

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

—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—

研究協力者：下川 宏明（東北大学大学院循環器病態学分野）

＜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

近年の心不全治療の進歩によって心不全患者の予後は改善しているが、重症心不全患者の予後は未だ不良である。一方、急性心筋梗塞救命率改善、人口構成高齢化を背景にして先進国における心不全有病率は増加している。日本人における心不全患者の特徴と予後を明らかにするために西暦 2000 年 2 月から安定期心不全患者の前向き登録研究：第一次東北慢性心不全登録研究(CHART-1)を開始し西暦 2005 年 12 月に終了した。CHART-1 研究は主に既に心不全を発症した症例の特徴や予後を明らかにするものであったが、現在では心不全診療の戦略は治療から予防へパラダイムシフトしつつある。ハイリスク患者におけるうっ血性心不全発症予防の方策解明を目的に西暦 2006 年 10 月から、多施設前向きコホート研究：第二次東北慢性心不全登録研究(CHART-2)を新規に開始した。

B. 研究方法

登録対象は、AHA/ACC 心不全診療ガイドラインのステージ B/C/D 患者と全ての冠動脈疾患患者である。本研究開始に先立って東北地区の関連 24 施設と共同して東北心不全協議会を組織した。症例登録をリアルタイムかつインタラクティブに施行するため、Web 登録システムを（株）

富士通東北システムズと新たに開発した。円滑なカルテ調査、研究補助、データモニタリングを行うために研究コーディネーター 8 名からなる研究事務局を開設した。

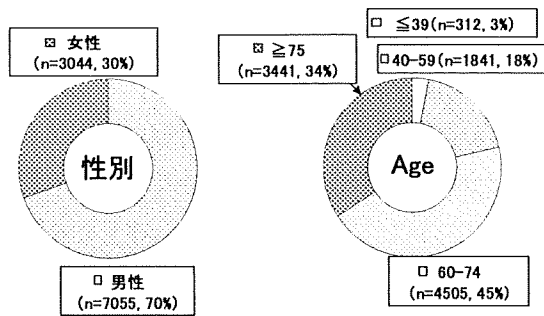
C. 研究結果

2010 年 1 月 13 日までに 10,099 名の登録があり、3 月 28 日に新規登録終了の予定である。平均年齢は 68.2 歳、男性が 70%を占めた(図 1)。背景疾患の 53%が冠動脈疾患で、心筋症と思われる症例が 13%であった(図 2)。心不全治療の標準治療薬である RAS 抑制薬や $\beta$ 遮断薬の浸透度は十分ではなかった(図 3)。ステージ C/D 患者のみを対象に検討すると CHART-1 研究と CHART-2 研究では虚血性心疾患を背景とする症例は、それぞれ 25%から 46%と増加しており心筋症は 33%から 20%と減少していた。

D. 考察

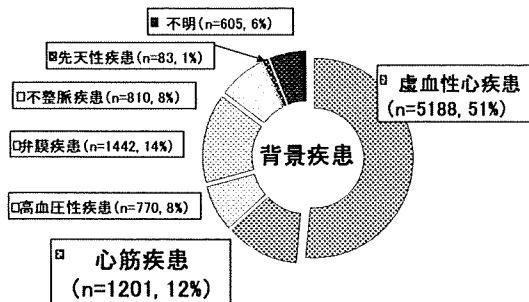
CHART-2 研究の中間解析から、冠動脈疾患の頻度の増加が示唆された。慢性心不全標準治療薬の浸透度は CHART-1 研究が施行された 2000 年に比較して CHART-2 研究が開始された 2006 年では改善が認められた。しかしながら、特に $\beta$ 遮断薬の浸透度は十分とは言えず、今後もエビデンスのある薬物治療の普及が必要である。

図1 CHART-2 登録実績



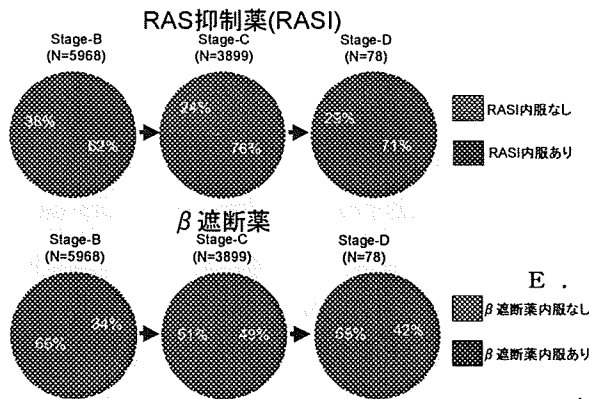
n=10099 2010/1/13現在

図2 CHART-2 登録実績



n=10099 2010/1/13現在

図3 CHART-2研究登録症例 全体の概要  
薬物治療の浸透度



E. 結論

2006年に開始された第二次東北慢性心不全登録の中間解析の結果を報告した。2010年4月以降に行われる各種検査データと予後の追跡によってうっ血性心不全発症の予防に関連する因子の解明を予定している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

・柴 信行、下川宏明。慢性心不全の疫学データ。救急・集中治療。22: 7-13. 2010.

・柴 信行、後岡広太郎、下川宏明 他。わが国における心不全治療のEBM: CHART研究。総合臨床。58: 693-696. 2009.

・柴 信行・下川宏明。拡張不全の疫学—わが国と海外では同じか—。医学のあゆみ。231: 818. 2009.

2) 学会発表

・柴 信行、下川宏明 他。急性心不全の疫学。第57回日本心臓病学会シンポジウム。2009/09/18-20。ロイトン札幌。

・三浦正暢、柴 信行、下川宏明 他。利尿薬は慢性心不全患者の長期予後を増悪させるか。東北慢性心不全登録からの報告。第57回日本心臓病学会学術集会。2009/09/18-20。ロイトン札幌。

・後岡広太郎、柴 信行、下川宏明 他。甲状腺機能障害を合併した心血管疾患の特徴。CHART-2研究中間解析より。第57回日本心臓病学会。2009/09/18-20。ロイトン札幌。

・Shiba N, Shimokawa H, et al. Sudden cardiac death in patients with chronic heart failure -Epidemiological findings from the CHART study-. 第13回日本心不全学会シンポジウム。2009/10/30-11/1。福岡国際会議場。

・Miura M, Shiba N, Shimokawa H, et al. Characteristics of Japanese patients with acute heart failure; Risks of in-hospital mortality. 第13回日本心不全学会。2009/10/30-11/1。福岡国際会議場。

・Nochioka K, Shiba N, Shimokawa H, et al. Characteristics of subclinical hypothyroid disease in patients with cardiovascular diseases -Interim analysis of the CHART-2 study-. 第13回日本心不全学会。2009/10/30-11/1。福岡国際会議場。

・Shiba N, Shimokawa H, et al. Long-term use of diuretics may be associated with increased cardiac events in patients with chronic heart failure. 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

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

—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—

研究協力者：竹石 恭知（福島県立医科大学医学部 循環器・血液内科学講座）

＜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

Pentraxin 3 (PTX3) は C-reactive protein (CRP) と同じ Pentraxin Superfamily に属する急性期炎症反応性蛋白であり、補体の活性化や好中球による食作用刺激などの作用を有し、体液性自然免疫に重要な役割を演じている。近年、高感度の測定法が確立され、急性冠症候群や心不全症例における新しい炎症マーカーとしての臨床的な有用性が報告されている。しかし、PTX3 が心不全の発症と進展に関与しているかはこれまでに十分に検討されていない。

本研究の目的は、PTX3 が圧負荷に対する心臓リモデリングに関与しているか検討することである。

B. 研究方法

・myosin heavy chain promoter を用いて、心臓にのみ選択的に PTX3 遺伝子を発現したトランスジェニックマウス (PTX3-TG) を作成した。また、ミラノ大学の Mantovani 教授から提供を受けた PTX3 ノックアウトマウス (PTX3-KO) を実験に用いた。PTX3-TG マウス、PTX3-KO マウス、野性型 (WT) マウスに大動脈狭窄手術 (TAC) を行った。術後 4 週に心臓超音波検査を行い、左室壁厚、左室内径、左室壁運動を評価した。また、右内頸動脈からマ

イクロマノメータカテーテルを逆行性に左室へ挿入し、左室圧を測定した。検査後サクリフェイスし、心臓を摘出し、重量を測定後、病理組織標本を作成した。また、心筋から蛋白と RNA を抽出し、細胞内シグナルと遺伝子の発現を検討した。

研究プロトコールは遺伝子組み換え実験安全委員会、動物実験委員会にて承認され、研究は遺伝子組み換え実験安全管理規則および動物実験指針に従い行われた。

C. 研究結果

TAC 後の圧負荷による心筋での extracellular signal-regulated kinase (ERK) と nuclear factor (NF)- $\kappa$ B の活性化は WT マウスに比較し PTX3-KO マウスで抑制され、PTX3-TG マウスでは反対に亢進した。TAC 後の心筋での interleukin (IL)-6 の発現は PTX3-KO マウスで抑制され、PTX3-TG マウスでは WT マウスより亢進した。組織へのマクロファージの浸潤と線維化は WT マウスに比し PTX3-KO マウスで抑制された。また、TAC 後の・myosin heavy chain、atrial natriuretic factor、collagen type I、collagen type 3 の遺伝子発現は PTX3-KO マウスでは抑制された。

TAC 4 週後に WT マウスで認められた心エコーで評価

した左室拡張末期径の拡大、左室短縮率の低下、およびマイクロマノメータカテーテルで測定した左室拡張末期圧の上昇は PTX3-KO では抑制され、左室機能は保持された。しかし、PTX3-TG マウスでは左室拡張末期径の拡大、左室短縮率の低下、左室拡張末期圧の上昇は WT マウスに比べより顕著であり、圧負荷による左室機能の低下は増悪した。

#### D. 考察

PTX3 は CRP と同じ Pentraxin Superfamily に属する急性期炎症反応性蛋白である。CRP が IL-6 が産生刺激となって肝臓で産生されるのに対し、PTX3 は IL-1、IL-6、IL-10、Toll-like receptor の ligand などが産生刺激となり、樹状細胞、好中球、マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などから産生される。近年、急性冠症候群や心不全症例における新しい炎症マーカーとしての臨床的有用性が報告されている。我々は血漿中の PTX3 濃度が重症の心不全例で上昇し、PTX3 値が高い症例ほど心臓死、心不全増悪による再入院が多いことを報告した。しかし、PTX3 が心不全の発症と進展に関与しているかはこれまでに十分に検討されていない。

本研究では PTX3-TG マウスと PTX3-KO マウスの 2 種類の遺伝子操作マウスを用いて、圧負荷に対する心臓リモデリングと心機能低下における PTX3 の役割を *in vivo* で検討した。PTX3-KO マウスでは圧負荷による ERK 活性化、NF- $\kappa$ B 活性化、IL-6 産生、線維化、肥大関連遺伝子の発現、線維化関連遺伝子の発現は抑制された。また、圧負荷後の心拡大と心機能低下は抑制された。一方、PTX3-TG マウスでは圧負荷による心機能低下は増悪した。これらの結果から、PTX3 が圧負荷後の左室リモデリングと心機能低下に関与することが明らかになった。

#### E. 結論

圧負荷後のリモデリングと心機能低下に pentraxin 3 が関与していることが示唆された。

#### F. 研究危険状況

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamaguchi O, Kaneshiro T, Saitoh S, Ishibashi T, Maruyama Y, Takeishi Y: Regulation of coronary vascular tone via redox modulation in the  $\alpha$ 1-adrenergic-angiotensin- endothelin axis the myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:

H226-H232, 2009

2) Sugimoto K, Ishibashi T, Sawamura T, Inoue N, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Sakamoto T, Sakamoto N, Okamoto Y, Takuwa Y, Kakino A, Fujita Y, Tanaka T, Teramoto T, Maruyama Y, Takeishi Y: LOX-1-MT1-MMP axis is crucial for RhoA and Rac1 activation induced by oxidized low-density lipoprotein in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 84: 127-136, 2009

##### 2. 学会発表

1) Suzuki S, Shishido T, Kitahara T, Sasaki T, Kato S, Ishino M, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: The long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. Scientific Sessions of American Heart Association 2009, Orlando, Florida, November 2009

2) Sakamoto N, Ishibashi T, Sugimoto K, Sakamoto T, Ohkawara H, Sawamura T, Inoue N, Takeishi Y: LOX-1 mediates renin-angiotensin system (RAS)-dependent redox-sensitive and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways induced in endothelial cells by monocyte adhesion. Scientific Sessions of American Heart Association 2009, Orlando, Florida, November 2009

3) Hirose M, Takeishi Y, Shimojo H, Nishio A, Nakada T, Kubota I, Mende U, Hongo M, Matsumoto K, Yamada M: Nicorandil inhibits ventricular remodeling and arrhythmias in a mouse model of chronic heart failure. Scientific Sessions of American Heart Association 2009, Orlando, Florida, November 2009

4) Kaneshiro T, Saitoh S, Machii H, Yamaguchi O, Ishibashi T, Takeishi Y: Metabolic regulation in coronary vascular tone: various vasodilative substances in myocardial ischemia. Scientific Sessions of American Heart Association 2009, Orlando, Florida, November 2009

5) Takeishi Y, Kitahara T, Kubota I: High-mobility group box 1 enhances angiogenesis, prevents cardiac remodeling, and improves survival after myocardial infarction in the chronic phase. Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009 - Molecular Mechanisms of Cardiovascular Disease, Lake Las Vegas, Nevada, USA, July 2009

#### 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

—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—

研究協力者：島本 健 川名 正敏（東京女子医科大学附属青山病院）

＜研究要旨＞ 心不全では心臓交感神経系が活性化され、心外からの血中エピネフリンが増加し、心臓から血中へのノルエピネフリンのspilloverがみられる。ノルエピネフリンとエピネフリンは心臓の $\alpha$ 、 $\beta$ 受容体を刺激し、特に $\beta$ （ $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ）刺激は心臓の収縮力を強め、弛緩を促進する。しかしこの刺激は長期にわたると心筋毒性として働き、心収縮力は低下し悪性不整脈が増加し、心不全の予後を悪くすることが明らかとなっている。 $\beta$ 遮断療法はその心機能と予後の改善作用から心不全の確立した治療法となっている。しかしこの治療方法は薬物による効果の違いがあり、その機序については明らかとはなっていない。カルベジロールは $\beta 1$ 、 $\beta 2$ を遮断する非選択性 $\beta$ ブロッカーで、 $\alpha$ 受容体遮断、抗酸化作用を有する。多くの臨床試験で心不全での予後改善作用が確認されている。その効果は他の $\beta$ 遮断薬より優れているとされている。最近ではエンドセリン合成阻害や $\beta$ 遮断薬にみられるインスリン感受性の低下がみられないなどの機序が提唱されており、カルベジロールは多機能を有する心筋保護薬と考えられる。心不全では交感神経活性の亢進のみならず、副交感活性の低下がみられ、自律神経の全般的な調節機構が障害され、心拍変動の低下は予後の不良を示す。カルベジロールの心臓交感神経遮断が有効性の主な機序であることは明らかであるが、基礎的研究ではカルベジロール治療による心機能の改善が一部には心拍変動あるいは副交感機能の改善が関与するという報告がある。しかし臨床的には心筋リモデリングと副交感神経機能との関係は明らかではない。

A. 研究目的

心不全では早期から心拍変動(heart rate variability HRV)の低下が見られるが、心不全の強力な予後予測因子である。 $\beta$ ブロッカーはHRVを増加させるという多くの報告がある。 $\beta$ ブロッカー療法は心不全の標準的治療法となっているが、いまだその機序は不明である。 $\beta$ ブロッカーは心室リモデリングを抑制するが、約20-50%の無反応例が存在する。

$\beta$ ブロッカー薬物間の有効性に差があることが指摘されており、カルベジロールのnon-class effectsが注目されている。カルベジロールが心拍変動を改善することが報告されているが、心室リモデリング改善の指標となるかは不明である。

B. 研究方法

洞調律でLVEF50%未満の収縮機能の低下した急性心不全の連続23例を対象とした。急性心筋梗塞、弁膜症、先天性疾患は除外した。24時間ホルターはACE阻害薬あるいはARBを導入後の安定期とカルベジロール投与後一ヶ月で測

定した。心拍変動は時間領域および周波数領域をMemCalc法で解析した。心エコーは安定期とカルベジロール投与後3ヶ月で施行した。心エコー上LVESD10%以上改善した群をレスポンド(R)、改善しない群を非レスポンド(NR)とし、各群カルベジロール投与前後で各パラメーターを比較した。

C. 研究結果

LVEFはR群(n=13)では21.4%( $p < 0.0001$ )改善したが、NR群(n=12)では1.6% ( $p = 0.6281$ )の悪化であった。R群ではLVDd( $p=0.0061$ )、BNP( $p=0.0076$ )が有意に改善した。meanNNは両群とも有意に低下した(R群： $p=0.0107$ 、NR群： $p=0.0076$ )。時間領域解析ではR群で、SDNN( $p=0.0015$ )、SDANN5( $p = 0.0024$ )、rMSSD( $p=0.0230$ )の有意な増加がみられた。周波数領域解析ではR群でLH( $p=0.0192$ )、HF( $p = 0.0231$ )の有意な増加がみられたが、L/H比は両群とも変化はなかった。

#### D. 考察

COMET 研究によりカルベジロールがメトプロロールより心不全の予後改善効果が強いことが示唆された。カルベジロールは、心不全でダウンレギュレーションした $\beta$ 受容体のアップレギュレーション作用がなく、また $\beta$ 受容体のアロステリック部位に結合するため血中濃度とは無関係に作用の持続が長いことから $\beta$ 受容体遮断作用そのものが強いとされる。しかし Non-class effect の機序として $\beta_2$ 遮断作用や抗酸化作用による心筋保護、 $\alpha$ 遮断作用や Ikr 阻害作用による抗不整脈作用、 $\beta_1$ 遮断作用やシナプス前 $\beta_2$ 遮断作用などによる自律神経作用が報告されている。またエンドセリン合成阻害や $\beta$ 遮断薬にみられるインスリン感受性の低下がみられないなどの機序も提唱されている。最近、M2 受容体増加作用により、直接副交感神経に作用することを示唆する報告がなされた。 $\beta$ 遮断薬の心拍変動改善作用は心不全改善の結果と考えられているが、最近副交感神経系が直接の心不全改善効果を有することが指摘されており、 $\beta$ 遮断療法の効果にも関与している可能性がある。

#### E. 結論

カルベジロールの投与により、心機能の改善に伴い心拍変動の改善がみられた。また左室リモデリングの改善がみられた群で、心拍変動の改善が著しかった。心拍変動改善はカルベジロールの心室リモデリング抑制の予測因子となりうる

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

08 心臓病学会

#### 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

—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？—

研究協力者：廣江 道昭（国立国際医療センター 戸山病院循環器科）

＜研究要旨＞ 糖尿病によって、虚血性疾患以外に心不全が発症するが、心臓の収縮不全のみならず拡張不全や重篤な不整脈など糖尿病性心筋症に起因すると言われている。しかしその発症機序はまだまだ不明である。本研究では、糖尿病性心筋症の病態解析により早期診断法の開発に関する研究により、治療に応用することを目的とした。そのためにまず、1) 糖尿病患者心臓の病理組織学的研究、2) 糖尿病ラットモデル実験 (in vivo 実験) など多岐にわたり実施した。糖尿病患者心臓の病理組織学的研究に関しては、光学・電子顕微鏡学的に心筋内微小血管障害の存在が観察され、病態進展に関わる一因子の可能性が示唆される。ストレプトゾトシン(STZ)によるI型糖尿病ラット実験では、収縮能、拡張能障害が認められ、この知験から糖尿病患者に類似していることが明らかになった。さらに分子生物学的検討では、心臓での VEGF とその受容体 Flk-1 は低下し、eNOS も低下していた。さらに心筋内微小血管床と心筋血流量共に著明に減少していた。以上の結果から、心筋内微小血管障害に起因する糖尿病性心筋症の存在が示唆され、その分子機構として高血糖による VEGF 系や内皮細胞系の障害が強く示唆された。

A. 研究目的

近年、本邦でも肥満を基盤とした Metabolic syndrome と共に2型糖尿病の患者が増加している。特に糖尿病によって、虚血性疾患以外に心不全が発症するが、心臓の収縮不全のみならず拡張不全や重篤な不整脈など糖尿病性心筋症に起因すると言われている。しかしその発症機序はまだまだ不明であり、医療コストも急増している。本研究では、糖尿病性心筋症の病態解析により早期診断法の開発に関する研究により、治療に応用することを目的とした。

B. 研究方法

1) 糖尿病患者心臓の病理組織学的研究に関しては、剖検症例と生検標本の解析することによって糖尿病性心筋症と言われている実態について検討する。対象は、国立国際医療センター戸山病院での連続剖検症例から選択した糖尿病17症例(年齢51歳～91歳、BMI15.2～29.4、心重量推定：心重量g/身長cm=1.5～3.6)。HE染色とMT(マッソン・トリクロム)染色による光学的顕微鏡による評価と生検3症例では電子顕微鏡学的評価を加えた。

2) 糖尿病モデル実験に関しては、SDラットによるSTD投与によるI型糖尿病モデルを作成し、生理学的(心エコーによる収縮・拡張機能評価)・病理的研究、分子病態研

究などを行った。

C. 研究結果

1) 病理組織学的検討：組織標本からは直径200 $\mu$ 以下の中・小血管の硬化像、内膜肥厚による血管内腔の狭窄、血管周囲性に心筋個細胞を取り囲むように広がる細い線維化を観察した。電顕的には、毛細血管基底膜の肥厚所見が観察された。

2) ラットI型糖尿病モデルによる検討：心エコーによる評価では、コントロールと比較して、有意な%FSの有意な低下(Con; 32.6  $\pm$  10.7% vs. DM; 26.9  $\pm$  3.0%) およびE/Aの低下傾向(Con; 1.64  $\pm$  0.58 vs. DM; 1.45  $\pm$  0.16)を認め、収縮能、拡張能ともに低下していることが示唆された。糖尿病ラットでの心重量は増加していた。分子生物学的検討では、糖尿病ラット心臓での VEGF とその受容体である Flk-1 は低下し、eNOS も低下していた。さらに心筋内微小血管床と心筋血流量共に著明に減少していた。

D. 考察

糖尿病の合併症である心血管疾患には虚血性疾患や動脈硬化以外に心不全が発症する。心不全の発症

には心臓の収縮不全・拡張不全や重篤な不整脈など種々の因子が関わっており、以前から糖尿病性心筋症に起因すると言われている。しかしその本態や発症機序はいまだ不明である。本研究では、糖尿病における心臓の病態解析により糖尿病性心筋症の病態を把握し、さらに早期診断法の開発を主眼とし、治療に応用することを目的としたい。そのために先ず、1) 糖尿病患者心臓の病理組織学的研究、2) 糖尿病ラットモデル実験 (in vivo 実験、in vitro 実験) など多岐にわたり実施した。

糖尿病患者心臓の病理組織学的研究に関しては、光学・電子顕微鏡学的に心筋内微小血管障害の存在が観察され、病態進展に関わる一因子の可能性が示唆される。ストロプトゾトシン(STZ)による I 型糖尿病ラット実験では、収縮能、拡張能障害が認められ、この知験から糖尿病患者に類似していることが明らかになった。さらに分子生物学的検討では、心臓での VEGF とその受容体 Flk-1 は低下し、eNOS も低下していた。さらに心筋内微小血管床と心筋血流量共に著明に減少していた。

以上の結果から、心筋内微小血管障害に起因する糖尿病性心筋症の存在が示唆され、その分子機構として高血糖による VEGF 系や内皮細胞系の障害が強く示唆された。

#### E. 結論

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?-について検討した結果、心筋内微小血管障害に起因する糖尿病性心筋症の存在が示唆され、その分子機構として VEGF 系や内皮細胞系の障害が強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

- 1) Sato A, Nozato T, Hiroe M et al. 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
- 2) Hirakata H, Tsubakihara Y, Hiroe M et al. Maintaining high hemoglobin levels improved the

left ventricular mass index and quality of life scores in pre-dialysis Japanese chronic kidney disease patients. *Clin Exp Nephrol* 14:28-35, 2010

- 3) Katashima T, Terasaki F, Hiroe M et al. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ J* 2010
- 4) Nishioka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M et al. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298:H1072-1078, 2010
- 5) Jesmin S, Gando S, Hiroe M et al. Protease-activated receptor 2 blocking peptide counteracts endotoxin-induced inflammation and coagulation and ameliorates renal fibrin deposition in a rat model of acute renal failure. *Shock.* 32: 626-632, 2009
- 6) Morooka M, Kubota K, Hiroe M et al. C-11-methionine PET of acute myocardial infarction. *J Nucl Med.* 50: 1283-1287, 2009
- 7) Fujimoto N, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M et al. Incremental prognostic value of serum tenascin-C levels with blood B-type natriuretic peptide testing at discharge in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. *J Card Fail.* 15: 898-905, 2009
- 8) 廣江道昭, 岡崎 修, 門脇 拓, 窪田和雄. 心筋症を MDCT, CMR, SPECT・PET 所見から診る. *内科* 103: 1283-1287, 2009
- 9) 廣江道昭, 岡崎 修, 窪田和雄. 心臓核医学研究の進歩. *循環器専門医* 117:320-324, 2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無。



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

—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—  
研究協力者：木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所・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

肥大型心筋症（HCM）では、サルコメア構成要素や Z 帯構成要素の遺伝子異常が病因になることが知られているが、家族性 HCM 患者のうちそれらの原因遺伝子に変異を有する患者は約 60%であり、さらに未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。また、これまでの解析からサルコメア構成要素異常は Ca 感受性異常、Z 帯構成要素異常はストレッチ反応異常をもたらすと考えられる。一方、ストレッチ反応の分子メカニズムには転写補因子 CARP が関わりと推定されている。そこで本研究では、既知の原因遺伝子に変異が認められない HCM 患者を対象として、候補遺伝子解析（CARP 変異検索と見出された変異の機能解析）を行うことで新規の原因遺伝子を解明することを目的とした。

B. 研究方法

既知の原因遺伝子に変異が見出されていない HCM 患者 384 名（日本人 144 名、米国人 240 名）および一般健常者 700 名（日本人 400 名、米国人 300 名）を対象として、CARP 遺伝子（ANKRD1）の全域について denatured HPLC 法およびダイレクトシーケンス法によって変異を検索した。変異のうち HCM に特異的に見出された

P52A、T123M、I280V について、タイチン N2-A 領域およびミオパラジンとの結合性を免疫沈降法により検討した。さらに、myc-tag 遺伝子を用いてラット心筋細胞内での正常および変異 CARP と局在を検討した。

【倫理面への配慮】

本研究に関連したヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針を遵守することとし、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会の承認を受けている。【研究課題「肥大型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」（研究代表者：木村彰方、平成 21 年 4 月 9 日研究計画継続承認）、「拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」（研究代表者：木村彰方、平成 21 年 4 月 9 日研究計画継続承認）、「高血圧性心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」（研究代表者：木村彰方、平成 21 年 4 月 9 日研究計画継続承認）、「心筋梗塞の病因と病態形成機構の究明に関わる研究」（研究代表者：木村彰方、平成 21 年 4 月 9 日研究計画継続承認）】

C. 研究結果

日本人家族性 HCM 患者 1 名に T123M 変異、米国人孤発性 HCM 患者 2 名にそれぞれ P52A および I280V 変異

を見出した。これらの変異は一般健常者集団には認められず、HCM 特異的と考えられた。一方、HCM 患者 2 名にナンセンス変異 (E34X) を認めたが、家系内で HCM と共分離しないことから病因変異ではないと考えられた。ついで、免疫沈降法による解析を行ったところ、P52A、T123M、I280V はいずれもタイチン N2-A 領域およびミオパラジンに対する結合性を増強することが判明した)。ついで、HCM 患者集団を対象としてタイチン N2-A 領域の変異を検索したところ、2 種類の変異 (R8500H および R8604Q) が見出された。そこで、これらの変異による CARP 結合性の変化を検討したところ、CARP への結合性が増強することが判明した。

さらに、ラット心筋細胞に正常ないし変異 CARP を導入したところ、未熟状態の細胞では正常、変異 CARP とともに核内に分布したが、成熟状態の細胞では、正常 CARP は核内には存在せず I 帯に分布するのに対して、変異 CARP は I 帯領域への分布増強とともに核周辺ないし核内への局在を認めた。すなわち、HCM に見出された CARP 変異は心筋伸展刺激がない状態でも核周辺ないし核内に分布することが判明した。

#### D. 考察

本研究によってこれまでに原因となる遺伝子変異が認められていなかった HCM 患者集団に 3 種の CARP 遺伝子変異が発見された。これらの変異はタイチン N2-A ドメインへの結合性を増強することから、タイチン N2-A ドメイン変異を検索したところ 2 種の変異が発見され、さらにこれらの変異は CARP 結合性を増強した。このことから、CARP・タイチン N2-A ドメイン間の結合増強が HCM の病因に深く関わるということが推定された。一方、ラット心筋細胞への CARP 遺伝子導入実験では、未熟心筋細胞では正常、変異 CARP のいずれもが核内に存在したが、成熟心筋細胞では、正常 CARP は核内には存在しないが、変異 CARP は核膜周辺ないし核内にも存在した。このような成熟心筋細胞における CARP の核内分布は心筋ストレッチに応じて生じることが報告されていることから、変異 CARP は心筋がストレッチされていない状態でも核内局在を示すこと、すなわちストレッチ反応が生じやすい状況にあることを強く示唆する。

#### E. 結論

新規の HCM 原因遺伝子として CARP 変異を同定した。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M, Towbin JA, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A. Impaired binding of ZASP/Cypher with phosphoglucomutase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2009; 83(1): 80-88.
- 2) Moulik M, Vatta M, Witt SH, Alora AM, Murphy RT, McKenna WJ, Boriek A, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA. ANKRD -the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein- is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(4):325-333.
- 3) Arimura T, Bos MJ, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(4): 334-342.
- 4) Sato A, Arimura T, Makita N, Ishikawa T, Aizawa Y, Ushinohama H, Aizawa Y, Kimura A. Novel mechanisms of trafficking defect caused by KCNQ1 mutations found in long QT syndrome. *J Biol Chem*. 2009; 284(50): 35122-35133.
- 5) Kimura A. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J Hum Genet*. In Press

他 9 篇

#### H. 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

—心臓転写因子 *Zac1* の同定と機能解析—

研究協力者：湯浅 慎介、福田 恵一（慶應義塾大学医学部 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

先天性心奇形の発症メカニズムの解明や、心筋細胞の再生の研究に心筋細胞転写因子の研究は必須である。心臓特異的転写因子の研究はホメオボックス型転写因子 *Nkx2.5* の発見から始まる。この遺伝子はホモ型欠損では心臓の発生が障害され、胎児死亡を呈する。また、ヘテロ型欠損では心房中隔欠損や心室中隔欠損を生じる。その後の研究で、心臓特異的転写因子として *Zn* フィンガー型転写因子 *GATA4* が発見され、*Helix-Loop-Helix* 型の転写因子 *HAND* 遺伝子等がクローニングされ、遺伝子ノックアウトマウスの作成が行われた。しかし、現在発見された複数個の転写因子を細胞に発現させても心筋細胞の表現型は形成できない。その原因として（1）さらなる重要な転写因子が存在、（2）染色体プロモーター領域のエピジェネティックな変化が想定されている。我々は以前、胚性幹細胞を選択的に心筋細胞に分化させることが出来る系として、*BMP* の内因性阻害因子 *Noggin* を添加させる方法を開発した（*Yuasa, Nat Biotech, 2005*）。そして、胚性幹細胞が心筋細胞に分化する過程で特異的に発現が増強する転写因子遺伝子群をスクリーニングし、これらの遺伝子群の内で転写因子型モチーフを持ち、*whole mount in situ hybridization* で胎生期心臓に発現している遺伝子として、

*Zn* フィンガーモチーフを 6 カ所持つ転写因子 *Zac-1* を見出した。*Zac-1* はこれまで *genome imprinting* を受ける遺伝子として報告されてはいたが、その機能は知られておらず、心臓における発現自体全く知られていなかった。本研究では *Zac-1* の心臓発生、心臓特異的転写制御を解析し、同時に *Zac-1* の遺伝子欠損マウスを作成することにより、心臓発生における *Zac-1* の意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究では(1) *Zac-1* の細胞内の局在、(2)心臓発生における発現時期、(3)心臓特異的構造蛋白あるいは分泌蛋白である ANP、BNP、 $\alpha$ -MHC の発現に関与しているか否か、(4)ANP のプロモーターのいずれの部分に *Zac-1* が結合するのか、結合部分の同定と変異を入れた際の転写活性変化、(5) *Zac-1* の DNA 結合部位の同定、(6) *Zac-1* と他の心臓特異的転写因子 (*Nkx2.5*、*GATA4*、*MEF2C*) との協調作用の有無、(7) *Zac-1* と共調作用を有する転写因子との結合部位の探索、(8) *Zac-1* と結合能を有する他の転写因子との結合部位、(9) *Zac-1* 遺伝子ノックアウトマウスにおける心臓表現形等を明らかにする。

### C. 研究結果

(1) Zac-1 蛋白の核局在の解明 (2) 心臓の発生過程における Zac-1 の発現時期の解明 (3) Zac-1 の ANP プロモーターへの結合部位の同定 (4) Zac-1 の deletion mutant の作成し、ANP プロモーターに対する DNA 結合部位の同定 (5) Zac-1 と他の心臓特異的転写因子 (Nkx2.5、GATA4、MEF2C) との会合の有無 (6) Zac-1 と他の心臓特異的転写因子 (Nkx2.5、GATA4、MEF2C) との協調作用 (7) Zac-1 と共調作用を有する転写因子との結合部位の探索 (8) Zac-1 を遺伝子ノックアウトマウスの作成と表現形の解析 (心奇形を呈する) (9) Zac-1 遺伝子ノックアウトマウス心臓における発現遺伝子解析とアポトーシスの解析 (心臓特異的遺伝子発現の低下、アポトーシス細胞の増加)

### D. 考察

本研究が取り組む Zac-1 という新しい転写因子は少なくとも心筋特異的蛋白のなかで ANP 遺伝子の発現誘導に関しては既存のどの転写因子より強い誘導作用を有することより、本転写因子の作用機序を解明することは、内因性 ANP 発現誘導薬として創薬のターゲットになる。また Zac-1 遺伝子ノックアウトマウスの心臓では多くの心筋細胞がアポトーシスに陥っている。その機序を解明することが出来れば、Zac-1 による心筋細胞の抗アポトーシス療法への開発に繋がり、心筋虚血や心筋梗塞のリモデリング予防の新規治療法へと繋がる大きな発展が期待できる。また、他の因子と組み合わせることにより、心筋細胞分化誘導の機序が解明できると共に、心筋再生療法への基盤研究を進展させることが出来る等の多くの成果を揚げる事が期待される。

### E. 結論

Zac1 は心臓発生に於いて必須な転写因子である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

1. Satori Tokudome, Keiichi Fukuda, et al. Glucocorticoid protects heart from

ischemia-reperfusion injury through activation of lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD<sub>2</sub> biosynthesis. *J Clin Invest* 119: 1477-88, 2009.

2. Fumiyuki Hattori, Keiichi Fukuda, et al. Novel methods for purifying and transplanting ES cell-derived cardiomyocytes with high cell survival rates and without inducing teratoma formation. *Nature Methods* 7: 61-6, 2010.
3. Hideaki Kanazawa, Keiichi Fukuda et al. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. *J Clin Invest*. 2010; (e-pub online)
4. Kenichiro Shimoji, Keiichi Fukuda et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell* 2010. (in press)
5. Shinsuke Yuasa, Keiichi Fukuda et al. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*. (in press), 2010.

#### 2) 学会発表

1. American Heart Association, 81<sup>th</sup> Scientific Meeting. Toru Egashira, Keiichi Fukuda et al. ATF4-regulated metabolic shift towards Phgdh-mediated serine synthesis enhances cardioprotection against oxidative stress. 2009.11.14-17, Orlando, FL, USA.
2. Hisayuki Hashimoto, Keiichi Fukuda et al. Novel Method 'Fucci' Elucidated the Cell Cycle Dynamics in Developing and Maturing Cardiomyocytes. The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2010.3.5-7, Kyoto, Japan.

### 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

—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—

研究協力者：武田信彬（東京慈恵会医科大学青戸病院内科）

＜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

心筋症モデル動物を用いて拡張型心筋症における心機能異常のメカニズムを解明するのが目的である。これまで我々の施設では新しい心筋症ハムスター J2N-k を開発し、心筋細胞レベルでの変化を検討してきた。一方、拡張型心筋症の原因遺伝子として心筋収縮蛋白の遺伝子変異が同定され、中でも収縮調節蛋白トロポニン遺伝子変異の頻度が比較的高く、また、突然死を含めた予後の悪さについても報告されている。今回はトロポニン T 遺伝子変異に伴う拡張型心筋症のモデルマウスを用いて心筋細胞の生理学的、生化学的変化を検討、また、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタンの効果について検討した。

B. 研究方法

トロポニン T 遺伝子変異に伴う拡張型心筋症モデルマウスとして、トロポニン T K410 欠失変異のノックインマウス (DCM マウス) を用いた。カンデサルタンは 10mg/Kg/日を生後 4 週目から投与開始、8 週目までの 4 週間毎日経口投与した。心機能は超音波検査にて評価、細胞内カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) 測定は、カルシウム感受性発光蛋白クオリンを細胞内に導入して、エクオリンの光信号を測定す

ることで行った。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態を評価するため、DCM マウスの左心室から乳頭筋標本を摘出し、張力測定用トランスジューサーに装着、標本の表層細胞内に Ca 感受性発光蛋白エクオリンを注入した。標本に電気刺激を与え、エクオリンの光信号 (CaT) と収縮張力を同時測定した。さらに左室自由壁切片に Masson Trichrome 染色を施し、組織学的検討を行った。この研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会指針に沿ったものである。

C. 研究結果

DCM マウスではヒト DCM と同様に心拡大および著大な心機能低下が認められた。また、生後 1 ヶ月過ぎより明らかな心不全徴候を呈する前に突然死する個体が出現、6 ヶ月以内にほぼすべてが突然死することが明らかとなった。DCM マウスの乳頭筋標本では収縮張力の著明な低下を認めたにもかかわらず、CaT は増大、また、張力の時間経過の短縮および CaT の時間経過の延長を認めた。カンデサルタン投与によって DCM マウスの生命予後は著明に改善した。心臓超音波検査でも著明に拡大した DCM マウスの左室内径はカンデサルタン投与によって改善、左室機能も有意ではないが改善傾向を認めた細胞内 Ca 濃度変化に関してはカンデサルタン投与でも変化はなかった。一方、

組織学的観察では、DCM マウスでみられた心筋の線維化は、カンデサルタン投与によって抑制された。

#### D. 考察

DCM マウス心筋では収縮張力の著明な低下にもかかわらずエクオリンの光信号 CaT の増大を認め、また、張力の時間経過の短縮および CaT の時間経過の延長を認めたが、これは DCM マウスの心筋収縮蛋白系の Ca 感受性の低下によるものと思われる。心筋細胞内 Ca 動態および収縮蛋白系の Ca 感受性に対してはカンデサルタンは影響しないことが判明した。したがって、カンデサルタン投与による左室拡張の改善、左室機能の改善傾向は心筋の線維化抑制による心筋リモデリングの改善によるものと考えられる。

#### E. 結論

拡張型心筋症モデル動物においてアンジオテンシン受容体拮抗薬カンデサルタンの生命予後の改善、心機能、心筋リモデリングの改善がみとめられた。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表：

1. 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.* 29:585-592, 2009.
2. Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Takeda A, Takeda N, Vahlhaus C, Stypmann J, Schmid C, Baba HA. Reversible regulation of the retinoblastoma protein/E2F-1 pathway during "reverse cardiac remodeling" after ventricular unloading. *J Heart Lung Transplant.* 29:117-124, 2010.

学会発表：

1. Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Morimoto S, Ohtsuki I, Takeda N, Kurihara S: Renin-angiotensin system plays an important role in the pathogenesis of DCM in mouse. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences. July 27-August 1, 2009, Kyoto.

#### H. 知的財産権出願・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

—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—  
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＞ 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

家兎の頸部迷走神経電気刺激により、一過性の僧帽弁逆流、心室期外収縮、心室頻拍が生じ、この系は僧帽弁複合の病変による僧帽弁逆流モデルとして知られていた。本病態では壁運動不均一性が認められ、病変が左心室基部に局在することより、逆タコツボ心筋症のモデルとなりうる可能性がある。家兎迷走心筋電気刺激剖検心における、組織変化、病変の局在を明らかにし、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

家兎 20 羽を、型通り心電図モニター下で右頸部迷走神経電気刺激を繰り返した。電気刺激直後に、コロイドカーボン静注し、その沈着によりマクロ病変局在を確認した。左心室を心基部から心尖部にかけて縦割し、組織標本を切り出し、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キシン 43 発現を観察した。

C. 研究結果

心室期外収縮による 2 段脈は 75%、心室頻拍は 30%に見られた。僧帽弁逆流エコーは 35%の例に確認された。

左心室基部では 80%の例に病変があり、乳頭筋乳頭部も含む心基部は心尖部に比して高度かつ広汎な病変を見た。組織学的に心筋細胞障害（単一心筋細胞障害およびその集合像）が見られ、刺激後 1 週後例では同部の間質に線維化、血管透過性亢進（墨汁沈着）を見た。僧帽弁も急性期に出血を伴う水腫性変化を呈した。電気刺激直後剖検例の心筋障害部位付近では介在板でのコネキシン 43 発現は減少していたが、刺激後 1 週後例の心筋障害近接部位では他の部位と同様程度のコネキシン 43 発現が認められた。

D. 考察

たこつぼ心筋症に見られる形態変化はカテコラミン心筋障害像に類似するが、障害を受けた心筋細胞が隣接する心筋細胞との結合を失い、障害心筋細胞数割合が心室部位により差のあることは循環カテコラミン増加による直接障害だけでは説明困難である。また、光学顕微鏡上検出される障害心筋細胞の程度は収縮不全を説明しえない。

心筋細胞障害の危険要素が、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、リスクに対応して（機能的？）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。

#### E. 結論

頸部迷走神経電気刺激により、心室に局在性をもつ病変が生じた。心基部に強い病変であり、ヒトの逆タコツボ現象に類似する。また、病変の偏在性は壁運動異常を形態学的に検討する貴重な実験系と考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

S, Kawai : Clinicopathology of Takotsubo (Ampulla) Cardiomyopathy in Japan. 2009 annual scientific session of Taiwan Society of Echocardiography. Journal of the Taiwan Society of Echocardiography 3(1) :31-32,2009.

河合祥雄：たこつぼ心筋症の診断と治療．Medical Practice 26(11):1859-1862,2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 免許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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

—拡張型心筋症における心機能と腎機能との関連

研究協力者：平敷安希博、大島景、因田恭也、坂東泰子、林 陸晴、室原豊明

名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座・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. 研究背景と目的

慢性心不全において、慢性腎臓病（CKD）の合併は、独立した予後不良因子の一つである。心不全患者における慢性腎不全の合併は、25%程度と報告されており、その割合は比較的高い。CKD は、心機能低下、心肥大をさらに惹起、増悪させ、心血管イベント発症率を増加させ、いわゆる“心腎連関”として最近の話題となっている。慢性心不全を対象にした心腎連関の研究はこれまでも多くなされているが、ほとんどの報告が虚血性疾患である心筋梗塞に伴うものであり、拡張型心筋症（DCM）の慢性心不全における心腎連関に関する報告は少ない。また CKD 合併患者は、左室の拡張機能障害を認めると報告されているが、心臓超音波検査による報告が多く、心臓カテーテル検査により直接評価した報告は少ない。従って、CKD の合併した拡張型心筋症（DCM）における、心機能および予後への影響は未だ明らかではないのが現状である。

本研究の目的は、DCM において、CKD の合併と心筋収縮能・弛緩能および予後との関連を明らかにすることである。

B. 研究方法

冠動脈造影検査にて虚血性心疾患が否定された、左室駆出率 50%未満の DCM 患者 135 例を、推算糸球体濾過量（eGFR）の値により、normal 群（eGFR > 90ml/min/1.73m<sup>2</sup>; 23 例）、mild CKD 群（60 ≤ eGFR < 90 ml/min/1.73m<sup>2</sup>; 70 例）、moderate CKD 群（eGFR ≤ 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>; 42 例）の 3 群に分類した。なお eGFR < 30 ml/min/1.73m<sup>2</sup> の高度 CKD 患者は除外した。マイクロメータ付きピッグテールカテーテルを用い、左室収縮能の指標として  $LVdP/dt_{max}$ 、弛緩能の指標として  $T_{1/2}$  を測定した。血液検査、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査の各種パラメータを比較検討し、心血管イベント発症の有無を後ろ向き（retrospective）に比較検討した。

C. 研究結果

moderate CKD 群では他の群と比較し、糖尿病の合併が有意に多く、血漿ノルアドレナリン、BNP 値が有意に高値を示した。 $LVdP/dt_{max}$  は、3 群間で有意差は認めなかったが、mild CKD, moderate CKD 群は normal 群と比較し、有意に  $T_{1/2}$  の延長を認めた。また、eGFR と  $LVdP/dt_{max}$  に相関は認めなかったものの、 $T_{1/2}$  には有意な相関を認め

た ( $P=0.005$ ) (図 1)。また多変量解析において、eGFR は  $T_{1/2}$  に影響を及ぼす独立した因子であった ( $p=0.039$ )。心イベントの発症の有無に関シ Kaplan-Meier 法で解析した結果、moderate CKD 群では、他の群と比較し心イベント発症率が有意に高かった ( $p=0.015$ ) (図 2)。

図 1

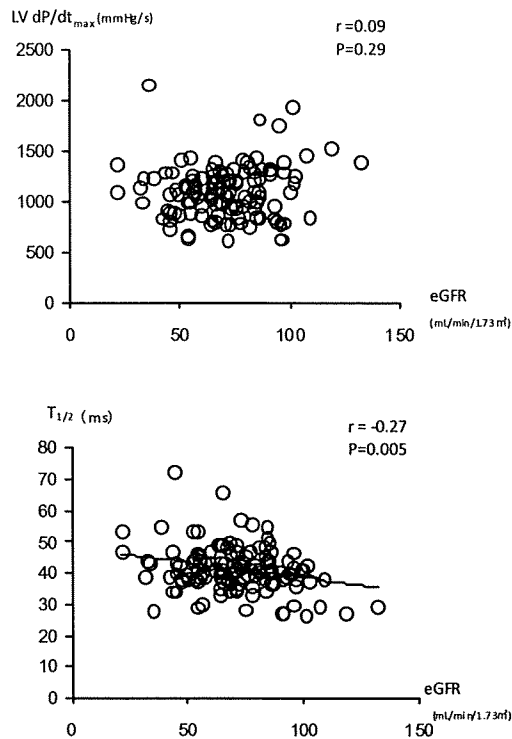
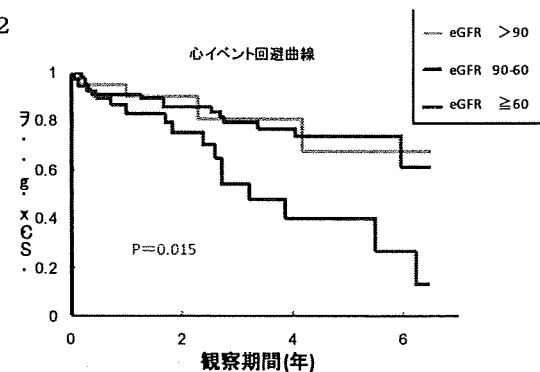


図 2



#### D. 考察

今回 DCM による慢性心不全患者において、軽症ないし中等度の CKD 患者における心機能と腎機能の関連性について、直接的なカテーテル挿入を用いた血行動態指標を用いて検討した。その結果、軽度の腎機能障害において、すでに左心室の弛緩（拡張）能障害が起きていることが示唆された。また、中等度の腎機能障害の合併により、予後に影響を及ぼすことも明らかにされた。CKD さらには心腎連関の話題はこれまでに欧米を中心にして報告が多くなされてきたが、今回日本人の慢性心不全患者でもその傾向

があることが確認されたことは意義深い。

#### E. 結論

DCM において、軽度の腎機能障害において、すでに心筋弛緩能障害に影響している可能性が示唆された。また、中等度の腎機能障害の合併により、予後に影響を及ぼすことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

Unno K, Isobe S, Izawa H, Cheng XW, Kobayashi M, Hirashiki A, Yamada T, Harada K, Ohshima S, Noda A, Nagata K, Kato K, 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; 30: 1853-1862.

Unno K, Shibata R, Izawa H, Hirashiki A, Murase Y, Yamada T, Kobayashi M, Noda A, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin acts as a positive indicator of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2009. (in press).

Miyagi M, Ishii H, Murakami R, Isobe S, Hayashi M, Amano T, Arai K, Yoshikawa D, Ohashi T, Uetani T, Yasuda Y, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Impact of renal function on coronary plaque composition. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009.

#### 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

—心筋組織リモデリングにおけるテネイシンCの役割—

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＞ 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

テネイシン C(TnC)は、多彩な生物活性をもち、組織構築の改変で重要な役割を演ずると考えられる。我々は、最近、拡張型心筋症同様、急性心筋梗塞患者でも、1)急性期の血中 TnC 濃度が高い患者はリモデリングをおこしやすく、予後が悪い、2)血中 TnC 値はリモデリングマーカーとして BNP と同程度に有用であり、両者を組み合わせると非常によい予後予測因子になることを見いだした。このことは、TnC が心室リモデリングに関与する重要な因子の一つであることを明らかに示唆するが、TnC が過剰にあるトリモデリングが促進するのか、リモデリングを促進するような種々の因子により反応性に TnC の発現が上昇するが、BNP 同様、本来心筋に対して保護的に作用しリモデリングを抑制する作用を持つものかは不明である。本研究では、TnC が左室リモデリング増悪因子なのか抑制機能持つのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. BALB/C 系オス 10 週令の野性型および TnC ノックアウトマウスの冠動脈を永久結紮して心筋梗塞モデルを作製し、28 日後の心エコー、血行動態、生存率、組織学的変化を比較した。また、一部は 1、3、5、7、14 日後

に心臓を摘出し、RT-PCR、Western Blot で TnC の発現を検討した。

2. CAG プロモーターとマウステネイシン C 遺伝子の間に lox ではさんだ stop を挿入したトランスジェニックマウスを作成した。このマウスと Nkx2.5 Cre-マウスを交配し、心臓特異的テネイシン C 過剰発現マウスを作成した。発現状況を免疫組織化学、Western Blotting で確認した。マウスを生後 64 週令まで飼育し心エコーによって心機能の評価を行った後、犠牲剖検して心臓を摘出し、組織標本作製、RNA 抽出を行った。

（倫理面への配慮）本研究の実験計画書は三重大学組換え DNA 実験安全委員会動物実験審査等委員会で承認を得た。遺伝子組み換え実験は安全確保のため P2 実験室で、遺伝子改変実験動物についても指定された管理区域内で行った。

C. 研究結果

野生型マウスの冠動脈永久結紮後、24 時間以内に TnC の mRNA, タンパクの発現が増加し、肉芽形成のおこる 3-5 日にピークになり、その後徐々に減少して 14 日には消失した。28 日後の癒痕形成期にはみられなかった。この治癒仮定で TnC 分子は、梗塞巣と残存心筋の境界に局在

した。TnC ノックアウトマウスで、組織修復、肉芽形成、癒痕形成は野生型と大差なく進行し、野生型マウスと 28 日目までの生存率、癒痕巣の大きさに有意な差はみられなかった。しかしながら、28 日目の心エコー、血行動態で、TnC ノックアウトマウスでは差室拡張が抑制され、駆出率、差室拡張終期圧、myocardial stiffness はの改善は野生型マウスより有意に良好であった。一方、心臓特異的テネイシン C 過剰発現マウスは少なくとも生後 64 週令まで問題なく生存し、心機能に変化は見られず、心肥大、線維化もみられなかった。しかし、このマウスの心筋組織の一部を電気メスで凝固壊死をさせるとその修復過程を過剰発現マウス心臓では傷害部位に接する心筋間質の線維化が促進される傾向がみられた

#### D. 考察

これまでの我々の分子機能解析により明らかにしたように、TnC は多彩な生物活性をもつ。例えば種々の細胞に作用し、MMP の発現、活性をあげ、炎症反応を増強する。これらの機能は傷害を受けた組織を除去し、組織再構築容易にする反面、組織の脆弱性をきたし、心室拡張をきたしうる。また、TN-C は筋線維芽細胞の動員、収縮力を増強するという作用をもち、創傷治癒、癒痕収縮を促して心室の拡張を防ぐ反面、線維化を促進して拡張能の低下をきたしうる。従って、理論的には、TN-C は心室リモデリングに対して促進的、抑制的な両面性をもつ。TnC ノックアウトマウスの心筋梗塞モデルでは、左室リモデリングが抑制されることから、TnC は左室リモデリングの増悪因子として働くと考えられた。しかしながら、TnC を心臓に過剰発現させるだけでは明らかな変化は認められないことから、TnC 分子が直接単独でリモデリング作用を示すのではなく、組織損傷に対する炎症などの反応を続伸するために、リモデリングを増悪させる可能性が考えられた。

#### E. 結論

TnC は、新しい心リモデリング予測マーカーとして、心不全患者の予後予測や治療法の最適化のために有用であるとともに治療標的分子になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Nishioka T, Onishi K, Shimojo N, Nagano Y, Matsusaka H, Ikeuchi M, et al. Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;298:H1072-1078,2010
2. Fujimoto N, Onishi K, Sato A, Terasaki F, Tsukada B, Nozato T, et al. Incremental prognostic values of serum tenascin-C levels with blood B-type natriuretic peptide testing at discharge in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure. *J Card Fail.* 15:898-905, 2009.
3. Shirai M, Imanaka-Yoshida K, Schneider MD, Schwartz RJ, Morisaki T. T-box 2, a mediator of Bmp-Smad signaling, induced hyaluronan synthase 2 and Tgfbeta2 expression and endocardial cushion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18604-18609,2009
4. Suzuki H, Kanamaru K, Suzuki Y, Aimi Y, Matsubara N, Araki T, et al. Tenascin-C is induced in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats and humans: a pilot study. *Neurol Res.*32:179-184,2009
5. Tsukada B, Terasaki F, Shimomura H, Otsuka K, Katashima T, Fujita S, et al. High prevalence of chronic myocarditis in dilated cardiomyopathy referred for left ventriculoplasty: expression of tenascin C as a possible marker for inflammation. *Hum Pathol.* 40:1015-1022.,2009

##### 学会発表

1. Imanaka-Yoshida, K. *Tenascin C as a Target for Regulation of Cardiac Remodeling*. Keystone Symposia: Cardiovascular Development and Repair. 2010年2月28日—3月5日, Keystone, Colorado, アメリカ合衆国
2. Ando K, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y. Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development. American Society for Cell Biology Meeting 49<sup>th</sup> Annual Meeting. 2009年12月5日—12月9日, San Diego, California, アメリカ合衆国
3. 今中恭子、廣江道昭. 細胞外マトリクステネイシン C による線維化・炎症・免疫反応の制御. 第13回日本心不全学会学術集会. 2009年10月30日—11月1日. 福岡
4. Hiroe M, Satoh A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Incremental Utility of Serum Tenascin-C and Plasma BNP Levels as Cardiac Biomarkers for Predicting Prognosis and Cardiac Events After Acute Myocardial Infarction and Successful Coronary Intervention, Basic Cardiovascular Science Conference 2009, 2009年7月20日—7月23日, Lake Las Vegas, Nevada アメリカ合衆国

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし