

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

—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—

研究分担者：後藤 雄一（国立精神・神経医療研究センター神経研究所）

＜研究要旨＞ ミトコンドリア DNA 変異により心筋症をはじめとするミトコンドリア病が発症することはよく知られた事実であるが、その主な原因とされている代表的な点変異は m.3243A>G や m.8344A>G などである。従来のミトコンドリア DNA 検査では、これら代表的な点変異の特異的検出が主体であり、高度先進として承認されているミトコンドリア病遺伝子診断も欠失検査以外には 10 個の点変異を調べる程度のものであった。しかしながら、ミトコンドリア病の認知が進み遺伝子検査が多くの症例で依頼されるようになったこと、シーケンス検査が比較的安価にできるようになってきたことなどから、ミトコンドリア全周シーケンス検査を進める必要がでてきた。そこで 3243 変異など 10 個の頻度の高い点変異を有しない 258 の症例でミトコンドリア DNA 全周シーケンスを行い、その中から頻度は低いが病因的と報告されている点変異 5 個、病因を証明できた点変異 3 個、病因の可能性のある点変異 20 個以上を同定できた。これらの結果を踏まえ、本検査の有用性と問題点を考察し、新たなミトコンドリア DNA スクリーニング検査の提案を行う。

A. 研究目的

ミトコンドリア DNA 変異により心筋症をはじめとするミトコンドリア病が発症することはよく知られた事実であるが、その主な原因とされている代表的な点変異は m.3243A>G や m.8344A>G などである。しかしながら、新しい病因的変異が数多く報告されるようになり、これまで行われている 10 種類程度の点変異検査では不十分なことが明らかになってきた。

そこで、ミトコンドリア全周シーケンス検査を行って、その有用性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センター病院では、先進医療としてミトコンドリア病の遺伝子検査を行っており、その内容は、サザン法及び long PCR 法による欠失検査、PCR+RFLP 法による点変異検査 (1555, 3243, 3271, 3291, 8344, 8356, 8363, 8993, 13513, 11778 の 10 種類) である。研究対象として、上記の欠失検査、点変異検査で変化を認めなかった 258 例について、患者骨格筋もしくは血液から分離した DNA を用いて、ミトコンドリア DNA 全周シーケンスを行い、標準的塩基配列（日本人 200 人）と比較した。

C. 研究結果

多くの正常人多型が見いだされた中で、MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>) に登録されている病因的変異を 5 個 (m.3252A>G 変異、m.5874T>G 変異、m.8296A>G 変異、m.10197G>A 変異、m.14459G>A 変異) を見いだした。また、MITOMAP には登録されていなかった新し変異 3 個 (m.3244G>A 変異、m.9155A>G 変異、m.11777C>A 変異) を見だし、これらは生化学的な機能解析を行うことで病因であることを証明できた。

さらに正常人には存在しない 20 種類以上の点変異が見いだされているが、生化学的な機能解析ができておらずその病因性が確定しない。しかし、その大部分は病因である可能性が高いと考えている。

D. 考察

頻度の高い欠失と 10 種類の点変異を除外した 200 例以上の症例で施行したミトコンドリア DNA 全周シーケンスの結果で、病因として確定していないものを含めると約 10% 弱の症例で病因となる、もしくは病因となる可能性のある点変異が見いだされている。この頻度はスクリーニング検査として十分高いと判断され、費用がある程度に抑えられればルーチン検査に加えるべきものと考えられる。

ただし、病因かどうかは不明は点変異が同定された場合に、病因かどうかを決定できる機能解析を行える研究室をバックにもっていることが不可欠であり、その意味で遺伝子検査以外の生化学検査や病理検査が可能な施設での施行が望ましい。

ミトコンドリア DNA 全周検査の有用性から、ミトコンドリア DNA 検査は、1. サザン法、long PCR 法による欠失検査、2. 3243 変異（等）の頻度の高いヘテロプラスミ一点変異の定量的検査、3. ミトコンドリア DNA 全周検査、という検査手順をルーチン検査として提唱したい。

E. 結論

ミトコンドリア DNA 検査、特に全周シーケン検査の有用性から、この検査法を含めた検査手順の変更を提唱した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degeneration of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18410-18415, 2010.

Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino Y, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I, Goto Y. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. *Ann Neurol* 68:845-854, 2010.

(学会発表)

後藤雄一、ミトコンドリア病の病態、診断。第 113 回日本小児科学会総会、盛岡、4.23、2010

新井ひでえ、田辺雄三、小俣卓、後藤雄一、三牧正和。基底核病変を認めた良性乳児型チトクローム c 酸化酵素欠損症と思われる姉弟例。第 52 回日本小児神経学会、福岡、5.20、2010

宮本雄策、栗原八千代、橋本修二、山本寿子、福田美穂、新井奈津子、神山紀子、村上浩史、瀧正志、小牧宏文、

後藤雄一、山本仁：Cytochrome c oxidase 欠損を伴う Leigh 脳症の兄弟例。第 52 回日本小児神経学会、福岡、5.20、2010

Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS: Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of TFAM. Gordon Research Conference: Mitochondria and Chloroplasts, Lucca, Italy, July 11-16, 2010

後藤雄一：ミトコンドリア病、教育プログラム「難治性疾患のマネージメントと新規治療法の展望」、日本人類遺伝学会第 55 回大会、大宮、10.30、2010

Goto Y. Whole mitochondrial DNA sequencing as a screening method of mitochondrial diseases. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Fukuoka, Japan, 12.18, 2010.

Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Nonaka I, Sher RB, Cox GA, Goto Y, Nishino I. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in muscle choline kinase beta defect. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Fukuoka, Japan, 12.16, 2010.

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

—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—

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

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

肥大型心筋症 (HCM) はサルコメア蛋白をコードする遺伝子が原因遺伝子であるが、変異により活性化される細胞内シグナルに関しては不明な点が多い。Myocyte enhancer factor-2 (MEF2) は Ca²⁺依存性肥大シグナルの下流に位置する転写因子であり、心筋細胞において活性化されると胎児性遺伝子を再発現させる。本研究の目的は、HCMの発症進展における MEF2 の関与を明らかにすることである。

B. 研究方法

MEF2-LacZ transgene を有する野生型マウス (WT/MEF2-LacZ) およびミオシン重鎖変異ノックインマウス (MHC^{403/+}/MEF2-LacZ) において、MEF2 活性の測定を行った。MEF2 活性は、β ガラクトシダーゼ活性の定量的アッセイ法により測定した。MEF2 活性を有する心筋細胞の組織学的分布は、β ガラクトシダーゼ染色および Gomori 染色により検討した。MEF2 の上流分子である class II HDAC の活性については、抗リン酸化 HDAC5 抗体と抗 HDAC5 抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。

C. 研究結果

心筋肥大発症前 (生後 3 週) の MHC^{403/+}/MEF2-LacZ マウス心では、WT/MEF2-LacZ と比較して MEF2 活性の

上昇は認められなかった。一方で、心筋肥大を発症した MHC^{403/+}/MEF2-LacZ マウス心 (生後 30 週) において、MEF2 活性は有意な上昇を認めた。

組織学的検討では、生後 30 週の MHC^{403/+}/MEF2-LacZ マウス心において MEF2 活性を認める心筋細胞は線維化組織周囲に集束して認められた。また、MEF2 により発現が制御される胎児性ミオシンの発現は、MEF2 活性陽性細胞の分布と一致して認められた。一方で、線維化組織を認めない MHC^{403/+}/MEF2-LacZ マウスの心筋領域および WT/MEF2-LacZ マウス心においては、孤発性の MEF2 活性陽性心筋細胞を認めるのみであった。重症 HCM を発症するホモ接合体変異マウス心 (MHC^{403/403}/MEF2-LacZ) においては、MEF2 は生後 3 日で心筋局所において活性化され、生後 6 日では MEF2 が活性化された心筋領域の一部が壊死に陥った。生後 6 日の MHC^{403/403}/MEF2-LacZ マウス心では、WT/MEF2-LacZ マウス心および MHC^{403/+}/MEF2-LacZ マウス心と比較して HDAC5 のリン酸化シグナルの有意な上昇が認められた。

D. 考察

サルコメア遺伝子変異による HCM の発症進展機序の中でも、特に心筋細胞壊死から心筋線維化を来す細胞内伝達経路については不明な点が多い。今回の研究結果より、(1) MEF2 及び胎児性ミオシンが局所心筋において活性化さ

れること、(2) その後、MEF2 活性を認める心筋領域が壊死に陥り線維化組織に置き換わること、が明らかとなった。MEF2 活性化による胎児性遺伝子の発現は、心筋虚血に代表される心筋ストレスに対して短期的には代償的な役割を果たすことが報告されている。したがって、HCM マウス心で認められた MEF2 の活性化は、局所心筋ストレスに適応するための代償機転であると考えられた。すなわち、MEF2 活性化による適応が局所ストレスを代償可能であれば心筋細胞はストレス下においても生存可能であるが、代償が十分でない領域においては心筋細胞死に至り、最終的には線維組織に置換されるものと考えられた。また、長期的な胎児性遺伝子の発現は病的リモデリングを来すことが報告されているため、MEF2 活性化により局所心筋ストレスを代償した心筋細胞であっても、長期的には病的リモデリングが進行し心機能の悪化や心室性不整脈の原因となる可能性があると考えられた。

E. 結論

HCM における心筋細胞壊死・線維化の発症進展に、MEF2 活性化による胎児性遺伝子の発現が関与していることが示唆された。MEF2 活性を制御することにより心筋線維化を抑制することが可能か否かについて、今後検討を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

< 論文発表 >

Funada A, Konno T, Fujino N, Muramoto A, Hayashi K, Tsubokawa T, Sakata K, Kawashiri MA, Takeda Y, Ino H, Yamagishi M. Impact of renin-angiotensin system polymorphisms on development of systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Evidence from a study of genotyped patients. *Circ J*;74 巻:2674-80 頁. 2010 年.

Funada A, Masuta E, Fujino N, Hayashi K, Ino H, Kita Y, Ikeda H, Fujii T, Nakanuma Y, Yamagishi M. Heterogeneity of clinical manifestation of hypertrophic cardiomyopathy caused by deletion of lysine 183 in cardiac troponin I gene. *Int Heart J*;51 巻:214-7 頁.

2010 年.

< 学会発表 >

Funada A, Fujino N, Masuta E, Ino H, Yamagishi M. Angiotensin-converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphisms Contributes to Favorable Clinical Courses of Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Gene Mutations. アメリカ心臓学会 (ACC) 年次学術集会 2010 年.

Muramoto A, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Masuta E, Funada A, Sakamoto Y, Yokawa J, Ino H, Yamagishi M. Impact Of Dual Mutations Of Sarcomere Gene On Clinical Manifestation Of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With Myosin-binding Protein C Gene Mutation: Evidence From Serial Analysis Of 50 Genotyped Patients. アメリカ心臓学会 (ACC) 年次学術集会 2010 年.

Yokawa J, Masuta E, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, Funada A, Sakamoto Y, Tsubokawa T, Muramoto A, Ino H, Yamagishi M. Impact of Extent of Myocardial Fibrosis on Occurrence of Ventricular Tachyarrhythmia in Hypertrophic Cardiomyopathy: Results from MRI with Late Gadolinium Enhancement Study in Genotyped Patients. アメリカ心臓学会 (ACC) 年次学術集会 2010 年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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

—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—

研究分担者：木村 剛（京都大学大学院医学研究科循環器内科学）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

特発性心筋症患者の多くにおいて心臓のポンプ機能が低下し心不全に陥る。また、心不全の程度は特発性心筋症患者の重症度を規定する大切な因子の1つである。

心不全は心筋のエネルギー代謝異常を伴い、エネルギー代謝の変化は心不全の進行に重要な役割を果たしていると考えられている。心筋代謝エネルギー代謝は大きくわけて3つの要素からなる。まず、糖や脂肪酸などがエネルギー基質として取り込まれ分解されてミトコンドリアのTCA回路に入る。次に、ミトコンドリアで酸化的リン酸化によりATPが産生される。ミトコンドリア呼吸鎖の活性低下はエネルギー供給の低下をもたらす。ミトコンドリアでATPとして産生された高エネルギーリン酸はクレアチン・リン酸として貯蔵される。心不全患者ではリン酸化クレアチンの低下が認められ、症状と予後に相関する。

B. 研究方法

心不全におけるエネルギー代謝変化のメカニズムや、その変化が心不全進行において保護因子なのか悪化因子かは未だ明らかではない。その原因のひとつとして、これまでの心筋代謝研究では、様々な背景を持つ患者や種々の動物モデルを用いて、異なる手法で解析した結果をもとに、解釈が試みられていたからである。そこで、我々は、遺伝的に均一な心不全モデルラット（ダール食塩感受性ラット）を用い心肥大から心不全への移行における心筋エネルギー代謝の変化を包括的に検討した。

ギー代謝の変化を包括的に検討した。

C. 研究結果

ダール食塩感受性ラットに6週齢から高食塩餌を投与し、高血圧を発症させた。ラットは11週齢で代償性心肥大をきたし17週齢から19週齢で心不全にて死亡した。心肥大から心不全への移行に伴い心筋エネルギー代謝のプロファイルは大きく変化した。すなわち、心不全ではリン酸化クレアチンが低下し、脂肪酸から糖へのエネルギー基質のシフトが見られ、ミトコンドリア機能関連遺伝子の発現低下を認めた。

メタボローム解析でエネルギー代謝に関連する、解糖系、TCA回路、アミノ酸、核酸などの代謝産物を測定すると、心不全で解糖系から分岐するペントース・リン酸経路が活性化されていることが明らかとなった。ペントース・リン酸経路は還元物質であるNADPHを作り細胞内の酸化還元状態を調節する。よって、心不全における糖代謝の亢進はペントース・リン酸経路の活性化を介して心不全に伴う酸化ストレスを軽減することにより心不全を改善している可能性が示唆された。さらに糖代謝を亢進する薬剤であるジクロロアセテートは心機能を改善し心不全の進行を予防した。

また、メタボローム解析によりペントース・リン酸経路以外にもアミノ酸など心不全の進行に伴い心筋組織中濃度が変化する代謝産物が同定され、将来心不全重症度のバ

バイオマーカーとなる可能性が示された。

D. 考察

心不全の進行に伴い心筋エネルギー代謝はダイナミックに変化した。また、現在心不全の標準治療薬であるアンジオテンシン変換酵素/アンジオテンシン受容体拮抗薬や交感神経β遮断薬が心臓のエネルギー需要を減らすことは、心筋エネルギー代謝への介入が心不全治療につながる可能性を示唆する。一方で心不全に伴い悪疫質は全身のインスリン抵抗性など全身の代謝異常も引き起こされる。

今後は心不全に伴う心臓と全身のエネルギー代謝にたいして栄養管理、リハビリテーション、代謝調節薬などによる包括的な介入が、1つの心不全治療の形として検討されるべきであると考えられる。この場合、ハードルとなりうるのは、代謝ネットワークの頑強さ (robustness) である。これについては標的分子のさらなる選定や多剤介入に必要性が検討されるべきである。また、ダイナミックに変化する心臓の代謝状態を評価するための手法 (画像診断やバイオマーカーなど) が開発される必要がある。

E. 結論

①小動物心不全モデルにおいて包括的に心臓エネルギー代謝を計測することに成功した。②新規技術であるメタボローム解析により、心不全・特発性心筋症の重症度指標となりえる小分子代謝産物を同定した。③エネルギー代謝の調節により心不全治療が可能である可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 3:420-30; 2010.

Kawashima T, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Takemura G, Kita T, Kimura T, Shioi T. Constitutive SIRT1

overexpression impairs mitochondrial function in mice. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 13-17, 2010, Chicago, USA

Niizuma S, Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, Kato T, Tamaki Y, Kawamoto A, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Kimura T, Shioi T. A constitutive activation of phosphoinositide 3-kinase modifies cardiac aging in mice. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 13-17, 2010, Chicago, USA

Okuda J, Niizuma S, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Kita T, Kimura T, Shioi T. Overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, induces proinflammatory response and impairs cardiac function. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 13-17, 2010, Chicago, USA

Tamaki Y, Iwanaga Y, Okuda J, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Shioi T, Ono K, Koshimizu T, Miyazaki S, Kita T, Kimura T. Metastasis-associated protein S100A4 contributes to cardiac fibrosis through the modulation of PTEN. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 13-17, 2010, Chicago, 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

—拡張型心筋症発症における CaMKII δ と p53 の役割—

研究分担者：小室 一成（大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学）

＜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

心疾患による死亡は、悪性腫瘍に次ぐ日本人の死因の第2位であり、ここ数年人口 1,000 人あたり約 100 人が心疾患により死亡している。心疾患死の原因は、虚血性心疾患や高血圧性心疾患、心筋症（肥大型心筋症、拡張型心筋症など）など多岐にわたる。これまでの多くの研究や治療法の開発により、高血圧性心疾患や虚血性心疾患の予後は改善してきているが、心不全の原因疾患のひとつである拡張型心筋症の予後は、現在でも 10 年生存率 50%程度と非常に不良である。我が国においても 1997 年 10 月に「臓器移植に関する法律」が施行され、1999 年から 2010 年までに 90 人弱に心臓移植が実施されたが、日本における心臓移植は絶対的にドナーが不足した状態であり、2011 年 3 月時点での移植待機患者数は 172 名、そのうち 4 割以上の患者さんの待機期間は 2 年を超えている。今後も心臓移植により加療できる患者数は限られていると言わざるを得ず、新たな治療法の確立が切望されている。近年の分子生物学的研究の進展に伴い、拡張型心筋症の約 30%は遺伝子変異によることが明らかとなってきた。しかしながら、遺伝子変異より心不全に至る機序については未だ不明であり、今後新しい治療法を開発するには、この分子機序の解明が必要であると思われる。そこで本研究では、既に報告のある変異遺伝子を導入することにより拡張型心筋症モデルマウスを作成し、遺伝子変異より心不全が発症する分子機序を明らかにすることをその目的とした。

B. 研究方法

我々は、ヒト拡張型心筋症の原因として既に報告のある変異心筋 α アクチン遺伝子をマウスの心臓に過剰発現したトランスジェニックマウスを作成し、この拡張型心筋症モデルマウスを用いて拡張型心筋症の発症機序の解明を試みた。

C. 研究結果

変異型心筋 α アクチン遺伝子を心臓に過剰発現したトランスジェニックマウスは、左室内腔拡大および心収縮力低下が週齢とともに進行し、40 週齢までに約半数が死亡した。したがってこのマウスはヒトの拡張型心筋症の病態モデルとして有用であると考えられた。

そこでこのマウスを用いて拡張型心筋症発症機序の解明を試みた。これまでの研究から癌抑制遺伝子である p53 が心不全の進展に関与することが明らかにされていた。そこでこのモデルマウスの心臓における p53 の発現について検討したところ、p53 およびその標的遺伝子である Bax の蛋白レベルが拡張型心筋症モデルマウスで増加していた。心筋症の病態における p53 の役割をさらに検討するために p53 ヘテロノックアウトと交配し、p53 発現量を低下させたところ、心機能の改善、Bax 発現量の低下、心筋細胞死の減少が認められ、p53 により誘導される心筋細胞アポトーシスの増加が、拡張型心筋症の発症に重要であると考えられた。

次に p53 蛋白レベルの増加の機序に関して、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK) II δ に着目し検討を行っ

た。拡張型心筋症モデルマウスの心臓においては CaMKII δ の発現量が増加しており、さらに CaMKII δ の標的蛋白であるホスホランパンのリン酸化レベルが増加していたことから、CaMKII δ の活性も上昇しているものと考えられた。また、心筋症の病態における CaMKII δ の役割をさらに検討するため、CaMKII δ 阻害薬である KN-93 を用いて検討を行った。拡張型心筋症モデルマウスに 2 ヶ月齢より 5 ヶ月齢まで KN-93 を osmotic mini-pump を用いて投与したところ、心内腔の拡大や心収縮力の低下は改善し、p53 の発現量増加も軽減した。CaMKII δ の inhibitory peptide である AC3-I を過剰発現したトランスジェニックマウスと心筋症モデルマウスを交配して作成したダブルトランスジェニックマウスにおいても、同様に心機能の改善と p53 発現量の低下が認められた。これらの結果は CaMKII δ が p53 の発現を誘導していることを示唆するものと考えられた。

CaMKII δ 活性化のメカニズムを明らかにするために、心筋の Ca 感受性について検討したところ、拡張型心筋症モデルマウスから単離した心筋においては Ca 感受性の低下を認めた。しかしながら心筋 calcineurin 活性はむしろ拡張型心筋症モデルマウスにおいては上昇しており、心筋 Ca 感受性の低下が二次的に局所の Ca シグナルを活性化し、CaMKII δ 活性化を引き起こしているものと考えられた。

D. 考察

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

一方、CaMKII δ は、心筋梗塞後の予後や致死性不整脈への関与が指摘されており、またその過剰発現マウスが拡張型心筋症様病態を呈することから、心疾患における役割が注目されている。今回の検討では拡張型心筋症モデルマウスにお

いて CaMKII δ の発現量が増加しており、さらに、その機能を阻害することにより、p53 の発現量が低下し、心機能が改善したことから、CaMKII δ の活性化が p53 発現誘導を介して心機能低下を来している可能性が考えられた。また、拡張型心筋症モデルマウスにおいては Ca 感受性が低下しており、これが二次的に局所の Ca シグナルを活性化し、CaMKII δ の活性が亢進するものと考えられた。

E. 結論

遺伝子変異により拡張型心筋症が発症する分子機構として、変異心筋遺伝子の発現により Ca 感受性が低下し、二次的に局所の Ca シグナルが活性化するために CaMKII δ が活性化され、それが p53 の発現を介して心筋細胞死を誘導している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

1. Toko H, Komuro I et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 122:891-9, 2010.
2. Shimizu I, Komuro I et al. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest* 120:1506-14, 2010.
3. Naito AT, Komuro I et al. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res* 106:1692-702, 2010.
4. Ueda K, Komuro I et al. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest* 120:2016-29, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

特発性心筋症に関する調査研究

—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—

研究分担者：中谷 武嗣（国立循環器病研究センター移植部）

＜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

心不全に対する各種治療法の進歩により、その治療成績は向上してきた。しかし、高度心筋障害を伴う心不全では心臓ポンプ機能を代替する必要があるため、補助人工心臓（VAS）や心臓移植が考慮される。しかし、我が国の心臓移植ドナーの不足は深刻であり、心臓移植待機患者の多くが左心補助人工心臓（LVAS）装着下に長期間待機を必要としており、平均待機期間も 870 日を超えるようになってきている。このため、待機中の死亡率も低くなく、LVAS 術後の強心剤の長期使用は予後不良因子である。LVAS を用いた治療へ移行するタイミングを適切に判断することが重要である。右心機能は LVAS 装着後の予後に関連することが報告されているが、LVAS 植込み術前に、術後の右心不全をひとつのパラメーターで予測することは難しい。そこで、今回、我々の提唱した心ポンプ機能が、LVAS 装着後の強心剤離脱困難症例を予測できるか検討を行った。

B. 研究方法

2001 年 4 月から 2009 年 6 月までの間に当センターにて LVAS 装着術を行った連続 66 症例を対象とした。しかし、このなかで、術前に右心カテーテル検査を行っていない症例（3 症例）および右心カテーテル検査時に PCPS を使用していた症例（2 症例）は除外し、61 例で検討を行った。LVAS 装着術前の右心カテーテル検査結果（右房圧、肺動脈楔入圧、心拍出量）から、我々の提唱した包括的循

環平衡モデルを用いて、心臓ポンプ機能（Starling 曲線を対数関数で近似した時の傾き）を右心（SR）及び左心（SL）に分離して評価した。LVAS 装着術後 30 日以上強心剤（DOA、DOB、PDE3I）を使用していた群（Gr. A）と 30 日未満で強心剤から離脱した群（Gr. B）に分けて比較した。

C. 研究結果

LVAS 装着術後 30 日の時点において 23 人（38%）は強心剤の投与を必要とし（Gr. A）、38 人（62%）は強心剤の投与を必要としなかった（Gr. B）。LVAS 装着術前の右心カテーテル検査データでは、個々のパラメータはいずれも両群間で有意差はなかった。左心ポンプ機能の指標である SL も両群間で有意差はなかった。一方、右心ポンプ機能の指標である SR は Gr. A で有意に低かった。Gr. B は有意に生存率が高かった。

D. 考察

：近年使用が始まった植込型非拍動流 LVAS は、設定された回転数で持続的に駆出し、かつ左室内圧と血圧の差により駆出量が変化する特性を持つ。そのため、植込型非拍動流 LVAS より安定した循環補助を得るためには自己右心機能が保たれていることがより重要で、装着タイミングの決定において自己右心機能の的確な評価が不可欠と考えられる。今回の検討より「包括的循環平衡モデル」を用い

て自己右心機能の評価することが LVAS 導入判断の一助となり得ると考えられた。

E. 結論

LVAS 装着術後の強心剤離脱困難患者では、術前の SR が有意に低かった。これは術前からの右心不全の存在が示唆される。LVAS 装着術前の SR を評価することによって、LVAS 導入判断の一助となる可能性があるものと考えられた。LVAS により長期補助が可能となってきたが、術前状態が不良な症例の成績は不良であった。今後、装着時期の検討が必要である。

F. 健康危険情報

現状では特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

中谷武嗣：心臓移植。「循環器疾患最新の治療 2010-2011」[編集 堀 正二、永井良三] (南江堂、東京) :279-282, 2010

築瀬正伸、中谷武嗣：心臓移植交代関連拒絶反応の診断と治療。心臓 42:20-25, 2010

中谷武嗣：心臓移植。「循環器臨床 サビア 8 心不全の急性期対応」[責任編集 北風政史、編集協力 金 智隆] (中山書店、東京) : 194-201, 2010

2. 学会発表

Nakatani T. Changes in healthcare reform in Asia. ASAIO 56th Annual Conference, シンポジウム, 2010.5.27-29. Baltimore, U.S.A

Murata Y, Shishido T, Seguchi, O, Yanase M, Fujita T, Toda K, Uemura K, Sugimachi M, Nakatani T.

Preoperative right ventricular pump function predicts the feasibility of weaning from inotropic support after implantation of left ventricular assist system. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, ポスター, 2010.9.23-26, Fukuoka, Japan

Nakatani T. J-MACS: VAS database in Japan. 18th Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps, 2010.10.14-16, Berlin, Germany

中谷武嗣：Japanese registry for mechanically assisted circulatory support の目的と今後への期待。第 38 回人工心臓と補助循環懇話会、2010.2.26-27, 諏訪

Toda K, Fujita T, Hori Y, Sekiguchi K, Murata K,

Yanase M, Yagihara T, Nakatani T: Multidisciplinary approach for severe heart failure using LVAS. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会、シンポジウム、2010.3.5-7、京都

村田欣洋、高木 洋、瀬口 理、築瀬正伸、藤田知之、戸田宏一、後藤葉一、中谷武嗣：心肺運動負荷試験は左室補助人工心臓離脱の指標となりうるか？第 16 回心臓リハビリテーション学会、2010.7.17-18、鹿児島

Toda K, Fujita T, Domae K, Yanase M, Murata Y, Seguchi O, Kobayashi J, Nakatani T: Aortic insufficiency in long-term mechanical circulatory support. 長期左心補助人工心臓治療に合併する大動脈弁閉鎖不全症。第 14 回日本心不全学会学術集会、シンポジウム、2010.10.7-9、東京

築瀬正伸、村田欣洋、瀬口 理、堀 由美子、渡邊裕美子、和田恭一、橋本修治、植田初江、吉牟田剛、藤田知之、戸田宏一、中谷武嗣：心臓移植後慢性期管理の問題点。第 29 回日本心臓移植研究会学術集会、シンポジウム、2010.10.9、東京

築瀬正伸、瀬口 理、村田欣洋、中谷武嗣：心臓移植待機患者における自己右心機能評価の重要性。第 46 回日本移植学会総会、シンポジウム、2010.10.20-22、京都

藤田知之、戸田宏一、築瀬正伸、瀬口 理、村田欣洋、堀由美子、小林順二郎、植田初江、中谷武嗣：マージナルドナーが心臓移植術後経過に与える影響。第 46 回日本移植学会総会、ワークショップ、2010.10.20-22、京都

戸田宏一、藤田知之、中嶋博之、島原佑介、武輪能明、巽英介、中谷武嗣、小林順二郎：補助人工心臓治療 101 例の中長期成績と新しい治療戦略。第 63 回日本胸部外科学会定期学術集会、シンポジウム、2010.10.24-27、大阪

中谷武嗣、佐瀬一洋、押山広明：補助人工心臓市販後レジストリ(J-MACS)。第 48 回日本人工臓器学会大会、シンポジウム、2010.11.18-20、仙台

戸田宏一、小林順二郎、藤田知之、築瀬正伸、瀬口 理、村田欣洋、中谷武嗣：当院での埋込型補助人工心臓治療成績の検討：体外設置型との比較。第 48 回日本人工臓器学会大会、シンポジウム、2010.11.18-20、仙台

藤田知之、戸田宏一、築瀬正伸、瀬口 理、村田欣洋、中谷武嗣、小林順二郎：LVAS 装着患者における脳出血の発生原因と対策。第 48 回日本人工臓器学会大会、2010.11.18-20、仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

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

一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—

研究分担者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学第1内科）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

2000年のヒトゲノム概要配列の決定、2003年の精密配列の決定をもってヒトゲノムプロジェクトは完了し、その情報は医療を含む多方面に活用されつつある。その進歩とともにハードウェアの革新も進み、現在では次世代シーケンサーが広く生命科学の分野で用いられつつある。次世代シーケンサーの特長は従来のサンガー法を用いたキャピラリーシーケンス法に比し、大量のデータを超高速にしかも安価に行えるという点である。現在までに次世代シーケンサーを用いた疾患責任遺伝子の同定が数例報告されている。今回我々はこの次世代シーケンサーを特発性心筋症の診断に応用し、家族性 DCM 責任遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

奈良県立医大付属病院通院中の家族性拡張型心筋症 (DCM) 患者 5 名、同家系内健常者 1 名、家系外 DCM 患者 1 名、家系外健常者 1 名から DNA を採取し、エクソン部分のみを選択した後、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスを施行した。次世代シーケンサーによるシーケンス後は、家系内健常者を 5 名に増やし、サンガー法によるキャピラリーシーケンスで遺伝子変化を確認した。また、家族性 DCM 患者 5 名のうち、経過中に亡くなった 3 名の剖検心組織および、心臓病以外で亡くなった 1 名の剖検心組織に対し、質量顕微鏡によるメタボローム解析を施行した。

なお、本研究は関係機関全ての倫理委員会承認を受けたうえで行った。また参加者またはその家族には十分な説明を行い、同意を得たうえで、連結可能匿名化の後に研究を行った。

C. 研究結果

8 名に対する全エキソームシーケンシングの結果、平均カバレッジは 20 であり、78,139 個の SNP が検出された。このうち家族性 DCM 発症者に特異的な SNP を選択すると 107 個の候補が抽出された。1000 人ゲノムプロジェクトで明らかにされた common SNP を除外しても 20 個の候補が残された。質量顕微鏡法による解析では、コントロールとして用いた非心臓病患者心筋に比し、患者心筋でリン脂質の一種で細胞膜主要構成成分である phosphatidylcholine (PC) の濃度低下が認められた。上記 20 個の SNP のうち、PC の代謝に関わりを持つ遺伝子として *LMNA* 遺伝子が疾患責任遺伝子の候補と考えられた。*LMNA* 遺伝子をターゲットとして、家族性 DCM 患者 5 名および家系内非発症者 5 名に対し、サンガー法によるシーケンスを行ったところ、発症者にのみ特異的に heterogenous な SNP が認められ (R225X)、この変異が本家族性 DCM 責任遺伝子と考えられた。

D. 考察

次世代シーケンサーの技術革新により、これを応用した

疾患責任遺伝子の同定が試みられ、公表されてきている。次世代シーケンサーは従来のサンガー法に比し、10 万倍以上もの情報量を一度の解析で得られることができる反面、その情報量が膨大であるがゆえに、塩基情報の統合、参照配列へのマッピング、遺伝子のアノテーションといった、インフォマティクス部分に多大な労力を要する。さらに疾患責任遺伝子を同定する場合、候補が多数挙げられるため、その絞り込みに難渋する結果となる。

本研究では、家族性 DCM 責任遺伝子同定のため次世代シーケンサーを利用した。一回の解析に 8 検体を同時に測定したため、一般的に提唱されている 30 回という必要カバレッジ数に比し低いカバレッジ数となり、シーケンスのデータ精度は低くなった。しかし、絞り込みの段階でゲノム解析情報にメタボロミクス解析手法である質量顕微鏡法の結果を統合し、効率よく候補 SNP の絞り込みを行うことができ、疾患責任遺伝子の同定に成功した。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた疾患責任遺伝子の同定は、非常に強力なツールであるが、情報量が多すぎるがゆえに絞り込み作業に難渋する。今回の結果から、インフォマティクスの活用に加えて質量顕微鏡法を用いたメタボロミクスも統合することで、疾患責任遺伝子をより正確に同定できると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Saito Y, Kishimoto I, Nakao K
Roles of Guanylyl Cyclase-A Signaling in Cardiovascular System.
Canadian J Physiology and Pharmacology. 2011 (in press)
Okada S, Morimoto T, Ogawa H, Kanauchi M, Nakayama M, Uemura S, Doi N, Jinnouchi H, Waki M, Soejima H, Sakuma M, Saito Y, for the Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes (JPAD) Trial Investigators.
Differential Effect of Low-Dose Aspirin for Primary Prevention of Atherosclerotic Events in Diabetic Management: A Subanalysis of the JPAD Trial.
Diabetes Care. 2011 (in press)
Saito Y, Morimoto T, Ogawa H, Nakayama M, Uemura S, Doi N, Jinnouchi H, Waki M, Soejima H, Sugiyama S, Okada S, Akai Y

Low-dose Aspirin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Reduced Glomerular Filtration Rate: Subanalysis from the JPAD Trial.

Diabetes Care. 34:280-285, 2011

Uesugi Y, Kawata H, Jo J, Saito Y, Tabata Y

An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy.

J Control Release. 15:147:269-77, 2010

Onoue K, Zaima N, Sugiura Y, Isojima T, Okayama S, Horii M, Akai Y, Uemura S, Takemura G, Sakuraba H, Sakaguchi Y, Setou M, Saito Y

Imaging Mass Spectrometry to Accurately Diagnose Fabry's Disease.

Circ J. 24:75:221-3, 2010

Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Hasegawa H, Nose M, Saito Y
Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models.

Am J Physiol Renal Physiol. 299:F207-16, 2010

Harada K, Miyamoto Y, Morisaki H, Ohta N, Yamanaka I, Kokubo Y, Makino H, Harada-Shiba M, Okayama A, Tomoike H, Okamura T, Saito Y, Yoshimasa Y, Morisaki T

A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated with hypercholesterolemia.

J Atheroscler Thromb. 26:17:131-40, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

齋藤 能彦

特願 2010-120535 「血栓溶解酵素含有複合体」

特発性心筋症に関する調査研究

—拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討—

研究分担者：松崎 益徳（山口大学大学院医学系研究科器管病態内科学教授）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

拡張型心筋症（DCM）の発症と進展機序には、①ウイルス性心筋炎後の慢性化機序や②自己免疫機序、③ウイルス再感染説等の諸説が推察されている。我々は本班会議でマウスウイルス性心筋炎・慢性期において、同種同量の Cocksackie virus B3 (CVB3) を再接種することにより、再感染が成立し、抗体価の上昇と著明な心拡大を来すことを報告し、ウイルス再感染が何らかの抗心筋抗体産生を引き起こし、自己抗体が DCM の発症に関与している可能性を示唆している。そこでマウスとヒト DCM 患者のそれぞれの血清及び心筋生検組織を用いて自己抗原のプロテオミクスを行い、ヒト DCM の発症と進展機序を免疫学的に解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. マウス再感染血清

CVB3 にて再感染させたマウス血清を 2-dimensional Western blotting にて展開した正常マウス心筋（膜分画）と反応させた。Anti-Mouse IgM 抗体処理にて得られたドットを LC-MS/MS 法にて質量解析を行い同定した。

2. 患者血清

研究同意を得た DCM 患者（4名：平均年齢 55.3 歳）の血清を 2-dimensional Western blotting にて展開したヒト心筋蛋白（膜分画）と反応させた。二次抗体処理にて得られたドットを MALDI-TOF/MS にて蛋白同定を行っ

た。

3. 心筋生検組織

研究同意を得た心筋炎及び心筋症患者に於ける心内膜心筋生検組織の蛋白電気泳動を行った。ミトコンドリア蛋白の発現は正常心筋をコントロールとし、比較定量を行った。

4. マウスへの抗体投与実験

6 週齢♂A/J マウスの下大静脈より抗ミトコンドリア抗体を投与し、組織学的、かつ超音波検査にて解析した。酸化ストレスの定量化は dHE 染色法にて行った。

5. マウス培養心筋細胞を使用した実験

（倫理面への配慮）

患者血清を使用した臨床研究に際しては、山口大学病院倫理委員会の審査を経たプロトコールに則り施行されている（H17-12: 心筋炎・心筋症における抗心筋自己抗体の研究）及び（H18-51: 拡張型心筋症における疾患特異的蛋白の検索）。臨床研究に当たっては患者本人または代理人から研究同意書を取得した上で、倫理面は最大限に配慮し、厳格な個人情報の管理の元で行った。

C. 研究結果

マウス再感染モデルの血清から、心筋細胞膜蛋白の自己抗原として hsp60、また細胞質蛋白より Thrombomyosin、ATPase β chain、 α -cardiac actin が同定された。DCM の患者血清からは、aconitase、flavoprotein precursor、

acyl-Coenzyme A dehydrogenase や voltage-dependent anion channel に対する自己抗体が同定された。マウスとヒト DCM の双方のプロテオーム解析を行った。ヒト DCM 患者血清のからも動物モデルと同様に数種類の候補抗原(蛋白)が同定された。候補抗原の多くはミトコンドリア内蛋白であった。DCM 患者において、心筋組織中の NDUFV1 の発現量と左室拡張末期径は負の相関を、aconitase の発現量と左室収縮末期径は正の相関を示した(図1)。マウス培養心筋細胞における抗ミトコンドリア(NDUFV1)抗体投与により、抗 NDUFV1 抗体はマウス培養心筋細胞の細胞質に多く取り込まれた(図2)。

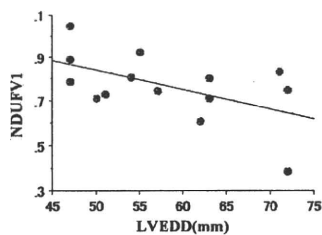


図1

NDUFV1 の心筋内発現量と左室拡張末期径には負の相関を認めた ($R^2=0.291$, $p<0.05$)。

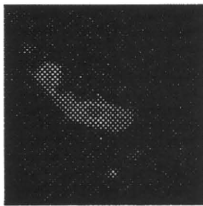


図2

抗 NDUFV1 抗体はマウス培養心筋細胞の細胞質に多く取り込まれた。

D. 考察

心筋ミトコンドリア内の NDUFV1 の低下は活性酸素の産生を増加させ、心拡大や心機能低下の一因となる可能性が示唆された。

E. 結論

DCM の発症と進展には抗ミトコンドリア抗体が関与している可能性が示唆された。プロテオーム解析による候補抗原の同定と、vitoro 実験による機能解析は DCM の発症機序解明の一助となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

- Ono H, Nakamura H, Matsuzaki M: A NADH dehydrogenase ubiquinone favoprotein is decreased in patients with dilated cardiomyopathy. *Internal Medicine*. 49: 2039-2042, 2010.
 - Matsushima M, Nakamura H, Umemoto S, Matsuzaki M: Regulation of cardiac regeneration by ACE inhibition following donor heart myocardial infarction after heterotopic transplantation in Tg mice. *Circulation Journal*. 72(5): 793-799, 2008.
 - Takata S, Nakamura H, Umemoto S, Yamaguchi K, Sekine T, Kato T, Nishioka K, Matsuzaki M: Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy. *Circulation Journal* 68(7): 677-682, 2004.
- 2) 学会発表
- 中村浩士、小野ひとみ、松崎益徳：マウスウイルス性心筋炎に対する dexamethasone の効果. 第 1 回 Molecular Cardiovascular Conference II (北海道/2010 年 9 月 4 日)
 - 中村浩士、松崎益徳：ウイルス性心筋炎に対するグルココルチコイドの心筋保護作用の検討. 第 58 回日本心臓病学会学術集会 (東京/2010 年 9 月 17 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 中村浩士、松崎益徳、吉田勉、山口 TLO：広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法 (特開：2002-209473)
- Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida：An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine. (米国特許：10/141608)
- 中村浩士、松崎益徳、山口 TLO：分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法 (特開 2004-044096)

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

—リコンビナント Tfam 導入による NFAT 活性化抑制作用の検討—

研究分担者：砂川 賢二（九州大学循環器内科）

<研究要旨> 特発性心筋症は、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

これまでの研究から、不全心筋においてミトコンドリア機能の低下がその増悪機転に寄与していることが明らかとなっているが、その中でも特に、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数の維持が重要であることが示されている。現時点で、ミトコンドリア DNA 量の調節には、

Transcriptional factor A (Tfam) が関与することが知られており、Tfam の過剰発現が心筋梗塞後モデルマウスの予後を著しく改善することから、その治療ターゲットとなることが示唆される。

一方で Tfam は、HMG 配列を 2 カ所に持つタンパクであり、細胞内にとりこまれる機構をもつことが知られている。本研究では、リコンビナント Tfam が新たな治療ツールとして心筋細胞にとりこまれ、機能するかについて検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) リコンビナント Tfam タンパクの精製

リコンビナント Tfam について、ミトコンドリア標的部 (MTS) ありの Tfam (Tfam with MTS) および、MTS なしの Tfam (Tfam without MTS) を作成した。(Fig.1)

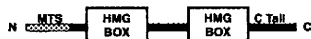


Figure.1

2) 心筋細胞の単離

仔ラット心筋細胞を単離し、24 時間経過した後に、実

験を行った。

3) ミトコンドリア DNA の定量

Real time PCR を用いて、核 DNA として Antithrombin III で標準化した値を相対的ミトコンドリア DNA 量として算出した。

4) NFAT 活性化の評価

アデノウイルスによって GFP-NFAT4 を遺伝子導入し、アンジオテンシン II (AT-II) およびエンドセリン-1 (ET-1) によるその核内移行を評価した。また、pNFAT-Luc を細胞内に導入することで、NFAT のリポーターアッセイを行い、その活性化を評価した。

5) 心筋細胞の肥大の評価

ファロイジンを用いて、心筋細胞の肥大について評価した。

C. 研究結果

培養液中に添加したリコンビナント Tfam タンパクは速やかに細胞内に入り、MTS ありの Tfam の場合は、細胞質、一部はミトコンドリアに局在し、MTS なし Tfam の場合は、核へ局在することが明らかとなった。(Fig. 2) さらに、MTS 付き Tfam では、10nM で 12 時間～24 時間をピークに mtDNA のコピー数が増加することが示された。

このリコンビナント Tfam タンパク (MTS あり) が、細胞内でリモデリングにかかわるシグナルを抑制するかどうかについて検討した。MTS 付きリコンビナント Tfam

は、アデノウイルスにより導入した GFP-NFAT の AT-II, ET-1 による核内移行を抑制し(Fig 4), pNFAT-Luc のリポーターアッセイでは、NFAT の活性化が抑制された。結果として、これらのリモデリングを来す刺激に対して生じる細胞肥大を抑制した。(Fig5)

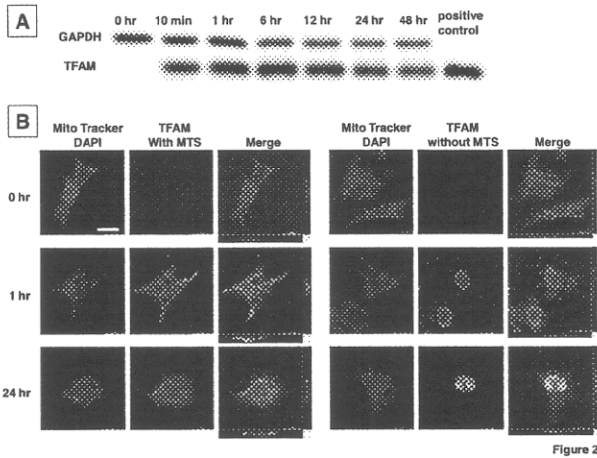


Figure 2

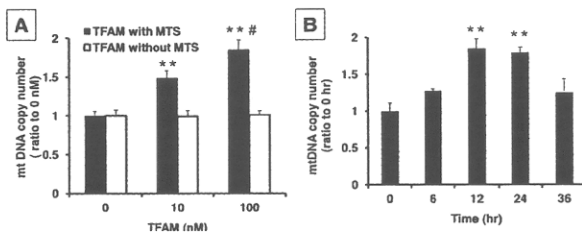


Figure 3

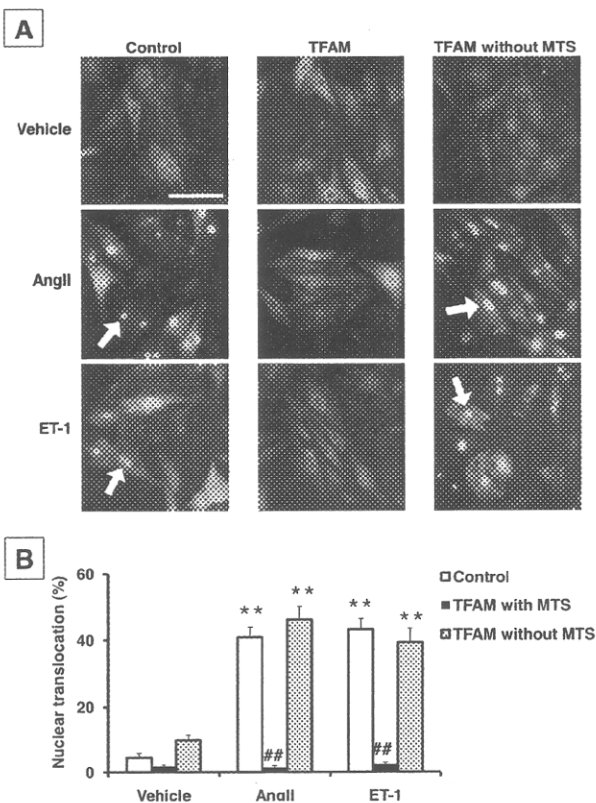


Figure 4

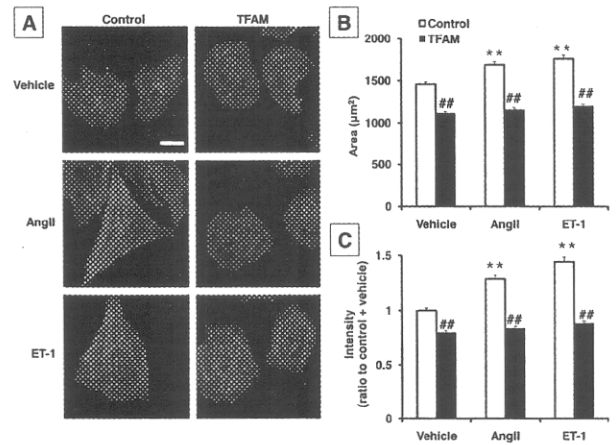


Figure 5

D. 考察

リコンビナント Tfam は、心筋細胞内に入り、mtDNA コピー数を増加させ、AngII や ET-1 によって活性化される NFAT の活性化、さらに細胞肥大を抑制した。Tfam が細胞内に導入される機序およびTfam の細胞内で NFAT を抑制する機序について、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

E. 結論

リコンビナント Tfam は、心不全における新たな治療戦略となり得る可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(Mini Symposium) T Fujino, T Ide, K sunagawa et al.
Recombinant TFAM Attenuates Pathological Hypertrophy of Cardiac Myocytes via Inhibiting NFAT Signaling
Experimental Biology 2011, April 9-13
Washington DC, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

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

—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—
研究分担者：今泉 勉（久留米大学医学部内科学講座心臓・血管内科部門）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

敗血症は lipopolysaccharide (LPS)による全身の炎症反応で、左心機能障害を高率に合併する。敗血症症例において、血中 tumor necrosis factor (TNF)や interleukin-1 (IL-1)などの炎症性サイトカインが上昇し予後不良の要因と考えられている。一方、erythropoietin (EPO)や granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)などの JAK-STAT 経路を活性化するサイトカインは LPS による左心機能障害を改善させると報告されている。Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3)は G-CSF や EPO によって発現が誘導され、これらのシグナルを強力に負に制御するネガティブフィードバック因子である。我々はこれまでに SOCS3 が心筋の生存に重要な役割を果たしていることを報告している。本研究の目的は、心筋特異的 SOCS3 欠損マウスを作成し、LPS による急性左心機能障害における心筋特異的 SOCS3 欠損の効果につて検証することである。また、SOCS3 欠損が LPS による左心機能障害に与える影響についての分子機序についても検証を行う。

B. 研究方法

1. マウス敗血症性心不全モデルについての解析

野生型マウスに LPS 投与し、経時的に心機能を心エコーにより評価する。LPS 投与 24 時間後の心筋組織における炎症細胞の浸潤、TUNEL 染色によるアポトーシスの評価、LPS 投与前、real time PCR array に

よるアポトーシス関連分子の評価、ウエスタンブロットによるチトクローム C, Bcl-x, Bcl-2, caspase 9, caspase 3 等の発現評価を行う。

2. 敗血症モデルにおける SOCS3 欠損の効果について

SOCS3-flox マウスと心筋特異的 Cre 発現マウスを交配させ、心筋特異的 SOCS3 欠損マウス（以下 SOCS3-CKO マウス、）を作成する。野生型マウスと SOCS3KO マウスに lethal dose の LPS を投与し、上記の項目について評価を行う。また、real time PCR array 解析により、サイトカイン関連遺伝子や酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を行う。また、ミトコンドリア障害についても OXPHOS などの発現をウエスタンブロットで評価する。

C. 研究結果

LPS 投与 3 時間後において、左室駆出率 (LVEF) は両群において著明に低下し、6 時間後には、野生型マウスにおいて LVEF はさらに低下したが、SOCS3-CKO では LVEF の低下は有意に抑制されていた。野生型マウスの心臓では LPS 投与後、速やかに STAT3 が活性化され SOCS3 が誘導されていた。野生型マウスの心臓では、SOCS3 の発現に伴い STAT3 のリン酸化は抑制されていた。一方、STAT3 のリン酸化と Bcl-xL の発現は SOCS3-CKO において遷延しており、cleaved caspase3 の発現は SOCS3-CKO で抑制されていた。次に、LPS 投与 6 時間後の心臓よりミトコンドリア分画と細胞質分画を調整し、

チトクローム C の局在を評価したところ、SOCS3-CKO ではチトクローム C の細胞質分画への放出が抑制されていた。さらに、LPS 投与 3 時間後の心臓における酸化ストレス関連分子の発現を real-time PCR で評価した。その結果、SOCS3-CKO マウスの心臓において、superoxide dismutase や heme oxygenase-1 などの抗酸化ストレス分子の発現が亢進していた。また、野生型マウスでは LPS により各 complex の発現が減少していたが、SOCS3-CKO ではそれらの発現が保持されていた。

D. 考察

LPS 投与後の心臓では、TNF や IL-1 などの心機能障害を促進するサイトカインが高度に誘導発現する一方で、G-CSF や leukemia inhibitory factor (LIF) などの JAK-STAT 経路を活性化するサイトカインも発現が上昇する。しかしながら、JAK-STAT 経路の活性化によってそのネガティブフィードバック因子である SOCS3 が発現するため、G-CSF や LIF などの心筋障害を抑制するサイトカインは作用が減弱していると考えられる。実際、SOCS3-CKO の心臓では、STAT3 の活性化が遷延し、それに伴い左心機能障害は優位に抑制されていた。その機序として、superoxide dismutase や heme oxygenase-1 などの抗酸化ストレス分子の発現が亢進に伴う酸化ストレスの抑制によってミトコンドリア障害が抑制され、結果として左心機能障害が抑制されたものと考えられた。最近、セリンのリン酸化 STAT3 がミトコンドリアに存在し、complex I, complex II と会合し電子伝達系の機能を維持するとの報告がなされている。STAT3 経路を活性化するサイトカインは、アポトーシスを抑制することが知られているが、ミトコンドリア機能維持においても重要な役割を果たしている可能性がある。

E. 結論

JAK-STAT 経路のネガティブフィードバック因子である SOCS3 が欠失した心筋では、STAT3 の活性化が遷延し、酸化ストレスやミトコンドリア障害が抑制されることによって LPS 投与後の左心機能障害が抑制される。心筋細胞の SOCS3 は敗血症における急性心不全の治療の標的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Arima K, Katsuda Y, Takeshita Y, Saito Y, Toyama Y, Katsuki Y, Ootsuka M, Koiwaya H, Sasaki K, Kai H, Imaizumi T. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved ischemic peripheral neuropathy in humans. *J Am Coll Cardiol.* 56: 238-239, 2010
2. Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Mawatari K, Oba T, Nagata N, Kyougoku S, Koga M, Imaizumi T. Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol.* 147: 258-264, 2011

学会発表

1. Oba T, Yasukawa H, Futamata N, Mawatari K, Nagata T, Kyougoku S, Oshima H, Imaizumi T. Activation of protective intracellular signaling pathways in the heart by skeletal muscle-derived cytokines during remote ischemic preconditioning. The American Heart Association, The 83th Scientific Sessions, Chicago, USA, November 14-16, 2010
2. Nagata T, Yasukawa H, Oba T, Mawatari K, Kyougoku S, Ohshima H, Yajima T, Knowlton K, Imaizumi T. Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury in cardiac-specific SOCS3 deficient mice by activating cardioprotective signaling pathways. The American Heart Association, The 83th Scientific Sessions, Chicago, USA, November 14-16, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

特発性心筋症に関する調査研究

—心不全に対する和温療法の抗酸化作用機序の解明—

研究分担者：鄭 忠和（鹿児島大学大学院 循環器・呼吸器・代謝内科学）

＜研究要旨＞ 特発性心筋症は、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

酸化ストレスは、心不全の進展機序における重要な因子の一つである。心不全により増加した酸化ストレスは、心筋におけるアポトーシスの誘導や線維化を促し、心機能障害を進展させる。さらに酸化ストレスは、一酸化窒素(NO) bioavailability の低下や、血管内皮型 NO 合成酵素(eNOS) 活性障害による NO 産生減少により、血管内皮機能を障害する。以上から、慢性心不全患者において酸化ストレスを軽減させることは、血管内皮機能改善および心機能障害の進展抑制につながる重要な治療戦略となる。

我々は、心不全に対する新たな全身療法として、60℃の均等乾式遠赤外線サウナ装置を用いた「和温療法」を提唱し、心不全患者における心血管機能・神経体液性因子・自律神経機能・自覚症状・予後を改善させ、さらに酸化ストレスを軽減させることを明らかにしてきた。

本研究の目的は、心不全における和温療法の抗酸化作用発現機序を解明することである。

B. 研究方法

心不全モデル動物である30週齢の雄T0-2ハムスターを和温療法施行群と非施行群の2群に分け、和温療法施行群に対してのみ1日1回、週5回、4週間和温療法を施行した。ハムスターに対する和温療法は、動物実験用遠赤外線サウナ装置を用いた39℃のサウナ浴15分間の後、30℃のサウナ浴を20分間追加する方法で行った。この方法によ

り、臨床における和温療法の場合と同様に、ハムスターの深部体温は約1℃上昇し約30分間維持されることが確認されている。

34週齢時に Millar catheter を用いて左心室内+dP/dt (LV+dP/dt)を計測し血行動態を評価した。また、免疫組織化学染色法及びELISA法を用いて、酸化ストレスマーカーである4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)の心筋における発現を比較検討した。さらに、抗酸化物質である Heat shock protein (HSP) 32、HSP27 および manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) の心筋における発現を、Western blot 法にて比較検討した。

(倫理面への考慮)

研究プロトコールは、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

和温療法非施行群と比較し、和温療法施行群ではLV+dP/dt が有意に改善し(5880±1640 vs 4180±660 mmHg/sec, n=11/群, P<0.01)、和温療法が心不全モデルハムスターの心機能を改善させることが確認された。

また、免疫組織化学染色及びELISA法により、4週間の和温療法が心筋における4-HNE発現を有意に軽減させることが明らかとなり、不全心筋に対する和温療法の抗酸化効果が確認された(ELISA; 3.57±0.96 vs 5.53±1.17 µg/ml, n=8/群, P<0.01)。

さらに、Western blot 法により、4 週間の和温療法が心筋の HSP32・HSP27 および Mn-SOD 発現を有意に増加させることが明らかになった (HSP32, 0.83 ± 0.18 vs 0.54 ± 0.12 , $n=8$ /群, $P<0.01$; HSP27, 1.25 ± 0.30 vs 0.27 ± 0.16 , $n=8$ /群, $P<0.01$; Mn-SOD, 0.81 ± 0.20 vs 0.52 ± 0.16 , $n=8$ /群, $P<0.01$)。

D. 考察

HSP は温熱刺激により発現が活性化・誘導されるモレキュラーシャペロンであるが、その中の一つである HSP27 および HSP32 には抗酸化機能を有することが報告されている。HSP27 は、代表的な抗酸化酵素である Mn-SOD の発現を誘導し、抗酸化効果を発揮すると同時に、抗アポトーシス効果を有していることが明らかにされている。また、HSP32 は一酸化炭素 (CO) とビリルビンに分解され、さらにこのビリルビンはビリバーディンへと分解されるが、ビリルビンやビリバーディンにも抗酸化作用があることが知られている。

本研究により、心不全モデル動物の心筋における HSP27、HSP32 および Mn-SOD 発現が亢進しており、さらに臨床研究と同様に本実験動物においても、和温療法は心機能障害を軽減させることが確認された。

また、我々は心不全に対する和温療法が血管内皮において eNOS 発現を亢進させ血清 NO 濃度を上昇させ、血管内皮機能を改善させることを、過去に報告している。通常 eNOS はダイマーを形成する coupling を生じて活性化するが、酸化ストレス下では eNOS がダイマーを形成できない“uncoupling 現象”をきたし、結果 NO 産生が低下することから、和温療法の抗酸化効果は、こうした eNOS/NO 産生系に対しても好循環をもたらすことが示唆される。

以上から、和温療法は HSP27、HSP32 や Mn-SOD 発現の誘導を介して、心不全における酸化ストレスを軽減し、結果心機能障害や血管内皮機能障害を改善させることが示唆された。

E. 結論

和温療法は、心不全における酸化ストレスを軽減させ、心機能障害を改善させる、有効な非薬物治療である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

I. 論文発表

Fujita S, Ikeda Y, Miyata M, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamada N, Miyauchi T, Yamaguchi T, Torii H, Hamasaki S, Tei C. Effect of Waon therapy on oxidative stress in chronic heart failure. *Circ J*. 75:348-56, 2011.

II. 学会発表

- Ikeda Y, Miyata M, Miyauchi T, Hamada N, Furusho Y, Akasaki Y, Hamasaki S, Tei C. Waon Therapy Decreases Oxidative Stress via the Upregulation of Heat Shock Proteins in TO-2 Cardiomyopathic Hamsters. 日本循環器学会総会・学術集会. 第 74 回 2010 年 3 月, 京都
- 池田義之. 和温療法の心不全患者における血管内皮機能改善効果および酸化ストレス軽減効果とその機序に関する検討. 日本心臓リハビリテーション学会総会シンポジウム. 第 15 回 2010 年 7 月, 鹿児島
- 池田義之・宮田昌明・宮内孝浩・浜田成郷・赤崎雄一・古庄優子・井手佳菜子・濱崎秀一・鄭 忠和. 和温療法の心不全における抗酸化作用発現機序の解明. 日本心臓病学会. 第 58 回 2010 年 9 月, 東京
- Ikeda Y, Miyata M, Miyauchi T, Fujita S, Akasaki Y, Shinsato T, Kubozono T, Kuwahata S, Hamasaki S, Tei C. Waon therapy decreases oxidative stress upregulation of heat shock protein 27 and Mn-SOD in TO-2 cardiomyopathic hamsters. 日本心不全学会総会. 第 14 回 2010 年 10 月, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。