

特発性心筋症に関する調査研究

—ヒトiPS由来心筋細胞の機能解析について—

研究協力者： 福田 恵一(慶應義塾大学医学部再生医学教室教授)

＜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、幹細胞生物学の発展に伴い難治性心不全の治療手段として再生医療および細胞移植医療の実現が期待される。従来、難治性疾患に対する移植療法の供給源として幹細胞が有用であると考えられており、中でも胚性幹細胞(ES細胞)はそのすぐれた増殖能や多分化能から臨床応用が期待されているが、生命倫理的問題や移植に伴う拒絶免疫などの問題が障壁となっていた。最近、山中からはES細胞の多能性維持に関わる数種類の転写因子を線維芽細胞に導入することにより細胞の初期化を誘導しES細胞と同等の増殖能・多分化能を有する誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS cell)を作成することに成功した。このiPS細胞は、移植が必要な患者自身の細胞から作製可能であるためES細胞のもつ生命倫理、移植時の拒絶免疫等の問題を克服可能な細胞供給源として期待されており、今後iPS細胞を用いた再生医療が急速に発展することが予想される。しかし、現在までヒトiPS細胞から分化誘導した細胞の表現型解析は十分なされていないのが現状である。

そこで本研究の目的は、ヒトiPS細胞から心筋細胞を分化誘導し、その生理学的特性を検討することである。

B. 研究方法

1) ヒトiPS由来心筋細胞の作製

京都大学(山中研究室)より供与を受けたヒトiPS細胞クローン(201B株)を、酵素処理をしたのち浮遊培養により胚様体(EB)を作製した。培養中に自己心拍を開始したEBのみを採取して機能解析を行った。

2) PCRによる遺伝子発現解析

未分化ヒトiPS細胞および拍動EBを採取し、RNeasy kitを用いてRNAを抽出した。さらに、Superscript First-strand Synthesis Systemを用いてcDNAを作製し、心筋特異的マーカー遺伝子(Nkx2.5, GATA4, ANP, MHC, MLC)の発現をPCRで確認した。

3) 細胞外電位計測

多電極チップ(MEA)に拍動EBをのせ、細胞外電位(field potential: FP)を記録した。記録が安定した後、薬剤(キニジン、ベラパミル、E4031、イソプロテレンール)を投与しFPの変化を検討した。測定はすべて37度で行った。

4) 細胞内Ca²⁺濃度測定

拍動EBにCa²⁺蛍光色素Fluo-4(5 mM)を37度で30分間投与したのち、共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss510)を用いて細胞内Ca²⁺イメージングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認済みである。

C. 研究結果

ヒトiPS細胞を浮遊培養し、約2週間後より拍動EBの出現を認めた。拍動EBにおける心筋マーカー遺伝子の発現を検討するためPCRを施行した。未分化なヒトiPS細胞ではOct3/4の発現を認めたが、分化した拍動EBでは消失していた。一方、拍動EBでは、Nkx2.5, GATA4, ANP等の心筋特異マーカー遺伝子の発現を認め、βミオシン重鎖およびミオシン軽鎖等の心筋サルコメア蛋白遺伝子の発現を認めた。

さらに、これらの心筋特異マーカーの蛋白レベルでの発現を確認するために免疫染色を行った。

拍動EB内の個々の細胞を観察するため、拍動EBをトリプシン処理することにより細胞を単離し、ディッシュに低濃度(粗)に播きなおして観察を行った。αアクチニン、ミオシン重鎖、トロポミオシンに対する抗体で染色したところ、横紋構造を認めサルコメ蛋白の発現が確認された。さらに、Nkx2.5、GATA4の核内の局在およびANPの核周囲の局在が確認された。以上の結果より、ヒトiPS細胞から分化した細胞(iPS由来心筋細胞)は、心筋特異マーカーの発現において心筋細胞と類似していることが確認された。

次に、iPS由来心筋細胞の電気生理学的特性を検討するため、微小電極法を用いて活動電位を記録した。培養30日後のEBから記録した活動電位は、急峻な立ち上がりのオーバーシュートを認めさらにプラトー相を有していたことから心室筋細胞様であった。そこで、心室筋で発現していることが知られているNa⁺チャンネル、L型Ca²⁺チャンネルおよび遅延整流性K⁺チャンネル(Ikr)の遺伝子発現をPCRを用いて確認した。未分化ヒトiPS細胞ではこれらのチャンネル遺伝子の発現は認めなかったものの、拍動EBでの発現が確認され遺伝子レベルでも心室筋に類似していることが示唆された。

また、拍動EBに発現しているイオンチャンネルの機能を検討するため、これらのチャンネル阻害剤による細胞外電位(FP)の変化を観察した。Na⁺チャンネル阻害剤キニジンを投与すると、Na⁺電流を反映すると考えられているFPの最初の急峻な陰性ピークの振幅が濃度依存的に減少し、washoutにより回復した。この結果から、機能的Na⁺チャンネルの存在が確認された。次にL型Ca²⁺チャンネル阻害剤ベラパミルを投与すると、活動電位持続時間を反映するとされるFPDが濃度依存的に短縮し、washoutにより元のレベルまで回復したことから、機能的L型Ca²⁺チャンネルの存在が確認された。さらに、Ikr阻害剤E4031を投与すると、FPDは濃度依存的に延長し、washoutにより元のレベルまで回復したことから、機能的遅延整流性K⁺チャンネルの存在が確認された。

次に、拍動EBの細胞内Ca²⁺濃度変化をCa²⁺蛍光色素Fluo-4を用いて検討した。拍動に伴いEB内の一過性Ca²⁺濃度増加(トランジェント)を認め、心筋細胞と同様の性質を有していた。

D. 考察・結論

今回我々は、ヒトiPS由来心筋細胞において心筋特異的マーカーの発現を確認し、心筋細胞に特有な電気生理学的特性を有していることを示した。これまで、ヒトiPS由来心筋細胞の表現型についての報告はごくわずかであるが、今回我々が行った実験の範囲ではヒトiPS由来心筋細胞の基本的な表現型はいわゆるnativeの心筋細胞と同等であった。

ヒトiPS細胞はその未分化性、多能性においてES細胞と比較しほぼ同等と考えられており、今後の

再生医療における主役となる可能性がある。我々は、iPS細胞の心臓再生医療への応用として、1)重症心不全に対する細胞移植療法、2)難治性および遺伝性心疾患の病因・病態の解明および3)創薬研究などを考え、プロジェクトを進行中である。まず、細胞移植療法にiPS細胞を供給源として用いるには、安全性の確認と分化誘導効率の改善が必須条件であり、実現にはさらなる検討が必要と思われる。一方、疾患の病因・病態解明については、すでに神経領域では疾患iPS細胞の樹立に成功しているように、今後循環器領域でも心筋症や遺伝性不整脈疾患のiPS細胞研究が進み新たな病態解明につながると予想される。最後に、創薬研究においては、疾患iPS細胞を用いた薬効評価を行い患者個々のオーダーメイド医療の実現が期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Naritaka Kimura, Chisa Shukunami, Daihiko Hakuno, Masatoyo Yoshioka, Shigenori Miura, Denitsa Docheva, Tokuhiko Kimura, Yasunori Okada, Goki Matsumura, Toshiharu Shinohara, Ryohei Yozu, Junjiro Kobayashi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yuji Hiraki, Keiichi Fukuda. Local absence of tenomodulin results in rupturing of the chordae tendineae cordis. *Circulation* 118: 1737-1747, 2008.
- Hao Chen, Fumiyuki Hattori, Mitsushige Murata, Weizhen Li, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onitsuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Erika Sasaki, Daihiko Hakuno, Motoaki Sano, Shinji Makino, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into Cardiomyocytes. *Biophys Biochem Res Comm* 369:801-6, 2008.
- Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda. The multiple roles of BMP signaling in cardiac development. *Drug Discovery Today*, 2009 (in press).
- Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6: 803-10, 2008.
- Narihito Nagoshi, Shinsuke Shibata, Yoshiaki Kubota, Masaya Nakamura, Yasuyo Nagai, Etsuko Satoh, Satoru Morikawa, Yohei Okada, Yo Mabuchi, Hisayuki Katoh, Seiji Okada, Keiichi Fukuda, Toshio Suda, Yumi Matsuzaki, Yoshiaki Toyama, Hideaki Okano. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell*

Stem Cell 2:1-12, 2008.

- Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda. Regenerative Cardiac Medicine. *Circulation J* 72: A49-55, 2008.
 - Takashi Yagi, Keiichi Fukuda, Jun Fujita, Yasuyo Hisaka, Yoshiyuki Suzuki, Masahiko Tamura, Satoshi Ogawa. G-CSF-augments small vessel and cell density in canine myocardial infarction. *Keio J Med* 57: 139-149, 2008.
 - Ieda M, Fukuda K. The regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J Pharmacol Sci* (in press).
 - Kentaro Hayashida, Motoaki Sano, Ikuro Ohsawa, Ken Shinmura, Kayoko Tamaki, Kensuke Kimura, Jin Endo, Takaharu Katayama, Akio Kawamura, Shun Kohsaka, Shinji Makino, Shigeo Ohta, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 30-5, 2008.
 - Kensuke Kimura, Kunihiro Suzuki, Shigetaka Noma, Keiichi Fukuda. Is Mitral Regurgitant Jet Offensive rather than Protective for Left Atrial Thrombus? *Int J Cardiol* 2008, Aug 14 [Epub ahead of print].
 - Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Hideaki Kanazawa, Keiichi Fukuda. Regulation of Cardiac Nerves: A New Paradigm in the Management of Sudden Cardiac Death? *Curr Med Chem* 15: 1731-1736, 2008.
 - Noriakki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Tadashi Wada, Hiroshi Handa, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda, Makoto Suematsu, Takashi Sawai, Chikao Morimoto, Hiroto Tanaka. Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by HEXIM1. *Molecular Endocrinology* 22: 2609-23, 2008.
 - Motoaki Sano, Keiichi Fukuda. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res* 103: 1191-3, 2008
- 2) 学会発表
- Keiichi Fukuda. Nural Crest-derived Progenitor Cells. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Mitsushige Murata, Hiroto Yada, Hiroyuki Yamakawa, Yoshiyasu Aizawa, Shinsuke Yuasa, Daihiko Hakuno, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Dominant Negative Suppression of Rad Leads to Intracellular Ca²⁺ Overload Via Up-Regulation of Cardiac Ryanodine Receptor Activity. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Daihiko Hakuno, Naritaka Kimura, Tokuhiko Kimura, Shinsuke Yuasa, Mitsushige Murata, Shinji Makino, Motoaki Sano, Yasunori Okada, Ryohei Yozu, Akira Kudo, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. The Potent Angiogenic Factor Periostin Accelerates Degeneration and Sclerosis of the Cardiac Valve Complex. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Jin Endo, Hideaki Kanazawa, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Inhibition of Cardiac Myocyte Apoptosis by Zac1, an Essential Transcription Factor for Cardiac Morphogenesis. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Haruko Manabe, Tokuhiko Kimura, Yasunori Okada, Hatsue Ueda, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Human Cardiac Sympathetic Nerves Switch the Neurotransmitter Property from Catecholaminergic to Cholinergic in Patients with Severe Heart Failure. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Takaharu Katayama, Motoaki Sano, Jin Endo, Kentaro Hayashida, Tomohiro Matsuhashi, Satori Tokudome, Toshimi Kageyama, Shinsuke Yuasa, Takeshi Adachi, Makoto Suematsu, Kiyomi Nishimaki, Ikuro Ohsawa, Shigeo Ohta, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Sublethal Levels of Aldehydes Augmented Cardiac Anti-Oxidant Defense through Activation of eIF2 α -ATF4 Pathway via GCN2 Kinase. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Toshimi Kageyama, Shinji Makino, Fumiyuki Hattori, Ruri Kaneda, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Sonhan, Yohei Ohno, Jin Endo, Kenichiro Shimoji, Takahide Arai, Daihiko Hakuno, Tomofumi Tanaka, Kensuke Kimura, Kentaro Hayashida, Mitsushige Murata, Takaharu Katayama, Motoaki Sano, Tomoyuki Tokunaga, Tomohiro Kono, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Imprinting Gene-Modified Parthenogenic ES Cells Can be a Novel Autologous Cell Source for Generating Regenerative cardiomyocytes. American Heart Association, 80th Scientific Meeting. 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Yohei Ohno, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Toru Egashira, Kenichiro Shimoji, Sung Han Yoon, Takahide Arai, Jin Endo, Toshimi Kageyama, Hao Chen, Tomofumi Tanaka, Fumiyuki Hattori, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Molecular Characterization, Safety and Feasibility of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Derived

- Cardiomyocytes for Heart Regenerative Therapy. American Heart Association, 80th Scientific Meeting, 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
- Yuichi Tamura, Masaki Ieda, Keisuke Matsumura, Hideaki Kanazawa, Kensuke Kimura, Yasuyo Ieda, Jin Endo, Takahide Arai, Haruko Kawaguchi-Manabe, Yuichi Tomita, Shinsuke Yuasa, Motoaki Sano, Kazuto Kobayashi, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Neural Crest Stem Cells Supply Intrinsic Cardiac Adrenergic Cells and Contribute to Reinnervation after Myocardial Infarction in Mice. American Heart Association, 80th Scientific Meeting, 2008.11.8-12, New Orleans, LA, USA.
 - Daihiko Hakuno, Naritaka Kimura, Tokuhiko Kimura, Yasunori Okada, Ryohei Yozu, Akira Kudou, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. The Potent Angiogenic Factor Periostin Accelerates Degeneration and Sclerosis of the Cardiac Valve Complex. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Mitsushige Murata, Hiroyuki Yamakawa, Hirotaka Yada, Shinsuke Yuasa, Ruri Kaneda, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak by small G-protein Rad in the heart. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Shinsuke Yuasa, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Cardiomyocyte differentiation from ES cells and iPS cells. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Haruko Kawaguchi-Manabe, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Kentaro Hayashida, Motoaki Sano, Ikuroh Ohsawa, Ken Shinmura, Kayoko Tamaki, Kensuke Kimura, Jin Endoh, Takaharu Katayama, Akio Kawamura, Shun Kohsaka, Shinji Makino, Takahiko Nishiyama, Toshimi Kageyama, Shinsuke Yuasa, Tomohiro Matsuhashi, Tohru Egashira, Hiroyuki Yamakawa, Shigeo Ohta, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Hydrogen gas protects cardiomyocyte cell death and reduces the infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Kentaro Hayashida, Akio Kawamura, Masahisa Yamane, Yasushi Asakura, Masaharu Kataoka, Keisuke Matsumura, Hideaki Kanazawa, Ayaka Endo, Yohei Ono, Takahide Arai, Yusuke Jo, Takaharu Katayama, Kimi Koide, Toshimi Kageyama, Shinsuke Yuasa, Yuichiro Maekawa, Satoshi Ogawa. DES can be a CABG Buster? : LMT-CYPHER. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Takeshi Onizuka, Shinsuke Yuasa, Kenichiro Shimoji, Toshimi Kageyama, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. Wnt2 plays a key role in cardiac development via a non-canonical pathway Poster. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Takashi Kawakami, Fumiyuki Hattori, Masaharu Kataoka, Hideaki Kanazawa, Takaharu Katayama, Hideki Mochizuki, Chieko Yokoyama, Takashi Shimada, Toru Satoh, Satoshi Ogawa, Tadashi Tanabe, Keiichi Fukuda. Adeno-associated virus-mediated prostaglandin I₂ synthase (PGIS) gene transfer improves a limb ischemia. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Toshimi Kageyama, Shinji Makino, Takeshi Onizuka, Sung Han Yoon, Yohei Ono, Jin Endoh, Shinsuke Yuasa, Kenichiro Shimoji, Takahide Arai, Tohru Egashira, Daihiko Hakuno, Fumiyuki Hattori, Ruri Kaneda, Kentaro Hayashida, Mitsushige Murata, Takaharu Katayama, Motoaki Sano, Tomoyuki Tokunaga, Tomohiko Kono, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Cardiomyocytes Derived from Bimaternal Parthenogenetic ES Cells by Epigenetic Modification have a Different Property and Genetic Presentation in Cardiogenesis. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Takaharu Katayama, Motoaki Sano, Jin Edo, Kentarou Hayashida, Tomohiro Matsuhashi, Shintarou Morizane, Hidenori Moriyama, Toshimi Kageyama, Takahide Arai, Yohei Ono, Sung Han Yoon, Takahiko Nishiyama, Yuichi Tamura, Shinsuke Yuasa, Daihiko Hakuno, Shinji Makino, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Atf4 plays a key role in antioxidant stress response in the heart. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Jin Endoh, Akaharu Katayama, Motoaki Sano, Takeshi Adachi, Satori Tokudome, Shinsuke Yuasa, Shinji Makino, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Kinase-dependent Metabolic Shift towards Phgdh-mediated Serine Synthesis Enhances

- Cardioprotection to Oxidative Stress as a Hormetic Response to Aldehydes. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
- Yohei Ono, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Toru Egashira, Kenichiro Shimoji, Sung Han Yoon, Takahide Arai, Chen Hao, Tomofumi Tanaka, Fumiya Hattori, Toshimi Kageyama, Satoshi Ogawa, Shinya Yamanaka, Keiichi Fukuda. Molecular characterization, safety and feasibility of induced pluripotent stem (iPS) cell- derived cardiomyocytes for heart regenerative therapy. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Yuichi Tamura, Masaki Ieda, Keisuke Matsumura, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Sung Han Yoon, Takahiko Nishiyama, Syugo Tohyama, Takaharu Katayama, Yuichi Tomita, Shinji Makino, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Neural Crest Stem Cells Supply Intrinsic Cardiac Adrenergic Cells and Contribute to Reinnervation after Myocardial Infarction in Mice. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Sung Han Yoon, Takahiko Nishiyama, Yohei Ono, Toshimi Kageyama, Ruri Ohki, Fumiya Hattori, Shinsuke Yuasa, Atsushi Shimizu, Shuichi Asakawa, Jun Kudo, Misato Fujita, Atsushi Kawakami, Akira Kudo, Motoaki Sano, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. Versican is Essential for Ventricular Trabeculation and Outflow Tract Formation in Medaka Heart. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Sung Han Yoon, Toshimi Kageyama, Takahide Arai, Yuichi Tamura, Kentaro Hayashida, Hiroyuki Mano, Shinsuke Yuasa, Shinji Makino, Keiichi Fukuda, Satoshi Ogawa. MiR-142-3p Regulates Heart Development and Somitegenesis on the Stage of Early Mesoderm Formation. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Naritaka Kimura, Chisa Shukunami, Daihiko Hakuno, Masatoyo Yoshida, Shigenori Murata, Denista Docheva, Tokuhiko Kimura, Yasunori Okada, Goki Matsumura, Toshiharu Shinoka, Ryohei Yozu, Junjiro Kobayashi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yuji Hiraki, Keiichi Fukuda. Local Tenomodulin Absence Angiogenesis, and Matrix Metalloproteinase Activation are Associated with the Rupture of the Chordae Tendineae Cordis. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Yuta Higashikuse, Shiji Makino, Sung Han Yoon, Toshimi Kageyama, Motoaki Sano, Shinsuke Yuasa, Takahiko Nishiyama, Takahide Arai, Yuichi Tamura, Ruri Kaneda, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani-Seiki, Shintaro Morizane, Takeshi Suzuki, Keiichi Fukuda. Yes-associated protein (YAP) is essential for the linear heart tube formation in cardiac development. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.
 - Shintaro Morizane, Motoaki Sano, Takaharu Katayama, Jin Endoh, Kentaro Hayashida, Tomohiro Matsushashi, Hidenori Moriyama, Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Fumiko Mitani, Yuta Higashikuse, Takeshi Suzuki, Seiji Honma, Keiichi Fukuda. Inadequate Suppression of Aldosterone Biosynthesis after Salt Intake is a Primary Cause of Sodium-Retention in Dahl Salt-Sensitive Rat. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3.20-22, Osaka, Japan.

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

— 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 —

研究協力者： 武田 信彬(東京慈恵会医科大学青戸病院内科教授)

<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

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

我々はこれまでその病因の解明に、マウスとヒトのラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子を比較し、両種に共通して存在し、プロモーターの転写を強く促進するDNA配列(bcn-1 element)を見出し(J. Biol. Chem. 271: 1996)、さらにbcn-1 elementに結合し、心筋の細胞に普遍的に発現する転写因子の存在を報告した(Am. J. Physiol. 275: 1998)。また、Yeastのone-hybrid systemを用いてライブラリーのスクリーニングを施行し、bcn-1に結合する転写因子(Smarce-1rと命名)を同定しデータベースに登録した(Genebank, 1998)。

そこで本研究では、心筋症の病因解明を目的に、(1)ラミニンの転写を強く促進する転写因子Smarce-1rの機能を明らかにするとともに、心筋に特異的に存在する新規タンパクならびに相互分子をクローニングし、心筋症との関連を検討した。また、(2)我々は、心筋症モデル動物である心筋症ハムスターBio 14.6とGoldenハムスターの交配を繰り返すことにより新しい心筋症ハムスターJ-2-Nkを開発したが、J-2-Nkではdelta-sarcoglycan遺伝子異常が知られている。そこで、今回J-2-Nkの心臓の機能解析として生理学的、生化学的検討ならびに遺伝子解析を施行した。

B. 研究方法

ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子に存在するDN(1)ラミニン γ 1鎖プロモーター遺伝子に存在するbcn-1モチーフを用い、酵母のハイブリッドシステムを用いて心筋由来cDNAライブラリーの

スクリーニングを施行し、Smarce-1rを同定した。さらに、本研究ではSmarce-1rをベイトにイーストのハイブリッドシステムによるスクリーニングを繰り返す、心筋症との因果関係の解析、ならびに分子間相互因子のクローニングを施行した。

また、(2)J-2-Nkにつき心筋収縮力の測定、心室筋ミオシンアイソザイムの変化、サルコレンマ、sarcoplasmic reticulum (SR)の生化学的検討ならびにマイクロアレイによる遺伝子解析を施行した。

C. 研究結果

1)Smarce-1r遺伝子の調節、発現についての検討
bcn-1モチーフを用いて、スクリーニングを繰り返す、心筋に特異的に発現する新規タンパクSmarce1rをクローニングした。Smarce-1rはノーザンプロットにて心臓に強く発現し、細胞内局在では核に局在した。

2)SMARP遺伝子の調節、発現についての検討
Smarce-1rを用いスクリーニングを施行し、ロイシンジッパー構造を有する新規蛋白を見つけSMARP(Smarce1r-related protein)とした。SMARPは、ノーザンプロットにてSmarce-1rと同様に心臓に強く発現し、細胞内局在では核小体により強く発現した。

3)トロポニンI α 遺伝子の調節、発現についての検討

同様にSMARPをベイトにスクリーニングを施行し、トロポニンI類似構造を認めるTroponin I-related(TnI α r)をクローニングした。TnI α rはノーザンプロットで、脳、肝、腎臓、精巣には発現せず、心臓に特異的に発現した。TnI α rは構造上、119個のアミノ酸からなり、トロポニンC、トロポニン

Tとの結合領域にあたるcTnIのエクソン5, 6のアミノ酸42-132の領域を欠損していた。そこで、機能解析を施行したところ、In vitroのPull-downならびに、In vivoのIn cellアッセイにて、TnIrはTnIと比較してトロポニンTとの分子間結合能が著明に低下していた。

4) J-2-Nkの生化学的解析では、心筋のフォスフォランパンならびSARCA2の活性低下を認めた(Am. J. Physiol., 2002)。マイクロアレイによる遺伝子解析では、343の遺伝子がup-regulate、258の遺伝子がdown-regulateされ、特にサルコメア構造遺伝子、サルコグリカン遺伝子等に興味深い発現を示した。

D. 考察および結論

本研究にてクローニングした3種のSmarce-1r、SMARP、TnIrはいずれも新規蛋白である。また、SMARPのN末端に核小体移行シグナルの存在を見出し、これは新たな核小体移行シグナルであるが、これらが心筋症の原因、心機能異常とどのような関係があるかは今後さらに検討が必要である。

E. 結論

今回心筋に特異的に発現する新規蛋白Smarce-1r、SMARPならびにTnIrをクローニングした。今後、J-2-Nkならびに、心筋症家系などにおけるこれらの新規タンパクの発現検索などが心筋症におけるラミニン増加の解明への布石となると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Wohlschlaeger J, von Winterfeld M, Milting H, El

Banayasy A, Schmitz KJ, Takeda A, Takeda N, Azhari P, Schmid C, August C, Schmid KW, Baba HA. Decreased myocardial chromogranin a expression and colocalization with brain natriuretic peptide during reverse cardiac remodeling after ventricular unloading. *J Heart Lung Transplant* 27:442-449, 2008.

- ・ Sanganalmath SK, Barta J, Takeda N, Kumamoto H, Dhalla NS. Antiplatelet therapy mitigates cardiac remodeling and dysfunction in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* 86:180-189, 2008.
- ・ Barta J, Sanganalmath SK, Kumamoto H, Takeda N, Edes I, Dhalla NS. Antiplatelet agents sarpegrelate and cilostazol affect experimentally-induced ventricular arrhythmias and mortality. *Cardiovascular Toxicol* 8:127-135, 2008.
- ・ Baba HA, Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Nadalin S, Lang H, Benesch A, Gu Y, Biglarnia AR, Sotiropoulos GC, Takeda A, Takeda N, von Wnuck Lipinski K, Levkau B. Survivin is upregulated during liver regeneration in rats and humans and is associated with hepatocyte proliferation. *Liver Int* 2008 Oct 31 (Epub ahead print).

2) 学会発表

- ・ Suzuki H, Hokkyo K, Yamada H, Horiguchi-Yamada J, Takeda N. Molecular cloning of cardiac troponin I isoform using the yeast two-hybrid system. 31st Annual Meeting of the Japanese Working Group "Cardiac Structure and Metabolism". July 13, Tokyo.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

<研究協力者>

鈴木英明(東京慈恵会医科大学総合診療部)

特発性心筋症に関する調査研究

—たこつぼ心筋症発症仮説の病理形態学的検討—

研究協力者： 河合 祥雄（順天堂大学医学部循環器内科先任准教授）

＜研究要旨＞中間型心筋症の相対的位置付けをリモデリングベクトル、病理形態から検討した。中間型心筋症は、拡張相大型心筋症の途中経過だけでなく、肥大型心筋症に進展する例も含む多様なベクトルを有した。空胞変性の頻度が高く、単なる reverse remodeling でない可能性がある。

A. 研究目的

病理所見からのたこつぼ心筋症発症仮説を検証し、病態生理学的に必要な補助仮説を追記する。動物実験モデル、たこつぼ型心筋障害剖検例での心室筋細胞Gap結合の異常の有無を抗Cx43抗体染色により検討する。

B. 研究方法

全国諸施設から提供された生検例・剖検例からたこつぼ心筋症の病理所見を抽出し、その心室病変組織像から諸仮説を検討した。家兔迷走心筋電気刺激モデル剖検心2例(1週後、直後)、対照(1週後)1例とヒト剖検例4例に抗Cx43抗体を含む各種染色を施し、心筋細胞障害と介在板でのコネクシン43発現を観察した。

C. 研究結果

全国諸施設から提供された生検例・剖検例からたこつぼ心筋症の病理所見を抽出し、その心室病変組織像から諸仮説を検討した。家兔迷走心筋電気刺激モデル剖検心2例(1週後、直後)、対照(1週後)1例とヒト剖検例4例に抗Cx43抗体を含む各種染色を施し、心筋細胞障害と介在板でのコネクシン43発現を観察した。

D. 考察

単一心筋細胞障害像は、心筋細胞障害が隣接心筋細胞に波及することを防止するために、心筋細胞間の機能的連絡を遮断する機序の存在を示唆する。心筋segmentationの形態像は、合胞体としての心筋細胞(複数)障害を示唆すると考えられる。心筋細胞障害の危険要素が心筋のある部位にat randomもしくは局所全体に生じた場合、組織内の広範なGap junctionが、あるリスクに対応して閉鎖またはサイズを減少させ、cell to cell

communicationを制限するといった機序が示唆される。これが収縮機能の低下・伝導速度の低下に関連している可能性も想定されよう。この場合、必ずしも細胞障害は伴わないので、たこつぼ心筋症での壁運動異常と障害心筋細胞数の少なさとの乖離を説明するのかもしれない。ヒト剖検例ではより症例を重ねての検討が必要である。

E. 結論

たこつぼ心筋の局所収縮不全に機能的・形態学的なGap junctionの変化が関与している可能性が考えらる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究報告

1)論文発表

- 河合祥雄：心筋症の病理の包括的理解--心筋症の病理像は一つではない。医学のあゆみ(第一土曜特集)：心筋症—基礎と臨床：Up to Date—226(1)：22-27, 2008.
- 河合祥雄：特定心筋症update：たこつぼ型心筋障害。Heart View 12(8)：956-961, 2008.

2)学会発表

- Kawai S: Takotsubo Cardiomyopathy: Pathological Characteristics and Pathogenetic Insights. The 73th Annual Scientific Meeting of The Japanese Circulation Society, March 20, 2009.
- 山田京志, 鈴木宏昌, 河合祥雄, 代田浩之：たこつぼ心筋症剖検例の病理組織学的検討。循環器科 64(2)：195-196, 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

—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—
研究協力者： 室原 豊明(名古屋大学大学院器管制御内科学教授)

＜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

肥大型心筋症(HCM)は左心室の非対称的肥大を特徴とし、患者の多くは無症状で経過するが、病期の進行とともに左室拡張不全を背景とする心不全症状を呈する。更に病期が進行すると左心室腔の拡大と収縮能の低下を示す拡張相に移行し、末期心不全の像を呈する。HCMは、その約7割の症例でサルコメア遺伝子異常に起因する心筋収縮蛋白の異常が同定されており、それが一次的原因とされているが、異なる遺伝子異常でも類似した形態や病態生理および自然歴を示すことから、共通の二次的もしくは三次的变化がこれらの病態に加わっていると考えられるようになった。その一つとして想定されているのがミトコンドリアの機能異常である。実験動物を用いた異なるサルコメア遺伝子改変モデルで同様のミトコンドリア異常が同定されたことに起因する仮説であるが、HCM患者に対する検討は少ない。^{99m}Tc-sestamibi(MIBI)はその性質から心筋に取り込まれると約90%がミトコンドリアに取り込まれ、電位依存的に洗い出されることが知られている。そこで、本研究では、MIBIの洗い出し率(washout rate: WR)を算出し、心臓カテーテル検査で得られる心筋収縮および拡張予備能との関係を検証した。また、心筋生検サンプルを用い電子伝達系酵素のmRNA発現およびミトコンドリアの形態変化についても検討した。

B. 研究方法

1) 患者の選定

心電図および心エコーにて心肥大を疑われ、当院にて心臓カテーテル検査を受け心筋バイオプシーにてHCMと診断された連続30名の患者(58±12歳)について検討を行った。すべての患者は運動時の軽い呼吸苦または、非典型的な胸痛症状を有していたが、心エコー上左室駆出率は60%以上であった。本研究の内容は等施設の倫理委員会により承認され、すべての患者より書面による同意を得た。

2) 心臓カテーテル検査

マンメーター付カテーテルを左室内に挿入し、baselineおよび右房ペースング中の圧変化を測定し、LV dP/dt_{max} 、pressure half time ($T_{1/2}$)、左室拡張末期圧(LVEDP)を計測した。ペースングによるLV dP/dt_{max} の変化をforce-frequency relation(FFR)として計測した。また、右心カテーテルを施行し、肺動脈楔入圧(PAWP)および心係数(CI)を計測または算出した。冠動脈造影にて虚血性心疾患を除外した。左室造影にて左室壁運動の評価を行うとともに、EFを算出した。

3) MIBI WRの評価

600mMBのMIBIを安静時に静脈内投与し、投与後30分および180分後に撮像を行った。正面ブレンダー像において心臓の周り縦隔にROIを設定し、下記に示す計算式にてWRを算出した。

$$WR = \frac{(\text{Early H} - \text{Early M}) - (\text{Delayed H} - \text{Delayed M}) \times DC}{\text{Early H} - \text{Early M}}$$

4) Reverse Transcription-PCR 解析

心筋生検で得た凍結サンプルより RNeasy Fibrous Tissue Mini-Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて全RNAを抽出した。それらをRNA PCR Core kit (Applied Biosystems, Foster, CA) を用いてcDNAを作成し、ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて定量的PCRを行った。human SERCA2, phospholamban, ryanodine receptor 2, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, calsequestrin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), human cytochrome oxidase subunit 5B (COX5B, respiratory complex IV), NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3 (NDUFV3, complex I), α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), P-glycoprotein (multidrug resistance 1, もしくは MDR1) について検討を行った。すべてにおいてGAPDHとの比を算出し患者間の比較を行った。

5) 電子顕微鏡による検討

心筋サンプルをグルタルアルデヒドで24時間固定したのち、1%オスミウム液にて1時間再固定した。エタノールにて脱水した後プロピレンオキサライドに浸し、エポキシに包埋した。試料を60-70nmの厚さに切断し、JEM-1400透過電子顕微鏡 (JEOL, Tokyo, Japan) にて観察した。

(倫理面への配慮)

本研究内容は本学倫理委員会の承認の下で行った(承認番号359)。すべての患者において検査内容を説明し文書による同意を得て研究を行った。

C. 研究結果

1) 左室収縮予備能と左室弛緩予備能の関係とグループ分け

左室予備能はペーシングに対するLVdP/dtmaxの変化により評価し、左室弛緩予備能はピークペーシング時のT1/2の値で評価した。ペーシングとともにLVdP/dtmaxが上昇し、あるペーシングレートを境に降下するものを二相性FFRとした。二相性FFRを示す症例は、ピークペーシング時のT1/2も延長していた。そこで、FFRが一相性で、T1/2が30ms未満の症例をグループA(正常群;15例)、FFRが二相性もしくは、T1/2が30ms以上のものをグループB(異常群;15例)とした。

2) MIBI WRと心筋予備能の関係

二相性FFRを示すものはMIBI WRが亢進していた。また、グループBではグループAに比べMIBI WRが高値を示した。更に、MIBI WRはピークペーシング時のT1/2と正の相関関係にあった。

3) Reverse Transcription-PCR 解析

MIBI WRは α -KGDHのmRNA量と負の相関関係にあった。また、COX5BおよびNDUFV3とは負の相関関係を示す傾向にあった。グループ間の比較では、それらすべてのmRNAの発現がグループBにおいて有意に低下していた。SERCA2についてもグ

ループBにおいて有意な発現の低下を認めたが、phospholamban, ryanodine receptor 2, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, calsequestrinについては、2群間で有意差を認めなかった。

4) 電子顕微鏡による観察

グループBの症例は、グループAの症例に比べミトコンドリアの増殖が顕著で、大小不同が大きかった。また、グループBの症例では巨大化したミトコンドリアやクリスタの異常がより高頻度に観察された。ミトコンドリアの脱落も顕著で、その周辺にはグリコーゲンの集積が観察された。

D. 考察

ミトコンドリアにおけるATP産生は電子伝達系によって作られる電気勾配と共役しているため、電気勾配が低下するとATPの産生も低下すると考えられている。MIBI WRは電気勾配が低下した状態で亢進するため、ミトコンドリアのエネルギー産生状態を反映していると考えられる。一方で、安静状態で左室収縮能の低下が無いHCM患者でも、収縮および弛緩予備能が低下している症例があり、それらが無い症例より病期が進行していると考えられる。これらの予備能が低下している状態とミトコンドリア障害が関係していることを本研究にて示した。また、ミトコンドリアの形態異常はミトコンドリアの機能異常と関係していることが示されていることから、本研究で行った電子顕微鏡での観察もミトコンドリアの機能異常を示す一つの証拠と考えられる。

E. 結論

安静時収縮能障害の無いHCM患者でもミトコンドリア機能は障害されており、その障害が左室収縮および弛緩予備能の低下という病態生理に関係していることを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

- Kobayashi M, Izawa H, Cheng XW, Asano H, Hirashiki A, Unno K, Ohshima S, Yamada T, Murase Y, Kato ST, Obata K, Noda A, Nishizawa T, Isobe S, Nagata K, Matsubara T, Murohara T, Yokota M. Dobutamine stress testing as a diagnostic tool for evaluation of myocardial contractile reserve in asymptomatic or mildly symptomatic patients with dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol Imaging 2008;6:718-26.
- Harada K, Izawa H, Nishizawa Takao, Hirashiki A, Murase Y, Kobayashi M, Isobe S, Cheng XW, Noda A, Nagata K, Yokota M, Murohara T. Beneficial Effects of Torasemide on Systolic Wall

- Stress and Sympathetic Nervous Activity in Asymptomatic or Mildly Symptomatic Patients with Heart Failure: Comparison with Azosemide. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009 (in press).
- Unno K, Isobe S, Izawa Hideo, Xian Cheng XW, Kobayashi M, Hirashiki A, Yamada T, Harada K, Ohshima S, Noda A, Nagata K, Kato K, Yokota M, Murohara T. Relation of Functional and Morphological Changes in Mitochondria to Myocardial Contractile and Relaxation Reserves in Asymptomatic to Mildly Symptomatic Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 2009 (in press).
- 2) 学会発表
- Hirashiki A, Izawa H, Arai K, Funahashi H, Yamada Y, Unno K, Murase Y, Harada K, Kobayashi M, Asano H, Isobe S, Nishizawa T, Yokota M, Murohara T. Dobutamine-induced mechanical alternans could be a useful predictor of poor prognosis in ambulatory patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (一般演題). *Circ J* 2008; 72 (Suppl I): 446 (abstract).
 - Unno K, Isobe S, Izawa H, Cheng X, Kobayashi M, Hirashiki A, Murase Y, Asano H, Yamada T, Ooshima S, Hirai T, Nishizawa T, Noda A, Nagata K, Kato K, Murohara T, Yokota M. Increased ^{99m}Tc-Sestamibi Washout reflects impaired myocardial contractile reserve and prolonged relaxation in patients with nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy (一般演題). *Circ J* 2008; 72 (Suppl I): 272 (abstract).
 - Cheng XW, Okumura K, Obata K, Hirashiki A, Asano H, Kobayashi M, Yamada T, Harata K, Murase Y, Nishizawa T, Izawa H, Nagata K, Kuzuya M, Murohara T, Yokota M. Superoxide-dependent activation of cathepsin system is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for AT1R blocker therapy (一般演題). *Circ J* 2008; 72 (Suppl I): 401 (abstract).
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし。

特発性心筋症に関する調査研究

—テネイシンCによる心臓血管新生制御メカニズム—

研究協力者： 今中 恭子(三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学准教授)

<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

心臓組織リモデリングは肥大など心筋細胞の反応と間質の反応の大きく2つに分けられる。さらに、間質反応は、線維化と血管新生の2つの要素に分け、そのバランスが、望ましい組織リモデリング(修復、適応)か、いわゆる心室リモデリングといわれる生体にとって不利益な結果をきたすかを左右すると考えられる。従って、それぞれの制御機構を明らかにし、生体に有利な組織変化に誘導することが、治療戦略の基本である。われわれは、これまで、細胞外マトリクス分子テネイシンCが、線維化を促進すること、および、そのメカニズムを明らかにした。また、テネイシンCは、癌浸潤や創傷治癒にも関わる多機能タンパクであり、癌間質の血管新生での役割が以前から示唆されてきた。心筋組織においても、血管新生制御に関わることが予想される。本研究では、最も単純で基本的な血管新生である、胎生期の冠動脈発生形成過程をモデルシステムとして、血管前駆細胞の挙動がテネイシンCによってどのように制御されるか明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 冠血管形成過程におけるテネイシンCの発現マップの作製

ウズラーニワトリ用いて、血管前駆細胞の挙動を追跡して血管形成の過程を明らかにし、その過程でのテネイシンCの局在をwhole mountおよび組織切片を免疫組織化学に解析して、詳細な発現マップを作成した。すなわち、PEO細胞が心臓に付着する前のHH16ウズラーからPEOを、あるいはCNC細胞が遊走する前のHH8~9(体節5~7)ウズラー胚からCNCを摘出して、ニワトリ胚に移植し、

マウス抗ウズラー細胞核膜特異抗体QCPN (Developmental Studies Hybridoma Bank)、マウス抗ウズラー内皮細胞特異抗体QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank)を用いて追跡し、ウサギ抗テネイシンC抗体を用いて二重染色しテネイシンCと対比した。

2) テネイシンCのは乳類冠動脈発生での役割に関する生体内解析

CAGプロモーターとマウスTN-C遺伝子の間にloxP配列ではさんだpolyAを挿入した遺伝子(TG)を導入したトランスジェニックマウス(*flox-TN-C::TG*マウス)とNkx2.5 Cre-マウスを交配したF1で、TGとCreの両方の遺伝子を持つ個体(TG/Cre)で過剰発現を誘導した。さらに、テネイシンCノックアウトを交配し、同腹で、テネイシンCを正常に(流路の一部のみ)発現するもの、それに加えて心臓全体で過剰発現するもの、多臓器には発現せず心臓全体で過剰発現するもの、全く発現しないものの4種類の表現型のマウスを作成し、whole mount immunostaining、血管内色素注入により冠動脈発生を検討した。さらに、テネイシンCに対するモノクロナル抗体を作成し、妊娠マウスの血中に投与することにより、経胎盤的に胎児に抗体を投与し、新生マウスの冠動脈に色素を注入して冠動脈の走行を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、三重大学動物実験委員会承認されたプロトコールに従って行った。

C. 研究結果

1) 冠動脈構成細胞のcell lineage

冠動脈は大部分PEO由来細胞で構成される。さらに、神経堤細胞が冠動脈の大動脈に開口部付近

の一部に内皮細胞としてはいりこみ冠動脈の大動脈への正常な開口を誘導しており、心臓神経堤塊拘束すると冠動脈入口部形成異常をおこす。

2) 冠動脈形成過程でのテネascin Cの発現様式

心臓の冠血管は、側板中胚葉由来の細胞からなる原始心筒に、あとから、横中隔由来の間葉系幹細胞が入り込むことによって形成される。すなわち、原始心筒と肝臓原器の間の横中隔中胚葉の細胞がproepicardial organ (PEO) と呼ばれるカリフラワー状の構造物を一過性に形成し、その先端の細胞が心臓に向かって遊走し、心筋層内に原始血管網を形成し、それが統合され最終的に大動脈に開口することによって完成するとされる。テネascin Cは、PEOから心臓に遊走を開始する際に強く発現するが、心臓表面に達すると消失し、心臓上皮細胞の上皮-間葉転換に伴って特異的に発現した。一般に心房、心室の心筋細胞はテネascin Cを発現しないが、流出路心筋細胞は例外的にテネascin Cを発現し、テネascin C陽性の流出路には原始血管網が構成されず、あたかも原始血管網の侵入を抑制するかのように存在した。発生がすすむにつれ、原始血管網を先導する様にテネascin C陽性部は短縮し、原始血管網は、流出路にそって大動脈基部にむかって伸長した。

組織切片をつくって検討すると、テネascinはPEO由来、神経堤由来細胞が大動脈壁を貫通して原始冠血管網が大動脈に開口した後、中膜に血管平滑筋が動員される際に強く発現することが明らかになった。

3) テネascin C欠損、過剰発現状態での冠動脈形成の変化

テネascin C欠損および発現過剰マウスの冠血管には大きな変化が認められなかった。野生型マウス胎児に、冠動脈が大動脈に開口する時期に抗テネascin C抗体を投与して一過性に機能を阻害すると、冠動脈起始部の開口数が多いものが有意に増加した。

D. 考察

テネascin Cは、非常に限られた部位に一過性に発現するという性質から、分子の局在が、その役割を解明するための手がかりになりうる。我々の詳細な解析により、テネascin Cは冠血管発生の後期、血管壁の成熟、統合、おそらく中膜平滑筋細胞の動員に関わることが示唆された。遺伝子改変動物を用いた検討では、予想に反し、テネascin C欠損でも過剰でも明らかな表現型を見つけることはできなかった。しかしながら、抗体投与により、大動脈につながる冠動脈近位部が形成される一過性に機能を抑制すると、冠動脈開口数が多い個体が有意に増加することから、大動脈に複数開口した未熟な血管が、成熟統合される時期に変化を生じたためと思われる。遺伝子改変動物を用いて、重要と思われる遺伝子の一つや2つを欠失させ

ても、しばしば胎児発生は問題なくすみ、表現型を見ないことはよく知られている。その一方、発生期には多くの機構によって代償される遺伝子機能の変化が、成体の病的状態で重大な表現型の差を生じることも明らかになってきた。我々の抗体による抑制実験で明らかにした表現型は、非常に軽微ではあるがテネascin Cの機能を解明する手がかりを提供すると考えられる。

心筋組織修復の基本は毛細血管の固まりである肉芽形成に始まる創傷治癒機転であり、これ自体が血管新生の一種である。しかし、心臓の血管新生において重要なのは、新生血管が既存の循環システムと連続性し、有効な血流を獲得することである。成体の心疾患の組織リモデリングに伴う血管新生メカニズムは、基本的にvasculogenesisである胎生期の冠血管新生の機構と完全には一致しない可能性はあるものの、共通のメカニズムによって制御される部分があることは予想される。特に、未熟な原始血管網が大動脈に連結し、血管壁の成熟に伴い、有効な血流を循環させる整ったヒエラルキー構造を形成するメカニズムは、大人の心筋組織で有用な血管新生を誘導するために重要な手がかりになると思われる。

今回の結果は、テネascin Cは、血管壁の成熟、おそらく中膜平滑筋細胞の動員に関わることが示唆すると考えており、治療法を開発する際の重要な標的分子の一つになると思われる。

E. 結論

テネascin Cは原始血管網の成熟統合化に関与す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

- Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, and Kitaura Y. High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: Expression of tenascin-C as a possible marker for inflammation. Human Pathol (in press).
- Kurita T, Onishi K, Dohi K, Takamura T, Fujimoto N, Tanigawa T, Imanaka-Yoshida K, Wada H, Nobori T, Ito M. Conventional therapy with an ACE inhibitor diminishes left ventricular dyssynchrony during the progression of heart failure. Int J Cardiol (in press).
- Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sugimura Y. Stromal tenascin-C regulates epithelial cell differentiation in mouse prostate. Dev Biol

- 324:310-9 (2008).
- Odaka K, Uehara T, Arano Y, Adachi S, Tadokoro H, Yoshida K, Hasegawa H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hiroe M, Irie T, Tanad S, Komuro I. Noninvasive detection of cardiac repair after acute myocardial infarction in rats by 111 In Fab fragment of monoclonal antibody specific for tenascin-C. *Int Heart J* 49: 481-92 (2008).
 - Suzuki H, Kinoshita N, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Taki W. Cerebrospinal fluid tenascin-C increases preceding the development of chronic shunt-dependent hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 39: 1610-2, 2008.
 - 宮川一富田幸子, 杉村洋子, 中西敏雄, 今中一吉田恭子. 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).
 - 今中恭子, 廣江道昭, 吉田利通. テネイシンC. *Heart View* 8: 124-129 (2008).
 - 廣江道昭, 今中(吉田)恭子, 吉田利通. テネイシンCの心臓リモデリングにおける有用性. *医学の歩み* 224: 408-413 (2008).
 - 吉田利通, 石垣共基, 今中一吉田恭子. 組織リモデリングにおけるテネイシンの役割. *生体の科学* 591: 123-128 (2008).
 - 今中(吉田)恭子. 心筋生検. 研修医のための病理マニュアル, 診断と治療社(梅澤明弘, 黒田雅彦, 大喜多肇) 30(2008).
- 2) 学会発表
- Tenascin-C may play a significant role in maturation of coronary arteries in mouse. *Weinstein Cardiovascular Development Conference* 2008, May 15-17, 2008, Houston, Texas, USA.
 - Imanaka-Yoshida K, Nishioka T, Onishi K, Tsutsui H, Yoshida T, Hiroe M. Deletion of Tenascin-C prevents left ventricular remodeling and cardiac failure after myocardial infarction. *Basic Cardiovascular Science Conference* 2008, July 28-31, 2008, Keystone, Colorado, USA.
 - Hiroe M, Onishi K, Fujimoto N, Sato A, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Incremental value of tenascin-C and BNP levels for predicting prognosis in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. *Basic Cardiovascular Science Conference* 2008, July 28-31, 2008, Keystone, Colorado, USA.
 - Yoshida T, Nagaharu K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition like change through recruitment of $\alpha v \beta 6$ integrin and phosphorylation of focal adhesion kinase by sec in breast cancer cells. *The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting* 2008, December 13-17, 2008, San Francisco, CA, USA.
 - Imanaka-Yoshida K, Nishioka T, Nagano Y, Onishi K, Yoshida T. Tenascin-C may accelerate adverse cardiac remodeling and cardiac failure. *The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting* 2008, December 13-17, 2008, San Francisco, CA, 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

—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—
研究協力者： 大津 欣也(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学准教授)

<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

心筋症の進展、増悪の過程には、圧負荷心や心筋梗塞後に認められる心筋リモデリングと同様な機序が働いているものと推察される。よって心筋リモデリングに関わる分子機序を明らかにし、これに対して治療を行なうことによって心筋症の進行を抑制しうる可能性がある。我々はこれまでに心筋リモデリングの進行には酸化ストレスの亢進が関与していることを報告してきた。酸化ストレスは細胞内の様々な機構によって産生されるが、その中の一つに鉄を介する経路がある。鉄は通常では細胞内においてferritin heavy chain(FHC)のferroxidase活性によりferritin蛋白質質内に取り込まれ隔離されているが、ferritinに取り込まれていない状態では遊離鉄としてFenton反応により活性酸素種の産生を促進し、酸化ストレスを亢進させる。FHCは細胞内鉄代謝において、鉄のferritin内への取り込みを調節し、遊離鉄の発生を制御している。すなわち、心筋リモデリング過程での酸化ストレスの亢進にこれらの経路が関与している可能性が考えられるが、詳細は不明である。本研究では細胞内鉄代謝で重要な役割を果たしているFHCの心筋リモデリングにおける役割について検討する。

B. 研究方法

週齢の野生型マウスの左冠動脈を結紮することより心筋梗塞モデルを作製した。このモデルは心筋梗塞作成後4週間で著明な左室の拡大と収縮力低下を来し、心不全状態に至ることをこれまでに報告している(Yamaguchi et al, PNAS 2003;100:15883-15886)。コントロールとして冠動脈を結紮しないsham手術をおこなったマウスを

用いた。手術後4週間における心筋でのFHC蛋白およびmRNAの発現をウエスタンブロットならびにリアルタイム定量的PCR法にて検討した。また心筋における酸化ストレスの評価として4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)に対する免疫染色をおこない、遊離鉄沈着の評価としてプルシアンブルー染色をおこなった。

*in vitro*での評価として、ラット新生仔より単離した心筋細胞を用いた。FHCを標的とする低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を発現するアデノウイルスベクター(Ad-FHC-shRNA)を構築し、ラット新生仔心筋細胞に感染させた。非特異的shRNAを発現するアデノウイルスベクター(Ad-NS-shRNA)を感染させた細胞を対照とし、FHC蛋白質減少による細胞死、鉄代謝および酸化ストレスを検討した。細胞死の評価にはCell titer blue assay kit(Promega)を用いた。遊離鉄および酸化ストレスの評価には前述のプルシアンブルー染色および4-HNEに対する免疫染色を用いた。

(倫理面への配慮)

組換え遺伝子実験については大阪大学組換えDNA実験安全管理規定に基づきおこなった。また動物実験は動物実験委員会の規定に基づきおこなった。

C. 研究結果

心筋梗塞後不全心におけるFHC蛋白質の発現レベルを梗塞作成後4週間において評価したところ、sham手術群に比し心筋梗塞群で有意に減少していた。一方、FHC mRNAの発現レベルには両群間で有意な変化を認めなかった。また、脳、肺および肝臓におけるFHC蛋白質の発現には、両群間で有意な差を認めなかった。

次に心筋梗塞後不全心での遊離鉄および酸化ストレスの程度を評価した。プルシアンブルー染色ではsham手術群に比し心筋梗塞群で鉄陽性細胞数の有意な増加を認めた。また4-HNEに対する免疫染色では、sham手術群に比し心筋梗塞群において染色度の有意な増強を認め、酸化ストレスが亢進していることが示された。

心筋梗塞後不全心筋で認められるFHC発現減少の機能的意義を検討するため、ラット新生仔単離心筋細胞を用いて検討を行なった。Ad-FHC-shRNA感染細胞群ではウイルス感染4日後にFHC蛋白質の有意な発現の低下を認めた。そこでウイルス感染6日後にCell titer blue assay kitを用いて細胞死の程度を評価した。Ad-FHC-shRNA感染細胞群では、Ad-NS-shRNA感染細胞群に比し生存細胞数の有意な減少を認めた。ウイルス感染6日後の遊離鉄をプルシアンブルー染色にて評価したところ、Ad-FHC-shRNA感染細胞群ではAd-NS-shRNA感染細胞群に比し鉄陽性細胞数の割合が有意に増加していた。一方、ウイルス感染4日後から鉄キレート剤であるデフェロキサミン(0.5mM)を培養液中に添加すると、鉄陽性細胞数の割合は有意に減少した。また、Ad-FHC-shRNA感染細胞群においてみられた生存細胞数の減少は、デフェロキサミン投与で有意に抑制され、FHC減少による細胞死が遊離鉄依存性であることが示唆された。

ウイルス感染6日後における心筋内酸化ストレスを4-HNE染色にて評価したところ、Ad-FHC-shRNA感染細胞群では4-HNE陽性細胞数の割合が対照群に比し有意に増加していた。一方Ad-FHC-shRNA感染細胞群における4-HNE陽性細胞数の増加はデフェロキサミンの添加により、有意に抑制された。すなわち、FHC減少時の酸化ストレス増加は遊離鉄を介していると考えられた。また、ウイルス感染4日後における抗酸化剤であるN-アセチルシステイン(0.2mM)の添加は、4-HNE陽性細胞数の割合を有意に減少させた。

FHC減少時の細胞死が酸化ストレス依存性であるか検証するため、ウイルス感染4日後にN-アセチルシステイン(0.2mM)またはビタミンE(1mM)を添加し細胞死に与える影響を検討した。その結果、Ad-FHC-shRNAにおいて認められる生存細胞数の減少は、N-アセチルシステインまたはビタミンEの投与によって有意に抑制された。すなわち、FHC減少時の細胞死は酸化ストレス依存性であることが示された。

D. 考察

不全心においては心臓特異的なFHC蛋白質の減少が認められ、遊離鉄および酸化ストレスの増加も認められた。単離心筋細胞でFHC蛋白をノックダウンすることにより、遊離鉄および酸化ストレス依存性の心筋細胞死が誘導されたことから、不全心筋で認められたFHC蛋白の減少が遊離鉄およ

び酸化ストレスの増加を介して心筋細胞死を惹起し心筋リモデリングの進行に關与している可能性が考えられた。

E. 結論

不全心で認められるFHCの発現低下は、遊離鉄および酸化ストレスの増加を介して心筋細胞死を誘導し、心不全の進展に寄与す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

- Taniike M, Yamaguchi O, Tsujimoto I, Hikoso S, Takeda T, Nakai A, Omiya S, Mizote I, Nakano Y, Higuchi Y, Matsumura Y, Nishida K, Hori M, Ichijo H, Otsu K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy. *Circulation* 117:545-552, 2008
- Ueno M, Suzuki J, Zenimaru Y, Takahashi S, Koizumi T, Noriki S, Yamaguchi O, Otsu K, Shen WJ, Kraemer F, Miyamori I. Cardiac overexpression of hormone-sensitive lipase inhibits myocardial steatosis and fibrosis in streptozotocin diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinology and Metabolism* 294:E1109-1118, 2008
- Watanabe T, Takeda T, Omiya S, Hikoso S, Yamaguchi O, Nakano Y, Higuchi Y, Nakai A, Abe Y, Aki-Jin Y, Taniike M, Mizote I, Matsumura Y, Shimizu T, Nishida K, Imai K, Hori M, Shirasawa T, Otsu K. Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52:779-786, 2008
- Kim C, Sano Y, Todorova K, Carlson B, Arpa L, Cerada A, Lawrence T, Otsu K, Brissette J, Arthur JS, Park JM. p38alpha MAP kinase serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nature Immunology* 9:1019-27, 2008
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Heart Disease. *Circulation Research* 103:343-51, 2008

2)学会発表

- 武田理宏, 渡部徹也, 大宮茂幹, 大津欣也, 第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜, 2008年12月5-6日). Reduction in Hemoglobin-Oxygen Affinity Results in the Improvement of Exercise Capacity in Mice with Chronic Heart Failure.
- 山口 修, 武田理宏, 辻本賀英, 大津欣也, 第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜, 2008年12

- 月5-6日), Cell death and cardiac remodeling.
- ・大宮茂幹, 彦惣俊吾, 大津欣也, 第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜, 2008年12月5-6日). Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes.
 - ・彦惣俊吾, 山口 修, 堀 正二, 大津欣也, 第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜, 2008年12月5-6日). The role of IKK β /NF- κ B pathway in the pathogenesis of heart failure.
 - ・大宮茂幹, 大津欣也, 山口 修, 彦惣俊吾, 武田理宏, 谷池正行, 中井敦子, 溝手 勇, 中野優子, 岡 崇史, 種池 学, 西田和彦, 松村泰志, 堀 正二. 第72回日本循環器学会学術集会(福岡, 2008年3月28-30日). Downregulation of Ferritin Heavy Chain is an Important Trigger of Cardiac Cell Death and Progression of Heart Failure.
 - ・谷池正行, 大津欣也, 山口 修, 彦惣俊吾, 武田理宏, 大宮茂幹, 溝手 勇, 岡 崇史, 種池学, 中井敦子, 辻本育子, 中野優子, 松村泰志, 西田和彦, 堀 正二. 第72回日本循環器学会学術集会(福岡, 2008年3月28-30日). Cross-talk between p38 Dependent Pathological Remodeling Cascade and Cardiac Adaptive Responses.
 - ・彦惣俊吾, 大津欣也, 山口 修, 武田理宏, 中井敦子, 谷池正行, 大宮茂幹, 溝手 勇, 種池学, 岡 崇史, 松村泰志, 西田和彦, 堀 正二. 第72回日本循環器学会学術集会(福岡, 2008年3月28-30日). I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B) signaling pathway protects hearts from hemodynamic stress mediated through regulating MnSOD expression.
 - ・大谷朋仁, 真野敏昭, 彦惣俊吾, 坂田泰史, 西尾まゆ, 竹田泰治, 大津欣也, 山本一博, 堀正二. 第72回日本循環器学会学術集会(福岡, 2008年3月28-30日). Increased Cardiac Glucocorticoid Contribute to Promoting Cardiac Hypertrophy.
- 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

—実験的自己免疫性心筋炎に対するS100A8/A9の投与効果—
研究協力者： 北浦 泰(大阪医科大学内科学Ⅲ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

S100A8/A9は、S100A8(10.6 kDa)およびS100A9(13.5 kDa)の2つのサブユニットからなるS100ファミリー蛋白である。これまでS100A8/A9は、ヒトにおいて活性化したマクロファージや好中球に発現し炎症を促進するとされているが、その機能は十分には明らかにされていない。最近、Ikemotoらはラットのlipopolysaccharideを用いた肝炎により肝障害を来すモデルにおいて、本蛋白が炎症に抑制的に作用していることを発見した。また、この研究において本蛋白が炎症促進性サイトカインと複合体を形成することが*in vitro*で証明され、これが炎症を抑制する機序である可能性が推測された。そこで、急性期の炎症においてマクロファージが重要な役割を担うとされているラットの実験的自己免疫性心筋炎モデル(EAM)を用いて、リコンビナント(R-)S100A8/A9の投与効果を検討した。

B. 研究方法

8週齢の雄Lewisラットにブタ心筋ミオシンを1週間間隔で2回皮下注射(第0日、第7日)しEAMを作成、投与群(S群、n=20)にR-S100A8/A9(1mg/日)を第8日より第13日まで連日腹腔内に大量投与した。対照(非投与)群(C群、n=20)には生理的食塩水を同様に投与した。第14日(S₁₄群、C₁₄群ともにn=10)および第21日(S₂₁群、C₂₁群ともにn=10)にペントバルビタールによる浅麻酔下で、1)心エコー検査により左室駆出率および心膜液貯留の有無を評価後、2)体重を計測、心臓を摘出して心重量を計測し心体重比を求めた。3)心臓を10%ホルマリンにて固定、両心室横断面標本(HE染色)において心筋炎病巣の占める割合を求めた。4)内因性S100A8/A9蛋白の存在と局在を確認するため抗S100A8/A9

抗体と抗CD68抗体を用いて心筋組織の二重蛍光免疫染色を行なった。また、リアルタイムRT-PCRにより心筋における炎症促進性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)のmRNA発現を検索し、ELISA法により血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定した。5)抗nuclear factor kappa-B(NF- κ B)p65抗体を用いて免疫組織学検索を行った。また、6)心筋ホモジネートの遠心分離上清について、1次抗体に抗S100A8/A9抗体、2次抗体に抗炎症性サイトカイン抗体を使用した。さらに、ELISA法によりR-S100A8/A9と炎症性サイトカイン結合複合体の濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪医科大学動物実験規則に基づき、動物実験委員会の承認のもと行われた。

C. 研究結果

1)心エコー検査による左室駆出率はS₁₄群81 \pm 2%に対しC₁₄群70 \pm 3%($p=0.017$)、S₂₁群78 \pm 2%に対しC₂₁群67 \pm 4%($p=0.049$)といずれも投与群で高かった。また、心膜液貯留は両群ともに認めなかった。2)心重量/体重比はS₁₄群0.41 \pm 0.02%、C₁₄群0.55 \pm 0.03%($p=0.002$)、S₂₁群0.39 \pm 0.02%、C₁₄群0.48 \pm 0.02%($p=0.009$)と投与群で小さかった。3)心筋組織標本で心筋炎病巣が占める割合は、S₁₄群で15.4 \pm 4.2%であるのに対しC₁₄群は37.2 \pm 7.3%($p=0.036$)、またS₂₁群16.0 \pm 3.8%、C₂₁群44.3 \pm 4.4%($p<0.001$)と第14、21日ともに投与群で病巣の占める割合が小さかった。4)EAM心筋において抗CD68抗体陽性のマクロファージの高度浸潤を認め、S100A8/A9を発現している単核球はすべてマクロファージであった。また、心筋における炎症促進性サイトカインmRNA発現はS₁₄群でIL-1 β

($p < 0.05$)、IL-6 ($p < 0.01$) および TNF- α ($p < 0.01$) がいずれも C_{14} 群に比較して抑制されていた。炎症性サイトカインの血清濃度も S_{14} 群において IL-1 β ($p < 0.01$)、IL-6 ($p < 0.05$) が C_{14} 群に比べ低値であり、 S_{21} 群においても IL-1 β ($p < 0.01$) が C_{21} 群に比べ低値であった。5) 心筋組織における NF- κ B の発現は S_{14} 群で C_{14} 群に比較して抑制がみられた。6) 心筋ホモジネート上清に R-S100A8/A9 と IL-1 β 、IL-6、TNF- α の各サイトカインとの結合複合体を認めた。

D. 考察

R-S100A8/A9 投与により EAM ラット心筋炎の急性期に病巣の縮小が認められ、心筋炎発病早期における R-S100A8/A9 大量投与が急性心筋炎を抑制することが明らかになった。投与群においては、炎症促進性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、TNF- α の mRNA の発現が非投与群に比較して心筋で抑制され、また、血清 IL-1 β 、IL-6 濃度も低値であった。さらに、心筋における NF- κ B の発現も抑制されていた。In vivo において心筋で S100A8/A9 と炎症促進性サイトカインとの結合複合体が認められた。従って、EAM ラット心筋炎に対する R-S100A8/A9 投与は、炎症促進性サイトカイン mRNA 発現抑制および血清濃度低下、また、本蛋白が炎症促進性サイトカインと結合し、トラップすることにより炎症促進性サイトカインネットワークを修飾することにより炎症を抑制した可能性が示唆される。今後、さらに本蛋白投与の炎症抑制機序についての詳細な検討が必要と考えている。

E. 結論

S100A8/A9 投与により ラット EAM が抑制された。その一機序として、本蛋白が炎症促進性サイトカインと結合し複合体を形成することにより炎症促進性サイトカインネットワークを修飾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

- ・大塚 薫, 他. Anti-inflammatory effects of S100A8/A9 (MRP8/14) on experimental autoimmune myocarditis by modulating autoimmune myocarditis by modulating proinflammatory cytokine network, European Society of Cardiology Congress 2008, 2008年8月30日～9月3日, Munich, Germany.
- ・大塚 薫, 他. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network. 第12回日本心不全学会学術集会, 2008年10月16日～18日, 東京.

2) 学会発表

- ・Otsuka K, et al. Suppression of inflammation in rat autoimmune myocarditis by S100A8/A9 through modulation of the proinflammatory cytokine network. Eur J Heart Fail 2009; 11: 229-237.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1) 書籍

班員	著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
筒井裕之	絹川真太郎, 筒井裕之	心不全	磯部光章, 佐々木成	心腎相関の病態理解と診療	羊土社	東京	2008	50-56
	筒井裕之, 絹川真太郎	急性心不全	刈尾七臣, 筒井裕之	心血管病薬物治療マニュアル	中山書店	東京	2008	36-44
	筒井裕之	慢性心不全	刈尾七臣, 筒井裕之	心血管病薬物治療マニュアル	中山書店	東京	2008	45-52
	筒井裕之, 岩野弘幸, 山田 聡	病態生理	松崎益徳	新しい診断と治療のABC 58 / 循環器9 心筋症	最新医学社	大阪	2008	100-106
久保田 功	久保田 功	6. 循環器疾患 急性心膜炎, 収縮性心膜炎.	山口徹, 北原光夫編, 福井次矢総編集.	TODAY'S THERAPY 2008 今日の治療指針.	医学書院	東京	2008	308-309
	渡邊哲, 久保田 功	4. 甲状腺疾患と心臓.	堀正二, 永井良三編.	循環器疾患最新の治療 2008-2009.	南江堂	東京	2008	471-474
	渡邊哲, 久保田 功	IV. 高血圧治療の最前線をいく 4. 薬物療法 心拍数を抑制するカルシウム拮抗薬の特徴とエビデンス.	菊尾七臣, 島田和幸, 吉川純一, 笠貫宏, 土師一夫, 別府慎太郎, 松崎益徳編.	新・心臓病診療プラクティス 11. 高血圧を識る・個別診療に活かす	文光堂	東京	2008	231-233
小川 毛	吉川勉	心筋障害の進行とカテコロールアミン	伊藤浩, 吉川純一	新・心臓病診療プラクティス	文光堂	東京	2008	272-8
松森 昭	松森昭	心筋炎	山口徹	今日の治療指針2008	医学書院	東京	2008	306-307
	松森昭	慢性心不全治療ガイドライン (2005年改訂版)	山口徹	今日の治療指針2008年	医学書院	東京	2008	1558-1562
	西尾亮介, 松森昭	III章心不全 D. 心筋炎	小室一成, 北風政史	循環器-専門医のための薬物療法Q&A	中外医学社	東京	2008	285-289
	松森昭	Biomarkers and Left Ventricular Function	篠山重威	AHA Highlights 2007	協和企画	東京	2008	196-201
	西尾亮介, 松森昭	3. 心筋症 2) 拡張型心筋症	北風政史	心不全診療マニュアルSkill Up	羊土社	東京	2008	143-156
松崎益徳	中村浩士	拡張型心筋症	北畠顕, 友池仁暢	厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症調査研究班心筋症: 診断の手引きと解説	かりん舎	札幌	2005	
	中村浩士	拘束型心筋症	松崎益徳, 吉川純一	臨床心臓病学	文光堂	東京	2006	
	中村浩士	非定型的疣贅性心内膜炎 (Libman-Sacks)	矢崎義雄	循環器症候群II (第2版)	日本臨床社	大阪	2007	
	中村浩士	ウイルス性心筋炎	矢崎義雄	循環器症候群III (第2版)	日本臨床社	大阪	2008	
	中村浩士	リウマチ性大動脈炎	矢崎義雄	循環器症候群III (第2版)	日本臨床社	大阪	2008	