

図5. 培養細胞における MMP および TIMP の発現と CAM による抑制
A: Western blot, B: RT-PCR

D. 考察

慢性拒絶で起こる移植片血管病変(GAD)の進展をCAMが抑制する事が示された。GADは移植後冠血管狭窄による虚血性の移植片不全であり、その効果的な治療やその予防法についてはまだ確立されていない。CAMは多くの治療手段として使われている薬であり、CAMによるGADが抑制される事は重要な観察である。慢性拒絶では炎症細胞や血管壁の細胞から、平滑筋増殖、遊走に関わる液性因子が放出される。MMP-9は平滑筋細胞の遊走能獲得に関与しており、遊走は血管障害時における内膜の肥厚に寄与している。今回の実験結果ではCAMはマクロファージと平滑筋細胞でMMP-9の発現を抑制させるがMMP-2の発現には関与しなかった。さらに今回の結果でCAMはTIMP-1の強発現を起こすことなくMMP-9の発現を抑制することが明らかになった。

CAMは直接的にMMP-9の発現を制御していると考えられる。CAMは抗生物質としての抗菌作用だけではなく多様な効果を持っている。16員環のマクロライドではそのような多様な効果はなく、14員環のマクロライドだけの特徴だと考えられている。以前の報告で、*in vitro*や*in vivo*で14員環マクロライドの一つであるエリスロマイシンがMMP-9とMMP-2との発現を抑制する事が確認されている。

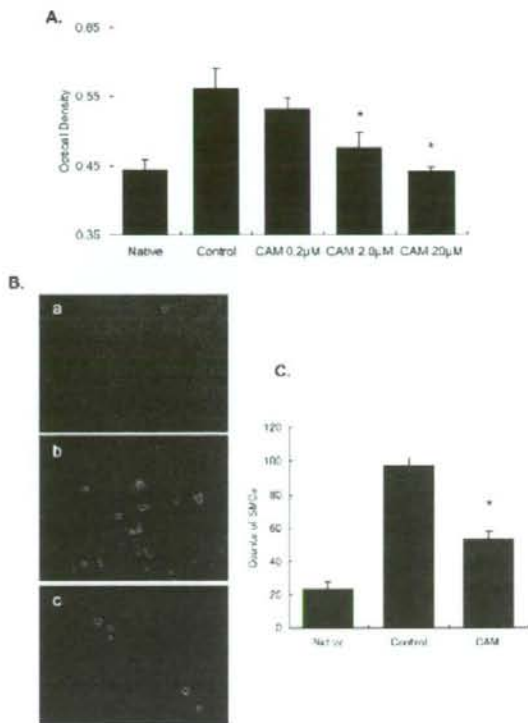


図6. CAM による細胞遊走の抑制

CAMはMMP-9だけを抑制するので、今回の結果はCAMが選択的なMMP-9の阻害剤としての潜在的な能力を持っているものと考えられる。しかしながら、CAMとMMP-9についての詳細な機構はまだわかっていない。今後さらなる検討が必要である。

急性拒絶の実験ではCAMがMMP-9活性阻害による炎症性細胞の遊走や細胞の浸潤の抑制を介して心筋の炎症と線維化を抑制する事が示された。慢性拒絶の実験ではCAMがMMP-9阻害による平滑筋細胞の増殖や遊走を抑制する事によりGADの進展を抑制する事を示した。CAMにはまだ様々な効果があると期待できるため今後はその他の因子についても確認する事が重要であると考えられる。

E. 結論

CAMはMMP-9の活性を阻害する事により急性及び慢性拒絶を抑制する作用を持っている。クラリスロマイシンは免疫抑制作用を持たず、また一般臨床に安全に用いられている薬剤である。そのため移植後患者への適用が期待出来る。さらにその他の炎症性の心血管病に対しても治療効果が期待出来る。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Ogawa M, Suzuki J, Hishikari K, Takayama K, Tanaka H, Isobe M: Clarithromycin attenuates acute and chronic rejection via matrix metalloproteinase suppression in murine cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol* 20;51(20), 1977-85, 2008.
- Saiki H, Suzuki J, Kosuge H, Haraguchi G, Ishihara T, Haga T, Maejima Y, Isobe M, Uede T: Blockade of the 4-1BB pathway attenuates graft arterial disease in cardiac allografts. *Int Heart J* 49: 105-118, 2008
- Tamamori-Adachi M, Takagi H, Hashimoto K, Goto K, Hidaka T, Koshimizu U, Yamada K, Goto I, Maejima Y, Isobe M, Nakayama KI, Inomata N, Kitajima S: Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. *Cardiovasc Res* 80: 181-190, 2008
- Suzuki J, Ogawa M, Muto S, Itai A, Isobe M: A specific inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 suppresses rat autoimmune myocarditis. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1313-20, 2008
- Goda A, Isobe M: Effects of a work rate increase during cardiopulmonary exercise testing in respiratory gas indexes in patients with chronic heart failure. *Jpn J Clin Physiol* 38: 167-173, 2008
- Konishi M, Maejima Y, Inagaki H, Haraguchi G, Hachiya H, Suzuki J, Hirao K, Isobe M: Clinical characteristics of acute decompensated heart failure

with rapid onset of symptoms. *J Heart Failure*, in press

- Haga T, Suzuki J, Kosuge H, Ogawa M, Saiki H, Haraguchi G, Maejima Y, Isobe M, Uede T: Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking T cell activation through 4-1BB pathway. *J Mol Cell Cardiol*, in press
- Ogawa M, Suzuki J, Isobe M: The Mechanism of Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandin E2 Receptor 4 Activation in Murine Cardiac Transplantation. *Transplantation*, in press

2) 学会発表

- Suzuki J, Ogawa M, Isobe M: Clarithromycin attenuates acute rejection and myocardial remodeling by altered MMP expression in murine cardiac allografts. 世界移植学会 2006, 7月22-27日, ボストン
- Suzuki J, Ogawa M, Takayama K, Isobe M: Clarithromycin Inhibited MMP-9 Activation and Attenuated Acute and Chronic Rejection in Murine Cardiac Allografts. AHA 2007, 11月 4-7日, オーランド

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

< 研究協力者 >

鈴木淳一

(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学・
東京大学先端臨床医学開発学)

小川真仁(東京医科歯科大学大学院循環制御内科学)

特発性心筋症に関する調査研究

—拡張型心筋症発症におけるCaMK II α とp53の役割—

研究分担者： 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)

<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

心疾患による死亡は、悪性腫瘍に次ぐ日本人の死因の第2位であり、ここ数年人口1,000人あたり約100人が心疾患により死亡している。心疾患死の原因は、虚血性心疾患や高血圧性心疾患、心筋症(肥大型心筋症、拡張型心筋症など)など多岐にわたる。これまでの多くの研究や治療法の開発により、高血圧性心疾患や虚血性心疾患の予後は改善してきているが、心不全の原因疾患のひとつである拡張型心筋症の予後は、現在でも10年生存率50%程度と非常に不良である。我が国においても1997年10月に「臓器移植に関する法律」が施行され、1999年から2005年までに27人に心臓移植が実施されたが、日本における心臓移植においては絶対的にドナー不足の状態である。今後も心臓移植により加療できる患者数は限られていると言わざるを得ず、新たな治療法の確立が切望されている。近年の分子生物学的研究の進展に伴い、拡張型心筋症の約30%は遺伝子変異によることが明らかとなってきたが、遺伝子変異より心不全に至る機序については未だ不明である。今後新しい治療法を開発するには、この分子機序の解明が必要であると考え、その機序の解明を目的とする。

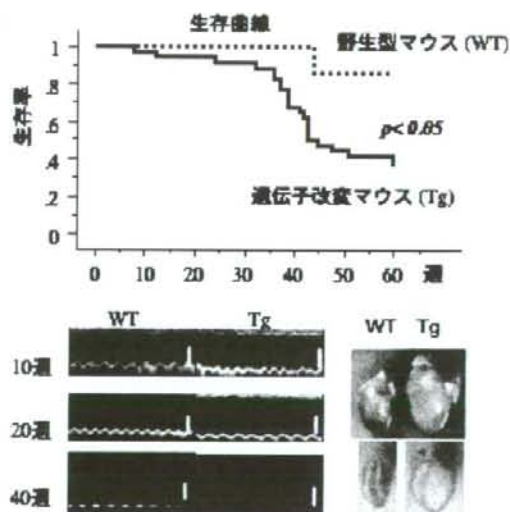
B. 研究方法

これまで拡張型心筋症の発症機序が明らかにならなかった理由の一つに、拡張型心筋症を解析するための適切なモデルマウスが存在しなかったことが挙げられる。そのため我々はまず、ヒト拡張型心筋症の原因として既に報告のある変異遺伝子をマウスの心臓に過剰発現させ拡張型心筋症モデルマウスを作成し、その拡張型心筋症モデルマウスを用いて拡張型心筋症の発症機序の解明を目指

す。

C. 研究結果

拡張型心筋症の発症機序の解明のため、我々はヒト拡張型心筋症の原因として報告のある変異心筋 α アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成した。この遺伝子改変マウスは、次第に左室内腔が拡大、心収縮力は低下し、30週齢より死亡した(図)。



次に野生型マウスと拡張型心筋症モデルマウスの蛋白レベルをwestern blottingにより検討した。野生型マウスと比較し、拡張型心筋症モデルマウスの心臓ではカルシウム依存性リン酸化酵素であ

るカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) II δ やその標的蛋白であるホスホランパンのリン酸化レベルが増加していた(図)。またがん抑制遺伝子であるp53やその標的遺伝子であるBaxの蛋白レベルが拡張型心筋症モデルマウスで増加していた。

CaMK II δ の増加が拡張型心筋症の発症に重要か否かをその阻害薬であるKN-93を用いて検討した。野生型マウスと拡張型心筋症モデルマウスに2ヶ月齢より5ヶ月齢までKN-93をosmotic minipumpを用いて投与した。KN-93投与により、拡張型心筋症モデルで認めた心内腔の拡大や心収縮力の低下は改善した。

次に、p53ヘテロノックアウトと交配することにより、拡張型心筋症の発症におけるp53の役割を検討した。結果、p53を減少させることにより、拡張型心筋症モデルマウスの心機能は改善した。さらに、拡張型心筋症モデルマウスで認めたTUNEL陽性心筋細胞の数もp53ヘテロノックアウトマウスとの交配により減少した。

D. 考察

ヒト拡張型心筋症の原因として報告のある変異心筋 α アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成した。この遺伝子改変マウスは、次第に左室内腔が拡大し、心収縮力は低下し、30週齢より死亡した。この経過や表現型はヒト拡張型心筋症と酷似しており、ヒト拡張型心筋症の研究を行う上で非常に有益なモデルマウスであると考えられる。

拡張型心筋症モデルマウスではCaMK II δ の活性が亢進していた。CaMK II δ は、心筋梗塞後の予後や致死性不整脈への関与が指摘されており、またその過剰発現マウスが拡張型心筋症様病態を呈することが報告され、心疾患における役割が注目されている。本拡張型心筋症モデルマウスにおいても、CaMK II δ を抑制することにより心内腔の拡大や心収縮力の低下が軽減することより、CaMK II δ が拡張型心筋症発症にも重要であると考えられる。しかし、なぜCaMK II δ の活性が亢進するの

か、またなぜCaMK II δ の活性化により心機能が低下し、心内腔が拡大するのかに関しては今のところ不明である。今後、CaMK II δ の活性化の機序並びにCaMK II δ による心機能低下の機序を検討する予定である。

我々は最近、心肥大から心不全に至る機序にがん抑制遺伝子であるp53が重要であることを、Nature誌に報告した。また、心筋梗塞後の心筋リモデリングにもp53が重要であることが報告され、p53と心疾患との関係に関して注目されている。この拡張型心筋症モデルマウスでも、p53およびその標的遺伝子であるBaxの蛋白量が増加していた。p53ヘテロノックアウトマウスとの交配により、p53の蛋白量を抑制すると拡張型心筋症の発症は抑制され、また拡張型心筋症モデルマウスで認めたTUNEL陽性心筋細胞数の増加も抑制された。このことより、p53により誘導される心筋細胞アポトーシスの増加が、拡張型心筋症の発症に重要であると考えられた。現在、拡張型心筋症におけるp53蛋白レベルの増加の機序に関して検討中である。

E. 結論

CaMK II δ とp53は拡張型心筋症の発症に重要な役割を担っていると考えられた。

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

・ Activation of CaMKII δ is Critically Involved in Mutated Cardiac Alpha-Actin Induced Dilated Cardiomyopathy. Basic Cardiovascular Science Conference, Colorado, July 28-31, 2008.

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

—心筋症と左室心筋緻密化障害の発症に関わる要因—

研究分担者： 山岸 正和(金沢大学循環器内科教授)

＜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

近年、肥大型心筋症の原因とされるサルコメア蛋白遺伝子の変異が拡張型心筋症でも同定され、家族性拡張型心筋症の約30%にサルコメア蛋白遺伝子変異が検出されることが報告されている。一方、左室心筋緻密化障害は心室壁の網目状の肉柱形成と深い間隙、および左室収縮障害を特徴とする心筋症で、新生児期に心不全で死亡することが多いが、近年、小児や成人での報告例がみられる。また左室拡大をきたすことが多く、拡張型心筋症との鑑別が困難な例もある。そこで我々は拡張型心筋症および左室心筋緻密化障害と診断された患者を対象として、原因遺伝子の遺伝子解析を行った。その上で、検出された遺伝子変異の疾患起因性を明らかにすることを目的として、同遺伝子変異をモデルマウスに導入して臨床病型を解析した。

B. 研究方法

金沢大学循環器内科および関連施設で診断された99名の拡張型心筋症患者と5名の孤立性左室心筋緻密化障害の患者に対し、書面でのインフォームドコンセントを得た後、末梢血液を採取して白血球を分離し高分子DNAを抽出した。PCR、SSCP法を用いて遺伝子変異を探索した。その結果、孤立性左室心筋緻密化障害の患者1名にbMHC遺伝子の新変異p.Met531Argを同定した。患者は13歳の女性で、13歳時に心不全を発症して拡張型心筋症と診断されたが、翌年心不全死した。剖検の結果、左室の著明な拡大と心尖部を中心とした左室の細かい肉柱形成と肉柱間の深い間隙を認め、孤立性左室心筋緻密化障害と診断された。一卵性双生児の姉は13歳時に拡張型心筋症と診断され急性心不全で死亡した。しかしながら、生前に遺伝子検査は施行されなかった。家系調査ならびに遺伝学的親

子鑑定の結果、de novo変異と診断した。

患者は若年で心不全死し、家系調査による臨床的表現型から疾患起因性を証明することが不可能であったため、同定されたbMHC遺伝子変異と疾患との関係を、トランスジェニックマウスを作製することにより検証した。

同定されたbMHC遺伝子の変異部位のアミノ酸は種を超えて保存されており、その前後の塩基配列はヒトとマウスで同一である。この塩基配列をもとにヒトbMHC遺伝子と同等なマウス心筋 α ミオシン重鎖(aMHC)のcDNAにMet532Arg変異を組み込み、変異aMHC cDNAを作製した。この変異DNA溶液をマウス受精卵の前核中にマイクロインジェクションし、一晚培養して発生した2-細胞期胚を受容雌マウスの卵管内へ移植してマウスを誕生させた。得られたマウスの尾部先端から染色体DNAを調整し、至適プライマーを作成して、PCR法により遺伝子導入を確認した。確認された変異マウスにおいて系統を樹立し、RT-PCR法により心筋組織からmRNAを調整し導入遺伝子の発現解析を行った。このうち導入遺伝子の発現の強い系統41と系統23を用いて心臓の性状評価を行った。変異マウスを生後3、12、15、18月齢にそれぞれ断頭して心臓をホルマリン固定し、マクロおよびミクロ病理組織標本を作製して病理組織学的評価を行った。また16月齢に電子顕微鏡を用いて、左室心筋細胞の形態評価を行った。

(倫理面への配慮)

この実験は、金沢大学組み換えDNA実験安全委員会の承認を得て、金沢大学動物実験規程に沿って行った。

C. 研究成果

心臓の病理組織学的検査の結果、マクロ像ではp.Met532Arg aMHC変異マウスは正常マウスに比し、生後3月齢で左室肥大が生じ始め、12月齢でびまん性

の左室肥大を認め、18月齢で約25%の変異マウスが著明な左室拡大を呈した。左室心筋緻密化障害の所見は認められなかった。ミクロ像では15月齢の変異マウスで心筋細胞の肥大と心筋の錯綜配列が認められ、また心内膜側を中心に間質の線維化が認められた。電子顕微鏡検査では、16月齢の変異マウスではサルコメアの短縮と心筋フィラメントの配列異常、M線の不明瞭化、およびZ帯の肥厚が認められた。これらの病理組織異常所見は正常マウスでは認められなかった。また12月齢での死亡率は、正常マウスが3.3%であったのに比し、変異マウスでは約20%と増加を認めた。8~10月齢で施行した心臓超音波検査では正常マウスと同様に左室収縮能は良好であったが、びまん性に左室壁の有意な肥厚を認めた。4月齢の変異マウスの左室心筋では正常マウスに比してβMHC遺伝子の発現が系統41で4.6倍、系統23で5.6倍に亢進し、心筋ストレスの増加が示唆された。

D. 考察

我々は世界で初めて、孤立性左室心筋緻密化障害の患者にde novo新変異βMHC遺伝子p.Met531Argを同定した。Met531はアクチン線維と結合する機能的に重要な部位であり、最近重症の拡張型心筋症家系でMet531近位部でのミスセンス変異が報告されている。このため、本例でもβMHC遺伝子p.Met531Argにより重症の心筋症をきたした可能性が考えられる。

左室心筋緻密化障害と遺伝子変異との関係を明らかにするため、p.Met532Arg αMHC 変異マウスを作製した。その結果、p.Met532Arg αMHC Tgマウスでは肥大型心筋症から拡張型心筋症に移行するような病理所見を認めたものの、左室心筋緻密化障害の所見は認められなかった。この原因として、形態発生におけるマウスとヒトとのMHC遺伝子発現の違いによる影響が考えられる。ヒトでは、心室心筋ではαMHCよりもβMHC遺伝子の発現が優位である。一方、マウスでは、βMHCよりもαMHC遺伝子の発現が優位であるが、胎生期の心筋の緻密化が生じる時期には、心室心筋ではαMHC遺伝子の発現が一時的に低下しβMHC遺伝子の発現が優位となることが知られている。このため心室心筋の緻密化に対して、マウスのαMHC遺伝子変異の影響はヒトのβMHC遺伝子変異よりも小さく、変異マウスでは緻密化の過程に障害を与えなかった可能性がある。

また心筋症モデルにおいてαMHC 変異マウスでは、ヒトよりも表現型が軽症である可能性がある。ヒトにおいてβMHC遺伝子p.Arg403Glnは重篤な肥大型心筋症を認め突然死をきたし予後不良であることが知られている。一方、このモデルマウスであるp.Arg403Gln αMHC 変異マウスでは、軽度の心肥大と心機能異常を認めるのみで、生存率は正常であった。p.Met532Arg αMHC 変異マウスではp.Arg403Gln αMHC 変異マウスに比し、病理所見でより重度の心筋障害を認めたことから、ヒトにおいてβMHC遺伝子p.Met531Argは重篤な心筋症をきたす原因となったと考えられる。またp.Met532Arg αMHC 変異マウスでは肥大型心筋症から拡張型心筋症に移行する所見が一部認められたことから、肥大型心筋症と拡張型心筋症は発生学的に同一線

上にある可能性が考えられる。

E. 結論

若年で心不全死した孤立性左室心筋緻密化障害の患者にβMHC遺伝子Met531Argのde novo新変異を同定した。疾患起因性を証明するため作製したp.Met532Arg αMHC 変異マウスでは、左室心筋緻密化障害の所見は認めなかったが、左室心筋の肥厚と、一部左室拡大を後に認め、死亡率の増加を認めた。以上より、βMHC遺伝子p.Met531Argは悪性心筋症の原因となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Oe K, et al. Takotsubo cardiomyopathy with marked ST-segment elevation and electrical alternans complicated with hyperglycemic hyperosmolar state. *Int Heart J* 14: 65-71, 2008年
- Kaneda T, et al. A novel beta-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. *Clin Sci (Lond)* 114: 431-440, 2008年
- Sakata K, et al. Exercise-induced systolic dysfunction in patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy and mutations in the cardiac troponin genes. *Heart* 94: 1282-1287, 2008年

2) 学会発表

- Fujino N, et al. Comparison of phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a calcium regulating gene and a sarcomere gene. 第73回日本循環器学会学術集会, *Cardiomyopathy/Hypertrophy (Clinical)*, 平成20年3月20~22日, 大阪国際会議場
- Funada A, et al. Impact of troponin-gene mutations on occurrence of atrial fibrillation and development of left atrial dilatation in hypertrophic cardiomyopathy. 第73回日本循環器学会学術集会, *Cardiomyopathy/Hypertrophy (Clinical)*, 平成20年3月20~22日, 大阪国際会議場
- Masuta E, et al. Impact of speckle tracking echocardiography on evaluation of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: Comparison with study by cardiovascular magnetic resonance. 第73回日本循環器学会学術集会, *Echo/Doppler (Others)* 1, 平成20年3月20~22日, 大阪国際会議場

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

< 研究協力者 >

- 藤野 陽 (金沢大学循環器内科)
- 金田 朋也 (金沢大学循環器内科)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究分担者： 松森 昭(京都大学大学院医学研究科循環器内科学助教授)

＜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

- 1)心筋炎における免疫グロブリン遊離軽鎖(FLC)の意義を臨床例において検討した。
- 2)心筋症の新しい分類を検討した。

B. 研究方法・結果

- 1)心筋炎症例における血中FLCの測定
1986-1990年に米国での心筋炎に対する免疫抑制療法治療試験(US-MTT)に登録された症例を対象として新しく開発されたELISA法にてFLCを測定した。

血中FLCカッパ鎖は心筋炎群で 37.7 ± 19.2 mg/L(平均 \pm 標準偏差、 $n=1,314$)と健常対照群 50.1 ± 14.8 mg/L($n=1,103$)に比し有意に低下した($p < 0.0001$)。一方、FLCラムダ鎖は心筋炎群 72.6 ± 124.4 mg/Lと健常対照群 52.4 ± 16.9 mg/Lに比し有意に上昇した($p < 0.0001$)。そして、カッパ鎖/ラムダ鎖比は心筋炎群で 0.65 ± 0.31 と健常対照群 $1.00.31$ に比し有意に低下した($p < 0.0001$)。また、心筋炎のうちC型肝炎ウイルス感染者($n=41$)では、非感染者($n=1,273$)に比し、さらにFLCカッパ鎖は低く、FLCラムダ鎖はさらに高値を示し、カッパ鎖/ラムダ鎖比はさらに低下した。

- 2)心筋症の新分類に関する提案

心筋症の定義、分類は1995年に発表されたWHO/ISFCによるものが広く使われていたが、近年、AHAおよびESCから新たな提案が行われている。

しかし、これらの分類は病因、形態、心機能などによる分類が混在している点に問題がある。治療の観点からは①病因(遺伝子異常、感染など)、②形態(肥大、拡張、左室、右室)、③心機能(収縮不全、拡張不全)、④電気生理学的異常(イン

オチャネル、刺激伝導系など)による分類が重要であると考えられる。われわれは、国際心筋症、心不全学会(ISCHF)において、これらに基づく心筋症の新分類を検討した(表)。

C. 結論

- 1)心筋炎ではFLCラムダ鎖を産生するB細胞が活性化され、HCV感染によりさらにこの反応が増強されることが明らかとなった。
- 2)心筋症の分類は病因、形態、心機能、電気生理学的異常に基づくべきである。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

- 1)論文発表
 - Oyake N, Shimada T, Murakami Y, Ishibashi Y, Satoh H, Suzuki K, Matsumori A, Oda T. Hepatitis C virus infection as a risk factor of increased aortic stiffness and cardiovascular event in dialysis patients. *J Nephrology* 21(3):345-53. 2008
 - Higuchi H, Hara M, Yamamoto K, Miyamoto T, Kinoshita M, Yamada T, Uchiyama K, Matsumori A. Mast cell play a critical role in the pathogenesis of viral myocarditis. *Circulation* 118:363-372. 2008
- 2)学会発表
 - Matsumori A. European/Asian Heart Failure Summit The Regulatory environment in Europe & Asia. Is The bar too high for new HF therapies?: Asian view, 4th Asian Pacific Congress of Heart Failure, January 31-February 3 2008. Melbourne, Australia

表. A New Classification of Cardiomyopathies

I. Etiological Classification	A. Genetic		
	B. Infections		
	C. Nutritional		
	D. Unknown		
II. Anatomical (Structural) Classification	A. Dilated	a. LV	
		b. RV	
	B. Hypertrophic	a. Septum	
		b. Diffuse	
		c. Free wall	
		d. Apex	
III. Physiological (mechanical) Classification	A. Systolic failure/dysfunction		
	B. Diastolic failure/dysfunction		
	C. Both		
	D. Normal		
IV. Electrical Classification	A. Ion channel disorders		
	B. Conduction system disease		
	C. Others		

Comparison of Classifications of Cardiomyopathies

WHO/ISFC Classification	Proposed Classification
DCM (with viral infection)	I B, II A a, III A
DCM (with gene mutation)	I A, II A a, III A
HCM (with gene mutation outflow obstruction)	I A, II B a, III B
Apical HCM (with unknown cause)	I D, II B, III B
Apical HCM (with HCV infection)	I B, II B d, III B
ARVC/D (with gene mutation)	I A, II A b, III B
ARVC/D (with HCV infection)	I B, II A b, III B
Long QT Syndrome	IA, IV A

- Matsumori A. Lessons From Asia: Co joint Session With WHFS: Hepatitis C virus-associated heart failure, 4th Asian Pacific Congress of Heart Failure, January 31-February 3 2008, Melbourne, Australia
- Matsumori A. Genetics: Pathogenesis and treatment of cardiomyopathies, 4th Asian Pacific Congress of Heart Failure, January 31-February 3 2008, Melbourne, Australia
- Matsumori A. Role of inflammation in heart failure, International Symposium on Cardiovascular and Neurovascular Medicine (ISCNM) in conjunction with International Heart Failure Symposium, February 22-24, 2008, Hong Kong
- Matsumori A. Global alert and response network: Hepatitis C virus-derived heart disease, Heart Failure Society of India, February 2-March 2, 2008, Chandigarh, India
- Matsumori A. ACC. Symposium, 57th Annual Scientific Session, American College of Cardiology, March 31, Chicago
- Matsumori A. Novel Immune Mechanisms of Dilated Cardiomyopathy, 57th Annual Scientific Session, American College of Cardiology, March 31, Chicago
- Matsumori A. Mast cells and antihistamines in dilated cardiomyopathy, 57th Annual Scientific Session, American College of Cardiology, March 31, Chicago
- Matsumori A. The role of ARBs in heart failure management, 17th Annual Scientific Meeting of the Indonesian Heart Association, April 17-20, 2008, Jakarta
- Matsumori A. APSC: Global burden of heart failure; Idiopathic heart failure: Contribution of cardiomyopathy and the global alert and response network, World Congress of Cardiology 2008, May 18-21, 2008, Buenos Aires, Argentina
- Matsumori A. WHFS: The failing heart around the World: Heart failure due to virus infection in Asia, World Congress of Cardiology 2008, May 18-21, 2008, Buenos Aires, Argentina
- Matsumori A. Understanding hypertrophic cardiomyopathy: Pathogenesis beyond gene mutations, World Congress of Cardiology 2008, May

18-21, 2008, Buenos Aires, Argentina

- ・ Matsumori A. Presidential Lecture: Global Alert and Response Network. Cardiomyopathies and heart failure due to infections agents, The 11th Annual Toronto International Heart Failure Summit: From Pathophysiology to Clinical Practice, Together with The 2nd Annual International Congress of Cardiomyopathies and Heart Failure, June 12-15, 2008, at The Four Seasons Hotel in Toronto, Canada
- ・ Matsumori A. New classification of cardiomyopathies. The 11th Annual Toronto International Heart Failure Summit: From Pathophysiology to Clinical Practice, Together with The 2nd Annual International Congress of Cardiomyopathies and Heart Failure, June 12-15, 2008, at The Four Seasons Hotel in Toronto, Canada
- ・ Matsumori A. NT-proBNP in infections myocarditis. 6th International Symposium on NT-proBNP, June 18-19, 2008, Baveno, Italy
- ・ Matsumori A. New classification of cardiomyopathies. The 4th China-Japan Cardiovascular Forum, October 23-24, 2008, Beijing, China
- ・ Matsumori A. New Biomarkers: Free immunoglobulin light chains and anti-troponin I antibodies: Japanese perspective. AHA/Japanese Circulation Society Joint Symposium: Cardiac Risk Prediction with Biomarkers: US and Japanese Populations. Scientific sessions, American Heart Association, November 11, 2008. New Orleans, USA

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

—心筋生存における増殖因子の役割解明—

研究分担者： 友池 仁暢(国立循環器病センター病院長)

＜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

高齢化社会とともに心不全患者が増加し続けている。心不全治療にも着実な進歩があり、β遮断薬やレニン-アンジオテンシン系抑制薬などが必須の治療法として登場した。しかしながら、これらの薬物療法をもってしても、治療抵抗性の心不全が存在するのも事実である。そのため、心不全および心筋症に対する新たな治療法の開発が急務である。特発性心筋症は、特に心筋変性が激しく、心筋の脱落が著明に認められる。この心筋の脱落を抑制する方策が必要である。神経細胞の死において、増殖因子の枯渇が重要であることが知られている。神経細胞と同様に、分裂および再生が難しい心筋細胞においても、同様の機序の存在が推察される。心筋細胞の生存シグナルとしての増殖因子の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

心不全動物モデルにおける増殖因子の動態を検討した。心不全動物モデルとしては、大動脈縮窄心不全マウスモデル、ペーシングによる心不全イスモデルにおけるEGFファミリーおよびEGF受容体の遺伝子発現レベルについて検討を試みた。

ドキシソルピシンによる心筋障害において、EGFファミリーおよびEGF受容体の役割について、生直後ラット培養心筋細胞を用いて解析を行った。

C. 研究結果

EPL投与により、GC-AKOマウスの血圧は約23%減少し、野性型マウスとほぼ同程度まで低下した。心臓の重量を体重で除した心肥大の指標(HW/BW)や心線維化の程度は野性型と同程度まで低下した。ヒドララジン群では、血圧はEPLと同様に

野性型マウスと同程度まで低下したが、HW/BWは低下せず、心臓線維化の程度はむしろ増加傾向であった。

心臓における、アルドステロン合成酵素であるCYP11B2mRNAはPCRで有意には検出できず、GC-AKOマウスでその発現量が亢進していることは確認できなかった。また、MRmRAN自体も4群間で有意な差は認められなかった。し、16週目に解剖して解析に供した。

D. 考察

心不全の状態において、増殖因子の発現が上昇するという興味深い現象を見出した。EGFファミリーのなかで、HB-EGFが顕著に上昇することから、心不全とHB-EGFの間に何らかの役割があることが推察された。また、HB-EGFにより活性化されるErb2受容体を遮断すると、ドキシソルピシンによる心筋障害が増強されることより、Erb2受容体のシグナルが重要であることが示唆された。今回の検討では、不全心全体からRNAを抽出しているため、心筋細胞、血管構成細胞、線維芽細胞などにおいて、どの細胞で発現が上昇しているかは明らかではないため、今後の検討課題である。

E. 結論

動物心不全モデルにおいて、EGFファミリーのなかで、特にHB-EGF遺伝子の発現上昇が顕著に認められた。このシグナルは、Erb2受容体を介して、心筋の生存に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- ・ Liao Y, Zhao H, Ogai A, Kato H, Asakura M, Kim J, Asanuma H, Minamino T, Takashima S, Kitakaze M. Atorvastatin slows the progression of cardiac remodeling in mice with pressure overload and inhibits epidermal growth factor receptor activation. *Hypertens Res* 2008;31:335-44.

2) 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

北風 政史

(国立循環器病センター心臓血管内科部門)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究分担者： 中谷 武嗣(国立循環器病センター臓器移植部部長)

＜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

心不全に対する各種治療法の進歩により、その治療成績は向上してきた。しかし、高度心筋障害を伴う心不全では心臓ポンプ機能を代替する必要がある。補助人工心臓(LVAD)や心臓移植が考慮される。しかし、我が国の心臓移植待機患者は、多くが左心補助人工心臓(LVAD)装着下に長期間待機を必要としており、待機中の死亡率も低くない。当センターでは1994年より慢性心不全急性増悪例にもLVADを適応するようになり、2001年からはLVAD及び心臓移植患者に対する専門病棟が稼働した。さらに、第9因子製剤及び抗MRSA薬のリネゾリド(商品名：ザイボックス®)を使用することができるようになり、LVAD装着下での長期補助成績が向上していると考えられた。そこで、今回、当センターにおける体外設置型LVADにおける長期予後、合併症、死因を後ろ向きに比較・検討した。

B. 研究方法

1994年から2007年までに体外設置型東洋紡製国産型LVADを装着した69例について検討を行った。1994年～2001年までの装着例をGroup A(30例)、2001年～2007年の装着例をGroup B(39例)とし、各群の平均補助期間、予後、合併症等を検討した。

C. 研究結果

平均補助期間はGroup Bが有意差をもって長く(673.9±341.5 days vs. 369.3±337.2 days, $p<0.001$)、1年および2年生存率も同様にGroup Bが有意差をもって良好であった(82.8% vs. 40.0%, $p<0.001$ 、44.0% vs. 16.6%, $p<0.03$)。脳血管疾患での死亡率もGroup Bで有意に低く(10.3% vs. 36.7%, $p<0.02$)、感染症死については有意差を認めなかったもの

の、Group Bで低い傾向を認めた。リネゾリド、第9因子複合体製剤の使用群は有意とはいえないものの、長期補助において良好な傾向を示した。

D. 考察

体外設置型LVAD装着例においてもLVAD関連合併症の適切な対応により長期生存が可能となっていった。第9因子複合体製剤およびリネゾリドなどの脳血管疾患および全身感染症に対する治療選択肢の増加が長期補助を可能にした一つの要因であると示唆された。

E. 結論

心臓移植は末期心不全に対する治療選択として欧米では定着しているが、わが国ではドナー不足から心臓移植待機期間が数年に及ぶため、心臓移植へのブリッジとしてLVADによる長期補助を余儀なくされている。現在わが国で用いることができる体外設置型LVADの管理経験を検討することは、心臓移植の代替手段として今後期待されている植込み型LVADによる長期在宅療法における管理を検討するうえで重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
 - ・中谷武嗣：補助人工心臓の現状と今後の展望、呼吸と循環 56：377-382、2008
 - ・中谷武嗣、築瀬正伸：循環動態維持を目的とした薬物療法と補助循環法、ICUとCCU 31：1061-1067、2008

- ・中谷武嗣：対外設置型補助人工心臓：東洋紡補助人工心臓。Clinical Engineering 19:618-622, 2008
 - ・中谷武嗣：心不全の機械的補助最前線。Current Therapy 26:955-958, 2008
 - ・中谷武嗣：心臓移植における保存法/移植43:336-341, 2008
 - ・Mano A, Nakatani T, Oda N, Kato T, Niwaya K, Tagusari O, Nakajima H, Funatsu T, Hashimoto S, Komamura K, Hanatani A, Ueda IH, Kitakaze M, Kobayashi J, Yagihara T, Kitamura S: 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
 - ・Miyata S, Yamamoto H, Kamei M, Nakatani T, Kobayashi J, Tsuji T, Minematsu K, Tomoike H. Heparin-induced thrombocytopenia clinical studies and the efficacy of argatroban in Japan. Semin Thromb Hemost 34:37-47, 2008
 - ・Morimoto Y, Niwa H, Hanatani A, Nakatani T. Hemostatic management during oral surgery in patients with a left-ventricular assist system undergoing high-level anticoagulant therapy: efficacy of low molecular weight heparin. Surg J Oral Maxillofac 66:568-571, 2008
- 2)学会発表
- ・築瀬正伸, 小田 登, 加藤倫子, 中谷武嗣, 船津俊宏, 小林順二郎, 北村惣一郎, 橋村一彦, 北風政史, 友池仁暢:重症心不全に対するleft ventricular assist system(LVAS)による長期補助。第56回日本心臓病学会学術集会, パネルディスカッション, 2008. 9. 8-10, 東京
 - ・中谷武嗣, 加藤倫子, 築瀬正伸, 山本 賢, 瀬口 周, 船津俊宏, 小林順二郎, 植田初江, 佐田正晴:心移植;既存抗体, 産生抗体のモニタリングと移植後の管理。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・中谷武嗣, 吉村了勇:シンポジウム1;臓器移植後の長期予後を考える。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・加藤倫子:心臓移植後遠隔期のフォローにおけるmTOR阻害剤の重要性。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・中谷武嗣, 加藤倫子, 船津俊宏, 築瀬正伸, 小田 登, 伊庭 裕, 中嶋博之, 島原祐介, 山崎康祥, 西岡 宏, 林 輝行, 堀 由美子, 市田三和子, 北風政史, 小林順二郎, 北村惣一郎:埋め込み型左心補助人工心臓による長期在宅治療。パネルディスカッション, 第36回人工心臓と補助循環懇話会, 2008. 3. 7-8, 越後湯沢
 - ・小田 登, 眞野暁子, 築瀬正伸, 花谷彰久, 加藤倫子, 中谷武嗣, 船津俊宏, 小林順二郎, 北村惣一郎:定常流遠心ポンプを用いた新型左心補助装置(EVAHEART)の当院での臨床経験。第36回人工心臓と補助循環懇話会, 2008. 3. 7-8, 越後湯沢
 - ・小田 登, 眞野暁子, 築瀬正伸, 花谷彰久, 加藤倫子, 中谷武嗣, 船津俊宏, 小林順二郎, 北村惣一郎: Clinical course and outcome of patients with left ventricular assist system: single center's experience at National Cardio Vascular Center. 第36回人工心臓と補助循環懇話会, 2008. 3. 7-8, 越後湯沢
 - ・中谷武嗣, 船津俊宏, 加藤倫子, 築瀬正伸, 伊庭 裕, 北風政史, 小林順二郎:人工心臓:わが国の現状と今後の展望。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・堀 由美子, 目良佳恵, 加藤倫子, 築瀬正伸, 中谷武嗣:レシピエント移植コーディネーターの役割;心臓移植待機患者の管理。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・加藤倫子, 篠岡太郎, 築瀬正伸, 船津俊宏, 佐田正晴, 中谷武嗣:当院での抗体関連型拒絶反応に対するストラテジー;心臓移植領域における試み。シンポジウム, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・小島久仁子, 大頭麻里子, 和田恭一, 小竹武, 岡田 博, 森下秀樹, 小田 登, 築瀬正伸, 加藤倫子, 中谷武嗣:心臓移植患者のシクロスポリンからタクロリムスへ切替える際のタクロリムスの投与量設定方法とミコフェノール酸の薬物動態変動率についての検討。ポスター, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・福田弘毅, 加藤倫子, 小田 登, 築瀬正伸, 小島久仁子, 和田恭一, 植田初江, 橋村一彦, 中谷武嗣:当院におけるシクロスポリンからタクロリムスへの変更を要した心臓移植後患者に関する検討。ポスター, 第44回日本移植学会総会, 2008. 9. 19-21, 大阪
 - ・中谷武嗣, 船津俊宏, 加藤倫子, 築瀬正伸, 村田欣洋, 伊庭 裕, 堀 由美子, 西岡 宏, 林輝行, 北風政史, 小林順二郎:わが国における補助人工心臓の将来。シンポジウム, 第46回日本人工臓器学会大会, 2008. 11. 27-29, 東京
 - ・中谷武嗣:2007年日本補助人工心臓レジストリー報告。第14回日本臨床補助人工心臓研究会, 2008. 11. 27, 東京
 - ・築瀬正伸, 加藤倫子, 村田欣洋, 船津俊宏, 伊庭 裕, 堀 由美子, 目良佳恵, 西岡 宏, 林輝行, 北風政史, 小林順二郎, 八木原俊克, 友池仁暢, 中谷武嗣:LVAS在宅管理に対するチーム医療の取り組み。パネルディスカッション, 第14回日本臨床補助人工心臓研究会, 2008. 11. 27, 東京
 - ・Bogaev B, Horstsmanshoff D, Meyns B, Nakatani T, Orime Y, Slaughter M, Sheffield S, Sivathasan

C. Wieselthaler G. State of the Art & Field-wide Challenges. 16th Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps, 2008. 10. 2-4, Houston, TX, U.S.A.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

<研究協力者>

加藤倫子(国立循環器病センター臓器移植部)

梁瀬正伸(国立循環器病センター臓器移植部)

村田欣洋(国立循環器病センター臓器移植部)

松津俊宏(国立循環器病センター心臓血管外科)

戸田宏一(国立循環器病センター心臓血管外科)

藤田知之(国立循環器病センター心臓血管外科)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究分担者： 齋藤 能彦 (奈良県立医科大学第1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

心不全や急性心筋梗塞の予後をアルドステロンブロッカーであるスピロノラクトンやエプレレノンが改善することが証明され、心室リモデリングにおけるアルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体(MR)系の意義が注目されている。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系とナトリウム利尿ペプチド(NP)系は機能的に拮抗しており、これら2つの系の相互関係とその破綻が心肥大・心不全の発症に深く関与していることを我々は報告してきたが、アルドステロン-MR系とGC-A系との関係については、まだ明らかにされていない。

また、ラットにおいてアルドステロンを高食塩摂取下に投与すると高血圧とともに心肥大や間質線維化を惹起し、ヒトにおける原発性アルドステロン症と同様である。しかし、興味深いことには、アルドステロンだけの投与では高血圧、心肥大、心線維化を惹起せず、高食塩の存在がアルドステロンの効果発現に必須である。このように、食塩、NP系、RAA系の3者の相互関係を理解することが、心室リモデリングの分子機序の解明に重要である。さらに、複雑なことには、マウスでは、ラットと異なり高食塩下にアルドステロンを投与しても高血圧も心肥大、心線維化も生じない。

ANP・BNPに対する共通の受容体であるGC-Aの遺伝子欠損マウスでは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系とANP系とのバランスが破綻し相対的にRAA系が活性化したために、心肥大と心臓線維化が生じる。このマウスにおいてアルドステロンの受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)ブロッカーである

Eplerenone(EPL)が、GC-A KOマウスで観察される心肥大や心臓の線維化を抑制することが可能か、また、高食塩下でアルドステロンを投与し心肥大を惹起するかを検討した。

B. 研究方法

1) 実験1

GC-A KOマウスはテキサス大学のD. Garvers 教授より供与された。ヘテロKOマウスどうしで交配し雄ホモKOマウスと雄野生型マウスを実験に供し、同腹間で比較検討した。GC-A KOマウスEPLを含有しているD10001飼料で12週より4週間飼育した。EPLと同様に血圧を下降させるためにヒドアラジンを5mg/Kg/dayで投与した。

2) 実験2

また、12週令のGC-A KOマウスに6%食塩含有食料でアルドステロンを4mg/say/miceで4週間投与し、16週目に解剖して解析に供した。

C. 研究結果

EPL投与により、GC-A KOマウスの血圧は約23%減少し、野生型マウスとほぼ同程度まで低下した。心臓の重量を体重で除した心肥大の指標(HW/BW)や心臓線維化の程度は野生型と同程度まで低下した。ヒドアラジン群では、血圧はEPLと同様に野生型マウスと同程度まで低下したが、HW/BWは低下せず、心臓線維化の程度はむしろ増加傾向であった。

心臓における、アルドステロン合成酵素であるCYP11B2 mRNAはPCRで有意には検出できず、GC-A KOマウスでその発現量が亢進していることは確認できなかった。また、MR mRNA自体も4群間で有意な差は認められなかった。

アルドステロンを高食塩下で投与すると、GC-AKOではやはり血圧は野生型のマウスと同様に上昇しなかったが、心肥大と心線維化は野生型では全く変化しなかったが、GC-AKOではLV/BWが10%以上増加し、心線維化は顕著に増悪した。

D. 考察

GC-AKOでは、NP系とRAA系のバランスが破綻し、相対的にRAA系が活性化したために、心室肥大・心線維化が生じていたと考えられているが、このバランスにMR系も関与していることが明らかとなった。

心臓にはCYP11B2、HSD2の発現があっても非常に微量であり、心臓におけるMRの内因性のリガンドは、流血中のアルドステロンがメインであるのか、また、コルチゾールがメインであるのかわからないが、GC-AKOではMR系が活性化していることは、EPLの投与実験より明らかにされた。

アルドステロンの慢性投与では、マウスでは過去の論文では高食塩下でも、高血圧、心肥大、心線維化が惹起されないが、GC-AKOでは高血圧は惹起しないものの、心肥大と心線維化を惹起した。ここには、NP系とアルドステロン作用の間の新たな相互関係の存在が示唆される。

E. 結論

心肥大・心線維化発症に、NP系、食塩、アルドステロンの3者が密接に関与していることがさらに明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・Zhang Q, Saito Y, Naya N, Imagawa K, Somekawa S, Kawata H, Takeda Y, Uemura S, Kishimoto I, Nakao K. The Specific Mineralocorticoid Receptor Blocker Eplerenone Attenuates Left Ventricular Remodeling in Mice Lacking the Gene Encoding Guanylyl Cyclase-A. *Hypertens Res* 31(6):1251-6, 2008

2) 学会発表

なし。

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

— 拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討 —

研究分担者： 松崎 益徳(山口大学大学院医学研究科器管病態内科学教授)

＜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

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

B. 研究方法

1) マウス再感染血清

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

2) 患者血清

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

3) 心筋生検組織

研究同意を得た心筋炎及び心筋症患者に於ける

心内膜心筋生検組織の蛋白電気泳動を行った。ミトコンドリア蛋白の発現は正常心筋をコントロールとし、比較定量を行った。

4) マウスへの抗体投与実験

6週齢♂A/Jマウスの下大静脈より抗ミトコンドリア抗体を投与し、組織学的、かつ超音波検査にて解析した。酸化ストレスの定量化はdHE染色法にて行った。

(倫理面への配慮)

患者血清を使用した臨床研究に際しては、山口大学病院倫理委員会の審査を経たプロトコルに則り施行されている(H17-12:心筋炎・心筋症における抗心筋自己抗体の研究)及び(H18-51:拡張型心筋症における疾患特異的蛋白の検索)。臨床研究に当たっては患者本人または代理人から研究同意書を取得した上で、倫理面は最大限に配慮し、厳格な個人情報管理の元で行った。ウイルスを使用した動物実験に際しては、山口大学医学部動物使用委員会の審査を受けたプロトコルに則り施行した(23-S02:マウス慢性心筋炎心移植モデルを使った免疫学的解析)。

C. 研究結果

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

D. 考察

DCMの発症と進展には複数の抗ミトコンドリア

抗体が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

DCMの発症と進展には複数の抗ミトコンドリア抗体が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Matsushima M, Nakamura H, Umemoto S, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibition following donor heart myocardial infarction after heterotopic transplantation in Tg mice. *Circulation Journal* 72(5): 793-799, 2008.
- Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M: Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circulation Journal* 68(7): 677-682, 2004.

2) 学会発表

- Nakamura H: Synchronic proteomics between murine cardiomyopathy and human DCM: New insight into the autoimmune mechanism after

viral myocarditis. 第72回日本循環器学会総会シンポジウム(福岡/2008年3月30日)

- 中村浩士: 拡張型心筋症の発症と進展機序に関する抗心筋抗体の検討. 第29回日本アフェレンス学会シンポジウム(広島/2008年11月22日)
- 中村浩士: 拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の役割. 第30回心筋生検研究会(津/2008年11月29日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

< 研究協力者 >

- 中村浩士
(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)
- 久保 誠
(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)
- 松田 晋
(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)
- 梅本誠治
(山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学)
- 加藤智啓
(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)
- 西岡久寿樹
(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—
研究分担者： 今泉 勉(久留米大学医学部第三内科教授)

＜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

Granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)、erythropoietin(EPO)やleukemia inhibitory factor(LIF)などのサイトカインは、心筋細胞の生存を促進させることによって急性心筋梗塞の梗塞範囲を縮小させ、心筋リモデリングを抑制することが多くの動物実験で示されている。このように、急性心筋梗塞の治療法について、サイトカイン投与によって心筋細胞の生存シグナルを増強させる方法の有効性と理解がすすむ一方で、心筋細胞の生存シグナルを抑制する機序については不明な点が多い。Suppressor of cytokine signaling-3(SOCS3)はG-CSF、EPOやLIFなどのサイトカインによって発現が誘導され、サイトカインのシグナルを強力に負に制御するネガティブフィードバック因子である。

本研究の目的は、「サイトカインシグナルの負の制御因子であるSOCS3を心筋特異的に欠損させ、心筋細胞のサイトカインシグナルが効率よく伝達されるマウスを作成し、急性心筋梗塞における心筋特異的SOCS3欠損の効果について検証すること。また、心筋特異的SOCS3欠損による、心筋梗塞後心不全の抑制機序について検討することである。

B. 研究方法

1)マウス急性心筋梗塞モデルの解析

左前下降枝を結紮後12時間後の心臓組織を回収し、real-time PCRにてサイトカインの発現を評価する。SOCS3の発現の時間経過をウエスタンブロットで評価する。

2)心筋特異的SOCS3欠損マウス(C-SOCS3-KO)

すでに作成済みのSOCS3-floxマウスとalpha-myosin heavy chain-Creマウスと交配し、C-

SOCS3-KOを作成する。組織学的評価と生理機能評価でbasal phenotypeを評価する。

3)C-SOCS3-KOマウスに対する急性心筋梗塞モデルの作成

C-SOCS3-KOマウスに心筋梗塞を作成し、術後14日に心エコーを行い野性型マウスと比較評価する。梗塞範囲はAzan染色を行い梗塞巣の面積を計測する。STAT3、ERK1/2、AKTのリン酸化の時間経過をウエスタンブロットで評価する。また、リン酸化STAT3の免疫染色を行い、梗塞巣、非梗塞巣、境界領域におけるSTAT3の活性化を評価する。梗塞24時間後の心臓組織におけるアポトーシスをTUNNEL染色で評価する。抗アポトーシス分子であるBcl-xL、Bcl2、アポトーシス分子であるcleaved caspase3、Bax、Badの発現の時間経過をウエスタンブロットで評価する。梗塞14日後の心臓組織における血管新生をCD31の免疫染色で評価する。梗塞2日後の心臓組織における血管新生因子の発現をreal-time PCRで評価する。

C. 研究結果

1)野性型マウスに急性心筋梗塞を作成し24時間後の心臓におけるサイトカインの発現をReal-time PCRで評価した。Jak-STATを活性化するLIF、cardiotrophin1、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSFなどが高度に発現していることがわかった。STAT3は梗塞後早期より活性化しており、STAT3のリン酸化に相関してSOCS3の発現誘導を認めた。

2)心臓でのJAK-STAT経路とSOCS3の役割を明らかにするために、心筋特異的SOCS3マウス(C-SOCS3-KO)を作製した。C-SOCS3-KOの心臓は組織学的に異常を認めず心エコーによる評価でも異常は認めなかった。C-SOCS3-KOマウスにLPSを投

与し、心臓と肝臓におけるSOCS3の発現をウエスタンブロットで評価した。肝臓ではSOCS3が発現していたが、心臓におけるSOCS3の発現は野性型マウスと比較し約90%抑制されていた。

3) MHC-SOCS3-KOに急性心筋梗塞を作製したところ、C-SOCS3-KOでは2週間後の心不全の発症が有意に抑制され全てのマウスが生じた(野性型マウスの死亡率は40%)。梗塞巣の範囲もC-SOCS3-KOで著明に抑制されていた。また野性型マウスと比べ、C-SOCS3-KOの心臓におけるSTAT3のリン酸化は、早期より増強し遷延していた。AKT, ERK1/2などリン酸化も同様にC-SOCS3-KOで早期より増強していた。また、TUNNEL陽性心筋細胞はC-SOCS3-KOで有意に少なく、BclXL, Bcl2の発現はC-SOCS3-KOで有意に高く、cleaved caspase3, Bax, Badの発現はC-SOCS3-KOで抑制されていた。梗塞14日目のCD31の発現細胞数はC-SOCS3-KOで有意に高く、血管新生が亢進していることが示唆された。C-SOCS3-KOの心臓においてHGF, IGFやMidkineといった血管新生因子の発現増強が観察された。VEGFの発現には差を認めなかった。

D. 考察

急性心筋梗塞後早期の心臓ではJak-STATを活性化するサイトカインが高度に発現しており、STAT3, AKT, ERK1/2などの心筋細胞の生存シグナルは、C-SOCS3-KOにおいて著明に遷延していた。これに伴い、C-SOCS3-KOの心臓ではアポトーシスが有意に抑制され血管新生の亢進を認めた。したがって、Jak-STATシグナルのブレーキであるSOCS3の発現を抑制することによって、心筋細胞の生存シグナルがより活性化し、アポトーシスの抑制と血管新生が亢進することによって、梗塞後心筋リモデリングが抑制されると考えられた。

E. 結論

SOCS3の発現抑制は急性心筋梗塞後の心筋リモデリング・心不全の新たな治療ストラテジーになることが示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

(→III. 研究成果の刊行に関する一覧表)

2) 学会発表

・ Nanjo Y, Adachi H, Furuki K, Kumagai S, Otsuka M, Fukami A, Satoh A, Enomoto M, Imaizumi T: Fasting plasma ghrelin levels are inversely associated with the metabolic syndrome and PAI-1 in a general population. 77th Annual European

Atherosclerosis Society (EAS) Congress, April 26-29, 2008, Istanbul, Turkey

- ・ Fukami A, Adachi H, Nanjo K, Furuki K, Kumagai S, Otsuka M, Satoh A, Enomoto M, Imaizumi T: MCP-1 may be a key factor for cardio-renal syndrome. Cross-sectional study in a general cohort. 77th Annual European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, April 26-29, 2008, Istanbul, Turkey
- ・ Fukuda Y, Yoshida T, Inage T, Takeuchi T, Nagamoto Y, Gondo T, Imaizumi T: Long-term results of maze procedure on cardiac function after mitral valve repair. Heart Rhythm 2008, May 14-17, 2008, San Francisco, USA
- ・ Enomoto M, Adachi H, Satoh A, Fukami A, Otsuka M, Kumagai S, Furuki K, Nanjo K, Imaizumi T: Inflammatory markers and all-cause death in a general population. 22nd Scientific Meeting International Society of Hypertension, June 14-19, 2008, Berlin, Germany
- ・ Adachi H, Shigetoh Y, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Kumagai S, Furuki K, Satoh A, Nanjo K, Imaizumi T: Tachycardia may predispose to the metabolic syndrome 20-year prospective study in a general population. 22nd Scientific Meeting International Society of Hypertension, June 14-19, 2008, Berlin, Germany
- ・ Mizuta Y, Kai H, Mizoguchi M, Tahara N, Osada K, Imaizumi T: Valsartan improved myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in hypertensive patients, preferentially in patients with severe fibrosis. 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research (HBPR 2008), September 17-20, 2008, Atlanta, USA
- ・ Takayama N, Kai H, Kudo H, Mori T, Fukui D, Takemiya K, Ikeda A, Yasuoka S, Koga M, Imaizumi T: Simvastatin attenuates large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy, but not myocardial fibrosis, by inhibiting Ras-ERK and Rho A pathways in hypertensive rats: New cardioprotective effects of statins. 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research (HBPR 2008), September 17-20, 2008, Atlanta, USA
- ・ Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ikeda A, Imaizumi T: Role of asymmetric dimethylarginine in endothelial dysfunction in renal failure mice. 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research (HBPR 2008), September 17-20, 2008, Atlanta, USA
- ・ Yasukawa H, Imaizumi T: Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) and cardiac injury during