

PPCM



Contact	
Laboratory Hilfiker-Kleiner (PPCM-Registry)	Phone +49-(0)511-532-6054 or -3270
Hannover Medical School (MHH)	
Clinic for Cardiology and Angiology	OE 6887
Carl-Neuberg-Str. 1	K5-02-3100
30625 Hannover	
Germany	
Contact persons:	Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner (-2531), head Dr. Edith Podewski (-2533), therapy Dr. Dieter Fischer (-4666), therapy Benedikta Ritter, Study Nurse (-6054 or -2534), transport Stud. med. Saida Labidi (-3270), data collection PPCM@MH-Hannover.de www.mh-hannover.de/10294.html

PPCM-therapy with bromocriptine
<ul style="list-style-type: none"> ➤ ACE-inhibitors ➤ β-blocker ➤ Further medication against heart failure, e.g. diuretics, aldosterone antagonist... ➤ Bromocriptine (first 2 weeks 2x 2.5 mg per day, subsequently 6 weeks 1x 2.5 mg per day) ➤ Heparin, low molecular (e.g. Fragmin P/Fragmin P forte) with bromocriptine therapy. When EF < 35% complete heparinisation (e.g. 2x weight adapted Clexane – cave, if impaired renal function: Anti-Xa-level-controls or Marcumar with INR < 2:5 with Bromocriptine).

Protocol for bromocriptine-study: Evaluation and visit schedule

Screening/Follow-up visit number	1	2	3	4
Week/Month after inclusion	W 0	M1	M2	M6
Inclusion/Exclusion criteria	X			
Information & Informed consent	X			
Medical history	X	X	X	X
Physical examination	X	X	X	X
NYHA class	X	X	X	X
ECG	X	X	X	X
Vital signs	X	X	X	X
Laboratory test*	X	X	X	X
Echocardiography	X	X	X	X
Biomarker profile	X	X	X	X
MRI	X			X

*Diff BB, K, Na, creatinine, Hst, CK, TNT, glucose, GOT, GPT, gamma GT, CRP, prolactin, TSH, NT-proBNP



16kDa PRLの周産期心筋症への関与

分担研究者 石田充代 明治大学農学部生命科学科

研究要旨

周産期心筋症患者において、酵素切断を受けたプロラクチン（PRL）であるVasoinhibinsが心筋障害に関与するという報告がある。

よって本研究では、周産期心筋症だけでなく心疾患合併産褥において Vasoinhibins が心機能増悪に関与しているのか、あるいは Vasoinhibins によって実際に心筋症を発症するのかというという課題に取り組むための基礎データと、周産期心筋症・心疾患合併妊娠・妊娠高血圧症候群症例における測定方法の確立を試みた。その結果、正常分娩マウスにおける Vasoinhibins の変化と Bioanalyzer を用いた血清における Vasoinhibins の測定に成功した。

A. 研究目的

プロラクチン(Prolactin : PRL) は、哺乳類の授乳には欠かすことが出来ない23kDa のペプチドホルモンである。しかしながらPRLには様々なバリエーションが存在し、それぞれが独自の機能を持つ。

メキシコ大学のCarmen Clapp らは、PRL がN末端を含む16kDaに切断されることを発見して以来、これらの研究を精力的に行い、16kDa PRL が抗血管新生因子としての機能を有し、成長性因子の活性阻害、プロテアーゼ産生阻害、内皮細胞アポトーシス促進といった作用を通じて血管新生を阻害することを報告している[1]。また、16kDaを始めとする、プロテアーゼ切断を受けたPRLを Vasoinhibinsと命名している。

このような背景のもと、2007年、周産期（産褥性）心筋症患者において、Vasoinhibinsが心筋障害に関与するとの報告がなされた[2]。また、妊娠高血圧症候群患者においても、Vasoinhibinsが発現しているとの報告があり[3]、妊娠高血圧症候群と周

産期心筋症も密接に関わっていることから、これらに共通の病因・病態として、Vasoinhibinsの関与がクローズアップされてきている。

周産期心筋症は、拡張型心筋症に類似した病態を示す特異な心筋症である。1990年～2002年のアメリカ全土では1/3189出産と非常に多く、国家規模の調査や対策が進められている。わが国においてはこれまでその疾患概念すら周知されていなかった。しかし、神谷らにより全国調査が進められ、2009年5月末までに73例の症例が集まり以下のようなことがわかってきた明らかになってきた[4]。

1. 日本における発症は約1/2 万出産
2. 発症年齢 32.3 ± 4.0 歳
3. 約 5%が母体死亡、約6 割が心機能を回復
4. 合併症関連では妊娠高血圧症候群(妊娠中毒症) 40%、多胎15%、子宮収縮抑制剤使用14%

そこで、本研究では、以下の二点を研究目的とした。一点目は、心疾患合併産褥において Vasoinhibins が心機能増悪に関与しているのか、

あるいは Vasoinhibins によって実際に心筋症を発生しうるのかという課題にアプローチするマウスを用いた基礎研究の構築を行う。

二点目は周産期心筋症・心疾患合併妊娠・妊娠高血圧症候群症例において、Vasoinhibins の血中濃度測定あるいはその切断酵素であるカテプシン D (CD) の酵素活性の測定方法を確立し、臨床経過と照合して、PRL 分泌ひいては母乳授乳の安全性を検討する。

B. 研究方法

マウスを用いた基礎研究の構築

①、②、③、④共に動物は当研究室で飼育・繁殖している ICR マウスを使用した。暗期・明期共に 12 時間周期、一定温度 (22±2°C) で明治大学農学部実験動物施設において自由給水・自由給餌 (ラボ MR ブリーダー) により飼育した。用いたマウスはすべて出生日を生後 0 日とし、生後 105 日前後のものを用いた。交配は生後 84 日で行い、未経産 (VG) 分娩日 (L0)、分娩後 10 日 (L10) とした。

屠殺はカリウム尾注による心停止誘発により行い、その後、心臓を摘出した。

① マウス心重量測定

麻酔後に体重を測定し、屠殺後に心臓と脛骨を摘出した後に計測した。

② N-PRL Ab による心臓の免疫組織化学

解剖後に摘出した心臓は、ブアン固定液にて 2 時間浸漬固定し、パラフィン包埋後に 6μM に薄切した。Vasoinhibins の検出には、一次抗体として当研究室で作成した chicken anti-mouse PRL antibody (Can Get Signal (TOYOBO) にて 10000 倍希釈) を用いた。この抗体を N-PRL Ab と称す。二次抗体は Cy3 conjugated rabbit anti-chicken IgG (Can Get Signal にて 500 倍希釈) を使用した。

毛細血管の検出には fluorescein griffonia simplicifolia lectin I, isolectin B4 (250 倍希釈) を使用した。核は DAPI で対比染色した。

③ N-PRL Ab による心臓の Western Blotting

解剖後に摘出した心臓からタンパクを抽出した後に、2-D Quant Kit (GE healthcare) にて定量した。その後、40μg に調整した各心臓サンプルを 15%SDS-PAGE にて泳動した。続いて、CBB 染色および PVDF メンブレンに転写後に Western Blotting (WB) を行った。PRL の検出には、一次抗体は免疫組織化学と同様の抗体を用い、二次抗体には HRP conjugated goat anti-chicken IgG (100000 倍希釈) を使用した。シグナルは Immobilon Western (Millipore) を用いた化学発光にて、ルミノイメーリアライザー LAS4000 (FUJIFILM) によって検出した。WB の定量化を示すグラフは LAS4000 で計測した Arbitrary Unit をもとに作成した。

④ 心臓における PRL、PRL レセプター (PRLR)、CD の RT-PCR

解剖後に摘出した心臓より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、ReverScriptR IV (和光純薬) にて cDNA 作成、2×GoTaq Green (Promega) を用いて PCR を行った。PCR は iCycler (BIO RAD) にて、95°C 4 分、95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 40 サイクル、72°C 7 分とした。各伝子プライマーを表 1 に示す。GHPDH はポジティブコントロールとして用いた。

	Foward	Reverse	size
GAPDH	CACCCAGAAGACTGTGGA	TGTTGAAGTCGAGGAGA	313bp
CD	CGTCTTGATACTGGGCTCT	GCCCTTGACTGGTCAGACTT	219bp
PRL	CTGCCAATCTGTTCCGCTG	ACTCGAGGACTGCACCAAAC	270bp
PRLR	AAGCCAGACCATTGGATACTGGAG	AGCAGTCTTCAGACTTGCCCTT	253bp

表 1 PCR に使用したプライマー配列と PCR 産物のサイズ

ヒト血清を用いた周産期心筋症の指標確立

①、②共に、国立循環器病センターにより採取された血清を、凍結保存し明治大学に輸送したものをを用いた。

① Vasoinhibins の濃度測定

血清 50 μ L をプロテアーゼインヒビター入り PBS400 μ L と 50 μ L プロテイン A アガロースと 1 時間 4 $^{\circ}$ C にてインキュベートする。次に、30 秒間 3800g、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行い、上清を回収し 15 μ L の Anti-hPRL Monoclonal Antibody-Clone 5602 (Diagnostics Biochem, Canada) と 6 時間 4 $^{\circ}$ C にて反応させた。なおこの抗体は、やはり Vasoinhibins が原因の一つであると言われている糖尿病網膜症の検体血清において、Vasoinhibins 測定に用いられた抗体と同様のものである [5]。さらに、50 μ L のプロテイン G アガロースを加え 16 時間 4 $^{\circ}$ C にて反応させる。最後に 5 分間 3800g、4 $^{\circ}$ C にて遠心を行い、上清を除去した後にペレットを 25 μ L PBS に再溶解した。アジレント社の Bioanalyzer を用いた解析は、同社の Protein 80 Kit (PN:5067-1515) の指示通りに行った。

② CD の酵素活性測定

血清 10 μ L を SensoLyte 520 Cathepsin D Assay Kit (ANA Spec) のメーカーが示す方法に従って使用した。この方法は、ドイツの Hilfeler-Kleiner が用いた方法 [2] と同様である。また、今回は解析方法の確立が目的であるため、検体 No.1 ~30 の中から乱数を用いて 10 体抽出し活性を測定した。その後、血清中に含まれる CD の推定濃度を算出した。測定は、3 回行い、平均値、標準誤差からグラフを作成した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立循環器病センター倫理委員会にて、平成 24 年 3 月 31 日までを実施期間と

して実験許可を得た。以下にその内容を示す。

本研究は、厚生労働省・文部科学省の「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年 7 月 31 日)」に従って作成されている。事前に本研究の主旨を、被験者に十分に説明したうえで実施する。また、得られたいかなる個人情報についても秘密が厳守されることを保証する。検体検査を分担する明治大学農学部においては、匿名化し、検体番号のみで識別された検体を使用する。得られたデータは匿名化して保存し、統計結果を公開する際には、個人が特定されない項目を集計・解析したもののみ、発表する。

疾患症例に於いては、通常の採血・尿検査と同時に検体採取する予定であるが、コントロールである正常例に於いては、採血検体を頂くため、侵襲を加えることとなる。それ以外の不利益は特にないと考える。

対象疾患

1. 心疾患合併妊娠症例 50例
2. 妊娠高血圧症候群症例 30例
3. 周産期心筋症症例 10例
4. コントロールとしての正常妊娠症例 10例

研究方法

1. 心疾患合併妊娠症例:妊娠後期・分娩後・産褥 1ヶ月
2. 妊娠高血圧症候群症例:当院入院時・分娩後・産褥1ヶ月
3. 周産期心筋症症例:当院入院時(・分娩後・産褥1ヶ月・抗プロラクチン療法施行時・施行後)・退院時・退院後1ヶ月
4. コントロールとしての正常妊娠症例:妊娠後期・分娩後・産褥1ヶ月

上記タイミングで患者体重・血圧・心拍数のデータを収集し、血清・24時間尿検体を採取して、下記項目を計測する。疾患症例(1~3)において

は、同じタイミングで心臓超音波検査を施行する。
また、同意を得られた症例では、分娩後と産褥1ヶ月に母乳も採取する。

検体検査項目

血清：プロラクチン (23kDa, 16kDa)、カテプシンD活性、トロンビン、MMP、oxLDL、MnSOD、BNP、hANP、カテコラミン3分画、レニン、アンギオテンシン I・II、アンギオテンシノーゲン、エストロゲン (E2,E3)、プロゲステロン、オキシトシン、AST、ALT、LDH、BUN、Cr、UA、PLT、RBC、Hb、Ht

尿中：プロラクチン (23kDa, 16kDa)、カテプシンD活性、トロンビン、MMP、TP

母乳中：プロラクチン (23kDa, 16kDa)、カテプシンD活性、トロンビン、MMP、TP

C. 研究結果

マウスを用いた基礎研究の構築

① マウス心重量測定

VG、L0、L10 日齢メスマウスの体重、心臓重量、脛骨長を測定した (表 2)。また、心臓重量/脛骨長 (mg/mm) を計算したところ、その値は $VG < L0 < L10$ と増加することが明らかになった。一方、心臓重量/体重 (mg/g) の値は L0、L10 よりも VG の方が高くなることがわかった (表 2, 図 1-1,2)。

	BW	HW	BL	HW/BW	HW/BL
VG mean	30.02	128.7	17.82	4.317	7.212
L0 mean	39.86	157.77	17.95	3.968	8.79
L10 mean	45.07	184.27	18.52	4.053	9.93
ALL mean	38.32	156.91	18.09	4.113	8.644

表 2 BW=体重 (g), HW=心臓重量 (mg), HW/BW=心臓重量/体重(mg/g)

BL=脛骨長(mm), HW/BL=心臓重量/脛骨長(mg/mm)

n=6

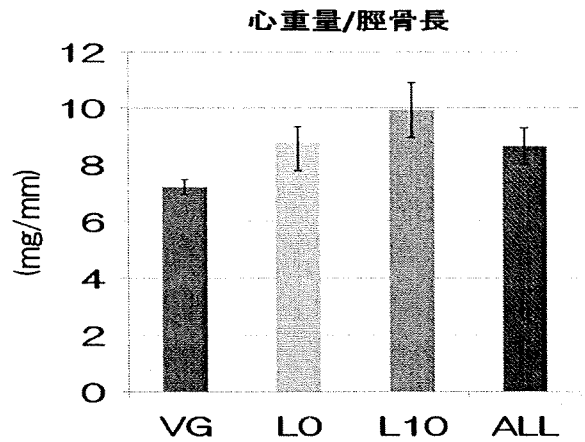


図 1-1 心重量/脛骨長 mean±SE n=6

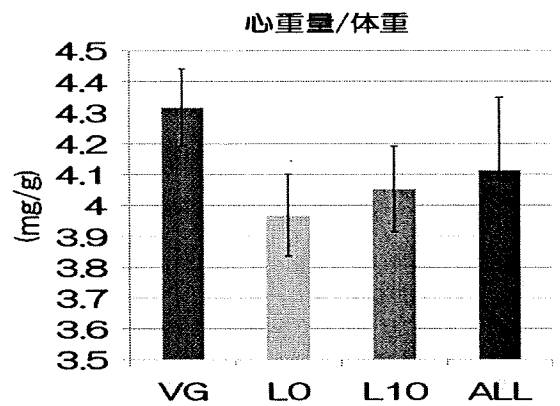


図 1-2 心重量/体重 mean±SE n=6

② N-PRL Ab による心臓の免疫組織化学

Vasoinhibins は心臓組織に局在しているのか、そしてそれはどこなのかを明らかにするために免疫組織化学を行った。その結果、毛細血管および心筋細胞に Vasoinhibins が局在していることがわかった。また、その局在数をカウントしたところ、心筋細胞内よりも毛細血管にて一致が多くみられた。日齢による局在箇所の違いはみられなかった (図 2)。

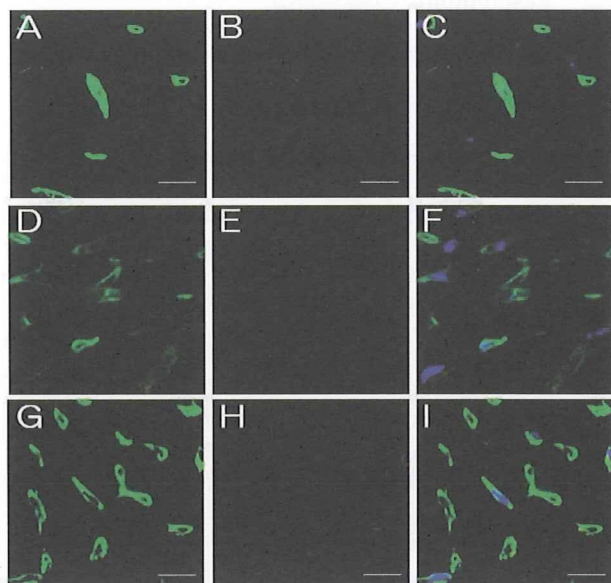


図 2

赤 1st:Ab N-PRL Ab
 2nd: Ab Rabbit-anti Chicken Cy3
 緑 毛細血管 Isolectin B4
 青 核 DAPI
 A~C = V、D~F = LO、G~I = L10 bar=10 μ m
 A, D, G Isolectin B4 B, E, H N-PRL Ab C, F, I merge

③ N-PRL Ab による心臓の WB

免疫組織化学において、心臓に Vasoinhibins が局在することは示された。よって次に、その量的変化を調査する目的で WB を行った。その結果、VG と比較して、授乳期には Vasoinhibins 量が増加し、授乳期もその増加が維持されることが明らかになった(図 3-1,2)。

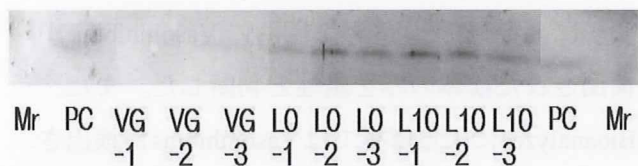


図 3-1 N-PRL Ab による心臓の Western Blotting
 泳動タンパク量 40 μ g, 15% SDS-PAGE, 1st:Ab N-PRL Ab, 2nd: Ab HRP conjugated goat anti-chicken IgG

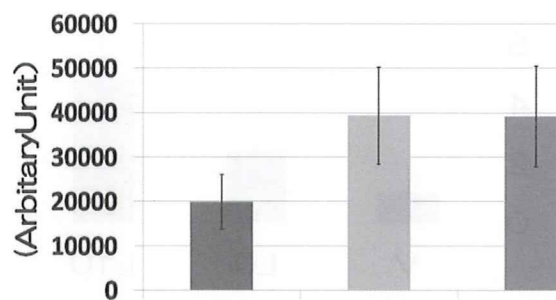


図 3-2 グラフは LAS4000 で計測した Arbitrary Unit を基に作成 mean \pm SE n=3

④ 心臓における PRL、PRL レセプター (PRLR)、CD の RT-PCR

免疫組織化学、WB にて、心臓における Vasoinhibins の存在が確認された。

よって次に、この Vasoinhibins が本来の PRL 産生細胞がある下垂体由来なのか、それとも異所的に心臓で発現したものなのかを解明するために、RT-PCR を行った。また、同時に PRLR と、PRL 切断酵素である CD の発現も同定した。その結果、PRLR、CD 共に日齢に依存せず、高濃度で均一な発現が見られた (図 4-1)。一方で PRL 発現はほとんど見られなかった (図示せず)。

しかしながら、バンドに相当する部位の定量化を行ったところ、非常に低濃度ではあるが、心臓において PRL が発現していることが明らかになった。また、その濃度は V < LO < L10 と増加していることがわかった (図 4-2)。

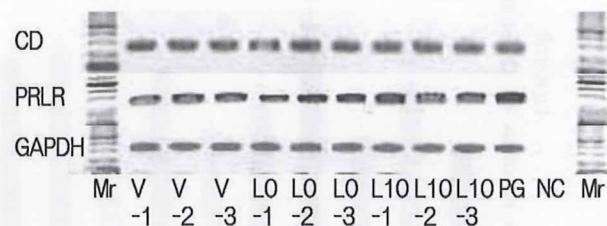


図 4-1 V, LO, L10 各 3 サンプルの CD, PRLR, GAPDH の PCR

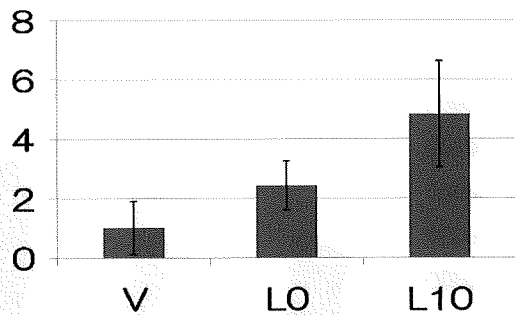


図4-2 PRLのPCR結果を同サンプルのGAPDH量を基準値としてグラフ化した。Vの発現量を1として示す。Mean±SEM n=3

ヒト血清を用いた周産期心筋症の指標確立

① CDの酵素活性測定

周産期心筋症の指標確立を目的として、CDの酵素活性測定を、検体の血清を用いて行った。

CDはPRLの切断酵素の代表であり、酸化ストレスにより心筋症においてリソソームから細胞質へのCD分泌が促進されるであろうことが予想される。CD酵素活性測定は少なくとも一つの検体に対し3回繰り返して実験を行った。

その結果、検体によってCD酵素活性に差があることを同定した。しかしながら、その結果は再現性があるとは言い難く、コントロールにおいてもCD酵素活性測定が高いなど、課題の残る結果となった(図5)。

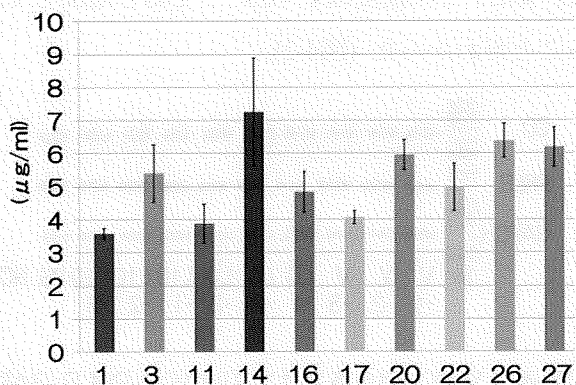


図5 CD活性測定表3をグラフ化 Mean±SEM n=3

② Vasoinhibinsの濃度測定

次に、検体の血清を用いてVasoinhibinsの濃度測定を試みた。Vasoinhibinsは本来のPRLと比べると極めて発現量は低く、その構造上、抗体を用いてPRLを検出せずに、Vasoinhibinsだけを検出することは極めて難しく酵素免疫測定法などは適さない。

そこで我々はまず、WBによるVasoinhibins検出を試みた(図示せず)。しかしながらその結果にはいくつかの問題が生じた。まず、VasoinhibinsはWBで検出されるものの、結果の再現性が不安定であった。次に、主要なVasoinhibinsと考えられる16kDa PRL以外にも多数の切断PRLが検出され、発光強度による定量化が難しいという問題であった。

よって、我々はWB以外の方法でVasoinhibinsの濃度および種類を測定する方法としてVasoinhibins抗体にて免疫沈降を行った後、アジレント社のBioanalyzerを用いることにした。Bioanalyzerは、レーザー励起蛍光法により生体分子を検出する。LabChipの調製の際に、まずゲルに専用の蛍光色素を混ぜ、このゲル-蛍光色素混合物をLabChipのチャンネルに充填して使用する。分析運転中には、蛍光色素がSDSミセルと結合し発光し検出を可能にする。

その結果、PRLはコントロールを含むどの検体においても検出された。測定は必ず、一つのサンプルに対し2回の免疫沈降とバイオアナライザによる測定を行い、2回共にVasoinhibinsが検出された検体のみを陽性と判断した。また、Bioanalyzerによる解析ではVasoinhibinsが検出されていないものの、ごく微量のVasoinhibinsが発現していたものも目視にて確認した。目視で確認したものには濃度が記載されていない(表3)。同時に、国立循環器病センターより送付された合

併疾患等の情報を表 5 に示す。また、検出された波形の例として、2 回共に Vasoinhibins が

検出された Sample No10 と、Vasoinhibins が検出されなかった Sample No 6 を図 6,7 にそれぞれ示す。

SampleNo	P 1st			P 2nd		
	Vasoinhibins分子量	Vasoinhibins濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PRL濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Vasoinhibins分子量	Vasoinhibins濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PRL濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	178	327	793			
2	174		356			
3	168		1774			
4	123/178		159	122/176	40*53	542
5	121/174		16			
6	119/149	809*51.1	1086	123	75	432
7			136			
8	121	283	1473	124	205	69.7
9	176		2776			
10			502			36.7
11	124/176	49.1*663	510.1	125/17.7	11.4*228	141.4
12			244			156.1
13	175		28.7			
14	174		37			
15	105/166	41.1*158	1052			
16	122/142	10.3*338	552	121/178		425
17	124	509	384			
18	176/113		520.3	17.7		
19	123	126	122.1			
20	119/175	165.2*90.9	3625.9	17.6		300.1
21	103	27.1	98.8			
22	166		77			
23	125/178	88	56	124	7	25.5

表 3 Bioanalyzer による Vasoinhibins 測定

左は 1 回目の結果、右は 2 回目の結果を示す。「Sample No」は表 8 とリンクしている。「Vasoinhibins 分子量」は、23kDaPRL 以下の検出された分子量を示す。「Vasoinhibins 濃度」は検出された Vasoinhibins の濃度を $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。空欄は非常に微量で濃度測定は不可能だったものを示す。ブルーは 2 回の解析共に Vasoinhibins が検出されなかったものを示す。ピンクは 2 回の解析共に Vasoinhibins が検出されたものを示す。ただし、色の薄いピンクについては、その量が微量で、目視で確認したものを示す。ホワイトは 2 回の解析が終了していない検体である。

No	合併疾患	BNP	PRL	産褥 BNP	産褥その他
1	心筋炎後 産褥 1 週間	<4.0	261.43	5.5	甲状腺機能亢進、内服開始
3	MR 産褥 1 週間	34.3	113.71	104.5	心不全増悪、利尿剤開始
4	MR 産褥 1 週間	16.9	-	-	
5	Ebstein 産褥 1 週間	4.4	195.62	11.4	PSVT 頻発⇒ABL
6	MR 産褥 1 週間	19.1	162.24	38.3	1 ヶ月で母乳でなくなる
7	ASD closure 後 産褥 1 週間	14.9	98.28	21.5	
8	AR, VSD 産褥 1 週間	10.7	323.49	-	
9	PPCM 既往、妊娠中期	7.9	73.77		
10	Mr 産褥 1 週間	11.2	87.32	-	
11	VSD 術後 small VSD	48.2	258.06	-	
12	VSD 産褥 1 週間	22.7	109.92	44.5	
13	c TGA 産褥 1 週間	34.1	208.02	29.1	
14	VSD 産褥 1 週間	56.2	264.76	12.7	
15	MR 産褥 1 週間	13	363.61	13.2	
16	severe DCM, D&C 翌日	429.5	62.41		採血後よりテルロン内服
17	ASD/VSD 術後、mild PS 産褥 1 週間	28.7	388.07		

表 4 国立循環器病センターより提供された検体情報を示す。Sample No は表 4 とリンクしている。

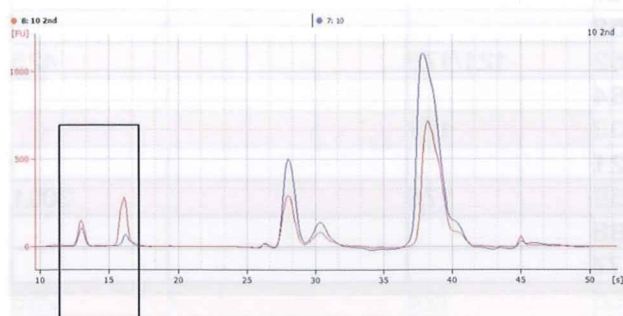


図 6 Sample No10 の波形。赤は 1 回目、青は 2 回目の解析結果。共に 16kDa 付近にピークが検出された。

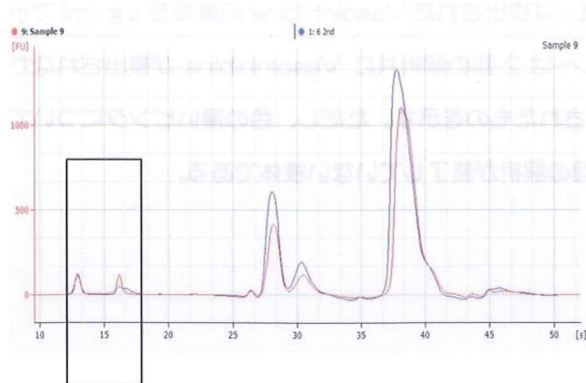


図 7 Sample No6 の波形。赤は 1 回目、青は 2 回目の解析結果。共に 16kDa のピークは小さい。

D. 考察

本研究の一点目の研究目的は、心疾患合併産褥において Vasoinhibins が心機能増悪に関与しているのか、または Vasoinhibins によって実際に心筋症を発症するのかという課題にアプローチするための、マウスを用いた基礎研究の構築であった。

今回の結果より、心臓重量/脛骨長(mg/mm)は $VG < L0 < L10$ と増加していた。また、Vasoinhibins は毛細血管および心筋細胞に局在し、Vasoinhibins タンパク量は VG と比較して授乳期には増加することが明らかになった。さらに、PRL は異所的に心臓で、非常に低濃度ではあるが、発現しておりその濃度は $V < L0 < L10$ と増加していた。

このことは、妊娠期でなくとも Vasoinhibins は心臓の毛細血管および心筋細胞に局在しているが、その量は妊娠および分娩の際には増加することを示している。これは心疾患合併産褥でない、正常妊娠、分娩においても Vasoinhibins が血管新生阻害因子として機能していると考えられる。ま

た、妊娠、分娩に伴い、異所性 PRL 発現が上昇するのは非常に興味深い。この増加した PRL が本来の PRL として機能しているのかその後切断を受けて Vasoinhibins として機能しているのかは、mRNA 発現からは解析できない。しかしながら、WB において Vasoinhibins が授乳期に増加することから考えると、心臓における異所性 PRL は Vasoinhibins として機能していると考えられるべきだろう。

二点目の研究目的は周産期心筋症・心疾患合併妊娠・妊娠高血圧症候群症例において、Vasoinhibins の濃度測定あるいはその切断酵素である CD の酵素活性の測定方法を確立することであった。

しかしながら、先に解析を進めていた CD 酵素活性測定の確立では、有意義な結果が得られなかった。そもそも、CD の本来の機能は PRL 切断だけではない。CD はほとんどの細胞に存在し、リソゾーム蛋白分解系における必須の酵素である。また、CD ノックアウトマウスの解析では 1) 生後発育が 14 日以降で急速に遅滞し生後 26±1 日で死に至り、(2) リンパ系組織が退縮し、(3) 死亡時には小腸領域に限局した広範な壊死を伴い、(4) CD ノックアウトマウスの線維芽細胞株では蛋白分解能の低下は認められないということがわかっている。よって CD 酵素活性が周産期心筋症・心疾患合併妊娠・妊娠高血圧症候群症例と直結しないのではないかと考えられる。しかしながら、Dr. Hilfeler-Kleiner D らの結果では周産期心筋症患者において CD 活性が優位に高いことが示されており、技術的改善が必要なのかもしれない。

次に我々は、Triebel J らが行った糖尿病網膜症の検体血清による Vasoinhibins 測定と同様の方法を試みることにした。つまり、Vasoinhibins を認識するペプチド抗体にて免疫沈降を行い

Bioanalyzer にて解析する方法である。

その結果、Vasoinhibins が検出される検体とされない検体があることがわかった。我々は測定した Vasoinhibins 濃度と国立循環器病センターより提示された症状との相関を思索したが、相関を解明するには至らなかった。しかしながら、周産期心筋症以外の心疾患にも Vasoinhibins が関与している可能性は示唆された。また、Bioanalyzer による解析は完全に確立されたわけではない。例えば、Vasoinhibins 認識抗体において免疫沈降を行っているにも関わらず、IgG とと思われる 37kDa 付近のタンパク質は完全には取り除けていない。また、Vasoinhibins の量がどれくらいになったら患者は授乳を止めるべきなのかを提示するためにも、その発現量というのが重要になってくる。我々がこれまでに行った解析では Bioanalyzer 解析ソフトは Vasoinhibins に相当する部位にタンパク質は発現していないと表示するが、目視で拡大して見て行くと、少量ではあるが Vasoinhibins が発現しているといった検体も見られた。今後サンプル数を増やすことで、どれくらいの Vasoinhibins が発現したら患者は授乳を中止するといったガイドラインを決定できるであろう。

E. 結論

正常分娩マウス心臓において Vasoinhibins は毛細血管で多く発現しており、一部は下垂体由来でなく心臓由来と示唆された。これらの結果は今後、心疾患合併産褥において Vasoinhibins が心機能増悪に関与しているのか、または Vasoinhibins によって実際に心筋症を発症するのかという課題にアプローチするための重要な基礎データとなる。また、Bioanalyzer を用いた血清における Vasoinhibins の測定に成功した。

引用文献

- [1] Clapp C et al. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. Trends Endocrinol Metab. 17 (8): 301-307. 2006
- [2] Hilfiker-Kleiner D et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates post partum cardiomyopathy. Cell. 9; 128 (3): 589-600. 2007
- [3] Carmen Gonza'lezl et al. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia Lab Invest. 87 (10):1009-1017. 2007
- [4] 神谷千津子。周産期心筋症について - 最近の知見から 心臓 41(4): 395-400.2009
- [5] Triebel J, et al. Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. Eur J Endocrinol. 161 (2): 345-353. 2009

F. 健康危険情報

「特になし」

G. 研究発表

1. 論文発表

「該当なし」

2. 学会発表

1. M. Suzuki, Y. Takata, S. Fukuta, M. Ishida, T. Harigaya Analysis of 16kDa prolactin in the mouse mammary gland The Endocrine Society's 91th Annual Meeting ワシントン DC USA 6月 10-13 日 2009 年
2. 鈴木 美香、前原 みどり、柳澤 悠、祖父江 健一、高田 有希子、石田 充代、針谷 敏夫 退行期マウス乳腺における 16kDa PRL機能の解析 第 24 回下垂体研究会 青森 8 月 27-29

日 2009 年

3. 柳澤 悠、祖父江 健一、石田 充代、針谷 敏夫 停留睾丸マウス精巣における 16kDaPRL機能の解析 第 24 回下垂体研究会 青森 8 月 27-29 日 2009 年
4. 鈴木 美香、前原 みどり、柳澤 悠、祖父江 健一、杉本 皓司、高田 有希子、石田 充代、針谷 敏夫 退行期マウス乳腺における 16kDa PRL 機能の解析 第 102 回日本繁殖生物学会 奈良 9 月 10 日-12 日 2009 年
5. 前原 みどり、柳澤 悠、渡部 皓太、鈴木 美香、石田 充代、針谷 敏夫 マウス退行期乳腺における 16kDa PRL の機能解析 第 109 回日本畜産学会大会 東京 3 月 27-29 (発表予定)
6. 中嶋 亮順、前原 みどり、鈴木 美香、石田 充代、針谷 敏夫 マウス周産期心臓における 16kDa PRL の解析 第 109 回日本畜産学会大会 明治大学 3 月 27-29 (発表予定)
7. 柳澤 悠、嶋田 政史、祖父江 健一、石田 充代、針谷 敏夫 停留精巣モデルマウスにおける 16kDa プロラクチンの機能解析 第 109 回日本畜産学会大会 東京 3 月 27-29 (発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

「該当なし」

2. 実用新案登録

「該当なし」

3. その他

研究協力者 鈴木美香

Ⅲ.学会発表資料

第4回 国立循環器病センター 周産期科サマーセミナー

2009年7月

国立循環器病センター 周産期治療部

プログラム

7月25日(土) 座長 池田 智明

開会 15:25
講演1. 「妊娠関連の脳血管障害に対する現状と対策」 15:30~16:00
講師: 大分大学 地域医療・産婦人科 教授 吉松 淳

講演2. 「当センターの産科出血に対する戦略」 16:00~16:30
講師: 埼玉医科大学総合周産期母子医療センター
母体胎児部門 講師 村山 敬彦

休憩 16:30~16:40

講演3. 「産褥心筋症: 全国アンケートの結果」 16:40~17:10
講師: 国立循環器病センター 周産期科 医師 神谷 千津子

講演4. 「科学的根拠に基づく胎児治療: TTTSに対するレーザー治療と
重症胎児胸水に対する胸腔-羊水シャント術」 17:10~17:40
講師: 国立成育医療センター 周産期診療部 部長 左合 治彦

質疑応答(夕食(弁当)) 17:40~18:10

7月26日(日) 座長 池田 智明

講演5. 「胎児心疾患の診断と治療(1) 心臓構造異常」 9:00~9:30
講師: 大阪府立母子保健総合医療センター小児循環器科 副部長 稲村 昇

講演6. 「胎児心疾患の診断と治療(2) 不整脈」 9:30~10:00
講師: 久留米大学病院 小児科 准教授 前野 泰樹

休憩 10:00~10:10

講演7. 「ホルモン補充療法ガイドライン日産婦09」 10:10~10:40
講師: 大阪医科大学 産婦人科 教授 大道 正英

講演8. 「周産期医学の発展と未来」 10:40~11:10
講師: 宮崎大学医学部長、産婦人科 教授 池ノ上 克

講演9. 「妊娠高血圧腎症の管理」 11:10~11:40
講師: ベルランド総合病院 周産期医療研究所長 村田 雄二

質疑応答 11:40~12:10

閉会 12:10

「産褥心筋症：全国アンケートの途中結果」

国立循環器病センター 周産期科
神谷 千津子

産褥心筋症（周産期心筋症）は、わが国における間接妊産婦死亡の重要な原因の一つであります。欧米、特に英国では妊産婦死亡原因の1位として研究が進み、症例登録も充実しています。重症例では、出産から1年以内に母体死亡や心移植適応となったり、数年の経過で重症心不全に陥ったりする難治性の疾患であり、周産期科のみならず、循環器科にとっても重要な疾患です。しかしながら、症例数が少ないこともあり、国内ではその疾患概念すら周知されておられません。また、国内の発症状況、治療や転帰などの臨床像についても、これまで把握されてきませんでした。そこで今回、厚生労働省科学研究の一環として、全国の周産期、救命救急および循環器施設に対して、本疾患の初発時および受診時の状況、母児の予後などのアンケート調査を実施し、その詳細の調査・検討を行っています。

本サマーセミナーでは、まず典型的な症例を1例提示し、疾患の概要を理解していただき、次に上記アンケートの途中結果についてお話しをさせていただきます。

【症例提示】 33歳、女性

【主訴】 呼吸困難、全身浮腫

【既往歴】 外傷性肝損傷術後

【家族歴】 母：気管支喘息

【嗜好歴】 喫煙：5本/日×16年、飲酒：焼酎水割り 200ml/日

【現病歴】 これまでに妊娠・出産歴なく、健診などで異常を指摘されたこともなかった。

自然妊娠成立にて近医産科で外来定期受診を受けていた。妊娠6ヶ月頃より湿性咳嗽が出現し、喘息の疑いで喘息治療薬の投薬を受けていた。妊娠8ヶ月に下腿浮腫、夜間呼吸困難が出現。また、切迫早産の疑いで、子宮収縮抑制薬の内服が開始された。妊娠9ヶ月に、起座呼吸にて救急病院へ緊急搬送され、胸部レントゲン上肺うっ血と心胸隔比（CTR）の拡大、心エコー上心拡大と左室収縮力低下を認め、うっ血性心不全、心筋症合併妊娠の診断で当院へ転院となった。

【入院時所見】 ベッド上起座呼吸。妊娠前より20kgの体重増加あり。

血圧：145/95mmHg、脈拍：110/分、体温：37.2℃、SpO₂：98%(5L/min酸素マスク下)

胸部レントゲン、心エコー：供覧

採血データ：肝機能・腎機能など正常範囲、BNP 434 pg/mL

尿検査：蛋白（+）

【入院後経過】 入院時所見より、うっ血性心不全、産褥心筋症、妊娠高血圧症、妊娠高血圧性腎症の合併が考えられた。母体適応にて全身麻酔下に緊急帝王切開を施行。児の予後は良好であった。利尿剤、PDE阻害薬、hANPを使用し、第6病日に人工呼吸器より

離脱し、その後内服薬調整を行った。各血清検査ではウイルス抗体価の増加を認めず。1ヶ月後に心臓カテーテル検査を施行。LVEF24%、冠動脈に有意狭窄を認めなかった。同時に施行した心筋生検では、心筋細胞の中等度肥大と核異常、間質の線維化を認めたが、明らかな細胞浸潤を認めず、心筋症に合致した所見であった。エナラプリル、カルベジロール、フロセミド、スピロラクトンの内服下に約2ヵ月後退院となった。退院時胸部レントゲンではCTR51%。その後心不全増悪なく、半年後の心エコーでは、左室収縮能の改善を認めた(供覧)。

【産褥心筋症とは】

診断基準

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">① 分娩前1ヶ月から分娩後5ヶ月以内に新たに心不全の症状が出現② 心疾患の既往がない③ 他に心不全の原因となるものがない④ 左室駆出率(LVEF) < 45~50%、左室短縮率 < 30%、左室拡張末期径(LVDd)/体表面積 > 27mm/m² |
|--|

症状と特徴

- ・ 妊娠の最終月から産褥5ヶ月の間に心不全症状が出現。
- ・ 病院初診時の症状は、呼吸困難、咳、浮腫、全身倦怠感、動悸が多いが、重症例ではショック、意識障害を認める。
- ・ 危険因子として、多産、高齢、多胎、慢性高血圧症、妊娠高血圧症、黒人、子宮収縮抑制剤の使用や喫煙、肥満などが報告されている。
- ・ 急性期治療により、約半数は心機能が正常に回復し、約半数は心機能低下が残存する。約1割が重症化し、心臓移植や死亡にいたる。
- ・ 欧米では2000~5000分娩に1例の確率で発症。米国では、アジア人種は黒人に次いで発症率が高く、約3000分娩に1例の確率。日本では、1万~2万分娩に1例程度と発症率は低いですが、診断にいたっていない症例もあると考えられる。
- ・ 原因不明である。従来、ウイルス感染、自己免疫異常、ホルモンや循環負荷などが原因として考えられてきた。近年、異型プロラクチンが心筋症発症に関与しているとの報告がある。
- ・ 診断基準では、心不全の発症は妊娠の最終週~産褥5ヶ月とされているが、妊娠6~9ヶ月で心不全発症する例でも、予後は同じであったことが報告されている。総じて、妊娠後期から産褥期の心不全症状には注意が必要である。

治療指針

- ・ 急性期・慢性期ともに心不全に対する一般的治療が行われている。
- ・ 初診時の心機能が慢性期の心機能予測因子であり、早期発見・早期治療による効果が見込まれている。
- ・ 近年、急性期に抗プロラクチン療法を施行し、予後良好であったとの報告がある。

A1 グループ 一般演題 (ポスターセッション) 2月20日 発表時間 13:35～14:35

座長 神谷 千津子先生 (国立循環器病センター 周産期治療科)

P1 わが国の慢性心不全におけるメタボリックシンドロームの意義：男女差の観点から

○三浦 裕¹、福本 義弘¹、下川 宏明¹、三浦 俊郎²、島田 和典³、代田 浩之³、
朝倉 正紀⁴、友池 仁暢⁴、山田 明⁵、筒井 裕之⁶

東北大学循環器内科¹、山口大学²、順天堂大学³、国立循環器病センター⁴、
飯塚病院⁵、北海道大学⁶

P2 周産期の低濃度 BPA 暴露は雌よりも雄に強く影響を与える

○松田 真悟¹、須藤 千尋¹、米久保 淳³、天野 恵子²、佐二木 順子²、清水 栄司¹

千葉大学大学院医学薬学府神経情報統合生理学¹、千葉県衛生研究所²、日本ウォーターズ K.K.³

P3 我が国における周産期心筋症 (産褥心筋症) の実態

○神谷 千津子、植田 初江、北風 政史、友池 仁暢、池田 智明

国立循環器病センター

P4 エストロゲンの血管内皮機能改善作用に対するジェノゲストの影響に関する基礎的・臨床的検討

○逸見 典子、高橋 一広、高橋 俊文、堤 誠司、山谷 日鶴、倉智 博久

山形大学医学部産婦人科

P5 月経周期と心不全との関連

○土井 香、駒村 和雄、青木 貴子、橋本 修治、友池 仁暢

国立循環器病センター

第31回心筋生検研究会

プログラム・抄録集



会長

植田 初江

国立循環器病センター臨床検査部病理

会期

2009年11月27日(金)・28日(土)

会場

国立循環器病センター図書館講堂

千里阪急ホテル

10:40~12:30

ワークショップ「心不全と心リモデリング」

座長： 今中 恭子(三重大学大学院修復再生病理学)

佐野 元昭(慶応義塾大学医学部再生医学教室)

キーノート1 ミトコンドリア酸化障害と心筋リモデリング(20分)

慶応義塾大学医学部再生医学教室

○佐野 元昭

キーノート2 心臓の発生異常により見出したスフィンゴシン1リン酸トランスポーター(20分)

国立循環器病センター研究所循環器形態部

○望月 直樹

1 クラリスロマイシンはMMP活性阻害により心筋リモデリングを抑制する(10分)

東京大学先端臨床医学開発講座¹⁾、東京医科歯科大学 循環制御内科²⁾

○鈴木 淳一¹⁾、小川 真仁¹⁾、高山 喜好²⁾、磯部 光章²⁾

2 エリスロポエチンの心臓リモデリング抑制作用(10分)

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学

○高野 博之、小室 一成

3 心筋梗塞後リモデリングにおける心筋オートファジーの役割(10分)

学²⁾、京都女子大学³⁾、兵庫県立尼崎病院⁴⁾

○金森 寛充¹⁾、竹村 元三²⁾、後藤 和子²⁾、丸山 留美²⁾、辻本 晃子²⁾、川村 一太²⁾、

竹山 俊昭²⁾、川口 智則²⁾、渡辺 崇量²⁾、荻野 敦史²⁾、荻野 敦史²⁾、藤原 兎子³⁾、

藤原久義⁴⁾、清島 満¹⁾、湊口 信也²⁾

4 我が国における周産期心筋症の実態(10分)

国立循環器病センター周産期治療科

○神谷千津子

5 拡張型心筋症に対するβ遮断薬治療は心筋コラーゲン発現を抑制する(10分)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター循環器内科¹⁾、国立循環器病センター臨床検査部病理²⁾

○安村 良男¹⁾、植田 初江²⁾

ワークショップ(4)

我が国における周産期心筋症の実態

国立循環器病センター周産期治療科

○神谷千津子

周産期(産褥性)心筋症は、心疾患の既往のない女性が、妊娠の最終月から産褥5カ月までの間に心不全を発症する疾患である。我が国における実態は、これまで症例報告のみでほとんど知られていない。そこで、2007~8年の2年間に新規発症した周産期心筋症患者についてアンケート形式による全国調査を行ったので、その結果について心筋生検結果も踏まえて報告検討する。

総症例数は103例、患者の平均年齢は32.7歳であった。29%が妊娠中に心不全を発症し、67%が分娩時もしくは分娩後に発症した。発症時の心機能は、左室駆出率が32%であり、3例の母体死亡を認めた。退院症例では、平均10ヶ月後には約6割の患者が左室駆出率50%以上に回復していた。17例で心筋生検が行われており、12例で線維化、3例でリンパ球浸潤、2例で好酸球浸潤を認めた。