

<リポソーム化アデノシンの血行動態への影響>

そこで、旧第一製薬との共同研究にて、リポソーム化アデノシンの開発をおこなった。水和方法を用いて、アデノシンのリポソーム化に成功した（平均サイズ： 126 ± 12 nm、と電位： -2.3 ± 0.4 mV）。最初に、R I 標識したアデノシンを用いて、フリーアデノシンならびにリポソーム化アデノシンの血中滞留時間を比較検討した。フリーのアデノシンを静脈内投与したラットでは、投与 10 分後の血中アデノシン量は投与量の 1% 以下になっていた。一方、リポソーム化アデノシン投与ラットでは、投与後 10 分においては投与量の 11%、投与 30 分後においても 3.5% のアデノシンが存在していた。以上より、リポソーム化により、アデノシンは長時間（数時間）血中内に滞留しうることが明らかになった。通常、アデノシンは血管内皮細胞や血球成分に存在するアデノシンデアミナーゼにより分解されるため、血中での半減期は数秒であるが、リポソーム化によりアデノシンの分解が抑制するため、その血中滞留時間が増加したものと考えられる。

次に、フリーアデノシンならびにリポソーム化アデノシンの全身静脈内投与を行い、全身血圧ならびに脈拍数への影響を検討した。フリーアデノシンは用量依存的に全身血圧を低下させた（225 ならびに $450 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の 10 分間静脈内投与にて、全身平均血圧はそれぞれ 4.8% ならびに 25.4% 低下した）。一方、リポソーム化アデノシンは $450 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の投与量においても全身血圧の低下をきたさなかった。脈拍数に対しても同様の効果が認められた。すなわち、フリーアデノシンによる脈拍数減少作用は用量依存性に認められたが、リポソーム化アデノシンでは上記投与量では脈拍数を低下させなかった。これらのことから、リポソーム化により、アデノシンによる血圧低下作用ならびに脈拍数減少作用は著明に軽減されることが明らかになった。次に、血行動態を変化させない最大用量のリポソーム化アデノシンによる心筋梗塞サイズ縮小効果を検討した。

<リポソーム化アデノシンの心筋梗塞サイズ軽減効果>

蛍光色素標識アデノシン投与実験と同様に、ラット心筋梗塞は左冠動脈を 30 分間閉塞後、再灌流することにより作成した。再灌流開始 5 分前から開始後 5 分までの計 10 分間、大腿静脈よりフリーアデノシン ($450 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) またはリポソーム化アデノシン ($450 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) を投与し、3 時間後に TTC 染色を用いて心筋梗塞サイズを評価した。興味深いことに、リポソーム化アデノシン投与群では、生理食塩水またはアデノシン単独投与群と比較して、心筋梗塞サイズが有意に縮小された。このリポソーム化アデノシンによる心筋梗塞サイズ抑制効果は非特異的アデノシン受容体拮抗薬 (8-(p-sulfophenyl) theophylline) により抑制された。これらのことから、心筋梗塞部位に集積する

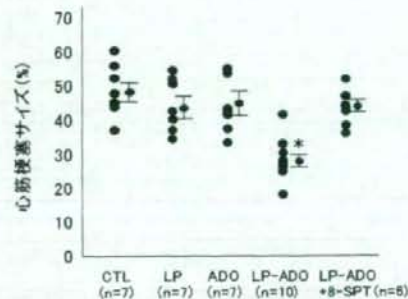


図3. リポソーム化アデノシンは心筋梗塞サイズ縮小効果を増強する(ラット)

リポソーム化アデノシンから漏出するアデノシンがアデノシン受容体を介して心筋保護効果を呈することが明らかになった(図3)。また、同様の検討を大型動物であるイヌを用いて行なった。心筋梗塞サイズは90分間虚血・6時間再灌流モデルにて検討した。リポソーム化アデノシン(450 μ g/kg/minの10分間静脈内投与)により、全身血圧・脈拍数に変化なく、心筋梗塞サイズが著明に抑制された(心筋梗塞領域/心筋危険領域:生理食塩水投与群41%、リポソーム化アデノシン投与群22%)。また、ラットでは見いだされなかった再灌流中の致死的な不整脈である心室細動発生率も著明に抑制することが明らかになった(心室細動発生率:生理食塩水投与群60%、リポソーム化アデノシン投与群17%)。以上より、アデノシンをリポソーム化することにより、アデノシンの副作用(血圧低下・徐脈作用)は軽減すると同時に、心筋梗塞サイズを縮小することが明らかになり、リポソーム化アデノシンは心筋梗塞治療薬として理想的な作用を有していることが明らかになった。心筋梗塞部位ではリポソームの集積により高濃度のアデノシンが存在するため心筋保護作用が生じる一方、末梢血中ではリポソーム化アデノシンの血中濃度は血行動態に変化させるほどに高くないと考えられる(図4)。

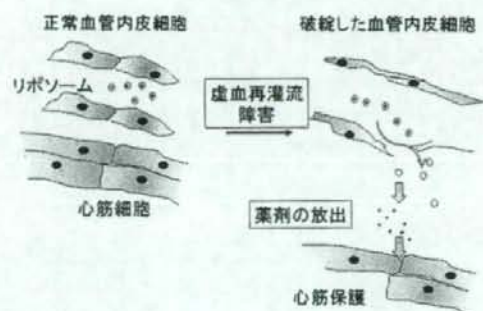


図4. 心筋虚血再灌流領域はリポソームの標的である

<今後の課題>

これまでの実験結果を踏まえ、リポソーム化アデノシンの心筋梗塞治療薬としての臨床応用をめざす。現在、提携企業にて feasibility 試験実施を予定している。同時に、抗不整脈薬、実験的に心臓保護作用が確認された薬剤、siRNAなどをリポソーム化することにより新たな心筋梗塞治療薬の開発をめざす。また、大阪大学微生物研究所との共同研究にて、心不全を標的としたDDSの開発を進めていく予定である。心筋虚血領域へのリポソーム集積は passive targeting にても十分に認められるが、active targeting の必要性や他の送達手段の有効性については今後の検討課題である。

引用文献

1. Derek M. Yellon, et al. N Engl J Med 2007; 357: 1121-35
2. Forman MB, et al. Cardiovasc Drug Rev 2006; 24:116-147.
3. Hill RJ, et al. J Mol Cell Cardiol 1998; 30: 579-85.
4. Ross AM, et al. J Am Coll Cardiol. 2005; 45: 1775-1780.
5. Horwitz LD, et al. Circulation 1994; 90: 2439-47.

6. Dauber IM, et al. *Circ Res* 1990; 66: 986-98.

日本臨床 65 卷 増刊号 5 (2007 年 5 月 28 日発行) 別刷

心不全 下

—最新の基礎・臨床研究の進歩—

XXVI. 特 論

HB-EGF は慢性心不全の新しい
ターゲット治療になるか

高島成二 堀 正二

HB-EGFは慢性心不全の新しいターゲット治療になるか

HB-EGF therapy to chronic heart failure

高島成二¹ 堀 正二²

Key words : growth factor, heart failure, GPCR, metalloprotease, transactivation

はじめに

心筋細胞は生直後にその分裂を停止し、一生涯ほとんど複製することがない臓器である。放射線同位元素を使用した実験においても心臓および脳細胞においては生直後のC14含有量をもつDNAが検出されており、この事実は証明されている。分裂しないという特性は高次の構造体として機能する心臓にとって必要と思われ、脳においても同様の理由で、分裂することの不利を回避していると考ええると興味深い。細胞はまたその機能維持のために様々な外部刺激を必要とする。分裂しない細胞でさえも、分裂細胞に必要とされるような、増殖シグナルがその機能維持に必要とされている。この概念は神経細胞では生存因子と呼ばれているがNGFなどの刺激で動くシグナルは増殖シグナルそのものであり、染色体がS期に入らないことを除けばほぼ共通のシグナル経路の存在を示唆する。

1980年代にSimpsonらは、カテコールアミン刺激により、心筋細胞での癌遺伝子c-fos, c-mycの発現上昇を見だし、非分裂細胞においても増殖シグナルが動くことを端的に証明した。

心筋細胞において、MAPK familyをはじめとする本来DNA複製に働くはずのシグナルが心筋でも日常的に活性化されていることはその後多くの報告がなされ、現在は心筋の生存に必須

のシグナルであることが明らかになりつつある。

本稿においては、この心筋細胞における恒常的増殖刺激に、一つのEGFファミリー分子であるHB-EGF (heparin binding EGF like growth factor)が重要な働きをしていることを示し、HB-EGFを心筋細胞生存因子として位置づけ、心筋不全治療への応用を検討する。

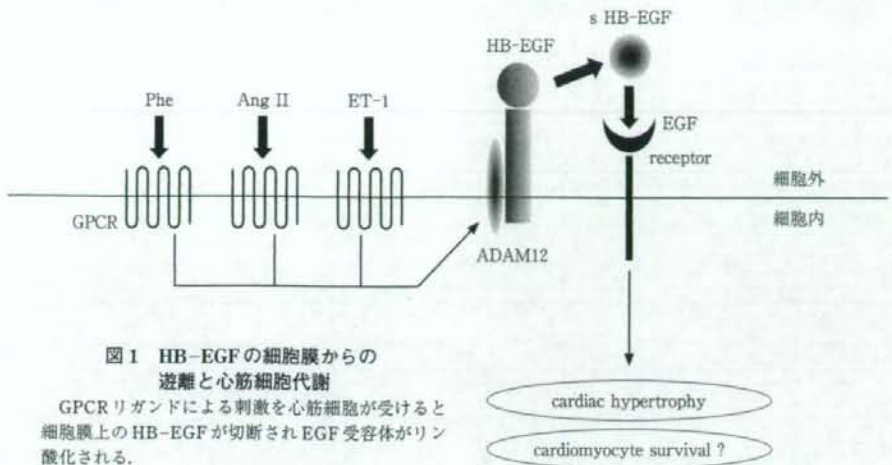
1. 心筋細胞におけるHB-EGFの役割

心筋細胞と同様に分裂増殖しない細胞である神経細胞は、ニューロトロフィンと呼ばれる一連の増殖因子をその生存に必須としている。心筋細胞も増殖はしないがその生存因子に増殖因子のシグナルを必要とする。

1980年代ごろより、カテコールアミンなどのG共役型受容体(GPCR)を介するシグナルがRasの活性化やc-fosの発現を来すことが明らかにされた。これらのシグナルは本来増殖因子が担うシグナルであるが、心筋細胞においても蛋白合成の亢進や、心筋の肥大がこれらのシグナルを介して起こることが知られている。

最近になり心筋細胞においてカテコールアミンやアンジオテンシンなどのGPCRを介するシグナルが一部、HB-EGFを介して起こることが明らかにされた¹⁾。すなわち、GPCRのリガンドにより心筋細胞を刺激すると細胞膜のメタロプロテアーゼが活性化され、活性化されたメタ

¹Seiji Takashima: Osaka University Health Care Center 大阪大学・保健センター ²Masatsugu Hori: Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学



ロプロテアーゼにより細胞膜に結合していたHB-EGFが遊離型となる。いったん細胞外に放出されたHB-EGFは細胞外からEGF受容体を活性化しRas、c-fosなどの増殖関連シグナルを動かすというモデルである(図1)。このモデルは心筋細胞に限られた現象ではなく、他の臓器でも同様のシグナルモデルがあることが明らかになっている。過去に、GPCRを介する直接の作用と思われた増殖シグナルが実は細胞膜から遊離したEGF受容体リガンドを介することが多くの例で示されている。このモデルはいったん細胞内に入ったシグナルがもう一度外に出るという珍しいインサイド・アウトシグナルのモデルである。GPCR刺激によりEGF受容体がリン酸化されることは以前から知られていたが、当初、細胞内からEGF受容体がリン酸化されると考えられていた。しかし、複雑な受容体の構造変化を伴うEGF受容体のリン酸化がリガンドの結合なしに起こるよりもむしろいったんリガンドを介する細胞外シグナルにゆだねる方が実は合目的である。

また外部シグナルのリガンドとして心臓以外の他の臓器ではTGF- α やamphiregulinなど他のEGFリガンドを使用している場合もある。心筋細胞においてはGPCRを介するEGF受容体のリン酸化反応はHB-EGFの中和抗体によ

りほぼ100%抑制されるため、HB-EGFが心筋では特異的にこれらのシグナルにおいて重要な役割を果たすEGF受容体リガンドであることが示唆された(図2)。

更に著者らはHB-EGFが細胞膜から切断されないマウスを作製し心臓におけるHB-EGFの役割を検討した。このマウスは野生型マウスに比し、生後しばらくしてから進行性の心不全を発症し、早期に心不全死を来した。組織像は心筋変性・脱落と線維芽細胞による置き換えがみられ、ヒト拡張型心筋症と極めて類似した表現型を示した(図3)²¹。このことは心筋の生存維持にHB-EGFの細胞膜からの遊離という現象が重要であり、その阻害は心筋細胞の機能不全につながることを示唆する。また驚いたことに全身でHB-EGFが切断されないマウスを作製したにもかかわらず、その表現型は心臓だけに現れた。更にHB-EGFの遺伝子欠損マウスも同様に心臓特異的に障害がみられた²²。以上のことからHB-EGFは心筋細胞の代謝に必須の分子であり様々な刺激により細胞膜から遊離されEGF受容体を活性化させることにより心筋の生存にとって重要なシグナルを担うことが示唆された。

更に、HB-EGFの心臓に対する特異的作用は、そのシグナルに關与する因子の欠損および



図2 GPCRリガンドによるHB-EGFを介したEGF受容体のリン酸化(文献⁹より引用)

ラット心筋細胞に各種GPCRリガンドを加えるとEGF受容体がリン酸化され、メタプロロテアーゼ阻害剤であるKBR-7785およびHB-EGFの中和抗体で抑制される。

不全により拡張型心筋症様の症状を呈する可能性があることを示唆する。実際に家族性拡張型心筋症患者の家系からは、HB-EGFの細胞膜からの遊離を来す酵素であるADMA12の遺伝子変異が見つかっている。これらの事実はこの家族症例に限らず他の拡張型心筋症患者においても、GPCRからHB-EGFの細胞膜からの遊離、EGF受容体刺激という一連のシグナル異常が原因となっている可能性が示唆される。そうであるならば外部から投与したHB-EGFがこれらの疾患において心筋保護的に働き心不全の治療として応用できる可能性がある。

2. HB-EGFの心筋保護効果(図4)

それでは実際にHB-EGFを投与することが心筋細胞保護的に働くかどうかを検討した。ラット培養心筋細胞を用いた実験においては心筋障害性のある抗がん剤であるドキソルビシンやH₂O₂付加による心筋細胞死をHB-EGFは有意に抑制した。更にHB-EGFのKOマウスはドキソルビシン心筋障害に対して野生型に比し脆弱であり、逆にHB-EGFを心筋において過剰発

現させたマウスは心筋障害に対して抵抗性であった。現在様々な心筋障害モデルにおいてHB-EGFの保護効果を検討中である。

3. ヒト心臓でのHB-EGFシグナルの重要性

臨床的にこのHB-EGFを介するシグナルの心筋における重要性を示唆する証拠がある。近年乳癌治療薬として使用されている増殖因子受容体ErbB2の中和抗体製剤ハーセプチンが心筋障害を起こすという報告である⁹。ハーセプチンは特にドキソルビシンなどの心筋障害性の抗がん剤と併用すると約20%の患者で心筋障害の増悪がみられたとされている。ドキソルビシンによる心筋障害の原因は酸素ラジカルと考えられているがその障害メカニズムははまだ不明である。

ErbB2の中和抗体による心筋障害はドキソルビシンによる心筋細胞障害の回復に必要なHB-EGFのシグナルを抑制することにより生じた可能性がある。もしそれが事実ならばHB-EGFは外部からの投与により、心筋障害部位で

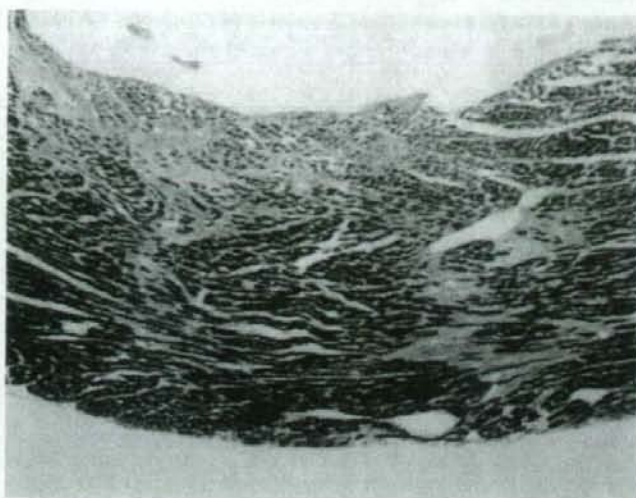


図3 HB-EGFが細胞膜から遊離されないマウスは拡張型心筋症様の表現型を示す(文献²より引用)

HB-EGF uncleavable mutantは心筋細胞の変性脱落、線維芽細胞による脱落を示す。

保護的に作用する可能性が示唆される。増殖因子治療はがんとの関連が示唆されるため安易な投与はできないが、成長因子やIGFが心筋保護的に働くことも報告されており、今後心筋保護作用を有する増殖因子の一つとしてHB-EGFの治療への応用が期待される。

HB-EGFは現愛媛大学の東山により同定され、その生理作用、遺伝子改変マウスの作製を含め、重要な生化学的データはほとんど我が国で得られている。HB-EGFの心筋障害に対する応用は現在海外でほとんど検討されていない。著者らは現在これらのノックアウトマウスの救済実験を含め心筋代謝におけるHB-EGFを含めたEGF受容体シグナルの生化学的解析を進めるとともに心不全の増殖因子療法の可能性を検討していく予定である。

おわりに

それでは実際に、HB-EGFなどを介するシグナルはいかに心筋を保護するのか、生存因子という概念は非常にあやふやであり、先に述べ

た H_2O_2 などの刺激による心筋障害は具体的にはどのような結果をもたらし、HB-EGFはなにを保護したのか。

答えは得られていないが、最近心筋において、老化や H_2O_2 などの刺激によりゲノムの突然変異や組換え障害が引き起こされることが示されている⁹。この報告では、心筋細胞はゲノム障害の結果としてmRNAの発現の個々の細胞でのばらつきが起こることを示した。老化現象のみならず、病態においてもこれらのゲノムあるいはエピジェネティックな遺伝子構造の変化が心筋の代謝不全にかかわる可能性が示唆される。

著者らも右室特異的に心筋代謝不全を来すモデルマウスにおいて、*lamr1-tp*という変異遺伝子がHP1というヘテロクロマチン構造蛋白と結合することにより、エピジェネティックな遺伝子構造障害を引き起こし、心筋細胞死が起こることを明らかにした⁹。これらの所見は、短期間の障害においても長期間の障害においてもゲノム構造自体の変化が心筋細胞の代謝自体に重要な働きをすることを強く示唆している。心筋

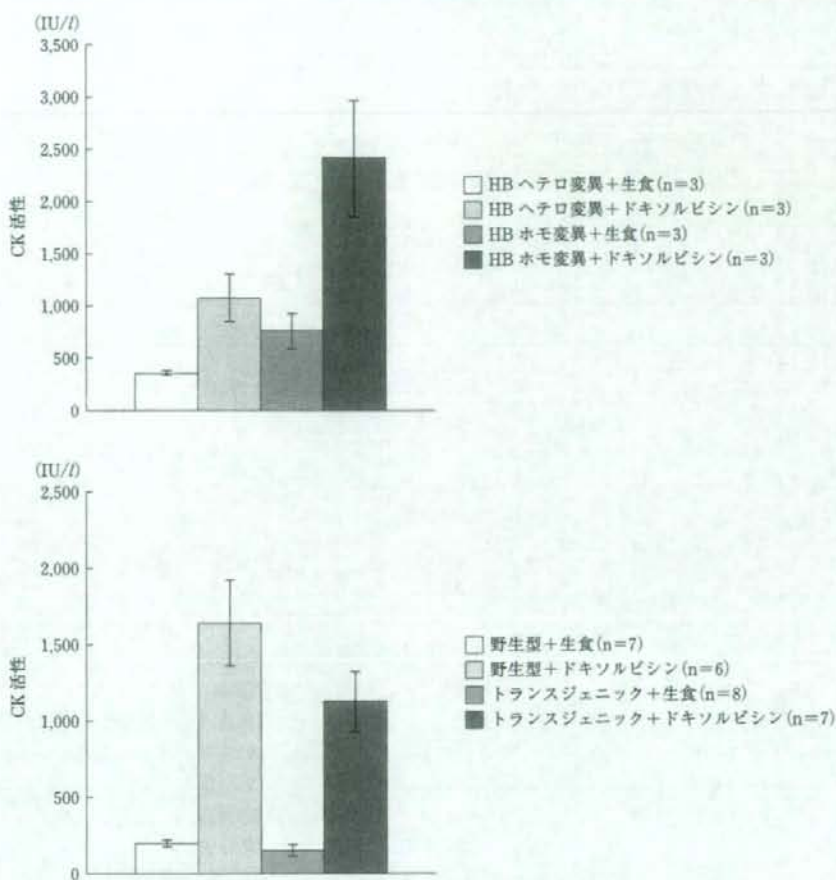


図4 HB-EGFの心筋保護効果(著者未発表)

HB-EGF 遺伝子改変マウスは野生型マウスに比し、ドキソルビシンなどの薬剤性心筋障害に対して脆弱であり、薬剤投与により大量の心筋逸脱酵素(CK)の上昇を認めた(上段)。

またHB-EGFを心筋において過剰発現させたマウスはドキソルビシンに対して野生型に比して耐性を示し、薬剤投与により心筋逸脱酵素の上昇が抑制された(下段)。

細胞は、分裂しないがゆえに、そのゲノムの構造変化が保存されやすいと予想される。放射性炭素を利用した実験においても心臓や脳などの特定の臓器においてはDNAはほとんど複製されないことが明らかになっている⁷⁾。長年にわたってDNA上の構造変化が複製されずに蓄積されて、心臓や脳の病態にどのように関与する

かは興味深い。

現在、様々な外部刺激が心筋特異的に起こすDNA障害保護機構、あるいはエピジェネティックな構造変化を解析することにより、心筋独特の代謝不全の分子メカニズムに迫るべく研究を進めている。

■ 文 献

- 1) Asakura M, et al: Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8: 35-40, 2002.
- 2) Yamazaki S, et al: Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163: 469-475, 2003.
- 3) Iwamoto R, et al: Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3221-3226, 2003.
- 4) Feldman AM, et al: Trastuzumab in the treatment of metastatic breast cancer: anticancer therapy versus cardiotoxicity. *Circulation* 102: 272-274, 2000.
- 5) Bahar R, et al: Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 441: 1011-1014, 2006.
- 6) Asano Y, et al: Lamr1 functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. *Nat Genet* 36: 123-130, 2004.
- 7) Spalding KL, et al: Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122: 133-143 2005.

C

EGF受容体ファミリーの生理機能と心不全

Physiological role of EGF receptor family in heart failure



高島成二(写真) 堀 正二

Seiji TAKASHIMA and Masatsugu HORI

大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学

◎生後まもなく分裂を停止する心筋細胞は、その後、いかにその細胞機能を維持したまま長年生存できるのか、心臓疾患にかかわる心筋細胞の生存や代謝を考えるうえでこの命題に対する答えは重要な意義をもつものと考えられる。分裂しない細胞においてそのゲノムは一生複製することがない。幼少時に心筋細胞核内にいったん合成されたDNAは半世紀以上にわたりその機能を維持し続けなければならない。このような特殊な環境におかれた細胞がいかに外部の障害に対処しているかは興味深い。本稿では、HB-EGFというEGFファミリーリガンドの機能解析を通じて心臓の代謝保護機構の一端を解説するとともに、ゲノムの構造そのものにかかわる分子と心筋代謝におけるかわりを概説する。



EGF受容体、HB-EGF、心筋代謝

心筋細胞におけるHB-EGFの役割

心筋細胞同様に分裂増殖しない細胞である神経細胞は、ニューロトロフィンとよばれる一連の増殖因子をその生存に必須としている。心筋細胞も増殖はしないが、その生存因子に増殖因子のシグナルを必要とする。1980年代ごろより、カテコールアミンなどのG共役型受容体(GPCR)を介するシグナルがRasの活性化やc-fosの発現をきたすことが明らかにされた。これらのシグナルは本来増殖因子が担うシグナルであるが、心筋細胞においても蛋白合成の亢進や心筋の肥大がこれらのシグナルを介して起こることが知られている。最近になり、心筋細胞においてカテコールアミンやアンジオテンシンなどのGPCRを介するシグナルが一部、heparin binding EGF like growth factor(HB-EGF)を介して起こることが明らかにされた¹⁾。すなわち、GPCRのリガンドにより心筋細胞を刺激すると、細胞膜のメタロプロテアーゼが活性化され、活性化されたメタロプロテアーゼにより細胞膜に結合していたHB-EGFが遊離型となる。いったん細胞外に放出されたHB-EGFは細胞外からEGF受容体を活性化し、Ras、c-fosなどの増殖関

連シグナルを動かすというモデルである(図1)。このモデルは心筋細胞に限られた現象ではなく、他の臓器でも同様のシグナルモデルがあることが明らかになっている。過去にGPCRを介する直接の作用と思われた増殖シグナルが、実は細胞膜から遊離したEGF受容体リガンドを介することが多くの例で示されている。このモデルは、いったん細胞内に入ったシグナルがもう一度外に出るといふ珍しいインサイドアウトシグナルのモデルである。GPCR刺激によりEGF受容体がリン酸化されることは以前から知られていたが、当初、細胞内からEGF受容体がリン酸化されると考えられていた。しかし、複雑な受容体の構造変化を伴うEGF受容体のリン酸化がリガンドの結合なしに起こるよりも、むしろいったんリガンドを介する細胞外シグナルにゆだねるほうが、実は合目的的である。

また、外部シグナルのリガンドとして、心臓以外の他の臓器ではTGF- α やamphiregulinなど、他のEGFリガンドを使用している場合もある。心筋細胞においてはGPCRを介するEGF受容体のリン酸化反応はHB-EGFの中和抗体によりほぼ100%

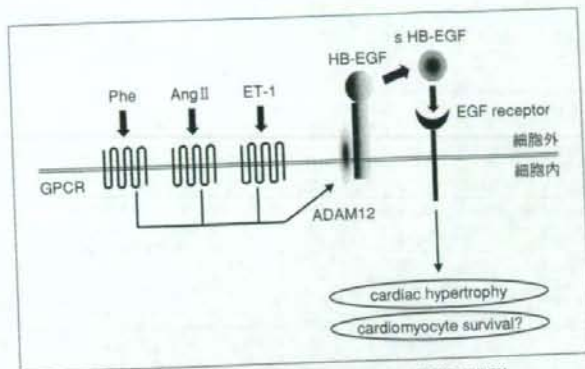


図1 HB-EGFの細胞膜からの遊離と心筋細胞代謝
GPCR リガンドによる刺激を心筋細胞が受けると細胞膜状の HB-EGF が切断され、EGF 受容体がリン酸化される。

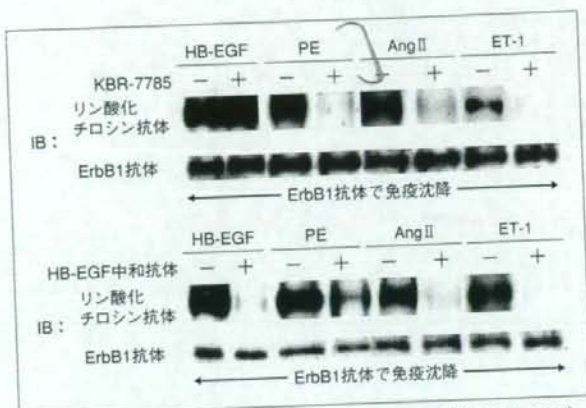


図2 GPCRリガンドによるHB-EGFを介したEGF受容体のリン酸化²⁾
ラット心筋細胞に各種 GPCR リガンドを加えると EGF 受容体がリン酸化され、メタロプロテアーゼ阻害剤である KBR-7785 および HB-EGF の中和抗体で抑制される。

抑制されるため、HB-EGF が心筋では特異的にこれらのシグナルにおいて重要な役割を果たす EGF 受容体リガンドであることが示唆された(図2)。

さらに著者らは、HB-EGF が細胞膜から切断されないマウスを作製し、心臓における HB-EGF の役割を検討した。このマウスは野生型マウスに比べ、生後しばらくしてから進行性の心不全を発症し、早期に心不全死をきたした。組織像は筋変性・脱落と線維芽細胞による置き換えがみられ、ヒト拡張型心筋症ときわめて類似した表現型を示した(図3)²⁾。このことは、心筋の生存維持に HB-

EGF の細胞膜からの遊離という現象が重要であり、その阻害は心筋細胞の機能不全につながることを示唆する。また、驚いたことに、全身で HB-EGF が切断されないマウスを作製したにもかかわらず、その表現型は心臓だけに現れた。さらに、HB-EGF の遺伝子欠損マウスも同様に心臓特異的に障害がみられた³⁾。以上のことから、HB-EGF は心筋細胞の代謝に必須の分子であり、さまざまな刺激により細胞膜から遊離され EGF 受容体を活性化させることにより、心筋の生存にとって重要なシグナルを担うことが示唆された。

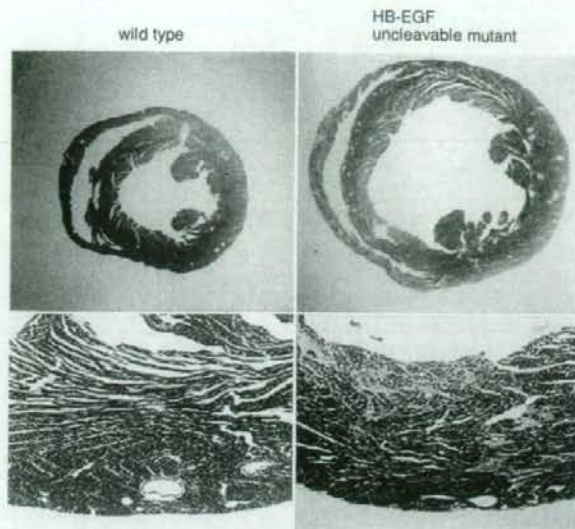


図3 HB-EGFが細胞膜から遊離されないマウスは拡張型心筋症様の表現型を示す⁴⁾

HB-EGF uncleavable mutant は著明な内腔拡大(上図)および心筋細胞の変性脱落、線維芽細胞による脱落を示す。

さらに、HB-EGFの心臓に対する特異的作用は、そのシグナルに関与する因子の欠損および不全により拡張型心筋症様の症状を呈する可能性があることを示唆する。実際に家族性拡張型心筋症患者の家系からは、HB-EGFの細胞膜からの遊離をきたす酵素であるADAM12の遺伝子変異がみついている。これらの事実は、この家族症例に限らず、他の拡張型心筋症患者においても、GPCRからHB-EGFの細胞膜からの遊離、EGF受容体刺激という一連のシグナル異常が原因となっている可能性が示唆される。そうであるならば、外部から投与したHB-EGFがこれらの疾患において心筋保護的に働き、心不全の治療として応用できる可能性がある。

HB-EGFの心筋保護効果(図4)

それでは、実際にHB-EGFを投与することが心筋細胞保護的に働くかどうかを検討した。ラット培養心筋細胞を用いた実験においては、心筋障害性のある抗癌剤であるドキソルビシンやH₂O₂付加による心筋細胞死をHB-EGFは有意に抑制した。さらに、HB-EGFのKOマウスはドキソルビシン

心筋障害に対して野生型に比べ脆弱であり、逆にHB-EGFを心筋において過剰発現させたマウスは心筋障害に対して抵抗性であった。現在さまざまな心筋障害モデルにおいてHB-EGFの保護効果を検討中である。

ヒト心臓でのHB-EGFシグナルの重要性

臨床的に、このHB-EGFを介するシグナルの心筋における重要性を示唆する証拠がある。近年、乳癌治療薬として使用されている増殖因子受容体ErbB2の中和抗体製剤ハーセプチン[®]が心筋障害を起こすという報告である⁴⁾(「サイドメモ」参照)。ハーセプチン[®]はとくにドキソルビシンなどの心筋障害性の抗癌剤と併用すると、約20%の患者で心筋障害の増悪がみられたとされている。ドキソルビシンによる心筋障害の原因は酸素ラジカルと考えられているが、その障害メカニズムはいまだ不明である。ErbB2の中和抗体による心筋障害は、ドキソルビシンによる心筋細胞障害の回復に必要なHB-EGFのシグナルを抑制することにより生じた可能性がある。もしそれが事実ならば、HB-

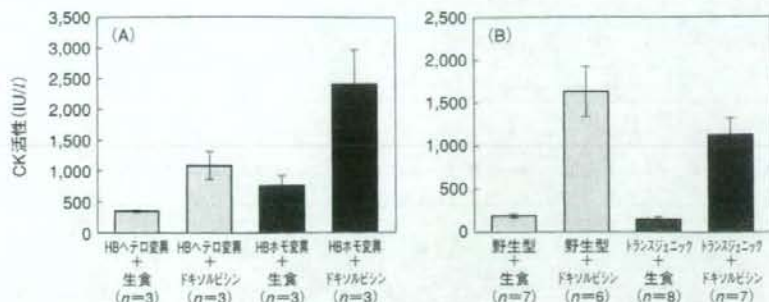


図4 HB-EGFの心筋保護効果(著者未発表)

A: HB-EGF 遺伝子改変マウスは野生型マウスに比べ、ドキソルビシンなどの薬剤性心筋障害に対して脆弱であり、薬剤投与により大量の心筋逸脱酵素(CK)の上昇を認めた。

B: HB-EGF を心筋において過剰発現させたマウスはドキソルビシンに対して野生型に比べて耐性を示し、薬剤投与により心筋逸脱酵素の上昇が抑制された。

EGF は外部からの投与により心筋障害部位で保護的に作用する可能性が示唆される。増殖因子治療は癌との関連が示唆されるため安易な投与はできないが、成長因子や IGF が心筋保護的に働くことも報告されており、今後、心保護作用を有する増殖因子のひとつとして HB-EGF の治療への応用が期待される。

HB-EGF は現愛媛大学の東山により同定され、その生理作用、遺伝子改変マウスの作製を含め、重要な生化学的データはほとんどわが国で得られている。HB-EGF の心筋障害に対する応用は現在、海外ではほとんど検討されていない。著者ら

は現在、これらのノックアウトマウスの救済実験を含め、心筋代謝における HB-EGF を含めた EGF 受容体シグナルの生化学的解析を進めるとともに、心不全の増殖因子療法の可能性を検討していく予定である。

エビジェネティックな遺伝子発現制御と心不全

それでは実際に、HB-EGFなどを介するシグナルはいかに心筋を保護するのか、生存因子という概念は非常にあやふやであり、さきに述べた H_2O_2 などの刺激による心筋障害は具体的にはどのような結果をもたらし、HB-EGF はなにを保護したのか。

答えは得られていないが、最近心筋において老化や H_2O_2 などの刺激によりゲノムの突然変異や組換え障害が引き起こされることが示されている⁵⁾。この報告では、心筋細胞はゲノム障害の結果として mRNA の発現の個々の細胞でのばらつきが起こることを示した。老化現象のみならず病態においても、これらのゲノムあるいはエビジェネティックな遺伝子構造の変化が心筋の代謝不全にかかわる可能性が示唆される。

著者らも右室特異的に心筋代謝不全をきたすモデルマウスにおいて、*lamr1-tp* という変異遺伝子が HP1 というヘテロクロマチン構造蛋白と結合することにより、エビジェネティックな遺伝子構造障害を引き起こし、心筋細胞死が起こることを明ら

サイドメモ

ErbB2中和抗体ハーセプチン®と心筋障害

4年前から日本でも承認されているハーセプチン®は、EGF 受容体 2(ErbB2)のヒト化モノクローナル抗体製剤である。ErbB2 を高発現している転移性乳癌に投与されている。初期の治療段階でハーセプチン®とアントラサイクリン系の抗癌剤を併用したときに高率に心筋障害が起こることが示された。ハーセプチン®の効果は受容体の機能阻害により発揮されるのではなく、むしろ抗体結合による免疫学的機序によるとされている。しかし、EGF 受容体刺激が心筋代謝に必須であることを考えれば、この心筋障害は EGF 受容体刺激の遮断に起因するかもしれない。現在、ハーセプチン®とアントラサイクリン系の抗癌剤の併用は禁忌である。また、心機能低下の患者にも慎重投与とされている。

かにした⁶⁾。これらの所見は、短期間の障害においても長期間の障害においても、ゲノム構造自体の変化が心筋細胞の代謝自体に重要な働きをすることを強く示唆している。心筋細胞は分裂しないため、そのゲノムの構造変化が保存されやすいと予想される。放射線炭素を利用した実験においても、心臓や脳などの特定の臓器においては DNA はほとんど複製されないことが明らかになっている⁷⁾。長年にわたって DNA 上の構造変化が複製されずに蓄積されて、心臓や脳の病態にどのように関与するかは興味深い。

現在、さまざまな外部刺激が心筋特異的に起こす DNA 障害保護機構、あるいはエピジェネティッ

クな構造変化を解析することにより、心筋独特の代謝不全の分子メカニズムに迫るべく研究を進めている。

文献

- 1) Asakura, M. et al. : *Nat. Med.*, **8** : 35-40, 2002.
- 2) Yamazaki, S. et al. : *J. Cell Biol.*, **163** : 469-475, 2003.
- 3) Iwamoto, R. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** : 3221-3226, 2003.
- 4) Feldman, A. M. et al. : *Circulation*, **102** : 272-274, 2000.
- 5) Bahar, R. et al. : *Nature*, **441** : 1011-1014, 2006.
- 6) Asano, Y. et al. : *Nat. Genet.*, **36** : 123-130, 2004.
- 7) Spalding, K. L. et al. : *Cell*, **122** : 133-143, 2005.

第九版

総編集

杉本恒明
矢崎義雄

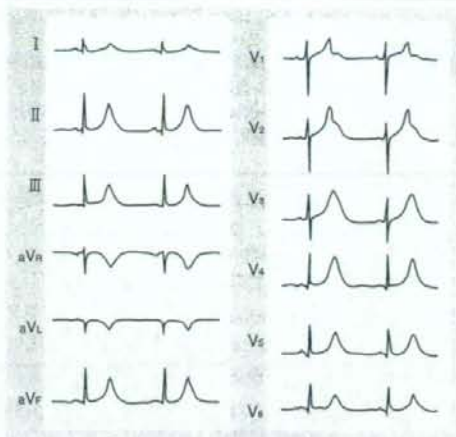
編集

小俣政男
水野美邦

伊藤貞嘉
岩本愛吉
岡 芳知
金倉 讓
島本和明
菅野健太郎
曾根三郎
永井良三
中尾一和
山本一彦

内科 歯学

朝倉書店



〈図 5-125〉先天性 QT 延長症候群の心電図
42 歳女性。長期に β 遮断薬投与が行われている。0.7 秒と著明な QT 延長を認める。

〈表 5-41〉先天性 QT 延長症候群の診断基準

心電図所見	ポイント
A. QTc \geq 480 msec 1/2	3
460~470 msec 1/2	2
450 msec 1/2 (男性)	1
B. torsade de pointes	2
C. 交代性 T 波 (T wave alternans)	1
D. notched T (3 誘導以上)	1
E. 徐脈	0.5
臨床症状	
A. 失神発作	
ストレスに伴うもの	2
ストレスに伴わないもの	1
B. 先天性聾	0.5
家族歴	
A. 確定診断を得た先天性 QT 延長症候群の家族歴があるもの	1
B. 30 歳未満の突然死の家族歴があるもの	0.5

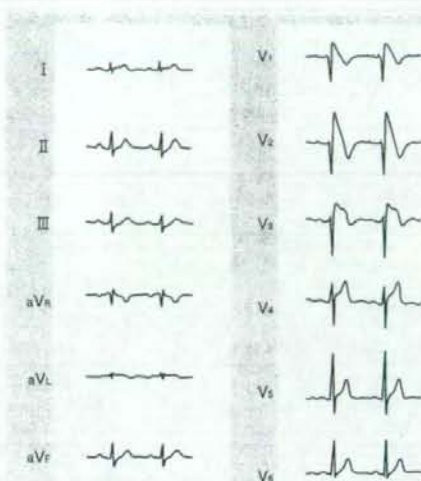
ポイントの合計により診断する。4 ポイント：診断確実。2 あるいは 3 ポイント：疑いあり。0 あるいは 1 ポイント：否定的 (Schwartz, et al, 1993)。

【検査成績・診断・鑑別診断】

表 5-41 のような診断基準が設けられている。標準 12 誘導心電図、Holter 心電図、運動負荷心電図などの検査を行う。電気生理学的検査におけるプログラム刺激での torsade de pointes 誘発率は低く、診断的価値は少ない。 β 遮断薬などの治療効果を知ることにも困難と考えられている。失神を生じる病態はいずれも鑑別の対象となる。

【経過・予後】

β 遮断薬による治療が確立されていない時期の調査では、失神などの既往のある先天性 QT 延長症候群の年死亡率は 5% にものぼっていた。しかし、 β 遮断薬が投与されているものでは 10 年を経ても死亡率は 10% 以下にとどまる。また、男性の失神発作は少年期までに集中するが、女性では 30 歳をこえても失神が続く傾向があり、臨床像に性差がみられる。



〈図 5-126〉Brugada 症候群が疑われる心電図
52 歳男性。V₁ と V₂ は coved 型に特有な ST-T 変化をみせている。診断は心電図所見のみでなく、家族歴や失神の既往を考慮する。

【治療】

障害のあるイオンチャンネルによって対処法は異なる。LQT1 と LQT2 では交感神経活動が torsade de pointes の出現を促進するため、 β 遮断薬が治療の主体となる。torsade de pointes の予防には高用量の β 遮断薬が必要となる。植え込み型除細動器や左星状神経節切除を要する症例もある。

(2) Brugada 症候群

【定義・概念】

1992 年、Brugada らは右胸部誘導の ST 上昇と右脚ブロックパターンを特徴とし、失神や突然死に至る疾患群を報告した。その家族性発症の傾向から遺伝性のある突然死関連疾患として注目されるようになった。

【原因・病因】

特徴的な心電図異常は右室流出路の活動電位の変化によって説明される。心筋の Na⁺ チャンネル遺伝子 SCN5A の変異が同定されたため、本疾患も遺伝子病としてとらえられている。なぜ活動電位の変化が右室に局在するのかなど未知のところが多い。

【疫学・臨床症状】

まれな疾患である。80% 以上が 30 歳~50 歳の男性であり、わが国を含む東南アジアに多い。失神、あるいは突然死として発症する。特記すべき身体所見を欠く。

【検査成績・診断・鑑別診断】

特徴的な心電図所見と心室細動、あるいはそれを示

波する失神発作によって診断される。本人に心室細動を思わせるエピソードがないときは、血縁者の既往に準じて診断をする。V₁, V₂ではQRS終末部からST部分にかけて上に凸のときcoved型とよび(図5-126)、ST上昇が下に凸ならsaddle-back型とよばれる。本症候群ではNa⁺チャンネル遮断薬や自律神経作動薬や遮断薬に対して特徴的な反応を示す。

不整脈源性右室心筋症(arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; ARVC)を除外するためのMRI検査や、冠動脈収縮の誘発を含む冠動脈造影も行われる。電気生理学的検査における心室細動の誘発頻度は報告により異なる。発作頻度によって重症度が決められるように見えるが、初回発作でも致死性となるので重症度は測りにくい。

●【経過・予後】

心室細動の既往がなくても心事故は4~8%に発生するという国外の報告はあるが、わが国ではこれよりも低い数値が報告されている。失神や突然死蘇生例では再発率が高い。

●【治療】

発作は心室細動として発症するために、通常の救急蘇生に準じる。速やかに電気的除細動を行わなければ致死性となる。本症候群の心電図異常は一部のNa⁺チャンネル遮断薬、β遮断薬、副交感神経刺激薬によって増悪する。これに対しβ刺激薬は心電図異常を改善させる。coved型のときに心室細動が生じやすい。薬物治療は不十分な効果しか望めず、しばしば植え込み型除細動器が選択される。(村川裕二)

5

■文献

- Sarkozy A, Brugada P: Sudden cardiac death and inherited arrhythmia syndromes. *J Cardiovasc Electro-physiol*, 16 (Suppl 1): S8-20, 2005.
- Schwartz PJ: The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J Intern Med*, 259: 39-47, 2006.
- Schwartz PJ, Moss AJ, et al: Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*, 88: 782-784, 1993.

5-6

虚血性心疾患 ischemic heart disease

1) 冠血流調節と心筋虚血

(1) 冠循環調節機構

a. 冠循環の解剖

心筋に血液を供給する冠循環は、大動脈起始部から直径2~5 mmの左右3冠動脈が心外膜側を走行す

る。その3冠動脈から直径1 mm以下の小動脈となつて心筋層内に入り、さらに冠動脈造影上判読不能となる直径数百μm以下の細動脈。中膜平滑筋が不連続となるメタ細動脈。毛細血管前細動脈を経て、内皮細胞と基底膜とからなる直径8~10 μmの毛細血管へと移行する。そして毛細血管後細動脈を経て、直径数百μm前後の細動脈から、大部分は冠静脈洞を経て右房に還流する。一般に、細動脈から細動脈までの心筋層内の冠循環は冠微小循環とよばれ、抵抗血管として生理的な状態での冠循環調節の主役をなしている。

b. 冠循環の特徴と調節機構

冠循環の第1の特徴として、心臓はエネルギー消費の最も大きな臓器であるため、大量の血液供給を必要とする(安静時約1 ml/g/分)。しかし、他臓器への分配血液量の低下を避けることから必要最小限に抑えられている(心拍出量の約5%)。そのため、冠動脈狭窄などにより冠血流供給が制限されると、心筋は容易に虚血に陥る。

第2の特徴として、収縮期に高圧となる心内膜側は、心外膜側と比較して十分な組織灌流が得られにくいとされる。冠動脈狭窄などで冠血流が低下すると、心内膜側・心外膜側血流比は容易に0.7くらいまで低下し、心内膜側より容易に虚血が生ずる(wavefront現象)。

第3の特徴として、冠循環は脳循環とともに多少の灌流圧の変動にかかわらず冠血流量を維持する自己調節能(autoregulation)を有する点で、他臓器とは異なっている。冠微小血管トーンスは、おもに平滑筋自体の特性にて制御されているが、神経・体液性因子の影響も受ける。

c. 冠微小血管トーンスの神経性調節

冠動脈は全身の動脈のなかで最も豊富に神経が分布し、precapillaryレベルまで神経支配を受けており、冠血流量の調節を担っている。冠動脈は、交感神経系と副交感神経系の両者の制御を受けており、副交感神経は太い血管の外膜のみに分布し、運動性および知覚性の神経線維を含む。交感神経は無髄運動神経線維を有し、細動脈レベルに至るまで分布し、中膜平滑筋細胞に入り込む。近位部の冠血管ではα交感神経刺激による血管収縮作用が優位で、遠位部の細血管では、α作用が消失していく。また、α交感神経受容体刺激による冠血管収縮作用の約70%が太い冠動脈の収縮により、残りの30%は冠抵抗血管に起因することが示されている。冠抵抗血管はβ交感神経のみならず、α交感神経活性による制御も受けており、互いが拮抗して冠血流量を調節している。さらに副交感神経刺激では、冠血管は拡張する。

d. 冠微小血管トーンスの体液性調節

心筋組織でのpH、P_{O₂}が低下すれば冠血流量が増加

する。ATPの代謝産物であるアデノシンは、冠血流量の制御に重要な役割を果たしており(Horiら, 1991), 冠血管のアデノシン A_2 受容体に作用し、冠血管平滑筋細胞内のcAMPレベルを増加させ、平滑筋を弛緩させる。アデノシンはおもに直径200 μ m以下の冠微血管に作用して冠血管抵抗を低下させる。また、アデノシンは心筋酸素需要増大や心筋虚血の程度に応じて、反応的に冠血流量を増加させるのに十分な量が遊出され、冠血管に対して耐性が生じにくいとされる。一方、心筋虚血や低酸素により細胞内ATPレベルが低下するが、このATPレベル低下に呼応して K_{ATP} チャネルが開く。冠血流量を低下させると直径100 μ m以下の冠微血管が拡張するが、その作用は K_{ATP} チャネル遮断薬であるグリベクランミドにて抑制されることが知られている。また、アセチルコリンなどが血管内皮細胞の受容体に結合することにより、 Ca^{2+} の流入をもたらす。血管内皮細胞に局在する血管内皮型NO合成酵素(eNOS)を活性化して、NOを継続的に産生する。NOは直ちに血管平滑筋に取り込まれ、グアニルシクラーゼの活性化によりサイクリックGMP(cGMP)が産生され、cGMP依存性蛋白質リン酸化酵素の活性化を介して血管平滑筋を弛緩させる。これらアデノシン、 K_{ATP} チャネル開口およびNOの三者が協調的に冠血流量調節に働いている。その他、内皮由来過極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF)、 PGI_2 などもトーン調節に関与している。

(2) 心筋虚血の病態生理

a. 冠循環の変化による心筋収縮および拡張に及ぼす影響

心内膜下局所心筋短縮率または壁厚増加率が低下しはじめる臨界灌流圧(critical perfusion pressure)または自己調節能(autoregulation)の限界は、100 mmHgが正常血圧である麻酔犬では約70 mmHg、また覚醒犬では40 mmHgといわれている。冠動脈の近位部を結紮すると、10秒後には灌流領域中心部の心筋短縮率が30%低下する。虚血がさらに持続すると心筋は収縮しなくなり、逆に収縮期を通じて伸展されるようになる。また、心筋虚血時には左室拡張機能障害を認める。拡張早期にみられる弛緩速度の低下と拡張中期から後期における拡張期スティフネス(コンプライアンスの逆数)の変化の2点である。心筋虚血が起こると収縮期よりも拡張期の指標の方が先に障害される。弛緩速度の低下の原因は、心筋虚血が起こるとATPの減少を認めるが、筋小胞体への Ca^{2+} の取り込みにはATPを要するため、収縮蛋白の不活性化が遅延するためと考えられている。拡張期スティフネスは、心筋虚血の状態では冠灌流圧が一定であれば冠

血流量が増加するため、coronary turgorの増加(garden hose effect)や間質浮腫により増加し、冠血流遮断が1時間以上持続すると心筋のATPが枯渇してアクチン-ミオシン結合が解離できなくなり、不可逆性の虚血性拘縮のため著明に増加する。

b. 心筋虚血から心筋壊死への形成過程

心筋虚血による心筋壊死は心内膜側心筋より生じ、虚血時間が長くなるにつれて心外膜側心筋へと伝播する。イヌの実験モデルでは、冠動脈結紮後40分、3時間、96時間後の心筋梗塞巣の形成過程を検討したところ、15分以内の虚血では心筋壊死は生じなかったが、40分で心内膜側心筋に散在性に心筋壊死が生じた。さらに3時間後には、心内膜側心筋の壊死は完成し、96時間後には心筋壊死が心外膜側まで進行し貫壁性梗塞が完成する(wavefront現象)。wavefront現象を修飾する重要な因子としては、側副血流量や虚血プレコンディショニング現象、前負荷・後負荷、薬剤などが重要な因子である。実際、側副血行路の不良なブタでは冠動脈結紮後40分で心内膜側(1/3)に心筋壊死が生じ、1時間後には約80%、2時間で貫壁性梗塞が完成することが知られ、ヒトの心筋梗塞では、発症後3~6時間以内に貫壁性梗塞が完成すると考えられている。

c. 心筋虚血における寄与因子

i) 側副血行路 側副血行路が発達しているイヌと側副血行路が乏しいブタを比較すると、心筋壊死形成に要する時間が異なることが知られていることから、側副血流量は心筋虚血から心筋梗塞に至る過程における重要な規定因子であると考えられる。イヌにおける検討では、冠動脈結紮後20分後の心筋外層・中層・内層への側副血流量はおのおの非虚血時の6、9、22%で、心内膜側により強い虚血障害が生じる。側副血行は、非虚血領域の心外膜側冠動脈の分枝により供給されるため、側副血管は心外膜側より心内膜側に穿通する。この側副血管は心筋内圧が高いために心内膜側を十分に灌流できないとされる。さらに、長時間持続による心筋虚血により不可逆性心筋障害が生じ、その周囲に出血・炎症・浮腫などが生じ側副血管を圧迫したり、トーン亢進を惹起するためと考えられる。

ii) 虚血プレコンディショニング 虚血プレコンディショニングとは、短時間心筋虚血の先行により、その後生じる長時間虚血による心筋細胞障害に対して保護的に作用する現象である。臨床において、心筋梗塞発症前に狭心症発作を有する急性心筋梗塞患者の予後や心機能が比較的良好であることが経験的に知られていた。その虚血改善効果のメカニズムとして、Murryらが、急性心筋梗塞モデルで実験的に同様の現象を明らかにした。そのことから、虚血プレコン

預イショニングは臓器保護の観点から普遍的な概念と定めた (Murryら, 1986)。プレコンディショニングには、心筋保護効果が1~2時間で消失する early phase プレコンディショニングと心筋保護効果が24時間~48時間後に再び出現する late phase プレコンディショニングとがある。early phase プレコンディショニングのメカニズムは蛋白リン酸化が主に関与するのに対して、late phase プレコンディショニングは蛋白合成を伴った現象であると考えられている。プレコンディショニングの分子メカニズムは、early phase プレコンディショニングでは、アデノシンなどがGプロテインキナーゼC (PKC) 活性化に続くATP感受性K⁺ (K_{ATP}) チャネルを活性化させ心筋保護作用を惹起することによる。一方、late phase プレコンディショニングの分子メカニズムについてはiNOSを介するNO産生増加-HSP 72-MnSOD 連関およびPKC-ecto-5'-nucleotidase 誘導-アデノシン連関の相加および相乗作用により惹起されるものと考えられている。このプレコンディショニング効果は、心筋梗塞サイズを縮小させるいちばん強い作用を有しており、現在臨床において、この作用に近い効果を有する薬剤の探索に力が注がれている。

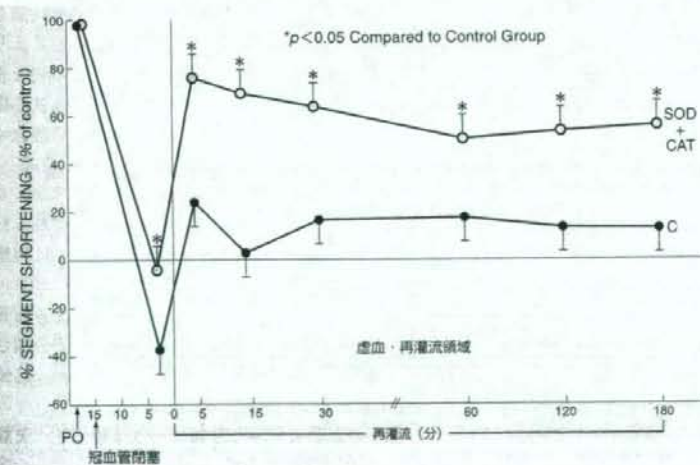
d. 心筋スタニング (stunned myocardium)

実験的に冠動脈を短時間結紮した後、再灌流すると組織学的にほとんど異常がないにもかかわらず心筋収縮能の低下が数時間~数日持続する現象がある。この再灌流後の心筋収縮不全を、1982年、Braunwaldらが“stunned myocardium (気絶心筋)”と命名した。臨床においても、急性心筋梗塞患者において虚血・再灌流後、一時的な心筋収縮不全が認められることがわかってきた。虚血心における心筋収縮能の低下は心筋酸素消費量を低下させ、一見合目的な現象と考えられ

る。しかし stunned myocardium 時の局所の酸素消費量はむしろ増大しており、エネルギー代謝の面からも脂肪酸取り込み低下および糖取り込み亢進という非効率なエネルギー代謝があり、一種の再灌流障害とも考えられている。現在、心筋スタニングの原因として、①フリーラジカル発生、②心筋細胞内Ca²⁺過負荷、の2つのメカニズムが考えられている (図5-127)。1つは、再灌流時に産生されるO²⁻やOH⁻による細胞膜や膜上のイオンチャネル障害がスタニングの一因と考えられる。また、Ca²⁺過負荷がスタニングの原因とされることは、①低[Ca²⁺]灌流液(または血液)で再灌流すると、スタニングは抑制される(低Ca²⁺再灌流)こと、②徐々に灌流したり、酸性溶液添加によりアシドーシスの回復を緩徐にすると、スタニングが抑制される(段階的再灌流、酸性再灌流)こと、③細胞外液のCa²⁺レベルを上昇させると、一過性には陽性変力作用を示すが、これを繰り返すと発生張力が低下することより、Ca²⁺過負荷により心筋陽性変力作用のCa²⁺感受性が低下することから支持されている (図5-128)。しかしながら、なぜCa²⁺過負荷がスタニングを惹起するのかは明らかでない。細胞骨格蛋白であるマイクロチュブルが障害をうけ、その障害程度が心機能低下と相関することから、細胞骨格の障害がスタニングの一因となっていることが考えられている。Ca²⁺が結合することにより、アクチン-ミオシンのスライディングが生じるトロポニンCの障害が生じることが報告されており、Ca²⁺に関係した収縮蛋白の障害が関与するものと思われる。

e. ハイバネーション (冬眠心筋, myocardial hibernation, hibernating myocardium)

心筋ハイバネーションは、冠血流量が低下しても心筋は酸素供給に見合うように心機能を低下させ虚血性



(図5-127) 虚血・再灌流領域における心筋短縮率。15分虚血刺激後の心筋短縮率低下(赤線)はSOD+カタラーゼ投与(青線)により抑制される (Grossら, 1986)。