

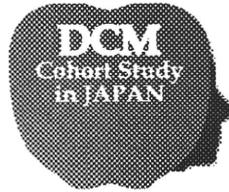
201024622A



厚生労働省難治性疾患克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

2010 年度報告書

2011 年 4 月



厚生労働省難治性疾患克服研究事業
特発性心筋症に関する調査研究
＜北風班＞

2010 年度報告書

■CONTENTS

I. 総括研究報告

| | |
|------------------------|---|
| [北風 政史] 特発性心筋症に関する調査研究 | 1 |
|------------------------|---|

II. 分担研究報告

| | |
|--|----|
| [筒井 裕之] ナチュラルキラーT細胞は圧負荷による心筋肥大・心不全の形成に重要な役割を果たしている | 3 |
| [久保田 功] Toll-like receptor(TLR)-4 を介した心房内皮障害は、心房内血栓形成に関与する | 5 |
| [下川 宏明] 心血管疾患進行抑制を目的としたコホート研究：第二次東北慢性心不全登録研究 | 7 |
| [永井 良三] 心血管病態形成における DNA 傷害・修復反応の役割の解析 | 9 |
| [福田 恵一] 末梢血 T 細胞からの iPS 細胞樹立法の確立と再生医学への応用 | 11 |
| [和泉 徹] 心筋障害時における転写調節因子の役割について | 13 |
| [磯部 光章] 心筋症における アディポネクチンの役割 | 15 |
| [後藤 雄一] ミトコンドリア DNA 全周シーケンス法のミトコンドリア病診断における有用性の検討 | 17 |
| [山岸 正和] 肥大型心筋症における心筋細胞死・線維化の分子機序に関する研究 | 19 |
| [木村 剛] 代謝異常に着目した新しい特発性心筋症の診断・治療法の開発 | 21 |
| [小室 一成] 拡張型心筋症発症における CaMKII δ と p53 の役割 | 23 |
| [中谷 武嗣] 特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究 | 25 |
| [斎藤 能彦] 次世代シーケンサーを利用した家族性 DCM 責任遺伝子同定の試み | 27 |
| [松崎 益徳] 拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討 | 29 |
| [砂川 賢二] リコンビナント Tfam 導入による NFAT 活性化抑制作用の検討 | 31 |
| [今泉 勉] エンドトキシン誘発性左心機能障害におけるサイトカイン機能調節因子の役割 | 33 |
| [鄭 忠和] 心不全に対する和温療法の抗酸化作用機序の解明 | 35 |
| [豊岡 照彦] 大容量 SNP マイクロアレイによる心筋症の遺伝子診断(I) | 37 |
| [竹石 恭知] 中枢性無呼吸を合併した心不全に対する adaptive servo ventilation の効果の検討 | 39 |
| [川名 正敏] Fluid Dynamics: A New Paradigm in the Pathogenesis of Sleep Apnea in Heart Failure | 41 |
| [廣江 道昭] 心血管疾患の発症における炎症の役割と分子機構の解明、特に tenascin C の炎症診断バイオマーカーとしての意義 | 43 |
| [木村 彰方] ミオシン脱リン酸化素の活性制御機構 | 45 |
| [吉村 道博] 遅延造影 MRI を用いた肥大型心筋症における心イベント予測の検討 | 47 |
| [室原 豊明] ドブタミン薬物負荷による左室収縮応答と CPX による運動耐容能の関連 | 49 |
| [今中 恭子] Matricellular タンパクによる心筋リモデリングの制御 | 51 |
| [大津 欣也] 心不全発症・進展における分子機構の解明 | 53 |
| [石坂 信和] 心臓サルコイドーシスの病態に関する研究 | 55 |

| | |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 57 |
|---------------------|----|

IV. [資料]研究成果の刊行物・別冊

| | |
|--|-----|
| Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. Biochem. Biophys. Res. Commun 393: 55-60 2010 | 95 |
| A histamine H2 receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of β -adrenergic receptor blockade. Basic Res Cardiol 105: 787-794 2010 | 101 |
| Spirolactone use at discharge was associated with improved survival in hospitalized patients with systolic heart failure. Am Heart J 160(6): 1156-1162 2010 | 109 |
| Serum midkine as a predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure. J Card Fail 16(4): 308-313 2010 | 117 |
| Trend for westernization of etiology and clinical characteristics of heart failure patients in Japan—First report from the CHART-2 Study. Circ J 75: 823-833 2011 | 123 |
| Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. J Biol Chem 285: 29662-70 2010 | 134 |
| Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Cell Stem Cell 7: 11-4 2010 | 143 |
| Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. Cardiovasc Res 89:309-319 2011 | 147 |
| Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). Proc Natl Acad Sci USA 107: 18410-18415 2010 | 158 |
| Impact of renin-angiotensin system polymorphisms on development of systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy—Evidence from a study of genotyped patients. Circ J 74: 2674-80 2010 | 167 |
| Analysis of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. Circ Heart Fail 3: 420-30 2010 | 174 |
| Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. Circulation 122(9): 891-9 2010 | 185 |
| 心臓移植 循環器疾患最新の治療 2010-2011:279-282 2010 | 194 |
| Using imaging mass spectrometry to accurately diagnose Fabry's disease. Circ J 24: 221-3 2011 | 198 |
| A NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein is decreased in patients with dilated cardiomyopathy. Intern Med 49(19): 2039-2042 2010 | 201 |
| Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. Int J Cardiol 147(2): 258-264 2011 | 205 |
| Effect of Waon therapy on oxidative stress in chronic heart failure. Circ J 75: 348-56 2011 | 212 |
| A novel algorithm from personal genome to the pathogenic mutant causing mitochondrial cardiomyopathy. | 221 |
| Adaptive servo ventilation improves cardiac dysfunction and prognosis in heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. | 246 |
| Acute decompensated heart failure syndromes (ATTEND) registry. A prospective observational multicenter cohort study: rationale, design, and preliminary data. Am Heart J. 159(6):949-955.e1.2010 | 274 |
| Dynamic expression of tenascin-C after myocardial ischemia and reperfusion: Assessment by ^{125}I -anti-tenascin-C antibody imaging. J Nucl Med 51: 1116-1122 2010 | 282 |
| Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates Rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1. J Biol Chem 285(44): 33680-33690 2010 | 289 |
| Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in a pig model. Circ. Cardiovasc. Interv 3(2) 166-173 2010 | 300 |
| Tenascin-C enhances crosstalk signaling of integrin $\alpha\beta3$ /PDGFR- β complex by SRC recruitment promoting PDGF-induced proliferation and migration in smooth muscle cells. J Cell Physiol 28: Epub ahead of prints 2010 | 314 |
| Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy Autophagy 6:600-606 2010 | 344 |
| A case of localized IgG4-related thoracic periarteritis and recurrent nerve palsy The American Journal of the Medical Sciences 341:166-169 2011 | 351 |

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

研究代表者：北風 政史（国立循環器病研究センター心臓血管内科部門）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓MRI検査やR I検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

特発性心筋症の病因・病態解明および新たな診断・治療法の確立を目指すべく、①特発性心筋症患者の診療実態の把握、②基礎的検討および臨床的検討の両側面から検討を行う。かかる成果を創出するために、本研究班を3層（全体研究、サブグループ研究、個別研究）に分けて研究を進めることを今年度も行った。

（I）全体研究

前年度に引き続き、新規に診断された特発性心筋症患者（拡張型心筋症、肥大型心筋症）を対象にした前向き登録研究（CCMM研究）を継続して行う。また、拘束型心筋症・ミトコンドリア病（心筋症）・ファブリー病・家族性突然死症候群・サルコイドーシスの患者において

は、既に診断されている患者においても登録を行う。調査項目としては、基礎データ、内服薬データ、心不全症状、血液検査値（血中BNP値など）、心臓超音波検査データ、心血管イベントなどを1年ごとに収集する。

（II）サブグループ研究

我が国では、臨床研究の普及および質の向上が必要とされ、新たなエビデンスを構築する上において、疾患ごとの臨床研究ネットワークが必要である。我が国における特発性心筋症のエビデンス構築を目指して、本研究班を心筋症・心不全ネットワークとして位置づけることにより、単施設では限界であった臨床研究の推進を目指すこととする。

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

②特発性心筋症における診断において、心筋生検が使用されている。近年、画像診断の進歩も目覚ましく、画像診断の中で最も有用視されているMRIを用いた診断法の有用性を検討する。具体的には、心筋生検による特発性心筋症の診断精度を検討する。

（III）個別研究

特発性心筋症における病因・病態解明および新たな診断・治療法に関する新たなエビデンスの探索を目的に、各分担研究者により、臨床研究および基礎研究を用いた解析を進めることとした。

C. 研究結果

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

（I）全体研究

「特発性心筋症の前向き登録研究」を継続して行った。今年度で約20症例の登録を行った。

(II) サブグループ研究

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

特発性心筋症に対する心臓移植が我が国で再開され、心筋症のより正確な診断について、臨床情報に加えて摘出心の病理組織を用いて再評価を行うべきあるとの提案がなされ、その課題を解決すべく、研究計画書を心臓移植実施施設で共同して作成した。現在、倫理委員会の申請に対するコメントに対して、検討を行った。次年度に対しての研究計画として、提出する予定である。

また、心筋症の診断におけるゴールデンスタンダードである心筋生検に関して、最近の画像診断の進歩に伴い、再評価する必要性が全体会議で指摘され、昨年度より継続して検討を行ってきた。昨年度40例から、本年度は最終的に137例まで大幅に症例を増やし、前向き観察研究を進めた。その結果、拡張型心筋症の正診率は、従来の心筋生検では66%、新しいMRIでは79%であり、MRIによる正診率が有意であった。しかし、それぞれが診断する上で有意な疾患群があり、両者を合わせて施行することにより、さらに診断精度が上がるということがわかった。今回の前向き観察研究から、従来の心筋生検だけではなく、それに向けたMRIによる遅延造影の評価が、拡張型心筋症の診断に有用であることが明らかとなった。

(III) 個別研究

分担研究者により、特発性心筋症および重症心不全に関する病因・病態の解明および新たな診断法・治療法の探索を目的に、前年度から引き続き数多くの研究がすすめられた。研究方法も、基礎的解析から臨床的解析までの様々なレベルで進められてきた。詳細は各班員の項に譲るが、前年度から進められている画像診断、テネイシンC等を用いた拡張型心筋症の診断に加えて、次世代シーケンサーを用いた新たな原因疾患遺伝子の探索やiPS細胞などを用いた先端的研究がすすめられた。研究成果に関して、年2回の研究発表会で、情報交換、意見交換が前年度と同様に、行われた。

D. 考察

特発性心筋症の病因・病態解明および新たな診断・治療法の確立を目指した研究を、さまざまな角度から進めてきた。全体研究として、「特発性心筋症の前向き登録研究」を継続して行った。症例の集積においては、十分な症例数にまでは至っておらず、次の研究班においては、症例の集積性を向上させる工夫が必要であると思われる。また前年度よりスタートした、サブグループ研究においては、心筋生検とMRIによる診断の精度に関して、エビデンスを構築することに成功した。このエビデンスをもとに、臨床に普及させるべく、次の研究班では、多施設共同研究を行うことが望まれる。個別研究においては、次世代シーケンサーやiPS細胞を用いた先端技術に応用した研究が進められてきた。次の研究班においては、先端技術を用いた心筋症の病態解明および新たな診断・治療法の確立に加えて、心筋症患者の臨床サンプルのバイ

オバンク構築などの確立をスタートすることが望まれる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

研究班全体としては特になし。

G. 研究発表

Kyung-Duk Min, Masanori Asakura, Yulin Liao, Kenji Nakamaru, Hidetoshi Okazaki, Tomoko Takahashi, Kazunori Fujimoto, Shin Ito, Ayako Takahashi, Hiroshi Asanuma, Satoru Yamasaki, Tetsuo Minamino, Shoji Sanada, Osamu Seguchi, Atsushi Nakano, Yosuke Ando, Toshiaki Otsuka, Hidehiko Furukawa, Tadashi Isomura, Seiji Takashima, Naoki Mochizuki and Masafumi Kitakaze. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 55-60, 2010
Tamaki Sawada, Tetsuo Minamino, Hai Ying Fu, Mitsutoshi Asai, Keiji Okuda, Tadashi Isomura, Satoru Yamazaki, Yoshihiro Asano, Ken-ichiro Okada, Osamu Tsukamoto, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Masanori Asakura, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze and Issei Komuro. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48:1280-1289, 2010
Yulin Liao, Wanling Xuan, Jing Zhao, Jianpin Bin, Hui Zhao, Masanori Asakura, Tohru Funahashi Seiji Takashima and Masafumi Kitakaze. Antihypertrophic effects of adiponectin on cardiomyocytes are associated with the inhibition of heparin-binding epidermal growth factor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 519-525, 2010
Hiroyuki Takahama, Hiroshi Asanuma, Shoji Sanada, Masashi Fujita, Hideyuki Sasaki, Masakatsu Wakeno, Jiyoung Kim, Masanori Asakura, Seiji Takashima, Tetsuo Minamino, Kazuo Komamura, Masaru Sugimachi and Masafumi Kitakaze. Histamine H2 receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of b-adrenergic receptor blockade. *Basic Res Cardiol* 105:787-794, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究班全体としては特になし

II. 研究分担報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—ナチュラルキラーT細胞は圧負荷による心筋肥大・心不全の形成に重要な役割を果たしている—

研究分担者：筒井 裕之（北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学教授）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓MRI 査やRI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

心筋リモデリングおよび心不全の進展に関わる因子として慢性炎症が注目されている。ユニークなTリンパ球のサブセットであるナチュラルキラーT (Natural Killer T; NKT) 細胞は種々の炎症性サイトカインを産生し、組織炎症を制御する能力を有している。我々は、NKT 細胞を特異的に活性化させる α -galactosylceramide の投与によって、心筋梗塞後の心筋リモデリングと心不全の進展が抑制されること、この効果には interleukin-10 が関わっていることを明らかにしてきた。今回、我々は圧負荷後肥大・心不全モデルマウスを用いて、心筋リモデリングおよび心不全の進展における NKT 細胞の役割について検討した。

B. 研究方法

C57BL/J マウスおよび Ja 欠損 (KO) マウスに横行大動脈縮窄術 (TAC) あるいは偽手術 (sham) を行った。本研究は、sham 群、KO+sham 群、TAC 群および KO+TAC 群の 4 群で実験を行った。マウスは 4 週間飼育し、生存率を評価した。また、別のグループのマウスを用いて、2 週間の時点で心エコーおよびカテーテルによる心内圧測定を行い、組織学的評価を行った。また、左室心筋を摘出し、定量的 RT-PCR 法によって各種遺伝子発現を検討した。

C. 研究結果

KO+TAC 群は TAC 群と比較して、4 週までの生存率が有意に低下した。TAC 群において左室肥大を認めたが、

左室径や左室短縮率は正常に保たれた。KO+TAC 群では左室肥大の増悪、左室径の拡大、左室短縮率の低下、さらに、肺重量の増加をみとめた。

組織学的解析では、TAC 群の心筋細胞が肥大し、間質線維化が増加したが、KO+TAC 群ではこれらがさらに増加した。

NKT 細胞受容体 (Va14Ja18) 遺伝子発現は TAC 群の左室心筋で 2 週後に増加した。KO マウスではこの発現は極めて低値であった。NKT 細胞の欠損と並行して、interleukin-10 遺伝子発現も消失した。

D. 考察

今回の研究において、TAC 後の左室心筋において NKT 細胞が増加していること、および NKT 細胞の欠損は TAC 後の心筋リモデリングおよび心不全を悪化させることが示された。この NKT 細胞欠損の効果には interleukin-10 が関係していた。最近の報告 (Circ Res 2009; 104: e9-18) では、interleukin-10 が炎症反応を抑制し、間質線維化の抑制や血管新生により MI 後の左室リモデリングおよび心不全を改善することが示されており、我々の結果を支持するものである。

E. 結論

NKT 細胞は圧負荷後左室リモデリングや心不全に対して保護的な役割を果たしていると考えられた。この効果には心保護的に働くサイトカインである interleukin-10 の

発現抑制が関与していると考えられた。

研究協力者：高橋将成、絹川真太郎、石森直樹、ソビリン・モハマド・アリ

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Ohta Y, Kinugawa S, Matsushima S, Ono T, Sobirin A, Inoue N, Yokota T, Hirabayashi K, Tsutsui H: Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in post-infarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (in press)
2. Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (in press)
3. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoe K, Tsutsui H: Natural killer T Cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-Induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2):193-199, 2010
4. Tsuchihashi-Makaya M, Furumoto T, Kinugawa S, Hamaguchi S, Goto K, Goto D, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H, for the JCARE-CARD Investigators: Discharge use of angiotensin receptor blockers provides comparable effects with angiotensin-converting enzyme inhibitors on outcomes in patients hospitalized for heart failure. *Hypertens Res* 33(3):197-202, 2010
5. Suga T, Okita K, Morita N, Yokota T, Hirabayashi K, Horiuchi M, Takada S, Omokawa M, Kinugawa S, Tsutsui H: Dose effect on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* 108(6):1563-1567, 2010
6. Hamaguchi S, Furumoto T, Tsuchihashi-Makaya M, Goto K, Goto D, Yokota T, Kinugawa S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H, for the JCARE-CARD Investigators: Hyperuricemia predicts adverse outcomes in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2010 Jun 12. [Epub ahead of print]
7. Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, Yokoshiki H, Hamaguchi S, Yokota T, Goto D, Goto K, Takeshita A, Tsutsui H, The JCARE-CARD Investigators: Beta-blocker use at discharge in patients hospitalized for heart failure is associated with improved survival. *Circ J* 74(7):1364-1371, 2010
8. Naya M, Chiba S, Iwano H, Yamada S, Katoh C, Manabe O, Yoshinaga K, Matsui Y, Tamaki N, Tsutsui H: Myocardial oxidative metabolism is increased due to haemodynamic overload in patients with aortic valve stenosis: assessment using 11C-acetate positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(12):2242-2248, 2010
9. Ylikallio E, Tyynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A: High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet* 19(13):2695-2705, 2010
10. Hamaguchi S, Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, Goto D, Yokota T, Goto K, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H, for the JCARE-CARD Investigators: Body mass index is an independent predictor of long-term outcomes in patients hospitalized with heart failure in Japan. *Circ J* 74(12):2605-2611, 2010
11. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Goto K, Goto D, Yokota T, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H: Spironolactone use at discharge was associated with improved survival in hospitalized patients with systolic heart failure. *Am Heart J* 160(6):1156-1162, 2010
12. Tsutsui H: The medical treatment of myocardial dysfunction ESC2010, 2010年8月29日, Stockholm
13. Tsutsui H: Mitochondrial oxidative stress in cardiac remodeling and failure CSDS, 2010年9月24日, 福岡

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）
研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—Toll-like receptor(TLR)-4 を介した心房内皮障害は、心房内血栓形成に関与する—

研究分担者：久保田 功（山形大学医学部内科学第一講座）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓 MRI 検査や RI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

肥大型心筋症や左室肥大合併心不全患者において、心不全死、突然死に加え、血栓塞栓症は予後を左右する重大な合併症である。血栓形成には血流停滞、凝固能亢進に加え血管内皮障害が関与することが知られている。心房には血管内皮に類似した心房内皮が存在し、心房細動モデルで、心房内皮の炎症が血栓形成に関与することが報告された。肥大心では心房細動を合併しやすいが、心房細動患者の心房筋において HSP 60 の発現増加が報告された。HSP60 は Toll 様受容体 (TLR)-4 の内因性リガンドである。これより TLR-4 シグナルを介する心房内皮の炎症が肥大心における心内血栓形成に関与するという仮説を立て、検討を行った。

B. 研究方法

心臓手術時に同意の得られた患者 27 名を対象にした。93%の患者が弁膜症の手術目的であり、手術時に右心耳より心房筋を採取した。HSP60 および TLR4、炎症性接着因子 VCAM-1 の発現を免疫染色およびウェスタンブロット法により観察した。

次に 8-12 週齢の C57BL/6 の野生型(WT)マウスと TLR-4 欠損(KO)マウスに大動脈縮窄術(TAC)を行い、心房筋における VCAM-1 の発現等について、免疫染色およびウェスタンブロット法により検討を行った。

C. 研究結果

心房細動を有する心臓手術患者では、同町立軍に比べ有意に左房径が大きく、血漿 BNP 値が高値であった。心房細動群では心房内皮に一致して炎症性接着因子 VCAM-1 の発現が亢進していた。ウェスタンブロット法では VCAM-1 の増加に加え、TLR-4、HSP60 の発現も増加していた。圧負荷心肥大モデルを用いた検討では、心肥大の程度と心機能には差を認めなかったが、WT マウスより TLR-4KO マウスにおいて心房内血栓を認める例が少なかった [WT: 16/20 (80%) vs. TLR-4KO: 4/15 (27%), $p<0.001$]。TLR-4KO マウスでは、WT マウスと比較し心房筋 VCAM-1 と PAI-1 の発現亢進と血管内皮機能を反映する eNOS リン酸化の抑制が減弱していた($p<0.05$, 各々)。更に TLR-4KO マウスでは、p38 リン酸化が抑制されていた ($p<0.05$)。他 MAP kinase (ERK 及び JNK) に差を認めなかった。また WT マウスと比較し TLR-4KO マウスで $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活性が抑制されていた。

D. 考察

心房細動を有する心臓手術患者において、心房内皮の TLR4、HSP90、VCAM-1 の発現が亢進しており、心房細動を有する患者では心房内皮の炎症が生じていることが示唆された。圧負荷心肥大モデルでは、心房内皮での VCAM-1 および PAI-1 発現増加および eNOS リン酸化減弱を認めたが、TLR-4KO マウスではこの心房内皮障害が

抑制された。TLR-4の作用はp38およびNFκBを介すると考えられた。以前のTACモデルの報告と異なり、TLR-4KOとWTで心肥大に有意差がなかったが、TAC後4週間で検討しており、心肥大、心不全が進行した状態であったためと考えられた。

E. 結論

肥大大心ではTLR-4/p38, NFκB経路を介する心房内皮炎症が心房内血栓形成に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1: Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Hirono O, Kubota I. Increased left atrial volume index predicts a poor prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail*; 17: 210-216. 2011.

2: Shishido T, Konta T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Takasaki S, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. Suppressive Effects of Valsartan on Microalbuminuria and CRP in Patients with Metabolic Syndrome (Val-Mets). *Clin Exp Hypertens*; 33: 117-123. 2011.

3: Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest*. Jan 25. 2011.

4: Bilim O, Takeishi Y, Kitahara T, Ishino M, Sasaki T, Suzuki S, Shishido T, Kubota I. Serum YKL-40 predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*; 16: 873-879. 2010.

5: Katoh S, Shishido T, Kutsuzawa D, Arimoto T, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Niizeki T, Nishiyama S, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I. Iodine-123 metaiodo-benzylguanidine imaging can predict future cardiac

events in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Ann Nucl Med*; 24: 679-686. 2010.

6: Nishiyama S, Watanabe T, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Shibata Y, Konta T, Kawata S, Kato T, Fukao A, Kubota I. Trends in coronary risk factors among patients with acute myocardial infarction over the last decade: the Yamagata AMI registry. *J Atheroscler Thromb*; 17: 989-998. 2010.

7: Arimoto T, Watanabe T, Nitobe J, Kubota I. Catheter ablation of ventricular tachycardia induced by injection of acetylcholine in the right coronary artery. *J Cardiovasc Electrophysiol*; 21: 1410-1412. 2010.

8: Tamura H, Watanabe T, Hirono O, Nishiyama S, Sasaki S, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Kayama T, Kubota I. Low wall velocity of left atrial appendage measured by trans-thoracic echocardiography predicts thrombus formation caused by atrial appendage dysfunction. *J Am Soc Echocardiogr*; 23: 545-552. 2010.

9: Kitahara T, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Ishino M, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. Serum midkine as a predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*; 16: 308-313. 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<研究協力者>

渡邊 哲

山形大学医学部内科学第一(循環・呼吸・腎臓内科学)講座

特発性心筋症に関する調査研究

—心血管疾患進行抑制を目的としたコホート研究：第二次東北慢性心不全登録研究—

研究分担者：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、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓 MRI 査や RI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

わが国では心血管疾患の有病率が増加している。心血管疾患は進行性疾患と考えられ、心不全はその末期的段階である。心不全を発症すれば予後は不良であり、診療コストの増加は先進諸国においては国家的問題と考えられている。心血管疾患が増悪する過程において急性心不全症候群(AHFS)の発症が最も重要な契機であると思われ、その発症のメカニズムと発症予防法の解明が必要と考えられる。このような状況を背景にして、心血管疾患と心不全の病態進行における疫学的知見の集積を行うため2つのコホート研究を現在施行中である。

B. 研究方法

1) 第二次東北慢性心不全登録研究(CHART-2)

Stage-B/Stage-C/Stage-D の症例に加え全ての有意な冠動脈疾患症例を東北地区 24 機関病院で連続登録し最低 3 年間にわたって臨床パラメータとイベントを前向きに調査する。2006 年 10 月に開始し、2010 年 3 月末日までに 10,219 名の登録が得られた。

2) 東北急性心不全登録研究(TAHFS-Study)

CHART-2 研究の参加施設から、岩手県 1 施設、宮城県 3 施設を選択し AHFS で入院した症例を後ろ向きに連続登録し臨床パラメータと予後の調査を行う。まず 2007 年分の調査を予備的に行い、2009 年まで継続予定。

C. 研究結果

1) CHART-2 研究の結果から：慢性心不全患者の β 遮断薬浸透率と予後改善効果

2010 年 9 月末日に初回の予後調査を施行。 β 遮断薬は心不全症例のうち 49.2%に使用されていた(図 1)。Propensity-score Matched Pair を用いた検討で β 遮断薬投与群は平均 871 日の追跡で 1.7%の有意な全死亡率低下を認めた。サブグループ解析を行うと、左心室駆出率・女性で交互作用があることが示唆された(図 2)。

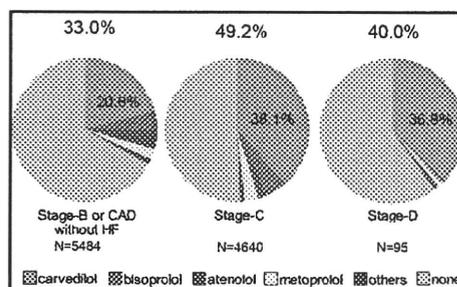


図 1 β 遮断薬の浸透率とステージ分類

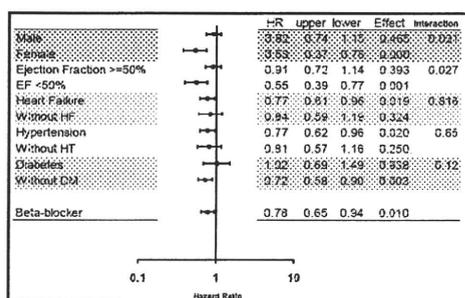


図 2 β 遮断薬の効果のサブグループ解析

一方、β遮断薬の予後改善効果のエビデンスのある虚血性心疾患における平均投与量は平均 7.0mg/日、また、75 歳以上の症例では 6.3mg/日と低かった。

2) 東北急性心不全登録研究(TAHFS-Study)の結果から

総登録数は 412 例であった。欧米の登録研究や ATTEND 研究と比較すると平均年齢は高く(77 歳、図 3)、平均入院期間は長く(29 日)、院内死亡率は高く(10%)、新規発症例が多く(70%)、虚血性心疾患が少なかった(30%)。

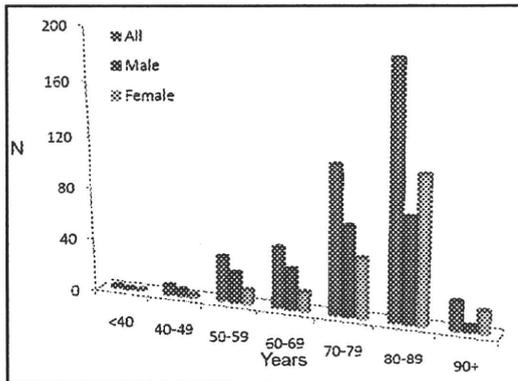


図 3 AHFS 症例の年齢分布

入院時の臨床的特徴をみると 78%が Nohria Profile-B、48%が Clinical Scenario-1 であった。急性心不全入院の原因について検討すると、不明なものが最も多く、感染・高血圧がそれに続いた(図 4)。

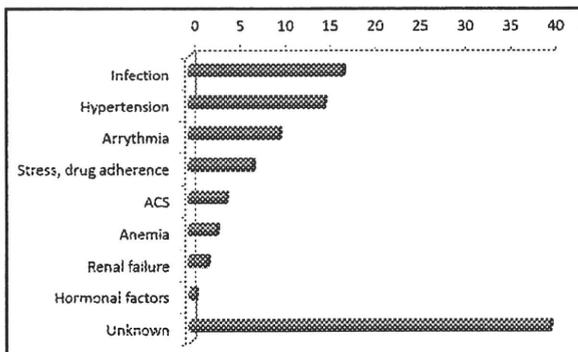


図 4 急性心不全発症の原因

入院後の治療内容は Carperitide が 78%の症例で使用され、NIPPV の使用は 5%と低かった。平均追跡期間 624 日での死亡ないし再入院率は 33%と不良であった。

D. 考察

心血管疾患患者の予後改善の方策に於いては、Stage-B からの進行予防と Stage-C 症例の急性増悪予防が最も重要で

ある。我が国では、ライフスタイルや動脈硬化リスクの欧米化によって心不全の背景や病態も欧米化しつつあると考えられる。また、これまでどの国も経験したことのない急速な高齢化によって心血管疾患のリスクや心不全有病率は増加している。今回我々は心不全治療の標準治療であるβ遮断薬の効果と不十分な使用について報告した。また、我が国の急性心不全入院患者の多くが高齢で初回発症が多いことを報告した。発症原因の多くが不明であり AHFS 予防を達成するには多くの知見が必要と思われる。

E. 結論

1) 地域の実臨床における急性心不全症例は、高齢で頻度に男女差はなく、高血圧・糖尿病の合併が多く、欧米型への接近が見られた。入院時には Warm & Wet 型が最も多く、カルペリチドが約 8 割で使用され、入院期間は長い。

2) β遮断薬の使用頻度は増加しているが投与量については未だ不十分の可能性はある。

3) β遮断薬の効果には症例の背景の差による effect modification が存在する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Nochioka K, Shiba N,, Shimokawa H. Both High and Low Body Mass Indexes Are Prognostic Risks in Japanese Patients with Chronic Heart Failure – Implications from the CHART Study –. J Card Fail. 16:880-7,2010.
2. Shiba N, Shimokawa H. Chronic kidney disease and heart failure--Bidirectional close link and common therapeutic goal. J Cardiol. 57:8-17,2010.
3. Shiba N,, Shimokawa H. Trend of Westernization of Etiology and Clinical Characteristics of Heart Failure Patients in Japan. Circ J. 75:823-833,2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許：超音波治療装置. 下川宏明、金井 浩. (国際出願番号：PCT/JP2010/72171)

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—心血管病態形成における DNA 傷害・修復反応の役割の解析—

研究分担者：永井 良三（東京大学医学部附属病院循環器内科）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓 MRI 査や RI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

最近、DNA 傷害・修復反応が DNA チェックポイントを含む伝統的な役割に加え、老化などの非癌領域においても制御機構を有することが報告された(Bartkova et al. 2006, 2005, Gorgoulis et al. 2005)。一方、酸化ストレスは血管内皮細胞の機能不全や老化を制御することが知られている。DNA 傷害は酸化ストレスや癌化ストレスにより誘導されるが、心血管病態は DNA 傷害・修復による制御機序が最も明らかにされていない分野の一つである。ATM (ataxia-telangiectasia mutated)は PI3K 関連タンパクファミリーに属し、酸化ストレスにおいて重要な役割を担う報告がある。しかし、循環器疾患における ATM シグナル経路の役割は不明であった。さらに、ATM 変異に関連した心血管病態形成機序は全く不明であった。本研究では ATM ノックアウトマウスおよび培養血管内皮細胞を用いて心血管病態形成における DNA 傷害・修復反応の役割を解析した。

B. 研究方法

細胞培養—ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs, 4~6 継代目を使用)は三光純薬より購入し、EGM-2 培養液にて 5% CO₂、37 °C インキュベータ内で維持した。

ウェスタンブロットおよび試薬—N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich), caffeine (Wako), KU-55933 (Calbiochem)にてプレインキュベート後、100 μM H₂O₂

添加した。サンプルは 1mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)および 1 mM sodium fluoride (Wako)加えた 2xNuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen)で回収し、10分間ボイル。NuPAGE(Invitrogen) 3-8%または 10%ゲルにて泳動し、PVDF (Invitrogen)膜に転写。5%スキムミルクでブロッキング後、標準的なプロトコールで実施した。

蛍光免疫染色—ガラスカバースライド上で 1x10⁵/well で培養。100μM H₂O₂ で 1 時間刺激後、3% paraformaldehyde/PBS にて固定。0.25% Triton X-100 /PBS にて 10分間浸透。0.1% gelatin にてブロッキング後、標準的なプロトコールにて 1 次抗体、2 次抗体反応。Alexa Fluor 488 green および Alexa Fluor 635 red (Life Technologies)にて発色。共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss LSM510)(Carl Zeiss, Jena, Germany)にて観察した。

SA-β-gal アッセイ—細胞を PBS 洗浄後、2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde にて固定後、SA-β-gal 染色液(contained 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal), 40 mM citric acid/sodium phosphate, pH 6.0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride, and 2 mM magnesium chloride) 37 °C で 12 時間培養。20 視野で 1,000 細胞を検鏡し陽性細胞数をカウントした。

RNA 干渉—Small interference RNA (siRNA) コンストラクトは siGENOME SMARTpool (Dharmacon)を使

用(100 pmol)。細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を使用。6-well ディッシュにて、80% コンフルエントの HUVECs 細胞 (3 x10⁵ cells/well)に導入した。

RNA 抽出および定量的 RT-PCR—RNeasy Mini kit (Qiagen)を使用し、総 RNA 抽出。1μg の RNA より powerscript reverse transcriptase (Clontech)使用して cDNA 合成。HotStarTaq (Qiagen)使用し、PCR 実施した。

動物実験—ATM ノックアウトマウス (129S6/SvEvTac:Atmtm1Awb/J) は Jackson Laboratories より購入した。10 週齢の SPF 雄 ATM wild-type(+/+), heterozygote (+/-), homozygote (-/-)マウスを使用(各 n=6, 15-25 g)。高血糖モデルは streptozotocin (STZ) (180 mg/kg; Sigma-Aldrich)の腹腔内投与にて作成した。

免疫組織染色—免疫染色は市販の染色キット Envision kit (Dako Japan)を用いて、標準プロトコール通り行った。凍結切片 10μm を用いて脱脂後、1次抗体 von Willebrand factor (Abcam), p21 および p16 (Santa Cruz Biotechnology) を反応後、diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako Japan)で発色。ヘマトキシリンで核をカウンター染色した。

C. 研究結果

酸化ストレスが Akt/p53/p21 経路を介したシグナルによる、ATM の活性化・リン酸化を通じて、血管内皮細胞老化を誘導することが示された。この反応は ATM をノックダウンした細胞において抑制されていることが観察され、さらに ATM 特異的阻害剤によっても抑制されることが確認された。さらに、これらの細胞実験において得られた所見は、ATM ノックアウトマウスモデルを用いた動物実験によっても確認された。ATM ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して、大動脈における内皮細胞老化の誘導が抑制された。さらに、ATM ノックアウトマウスでは浸透圧ポンプによるアンジオテンシン II の持続投与により、心臓線維化が促進していた。

D. 考察

ATM が酸化ストレスにより誘導された血管内皮細胞における機能不全・老化を制御することを明らかにした。本

研究は心血管病態形成における DNA 傷害・修復反応の役割の解析の端緒として、実験的に扱いやすい血管内皮細胞を用いて、その可能性を実施したものである。さらに、ATM が心臓線維化反応における役割を有する可能性も示した。今度、心臓についても同様の DNA 傷害・修復反応がみられるか確認していく予定だが、in vivo のパイロットデータで陽性所見が得られたことから、血管のみならず心臓においても同様の制御系の存在が示唆された。今後、拡張型心筋症の病因・病態解明に繋がる可能性についても追求して参りたい。

E. 結論

ATM を中心とした DNA 傷害・修復反応の血管老化ならびに心臓線維化の機序解明は心血管病態形成における新たな制御機構についての知見を増加させるのみならず、新たな治療標的となる可能性がある。今後は臨床病態での検討とあわせて、より広く心血管病態における役割と位置づけを包括的に明らかにし、新しい拡張型心筋症の病因・病態解明および治療法開発の糸口としたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文

Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. J Biol Chem 285:29662-70, 2010.

学会発表

Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Miyagawa K and Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cells senescence. Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair (February 6-11, 2011, LVentura, CA, USA)

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）
研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—末梢血 T 細胞からの iPS 細胞樹立法の確立と再生医学への応用—

研究分担者：福田 恵一（慶應義塾大学医学部循環器内科）

＜研究要旨＞ 拡張型・肥大型心筋症の病態に遺伝子異常が伴うことは良く知られている。遺伝子異常の大規模スクリーニングが容易となり、原因遺伝子が特定される時代が到来したが、その治療法を構築するのは容易ではない。再生医学の発展により、iPS 細胞が開発され、これを基に患者由来の再生心筋細胞の作製が可能となった。これにより、患者由来再生心筋を用いた心筋症の病態解明・治療法の開発が可能となった。本研究では、患者から非侵襲的、かつ短期間で効率よく iPS 細胞を樹立する方法を開発した。末梢血中の T 細胞を抗 CD3 抗体と IL2 により刺激することで活性化してコロニーを形成した。これに対し、山中 4 因子をセンダイウイルスで構築したベクターにより遺伝子を導入し、iPS 細胞を作出した。この方法で作出した iPS 細胞はゲノム遺伝子の破壊もなく、1 か月以内に樹立可能であった。

のリプログラム遺伝子の導入を行った。SeV は RNA(−)

A. 研究目的

従来の iPS 細胞の樹立方法はレトロウイルスを用いて Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc の四つのリプログラム遺伝子を線維芽細胞に導入する方法であった。この方法は、①皮膚の細胞をバイオプシーが必要、②線維芽細胞樹立に時間が掛かる（iPS 細胞樹立までに 2 ヶ月半掛かる）、③遺伝子をゲノムに挿入するため染色体上の既存遺伝子を破壊し遺伝子異常を惹起する可能性がある、④iPS 細胞樹立後にマスキングされるリプログラミング遺伝子がゲノム上に残存し、再度活性化して奇形腫等の腫瘍を形成する可能性が有る等が問題点として挙げられていた。

本研究の目的は健康者や種々の遺伝性心筋疾患の患者から TiPS 細胞を樹立し、これを用いて正常および疾患心筋細胞を誘導し、種々の疾患の病態解明、創薬へと研究を進めることである。

B. 研究方法

これらの問題を解決するため、我々は血液中 T リンパ球を使い、1 滴の血液（0.1 ml）から僅か 1 ヶ月足らずでゲノム遺伝子を損傷せずに iPS 細胞を樹立する方法を開発することを試みた。血液単核球成分を抗 CD3 抗体と IL2 存在下で培養すると T リンパ球のみが細胞増殖させる。5 日目には増殖 T リンパ球がコロニーを形成する。この T 細胞コロニーに対し、センダイウイルス SeV を用いて 4 つ

鎖型のウイルスであり、細胞内に取り込まれた SeV はゲノムには取り込まれず、細胞質内で増殖する。このため、4 つのリプログラム遺伝子の導入に伴うゲノム遺伝子の破壊やこれらの遺伝子の再活性化が伴わない。

C. 研究結果

この方法で iPS 細胞を樹立した。これは iPS 細胞は *in vitro* でも心筋を含む 3 胚葉系に分化すること、15 継代程度で残存ウイルスは完全に消滅することを確認した。さらに、ゲノム染色体形に異常のないことを観察した。免疫不全マウスに移植すると奇形腫を形成し、多分化能を有することを証明した。

D. 考察

本方法は皮膚生検を必要としないため、若年女性からも iPS 細胞が樹立できる利点を有していた。また、1 か月で iPS 細胞が樹立できる点も有用であった。今後の疾患 iPS 細胞研究等に極めて有用なツールになると考えられる。

E. 結論

少量の末梢血中の完全に分化した T 細胞からセンダイウイルスを用いることにより、iPS 細胞を樹立できる技術を開発した。再生医学への応用が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し

G. 研究発表

1. Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Haruko Kawaguchi-Manabe, Jin Endo, Takashi Kawakami, Tokuhiko Kimura, Toshiaki Monkawa, Matsuhiko Hayashi, Akio Iwanami, Hideyuki Okano, Yasunori Okada, Hatsue Ishibashi-Ueda, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. *J Clin Invest*. 120:408-21. 2010 (IF = 17.089)
2. Kenichiro Shimoji, Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Fumiyuki Hattori, Tomofumi Tanaka, Mie Hara, Yohei Ohno, Hao Chen, Uichi Koshimizu, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ES and iPS cells. *Cell Stem Cell* 6:227-237. 2010(IF = 23.563)
3. Shinsuke Yuasa, Takeshi Onizuka, Kenichiro Shimoji, Yohei Ohno, Toshimi Kageyama, Sung Han Yoon, Toru Egashira, Ruri Kaneda, Mitsushige Murata, Fumiyuki Hattori, Shinji Makino, Motoaki Sano, Satoshi Ogawa, Richard P Harvey, Keiichi Fukuda. *Zac1* is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 106:1083-91, 2010. (Corresponding author, IF = 9.989)
4. Mitsushige Murata, Shugo Tohyama, Keiichi Fukuda. The impact of recent advances in cardiovascular regenerative medicine on clinical therapeutics and drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*. 126:109-18.2010 (Corresponding author, IF = 9.443)
5. Gregory G. Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmén, Rinku Sarangi, Keiichi Fukuda, Andrew A Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, and Josef M, et al. Penninger. A global *in vivo Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. 141:142-53. 2010 (IF = 31.253)
6. Kensuke Kimura, Miho Sakai-Kimura, Ryuichi Takahashi, Atsushi Watanabe, Shigetaka Noma, Keiichi Fukuda. Too friable to treat? *Lancet* 375: 1578. 2010 (IF=28.409)
7. Kenichiro Kinouchi, Atsuhiko Ichihara, Motoaki Sano, Ge-Hong Sun-Wada, Yoh Wada, Yoichi Oshima, Mariyo Sakoda, Asako Kurauchi-Mito, Kanako Bokuda, Tatsuya Narita, Yoshitaka Tamai, Hiromu Sato, Minoru Takemoto, Susan E. Quaggin, Keiichi Fukuda, and Hiroshi Itoh. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 107: 30-4. 2010 (IF = 9.989)
8. Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Hikari Nakata, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Yohei Okada, Hiroyuki Seimiya, Noemi Fusaki, Mamoru Hasegawa, Keiichi Fukuda. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 7:11-4. 2010(IF = 23.563)
9. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest*. 120: 2292-306. 2010 (IF = 17.089)
10. Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda R, Makino S, Nakajima K, Okano H, Fukuda K. Neural Crest-Derived Stem Cells Migrate and Differentiate Into Cardiomyocytes After Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* Jan 6. 2011 (IF = 7.235)
11. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab*. 13: 170-82. 2011(IF = 17.350)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事無し。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋障害時における転写調節因子の役割について—

研究分担者：和泉 徹（北里大学医学部循環器内科学教授）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓 MRI 査や RI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

BTB-Zn finger protein は protein-protein interaction 機能を有する POZ(BTB)ドメインと C 末端側に DNA と結合可能な Zn-finger ドメインを持つタンパクである。

BTB-ZF は遺伝子の転写調節、細胞周期や細胞の形質転換、或いは細胞障害によって引き起こされる DNA 損傷の修復に深く関与することが知られているが、心筋障害における BTB-ZF の役割については未だ解明されていない領域である。

今回我々は 584 アミノ酸からなる BTB-ZF タンパクの一つである ZBTB-7 に注目した。ZBTB-7 はプロトオンコジーンとして細胞の形質転換に重要な役割を果たし、さらに DNA 障害に引き続く転写の調整に深く関わっている事が明らかとされている。しかしながら、通常心筋や心筋障害における ZBTB-7 の役割は不明であり、今回心筋障害における役割を検討した。

B. 研究方法

本研究ではマウス培養心筋細胞を使用した (C3H/HeJ, passage 2)。培養心筋細胞にプロテアゾーム阻害剤である MG132 (0.05uM) を先行投与し、0.2.0uM の異なった Doxorubicin 存在下でマウス心筋細胞を 24 時間培養した。Doxorubicin 非投与群は薬剤溶解液である DMSO のみをコントロールとして細胞に投与した。24 時間後培養心筋細胞を収集し、細胞質分画と核抽

出分画に分け、薬剤による心筋障害時の ZBTB-7 および p53 のタンパク発現量の増減をウエスタンブロッティング法にて確認した。

C. 研究結果

ZBTB-7 は MG132 の非存在下でも発現が確認でき、心筋に常在的に発現していた。また、細胞質分画には存在せず、核抽出分画に存在していた。培養心筋は Doxorubicin 濃度 0.5uM で 24 時間培養することにより形態的に障害を認めた。

ZBTB-7 は Doxorubicin 濃度依存的にその発現量は低下していた。P53 は通常心筋では発現が確認できなかったが、Doxorubicin によって心筋障害が進展し、ZBTB-7 が減少すると同時に p53 の発現量が逆相関的に増加していった。

ZBTB7 は Doxorubicin 存在下であっても MG132 先行投与群では発現量は低下せず、分解が抑制されていた。P53 は ZBTB-7 発現の安定化に伴い、その発現量が抑制されていた。

D. 考察

ZBTB7 の分解はプロテアゾーム阻害薬 MG132 で抑制されていたことより、ユビキチンによる能動的タンパク質分解と考えられた。近年 ZBTB-7 は癌抑制遺伝子である ARF に直接結合することによって、その転写を特異的に抑制することが明らかとなった。さらに ARF はユビキチ

ンライゲースである Mdm2 および p53 と複合体を形成し p53 のプロテアゾーム分解を抑制し p53 を安定化させる。

今回の心筋培養細胞における心筋障害の検討では BTB-ZF である ZBTB-7 が減少し、その結果 p53 が上昇しており、ARF-ZBTB7-p53 pathway が深く関わっていると考えられた。また、MG132 で ZBTB-7 を安定化させると Doxorubicin 存在下でも p53 の発現は抑制されていた。

P53 は癌抑制遺伝子としての役割が重要視されているが、心筋障害においては障害を悪化させる要因である可能性が指摘されている。臨床的にも心筋症患者では p53 の蓄積が認められており、心筋障害を悪化させる要因であると考えられているが、未だその役割は完全に解明されていない。また、心筋細胞が障害を受けた際、p53 の発現に関してどの pathway が直接或いは間接的にコントロールしているか検討している研究は極めて少ない。今後心筋症においても p53 のタンパク発現のみに注目するのではなく、BTB-ZF など転写調節因子の検討も重要となると思われる。BTB-ZF は DNA 修復過程にも深く関わっているため、心筋障害における DNA 修復過程においてどのような役割をしているかを検討することが重要である。

E. 結論

本研究は心筋細胞において心筋障害における BTB-ZF の変化を初めて観察したものである。心筋細胞において ZBTB-7 は核内に常在発現しており、心筋症障害時の p53 発現のコントロールに深く関わっていると思われた。今後心筋障害および修復過程において ZBTB-7 の役割或いはその上流、下流の因子 ARF や Mdm2 (或いはそのほかのユビキチンライゲース) などの発現を観察することが重要である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

現在のところ発表なし。現在確認中である ARF の発現量、及び過剰発現或実験を確認次第、国内外の学会発表、論文にする予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところなし。

現在作成中の ZBTB-7 over-expression 及び knock-down 心筋細胞を樹立次第登録。同様に ARF 及び p53 についても同心筋細胞樹立後に登録予定。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋症における アディポネクチンの役割—

研究分担者：磯部 光章（東京医科歯科大学大学院循環制御内科学）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、拡張型心筋症・肥大型心筋症・拘束型心筋症などが含まれ、循環器疾患において予後不良な疾患群である。肥大型心筋症の病因は、家系解析による遺伝学的解析より、数種類の構造蛋白に起因することが明らかとなってきた。しかしながら、拡張型心筋症の病因・病態の解明はまだ十分ではないため、診断・治療に限界があるのが現状である。本研究班では、予後に関連する因子の同定を明らかにすべく、登録研究を進めた。画像診断の進歩に伴い、心臓 MRI 査や RI 検査などの心筋症の新たな分類診断・重症度診断における有用性を評価した。特発性心筋症の診断・治療への応用に向けて、次世代シーケンサー、iPS 細胞などを用いた先端的研究も進められてきた。これらの研究の推進のもと、心筋症に対する新たな診断・治療法の具現化に向けて、進める。

A. 研究目的

Adiponectin (APN) は、脂肪細胞から分泌される生体活性化因子でヒト血清に広く分布し、APN レセプター1 と 2 (AdipoR1 と AdipoR2) に作用し、抗糖尿病、抗動脈硬化作用を発揮する。基礎研究として、APN ノックアウトマウスは、肥満性インスリン抵抗性を示し、血管新生反応が抑制され、圧負荷後の心リモデリングも増悪した。一方、Doxorubicin (DOX) は非常に有用な抗腫瘍薬だが、進行性で用量依存性の心毒性を有することが問題である。以前の動物実験では、DOX が心筋細胞のアポトーシスを誘導することが示されており、AMPK とそのリン酸化を抑制すると、DOX 誘発性心筋症モデルで心筋細胞のアポトーシスが增加することも示されている。

この研究は、APN が DOX 誘発性心筋症マウスモデルにおいて心保護作用を有するかどうかを評価し、そのメカニズムを解明するのが目的である。

B. 研究方法

我々は、マウス APN 相補的 DNA が β -actin のプロモーター領域に挿入され全身臓器に過剰発現した、APN トランスジェニックマウスを用いた。In vivo 実験として、我々は、C57BL/6 マウス（野生型 (WT) マウス）、血清 APN 高濃度の APN トランスジェニックマウス (APN トランスジェニックセクス (APN-SE) マウス)、血清 APN 低濃度の APN トランスジェニックアンチセクス (APN-AS) マウスの 3 群

に DOX を腹腔内投与（週 1 回 4mg/kg を 6 週投与）して DOX 誘発性心筋症モデルを作成し、14 日後の予後および血清 APN 値、心機能評価を行った。In Vitro 実験として、我々は、新生仔 WT マウス心臓から分離した培養心筋細胞を、培養液に生理食塩水を加えた 12 時間後に DOX ($1 \mu\text{mol/L}$) を加えた生理食塩水 (Saline) 群、中濃度 APN ($30 \mu\text{g/mL}$) と DOX を加えた中濃度 APN (APN-medium) 群、高濃度 APN ($100 \mu\text{g/mL}$) と DOX を加えた高濃度 APN (APN-high) 群、AMPK 阻害剤 (AMPK-I) で 90 分間前処理を行った後に高濃度 APN と DOX を加えた AMPK 阻害剤 (APN-high + AMPK-I) 群、AMPK 活性化剤 (AICAR) で前処理を行い生理食塩水と DOX を加えた AICAR (Saline + AICAR) 群の 5 群に分け、メカニズム評価としてアポトーシス測定と、RT-PCR によるメッセンジャー RNA (mRNA) 発現量測定、Western blotting analysis による蛋白発現量測定を行った。

C. 研究結果

In vivo 実験において、血清 APN 値は、全群で 14 日後に基礎値より有意に低下し、APN-SE 群は WT 群の約 2 倍、APN-AS 群は WT 群の約半分であった。また、生存率は APN-SE 群は WT 群より有意に高く、APN-AS 群は WT 群より有意に低かった。DOX 誘発性心筋症の進行を示唆する収縮期血圧の低下、左室重量・体重比の減少、肺重量・体重比の増加、心エコーでの左室短縮率と左室壁厚の減少、心筋アポトーシス・線維化は全て、APN-SE 群で WT 群と APN-AS 群より有

意に抑制されていた。DOX 誘発性心筋症における mRNA と蛋白発現に関しては、AdipoR1 の発現は APN-SE 群で WT 群と APN-SE 群に比較して有意に維持されていたが、AdipoR2 の発現は 3 群で同様に低下していた。また、APN-SE 群では WT 群と APN-SE 群に比較して有意に、AMPK と抗アポトーシス因子 Bcl-2 の発現が亢進し、アポトーシス誘導因子 Bax の発現が低下していた。In vitro 実験においては、アポトーシスは、APN-high 群では APN-medium 群と Saline 群より有意に減少していたが、その効果は AMPK-I 投与群で抑制されていた。また、APN-high 群では APN-medium 群と Saline 群に比較して有意に、AMPK、Bcl-2 の発現が亢進し、Bax の発現が低下していた。また、APN-high 群ではミトコンドリア内の Cytochrome c が維持され、細胞質内 Cytochrome c および活性型 Caspase-3 が低下していた。さらに、高濃度 APN の心保護的作用は AMPK-I の投与によって抑制され、AICAR 投与にて賦活されていた。

D. 考察

今回我々は、In vivo および In vitro 実験において、APN が DOX 誘発性心筋症に対して心保護作用を有し、その心保護作用に AMPK 依存性の抗アポトーシス効果に関連していることを、世界で初めて示した。この結論は、APN を投与しても AMPK 阻害剤を投与すると抗アポトーシス効果が減弱することで、明らかに証明された。In vivo 実験においては、血清 APN 低値の APN-AS 群では、WT 群より DOX 誘発性心筋症による左室機能低下を示し、一方で血清 APN 高値の APN-SE 群では、WT 群より左室機能不全を減弱した。また APN が心筋細胞の組織学的アポトーシスを抑制することで、左室機能不全の進行を防ぐことと、AMPK シグナル経路が関与していることが示された。さらに In vivo および In vitro 実験において、DOX 投与後に血清 APN 濃度と AMPK リン酸化率が高いほど、Bcl-2 の発現が亢進し、Bax の発現が低下することが示された。これらの結果から、血清 APN 濃度と AMPK リン酸化率の高値が、ミトコンドリアを介したアポトーシスを抑制したことが示唆された。

E. 結論

APN は AMPK シグナルを介した抗アポトーシス効果により、DOX 誘発性心筋症において心保護的であることが示唆された。APN は、マウスの DOX 誘発性心筋症と心不全にお

ける治療的目標となりうるが、他の動物種でのさらなる評価が必要である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

論文発表のリスト

1. Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, Ishihara T, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation. *Cardiovascular Research* 89; 309-319; 2011

学会発表のリスト

1. Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, Ishihara T, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Adiponectin Protects Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Anti-Apoptotic Effects through AMPK Upregulation in Mice. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society; 2010, March 5-7; Kyoto, Japan
2. Konishi M, Haraguchi G, Ohigashi H, Ishihara T, Saito K, Nakano Y, Isobe M. Adiponectin Protects Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Anti-Apoptotic Effects through AMPK Upregulation in Mice. The 27th Annual Scientific Meeting, International Society for Heart Research; 2010, May 13-16; Kyoto, Japan