: 63-69.

12. Okura H, Kubo T, Asawa K, Toda I, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Yoshida K. Elevated E/E' predicts prognosis in congestive heart failure patients with preserved systolic function.

Circ J 2009; 73: 86-91.

13. Okura H, Takada Y, Kubo T, Asawa K, Taguchi H, Toda I, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Yoshida K. Functional mitral regurgitation predicts prognosis independent of left ventricular systolic and diastolic indices in patients with ischemic heart disease.

J Am Soc Echocardiogr 2008; 21: 355-360.

14. Okuyama T, Ehara S, Shirai N, Sugioka K, Ogawa K, Oe H, Kitamura H, Itoh T, Otani K, Matsuoka T, Inoue Y, Ueda M, Hozumi T, Yoshiyama M. Usefulness of three-dimensional automated quantification of left ventricular mass, volume, and function by 64-slice computed tomography.

J Cardiol 2008; 52: 276-284.

15. Okuyama T, Ehara S, Shirai N, Sugioka K, Yamashita H, Kataoka T, Naruko T, Itoh T, Otani K, Matsuoka T, Inoue Y, Ueda M, Yoshikawa J, Hozumi T, Yoshiyama M. Assessment of aortic atheromatous plaque and stiffness by 64-slice computed tomography is useful for identifying patients with coronary artery disease.

Circ J 2008; 72: 2021-2027.

16. Sugioka K, Hozumi T, Iwata S, Oe H, Okuyama T, Shirai N, Yamashita H, Ehara S, Kataoka T, Yoshikawa J, Ueda M, Yoshiyama M. Morphological but not functional changes of the carotid artery are associated with the

extent of coronary artery disease in patients with preserved left ventricular function.

Stroke 2008; 39: 1597-1599.

17. Takeshita H, Shimada Y, Kobayashi Y, Nishioka H, Ehara S, Kataoka T, Yoshiyama M. Impact of body mass index and Framingham risk score on coronary artery plaque.

Osaka City Med J 2008; 54: 31-39.

18. Wake R, Muro T, Hozumi T, Matsumoto R, Kataoka T, Nakamura Y, Takemoto Y, Takagi M, Suehiro S, Yoshiyama M. Multiple cardiac thrombi and thromboembolism in a heparin-induced thrombocytopenia antibody-positive patient with heart failure.

Am J Emerg Med 2008; 26: 1066 e1065-1067.

19. Yoshida K, Shimada K, Tanaka A, Jissho S, Tanaka H, Yoshiyama M, Yoshikawa J. Quantitative analysis of myocardial contrast enhancement by first-pass 64-multidetector computed tomography in patients with coronary heart disease.

Circ J 2009; 73: 116-124.

(寺崎文生)

1. Otsuka K, Terasaki F, Ikemoto M, Fujita S, Tsukada B, Katashima T, Kanzaki Y, Sohmiya K, Kono T, Toko H, Fujita M, Kitaura Y. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network.

Eur J Heart Fail 2009; 11: 229-237.

2. Miyamoto S, Ueda M, Ikemoto M, Naruko T, Itoh A, Tamaki S, Nohara R, Terasaki F, Sasayama S, Fujita M. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque

of unstable angina.

Heart 2008; 94: 1002-1007.

(藤尾慈)

1. Nonen S, Yamamoto I, Liu J, Maeda M, Motomura T, Igarashi T, Fujio Y, Azuma J. Adrenergic β 1 receptor polymorphism (Ser49Gly) is associated with obesity in typeII diabetic patients.

Biol Pharm Bull 2008; 35: 295-298.

2. Myrand SP, Sekiguchi K, Man X., Lin X, Tzeng R-Y, Teng C-H, Hee B, Kikkawa H, Lin C-Y, Eddy SM, Dostalík J, Mount J, Azuma J, Fujio Y, Jang I-J, Shin S-G, Bleavins MR, Williams JA, Paulauskis JD, Wilner K. Pharmacokinetics/ Genotype association for major cytochrome P450 enzymes in native, 1st, and 3rd generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations.

Clin Pharmacol Ther 2008; 84: 347-361.

3. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Hamaguchi T, Matsui Y, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor α_{1D} are associated with the response to β -blockers in dilated cardiomyopathy.

Pharmacogenomics J 2008; 8: 78-84.

4. Maeda M, Yamamoto I, Fukuda M, Motomura T, Nishida M, Nonen S, Fujio Y, Kasayama S, Azuma J. MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients.

J Diabetes Complications 2008; 22: 119-125.

5. Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, Takai M, Muraoka S, Matsuda T, Ueki K, Yoshiyama M, Ikawa M, Okabe M, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy.

J Mol Cell Cardiol 2008; 44: 927-937.

6. Yamamoto Y, Hoshino Y, Ito T, Nariai T, Mohri T, Obana M, Hayata N, Uozumi Y, Maeda M, Fujio Y, Azuma J. Atrogin-1 ubiquitin ligase is upregulated by doxorubicin via p38 MAP kinase in cardiac myocytes.

Cardiovasc Res 2008; 79: 89-96.

7. Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, Mohri T, Nonen S, Maeda M, Azuma J. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling.

Biochem Biophys Res Commun 2008; 370: 274-278.

8. Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-1-dependent myogenic differentiation via ERK1/2 signaling pathway.

J Biol Chem 2008; 283: 24234-24244.

8. Mohri M, Fujio Y, Iwakura T, Matsuda K, Maeda M, Azuma J. Signals through glycoprotein 130 regulate the endothelial differentiation of cardiac stem cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009 In press.

2. 学会発表

(岩尾洋)

1. 第 79 回日本薬理学会年会 2006 年 3 月 8 日～10 日 横浜

トロンボポエチンは転写因子を Foxo3a を不活性化することにより巨核球造血を促進する

中尾 隆文、三浦 克之、岩尾 洋、Kaushansky Kenneth

2. 第 109 回日本薬理学会近畿部会 2006 年 6 月 16 日 岡山

血管内皮細胞におけるスタチンの Akt 機能の与える影響

塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋

3. Effect of Statins on Activation of Akt in Vascular Endothelial Cells

The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension

October 15-19, Fukuoka

Shiota, M., Izumi, Y., Nakao, T. and Iwao, H.

4. 第 110 回日本薬理学会近畿部会 2006 年 11 月 10 日 京都

ブラバスタチンは PI3K/Akt/mTOR/p70S6 kinase 経路を介して血管内皮細胞の増殖を促進する

中尾 隆文、塩田 正之、泉 康雄、岩尾 洋

5. 第 16 回日本循環薬理学会 2006 年 12 月 1 日 東京

スタチンの多面的作用発現における PI3K/Akt 経路の関与

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

6. 第 80 回日本薬理学会年会シンポジウム 2007 年 3 月 14 日～16 日 名古屋

スタチンによる血管保護作用の分子ネット

ワーク解析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

7. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 2007 年 6 月 15 日 名古屋

ブラバスタチンはラット大動脈内皮細胞において FGF-2 の産生を増加させる

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋

8. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10 月 25-27 日 沖縄

心臓特異的な MAT1 遺伝子欠失マウスは劇的な心不全を引き起こす

泉 康雄、塩田 正之、三浦 克之、岩尾 洋

9. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10 月 25-27 日 沖縄

HSP70 はスタチンによる Akt の活性化を制御し、血管内皮細胞遊走および脈管形成に関与する

日下部 裕美、塩田 正之、疋田 優子、泉 康雄、岩尾 洋

10. 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10 月 25-27 日 沖縄

ブラバスタチン依存的 FGF-2 発現は血管新生作用に関与する

疋田 優子、塩田 正之、日下部 裕美、泉 康雄、岩尾 洋

11. 第 112 回日本薬理学会近畿部会 2007 年 11 月 16 日 大阪

スタチンの多面的作用発現の分子機序の解析

塩田 正之、日下部 裕美、疋田 優子、中尾 隆文、泉 康雄、岩尾 洋

12. 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2007 年 11 月 16-17 日 東京

Menage-a-trois 1 は心筋のミトコンドリア機能に不可欠である

泉 康雄、岩尾 洋

13. 第 17 回日本循環薬理学会 2007 年 11 月 30 日 大阪

Menage-a-trois 1 は心筋の代謝機能保持に不可欠である

泉 康雄、塩田 正之、中尾 隆文、岩尾 洋

14. 第 22 回国際高血圧会議 (ISH)

2008 年 6 月 14 日-19 日 ベルリン

HSP70 plays a critical role in angiogenesis

Iwao H, Kusakabe H, Shiota M, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y.

15. 第 113 回日本薬理学会近畿部会

2008 年 6 月 20 日 岡山

心臓における menage-a-trois 1 の役割

泉 康雄、塩田 正之、中尾 隆文、三浦 克之、Schneider MD、岩尾 洋

16. 第 31 回日本高血圧学会総会

2008 年 10 月 9-11 日 札幌

カニクイザルを用いたタコツボ心筋症モデル作成とメトプロロールの効果

泉 康雄、塩田 正之、中尾 隆文、岩尾 洋

17. 第 114 回日本薬理学会近畿部会

2008 年 11 月 14 日 神戸

プラバスタチンによる内皮細胞遊走とその機序の解析

塩田 正之、泉 康雄、川本 由貴子、中尾 隆文、岩尾 洋

18. 第 18 回日本循環薬理学会

2008 年 11 月 21 日 千葉

Hsc70 (Hsp ファミリー) の内皮機能における役割

塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾

洋

19. 第 38 回日本心脈管作動物質学会

2009 年 2 月 6 日 岡山

内皮機能における Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) の役割

塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、岩尾 洋

20. 第 82 回日本薬理学会年会シンポジウム

2009 年 3 月 16-18 日 横浜

サル心不全モデルにおける薬理ゲノミクス

泉 康雄、塩田 正之、岡谷 秀明、

伊勢 亮太、中尾 隆文、三浦 克之、岩尾 洋

21. 第 82 回日本薬理学会年会

2009 年 3 月 16-18 日 横浜

Hsc70 は血管内皮細胞における Akt シグナル制御に必須である

塩田 正之、泉 康雄、中尾 隆文、三浦 克之、岩尾 洋

22. 第 83 回日本循環器学会学術集会

2009 年 3 月 20-22 日 大阪

Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) is essential for Akt signaling in endothelial functions.

Izumi Y, Nakamura Y, Yoshiyama M, Iwao H.

(岡本洋)

1. Hiroshi Okamoto, Masatsugu Hori, J-CHF Investigators 「J-CHF T r i a l」

第 12 回日本心不全学会 2008 年 10 月 16 日、東京

2. Hiroshi Okamoto, Shinpei Nonen, Yasushi

Fujio, Yasuhiko Takemoto, Minoru Yoshiyama,

Junichi Teranishi, Tetsuo Betsuyaku, Minoru

Sato, Atsushi Tamada, Junichi Yoshikawa,

Akira Kitabatake and Junichi Azuma The

Association of Osteopontin with Cardiac Fibrosis and the Responsiveness to Beta-blockers in Patients with Heart Failure

第30回心筋生検研究会 11月29日, 2008, 三重

3. 東 純一、岡本洋、北島顕

我が国で実施された循環器用薬による大規模臨床試験成績の意義について

慢性心不全における β 遮断薬による治療法確立のための大規模臨床試験(J-CHF)

第29回 日本臨床薬理学会 2008年11月 東京

4. 心不全 β 遮断薬 β 遮断薬の本邦におけるRCT/JCHF研究とゲノム薬理学の可能性
東 純一、岡本 洋、南畝晋平、藤尾 慈、北島 顕

第2回「薬理学・臨床薬理学共催シンポジウム」 2008年11月 東京

5. 岡本 洋、松井 裕、南畝 晋平、藤尾 慈、東 純一、竹本 恭彦、葭山 稔、吉川純一、北島顕心不全における β 遮断薬反応性関連バイオマーカーとしてのオステオポンチン遺伝子多型性の意義 第10回日本オステオポンチン研究会、2008

6. 南畝晋平、岡本洋、藤尾慈、竹本恭彦、葭山稔、濱口智幸、吉川純一、北島顕、東純一 $\alpha 2C$ アドレナリン受容体 Del322-325、ノルエピネフリントランスポーター

T-182C 遺伝子多型と心不全治療における β 遮断薬反応性個人差との関連

第29回日本臨床薬理学会 2008年11月 東京

7. Combined genotype of norepinephrine transporter T-182C and $\alpha 2c$ adrenergic receptor deletion polymorphisms is associated with the response to beta-blockers in dilated

cardiomyopathy.

Shinpei Nonen, Hiroshi Okamoto, Yasushi Fujio, Yasuhiko Takemoto, Minoru Yoshiyama, Tomoyuki Hamaguchi, Fumio Terasaki, Junichi Yoshikawa, Akira Kitabatake and Junichi Azuma

第2回「薬理学・臨床薬理学共催シンポジウム」 2008年11月 東京

8. 心不全における β 遮断薬反応性関連バイオマーカーとしてのオステオポンチン遺伝子多型性の意義

岡本 洋、松井 裕、上出 利光、南畝 晋平、藤尾 慈、東 純一、竹本 恭彦、葭山 稔、吉川純一、北島顕

第8回オステオポンチン研究会、2008年9月27日札幌

9. 南畝晋平、岡本洋、藤尾慈、竹本恭彦、葭山稔、寺崎文生、吉川純一、北島顕、東純一ノルエピネフリントランスポーター T-182C と $\alpha 2C$ アドレナリン受容体 Del322-325 遺伝子多型の組み合わせが、心不全 β 遮断薬治療における心収縮機能改善と関連する 医薬薬学フォーラム 2008

10. 松本恭尚、南畝晋平、岡本洋、藤尾慈、竹本恭彦、葭山稔、寺崎文生、大塚薫、岩尾洋、東純一「Complement component 4 遺伝子コピー数多型と拡張型心筋症による心不全治療における β 遮断薬反応性個人差との関連」 29th日本臨床薬理学会、2008

11. 松本恭尚、南畝晋平、岡本洋、藤尾慈、竹本恭彦、葭山稔、寺崎文生、大塚薫、岩尾洋、東純一「Complement component 4 遺伝子コピー数多型と拡張型心筋症による心不全治療における β 遮断薬反応性個人差との関連」 第29回 日本臨床薬理学会 2008年11月 東京

12. 上野由香子, 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 寺崎文生, 大塚薫, 岩尾洋, 東純一 「心不全治療における β 遮断薬反応性の個人差とThrombospondin1遺伝子多型との関連」 第29回 日本臨床薬理学会 2008年11月 東京

13. The Association of Osteopontin with Cardiac Fibrosis and the Responsiveness to Beta-blockers in Patients with Heart Failure.
Hiroshi Okamoto, Shinpei Nonen, Yasushi Fujio, Yasuhiko Takemoto, Minoru Yoshiyama, Junichi Teranishi, Tetsuo Betsuyaku, Minoru Sato, Atsushi Tamada, Junichi Yoshikawa, Akira Kitabatake and Junichi Azuma
AHA Scientific Session 2008, 11/11, 2008, New Orleans

(葭山稔)

1. Kitabayashi C, Ehara S, Ikura Y, Nakagawa M, Arimoto J, Shirai N, Sugioka K, Hozumi T, Naruko T, Yoshiyama M, Ueda M. Plaque Instability of Human Carotid Atherosclerotic Lesions: Significance of Platelet Thrombus, Neutrophil Infiltration, and Early Neointimal Proliferation.
2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.
2. Maeda K, Takagi M, Tatsumi H, Ishii H, Shimeno K, Doi A, Yamashita H, Nakagawa E, Yoshiyama M. Risk Assessment by 12-lead Holter ECG and SAECG: Circadian Variation of 12-lead ECG and SAECG Parameters in Brugada Syndrome.
2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.
3. Doi A, Takagi M, Maeda K, Tatsumi H, Shimeno K, Yamashita H, Nakagawa E, Yoshiyama M. Comparison of Daily

Fluctuations in 12-lead and Signal-Averaged Electrocardiogram between Spontaneous and Drug Induced Type 1 ECG in Brugada Syndrome.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

4. Ehara S, Naruko T, Nakagawa M, Kitabayashi C, Shirai N, Sugioka K, Oe H, Okuyama T, Hozumi T, Haze K, Itabe H, Yoshiyama M, Ueda M. Myeloperoxidase are Associated with Low Density Lipoprotein Oxidation and Unstable Coronary Syndrome in Human.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

5. Izumi Y, Sano M, Yoshiyama M, Iwao H. Loss of Menage-a-Trois 1 in Cardiomyocytes Causes Mitochondrial Dysfunction.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

6. Ehara S, Kataoka T, Shirai N, Yamasita H, Takeshita H, Tsumori T, Okuyama T, Sugioka K, Nakata S, Hozumi T, Ueda M, Yoshiyama M. Obesity, Dyslipidemia and Constrictive Remodeling are Characteristic of Young Patients with Acute Myocardial Infarction.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

7. Yoshikawa J, Hyodo E, Hirata K, Kita R, Okajima K, Hirose M, Sakanoue Y, Nishida Y, Kawarabayashi T, Yoshiyama M. Efficacy of Multi-detector Computed Tomography in Combination with Coronary Flow Reserve Measurements by Transthoracic Doppler Echocardiography for Detecting Coronary Stenosis.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

8. Ogawa K, Hozumi T, Fukuda S, Oe H, Kohno Y, Sugioka K, Otsuka R, Yoshiyama M. Assessment of Left Ventricular Wall Motion in

Apical Cross-sections Using Velocity Vector Imaging: Which Is Better, Longitudinal or Radial Strain?

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

9. Oe H, Hozumi T, Fukuda S, Ogawa K, Matsui M, Abo K, Fujioka K, Sugioka K, Otsuka R, Yoshiyama M. Full-volume Data-set in Real-time 3D Echocardiography can Be Used for the Routine Echocardiography in Patients with Ischemic Heart Disease.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

10. Nakanishi K, Ehara S, Okuyama T, Shirai N, Yamashita H, Takagi Y, Kitamura H, Sugioka K, Oe H, Takagi M, Hozumi T, Yoshiyama M. Relationship between Left Ventricular Mass Assessed by 64-slice Computed Tomography and Left Ventricular Hypertrophy Detected by Electrocardiogram.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

11. Hozumi T, Fukuda S, Oe H, Sugioka K, Otsuka R, Ehara S, Ueda M, Yoshikawa J, Yoshiyama M. New Echocardiographic Approach Using Real-time Three Dimensional Echocardiography in the Clinical Practice.

2008 Japanese Circulation Society, Fukuoka.

12. 河野靖、竹本恭彦、松本亮、中村泰浩、杉岡憲一、大塚亮、麻植浩樹、室生卓、葭山稔、「心不全における β 受容体遮断薬反応性個体差の究明：良好反応性関連因子の検討」：

第56回日本心臓病学会、2008年、東京

13. Kouno Y, Takemoto Y, Matsumoto R, Nakamura Y, Muro T, Yoshiyama M. Predictors of early and late restoration of left ventricular function by beta-blocker therapy among patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.

第12回日本心不全学会、2008年、東京

(寺崎文生)

1. 大塚 薫 他. Anti-inflammatory effects of S100A8/A9 (MRP8/14) on experimental autoimmune myocarditis by modulating proinflammatory cytokine network, European Society of Cardiology Congress 2008, 2008年8月30日~9月3日, Munich, Germany.

2. 大塚 薫 他. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network. 第12回日本心不全学会学術集会、2008年10月16日~18日,東京.

(藤尾慈)

1. Yasushi Fujio "Cytokine" American Heart Association, Scientific Session 2008 (New Orleans) Nov.8-12, 2008

2. Nonen S, Okamoto H, Fujio Y, Takemoto Y, Yoshiyama M, Terasaki F, Yoshikawa J, Kitabatake A, Azuma J. "Combined Genotype of Norepinephrine Transporter T-182C and Alpha2c Adrenergic Receptor Deletion Polymorphisms is Associated with the Response to Beta-blockers in Dilated Cardiomyopathy" The 9th World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics (CPT2008), July 27-August 1, 2008 (Quebec, Canada)

3. 上野由香子, 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈, 竹本恭彦, 葭山稔, 寺崎文生, 大塚薫, 岩尾洋, 東純一: 心不全治療における β 遮断薬反応性の個人差とThrombospondin1遺伝子多型との関連: 第29回日本臨床薬理学会年会、2008年12月4日~6日(東京)

4. 松本恭尚, 南畝晋平, 岡本洋, 藤尾慈,
竹本恭彦, 葭山稔, 寺崎文生, 大塚薫, 岩
尾洋, 東純一 : Complement component 4 遺
伝子コピー数多型と拡張型心筋症による心
不全治療における β 遮断薬反応性個人差と
の関連: 第 29 回日本臨床薬理学会年会,
2008 年 12 月 4 日~6 日 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・出願
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

心不全関連遺伝子の分子生物学的解析と薬理学的検討

分担研究者 岩尾 洋 大阪市立大学大学院教授 医学研究科

研究要旨：たこつぼ型心筋症は心筋梗塞症と類似した病態を呈するが、冠動脈には有意狭窄を認めず、冠動脈の支配領域とは一致しない左室壁運動低下を来す。急性心不全で亡くなる患者がいる。一方で、慢性期には心機能が次第に改善する。カテコラミンの関与が示唆されているが、まだ発症機序は解明されていない。我々は正常のカニクイザルにエピネフリンを2回静脈内投与し、左室基部の壁運動に比べて心尖部での著明な壁運動異常が認められる“たこつぼ型”心筋症の病態モデルを初めて作成した。心機能評価（左室容量および駆出率）では、急性期の死亡例が認められるが、慢性期には次第に心機能が改善してくる、きわめてヒトによく似たモデルであることがわかった。この心筋症モデルに β 受容体遮断薬のメトプロロール（0.3mg/kg/10min）を投与すると、翌日の左室駆出率は30%から40%へ有意に改善した。そこで、基部心臓（正常壁運動）と心尖部心臓（壁運動の著明な低下）それぞれのmRNAを抽出し、遺伝子発現レベルを評価した。また、心筋障害を免疫組織染色法にて評価した。心不全関連遺伝子、カルシウムチャンネル関連遺伝子、レニン・アンジオテンシン関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子などは、心機能低下を伴う心尖部でのみ、それらの遺伝子発現が大きく変化しており、メトプロロールによって一部の遺伝子発現は改善した。また、心尖部に心筋障害がみられたが、 β 受容体の投与により改善した。ヒトの病態に極めて類似したモデルの一つとして、新たな治療応用へつながらせる可能性がある。

A. 研究目的

現在、わが国の死因の第2位が心疾患であり、高齢化と生活習慣の欧米化により心疾患の最終段階である心不全はますます増加すると推測されている。心疾患に対する治療薬としては様々な薬剤が存在するが、種々の心疾患の終末像である慢性心不全の治療において、 β 受容体遮断薬は不可欠な薬剤である。事実、近年数多くの大規模臨

床試験の結果から、 β 受容体遮断薬が慢性心不全の死亡率を改善させることが報告されている。しかしながら、 β 受容体遮断薬がなぜ有効なのかを説明する作用機序に関しては未だに不明の点が多く存在する。特に、 β 受容体遮断薬の心筋に対する陰性変力作用により約30%のノンレスポnder患者においては、心不全を悪化させるという欠点をもつことも知られている。一方では、

大多数の心不全患者の心臓の駆出率 (ejection fraction) を増加し、心機能を改善することが報告されている。

本研究は、 β 受容体遮断薬の薬物反応性がヒトと類似するサル心不全モデルを用いて、心機能評価とともに β 受容体遮断薬の作用機序を遺伝子発現様式や免疫組織化学による解析を行うことにより明らかにする試みである。

β 受容体遮断薬の薬物反応性が良い拡張型心不全モデルの一つであるカテコラミン心筋症による心不全を作成する。心不全時の遺伝子発現解析、免疫組織化学による解析を行い、 β 受容体遮断薬メトプロロール投与による駆出率改善時の遺伝子発現解析、免疫組織化学による解析を比較検討することにより、① β 受容体サブタイプの変化や norepinephrine transporter などのアドレナリン関連遺伝子の関与、② リアノジン受容体、Sarcoendoplasmic reticulum ATPase (SERCA)、adenyl cyclase、phosphodiesterase など細胞内カルシウム調節関連遺伝子の関与、③ angiotensinogen や angiotensin II receptor など レニン・アンジオテンシン系関連遺伝子の関与、④ superoxide dismutase 2 や cytochrome c、proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) など、酸化ストレスや代謝関連遺伝子の関与、⑤ brain natriuretic peptide (BNP) や osteopontin など心不全関連遺伝子の関与などについて調べる。この研究により心不全での β 受容体遮断薬の作用を包括的に解析することで作用機序を解析し、治療関連候補遺伝子を探索することが出来る。

B. 研究方法

エピネフリン心不全モデルの作成

エピネフリンの反復投与により、たこつぼ型心不全モデルを作成する。左心室の機能測定には、RT3D 心エコーで左心室の容積変化を求める。また、左心室の拡張末期容積、収縮末期容積、1 回拍出量および駆出率を求め、さらに心拍出量を算出する。

β 受容体遮断薬のメトプロロール (0.3mg/kg) を 0.1ml/kg/min で静脈内に 20 分間投与する。投与後 30 分後、2 時間後、24 時間後に RT3D 心エコーにより心機能の測定後に心臓を摘出する。心臓は左右の心房、右心室、心室中隔、左心室自由壁に分ける。心不全時には心尖部の壁運動が他の部位に比べて著しく動きが弱いことから、心室中隔と左心室自由壁は心尖部、中間部、基部の 3 部位に分る。それぞれの部位間で遺伝子発現解析と受容体の解析と組織学的解析を行い、比較検討を行う。

<解析項目>

①心エコー図

エピネフリン投与前 (Day 0)、メトプロロール投与直後 (Day 1 および 2)、および投与 24 時間後 (day 3)、さらに 1 ヶ月まで経時的に測定する。

②血液生化学的検査項目

心エコーの測定直前に 10ml の静脈血を採血し、正常時、エピネフリン投与後、メトプロロール投与後に採血し、カテコラミン、心房性利尿ペプチド ANP、脳性利尿ペプチド BNP を測定する。更に、心臓からの逸脱酵素の血中レベルを測定する。

③網羅的遺伝子発現解析

cDNA マイクロアレイ解析用に心臓を摘出後、速やかに各部位の組織を液体窒素で

瞬間凍結する。TRIzol および QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出後アフィメトリックス社製の Rhesus Macaque Genome Array を使用して遺伝子発現を網羅的に解析する。心不全時には脳性利尿ペプチド (BNP) 発現が増加することがすでに知られている。そこで、脳性利尿ペプチドの遺伝子発現量の増加度を基準にして他の収縮関連遺伝子、カルシウムチャンネル蛋白遺伝子の発現量を測定する。細胞内カルシウム調節に関与する蛋白質は、細胞外膜の L 型電位依存性カルシウムチャンネル、筋小胞体のリアノジン受容体 (RYR2)、sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2) などの遺伝子発現を検討する。また、レニン・アンジオテンシン系の関与を調べるため、angiotensinogen (AGT) や angiotensin II receptor (AGTR1 および AGTR2) などの遺伝子発現を検討する。心臓の代謝機能に関与する superoxide dismutase 2 や cytochrome c (CYCS)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) などの遺伝子発現について検討する。上述の遺伝子については定量リアルタイム PCR 法により、各個体における発現を調べる。

④組織化学的解析

組織学的解析を行う目的で 4%パラホルムアルデヒド固定、カルノア固定、凍結切片用ブロックを準備する。4%パラホルムアルデヒド固定後にパラフィン包埋したサンプルはヘマトキシエオジン染色とアザン染色を行う。カルノア固定によるものと凍結切片により免疫組織学的検討を行う。luxol fast blue 染色により正常心筋は桃色に染まり、心不全による障害心筋は青染する

ことが知られている。

C. 研究結果

心エコー図

正常状態のカニクイザルにエピネフリンの反復投与 (Day 1 および Day 2) することにより (E 群)、2 回目投与 24 時間後 (Day 3) の心エコーでは“たこつぼ型”の心尖部領域の壁運動低下を呈し、左室駆出率は約 30% にまで低下した。この“たこつぼ型”心不全モデルに対して Day 3 にメトプロロール (0.3mg/kg/10min 静脈内) を投与 (M 群) することで駆出率は有意に改善した。1 カ月の経過観察において、非投薬群も徐々に心機能が回復するが、メトプロロール投与群では、心機能の改善が早かった。

血液生化学的検査項目

エピネフリン投与群 (E 群) ではコントロール群 (C 群) 心筋逸脱酵素 (AST, CPK など) の上昇が見られたが、Day 3 ないし Day 4 において、メトプロロール (M 群) によりこれらの逸脱酵素は改善しなかった。

網羅的遺伝子発現解析

マイクロアレイ法 (各群 n=3 を一纏め) の結果、コントロール群心尖部に比べてエピネフリン投与群心尖部における遺伝子発現が 2 倍以上のものは約 2500 遺伝子、0.5 倍以下のものは約 600 遺伝子であった。その中で、基部で同様に変動している遺伝子を除くと、それぞれ約 2000 遺伝子、約 550 遺伝子となった。基部に比べて心尖部では、エピネフリン投与による発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。

定量リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

C群に比べてE群では、BNPは心尖部・基部ともに発現亢進が見られたが、心尖部の方がより強かった。心不全時の発現亢進が知られているCTGFやオステオポンチン(OPN)は、心尖部においてのみE群での発現亢進を認めた。M群ではOPNの発現亢進がE群に比べて有意に抑制していた。

細胞内カルシウム調節に関与するRYSR2やSERCA2発現はE群心尖部で有意に減少しており、M群では改善傾向を認めた。E群基部でのSERCA2発現は心尖部と反対に増加しており、M群ではその増加が抑制された。

レニン・アンジオテンシン系関連遺伝子のAGT、AGTR2はE群心尖部で発現亢進し、AGTR1発現は減弱していた。一方、基部においてはC群と比してE群で有意な変化は認めなかった。

代謝関連遺伝子のPGC-1やアポトーシスに関連するCYCS発現はE群心尖部で有意に抑制され、M群では改善傾向を示した。

組織化学的解析

Luxol fast blue染色により、E群心尖部では、障害心筋を示唆する青染する箇所がまばらに見られた。M群心尖部ではE群で認めた青染は殆ど見られなかった。また、基部ではE群を含め、全く青染されなかった。



「左から、C群心尖部、E群心尖部、M群心尖部(矢印が青染部)」

D. 考察

心不全モデルとしてのサル病態はエピネフリンを反復投与することにより確立できたと考える。今回作成したカニクイザル心不全モデルは、心不全に対する β 遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールの一つとなると考えられる。壁運動低下を認めた心尖部心臓と正常壁運動の基部心臓の遺伝子発現変化は、全く異なっており、非常に興味深いものであった。

E. 結論

我々はカニクイザルを用いて、ヒトたこつぼ型心筋症に極めて類似したモデルの作成に成功した。このモデルに対して、 β 遮断薬は心機能を改善させた。また、様々な遺伝子発現を部位別に評価することにより、心機能と併せた評価ができた。このモデルを解析することで、ヒトたこつぼ型心筋症の機序解明および治療応用への可能性が示唆される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi Y, Okatani H, Shiota M, Nkao T, Ise R, Kito G, Miura K, Iwao H. Effects of Metoprolol on Epinephrine-Induced Takotsubo-Like Left Ventricular Dysfunction in Non-Human Primates.

Hypertens Res 2009 in press.

2. Toyo-oka K, Mori D, Yano Y, Shiota M, Iwao H, Goto H, Inagaki M, Hiraiwa N, Muramatsu M, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A, Hirotsune S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1