

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 CaMKII δ と p53 の役割—

分担研究者：小室 一成（千葉大学大学院医学系研究院循環病態医科学）

＜研究要旨＞ 拡張型心筋症は左心室拡大と左室収縮能低下をきたす予後不良の疾患群であり、その約 30%は心筋 α アクチン遺伝子などの遺伝子異常が原因であることが報告されている。しかしながら、遺伝子異常がどのような機序で心機能低下をきたすかについては不明な点が多い。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1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あげられる。そこで我々は、拡張型心筋症モデルマウスを作成し、それを用いて遺伝子変異から心不全が発症する分子機構を明らかにすることを目的に研究をおこなった。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心筋 α アクチン遺伝子をマウスの心臓に過剰発現したトランスジェニックマウスを作成し、拡張型心筋症モデルマウスを樹立した。次にこ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試みた。心筋症マウスモデルの心臓では癌抑制遺伝子 p53 およびカルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK) II δ の発現増加が認められ、これらの因子が病態に関与している可能性が強く示唆された。

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 2009 年までに 70 人弱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。しかしながら、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り、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思われる。そこで本研究では、拡張型心筋症モデルマウスを作成し、遺伝子変異より心不全が発症する分子機構を明らかにすることをその目的とする。

B. 研究方法

我々は、ヒト拡張型心筋症の原因として既に報告のある変異心筋 α アクチン遺伝子をマウスの心臓に過剰発現したトランスジェニックマウスを作成した。この遺伝子改変マウスは、左室内腔拡大および心収縮力低下が週齢とともに進行し、40 週齢までに約半数が死亡することが明らかになり、拡張型心筋症のモデルと考えられた。そこでこ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試みた。

C. 研究結果

これまでの研究から癌抑制遺伝子である p53 が心不全の進展に関与することが明らかにされていた。そこでこの拡張型心筋症モデルマウスの心臓における p53 の発現について検討したところ、p53 および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。心筋症の病態における p53 の役割をさらに検討するために p53 ヘテロノックアウトと交配し、p53 発現量を低下させたところ、心機能の改善、Bax 発現量の低下、心筋細胞死の減少が認められ、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。次に p53 蛋白レベルの増加の機序に関して、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK) II δ に着目し検討を行った。拡張型

心筋症モデルマウスの心臓においては CaMKII δ の発現量が増加しており、さらに CaMKII δ 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ことから、CaMKII δ の活性も上昇しているものと考えられた。次に、心筋症の病態における CaMKII δ の役割をさらに検討するため、CaMKII δ 阻害薬である KN-93 を用いて検討を行った。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 mini-pump を用いて投与したところ、心内腔の拡大や心収縮力の低下は改善し、さらに、p53 の発現量増加も軽減した。これらの結果は CaMKII δ が p53 の発現を誘導していることを示唆するものと考えられた。

D. 考察

今回の検討により、癌抑制遺伝子 p53 および CaMKII δ の拡張型心筋症発症における重要性が明らかになった。我々は以前、心肥大から心不全へと移行するメカニズムとして、p53 の関与を報告した。すなわち、血行力学的負荷が長期間持続すると p53 の発現が誘導され、誘導された p53 が HIF-1 を抑制することにより VEGF などの血管新生因子の発現が低下し、心筋が相対的な虚血状態に陥ることが心肥大から心不全へ移行する機序のひとつであると考えられた。しかしながら、今回の拡張型心筋症モデルマウスにおいては細胞死を促進する Bax の発現量が亢進しており、また、実際に心筋細胞死も増加していることから、p53 を介した心筋細胞死の増加が心機能低下の主な原因であると考えられた。したがって、様々な心不全の病態生理において p53 は重要であるが、その下流のシグナルは病態によって異なることが示唆された。

一方、CaMKII 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から、心疾患における役割が注目されている。今回の検討では拡張型心筋症モデルマウスにおいて CaMKII δ の発現量が亢進しており、さらに、その阻害薬の投与により、p53 の発現量が低下し、心機能が改善したことから、CaMKII δ の活性化が p53 発現誘導を介して心機能低下を来している可能性が考えられた。拡張型心筋症モデルマウスにおいて CaMKII δ の活性が亢進する理由については現時点では明らかではないが、CaMKII δ はカルシウム依存性リン酸化酵素であり、遺伝子変異にともなう細胞内 Ca 代謝の変化が CaMKII δ の活性亢進の原因である可能性も考えられる。

E. 結論

遺伝子変異より拡張型心筋症が発症する分子機構として、変異心筋遺伝子の発現により CaMKII δ が活性化され、それが p53 の発現を介して心筋細胞死を誘導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

論文発表

・Kayama, Y., Minamino, T., Toko, H., Sakamoto, M., Shimizu, I., Takahashi, H., Okada, S., Tateno, K., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Yoshimura, M., Egashira, K., Aburatani, H., Komuro, I. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med* 6;206:1565-74, 2009.

・Ikeda, H., Shiojima, I., Ozasa, Y., Yoshida, M., Holzenberger, M., Kahn, C.R., Walsh, K., Igarashi, T., Abel, E.D., Komuro, I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 47:664-675, 2009.

・Ito, K., Akazawa, H., Tamagawa, M., Furukawa, K., Ogawa, W., Yasuda, N., Kudo, Y., Liao, C.H., Yamamoto, R., Sato, T., Molkenstin, J.D., Kasuga, M., Noda, T., Nakaya, H., Komuro, I. PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8689-8694, 2009.

学会発表

・小室一成. 「心不全の新しい発症機序と治療」日本循環器学会北海道地方会教育セッション(平成 21 年 6 月 13 日, 北海道)

・小室一成. 「心不全の新しい発症機序と再生治療」第 30 回千葉県小児循環器研究会(平成 21 年 9 月 11 日, 千葉)

・小室一成. 「心不全の新しい発症機序と再生治療」第 57 回日本心臓病学会学術集会ランチョンセミナー(平成 21 年 9 月 19 日, 北海道)

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

—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—

分担研究者：山岸 正和（金沢大学医薬保健研究域医学系・循環医科学専攻・臓器機能制御学）

＜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

肥大型心筋症は、高血圧症や大動脈弁狭窄症など心筋因子以外の原因が確認されないにもかかわらず心筋肥大をきたす特発性心筋症である。分子遺伝学的解析の結果、肥大型心筋症の病因が心筋サルコメア遺伝子の変異であることが明らかにされた。肥大型心筋症の特徴は心筋肥大を認めることと左室収縮能が正常であることだが、一部の症例では徐々に心筋の線維化が進行し、心筋収縮能低下による心不全を発症する。また心室頻拍や心室細動により突然死をきたす症例が認められ、肥大型心筋症は若年者突然死の原因としては最も頻度が高い。従って肥大型心筋症の経過観察においては、経時的な心機能評価とともに心室性不整脈のリスク評価が求められる。一方、心電図におけるQT間隔やQT dispersion(QT間隔のばらつき)といったQT指標は、心筋の再分極過程における遅延や非同期性を示すものであり、心室性頻拍の臨床的指標になりうると考えられている。これまで肥大型心筋症は主に形態変化によって確定診断されてきたため、心電図QT指標の変化が心筋の形態変化に先行するか否か、またQT指標が臨床的予後との関連を有するか、についての検討は十分ではなかった。近年の分子遺伝学的研究の進歩により、心筋肥大という形態学的変化が出現する以前の段階で、肥大型心筋症を遺伝子

診断することが可能となってきた。このため我々は、遺伝子変異が同定された肥大型心筋症例を対象として、心電図変化と心筋肥大の有無に着目して心電図QT指標を解析した。

B. 研究方法

対象は、心筋サルコメア遺伝子変異が同定された肥大型心筋症111例（心筋ベータミオシン重鎖遺伝子（*MYH7*）：16例、ミオシン結合蛋白C遺伝子（*MYBPC3*）：32例、心筋トロポニンT遺伝子（*TNNI2*）：21例、心筋トロポニンI遺伝子（*TNNI3*）：42例）と同遺伝子変異を有さない対照43例で、遺伝子変異を有する症例は心電図変化も心筋肥大も有さないA群、心筋肥大は有さないが心電図変化を認めるB群、心筋肥大を認めるC群の3群に分類してQT指標を解析した。A群とB群との間で年齢に有意差が生じたため、それぞれに年齢を合致させた対照群を選び、それぞれ対照A群、対照B群とした。またA群、B群、C群を対象として、その臨床的転帰を調査した。

C. 研究結果

左室最大壁厚はA群、B群と比べてC群で有意に大であった（C群 $19.0 \pm 4.3\text{mm}$ ；A群 9.2 ± 1.8 ，B群 10.4 ± 1.8 ，平

均±標準偏差, $P < 0.001$)。この状況下で、補正最大 QT 間隔 (Max QTc) と QT dispersion は、A 群と比べて C 群で有意に大であった (Max QTc/QT dispersion; C 群 $438 \pm 38\text{ms}/64 \pm 31\text{ms}$, A 群 $406 \pm 30/44 \pm 18$, $P < 0.01$)。さらに興味深いことに左室壁肥厚を有さない B 群でも、Max QTc と QT dispersion は A 群と比べ有意に大であった (Max QTc/QT dispersion; B 群 $436 \pm 50/64 \pm 22$, $P < 0.05$)。対照 A 群と対照 B 群では差がないことから、両群間の年齢差による QT 指標への影響は排除できると思われた。

一方、対象の予後調査では 111 例中 57 例で臨床的転帰の確認が可能であった。経過観察期間中 (平均 6.9 年) に、C 群では 4 例に突然死を、1 例に心室細動からの蘇生例を認め、B 群では 2 例に非致死性心室頻拍を認めた。一方、A 群ではこれら心室性不整脈は全く認められなかった。

D. 考察

肥大型心筋症は一般的には予後は良好といわれ、1 年間での死亡率は約 1% と報告されている。しかしながら、左室最大壁厚が 30mm を超える例や突然死の家族歴を認める例では死亡率は 5% 近くにまで高まることも報告されている。左室収縮能が徐々に低下する例では、心エコー図検査などにより注意深く形態学的・機能的な変化を観察することにより病態の変化を早期に把握することは可能である。しかしながら心室頻拍や心室細動などの致死的心室性不整脈は、心収縮能低下例において認められるのみならず心収縮能正常例においても認められ、その発症予測が困難である。従って、肥大型心筋症患者の診療・管理に関して最も重要な点は、致死性不整脈を発症しやすい患者を見出すこと、すなわちリスク層別化を行うことである。今回の研究結果からは、QT 指標の変化は形態学的に左室肥大が出現した時点ではなく、心電図変化が出現した時点から起こり始めるということ、および心電図 QT 指標の変化が肥大型心筋症例における突然死発症の予測因子となることが明らかにされた。

E. 結論

肥大型心筋症の病因となる遺伝子変異保因者においては、左室肥大の出現前であっても、心電図変化が認められた時点で QT 指標に変化が生じる。そしてこのような遺伝子変異保因者では QT 指標の変化に留意し、注意深い経過

観察が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Hayashi K, et al. Long QT syndrome and associated gene mutation carriers in Japanese children: results from ECG screening examinations. Clin Sci (Lond). 117 巻: 415-424 頁. 2009 年

2) Uchiyama K, et al. Impact of QT variables on clinical outcome of genotyped hypertrophic cardiomyopathy. Ann Noninvasive Electrocardiol. 14 巻: 65-71 頁. 2009 年

学会発表

1) Fujino N, et al. Significance of Genetic Analysis in Hypertrophic Cardiomyopathy: Comparison of Development to End-Stage Phase in Thick and Thin Filament Mutations Carriers. 第74回日本循環器学会学術集会. Cardiomyopathy / Hypertrophy (Clinical), 平成22年3月5-7日、国立京都国際会館

2) Hayashi K, et al. Long QT syndrome and Associated Gene Mutation Carriers in Japanese School Children: ECG and Molecular Screening and Prospective Follow-up Study. 第74回日本循環器学会学術集会. Symposium 19 / 学校健診は突然死と生活習慣病を防止できるか, 平成22年3月5-7日、国立京都国際会館

3) Uchiyama K, et al. Impact of QT Variables on Clinical Outcome of Genotyped Cardiomyopathy with or without Left Ventricular Hypertrophy. 第74回日本循環器学会学術集会. Plenary Session 03 / Cardiac Sudden Death: Clinical Evidence and Treatment, 平成22年3月5-7日、国立京都国際会館

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

—C型肝炎ウイルスによる心筋症発症機序—

分担研究者：松森 昭（京都大学大学院医学研究科循環器内科学）

＜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

われわれのこれまでの研究により、C型肝炎ウイルス(HCV)は種々の病型的心筋症をきたすことが明らかになっている。また、HCVは、肝炎、心筋症のみならず、腎炎、リンパ腫など種々の疾患をきたすことも知られている。われわれは、HCVによる多臓器傷害の原因としてHCVが白血球に感染することによることを報告してきたが、今回、HCV構造蛋白に加え、HCVの増殖を示す非構造蛋白の局在について検討した。

B. 研究方法

HCV感染陽性者の末梢血単核細胞(PBMC)および肝臓、心臓、腎臓、骨髄のパラフィン切片を用い、HCVコア蛋白および非構造蛋白NS4に対する抗体を用いてABC法により免疫染色を行った。また、CD3, CD20, CD68抗体を用いて二重染色を行った。

C. 研究結果

HCVコア抗原の分布を表に示す。
 HCVコア抗原陽性細胞の多くはCD68陽性のマクロファージであることが明らかとなった。
 NS4抗体を用いた検討でも、NS4陽性細胞は、コア抗原

の分布と同様であり、HCVは、主としてマクロファージで増殖することが示唆された。

【表】 肝細胞癌および心筋症剖検心におけるHCVコア抗原の存在

年齢	性	診断	肝臓	心臓	腎臓	骨髄
54	F	HCC	1	1	1	1
58	M	HCC	2	1	1	4
65	M	HCC	2	1	1	3
66	M	HCC	1	1	1	2
68	M	HCC	1	1	1	1
70	M	HCC	2	3	2	4
73	M	HCC	2	2	2	3
76	F	HCC	1	1	1	1
81	M	HCC	1	1	1	3
73	F	HCM	2	2	1	3
81	M	DCM	1	2	1	2
84	F	DCM	2	4	1	2

(Dilated HCM?)

HCC:肝細胞癌
 1, 0-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%(全単核球中の陽性細胞の%)

D. 結論

HCVは肝細胞や心筋細胞などの実質細胞で増殖するのではなく、単核細胞とくにマクロファージで増殖することが明らかとなった。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

論文発表

1. Nakagawa Y, Nobuyoshi M, Yamaguchi T, Meguro T, Yokoi H, Kimura T, Hosoda S, Kanmatsuse K, Matsumori A, Sasayama S. Efficacy of Abciximab for patients undergoing balloon angioplasty –Data from Japanese evaluation of c7E3 fab for elective and primary PCI organization in randomized trial (JEPPORT)- Circulation Journal. 73:145-151, 2009
2. Xiao J, Shimada M, Liu W, Hu D, Matsumori A. Anti-inflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis. Eur J Heart Fail. 11:349-53, 2009
3. Nishio R, Matsumori A. Gelsolin and cardiac myocyte apoptosis: a new target in the treatment of postinfarction remodeling. Circ Res. 104:829-31, 2009
4. Matsumori A. Global alert and response network for hepatitis C virus-derived heart diseases: A call to action. CVD Prevention and Control. 4: 109-118, 2009
5. Sasayama S, Izumi T, Matsuzaki M, Matsumori A, Asanoi H, Momomura S, Seino Y, Ueshima K, for The CHF-HOT Study Group. Improvement of quality of life with nocturnal oxygen therapy in heart failure patients with central sleep apnea. Circ J. 73:1255-1262, 2009
6. Liu W, Shimada M, Xiao J, Hu D, Matsumori A. Nifedipine inhibits the activation of inflammatory and immune reactions in viral myocarditis. Life Sciences. 85: 235-240, 2009

7. Matsumori A, Nishio R, Nose Y. Calcium Channel Blockers Differentially Modulate Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. Circ J. 74: 567-571, 2010

学会発表

1. Matsumori A. Joint Session of the Japanese Circulation Society and the American College of Cardiology: Unusual Cardiomyopathies. 58th Annual Scientific Session, American College of Cardiology, March 31, 2009, Orlando, Florida, USA
2. Matsumori A. IHA-APSC Joint Symposium: New Biomarkers of Heart Failure Free Immunoglobulin Light Chains and Antitroponin I Antibody. 18th Annual Scientific Meeting of Indonesia Heart Association, June 12-14, 2009. Jakarta

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

—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—

分担研究者：中谷武嗣（国立循環器病センター臓器移植部）

＜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ため、補助人工心臓（VAS）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（LVAS）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 LVAS を適応するようになり、2001 年からは LVAS 及び心臓移植患者に対する専門病棟が稼動した。そこで、今回、当センターにおける LVAS 装着例における長期予後を検討した。

B. 研究方法

1994 年から 2009 年までに当センターにおいて管理した LVAS98 例について検討を行った。

C. 研究結果

男性 68 例、女性 29 例で、平均年齢は 34 歳であった。基礎疾患は、心筋症 91 例（DCM：85 例、dHCM：6 例）で、虚血性心筋疾患は 7 例のみであった。使用システムは、体外設置型 Topyobo-NCVC 型が 87 例（左室脱血 72 例）

で、体内植込み型は 11 例（拍動型：7 例、定常流型：4 例）であった。平均補助期間は 510 日で、心移植へのブリッジ 33 例では平均 693 日（最長 1444 日）であった。また、装着例における生存率は 5 年で 52.5%であった。専門病棟設置前後で比較すると、5 年生存率は設置前 35.5%に比し、設置後は 61.8%と良好となった。体外設置型および植込み型を 5 年生存率で比較すると、49.9%vs70.0%と植込み型が良好であった。また、体重の影響を Topyobo-NCVC 型の LV 脱血装着例で検討すると、50Kg 未満例と 50kg 以上例で差を認めなかった。装着時における病態として PCPS 装着の有無を当センターで装着した 91 例で検討すると、装着時 PCPS 施行例における 5 年生存率 16.7%、PCPS 非施行例 44.3%と PCPS 施行例の成績は不良であった。

D. 考察

LVA 装着例においても専用病棟による管理により補助期間が延長し、離脱あるいは移植までのブリッジ例を含め長期生存が可能となってきた。さらに植込み型の導入により長期在宅療法へ進むことが期待される。また、体重の小さな症例に対しては、体外設置型により同等の成績が示された。しかし、装着時に PCPS を装着している症例での成績は不良であり、装着時期が予後に関連していた。

E. 結論

LVASにより長期補助が可能となってきたが、術前状態が不良な症例の成績は不良であった。今後、装着時期の検討が必要である。

F. 健康危険情報

現状では特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakatani T.:Heart Transplantation. Circ J: 73(Suppl A):A-55-A-60, 2009

Mano A, Fujita K, Uenomachi K, Kazama K, Katabuchi M, Wada K, Terakawa N, Arai K, Hori Y, Hashimoto S, Nakatani T and Kitamura S.:Body mass index is a useful predictor of prognosis after left ventricular assist system implantation. J Heart Lung Transplant 28:428-433, 2009

Kitamura S, Nakatani T, Kato T, Yanase M, Kobayashi J, Nakajima H, Funatsu T, Toda K, Kada A, Ogino H, Yagihara T.: Hemodynamic and echocardiographic evaluation of orthotopic heart transplantation with the modified bicaval anastomosis technique. Circ J 73:1235-1239, 2009

Wada K, Takada M, Sasaki M, Ochi H, Kotake T, Okada H, Morishita H, Oda N, Mano A, Kato TS, Komamura K and Nakatani T.:Drug interaction between tacrolimu and carbamazepine in a Japanese heart Transplant recipient: a case report. J Heart and Lung Transplant. 28:409-411, 2009

Higashi H, Komamura K, Oda No, Kato T.S., Yanase M, Mano A, Hashimoto S, Wada K, Shishido T, Hashimura K, Kitakaze M, Kitamura S, Nakatani T. Experience of appendicular thermal therapy applied to a patient with a left ventricular assist device awaiting heart transplantation. J. Cardiology 53:301-305, 2009

中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、瀬口 理、加藤倫子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也:わが国における心臓移植でのエベロリムスの現状。今日の移植 22:c, 2009

中谷武嗣:心臓移植と待機患者への治療。内科 103:521-525, 2009

中谷武嗣:心臓。移植 2009, 44(特別号): S119-S121

中谷武嗣、築瀬正伸、戸田宏一:人工心臓。「重症心不全の予防と治療」[編著 北風政史](中外医学社、東京)2009: 293-298

中谷武嗣:心筋疾患 心臓移植。「最新循環器診療マニュアル」[総編集 友池仁暢](中山書店、東京):239-243, 2009

2. 学会発表

Nakatani T: Heart transplantation and mechanical support in Japan. シンポジウム、17th Asian Pacific Congress of Cardiology, 2009.5.20-23, Kyoto, Japan.

Nakatani T: Poster Session (English)41 (M) Translantation /LVAD. Chairperson、第73回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22

Nakatani T: Present Strategy for the treatment of profound hert failure:Long-term support by left ventricular assist systems and heart transplantation. シンポジウム、第73回日本循環器学会総会・学術集会、大阪、2009.3.20-22

中谷武嗣、築瀬正伸、村田欣洋、加藤倫子、戸田宏一、藤田知之、和田恭一、中野一也:心臓移植におけるエベロリムスの現状。シンポジウム、Ciclosporin Pharmaco-Clinical Forum 2009、名古屋、2009.8.1

和田恭一、小島久仁子、岡田 博、森下秀樹、村田欣洋、築瀬正伸、加藤倫子、中谷武嗣:心臓移植患者における血漿交換時のミコフェノール酸の除去率についての検討。ポスター、第45回日本移植学会総会、東京、2009.9.16-17
村田欣洋、築瀬正伸、加藤倫子、藤田知之、戸田宏一、宍戸稔聡、小林順二郎、中谷武嗣:心室細動下に LVAS による Fontan 循環管理を行っている一例。第57回日本心臓病学会、札幌、2009.9.18-20

戸田宏一、小林順二郎、藤田知之、八木原俊克、堀 由美子、関口賢一、村田欣洋、築瀬正伸、中谷武嗣:わが国の植込型補助人工心臓治療に期待されるものとは?:体外式補助人工心臓治療との比較から示唆される治療の quality. シンポジウム、第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009.11.12-14

藤田知之、小林順二郎、戸田宏一、築瀬正伸、加藤倫子、村田欣洋、中嶋博之、伊庭 裕、島原佑介、宮田茂樹、八木原俊克、中谷武嗣:LVAS 装着患者に対する抗凝固療法と頭蓋内出血に対する第 IX 因子複合体製剤の有用性について。ワークショップ、第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009.11.12-14

中島育太郎、加藤倫子、小田 登、村田欣洋、築瀬正伸、戸田宏一、中谷武嗣:Left Ventricular Assist Device(LVAD)導入後強心薬依存性心不全患者の予測因子に関する検討。第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009.11.12-14

中谷武嗣:心臓移植後の免疫抑制について。モーニングセミナー、第31回心筋生検研究会、吹田、2009.11.27-28

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし

2. 実用新案登録:なし

3. その他:研究協力者

梁瀬正伸 国立循環器病センター臓器移植部

瀬口 理 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

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

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

—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—

分担研究者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学第1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

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、心線維化も生じにくい。

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(GC-A KO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NP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かを検討した。

B. 研究方法

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(WT)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週齢より4週間飼育した。EPLと同様に血圧を低下させるためにヒドララジンを5mg/Kg/dayで投与した。

2). また、12週齢の雄GC-A KOマウスおよびWTマウスに6%食塩含有高食塩食餌下でアルドステロン(100ng/kg/min)もしくはコントロールvehicleを4週間腹腔内投与し、16週齢で解剖して解析に供した。

C. 研究結果

1). EPL投与により、GC-A KO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生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。GC-A KOマウスやWTマウス間に血清アルドステロン濃度に差異はなくまた心臓における、アルドステロン合成酵素であるCYP11B2のmRNA発現はともにPCRであっても検出できなかった。また、MRのmRNA発現自体もGC-A KOマウスやWTマウス間で有意な差は認められなかった。

2). アルドステロンを高食塩食餌下で投与したが、GC-A KOマウスWTマウスともコントロール vehicle投与に比較して血圧は上昇しなかった。しかしながらアルドステロンを高食塩食餌下で投与すると心肥大と心線維化はWTマウスでは変化しなかったが、GC-A KOマウスでは有意にHW/BWが増加し、また組織学に心筋の肥大および線維化の増悪が認められた。アルドステロンを高食塩食餌下のGC-A KOマウスの心臓におけるコラーゲンIやBNPのmRNAも上昇していた。

D. 考察

ANP、BNPの心保護作用が無くなるGC-A KOマウスでは、循環や組織アルドステロン濃度の上昇やMRの発現そのものが変化するのではなくMRシグナルがhyperreactivityになっていると推測された。実際、高食塩食餌(6% NaCl)下でアルドステロン(100ng/kg/min)を過剰投与すると、GC-A KOマウスのみ心リモデリングの増悪を来し、WTでは変化を認めなかった。

NP系GC-Aシグナルはアルドステロンと食塩によるMRの活性化による心リモデリングに強く拮抗していると考えられる。

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

特になし

G. 研究発表

Somekawa S, Qingfen Zhang, Nakagawa H, Sung J, Nish

ida T, Soeda T, Takemoto Y, Onoue K, Okayama S, Ishigami K, Kawata H, Horii M, Uemura S, Saito Y Guanylyl Cyclase-A Signaling Attenuates Salt Effect on Aldosterone -Induced Cardiac Remodeling. American Heart Association Scientific Session 2009 など

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

—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—

分担研究者：松崎 益徳（山口大学大学院医学系研究科器管病態内科学教授）

＜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

副腎皮質ステロイド薬は抗炎症薬、免疫反応抑制薬として広くその有効性が確認され、ウイルス性心筋炎においても古くからその有効性が報告されてきた。最近の報告でも副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して心筋保護的に作用することが報告されている。そこでマウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。

B. 研究方法

3 週令♂A/J マウスに coxsackievirus B₃ (CVB3) 2×10⁴ PFU を腹腔内投与し心筋炎を作成した。CVB3 のみを投与した群 (CVB3 群)、dexamethasone 0.15ml/日を 5 日間投与した後、6 日目に CVB3 を投与した群 (DEX-pre/CVB3 群)、CVB3 を投与した後、dexamethasone 0.15ml/日を 5 日間投与した群 (DEX-post/CVB3 群) の 3 群を作成した。14 日後にマウスの心筋を採取し、左室内径、壁厚、ウイルス力価 (TCID₅₀) を測定し、それぞれ 3 群間を比較した。また COX-2 阻害実験として、NS-398 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を投与した群 (NS-398/CVB3)、CVB3 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を接種し dexamethasone 連日投与した群 (NS-398/DEX-pre/CVB3 & NS-398/DEX-post/CVB3) の生存分析を行った。

C. 研究結果

CVB3 群は、左室内径の拡張と壁厚の減少、ウイルス力価の上昇を認めたが、DEX-pre/CVB3、DEX-post/CVB3 群においてはその変化は有意に抑制されていた。NS-398 を用いた

阻害実験ではウイルス接種と共に NS-398 を使用した群の方が全例とも超早期に死亡したが dexamethasone の早期投与により生存率を有意に改善した。

D. 考察

副腎皮質ステロイド薬には、古典的経路 (抗炎症作用) とはまったく異なったメカニズムとして、遺伝子調節には関与せず、短時間で細胞膜に直接作用し、T 細胞アポトーシス誘導や eNOS、COX-II 活性などに関与する第 3 の経路 (nongenomic mechanism) が明らかになっている。さらにこの作用は心血管系に強く発現することが分かっている。従って本効果はコクサッキーウイルスに限定するものではなく、インフルエンザ心筋炎を含む他のウイルス性心筋炎にも応用できる可能性があり、臨床的有用性が期待される。

E. 結論

マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用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

・ Kamota T, Li T-S, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo

- A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K: Ischemic Pre-Conditioning Enhances the Mobilization and Recruitment of Bone Marrow Stem Cells to Protect Against Ischemia/Reperfusion Injury in the Late Phase. *J Am Coll Cardiol* 53(19): 1814-1822, 2009.
- Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ohno M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M: Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing inter-domain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 53(21): 1993-2005, 2009.
 - Matsuzaki M, Yokoyama M, Saito Y, Origasa H, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K, Matsuzawa Y and The JELIS Investigators: Incremental Effects of Eicosapentaenoic Acid on Cardiovascular Events in Statin-Treated Patients With Coronary Artery Disease Secondary Prevention Analysis From JELIS. *Circ J* 73(7): 1283-1290, 2009.
 - Hiro T, Kimura T, Morimoto T, Miyauchi K, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y, Kimura K, Saito S, Yamaguchi T, Daida H, Matsuzaki M, for the JAPAN-ACS Investigators: Effect of Intensive Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis in Patients With Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 54(4): 293-302, 2009.
 - Sasayama S, Izumi T, Matsuzaki M, Matsumori A, Asanoi H, Momomura S, Seino Y, Ueshima K, The CHF-HOT Study Group: Improvement of Quality of Life With Nocturnal Oxygen Therapy in Heart Failure Patients With Central Sleep Apnea. *Circ J* 73(7): 1255-1262, 2009.
 - Kihara C, Murata K, Wada Y, Hadano Y, Ohyama R, Okuda S, Tanaka T, Nose Y, Fukagawa Y, Yoshino H, Susa T, Mikamo A, Furutani A, Kobayashi T, Hamano K, Matsuzaki M: Impact of intraoperative transesophageal echocardiography in cardiac and thoracic aortic surgery: Experience in 1011 cases. *J Cardiol* 54(2): 282-288, 2009.
 - Oikawa S, Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K, for the JELIS Investigators, Japan: Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis* 206(2): 535-539, 2009.
 - Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 208(2): 366-369, 2010.
 - 吉賀康裕, 清水昭彦, 鈴木慎介, 杉直樹, 大宮俊秀, 大野誠, 吉田雅昭, 松崎益徳, 三尖弁輪周囲を旋回する心室頻拍を認めた不整脈源性右室心筋症の1例. 臨床心臓電気生理 32: 216-220, 2009.
- 2) 学会発表
- 中村浩士、松崎益徳. NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein (NDUFV1) in the mitochondria may have negative consequences in patients with idiopathic cardiomyopathy. 第73回日本循環器学会総会 (大阪/2009年3月21日)
 - 中村浩士、松崎益徳、加藤智啓. 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53回リウマチ学会総会・学術集会 (東京/2010年4月25日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- ①広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法. 中村浩士、松崎益徳、吉田勉、山口TLO (特開: 2002-209473)。
 - ②An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine. Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida. (米国特許: 10/141608)
 - ③分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法 中村浩士、松崎益徳、山口TLO (特開 2005-229927)

特発性心筋症に関する調査研究

—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—

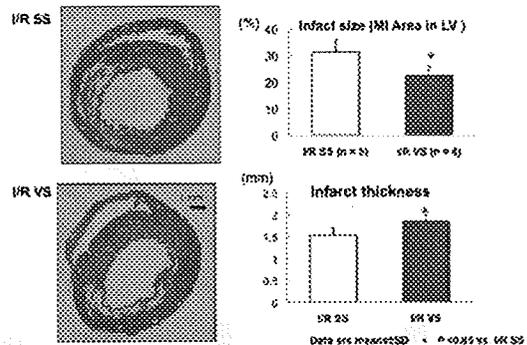
分担研究者：砂川賢二（九州大学循環器内科）

<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 CCMR 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

心不全における自律神経の発火異常は、その病態に強く関与していると考えられている。心不全モデルラットに、迷走神経を慢性的に刺激することで、左室リモデリングを抑制し、その生命予後を著しく改善することが報告されている (Li et al Circulation 2004)。われわれは虚血再灌流においても、迷走神経刺激が左室機能の維持に有用であるとの仮説に基づき、一過性心筋虚血ラットを用いて、検証を行った。

図1. 虚血再灌流後の梗塞範囲の比較



ことが明らかとなった (図 1)

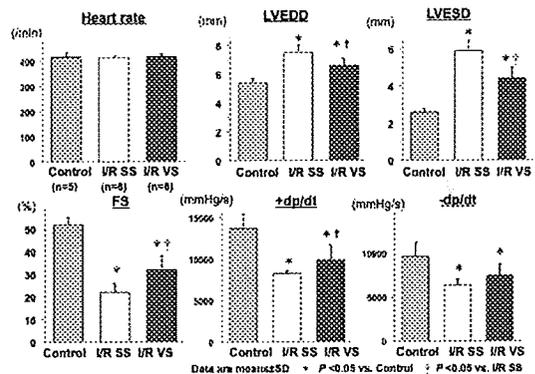
B. 研究方法

麻酔導入下に、オスの SD ラットを開胸し、左冠動脈を結紮、30 分間の虚血の後に、結紮糸を解除することで再灌流を行い、心筋梗塞を作成した。迷走神経刺激は、右頸部迷走神経を剥離表出し、0.3V, 1 msec, 5Hz で、10%程度に心拍低下を得るように行った。迷走神経刺激は、虚血時より再灌流も含めて 30 分間行い、24 時間後に梗塞範囲、アポトーシス評価、4 日後に血行動態の評価を行った。

C. 研究結果

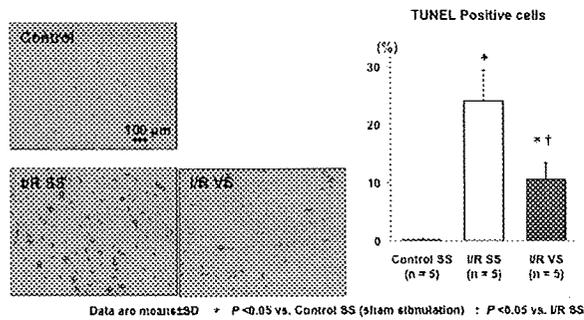
虚血再灌流 24 時間後の心臓で梗塞サイズを評価したところ、迷走神経刺激によって梗塞範囲が有意に減少している

図2. 虚血再灌流後の血行動態の比較(4日後)



4 日後の血行動態では、心エコー上、左室拡大の程度、駆出力(EF)の低下が改善した(図 2)。

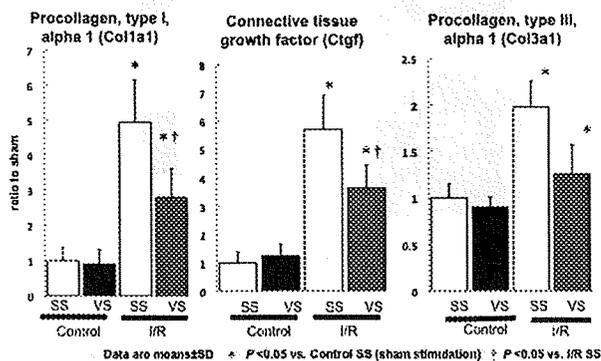
図3. 梗塞心筋のTUNEL染色によるアポトーシス評価



さらに、迷走神経刺激による抗リモデリング効果のメカニズムとして、心筋梗塞部位におけるアポトーシスの出現を検討した。(Fig5) 虚血再灌流によって、24 時間後の梗塞部には、TUNEL 陽性細胞が多数出現するが、迷走神経刺激後の心筋梗塞部において、これらの TUNEL 陽性細胞は有意に抑制されていることが示された。

また、心筋梗塞部 3 時間後のコラーゲン生成にかかわる遺伝子発現をみると、Procollagen type 1, type 3, connective tissue growth factor で認められる遺伝子発現が、迷走神経刺激によって有意に抑制されることが明らかとなった(図 4)。

図4. 虚血部位におけるコラーゲン産生に関わるmRNA



D. 考察

我々は以前、短期の迷走神経刺激が、心不全マウスの心臓において、フリーラジカルの産生を低下させることを報告した。迷走神経刺激が梗塞範囲を減少させるメカニズムについてのさらなる検討が必要である。また、至適条件の検討を踏まえて、今後臨床的な適応へむけての動物実験が必要とされる。

E. 結論

迷走神経刺激は、虚血再灌流直後の心筋リモデリングを改善し、梗塞範囲を縮小し、その後の血行動態改善効果が得られることが示された。

そのメカニズムの一つとして、アポトーシスの抑制効果が考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

① Makoto Ando, Tomomi Ide, Kenji Sunagawa, Vagal Nerve Stimulation during Ischemia-Reperfusion (I/R) Reduces the Infarct Size and Ameliorates Subsequent Left Ventricular (LV) Dysfunction/Remodeling 第 74 回 日本循環器学会学術集会 2010 年 3 月 5 日 (金) ~ 7 日 (日) 国立京都国際会館

② Makoto Ando, Tomomi Ide, Kenji Sunagawa Short-term Vagal Nerve Stimulation protects myocardium from ischemia-reperfusion (I/R) injury 第 13 回 日本心不全学会学術集会 2009.10.30-11.1 福岡国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許：循環器疾患治療用電気刺激装置及び循環器疾患の治療方法 出願中

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

—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—

分担研究者: 今泉 勉 (久留米大学医学部内科学講座心臓・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

急性心筋梗塞後心筋リモデリングを抑制することは生命予後の改善に非常に重要である。近年 JAK2/STAT3 を介したシグナル伝達経路の活性化が心筋の生存促進に最も重要であるとの報告が相次いでなされた。Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3)はG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)、EPO (erythropoietin)や LIF (leukemia inhibitory factor)などのサイトカインによって発現が誘導され、サイトカインの心筋生存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を制御しブレーキをかける 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」である。

B. 研究方法

心筋梗塞後の表現型の差を心筋特異的 SOCS3 ノックアウトマウス (SOCS3-CKO)と野生型のマウスで比較を行った。またサイトカインの発現、シグナルの活性化と SOCS の発現を real-time PCR で確認し、心筋特異的 SOCS3 欠損が心筋梗塞の病態に与える影響を検討した。アポトーシス関連分子の発現の検討も比較し、心筋生存に SOCS3 が与える影響を検討した。さらに虚血後の心筋アポトーシスにはミトコンドリア障害を介したアポトーシス関連分子の発現が重要であり、心筋特異的 SOCS3 欠損がミトコンドリア機能に与える影響について検討した。マウス心筋梗塞モデルに G-CSF、LIF を投与し、

SOCS3-CKO マウスの心筋梗塞後のリモデリング改善効果を野生型マウスと比較検討した。SOCS3-CKO マウスでは G-CSF、LIF の心筋生存シグナルがより効率よく伝わるため、野生型と比較しても著明なりモデリング抑制があると推測のもと研究を行った。

C. 研究結果

心筋細胞内の SOCS3 はサイトカインによる Jak 経路の抗アポトーシス効果を抑制することによって心筋障害を促進する。そこで、心筋細胞内の SOCS3 の発現を抑制すれば、サイトカインによる Jak 経路の活性化が亢進しストレスによる心筋障害が抑制できると考え、Cre-loXp システムを用いて心筋特異的 SOCS3 ノックアウトマウスを作成した。同マウスは組織学的解析と心エコーによる解析において特に以上は認めなかった。このマウスの心筋細胞では、G-CSFなどの STAT3を活性化するサイトカインが効率よく作用することができる。このマウスに急性心筋梗塞を作成したところ、梗塞範囲は著明に縮小し、心筋リモデリングと梗塞後の心不全が抑制されていた。急性心筋梗塞発症24時間後の心臓におけるサイトカインの発現をリアルタイム PCR で測定したところ、G-CSF、LIF や interleukin-11 など、Jak を活性化するサイトカインが高度に発現していた。また、これらの組織切片を用いて CD31 の免疫染色を行い新生血管の評価をおこなった。その結果、SOCS3 ノックアウトマウスにおいて毛細血管数が優位に増加していた。さらに、主要な血管新生因子の real-time PCR を行ったところ、hepatocyte growth factor (HGF)、insulin growth factor (IGF)や mydkiene な

どの血管新生促進因子の優位な発現上昇を確認できた。したがって、心筋特異的 SOCS3 ノックアウトマウスでは、これらのサイトカインによる STAT3 経路と Akt 経路の活性化が遷延することにより、心筋細胞のアポトーシスが抑制され、一方で、血管新生因子の発現亢進によって血管新生が促進していることが梗塞抑制の機序と考えられた。

D. 考察

G-CSF や EPO による急性心筋梗塞と梗塞後心筋リモデリングにおける心保護作用は明らかではあるが、臨床での効果はいまのところ定かではない。しかし、その投与時期や投与方法などプロトコールを検証する必要があると考えられる。また、G-CSF や EPO を投与するとこれらの刺激そのもので内因性の SOCS3 が誘導され、その効果が制限されている可能性がある。本研究の結果は、心筋細胞における SOCS3 の発現を抑制できれば、G-CSF や EPO が虚血心筋へ効率よく作用することができることを示している。今後、SOCS3 が再灌流障害や梗塞後心筋リモデリングの治療標的となる可能性がある。

E. 結論

心筋特異的に SOCS3 を欠損させることにより急性心筋梗塞後の心筋リモデリングが抑制される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

原著

1. Ogihara T, Saruta T, Rakugi H, Shimamoto K, Ito S, Matsuoka H, Horiuchi M, Imaizumi T, Takishita S, Higaki J, Katayama S, Saito I, Shimada K, on behalf of the COLM study investigators: Rationale, study design and implementation of the COLM study: the combination of OLMesartan and calcium channel blocker or diuretic in high-risk elderly hypertensive patients. *Hypertens Res* 32(2): 163-167, 2009.2
2. Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y, Yoshimura A: Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. *PLoS ONE* 4:e5467, 2009
3. Kudo H, Kai H, Kajimoto H, Koga M, Takayama N, Mori T, Ikeda A, Yasuoka S, Anegawa T, Mifune H, Kato S, Hirooka Y, Imaizumi T: Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension* 54(4): 832-838, 2009.10
4. Takemiya K, Kai H, Yasukawa H, Tahara N, Kato S, Imaizumi T: Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension rats. *Basic Res Cardiol* (in press)
5. Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Mawatari K, Oba T, Nagata T, Kyougoku S, Koga M, Imaizumi T: Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol* (in press)
6. Arima K, Katsuda Y, Takeshita Y, Saito Y, Toyama Y, Katsuki Y, Otsuka M, Koiwaya H, Sasaki K, Kai H, Imaizumi T: Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved ischemic peripheral neuropathy in humans. *J Am Coll Cardiol* (in press)

学会発表

1. Imaizumi T: High risk patients/management strategies. (17th Asian Pacific Congress of Cardiology, Symposium7 'New insights into hypertrophic cardiomyopathy: Disease expression and management strategies', May 20-23, 2009, Kyoto, Japan)
2. Oba T, Yasukawa H, Sasaki K, Futamata N, Mawatari K, Fukui D, Yajima T, Hoshijima M, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-specific deletion of SOCS3 prevented myocardial apoptosis after acute myocardial infarction through inhibiting mitochondrial damage. (The American Heart Association, The 82th Scientific Sessions, November 14-18, 2009, Orlando, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

SOCS3 遺伝子がコードする SOCS3 タンパク質の発現を抑制し得る RNA 干渉分子、及びその利用特許出願中 (特願平 2009-278563)

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

—和温療法による慢性心不全患者の自律神経改善効果—

分担研究者：鄭 忠和（鹿児島大学大学院 循環器・呼吸器・代謝内科学）

＜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

「和温療法」は心不全に対する新しい治療法として、1989年、我々が開発してきた全身療法であり、「温熱療法」として啓蒙してきた。しかし、癌に対する高温での局所療法などと区別し、これまで取り組んできた温熱療法の正しい理解を得るために、「心地よく心身をリフレッシュさせるぬくもり」の意味を込めて、2007年4月、「和温療法」と命名した。我々は、慢性心不全患者における和温療法の効果を検討し、症状の改善のみならず、心機能や末梢血管機能、神経体液性因子、酸化ストレスに対する改善効果を明らかにしてきた。一方、心不全では交感神経活動が亢進かつ副交感神経活動が減弱し、病態の増悪に関与していることが明らかにされている。そこで今回、慢性心不全患者における和温療法の自律神経に対する効果を検討した。

B. 研究方法

NYHA 分類Ⅱ～Ⅳ度の慢性心不全患者 45 名を、和温療法を 4 週間施行した和温療法群 28 名と、年齢・性別・重症度を一致させた非和温療法群 17 名に分け比較検討した。和温療法は、遠赤外線乾式サウナ治療室を用い、60℃・15 分間のサウナ浴と出浴後 30 分間の安静保温を行った。入院時、治療 2 週間後、4 週間後のそれぞれで、心拍変動による

自律神経機能評価を行った。心拍変動スペクトルは MemCalc/Tonam[®]システムを用いて、5 分間の連続する RR 間隔の時系列解析を行い、低周波成分(LF: 0.04～0.15 Hz)、高周波成分(HF: 0.15～0.40 Hz)および両者の比 LF/HF を測定した。副交感神経活動の指標として心電図 R-R 間隔変動係数(CVRR)と HF を、交感神経活動の指標として血漿ノルアドレナリン濃度と LF/HF を用いた。また、心エコーで左室駆出率(LVEF)、左室拡張末期容積(LVEDV)、心拍出量(CO)、左室 Tei-index、右室 Tei-index をそれぞれ入院時、治療 2 週間後、4 週間後に計測した。

(倫理面への配慮)

研究プロトコルは、鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

和温療法群では CVRR、HF ともに 2 週間後、4 週間後に有意に上昇し(CVRR: 前 $1.36 \pm 0.60 \rightarrow$ 2 週間後 1.63 ± 0.59 , $p < 0.05 \rightarrow$ 4 週間後 1.84 ± 0.86 , $p < 0.01$; HF: 前 92 ± 83 msec² \rightarrow 2 週間後 139 ± 105 msec², $p < 0.05 \rightarrow$ 4 週間後 178 ± 113 msec², $p < 0.01$)、副交感神経活動の亢進が認められた。また、血漿ノルアドレナリン濃度、LF/HF ともに 2 週間後、4 週間ともに有意に低下し(血漿ノルアドレナリ

ン: 前 599 ± 320 pg/ml \rightarrow 2 週後 481 ± 269 pg/ml, $p < 0.05$ \rightarrow 4 週後 453 ± 255 pg/ml, $p < 0.01$; LF/HF: 前 2.04 ± 1.71 \rightarrow 2 週後 1.47 ± 1.06 , $p < 0.05$ \rightarrow 4 週後 1.17 ± 0.85 , $p < 0.01$ 、交感神経活動の減弱が認められた。一方、非和温療法群では CVRR、HF、血漿ノルアドレナリン濃度、LF/HF ともに有意な変化を認めなかった。心エコーの指標では、LVEF、CO は和温療法群において、2 週後、4 週後とも有意に増加 (LVEF: 前 $32 \pm 13\%$ \rightarrow 2 週後 $34 \pm 13\%$, $p < 0.05$ \rightarrow 4 週後 $34 \pm 11\%$, $p < 0.05$; CO: 前 2.89 ± 0.72 L/min \rightarrow 2 週後 3.21 ± 0.76 L/min, $p < 0.05$ \rightarrow 4 週後 3.23 ± 0.74 L/min, $p < 0.05$)、LVEDV は和温療法群において 4 週後に有意に減少 (前 186 ± 64 ml \rightarrow 4 週後 168 ± 58 ml, $p < 0.05$)、RV-Tei index は和温療法群において 2 週、4 週後に有意に改善 (前 0.67 ± 0.42 \rightarrow 2 週後 0.56 ± 0.31 , $p < 0.05$ \rightarrow 4 週後 0.54 ± 0.30 , $p < 0.05$)、非和温療法群において 4 週後に有意に改善した (前 0.68 ± 0.23 \rightarrow 4 週後 0.56 ± 0.18 , $p < 0.05$)。

D. 考察

和温療法が自律神経機能を改善させる機序として、非和温療法群と比べ和温療法群で心拍出量や左室駆出率、左室拡張末期容積が有意に改善していること、また、過去に和温療法が一回拍出量を増加させ、体血管抵抗や平均肺動脈圧、肺動脈楔入圧を減少させることを明らかにしていることより、これらの改善による前負荷、後負荷の減少や、心拍出量の増加が自律神経機能の改善に寄与していると考えられる。右室 Tei-index は非和温療法群、和温療法群ともに有意に改善したが、和温療法群のほうがより早期に改善した。交感神経活性と肺動脈圧とは正相関があるとの報告もあることから、和温療法による右心機能の早期改善も自律神経機能改善に関与していると考えられる。また、我々は過去に和温療法が、心不全の進行に伴い発現が低下する血管内皮型一酸化窒素合成酵素の発現および、内皮由来血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) の産生を亢進させ、生命予後が改善することを報告したが、NO は交感神経活性の調節にも関与していることから、和温療法による NO 産生亢進が自律神経活動を改善させている可能性もある。

E. 結論

和温療法は、慢性心不全患者において副交感神経活動を亢進、かつ交感神経活動を減弱させ、自律神経機能を改善させることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Miyata M, Tei C. Pleiotropic effect of Waon therapy. JMAJ 2009; 52:191-193.
2. Kihara T, Miyata M, Fukudome T, Ikeda Y, Shinsato T, Kubozono T, Fujita S, Kuwahata S, Hamasaki S, Torii H, Lee S, Toda H, Tei C. Waon therapy improves the prognosis of patients with chronic heart failure. J Cardiol 2009; 53: 214-218.
3. Basford JR, Oh JK, Allison TG, Sheffield CG, Manahan BG, Hodge DO, Tajik AJ, Rodeheffer RJ, Tei C. Safety, acceptance, and physiologic effects of sauna bathing in people with chronic heart failure: a pilot report. Arch Phys Med Rehabil 2009; 90: 173-177.

II. 学会発表

1. Fujita S, Miyata M, Kihara T, Fukudome T, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamasaki S, Torii H, Tei C. Effect of Waon therapy on oxidative stress in patients with chronic heart failure. 58th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology. 2009年3月, Orlando, USA
2. Miyata M, Shinsato T, Akasaki Y, Tei C. Waon therapy improves peripheral artery disease. 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Symposium 12. 2009年3月, 大阪
3. Miyata M, Kihara T, Kubozono T, Ikeda Y, Shinsato T, Fujita S, Kuwahata S, Hamasaki S, Tei C. Beneficial effects of Waon therapy on patients with chronic heart failure: results of a multicenter study. 第73回日本循環器学会総会・学術集会 Featured Research Session 07. 2009年3月, 大阪

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

—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、カルパイン-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—
研究協力者：豊岡 照彦（北里大学・医療系研究科・循環器内科、客員大学院教授）

<研究要旨> 横紋筋や血小板に多量のカルシウム活性化中性タンパク分解酵素、カルパイン-1 と-2 が含まれ、先天的な遺伝子欠損による拡張型心筋症 (DCM) や圧負荷等で酵素が活性化する。更に後天的な心筋梗塞の急性期に sarcomere 上の収縮調節タンパクのトロポニン-I と-T を選択的に加水分解し、慢性期には細胞膜上の骨格タンパクのジストロフィン複合体の切断により心不全が増悪することを筆者らは動物モデルとヒト臨床例で示し、これが遺伝子治療や一部の薬物治療で改善する事を報告した。しかしカルパイン-2 の特異的な阻害薬が無く、knock-out 動物も致死性で正確な生理機能が不明だった。昨年、筆者らは RNAi と、その shRNA を含む cDNA の遺伝子導入によりカルパイン-2 選択的な発現と酵素活性の knock-down に成功した。その結果、筋芽細胞の融合による筋管形成が為されず、成熟筋細胞への分化が停止する事を見出した。今回は同様の手法で細胞骨格タンパクの中の δ SG を骨格筋の筋芽細胞で knock-down して我々が *in vivo* の δ SG 遺伝子欠損動物の心筋で示したように近隣の SG 類やジストロフィンが病態進展と共に消失して筋細胞の崩壊に至るか検討した。この研究は心筋細胞が骨格筋と異なり恒常的に拍動を繰り返す結果、 δ SG 遺伝子欠損により細胞膜が脆弱化して、内因性のカルパイン-2 を活性化する仮説を骨格筋系で、取って自働拍動の無い状態で細胞分化と病態進展説を検証する事を目的とした。

A. 研究目的

临床上 DCM の最大の問題は原因究明に加えて心不全が治療抵抗性で、徐々に進行して重症化する機構が不明な点に有る。重症心不全の根本解決策として心移植が行われているが、移植費用、慢性的なトナー不足と免疫抑制薬の生涯投与など社会医学的な問題が山積している。

筆者らは横紋筋や血小板に多量に含まれるカルシウム活性化中性タンパク分解酵素、カルパインに注目して、その生化学的性質や病態生理学的な意義を検討して来た。

その過程で DCM 発症 TO-2 系ハスターが細胞骨格タンパクでジストロフィンと複合体を形成する膜貫通型サルコグリカン(SG)の中の δ -SG の遺伝子欠損であることを同定した(Sakamoto *et al.*, *PNAS*, 1997)。この結果を受けてヒトでも同じ δ -SG の遺伝子欠損による DCM 症例が報告された。この時に δ -SG 以外の α -, β -, と γ -SG も mRNA は十分発現しているにも関わらず、各タンパクが発現しなかったことから、遺伝子翻訳後の修飾により各 SG が分解されることが示された。

逆に、遺伝子治療により欠損した動物の心筋に正常化した δ -SG 遺伝子を長期間発現させると他の SG が再発現し

て、心機能と生命予後も改善したことから(Kawada *et al.*, *PNAS*, 2002)、心不全の進展に応じてジストロフィン複合体が増減する機構を示した。

更に、後天的な広範囲陳旧性心筋梗塞ではカルパインのタンパク量と酵素活性が上昇し、*in vitro* で精製カルパインが δ -SG 以外の SG を容易に加水分解することから、心不全の進行と共に心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇してカルパインが活性化し、各種の薬物治療で改善することからカルパインによる悪循環説を提案した(Toyo-oka *et al.*, *PNAS*, 2004)。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は心筋細胞が収縮弛緩を繰り返す結果、細胞膜が脆弱化によると従来考えられて来た。今回は取って拍動をしない骨格筋細胞を用いて、この仮説を検証した。

B. 研究方法

骨格筋細胞として C₂C₁₂ 細胞株を用い、細胞培養の条件は既に発表した(Honda *et al.*, *Am.J.Physiol (Cell Physiol.)* 2008)。また、マウス δ -SG の遺伝子配列から他多種類の RNAi を作製し、lipofectamine で上記細胞株に transfection した後に site-directed 抗体の免疫染色により選択的な δ -SG の

発現抑制 RNAi を選別した。対照には特定の遺伝子を code しない scramble 配列を用いた。

有効な RNAi 配列から演繹した cDNA による oligo-nucleotide から、その short hairpin 構造を有する sh_δ-SG と対照用の sh_SCR を作製して最終的に adenovirus vector に組み込み、実験に供した。また、他のジストロフィン複合体タンパクの mRNA を qRT-PCR で、発現タンパクを特異抗体による Western blotting で定量した。詳細は後記の発表論文を参照されたい。

C. 研究結果

1. 筋細胞の発生分化中の SG 類の発現と δ-SG knock-down の効果

C₂C₁₂ 細胞株は培地中の FCS 欠乏や contact inhibition 等の培養条件を変えることにより、筋芽細胞→myotube→筋細胞へ分化する。この過程で各 SG を定量した結果、δ-SG が最初期から発現し、次に α、β と γ-SG の順に myotube 形成以降に発現した。この系に sh_δ-SG を transfect した結果、δ-SG は強力に (95-99%) 発現が抑制され、その効果は添加後 3-10 日と比較的長期間 knock-down された。この際に筋芽細胞から myotube への形態的な分化には影響せず、細胞骨格タンパクの actin の局在も変化しなかった。

更に、δ-SG の knock-down による他の SG 類の発現を検討した結果、各 SG の発現も抑制されたが、その程度は β > α > γ-SG の順に抑制効果が大きかった。しかし、発現抑制されても残存する各 SG の局在を免疫染色で観察した結果、大部分は細胞膜に、一部に細胞質内に限局して、その分布に knock-down に起因する大きな差を認めなかった。

2. δ-SG の knock-down による他の SG 類の翻訳後修飾

上記の SG 類の増減が各タンパクの合成能の低下に起因する可能性を検討する為に α、β と γ-SG の mRNA の発現を qRT-PCR で検討した結果、対照群の sh_SCR と有意差が無く、タンパク合成系の関与は否定された。この結果はタンパク合成後に分解が促進する作業仮説を支持する。

3. δ-SG の knock-down 後のカルパイン-2 の細胞内移行

上記の翻訳後修飾による各 SG の現象作用についてカルパイン-2 の関与を検討する目的で免疫染色によりその局在を観察した。その結果、δ-SG を knock-down した myotube では細胞質と細胞膜に存在したカルパイン-2 が細胞膜に移行

(translocation) した。更に興味有る所見として Western blotting の結果、カルパイン-2 の総量には対照群と差が無く、これらの結果からカルパイン-2 の shift が起きたと判断した。

D. 考察

今回の研究で各 SG の発現には筋細胞の分化過程で時間的なズレが有り、特に δ-SG は筋細胞の分化で主導的な役割を果たしていることが示された。その knock-down により自働拍動をしない骨格筋細胞でも各 SG が減少したことから機械的な刺激が一義的に各 SG の消退を起こす原因ではないと想像された。更に、その翻訳語の修飾には δ-SG 欠損により、カルパイン-2 が細胞内移行して各 SG が局在する細胞膜に接近する結果、カルパイン-2 が SG 類に空間的に accessible となり基質分解が容易になる可能性を示す。

E. 結論

骨格筋芽細胞の人為的な δ-SG 欠損状態でも自然発症動物やヒト DCM 心筋と同様、他の SG 類の減少を惹起した。これはタンパク発現後の修飾による。また δ-SG 欠損状態でカルパイン-2 の細胞質から細胞膜への移行が起こる。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

論文

Honda M, Hosoda M, Kanzawa N, Tsuchiya T, Toyo-oka T. Specific knockdown of δ-sarcoglycan gene in C₂C₁₂ *in vitro* causes post-translational loss of other sarcoglycans without mechanical stress. *Mol. Cell. Biochem.* 323: 149-159, 2009.

学会発表

Chairman and Invited Speaker,

Toyo-oka, T. Which skeletal myoblasts and how should they be transplanted for the efficient engraftment and cardiac tissue repair? The 3rd World Conference of International Academy of Cardiovascular Sciences, Copenhagen, June 18, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。