

200834037A



厚生労働省難治性克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

2008年度報告書

主任研究者 北風政史

2009年4月



厚生労働省難治性克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

2008年度報告書

■CONTENTS

I. 総括研究報告

特発性心筋症に関する調査研究[北風 政史]	1
-----------------------------	---

II. 分担研究報告

[筒井 裕之]心不全におけるインスリン抵抗性と酸化ストレスの役割	3
[久保田 功]心不全における血清終末糖化産物(AGE)および可溶性AGE受容体(RAGE)系の意義	5
[永井 良三]心筋リモデリングにおける転写因子KLF5の役割	7
[小川 聡]拡張型心筋症による重症心不全に対する免疫吸着療法	9
[和泉 徹] 実験的自己免疫性心筋炎におけるラジカルスカベンジャーによる電氣的・構造的リモデリングの予防効果 ..	13
[磯部 光章]心拒絶反応の進展予防におけるクラリスロマイシンの役割	15
[小室 一成]拡張型心筋症発症におけるCaMK II α とp53の役割	19
[山岸 正和]心筋症と左室心筋緻密化障害の発症に関わる要因	21
[松森 昭]心筋症における免疫グロブリン遊離軽鎖の意義および心筋症の新分類に関する検討	23
[友池 仁暢]心筋生存における増殖因子の役割解明	26
[中谷 武嗣]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	28
[斎藤 能彦]アルドステロンによる心肥大・線維化増強作用におけるGC-Aの意義	31
[松崎 益徳]拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討	33
[今泉 勉]心筋梗塞後心筋リモデリングにおけるサイトカイン機能調節因子の役割	35
[砂川 賢二] 慢性腎不全合併心不全(心腎連関)モデルの作成と解析:その病態メカニズムと治療法の解明にむけて ..	40
[鄭 忠和]心不全に対する和温療法の有用性:多施設共同研究の結果	43
[豊岡 照彦] 心筋症の遺伝子診断における網羅的解析の重要性:拡張相を伴う肥大型心筋症の病因解析を一例として ..	45
[竹石 恭知]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	48
[川名 正敏]拡張型心筋症患者において心臓MRIの遅延造影は心イベントを示唆する	50
[廣江 道昭]霊長類拡張型心筋症モデルを用いたテネイシンCの診断意義の検討	52
[木村 彰方]特発性心筋症におけるフクチン変異の解析	54
[福田 恵一]ヒトiPS由来心筋細胞の機能解析について	57
[武田 信彬]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	62
[河合 祥雄]たこつぼ心筋症発症仮説の病理形態学的検討	64
[室原 豊明] 軽症肥大型心筋症患者におけるミトコンドリアの機能および形態変化と心筋収縮および弛緩予備能の関係 ..	65
[今中 恭子]テネイシンCによる心臓血管新生制御メカニズム	68
[大津 欣也] Ferritin heavy chain(FHC)による鉄代謝調節機構の心筋リモデリングにおける役割の検討	71
[北浦 泰]実験的自己免疫性心筋炎に対するS100A8/A9の投与効果	74
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	76
IV. [資料]研究成果の刊行物・別冊	
Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure Journal of Cardiac Failure 14:426-230, 2008	117
Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure Circulation Journal Suppl. A:A-31-A-37, 2008	122
Soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure Journal of Cardiac Failure 14(2):133-139, 2008	129

Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling after myocardial infarction The Journal of Immunology 181:5691-5701, 2008	136
Clarithromycin attenuates acute and chronic rejection via matrix metalloproteinase suppression in murine cardiac transplantation Journal of the American College of Cardiology 51(20):1977-1975, 2008	147
A novel β -myosin heavy chain gene mutation, p.Met531Arg, identified in isolated left ventricular non-compaction in humans, results in left ventricular hypertrophy that progresses to dilation in a mouse model Clinical Science 114:431-440, 2008	156
Mast cells play a critical role in the pathogenesis of viral myocarditis Circulation 118:363-372, 2008	166
High-density association study and nomination of susceptibility genes for hypertension in the Japanese National Project Human Molecular Genetics 17(4):617627, 2008	176
Which factors predict the recovery of natural heart function after insertion of a left ventricular assist system? Journal of Heart and Lung Transplantation 27:869-874, 2008	187
Acute myocardial infarction as a systemic prothrombotic condition evidenced by increased von Willebrand factor protein over ADAMTS13 activity in coronary and systemic circulation Heart Vessels 23:301-307, 2008	193
Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy Circulation Journal 68:677-682, 2004	200
Chronic cardiac resynchronization therapy reverses cardiac remodeling and improves invasive haemodynamics of patients with severe heart failure on optimal medical treatment Europace 10:379-383, 2008	206
Time-dependent changes of myocardial and systemic oxidative stress are dissociated after myocardial infarction Free Radical Research 43(1):3746, 2009	211
Beneficial effects of Waon therapy on patients with chronic heart failure: Results of a prospective multicenter study Journal of Cardiology 52:79-85, 2008	221
Specific knockdown of m-calpain blocks myogenesis with cDNA deduced from the corresponding RNAi American Journal of Physiology-Cell Physiology 294:957-965, 2008	228
Diacylglycerol kinase- ϵ restores cardiac dysfunction under chronic pressure overload: a new specific regulator of G_{α_i} signaling cascade American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 295:H245-H255, 2008	237
Synergistic effect of dual chamber pacing and disopyramide in obstructive hypertrophic cardiomyopathy International Journal of Cardiology, 2008 (Epub ahead of print)	248
Noninvasive detection of cardiac repair after acute myocardial infarction in rats by ^{111}In Fab fragment of monoclonal antibody specific for tenascin-C International Heart Journal 49:481-492, 2008	251
Mutational analysis of fukutin gene in dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy Circulation Journal 73:158-161, 2009	263
Local tenomodulin absence, angiogenesis, and matrix metalloproteinase activation are associated with the rupture of the chordae tendineae cordis Circulation 118:1737-1747, 2008	267
特定心筋症 update : たこつぼ型心筋障害 Heart View 12(8) : 956-961, 2008.	280
Dobutamine stress testing as a diagnostic tool for evaluation of myocardial contractile reserve in asymptomatic or mildly symptomatic patients with dilated cardiomyopathy Journal of American College of Cardiology-Cardiovascular Imaging 6:718-726, 2008	286
心外膜原基由来細胞を制御するテネイシンCの検討 日本小児循環器学会雑誌 24 : 606-614, 2008	297
Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes Journal of Molecular and Cellular Cardiology 46:59-66, 2009	306
Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network European Journal of Heart Failure 11:229-237, 2009	314

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業)
総括研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

研究代表者: 北風 政史(国立循環器病センター心臓血管内科部門)

<研究要旨>心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

<研究分担者>

- 筒井裕之(北海道大学循環病態内科学教授)
久保田 功
(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野教授)
小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)
永井良三
(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)
和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)
磯部光章
(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学教授)
小室一成
(千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授)
山岸正和
(金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学教授)
松森 昭
(京都大学大学院医学研究科循環器内科学准教授)
友池仁暢(国立循環器病センター病院長)
中谷武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)
斎藤能彦(奈良県立医科大学第一内科教授)
松崎益徳
(山口大学大学院医学研究科器官病態内科学教授)
今泉 勉(久留米大学医学部第三内科教授)
砂川賢二
(九州大学大学院医学研究院循環器内科学教授)
鄭 忠和
(鹿児島大学大学院循環器・呼吸器・代謝内科学教授)

A. 研究目的

1995年に提案されたWHO/ISFCによる特発性心筋症に関するガイドラインから、特発性心筋症の病態、診断法の進展が著しく、近年、AHAやESC

などの欧米における特発性心筋症の新たなガイドラインの提唱が行われている。特に注目されるのは、チャネル心筋症などの遺伝子機能異常などによる新たな病型の試みである。我が国においても、特発性心筋症の研究班により平成17年に「特発性心筋症診断の手引き」が作成され、診療への応用がなされている。10年以上経過した現在、特発性心筋症における新たなエビデンスの整理を行い、新たな手引きの作成が期待され、必要である。

本研究班は、特発性心筋症の病因・病態・診断・治療における我が国における臨床実態および臨床研究に関する情報を収集および統括し、特発性心筋症に関する新たなエビデンス構築を行い、得られた研究成果を社会へと広く普及および還元することを目的とする。

B. 研究方法

本研究班においては、新たな「特発性心筋症診断の手引き」を目指した①特発性心筋症のエビデンスの整理、②クリニカルニーズの調査および整理、③新しいエビデンスの創出を行う。これらの研究結果の創出を目指して、本研究班は3つの層にわかれた研究デザインを構築することとした。すなわち、(I)全体研究、(II)サブグループ研究、(III)個別研究の3つである。なお(I)全体研究および(III)個別研究は、前研究班の研究デザインを踏襲することとした。

(I)全体研究として、前研究班に進められてきた特発性心筋症における前向き登録研究(CCMM研究)を引き続きすすめている。さらに、2年後の最終年度には、CCMM研究をより新奇性の高い登録研究に改訂すべく、その研究デザイン刷新の検討

を開始した。

(II)サブグループ研究として、従来の研究班では行っていない新たなエビデンス構築を目指した研究課題の提案募集を、本研究班で初めて行った。本研究班は、全国の心筋症に関するハイレベルな臨床研究および基礎研究の施設であり、心筋症・心不全ネットワークとしての位置づけとして、個別研究では症例数や生体試料などが十分ではない研究に関して、班員の協力の下、世界に先駆けて新たな心筋症のエビデンスを構築することを目的として、サブグループ研究を進めることとした。

(III)個別研究として、従来の班研究より進められてきた、各班員の得意な臨床研究および基礎研究の手法をもちいて、特発性心筋症における新たな病因・病態・診断・治療に関するエビデンスを目指した研究を継続的に進めることとした。

C. 研究結果

本年度は、これらの目的を設定するための準備期間として、3つの層に分けた新たな研究班の構築を行った。

(I)全体研究

「特発性心筋症の前向き登録研究」を継続して行った。これらの前向き登録研究が進むことにより、薬物療法などが進展した現時点における心筋症の臨床実態が明らかにされることが期待される。また、以前の研究班により登録された心筋症コホートの10年後の生存調査が同時に進行されることとなった。

(II)サブグループ研究

本研究班で、8課題(現時点)の研究提案がなされた。具体的には、1)心筋症患者の遺伝子解析に関する臨床研究(2課題)、2)特発性心筋症の炎症に関する病理診断を用いた臨床研究、3)心筋炎・心筋症における免疫グロブリン遊離軽鎖に関する臨床研究、3)心筋症における抗心筋自己抗体に関する臨床研究、4)心筋症における臨床的疑問に関する調査研究、5)心筋症の診断におけるバイオプ

シー、画像診断などの有用性の検討などが提案された。さらに、心筋症に対する心臓移植が行われて10年近く経過する現時点において、心筋症のより正確な診断について、臨床情報に加えて摘出心の病理組織を用いて再評価を行うべきあるとの提案が研究会議よりなされ、来年度末を目標にその検討を進める予定となった。

(III)個別研究

基礎研究から臨床研究へと様々なレベルにおいて、心筋症における病因、病態、診断、治療法の開発に関しての研究がすすめられた(各班員の項を参照)。研究成果に関して、年2回の研究会発表会で、情報交換、意見交換が行われた。

D. 考察

本年度は、初年度であり、全体研究としての前年度よりの登録調査研究の継続および個別研究の基礎研究および臨床研究に関する研究を行い、心筋症の新たな診断、治療法の開発を目指してきた。本年度より、本研究班を心筋症・心不全ネットワークという位置づけととらえ、サブグループ研究を行うように構築を進めてきた。8課題の提案がなされ、来年度に向けて準備を進める予定であり、心筋症に関する新たなエビデンスが期待される。

E. 結論

心筋症の病態解明に向けて、3つのレベルから研究を進めていく基盤構築を進めた。

F. 健康危険情報

(班全体として)なし。

G. 研究発表

(班全体として)なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(班全体として)なし。

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金(難治性克服研究事業) 分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—心不全におけるインスリン抵抗性と酸化ストレスの役割—

研究分担者： 筒井 裕之(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学教授)

＜研究要旨＞心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

糖尿病・インスリン抵抗性が心不全の発症・進展に密接に関与することはよく知られている。糖尿病・インスリン抵抗性患者において心不全発症が多い原因として、冠動脈病変による虚血性心筋障害だけでなく、糖尿病自体による糖尿病性心筋障害が関係していると考えられている。我々は1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン誘導性糖尿病マウスあるいは高脂肪食負荷による2型糖尿病モデルマウスに心筋梗塞を作製し、左室リモデリング及び心不全が悪化することを明らかにした。

一方、慢性心不全患者ではインスリン抵抗性が認められると報告されている。さらに心筋梗塞発症後早期において新たに発症した耐糖能異常が、その後の経過での心不全発症を含む長期予後と深く関わっていることも示されている。これらの報告は心不全自体がインスリン抵抗性を惹起し、そのインスリン抵抗性が心不全の病態の進展・増悪に深く関わっていることを示唆している。本研究の目的は心不全自身がインスリン抵抗性を惹起しうるか、またそのメカニズムは何かを解明することである。

B. 研究方法

C57BL/Jマウスに心筋梗塞(MI)を作製し、4週間飼育した。また、心エコーおよびカテーテルによる心内圧測定を行った。血糖、インスリンを測定するとともに、糖負荷およびインスリン負荷試験を行った。骨格筋を摘出し、インスリンシグナルをウエスタンブロットで評価した。また骨格筋において酸化ストレスマーカーであるTBARSおよび

NAD(P)H oxidase活性を測定した。

C. 研究結果

MI後4週間において、左室拡張末期径の拡大・左室短縮率の低下・左室拡張末期圧の増加・肺重量の増加をみとめ、左室リモデリングとともに心不全を呈した。空腹時血糖は偽手術(Sham)マウスと差を認めなかったが、空腹時インスリンレベルは有意に高値であった。結果としてインスリン抵抗性の指標であるHOMA指数は上昇した。糖負荷前後の血糖値上昇反応には差がなかったが、インスリン負荷後45分の血糖値はMIマウスで有意に高値であり、インスリン負荷前後の血糖値低下反応もMIマウスで有意に小さかった。

インスリン刺激後の骨格筋において、インスリン受容体(IR- β)のリン酸化、インスリン受容体器質1(IRS-1)のリン酸化、PI3キナーゼ(PI3K)と関連したIRS-1はいずれもMIマウスとshamマウスで変化がなかった。一方、Aktのセリンリン酸化はMIマウスで有意に低下しており、この結果と一致して糖輸送蛋白(Glut4)の細胞質分画の膜分画への移行が低下した。

MIマウスの骨格筋で酸化ストレスの亢進およびNAD(P)H oxidase活性化が認められた。MIマウスにおけるインスリン抵抗性に酸化ストレス特にNAD(P)H oxidaseが関係しているかどうかを検討するため、NAD(P)H oxidaseの活性化抑制薬であるapocyninを投与した。apocynin投与マウスでは骨格筋のNAD(P)H oxidase活性および酸化ストレスは抑制された。インスリン負荷試験においてMIマウスと比較して有意に血糖低下反応が改善した。この

結果と一致して、骨格筋におけるAktのリン酸化およびGlut4の膜分画/細胞質比が有意に増加した。

D. 考察

今回の研究において、MI後心不全モデルマウスでインスリン抵抗性が出現し、骨格筋におけるインスリンシグナル障害が生じていること、さらに骨格筋におけるNAD(P)H oxidase由来の酸化ストレス亢進がこれらの現象に関わっていることを明らかにした。今後インスリンシグナル障害の詳細な機序の検討を進めていくとともに、心不全におけるインスリン抵抗性の生理学的意義を解明していく予定である。

E. 結論

酸化ストレスの制御は、心不全におけるインスリン抵抗性の改善あるいは糖尿病における心不全の改善、さらにその結果として心不全の予後を改善する有効な治療法となり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- 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* 51(1):62-70, 2008
- Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 77(4):713-721, 2008
- Wu YW, Naya M, Tsukamoto T, Komatsu H, Morita K, Yoshinaga K, Kuge Y, Tsutsui H, Tamaki N: Heterogeneous reduction of myocardial oxidative metabolism in patients with ischemic and dilated cardiomyopathy using C-11 acetate PET. *Circ J* 72:786-792, 2008
- Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H: Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci* 28(34):8624-8634, 2008
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S: Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J Suppl A*:A-31-A-37, 2008

2) 学会発表

- Kinugawa S, Tsutsui H: The role of Angiotensin II and reactive oxygen species on exercise capacity in heart failure. 第72回日本循環器学会総会学術集会(シンポジウム), 2008年3月28日, 福岡
- Makaya M, Kato N, Kinugawa S, Gotoh D, Takeshita A, Tsutsui H: Management of the 'Real World' patients with heart failure in Japan~JCARE and J-HOMECARE trial~. 第72回日本循環器学会総会学術集会(シンポジウム), 2008年3月28日, 福岡
- 筒井裕之: 心血管リモデリング制御と高血圧・心不全治療, 第19回日本心エコー図学会学術集会(ランチョンセミナー), 2008年4月12日, 神戸
- 筒井裕之: 心血管病におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割, 第61回日本酸化ストレス学会学術集会(ランチョンセミナー), 2008年6月19日, 京都
- 筒井裕之: 高血圧・心不全治療とRA系抑制薬~最新のエビデンスと将来展望~, 第56回日本心臓病学会学術集会(ランチョンセミナー), 2008年9月8日, 東京
- 筒井裕之: 心腎連関をふまえた心血管病の治療戦略, 第56回日本心臓病学会学術集会(ランチョンセミナー), 2008年9月9日, 東京
- 筒井裕之: 心保護を目指した高血圧の治療戦略, 第31回日本高血圧学会総会(教育セッション), 2008年10月10日, 札幌
- 筒井裕之: 心不全の病態をふまえた治療戦略~理想的な周術期管理の実践のために~, 日本心臓血管麻酔学会第13回学術大会(特別講演), 2008年11月1日, 沖縄
- 筒井裕之: メタボリックシンドローム・心血管病と骨格筋機能不全, 第19回日本臨床スポーツ医学会学術集会(モーニングセミナー), 2008年11月2日, 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

< 研究協力者 >

細川真太郎(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
横田 卓(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
大田幸博(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
井上直樹(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
濱口早苗(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
平林 鑑(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
小野太祐(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
菅 唯志(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
ソビリン モハマド アリ
(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)

特発性心筋症に関する調査研究

—心不全における血清終末糖化産物(AGE)および可溶性AGE受容体(RAGE)系の意義—

研究分担者: 久保田 功(山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野教授)

〈研究要旨〉心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

慢性心不全は、人口の高齢化と心疾患の罹患率の上昇より増加しており、日本人の重大な死亡原因となっている。心不全患者では炎症性サイトカインの増加を認め、その発症に関与している。酸化ストレスも増加しており、心筋収縮障害や心室リモデリングを惹起すると考えられている。最終糖化反応生成物であるAGE(advanced glycation endproducts)は、非酵素的に蛋白の糖化や酸化により産生される。AGE受容体(RAGE)は内皮細胞や平滑筋細胞、心筋細胞など多様な組織において発現しており、AGEと結合することで酸化ストレスや細胞内シグナル伝達を介し、サイトカインや炎症メディエーターの産生を引き起す。またヒト心臓で、心機能低下とRAGE発現の増加が関連していることが報告された。そこで我々は心不全患者におけるAGEの一つである血清ペントシジンと血中可溶性RAGE(C末端を欠くRAGEアイソフォーム)が心不全の危険因子となるか検討を行なった。

B. 研究方法

1) 血清ペントシジンと心不全との関係

心不全の精査、加療目的に当院へ入院した連続141名の慢性心不全患者と18名の対照患者において血清ペントシジンをELISA法により測定した。観察期間の中央値は479日で、心臓死および心不全増悪による入院をエンドポイントとした。血清クレアチニン >2 mg/dlの腎機能低下症例は除外した。

2) 血清RAGEと心不全との関係

当院へ入院した連続160名の慢性心不全患者を対象とし、ELISA法により可溶性RAGEを測定した。観察期間の中央値は872日で同じく心臓死および心不全増悪による入院をエンドポイントとした。心

不全の原因は、拡張型心筋症29%、虚血性心疾患26%、弁膜症22%であり、40%の症例がNYHA分類Ⅲ度であった。糖尿病の合併率は24%であった。心エコーによる左室駆出率の平均は48%であった。

(倫理面への配慮)

研究参加に関しては、文書による説明を行い、同意を得た。

C. 研究結果

1) 血清ペントシジンと心不全との関係

血清ペントシジン濃度は、NYHAクラスⅢおよびⅣの重症心不全患者で、NYHAクラスⅠおよびⅡの軽症・中等症患者より有意に高値であった($P < 0.0001$)。また心イベントを認めた患者では、心イベントを認めない患者に比べて、血清ペントシジン濃度は有意に高値であった($P < 0.001$)。単変量Coxハザード試験では、年齢およびNYHAクラス、ペントシジン、クレアチニン、尿酸、BNP、左室収縮末期容積、左室心筋重量が有意な心イベント予測危険因子であった。多変量Cox比例ハザード試験では、血清ペントシジン高値は、独立した心イベント予測因子であった(ハザード比1.88, 95% CI 1.23-2.69, $P < 0.002$)。心不全患者をペントシジン濃度で4群に分けたところ、ペントシジン濃度が最も低い群に比べ、最も高い群では心イベントの発症リスクは4.52倍高かった。

2) 血清RAGEと心不全との関係

血清中の可溶性RAGEは、NYHA分類の重症例ほど高値を示した。フォローアップ期間中、11例で心臓死と37例で心不全増悪による再入院を認めた。心イベント発生群では非発生群に比べ有意に可溶性RAGEが高値であった。Kaplan-Meier解析で

は、可溶性RAGE高値群において低値群と比べ有意に心イベントが多かった。Cox比例ハザード試験により、可溶性RAGEは独立した心不全予後予測因子であった(P=0.019)。

D. 考察

ペントシジンと可溶性RAGEはともにNYHAクラスの重症度に比例し上昇し、心イベントを認めた群で有意に高値であった。またペントシジンと可溶性RAGE高値群では、低値群に比べて心イベント発症率が有意に高値であった。多変量Cox比例ハザード試験では、ペントシジンと可溶性RAGE高値群はともに独立した予後予測因子であった。糖尿病群と非糖尿病群では、両者に有意差は認めなかった。また可溶性RAGEは推定糸球体濾過率eGFRと負の相関があったが、ペントシジンはeGFRと相関を認めなかった。eGFRで補正後もペントシジンと可溶性RAGEはともに独立した予後予測因子であった。

E. 結論

血清ペントシジンおよび可溶性RAGE高値は心不全患者の独立した予後予測因子であり、心不全患者のリスク層別化に有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Koyama Y, Takeishi Y, Niizeki T, Suzuki S,

Kitahara T, Sasaki T, Kubota I. Soluble Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a prognostic factor for heart failure. *J Card Fail* 2008 Mar;14(2):133-139.

・ Ishino M, Takeishi Y, Niizeki T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Kitahara T, Suzuki S, Sasaki T, Bilim O, Kubota I. Risk stratification of chronic heart failure patients by multiple biomarkers: implications of BNP, H-FABP, and PTX3. *Circ J* 2008 Nov;72(11):1800-1805.

2) 学会発表

・ Kitahara T, Takeishi Y, Shishido T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Nishiyama S, Kubota I. Serum Midkine Predicts Cardiac Events in Chronic Heart Failure Patients. American Heart Association Scientific Sessions (New Orleans, USA/November, 2008)

・ Ishino M, Takeishi Y, Shishido T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Nishiyama S, Kubota I. Multiple Biomarkers Approach for Risk Stratification in Heart Failure Patients. American Heart Association Scientific Sessions (New Orleans, USA/November, 2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

< 研究協力者 >

渡邊 哲

(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)

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋リモデリングにおける転写因子KLF5の役割—

研究分担者： 永井 良三(東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授)

＜研究要旨＞心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

高血圧性心リモデリングにおける非心筋細胞(線維芽細胞、内皮細胞)の役割が注目されている。平滑筋形質変換を制御する転写因子として単離されたKLF5は、臓器ストレス後に誘導される間葉系細胞の活性化にも関与する。KLF5ヘテロ欠損マウス(KLF5^{+/+})では、アンジオテンシンII投与後の心線維化や心肥大が抑制されたが、その病態機序や圧負荷肥大心モデルにおけるKLF5の役割は明らかではない。KLF5遺伝子改変マウスを用いて弓部大動脈縮窄モデル(TACモデル)を作成し、圧負荷後の心肥大や線維化に及ぼすKLF5の役割を検討した。

B. 研究方法

1) 圧負荷肥大心モデルにおけるKLF5発現様式を検討する。

2) KLF5^{+/+}マウスに対して圧負荷肥大心モデルを作成し、心エコーや左心内圧測定による心機能評価を行い、心肥大・心線維化を病理学的に評価した。さらに心リモデリング関連遺伝子の発現や、圧負荷初期の非心筋細胞増殖・活性化に与える影響をBrdU assayを用いて検討した。

3) Cre-loxPシステムを用いた細胞種特異的KLF5欠損マウスの作成・解析に着手した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトを対象とする研究は行わない。細胞培養実験および動物実験は学内での利用規則・指針を遵守し、実験者および細胞・動物の安全・良環境を確保、実験結果の信頼性に配慮した。

C. 研究結果

1) 心臓におけるKLF5発現は線維芽細胞で多く

(心筋細胞比で約3-5倍)、圧負荷後第3日で最大となった。KLF5免疫染色では、心筋周囲の非心筋細胞(増殖部)でのKLF5染色性(発現)が高かった。

2) KLF5^{+/+}マウスへの圧負荷肥大心モデルの解析では、KLF5^{+/+}マウスで圧負荷後初期の非心筋細胞の増殖が抑制されており(BrdU assay)、圧負荷後の心体重比や心筋細胞径の増加、間質線維化が軽減された。遺伝子発現では胎児型心臓遺伝子(bMHC)やANPの再発現の抑制、線維化関連因子(endothelin-1, osteopontin, FGF2, CTGF, periostin)の発現低下などが認められた。

3) 心筋細胞と非心筋細胞のいずれにおけるKLF5が、心肥大・線維化の形成に重要であるかを明らかとするために、KLF5遺伝子の第2エクソン両端にloxP配列を挿入したfloxedマウスを作成し、心筋細胞や非心筋細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞)の各々に特異的に発現する各プロモーター(順にaMHC, 遺伝子X, Tie2)によってCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとの交配・解析に着手した。心筋細胞特異的KLF5欠損マウスでは、圧負荷に伴う心肥大と線維化は軽減されなかった。活性化された線維芽細胞特異的KLF5欠損マウスでは、圧負荷に伴う心肥大と線維化は共に軽減した。

D. 考察

心臓への圧負荷に伴う心肥大に、心線維芽細胞が重要な役割を担うことを示唆する結果であり、その活性化に転写因子KLF5が密接に関わる。しかしながら、心肥大や心線維化は、圧負荷に対する心組織の適応現症とも考えられ、過度の心負荷条件・病態により、その適応現症は破綻し心不全を来することが知られる。これらを考慮した心肥大・

心不全解析を行うことで、心筋細胞肥大や線維化の適切な制御機構、介入方法を明らかとしたい。

E. 結論

圧負荷後の心線維化や心筋肥大において、KLF5は重要な役割を担う。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

なし。

2) 学会発表

- ・ Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Yuichi Uchino, Ryozo Nagai. Significance of the transcription factor KLF5 in myocardial hypertrophy in response

to pressure overload. American Heart Association 81th Scientific Sessions, 2008/11/8-12, New Orleans, USA.

- ・ Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Yuichi Uchino, Hiroshi Iwata, Katsuhiko Fujiu, Yumiko Oishi, Sahohime Matsumoto, Kosei Eguchi, Ryozo Nagai. Significance of the transcription factor KLF5 in myocardial hypertrophy in response to pressure overload. 第72回日本循環器学会総会・学術集会, 2006年3月28-30日, 福岡.
- ・ 武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三, 圧負荷肥大心モデルにおける転写因子KLF5の役割. 第56回日本心臓病学会学術集会, 2008年9月8-10日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—拡張型心筋症による重症心不全に対する免疫吸着療法—

研究分担者： 小川 聡(慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科教授)

＜研究要旨＞心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

拡張型心筋症(DCM)は本邦における難治性末期心不全の主たる原因疾患である。しかしながら心臓移植待機例の内、実際に移植を受けることのできる患者はそのごく一部であるというのが現状である。DCMの発症機序の一つとして自己免疫異常が挙げられるが、その一環としてDCM患者では様々な抗心筋自己抗体が検出される。これまでの研究成果の蓄積により、少なくとも一部は病態生理学的意義を有する。免疫吸着療法(IA)はこれらの抗心筋自己抗体を除去することにより病態を改善することを目的とする治療手段である。ヨーロッパではヒツジ抗ヒト免疫グロブリン抗体やprotein Aを用いたカラムを使用しIAを行っており、DCM患者の心機能や予後の改善効果を認めた。しかしながらIA後に血中IgGの急激な低下を認めることから感染予防のためイムノグロブリン製剤の補充を必要とすること、抗ヒトIgG抗体を用いた際患者血中に混入した場合に抗原性を発現する可能性が否定できないこと、治療標的とされるIgG3サブクラスへの選択性が劣ることなどが問題点としてあげられる。IAに用いられるカラムの中でもトリプトファンカラムはIgG3サブクラスに選択性が高い、人体に対する抗原性が少ない、グロブリン製剤の補充が不要である等の利点を持つ。我々はこのトリプトファンカラムを用いて従来の治療に抵抗性の重症DCM患者に対しIAを行い、その安全性、有効性について検討を行った。

B. 研究方法

New York Heart Association分類Ⅲ・Ⅳ度、左室駆出分画<35%でβ遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体遮断薬や両

心室ペースングによる心臓再同期治療、睡眠時無呼吸に対する酸素療法などを含めた従来の治療に抵抗性のDCM患者17例(年齢53±3歳、男性8/女性9)を対象とした。ELISA法によるβ1アドレナリン受容体もしくはムスカリンM2受容体に対する自己抗体陽性を条件とした。IAは入院後ブラッドアクセス用カテーテルを内頸静脈より挿入して、1セッションを2時間かけて行い、計3回～5回行った。

C. 研究結果

17例すべての症例で重大な合併症を認めず終了した。血中BNP濃度はIA後にIA前と比べ有意に低下を認めた(IA前855±179 pg/ml 後523±128 pg/ml, p=0.009)。6分間歩行ではIA後でIA前と比べ有意に歩行距離の増加を認めた(IA前314±39 m 後360±30 m, p=0.01)。RIにより測定した左室駆出分画はIA後3ヶ月でIA前と比べ有意に増加を認めた(IA前18±2% 3ヶ月後21±2%)。β1アドレナリン受容体、M2ムスカリン受容体に対する自己抗体はいずれもIA後に陰性化もしくは抗体価の低下を認めた。IA前後での血中の各IgGサブクラス濃度を測定すると、IgG3の除去率が最も高かった。血中の炎症性サイトカイン(interleukin-6, TNF-α)はいずれもIA前後で有意な変動を認めなかった。

D. 考察

DCMにおいて自己免疫異常は重要な要素の一つである。各種抗心筋自己抗体の病的意義について数々の報告がなされている。β1アドレナリン受容体に対する自己抗体は家兎に免疫することによりDCM様の病態を誘導する。臨床的にはこの自己抗体を有する例ではより重症例が多いことが示さ

れ、 β 1アドレナリン受容体に対する自己抗体を特異的に除去するカラムを用いてIAを行い、心機能の改善を認めたとの報告がある。しかしながら自己抗体の陽性例と陰性例でいずれもIA後に心機能の改善を認め、その改善度は同等であったとする報告もあり、IAにおける本自己抗体除去の意義はいまだ完全に解明されているとは言いがたい。ムスカリンM2受容体に対する自己抗体についてもラットや家兎に免疫することでDCM様病態を誘導できることが示されている。ヒトにおいて本自己抗体の陽性例では心房細動の発症が多く、多変量解析においても本自己抗体陽性は心房細動発症の独立した危険因子であった。以前の我々の検討ではNa-K-ATPaseに対する自己抗体がDCM患者で検出され、この自己抗体の陽性患者では陰性患者に比べ心室頻拍の頻度が多く見られ、多変量解析ではこの自己抗体が心臓性突然死の最も強力な規定因子であった。今回の検討では β 1アドレナリン受容体、ムスカリンM2受容体に対する自己抗体の抗体価の低下、ないし陰性化を確認したが、これらが患者の心機能の改善とどのように関連しているかは今後の検討課題である。

IgGには4つのサブクラスがあるが、IgG3は他のサブクラスよりもヒンジ部が長いこと、自由度の高いFc領域を介して、補体C1qの結合能、Fc γ レセプターの結合能・活性化能はサブクラスの中で最も高く、すなわち、補体活性化やファゴサイトーシスの誘導(オプソニン化)など免疫担当細胞の活性化能が高いことが知られている。免疫性神経疾患の特異的自己抗体である重症筋無力症の抗アセチルコリン受容体抗体、ギラン・バレー症候群の抗ガングリオシド抗体、多発性硬化症のミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質およびミエリン塩基性蛋白質に対する自己抗体はすべてIgG3およびIgG1と報告されており、免疫活性化能との関連が示唆されている。以前の報告から、DCM患者から α 、 β ミオシン重鎖に対する自己抗体がIgG3分画に検出され、またこの抗体価は左室機能障害と相関を認め、病態への関与であるがIA前後でのTNF- α 、IL-6濃度を計測しており、有意な変動を認めなかった。

これまでのデータからIAに対するレスポンス解析を行ったがいずれの指標もレスポンスを予測するマーカーとはなりえなかった。当初自己免疫異常の素因を持つ患者がレスポンスとなりうる可能性が予測され、 β 1アドレナリン受容体、ないしムスカリンM2受容体に対する自己抗体を持つ患者がレスポンスとなりうると思われた。しかしながら実際には自己抗体陽性患者の中でもIAに対する反応が不良である患者が見受けられた。Staudtらは患者の血清より抽出した抗体をラット単離心筋細胞に加え、カルシウム・トランジェント、細胞収縮を計測し、これらが低下したものを“心抑制性抗体”陽性とした。この心抑制性抗体陽

性者ではIAに対する反応が陰性者に比べ有意に良好であった。本研究においても自己免疫異常とIAに対する反応性との関連につき現在検討中である。

今回我々は以前の報告にならぬ、最大5セッションの治療を行い1クールとし、その後の追加は行わなかった。ドイツからの報告ではIAを行った後、 β 1アドレナリン受容体に対する自己抗体の抗体価は再上昇することなく、1年間低値を維持した。長期的な心機能や抗体価の推移、さらには長期予後については今後検討が必要であり、その結果を踏まえた上でプロトコールについても再度検討が必要となる可能性がある。

E. 結論

今回の初期臨床成績では心機能・運動耐容能の改善を認め、同時に β 1アドレナリン受容体、ムスカリンM2受容体に対する自己抗体の抗体価の低下を認めた。IAは重症DCM患者において安全性が高く有効な治療法と考えられる。IAが長期的に心機能や予後に与える影響、およびこれらの自己抗体の除去と心機能との関連に関しては今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Kataoka M, Satoh T, Yoshikawa T, Nakamura I, Kohno T, Yoshizawa A, Anzai T, Ogawa S: Comparison of the effects of carvedilol and metoprolol on exercise ventilatory efficiency in patients with congestive heart failure. *Circ J* 2008;72:358-63
- Kohno T, Anzai T, Naito K, Sugano Y, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S: Angiotensin receptor blockade reduces border zone myocardial monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in post-infarction ventricular remodeling. *Circ J* 2008;72:1685-92
- Hata N, Seino Y, Tsutamoto T, Hiramitsu S, Kaneko N, Yoshikawa T, Yokoyama H, Tanaka K, Mizuno K, Nejima J, Kinoshita M: Effects of carvedilol on long-term prognosis in patients with acute decompensated chronic heart failure: the PROTECT multicenter randomized controlled study. *Circ J* 2008;72:1787-93
- Naito K, Anzai T, Yoshikawa T, Anzai A, Kaneko H, Kohno T, Takahashi T, Kawamura A, Ogawa S: Impact of chronic kidney disease on post-infarction inflammation, oxidative stress and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2008;14:831-8

- Naito K, Anzai T, Sugano Y, Maekawa Y, Kohno T, Yoshikawa T, Matsuno K, Ogawa S: Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Immunol* 2008;181:5691-5701
- Nagatomo Y, Yoshikawa T, Kohno T, Yoshizawa A, Baba A, Anzai T, Meguro T, Satoh T, Ogawa S: A pilot study on the role of autoantibody targeting the β 1-adrenergic receptor in the response to β -blocker therapy for congestive heart failure. *J Card Fail* (in press)
- Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ishizaka A, Ogawa S: Role of high mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 2009;81:565-73
- Yoshikawa T, Baba A, Nagatomo Y: Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. *Circ J* (in press)
- 2) 学会発表
 - Yoshikawa T: Autoimmune mechanisms underlying dilated cardiomyopathy. 72th Japanese Circulation Society Meeting, Controversy #2 'The cause of dilated cardiomyopathy: inflammation or genetic', Fukuoka, Mar 29, 2008
 - Yoshikawa T: New horizon in the treatment of heart failure: from bench to bedside. 17th Annual Scientific Meeting of Indonesian Heart Association, Apr 18, 2008, Jakarta
 - Yoshikawa T: Significance of cardiac-specific autoantibodies as cardiac biomarkers in patients with dilated cardiomyopathy. 11th Annual Toronto International Heart Failure Summit, Toronto, Jun 12, 2008
 - 馬場彰泰, 島田 恵, 高橋路子, 赤石 誠, 長友祐司, 吉川 勉, 小川 聡, 猪又孝元, 和泉 徹: 重症心不全に対するアフェレーシス. 第56回日本心臓病学会パネルディスカッション8「重症心不全の非薬物治療」, 2008年9月10日, 東京
 - Yoshikawa T, Baba A: Cardiac-specific autoantibodies as a new therapeutic target for patients with dilated cardiomyopathy. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Symposium #2 "Inflammatory and immune response in heart failure", Oct 17, 2008, Tokyo
 - 門川俊明, 吉川 勉, 長友祐司, 馬場彰泰, 小川 聡, 林 松彦: 拡張型心筋症に対する免疫吸着療法の安全面からのプロトコルの検討. 第29回日本アフェレーシス学会シンポジウム「心臓血管疾患のアフェレーシス治療」, 2008年11月22日, 広島
 - 馬場彰泰, 吉川 勉, 門川俊明, 村山 章, 池田 亜希子, 若林靖久: 拡張型心筋症に対する免疫吸着療法. 第29回日本アフェレーシス学会シンポジウム「心臓血管疾患のアフェレーシス治療」, 2008年11月22日, 広島
 - Yoshikawa T, Nagatomo Y, Monkawa T, Ogawa S, Baba A, Wakabayashi Y, Akaishi M: Cardiac-specific autoantibodies as a therapeutic target for refractory heart failure due to dilated cardiomyopathy. 25th Annual Meeting of International Society for Heart Research (Japanese section), Symposium #3 'Inflammation as a target for cardiovascular diseases', Dec 6, 2008, Yokohama
 - Naito K, Anzai T, Sugano Y, Maekawa Y, Kohno T, Yoshikawa T, Ogawa S: Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling after myocardial infarction. 11th International Toronto Heart Failure Summit, Jun, 2008
 - Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Anzai A, Mano Y, Maekawa Y, Ogawa S, Yoshikawa T: Increased expression of human C-reactive protein aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. European Congress of Cardiology 2008, Aug, 2008
 - Nagatomo Y, Baba A, Ito H, Naito K, Yoshizawa A, Kurita Y, Nakamura I, Monkawa T, Matsubara T, Wakabayashi Y, Ogawa S, Akaishi M, Yoshikawa T: Short-term experience of immunoabsorption therapy for refractory heart failure due to dilated cardiomyopathy. American Heart Association Meeting 2008, Nov, New Orleans
 - Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Anzai A, Mano Y, Maekawa Y, Ogawa S, Yoshikawa T: Increased C-reactive protein expression exacerbates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Meeting 2008, Nov, New Orleans
 - 中溝ひかる, 矢田浩崇, 岩永史郎, 三好俊一郎, 佐藤俊明, 副島京子, 村田光繁, 福本耕太郎, 谷本耕司郎, 富樫郁子, 吉川 勉, 小川 聡: CRT 適応判定におけるスペクトルトラッキングストレインのピークの解析. 第56回日本心臓病学会, 2008年9月25日
 - Nagatomo Y, Baba A, Kurita Y, Nakamura I, Monkawa T, Matsubara T, Wakabayashi Y, Ogawa S, Akaishi M, Yoshikawa T: Short-term experience of immunoabsorption therapy for refractory heart failure due to dilated cardiomyopathy. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 17, 2008
 - Nakamizo H, Yada H, Iwanaga S, Miyoshi S, Suzuki K, Murata M, Sato T, Soejima K, Yoshikawa T, Ogawa S: High velocity peak of the ventricular septum during isovolumic contraction

- period in tissue imaging represents intraventricular dyssynchrony. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 17, 2008
- Mano Y, Anzai T, Takahashi T, Nagatomo Y, Koide K, Kaneko H, Meguro T, Yoshikawa T, Ogawa S: Effect of human C-reactive protein on cardiac function and angiotensin 2 signaling in diabetic cardiomyopathy. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Anzai A, Mano Y, Maekawa Y, Ogawa S, Yoshikawa T: Effect of increased C-reactive protein expression on left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Koide K, Yoshikawa T, Nagatomo Y, Anzai T, Meguro T, Ogawa S: Persistent elevation in troponin T level during convalescence is associated with inflammatory response in patients with decompensated heart failure. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Nozaki T, Kohsaka S, Koide K, Nagatomo Y, Ito H, Meguro T, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: Usefulness of biomarkers in predicting functional class recovery in patients admitted with heart failure. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Ito S, Kohsaka S, Koide K, Nagatomo Y, Ito H, Meguro T, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: Impact of optimal medical therapy at discharge in patients with heart failure: characteristics and long-term outcome. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Yoshimatsu Y, Kohsaka S, Koide K, Nagatomo Y, Ito H, Meguro T, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: Use of renin-angiotensin inhibitors at discharge in patients hospitalized for heart failure is associated with improved survival. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 16, 2008
 - Ito H, Nagatomo Y, Kohno T, Anzai T, Meguro T, Ogawa S, Yoshikawa T: Differential effects of carvedilol and metoprolol on renal function in patients with heart failure. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 17, 2008
 - Nagatomo Y, Meguro T, Ito H, Koide K, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: AT1 signaling blockade has beneficial effects on diabetes-induced cardiomyopathy through upregulation of heat shock proteins and attenuation of apoptosis. 12th Japanese Heart Failure Society Meeting, Oct 17, 2008
- H. 知的財産権の出願・登録情況
なし。
- <研究協力者>
吉川 勉(慶應義塾大学循環器内科)
長友祐司(慶應義塾大学循環器内科)
馬場彰泰(北里研究所病院循環器科)

特発性心筋症に関する調査研究

一実験的自己免疫性心筋炎におけるラジカルスカベンジャーによる電気的・構造的リモデリングの予防効果—
研究分担者： 和泉 徹(北里大学医学部循環器内科学教授)

＜研究要旨＞心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

我々はこれまでに、N-acetylcysteineの超急性期投与がreactive oxygen species(ROS)調整を通じて実験的自己免疫性心筋炎(EAM)の電気的リモデリングを予防することを報告した。すなわち、ROSは自己免疫機序とともに心リモデリング進行において鍵を握る役割を有し、特に発症急性期におけるROS抑制は心筋炎の発症予防に重要な方法論と考えられた。今回別ラジカルスカベンジャーであるnicaravenを用い、EAMでのリモデリング予防効果が投与時期によりどのように修飾されるかを検討した。

B. 研究方法

300もしくは900mg/kg/日のnicaravenをミオシン免疫後の10-14日目(超急性期、S群)もしくは14-21日目(急性期、A群)にEAMラットに腹腔注射した。免疫後21日目に屠殺し、組織学的所見(HE染色、酸化ストレス指標となるNe-hexanoyl-lysine: HEL染

色)、電気生理学的所見(心室有効不応期: ERPおよび単相性活動電位時間: MAPD)、リアルタイムPCR法による左室筋からのmRNA定量(Kv4.2, 4.3, 1.4, ERG, α -subunit of L-type Ca^{2+} ; SERCA2a, RyR, and Na^{+}/Ca^{2+} exchanger; TNF- α , BNP; Internal controlsとしてのcyclophilin)を行った。

C. 研究結果

1) EAMラットでは突然死が見られたが、非EAM(コントロール)ラットおよびnicaraven超急性期治療群(S群)では突然死がなかった。

2) nicaravenは組織学的な心筋炎重症度を用量依存性に抑制したが、その抑制の程度は急性期治療群(A群)よりS群で軽度であった。EAM発症ラットでの心筋局所では明瞭にHEL染色が確認されたが、S群では用量依存性に発現の抑制が見られた。

3) EAMではERPとMAPDが延長するが、その延長はS群でのみ用量依存性に抑制された(図1)。

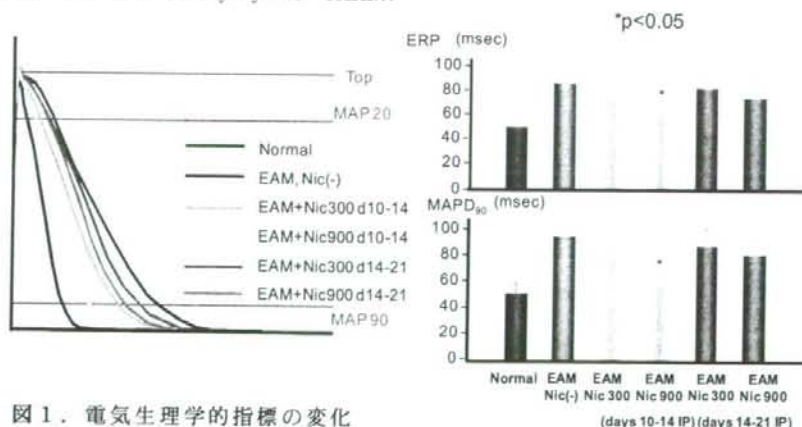


図1. 電気生理学的指標の変化

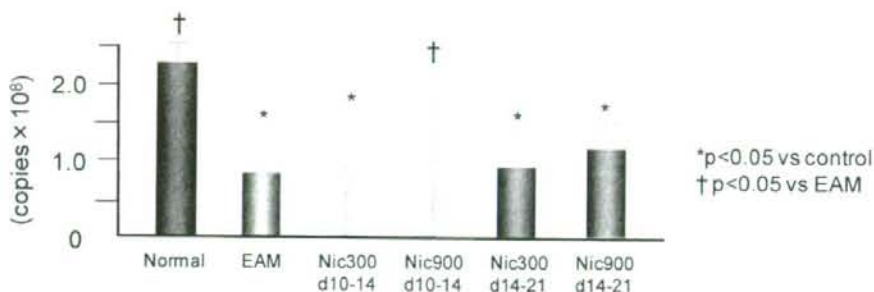


図2. Ito 関連分子 Kv4.2 mRNA 発現の変化

4) EAMではItoチャンネルを主要に構成するKv4.2のmRNA発現が低下し、その低下はnicaravenにて抑制されるが、有意差を持って抑制をもたらすのはS群のみであった(図2)。他のイオンチャンネル発現に変化は見られなかった。一方、EAMにて亢進するBNPとTNF- α 発現も同様に、nicaravenによる用量依存性の抑制が認められた。

D. 考察

nicaravenによるROS抑制に基づくEAMでの電氣的及び構造的リモデリングの抑制はN-acetylcysteine同様、EAM超急性期での投与時で認められた。ROSはEAM病態の様々な時相で病態形成に関与することが予想されるが、心リモデリング進行に関わる自己免疫機序でのROSの関与は心筋炎発症初期の効果期(effector phase)で特に重要であると思われる。

E. 結論

EAM超急性期のnicaraven投与は、電氣的および構造的リモデリングを抑制する。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

なし。

2) 学会発表

・ Niwano S, Niwano H, Sasaki S, Kurokawa S, Fukaya H, Izumi T. The importance of the phase of administration of radical scavenger to prevent the electrical and structural remodeling in rat experimental autoimmune myocarditis. The ESC Congress 2008, 30 Aug-3 Sep in Munich.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

庭野慎一(北里大学医学部循環器内科学)
佐々木紗英(北里大学医学部循環器内科学)
庭野裕恵(北里大学医学部循環器内科学)
猪又孝元(北里大学医学部循環器内科学)

特発性心筋症に関する調査研究

—心拒絶反応の進展予防におけるクラリスロマイシンの役割—

研究分担者： 磯部 光章(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学教授)

＜研究要旨＞心筋症は、最新の医療・医学を駆使しても依然循環器疾患における予後不良な疾患群である。心筋症の病態は、分子生物学や家系解析などによる遺伝解析の進展により、心筋細胞を構成する構造蛋白、チャネル蛋白、Caハンドリング蛋白などによる機能低下に起因することが一部明らかになってきたが、未だその病態には、まだ不明な点が多々あるのが現状である。本研究班においては、(1)全体研究、(2)サブグループ研究、(3)個別研究という3段階のレベルで研究を進めていくこととした。(1)全体研究は、前班研究の調査研究であるCCMM研究を引き続き進め、現時点における心筋症の現状を調査することとした。(2)サブグループ研究としては、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして捉え、心筋症における新たな課題に対して、サブグループを構成し、研究を進める体制を新たに構築した。(3)個別研究は、心筋症に関する各班員の先端的臨床・基礎研究を進めていくこととした。これらの複合的研究をもとに、心筋症に対する新たな診断・治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

心移植後の長期観察において心臓の移植片は血管内に平滑筋(smooth muscle cells: SMCs)、細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)や様々な浸潤細胞で構成された新生内膜が形成され、血管が狭窄する(graft arterial disease: GAD)。GADの有効な予防法や治療法についてはまだ知られていない。

クラリスロマイシン(clarithromycin: CAM)は14員環のマクロライド系の抗生物質で実際に様々な感染症の治療薬として用いられている。今回の研究で我々はCAMがマクロファージやSMCsから産生されるMMP(matrix metalloproteinase)を阻害する事を明らかにした。リンパ球、単球/マクロファージなどの多くの炎症性細胞はMMPを産生し、ヒトやほ乳類での臓器移植片ではその発現が増強される事が報告されている。MMPはコラーゲンやプロテオグリカンなどECMのタンパク分解酵素の一つとして認識されていて、ECMの分解は炎症や組織リモデリングの過程において重要なイベントとなる。MMPの一つであるMMP-9は特に組織のリモデリングやSMCsやマクロファージなど様々な細胞の遊走に関わっている。多くの実験モデルでMMP-9の過剰発現がECMの分解を介して血管の狭窄とリモデリングを促進することが報告されている。しかし心臓移植において急性拒絶及び慢性拒絶におけるMMP-9の役割については知られていない。そこで本研究ではCAMのMMP-9抑制効果が急性拒絶または慢性拒絶に対する影響について検討した。

B. 研究方法

実験動物と心臓移植

ドナーマウスBALB/cとレシビエントマウス

C57BL/6の組み合わせは急性拒絶(主要組織適合抗原: major histocompatibility complex (MHC) total allomismatch group)を調べるために用い、C57BL/6 Bm12とC57BL/6との組み合わせは慢性拒絶(MHC class II mismatch)の検討に用いた。

ドナー心をレシビエントの腹部に移植する異所性心臓移植法を行い、レシビエントマウスにはCAM(100mg/kg)を1日2回、連日経口投与した。移植片は犠牲死の後病理学的検討とRNase Protection Assay(RPA)による分子生物学的方法により評価した。またin vivoにおけるMMPの発現はin situザイモグラフィ、免疫組織化学染色により確認した。In vitroにおいてはウェスタンブロット、RT-PCRにてMMP-9、MMP-2、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1の発現を確認し、CAMによる平滑筋の遊走能、増殖能の変化を確認した。

(倫理面への配慮)

これらの実験は東京医科歯科大学の実験動物の使用ガイドラインに沿って行った。

C. 研究結果

急性拒絶群において無治療群の移植片では7.3 ± 0.2日で拒絶が起こるが、CAM投与群では有意な生着の延長が見られた(図1)。移植後7日目の移植片において無治療群では広範囲に細胞の浸潤が多く見られる事が確認できた。CAM投与群ではその細胞浸潤面積は有意に減少していた。Mallory染色による線維化部位も同様に無治療群で広範囲に存在し、CAM投与により有意な減少が見られた。慢性移植群において無治療群では心筋への高度な細胞浸潤や線維化が見られた。CAM投与において有意に浸潤、線維化の抑制が見られた。またGADも

CAMを投与する事により抑制された(図2)。

免疫染色において、無治療群では急性拒絶を起こした移植片においてCD4、CD8、CD11b、NF- κ B、ICAM-1の発現が増強される事が確認されたが、CAMを投与した群ではそれらの発現が抑制されていた。急性拒絶モデルの7日目の心臓を採取しmRNAの発現をRPAで確認した。無治療群の移植片で炎症性サイトカインのmRNAの発現が増強していたが、CAM投与によってそれらの発現は減少した(図3)。

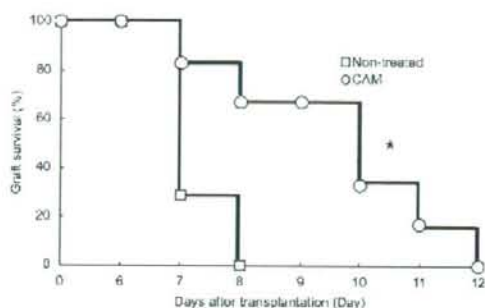


図1. 移植心生着率

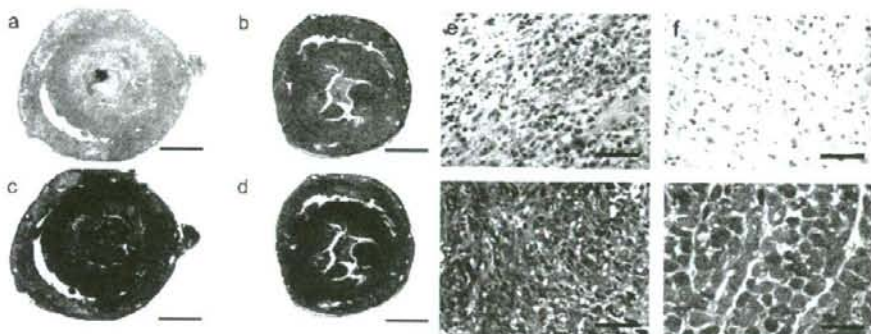


図2. 移植心病理所見
(上段: HE染色、下段: Mallory染色)

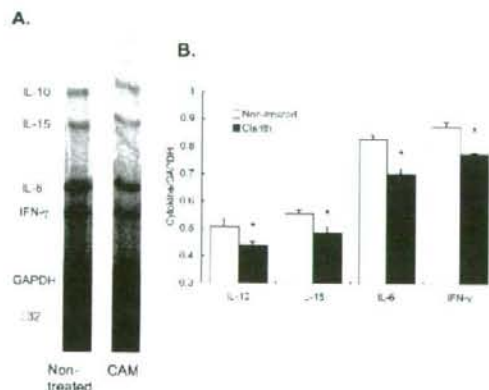


図3. 急性モデルにおけるサイトカイン発現

MMPの活性は無治療の移植片の細胞浸潤部分に強い反応が見られる。これもCAM投与によって抑制されていた。免疫染色において、無治療群では浸潤細胞上にMMP-9の発現が見られたが、CAMの投与はその発現を抑制した(図4)。

J774.1細胞をIL-1 β で刺激するとvehicle群では無刺激群と比べてMMP-9の強い発現が見られたがCAMの投与によってMMP-9のタンパク、mRNAレベルは減少していた。培養平滑筋細胞においてもCAM投与においてMMP-9発現が減少する事が確認された。MMP-2レベル、TIMP-1レベルは、心筋組織上および培養平滑筋細胞においても、コントロール群とCAM投与において変化は見られなかった(図5)。

平滑筋細胞にPDGF-BB刺激を行うと細胞の顕著な増殖が見られるが、CAMを2.0 μ Mと20 μ Mの濃度で投与すると細胞の増殖は抑制された。細胞遊走評価分析でもコントロール群で下層への細胞の遊走が強く見られた一方、CAMの投与により細胞の遊走も抑制する事が確認された(図6)。

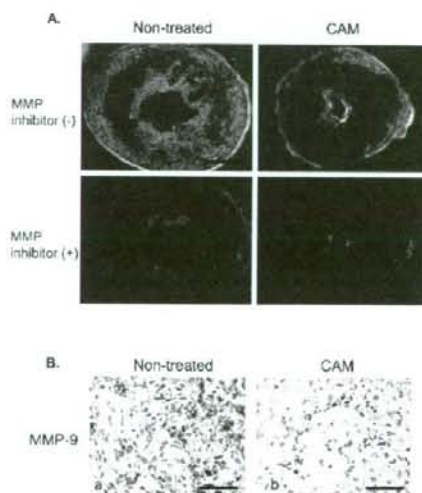


図4. Zymographyによるgelatinase活性(A)、免疫染色によるMMP-9発現(B)