

200936030A

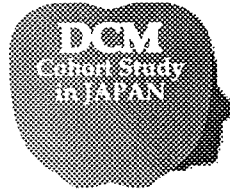
訂正版



厚生労働省難治性疾患克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

総括・分担研究
2009年度報告書

2010年4月



厚生労働省難治性疾患克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

2009 年度報告書

■CONTENTS

I. 総括研究報告

[北風 政史] 特発性心筋症に関する調査研究……………1

II. 分担研究報告

[筒井 裕之] ナチュラルキラーT細胞の活性化は心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全を改善する…3

[久保田 功] MIBG 心筋シンチによる収縮機能保持心不全患者の予後予測……………5

[永井 良三] 圧負荷心筋リモデリングにおける線維芽細胞の役割……………7

[吉川 勉] 糖尿病性心筋症における RAS 系の役割……………9

[和泉 徹] GFP トランスジェニックラットを用いた実験的自己免疫性心筋炎モデルの病態解析……………11

[磯部 光章] 重症心不全患者に対する Carvedilol および Bisoprolol 導入後の心不全改善効果についての比較……………13

[後藤 雄一] ミトコンドリア病の認定基準案の作成……………15

[小室 一成] 拡張型心筋症発症における CaMKII δ と p53 の役割……………17

[山岸 正和] 肥大型心筋症の臨床的予後と QT 指標との関連に関する研究……………19

[松森 昭] C型肝炎ウイルスによる心筋症発症機序……………21

[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……………23

[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……………25

[松崎 益徳] マウスウイルス性心筋炎に対するグルココルチコイドの心保護作用……………27

[砂川 賢二] 迷走神経刺激による心筋リモデリングの改善と心筋梗塞サイズの減少効果の検討……………29

[今泉 勉] 心筋梗塞後心筋リモデリングの分子機構—サイトカインシグナル制御の役割……………31

[鄭 忠和] 和温療法による慢性心不全患者の自律神経改善効果……………33

[豊岡 照彦] 心不全の増悪機構に関する研究— δ サルコグリカン(δ -SG)の選択的な *in vitro* ノックダウンは機械的拍動によらず *in vivo* の心筋症動物と同様に、 Ca^{2+} イン-2 の移動を促進してジストロフィン関連タンパクを翻訳後に消失させる……………35

[下川 宏明] うっ血性心不全発症予防を目的とした慢性心不全前向きコホート研究—CHART-2 研究……………37

[竹石 恭知] 急性期炎症反応性蛋白 pentraxin 3 の心不全発症と進展における役割の検討……………39

[川名 正敏] カルベジロールによる心室リモデリング改善作用と副交感神経機能……………41

[廣江 道昭] 糖尿病性心筋症の病態解明-糖尿病性心筋症は存在するのか?……………43

[木村 彰方] 肥大型心筋症の新規原因遺伝子としての CARP 変異の同定と機能解析……………45

[福田 恵一] 心臓転写因子 Zacl の同定と機能解析……………47

[武田 信彬] トロポニン T 遺伝子変異による拡張型心筋症マウスに対するカンデサルタンの効果……………49

[河合 祥雄] たこつぼ心筋症に関する研究—逆タコツボ心筋症モデルにおける病変とその局在……………51

[室原 豊明] 拡張型心筋症における心機能と腎機能との関連……………53

[今中 恭子] 心筋組織リモデリングにおけるテネイシン C の役割……………55

[大津 欣也] 心不全発症・進展における分子機構の解明……………57

[北浦 泰] 心疾患における S100A8/A9 複合体の発現に関する研究……………59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………61

IV. [資料]研究成果の刊行物・別冊	99
Increased myocardial NAD (P) H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of post-infarct heart failure in type 2 diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 297:409-416 2009.....	113
Iodine-123-Metaiodobenzylguanidine Imaging Can Predict Future Cardiac Event in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Patients.....	121
Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. J Clin Invest 120:254-265 2010.....	152
Persistent Cardiac Aldosterone Synthesis Angiotensin Type 1A Receptor-Knockout Mice After Myocardial Infarction Circulation:2157-2164.....	164
Clinical course of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in the era of implantable cardioverter-defibrillators and radiofrequency catheter ablation. Int Heart J 51:34-40 2010.....	172
Granular swollen epithelial cells: a histological and diagnostic marker for mitochondrial nephropathy. Am J Surg Pathol 34:262-270 2010.....	179
PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart. Proc Natl Acad Sci USA 106: 8689-8694 2009.....	188
Impact of QT variables on clinical outcome of genotyped hypertrophic cardiomyopathy Circulation Journal 73: 145-151 200.....	194
Nifedipine inhibits the activation of inflammatory and immune reactions in viral myocarditis. Life Sciences 85: 235-240 2009.....	201
Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. Circulation 15;120(24): 2470-7 2009.....	207
Incremental Effects of Eicosapentaenoic Acid on Cardiovascular Events in Statin-Treated Patients With Coronary Artery DiseaseSecondary Prevention Analysis From JELIS Circ J 73(7): 1283-1290 2009.....	229
Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. Int J Cardiol in press 2010.....	237
Waon therapy improves the prognosis of patients with chronic heart failure J Cardiol 53: 214-218 2009.....	244
Specific knockdown of d-sarcoglycan gene in C2C12 in vitro causes post-translational loss of other sarcoglycans without mechanical stress. Mol Cell Biochem 323: 149-59 2009.....	249
Chronic heart failure in Japan:Implications of the CHART studies Vascular Health and Risk Management 4(1):103-113 2008.....	260
Incremental value of combining 64-slice computed tomography angiography with stress nuclear myocardial perfusion imaging to improve noninvasive detection of coronary artery disease. J Nucl Cardiol. 17:19-26 2010.....	271
Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 54(4): 334-342 2009.....	279
Za1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. Circ Res. in press 2010.....	288
たこつぼ心筋症の診断と治療 Medical Prctice 26(11): 1859-1862 2009.....	304
Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298:H1072-8 2010.....	308
The Ikb kinase α /NF- κ B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated through the regulation of MnSOD expression, Circ Res 105: ,70-79 2009.....	315
Enhanced expression of the ubiquitin-proteasome system in the myocardium from patients with dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: An immunohistochemical study with special reference to oxidative stress. Heart and Vessels in press 2010.....	325

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

総括研究者：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＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

特発性心筋症に対する知見は、分子生物学的解析の進歩、疫学的研究によるエビデンスの増加により着実に蓄積されている。特発性心筋症におけるガイドラインも 1995 年に WHO/ISFC が提案したものが普及しているが、近年 AHA や ESC が新たなガイドラインを提唱している。分子生物学的研究の成果であるチャネル心筋症などの新たな病型分類が提唱されている。わが国でも、本特発性心筋症研究班により、平成 17 年に「特発性心筋症診断の手引き」が作成され、診療において活用されている。その後も、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されていく中で、エビデンスの整理、新たな手引きの作成が必要である。本研究班では、特発性心筋症における病因・病態・診断・治療の現状に関する情報収集を行う。これらの得られたデータをもとに、将来的に新たな病型分類やその分類に基づいた診断法の開発を目指す。得られた研究成果を社会へと広く普及し、還元することを目的とする。

B. 研究方法

新たな「特発性心筋症診断の手引き」を目指すべく、①特発性心筋症患者の診療実態の把握、②基礎的検討および臨床的検討の両側面からの特発性心筋症における新たな

エビデンスの構築を行う。かかる成果を創出するために、本研究班を 3 層（全体研究、サブグループ研究、個別研究）に分けて研究を進めることとした。

（I）全体研究

①新規に診断された特発性心筋症患者（拡張型心筋症、肥大型心筋症）を対象にした前向き登録研究（CCMM 研究）を継続して行う。また、拘束型心筋症・ミトコンドリア病（心筋症）・ファブリー病・家族性突然死症候群・サルコイドーシスの患者においては、既に診断されている患者においても登録を行う。調査項目としては、基礎データ、内服薬データ、心不全症状、血液検査値（血中 BNP 値など）、心臓超音波検査データ、心血管イベントなどを 1 年ごとに収集する。

②肥大型心筋症および拘束型心筋症が難治性疾患助成の対象となった。これら 2 つの認定基準および個人票作成を行った。

（II）サブグループ研究

新たなエビデンスを構築する上において、臨床研究ネットワークが必要であるが、我が国における特発性心筋症のエビデンス構築において本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして位置づけることにより、単施設では限界であった臨床研究の推進を目指すこととする。

①特発性心筋症における心臓移植患者における現状に関して、診断から心臓移植への適応に注目して、心臓移植関連施設の共同研究において検討する。

②特発性心筋症における診断において、心筋生検が使用されている。近年、画像診断の進歩も目覚ましく、画像診断と心筋生検による特発性心筋症の診断精度を検討する。

(Ⅲ) 個別研究

特発性心筋症における病因、病態、診断、治療に関する新たなエビデンスの開発を目指すために、各分担研究者により、臨床研究および基礎研究を用いた解析を進めることとした。

C. 研究結果

本研究班は、全体研究、サブグループ研究、個別研究の3層に分かれて行ってきた。

(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。今年度で約30症例の登録を行った。次年度に向けて、最終の登録を依頼する準備も行った。

難治性疾患助成の対象に、新たに肥大型心筋症および拘束型心筋症が追加された。行政と共同して、それぞれの認定基準および個人票の作成を行った。肥大型心筋症においては、心不全および突然死の既往もしくはハイリスク患者を対象にする基準を作成した。

(Ⅱ) サブグループ研究

特発性心筋症の診断法に関する検討を2つのサブグループ研究を企画し、進めてきた。

特発性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以前の研究会議よりなされ、その課題を解決すべく、研究計画書を心臓移植実施施設で共同して作成した。現在、倫理委員会にて審査中である。

また、心筋症の診断におけるパイオプシー、画像診断などの有用性の検討をすることも以前の研究会議より提案された。本研究計画を行う予備的検討として、心筋生検とMRIを用いた画像診断を比較する後ろ向き観察研究の試験計画書を作成し、倫理委員会の承認を得た。現在、40症例までの解析が終了しており、100症例を目標として進めている。この予備的解析をもとに、前向き観察研究を進

める予定である。

(Ⅲ) 個別研究

分担研究員により、特発性心筋症およびそれによる心不全に関する病態解明、診断法の開発、治療法の開発を目指した研究がすすめられた。基礎的解析から臨床的解析までの様々なレベルで進められてきた。詳細は各班員の項に譲るが、ウイルスや免疫の関与、代謝障害の関与、テネイシンCなどの新たな分子マーカーの臨床応用、遺伝子診断などが検討された。研究成果に関して、年2会の研究班発表会で、情報交換、意見交換が行われた。

D. 考察

特発性心筋症の病態解明、診断法・治療法の構築を目指した研究を進めてきた。「特発性心筋症の前向き登録研究」を継続して進行してきた。また今年度より、サブグループ研究を具体的に2課題進めることをスタートした。心筋生検による診断とMRIによる診断の精度に関しては、次年度に予備的調査が明らかにできる予定である。個別研究においても興味深い研究が多く、iPS細胞の普及とともに、次年度は遺伝子診断および再生医療などに注目して進められるように検討する。

E. 結論

心筋症の病態解明および新たな診断法・治療法の開発に向けて、3つのレベルにおける研究から検討を進めた。

F. 健康危険情報

班全体としては特になし。

G. 研究発表

肥大型心筋症 / 拘束型心筋症の認定基準

肥大型心筋症 / 拘束型心筋症の個人票

日本循環器学会 プレナリーセッション

Hitonobu Tomoike, Current Status of Pathophysiology of Dilated Cardiomyopathy in Japan - Reports from the Research Committee of the investigation of Idiopathic Cardiomyopathy -

H. 知的財産権の出願・登録状況

班全体としては特になし

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—ナチュラルキラーT細胞の活性化は心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全を改善する—

分担研究者：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＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

心筋梗塞（MI）後の心筋リモデリングおよび心不全の進展に関わる因子として慢性炎症が注目されている。ユニークなTリンパ球のサブセットであるナチュラルキラーT（Natural Killer T; NKT）細胞は種々の炎症性サイトカインを産生し、組織炎症を制御する能力を有している。これまでに、自己免疫疾患や炎症性疾患においてNKT細胞は防御的な役割を果たしていることが示されている¹。一方、動脈硬化進展やインスリン抵抗性において血管壁や脂肪組織の炎症惹起にNKT細胞が関わっていることが示されている^{2,3}。このように、NKT細胞は組織炎症において二面性を有すると考えられるが、心不全・心筋リモデリングにおける役割については全く知られていない。我々はMI後心不全モデルマウスを用いて、心筋リモデリングおよび心不全の進展におけるNKT細胞の役割について検討した。

B. 研究方法

C57BL/J マウスにMIを作製し、無作為に2群に分けた。NKT細胞を特異的に活性化する α -galactosylceramide (MI+ α -GalCer 群)あるいは生理食塩水 (MI 群)をMI手術後1日目および4日目の2回投与し、4週間飼育した。

心エコーおよびカテーテルによる心内圧測定を行い、組織学的評価を行った。また、非梗塞部心筋を取り出し、定量的RT-PCR法によって各種遺伝子発現を調べた。一部のマウスでは7日目に屠殺し、実験を行った。

C. 研究結果

MI+ α -GalCer 群はMI群と比較して、4週までの生存率が有意に改善した。MI群において左室径の拡大、左室短縮率の低下、左室拡張末期圧の上昇、肺重量の増加があり左室リモデリングおよび心不全を呈した。MI+ α -GalCer 群ではこれらが有意に改善した。両群間で心筋梗塞サイズや血圧・心拍数に違いはなかった。

組織学的解析では、MI群の非梗塞部心筋において心筋細胞が肥大し、間質線維化、アポトーシスおよびMMP2活性が増加した。MI+ α -GalCer 群ではこれらが抑制された。

NKT細胞受容体 (Va14Ja18) 遺伝子発現はMIマウスの非梗塞部心筋で梗塞後7日目に一過性に増加した。 α -GalCerの投与によって、梗塞後7日目のNKT細胞受容体発現をさらに高め、この増加は28日後まで持続した。NKT細胞の活性化と並行して、monocyte chemoattractant protein-1, tumor necrosis factor- α お

よび interleukin-10 遺伝子発現が梗塞後 7 日目に増加し、interleukin-10 遺伝子発現増加だけが 2 8 日目まで持続した。

D. 考察

今回の研究において、MI 後の非梗塞部心筋において NKT 細胞が増加していることおよび α -GalCer 投与による NKT 細胞の活性化は MI 後の心筋リモデリングおよび心不全を抑制することが示された。この NKT 細胞活性化の効果には interleukin-10 が関係していた。最近の報告⁴では、interleukin-10 が炎症反応を抑制し、間質線維化の抑制や血管新生により MI 後の左室リモデリングおよび心不全を改善することが示されており、我々の結果を支持するものである。今後、NKT 細胞を欠損させたマウス (Ja ノックアウトマウス) を用いて、左室リモデリングや心不全における NKT 細胞の役割を解明していく予定である。

E. 結論

NKT 細胞は心筋梗塞後左室リモデリングや心不全に対して保護的な役割りを果たしていると考えられた。この効果には心保護的に働くサイトカインである interleukin-10 の発現が関わっていると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1.Naya M, et al: Myocardial beta-adrenergic receptor density assessed by ¹¹C-CGP12177 PET predicts improvement of cardiac function after carvedilol treatment in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Nucl Med* 50(2):220-225, 2009
- 2.Suga T, et al: Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* 106:1119-1124, 2009
- 3.Matsushima S, et al: Increased myocardial NAD (P) H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of post-infarct heart failure in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:409-416, 2009
- 4.Yokota T, et al: Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise

capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:1069-1077, 2009

- 5.Tsuchihashi-Makaya M, et al: Characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. Report From the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ J* 73(10):1893-1900, 2009
- 6.Satoh H, et al: Metabolic syndrome is a significant and independent risk for increased arterial stiffness in Japanese subjects. *Hypertens Res* 32:1067-1071, 2009
- 7.Ohmura K, et al: Natural killer T Cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:193-199, 2009
- 8.Tsutsui H, et al: Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 81(3):449-456, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—MIBG 心筋シンチによる収縮機能保持心不全患者の予後予測—

分担研究者：久保田 功（山形大学医学部内科学第一講座）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

心不全患者の予後不良因子として、左室駆出分画 (LVEF) の低下が知られているが、心不全の約半数は、収縮機能保持心不全とされている (Yusuf S, et al. Lancet 2003)。人口の高齢化とともに収縮機能保持心不全が増加し、その予後は収縮機能低下心不全と同等であることが報告された (Vasan RS, et al. J Am Coll Cardiol 1999)。収縮機能低下心不全では交感神経活動の亢進と心不全の重症度が相関し、予後と密接に関係する。¹²³I-MIBG はノルエピネフリンのアナログで、交感神経終末に取り込まれ、心筋の交感神経活動をイメージできる。MIBG 心筋シンチにおける washout rate の亢進は、LVEF 低下や血漿 BNP、ノルエピネリンの上昇と強い相関があり、予後予測に有用である。また MIBG 心筋シンチはβ遮断薬反応性の予測にも有用であり、幅広く用いられている。しかし収縮機能保持心不全では、β遮断薬の有効性は未だ確立しておらず、MIBG 心筋シンチが収縮機能低下心不全と同様に予後予測に有用であるかは不明である。そこで我々は MIBG 心筋シンチによる心臓交感神経活動の評価が収縮機能保持心不全の予後予測に有用であるかを検討した。

B. 研究方法

対象は2002年から2009年まで心不全の治療や診断のために当院に入院した連続368名の中で、左室収縮機能が保たれた (LVEF ≥ 50%) 心不全患者で MIBG 心筋シンチの検査を施行された128名 (男性71名、平均年齢66 ± 14歳) である。心不全のない25名を対照とした。入院3ヶ月前までに心筋炎や急性冠症候群を発症した症例と三還系抗うつ薬等の服用者や腎機能低下例 (Cr > 2.0 mg/dL) を除外した。MIBG 心筋シンチは退院前に施行した。¹²³I-MIBG 111 Mbq を静注し30分後 (初期像) と240分後 (後期像) に胸部前面プラナー像を撮像した。MIBG の心筋/縦隔集積比 (H/M 比) と washout rate を算出した。平均フォローアップ期間は1026日で、エンドポイントは心臓死と心不全増悪による入院とした。2群の比較はt検定とMann-Whitney U検定を行い、心イベントに関わる危険因子の解析はCox比例解析を行った。ROCカーブより washout rate のカットオフ値を決定し、Kaplan-Meier 解析により washout rate と心イベントの関係性を明らかにした。

C. 研究結果

心不全患者の原因疾患は、拡張型心筋症11名 (9%)、虚血性心筋症11名 (9%)、高血圧性心疾患44名 (34%)、肥

大型心筋症 15 名(12%)、頻脈誘発性心不全 21 名(16%)、その他 26 名(20%)。退院前の NYHA 心機能分類 I は 29 名、II は 78 名、III は 21 名であった。収縮機能保持心不全患者の退院前代償期における BNP の中央値は 163 pg/ml (61.8-341 pg/ml)であった。

収縮機能保持心不全患者では、対照群に比べて、初期および後期 H/M 比の低下と washout rate の亢進を認めた。また NYHA 心機能分類 I および II の中等度群に比べ、NYHA III の重症群では有意に washout rate が亢進していた (25.3±12.2 vs. 48.0±18.5, $p<0.0001$)。しかし washout rate は、LVEF や血漿 BNP レベルとは有意な相関を認めなかった。Washout rate を中央値で 2 群に分類し、Kaplan-Meier 解析を行ったところ washout rate 亢進群において再入院を要する心イベント発症を有意に多く認めた ($p=0.0095$)。

D. 考察

収縮機能保持心不全において MIBG 心筋シンチは心不全の状態評価や予後予測に有用な検査であることが示唆された。Kasama らは収縮機能保持心不全 (LVEF \geq 40%) において、カンデサルタンによる左室収縮能が改善する群では MIBG 心筋シンチによる交感神経の活性化指標が改善することを報告している (J Am Coll Cardiol 2005)。本研究では、ACE 阻害剤/ARB は 56%の症例で用いられていたが、心イベントの発症には有意差がなく、washout rate にも差を認めなかった。また 39%の症例に β 遮断薬の投与が行われていたが、非投与群との間に心イベントと MIBG washout rate に有意差を認めなかった。本研究では washout rate と LVEF の相関が乏しかった。BNP 値は、収縮機能保持心不全患者においても独立した予後予測因子であるが (Am J Cardiol 2008)、今回の研究では BNP の採血は退院前の代償期に行われ、多変量 Cox 比例ハザード分析において有意な予後予測因子ならなかった。今後、 β 遮断薬の有用性の検討に MIBG 心筋シンチが有用であるか、更なる検討が必要である。

E. 結論

MIBG 心筋シンチ washout rate は収縮機能保持心不全において、心不全の重症度と相関し、予後予測に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: Sasaki T, Takeishi Y, Suzuki S, Niizeki T, Kitahara T, Katoh S, Ishino M, Shishido T, Watanabe T, Kubota I. High serum level of neopterin is a risk factor of patients with heart failure. Int J Cardiol 2010.

2: Yamauchi K, Shibata Y, Kimura T, Abe S, Inoue S, Osaka D, Sato M, Igarashi A, Kubota I. Azithromycin suppresses interleukin-12p40 expression in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated macrophages. Int J Biol Sci 2009; 5(7): 667-78.

3: Suzuki K, Konta T, Takasaki S, Ikeda A, Ichikawa K, Sato H, Shibata Y, Watanabe T, Kato T, Kawata S, Kubota I. High variability of albuminuria in nondiabetic population: the Takahata Study. Clin Exp Nephrol 2009; 13(5): 452-9.

5: Ichikawa K, Konta T, Emi M, Toriyama S, Takasaki S, Ikeda A, Shibata Y, Takabatake N, Takeishi Y, Kato T, Kawata S, Kubota I. Genetic polymorphisms of paraoxonase-1 are associated with chronic kidney disease in Japanese women. Kidney Int 2009; 76(2): 183-9.

7: Niizeki T, Takeishi Y, Kitahara T, Suzuki S, Sasaki T, Ishino M, Kubota I. Combination of conventional biomarkers for risk stratification in chronic heart failure. J Cardiol 2009; 53(2): 179-87.

8: Takeishi Y, Kubota I. Role of Toll-like receptor mediated signaling pathway in ischemic heart. Front Biosci 2009; 14: 2553-8.

9: Takabatake N, Toriyama S, Igarashi A, Tokairin Y, Takeishi Y, Konta T, Inoue S, Abe S, Shibata Y, Kubota I. A novel polymorphism in CDC6 is associated with the decline in lung function of ex-smokers in COPD. Biochem Biophys Res Commun 2009; 381(4): 554-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—圧負荷心筋リモデリングにおける線維芽細胞の役割—

分担研究者：永井良三（東京大学大学院医学系研究科循環器内科）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

病態形成における非実質細胞の役割が注目されている。心線維芽細胞の培養上清には、心筋肥大反応を促進する多くの分泌蛋白が含まれるが、心筋リモデリングにおける心線維芽細胞の *in vivo* 機能解析は従来困難であった。

転写因子 KLF5 は心筋リモデリングに関与するが、肥大型の線維芽細胞で特に強く活性化されている。線維芽細胞 KLF5 への *in vivo* 機能修飾を試みることによって、圧負荷心筋リモデリングにおける線維芽細胞の役割を検討した。

B. 研究方法

心線維芽細胞で活性化される Periostin プロモーターを用いた新規 Cre マウスと、*Klf5* floxed マウス (*Klf5^{fl/fl}*) を新規作成・交配し、心線維芽細胞特異的 *Klf5* 欠損マウス (*Klf5^{fl/fl};Postn-Cre*) を樹立した。圧負荷には弓部大動脈縮窄 (TAC) による心圧負荷モデルを用い、心機能および病理・遺伝子発現などを比較することにより、KLF5 が発現・活性化した線維芽細胞の役割を検討した。

C. 研究結果

心線維芽細胞特異的 *Klf5* 欠損マウス (*Klf5^{fl/fl};Postn-Cre*) では、線維芽細胞の増殖抑制・線維化の軽減と共に、心筋細胞肥大も抑制された。一方で心筋細胞特異的 *Klf5* 欠損マウスでは、心筋リモデリングへの影響がなかったことから、KLF5 が発現・活性化した線維芽細胞は、線維化のみならず *in vivo* 心筋細胞肥大にも関与することが示唆された。線維芽細胞からの分泌蛋白をスクリーニングした結果、KLF5 はインスリン様成長因子-1 (IGF-1) の転写制御を担い、IGF-1 は (パラクライン因子として) 心筋細胞の肥大反応を促進した。

更に重度の圧負荷を用いた心不全モデルでは、*Klf5^{fl/fl};Postn-Cre* の心線維化・心肥大は同様に抑制されたが、著明な左室拡大及び左室収縮機能低下を来し易く、早期に心不全死に陥った。IGF-1 受容体抑制薬 (JB1) を投与した重度圧負荷マウスでも、同様の早期心不全死に至ったことから、線維芽細胞およびその分泌蛋白 IGF-1 は、重度の圧負荷に対する心保護的作用も担うことが明らかとなった。

D. 考察

心線維芽細胞の活性化を担う転写因子 KLF5 に着目し、

心線維芽細胞特異的な遺伝子改変動物を新規に作成することによって、心線維芽細胞の *in vivo* 機能を初めて明らかにすることができた。KLF5 を介して活性化された線維芽細胞は、心線維化反応を担うと共に、IGF-1 を分泌し心筋肥大作用や心保護作用を担っていることが明らかとなった。

E. 結論

心線維芽細胞は、圧負荷後の適正な心筋リモデリングを司る重要な細胞種であり、重症心不全の治療標的として考慮すべき対象である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【論文発表】

1. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* 120:254-265, 2010

【学会発表】

1. 武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the heart to pressure overload. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症に関する調査研究(2009年度第2回北風班). 2010/2/4 (大阪)
2. Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Ryozo Nagai. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the heart to pressure overload. 第26回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会. 2009/12/4-5 (札幌)
3. Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Ryozo Nagai. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the heart to pressure overload. 第26回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会 (Symposium 1:

Molecular Pathophysiology and New Strategy in Heart Failure). 2009/12/4-5 (札幌)

4. Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Yuichi Uchino, Takayuki Shindo, Motoaki Sano, Kinya Otsu, Paige Snider, Simon J Conway, Ryozo Nagai. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the heart to pressure overload. *AHA Scientific Sessions 2009*. 2009/11/14-18 (米国オーランド)
5. 武田憲文, 真鍋一郎, 内野悠一, 新藤隆行, 佐野元昭, 大津欣也, Paige Snider, Simon J. Conway, 永井良三. 圧負荷心筋リモデリングにおける線維芽細胞の役割. 第13回日本心血管内分泌代謝学会学術集会. 2009/10/23-4 (大宮)
6. 武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. 心筋リモデリングにおける転写因子 KLF5 の役割. 第2回臨床研究フォーラム. 2009/8/7-8 (御殿場)
7. 武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. 心筋リモデリングにおける転写因子 KLF5 の役割. 第15回成人病の病因・病態の解明に関する研究会(TMFC). 2009/7/4-5 (軽井沢)
8. 武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. Significance of the transcription factor KLF5 in myocardial hypertrophy in response to pressure overload. 第73回日本循環器学会学術集会. 2009/3/20-22 (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在、本研究に関する知的財産権願い・登録はなし。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—糖尿病性心筋症における RAS 系の役割—

分担研究者：吉川 勉（慶應義塾大学医学部循環器内科准教授）

＜研究要旨＞ 糖尿病の存在は収縮障害と拡張障害を惹起することが知られているが、その分子メカニズムについては明らかではない。本研究は、アンジオテンシン受容体ノックアウト(KO)・マウスを用いて、糖尿病性心筋症における RAS 系の役割を明らかにすることを目的とする。9 週令の KO マウスおよび野生型(WT)マウスにストレプトゾトシン 200mg/kg (KO-DM, WT-DM)あるいは生理食塩水(KO-C, WT-C)の腹腔内注射を行い、糖尿病を惹起した。さらに 6 週間後に心エコー検査、血行動態測定後に心筋を採取し、分子生物学的解析を行った。左室内圧+dp/dt、内径短縮率や拡張末期圧には WT-DM と WT-C の間で差はなかった。WT-DM は WT-C に比べて、E/A 比および dp/dt は低値であり、時定数は延長していた。左室内径短縮速度も WT-DM において低値であった。KO-DM と KO-C の間ではこれらの指標に差はなかった。WT-C に比べて WT-DM では、アンジオテンシノーゲン mRNA は 2.3 倍に、アンジオテンシン・タイプ 1a 受容体 mRNA は 1.7 倍に増加していた。筋小胞体 SERCA2a の蛋白レベルと mRNA レベルは共に WT-DM で低値であった。全フォスホランパン(PL)mRNA レベルには両群間で差はなかったが、リン酸化 PL は WT-C よりも WT-DM で低値であった。KO-DM と KO-C の間では SERCA2a や PL に差はなかった。ストレプトゾトシン誘発 I 型糖尿病では拡張障害を主徴とする心筋障害を呈した。RAS 系を介するカルシウム・ハンドリング異常がその背景にあるものと思われた。

A. 研究目的

糖尿病患者において冠動脈疾患をはじめとする心血管系合併症の頻度は多く、死因の主座を占めている。一方で、フラミンガム疫学調査などでは糖尿病患者において心不全発症のリスクが高いことが報じられている。糖尿病の存在は収縮障害と拡張障害を惹起することが知られているが、その分子メカニズムについては明らかではない。本研究は、アンジオテンシン受容体ノックアウト(KO)・マウスを用いて、糖尿病性心筋症における RAS 系の役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

9 週令の KO マウスおよび野生型(WT)マウスにストレプトゾトシン 200mg/kg (KO-DM, WT-DM)あるいは生理食塩水(KO-C, WT-C)の腹腔内注射を行い、糖尿病を惹起した。さらに 6 週間後に心エコー検査、血行動態測定後に心筋を採取し、分子生物学的解析を行った。

C. 研究結果

左室内圧+dp/dt、内径短縮率や拡張末期圧には WT-DM と WT-C の間で差はなかった。WT-DM は WT-C に比べて、E/A 比(1.30 ± 0.21 vs. 1.99 ± 0.17 , $p < 0.05$)および dp/dt (-3337 ± 351 mmHg/sec vs. -4915 ± 201 mmHg/sec, $p < 0.05$)は低値であり、時定数は延長していた(18.2 ± 1.6 msec vs. 12.9 ± 1.0 msec, $p < 0.05$)。左室内径短縮速度も WT-DM において低値であった(1.94 ± 0.09 sec^{1/2} vs. 2.45 ± 0.15 sec^{1/2}, $p < 0.05$)。KO-DM と KO-C の間ではこれらの指標に差はなかった。WT-C に比べて WT-DM では、アンジオテンシノーゲン mRNA は 2.3 倍に、アンジオテンシン・タイプ 1a 受容体 mRNA は 1.7 倍に増加していた。筋小胞体 SERCA2a の蛋白レベル($p < 0.05$)と mRNA レベル($p < 0.05$)は共に WT-DM で低値であった。全フォスホランパン(PL)mRNA レベルには両群間で差はなかったが、リン酸化 PL は WT-C よりも WT-DM で低値であった($p < 0.05$)。KO-DM と KO-C の間では SERCA2a や PL に差はなかった。

D. 考察

ストレプトゾトシンにより誘発された I 型糖尿病マウスでは、6 週間後に $-dp/dt$ と E/A 比が低値であり、拡張障害を主徴とする心機能障害を呈した。時定数の延長を認めることより、ATP 依存性の能動的弛緩の障害が関与すると思われる。筋小胞体 Ca-ATPase の発現は低下し、活性化フォスホランバンも低下したことから、筋小胞体のカルシウム・ハンドリングの障害が関与するものと思われる。WT-DM ではアンジオテンシノーゲンと AT1a 受容体の mRNA が増加したことから、RAS 系が活性化していることが示された。さらに本モデルで観察された拡張障害とカルシウム・ハンドリング異常は AT1 受容体ノックアウト・マウスで抑制されたことから、RAS 系を介する現象であると思われる。

E. 結論

ストレプトゾトシン誘発 I 型糖尿病では拡張障害を主徴とする心筋障害を呈した。RAS 系を介するカルシウム・ハンドリング異常がその背景にあるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

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* 2009;15:224-32

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

Koide K, Yoshikawa T, Nagatomo Y, Kohsaka S, Anzai T, Meguro T, Ogawa S: Elevated troponin T on discharge predicts poor outcome of decompensated heart failure. *Heart Vessels* (in press)

Kaneko H, Anzai T, Naito K, Kohno T, Maekawa Y, Takahashi T, Kawamura A, Yoshikawa T, Ogawa S: Role of ischemic

preconditioning and inflammatory response in the development of malignant ventricular arrhythmias after reperfused ST-elevation myocardial infarction. *J Card Fail* 2009;15:775-81

Anzai A, et al: Prognostic significance of acute kidney injury after reperfused ST-elevation myocardial infarction: synergistic acceleration of renal injury and left ventricular remodeling. *J Card Fail* (in press)

2) 学会発表

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. 73rd Japanese Circulation Society Meeting, Mar 20, 2009

Mano Y, Anzai T, Takahashi T, Maekawa Y, Nagatomo Y, Koide K, Jo Y, Kaneko H, Anzai T, Meguro T, Yoshikawa T, Ogawa S: Overexpression of human C-reactive protein deteriorates diabetic cardiomyopathy through the activation of renin-angiotensin system. 73rd Japanese Circulation Society Meeting, Mar 20, 2009

Jo Y, Anzai T, Ueno K, Kohno T, Naitoh K, Nagatomo Y, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S: Erythromycin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via inhibition of microcirculatory disturbance and inflammatory response. 73rd Japanese Circulation Society Meeting, Mar 22, 2009

Anzai T, Naito K, Anzai A, Kaneko H, Mano Y, Jo Y, Maekawa Y, Kawamura A, Yoshikawa T, Ogawa S: Impact of chronic kidney disease on left ventricular remodeling after myocardial infarction. 73rd Japanese Circulation Society Meeting, Mar 20, 2009

Nagatomo Y, Meguro T, Ito H, Koide K, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T: Persistent angiotensin II-independent activation of mineralocorticoid receptor signaling is associated with the cardiac dysfunction induced by long-term diabetes mellitus. 13th Japanese Heart Failure Society Meeting, Fukuoka, Oct 31, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<研究協力者>長友祐司、目黒知己

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—GFP トランスジェニックラットを用いた実験的自己免疫性心筋炎モデルの病態解析—

分担研究者：和泉 徹（北里大学医学部循環器内科学、教授）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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）はわが国での心移植レシピエントの大部分を占める致死性疾患である。心移植ドナーの絶対的不足という社会的背景とも絡め、病態解析およびこれに基づく特異的治療の開発が社会的な急務となっている。その主要な発症機序として、自己免疫性病態が論ぜられてきた。我々は心筋特異的蛋白である心筋ミオシンに着目し、同蛋白免疫によるラット自己免疫性心筋炎モデル（EAM）を開発した。本モデルはTリンパ球による細胞性免疫が病態の主体を形成し反復免疫によりDCMを惹起する。これまでの自己抗体を中心とした液性免疫が主病因論をなしてきた議論から本モデルの登場により細胞性免疫の関与にその検索の主体を移行させていく必要性が生じた。

我々は今までの研究成果として心筋ミオシン内のT細胞エピトープ同定に成功し、さらにはミオシン内ペプチドCM2（aa. 1539-1555）に対する特異的Tリンパ球株（MTL）を確立した。そしてMTLを健常ラットへの移注により重症心筋炎を惹起することが再現される（tEAM）ことを見出した。しかし、tEAMの病態解明は結果としての現象論は理解されるも、MTL細胞がどのような体内循環動態を示すのか、心筋組織内でどのような作用をしているのか、さらには病態の鍵を握る心筋炎症の慢性化機序の解明は極めて困難であり研究展開が進まなかった経緯がある。その理由として、病変惹起を担う免疫細胞の挙動を探索するためには標

的細胞のラベル化が必要不可欠であるにも関わらず、生体から取り出す浮遊性の非腫瘍細胞のためこれまで技術的に成功に導けなかったことが挙げられる。しかし、GFPトランスジェニックラット（LEW-Tg(CAG-EGFP)1Ys）の開発により、GFPのMTLへのラベル化が可能となり、MTL移注後の体内動態や心臓局所での病態形成が可能となった。

B. 研究方法

1. GFP 発現心筋炎惹起性 T リンパ球株の樹立と細胞移注による EAM の惹起

これまでに確立し報告をしてきた培養手法を応用し、LEW-Tg(CAG-EGFP)1YsにCM2を感作させた。その後、腋窩リンパ節および膝窩リンパ節から作成したリンパ節細胞浮遊液に、naïve ルイスラットの胸腺細胞を抗原提示細胞としてCM2により抗原刺激を繰り返しながら、インターロイキン2添加培養液下で継代培養した。³Hサイミジン取り込み能にて抗原特異性を確認した。また、樹立した細胞株（GFP発現心筋炎惹起性Tリンパ球株、GFP-Tg MTL）をnaïve ルイスラットの尾静脈より細胞移注し、tEAMの惹起能を確認した。

2. 移注した tEAM の体内動態観察および心臓局所での組織学的検討

naïve ルイスラットへのGFP-Tg MTL細胞移注後、経時的に心臓を含む各臓器を摘出した。励起灯によるマクロ観察

および共焦点レーザースキャン顕微鏡・画像解析ソフトを用いマイクロ観察を行った。その際、GFP 発光に加え蛍光免疫染色による各細胞表面抗原での細胞同定を行い、心筋組織内での心筋炎発症様式を追跡した。

C. 研究結果

1. GFP 発現心筋炎惹起性 T リンパ球株の樹立と細胞移注による EAM の惹起

我々が樹立した GFP-Tg MTL は 99% の GFP 発現および 99% の CD4 陽性を呈しており、CM2 に特異的な抗原特異性を有していた。また、この細胞株は GFP ラベル化されていない従来の心筋炎惹起性 T リンパ球株 (control MTL) と同等の CD4 陽性率を呈しており、³H サイミジン取り込み能も同等であった (40788 ± 4495 vs. 27992 ± 2488 cpm, NS)

同細胞株を naïve ラットの尾静脈から細胞移注した tEAM (GFP-Tg tEAM) において、control MTL を移注し惹起させた従来の tEAM (Control tEAM) と比して、臨床像の差異はなかった (心筋炎マクロスコア: 2.5 ± 0.6 vs. 2.4 ± 0.5, NS)。

2. 移注した tEAM の体内動態観察および心臓局所での組織学的検討

GFP-Tg MTL を細胞移注により心臓組織内に第 5 病日より GFP-Tg MTL の出現を認めた。すなわち、GFP-Tg MTL は細胞移注後一定のタイムラグをおいて心臓への浸潤をきたした。しかし、GFP-Tg MTL の心臓内への浸潤は第 7 病日をピークに減少に転ずるものの心筋組織そのものの炎症細胞浸潤は増悪を続け、その構成の主体は GFP 陰性の CD4 陽性 T リンパ球 (ホストの naïve ルイスラット由来細胞) に移行する。

D. 考察

生体内において、成熟したリンパ球は胸腺にて分化成熟し、リンパ管や血管を通して末梢リンパ組織がある全身各所に移動する。また、全身をめぐる末梢リンパ組織内で刺激に应答し、活性化し最終的なエフェクター細胞となることは既に広く知られている。今回、GFP-Tg MTL を尾静脈より移注することにより静脈系経路を介してリンパ管経路へ流入し、心臓局所へ浸潤をきたすと考えられる。心筋炎は当初は GFP-Tg MTL による液性免疫に伴う心筋傷害であるが、ホスト由来のリンパ球が心筋炎の発現による心筋逸脱蛋白の流出による心筋ミオシン等の抗原刺激に应答し、活性化し最終的なエフェクター細胞となり心臓への炎症の主体となることが考えられた。

E. 結論

我々が樹立した LEW-Tg (CAG-EGFP)1Ys から作成した GFP-Tg MTL は control MTL と同様な特性を有し、移注し作成した GFP-Tg tEAM においても control tEAM と同等な心筋炎惹起能を有した。

移注した GFP-Tg MTL が心筋炎病巣に集簇しており、直接浸潤することで心筋炎を惹起した。その後、ホスト由来の CD4 陽性 T リンパ球が炎症の主体に移行した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Imaki R, Niwano S, (4 人略 last author) Izumi T. Neutral endopeptidase inhibitor suppresses the early phase of atrial electrical remodeling in a canine rapid atrial pacing model. *Indian Pacing Electrophysiol J*, 8(2):102-13, 2008.

② Inuzuka Y, Okuda J, (11 人略) Izumi T (2 人略). Suppression of Phosphoinositide 3-Kinase Prevents Cardiac Aging in Mice. *Circulation*, 120(7):1695-703, 2009.

③ 柳澤智義、和泉 徹. 心筋炎から拡張型心筋症へ. *医学のあゆみ 心不全*, 232(5):330-4, 2010.

2. 学会発表

① 柳澤智義、和泉 徹ら. Novel Experimental Model of Autoimmune Myocarditis Induced by Green-Fluorescent-Protein-Expressing T Cell Transfer. 第 74 回 日本循環器学会総会・学術集会、2010 年 3 月、京都。

② 柳澤智義、和泉 徹ら. Role of Experimental Autoimmune Myocarditis on Green-Fluorescent-Protein-Expressing T Cells. XXth World Congress of International Society for Heart Research. 2010 年 5 月、京都。

H. 知的財産権の出願・登録状況

「蛍光ラベル化した心筋炎惹起性細胞株の樹立および自己免疫性心筋炎の病態解明への応用」特許出願済み

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—重症心不全患者に対する Carvedilol および Bisoprolol 導入後の心不全改善効果についての比較—

分担研究者：磯部 光章（東京医科歯科大学循環制御内科教授）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

β 遮断薬の Carvedilol および Bisoprolol はともに、大規模臨床試験により心不全患者に対する有効性は証明されているが、両剤の効果を直接比較した研究はほとんど行われていない。一方で、Carvedilol は非選択的 α β 遮断薬であり、Bisoprolol は選択的 β 1 遮断薬であるという違いを有しており、両剤の心不全患者に対する効果にも差が存在する可能性が考えられる。そこで我々は、重症心不全患者に対する両剤の効果を、後ろ向きに検証した。

B. 研究方法

当院に、2005 年 1 月から 2008 年 1 月の間に入院した 655 名の重症心不全患者（NYHA 分類 3 度および 4 度）のうち、急性冠症候群、重症肺炎、重症弁膜症、透析患者を除き、両剤を初めて導入した 217 名（Carvedilol 群 110 名、Bisoprolol 群 107 名）について、導入 12 か月後の検証を行った。また、両群の心房細動患者 83 名（Carvedilol 群 40 名、Bisoprolol 群 43 名）についても検証を行った。退院後、外来主治医によって、両群ともそれぞれの β 遮断薬を最大容量まで増量した。心不全の診断は、Framingham Heart Study の基準に準拠した。また、心房細動の診断は Holter 型 24 時間心電図で行った。評価は、入院後に患者

の全身状態が安定した時期に、血液検査（brain natriuretic peptide (BNP), CRP, BUN, creatinine, albumin, hemoglobin concentration, CK, troponin-I level）、胸部レントゲン検査、心電図検査、心臓超音波検査（LVEF, LVDD, LVDs, IVST, PWT, E/A ratio, deceleration time of the mitral inflow E-wave (DT))で行った。12 か月後に同様の評価を行い、最初のデータと比較した。すべての結果は SPSS ソフトウェアを用いて統計学的に評価し、 $p < 0.05$ の差であれば有意とした。

C. 研究結果

Carvedilol 群の内服用量は、導入時 3.3 ± 1.6 mg（平均 \pm 標準偏差）、12 か月後 6.0 ± 4.0 mg であり、Bisoprolol 群の内服用量は、導入時 2.2 ± 1.5 mg、12 か月後 3.0 ± 1.5 mg であった。導入前の年齢、性差、既往歴、血圧、心電図検査での心拍数と QRS 間隔値、血液検査、胸部レントゲン検査での心胸比值、心臓超音波検査での患者特性は、両群間に有意差は認めなかった。併用薬についても両群間で有意差は認めず、Carvedilol 群では利尿剤が 98%、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が 28%、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬が 45% の患者に併用され、Bisoprolol 群では利尿剤が 98%、アンジオテンシン変換酵素阻害剤が 16%、

アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬が47%の患者に併用されていた。導入12か月後、生存率および心血管イベント出現率は、両群間に有意差は認めなかった。死亡例については、Carvedilol群では急性冠症候群発症者1名、原因不明の突然死発症者1名、急性心不全発症者16名であり、Bisoprolol群では急性冠症候群発症者3名、急性心不全発症者12名であった。両群とも導入前に比べ、血圧、心拍数、左室駆出率、BNP値の有意な改善を認めた。一方、心房細動患者について、生存率および心血管イベント出現率は、両群間に有意差は認めなかったが、心拍数(Carvedilol群対Bisoprolol群: $-27.2 \pm 17.5\%$ 対 $-38.5 \pm 20.2\%$; $p = 0.04$)、BNP値の改善率($-41.5 \pm 52.5\%$ 対 $-69.0 \pm 23.2\%$; $p = 0.04$)が、Carvedilol群よりBisoprolol群で有意に大きかった。また、電氣的除細動を行わず、心房細動から洞調律化した患者が、Carvedilol群でBisoprolol群より有意に多かった(16%対48%; $p=0.03$)。

D. 考察

今回の研究では、 β 遮断薬導入前の両群の患者特性に違いはなかったため、両剤の効果を明確に比較できた。両剤の投与量は、欧米で行われた大規模臨床試験での用量と比較すると少なかった。しかし、日本人では少量でも欧米の試験と同等の心保護効果があるという報告が多数あり、今回の研究では生存率や心血管イベント出現率から考えると、両剤とも十分量投与されていると考えられた。Bisoprolol群では、Carvedilol群と比較して心拍数が有意に改善していたが、これはBisoprololが選択的 β_1 遮断薬であり、Carvedilolが非選択的 $\alpha\beta$ 遮断薬であるため、Bisoprololの方が β_1 遮断作用による心拍数抑制効果が強く現れた結果と考えられた。そのため、Bisoprolol群ではCarvedilol群と比較して、より強い心不全改善効果を示し、BNP値のより大きな改善に結び付いたと考えられた。しかし、両群の生存率や心血管イベントに有意差はなかったため、Carvedilolは心拍数抑制以外の機序による心保護効果を有する可能性が考えられた。また、心房細動患者の洞調律化についても同様に、心拍数抑制が寄与した可能性が考えられた。今回の研究では、両群とも明らかな血栓塞栓症をきたした患者は認めなかったが、心房細動患者の洞調律化の際は、脳梗塞をはじめとする血栓塞栓症をきたす可能性があり、洞調律化率の大きかったBisoprololでは、投

与時に注意が必要と考えられた。一方で、両群とも β 遮断薬を導入する時点で、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬など、心不全改善効果のあるとされる薬剤が多く患者に併用されていた。そのため、今回の研究でみられた両剤の心不全改善効果は、他剤の影響を受けた可能性がある。また、今回の研究は、単一施設で行った後ろ向き研究であり、患者に対する β 遮断薬の割り振りとその最大容量については、主治医の判断が大きく関わっているため、バイアスが含まれた可能性がある。両剤の心不全改善効果をより正確に評価するために、両剤の等効果用量を厳格に設定した上で、多施設の大規模無作為比較試験を行う必要がある。

E. 結論

以上の結果から、CarvedilolとBisoprololは同等に重症心不全患者に対して心不全改善効果を有すると考えられた。また、心房細動合併患者に対しては、心拍数改善効果の大きいBisoprololがより有効である可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

2009年10月31日 第13回日本心不全学会学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—ミトコンドリア病の認定基準案の作成—

分担研究者：後藤 雄一（国立精神・神経センター神経研究所）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、循環器疾患において予後不良な疾患群である。家系解析による遺伝学的解析や分子生物学的解析などにより、心筋細胞を構成する構造蛋白、Ca ハンドリング蛋白などの機能異常が特発性心筋症の病態にかかわることが明らかにされてきた。しかしながら、特発性心筋症の病態を解明する上ではまだ十分ではなく、さらなる検討が必要である。本研究班においては、現時点における特発性心筋症の頻度、治療状況などを調査する CCMM 研究を進めてきた。また、本年度に特発性心筋症のなかの肥大型心筋症・拘束型心筋症が特定疾患の難病指定に認定され、それぞれの認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。サブグループ研究として、「日本における心臓移植医療を受けた患者の調査研究」・「特発性心筋症における心筋生検および画像診断の有用性の検討」を開始する準備を進めてきた。また、各研究員の個別研究として、特発性心筋症および心不全に関する予防、診断、病態解明、治療などさまざまな角度から先端的臨床・基礎研究を進めた。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

ミトコンドリアはすべての細胞内において、エネルギーを産生する小器官である。ミトコンドリアに何らかの異常があると、大量のエネルギーを必要とする神経・筋、循環器、代謝系、腎泌尿器系、血液系、視覚系、内分泌系、消化器系などに障害が起こる。なかでも、中枢神経や筋の症状を主体とするミトコンドリア脳筋症が代表的な疾患であるが、最近では「ミトコンドリア病」と総称することが一般的である。

ミトコンドリア病は時に特発性心筋症を起こすことがあることから、「難治性疾患克服研究事業（特定疾患調査研究分野）」の対象疾患になっている。今年度、ミトコンドリア病が認定疾患とされることから、当研究班に分担研究者として参画し、その認定基準の策定に関わった。

B. 研究方法

ミトコンドリア病の診断基準は、世界的に共通のものは存在しない。本疾患は多様な臨床症状を示すために、その診断には、病理検査、生化学検査、遺伝子検査を中心としたミトコンドリア異常を確認する基盤的検査と、画像検査、電気生理学的検査などそれぞれの臓器に特異的な検査を合わせて行われている。それらを網羅するような診断基準

を策定することは困難であり、これまで欧米でいくつかの診断基準案が提案されているものの一般的にはなっていない。

そこで今回の認定基準案策定においては、東京都難病医療費助成事業（平成 5 年度から）及び埼玉県特定疾患医療給付（へ市営 18 年度から）の認定基準、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金小児疾患臨床研究事業（主任研究者：古賀靖敏・久留米大学）で作成された MELAS と Leigh 脳症（ともにミトコンドリア病の代表的臨床病型）の診断基準等を参考に、近年の診断手法の進歩を踏まえてミトコンドリア病全体の認定基準案作成を行った。また海外から提案されている診断基準も参考にした。

C. 研究結果

別紙に示すようにミトコンドリア病の認定基準案を作成し、厚生労働省から平成 21 年 10 月 1 日から認定が始まった。

主な内容を記載すると、主症候として、骨格筋症状、中枢神経症状、その他の症状（心症状、腎症状、血液症状、肝症状）のうち、いずれの症状の 1 つ以上有することを必須とした。東京都、埼玉県で行われていた医療費助成事業における基準では、骨格筋症状を有することを必須として

おり、ミトコンドリア病患者を広くとらえることとした。

また検査に関しては、平成 16 年に作成された古賀班での基準を概ね踏襲し、病理検査、生化学、遺伝子検査を中心とした検査で 2 つ以上の項目で所見があることを基準とした。

D. 考察

これまで我が国においては、ミトコンドリア病の診断基準が整備されておらず、そのため実態調査もほとんど行われていない。ミトコンドリア病の診断には、病理学、生化学、遺伝子などのそれぞれ専門的な知識と技術が必要であり、さらにそれらの結果を総合的に解釈しなくてはならず、おそらく診断に至っていない患者が多数存在していると考えられる。この認定基準の策定が、ミトコンドリア病に関する関心が医療を提供する側、受ける側の双方にとって大きな意味をもつと考える。

一方で、ミトコンドリア病でもっとも患者が多いと考えられるミトコンドリア糖尿病／難聴に関しては、この基準では認定が困難である。筋症状や末梢神経障害を合併する場合に認定されるようになっている。今後は認定基準に重症度スケールを導入し、基準を明確にしてゆく必要が生じるであろう。

E. 結論

ミトコンドリア病の認定基準を作成した。今後のミトコンドリア病の病因、病態鶏鳴と新たな治療法の開発に向けて実態把握早急に行うことが必要であり、またこの認定基準の妥当性も検討してゆく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

1. Nishigaki Y, Ueno H, Coku J, Koga Y, Fujii T, Sahashi K, Nakano K, Yoneda M, Nonaka I, Tang L, Liou C-W, Paquis-Flucklinger V, Harigaya Y, Ibi T, Goto Y, Hosoya H, DiMauro S, Hirano M, Tanaka M. Extensive screening system using suspension array technology to detect mitochondrial DNA point mutations.

Mitochondrion (doi:10.1016/j.mito.2010.01.003)

2. Kobayashi A, Goto Y, Nagata M, Yamaguchi Y. Granular swollen epithelial cells: a histological and diagnostic marker for mitochondrial nephropathy. *Am J Surg Pathol* 34:262-270, 2010.

3. Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 12:1-13, 2009.

4. Mimaki M, Ichiyama T, Isumi H, Furukawa S, Akasaka M, Kamei A, Komaki H, Nonaka I, Goto Y. Different effects of novel mtDNA G3242A and G3244A base changes adjacent to a common A3243G mutation in patients with mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 9:115-122, 2009.

(学会発表)

1. Hatakeyama H, Sawa K, Goto Y: Functional threshold in mitochondria with cytochrome c oxidase deficiency: A cell-based diagnostic approach for mitochondrial diseases. The 6th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Taipei, TAIWAN, 10.31-11.1, 2009.

2. 島山英之, 澤佳世, 喜多俊二, 後藤雄一. COX 欠損症により支配される重篤なミトコンドリア機能障害. 第 9 回日本ミトコンドリア学会, 12.17-12.19, 2009, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし