

## 拡張型心筋症における flavoprotein の役割

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学<sup>1)</sup> / 山口大学附属病院臨床治験センター<sup>2)</sup>

中村 浩士<sup>1)</sup> / 久保 誠<sup>1)</sup> / 松田 晋<sup>1)</sup> / 松崎 益徳<sup>1)</sup> / 梅本 誠治<sup>2)</sup>

拡張型心筋症(DCM)患者4名の血清を用いた自己抗原のプロテオミクスから、ミトコンドリア内 flavoprotein に対する自己抗体の存在が示唆された。そこで、DCM 発症における自己免疫機序の関与を知る目的で、心内膜下心筋生検検査にて採取された心筋サンプル(14名)を用いて、ミトコンドリア内の蛋白である NADH dehydrogenase ubiquinone flavoprotein(NDUFV1)、fumarate hydratase、flavoprotein SDHA を測定した(ウエスタンブロット法)。心筋内 NDUFV1 の蛋白量は他の蛋白に比較して有意に低下しており、NDUFV1 の蛋白量も左室拡張末期径とも有意な負の相関( $r=0.539$ ,  $p<0.05$ )を認めた。この事から心筋内 NDUFV1 の低下が心筋リモデリングに関与した可能性が示唆された。次に A/Jマウスに対して抗NDUFV1抗体、抗fumarate hydratase抗体、抗flavoprotein SDHA抗体を用いた投与実験を行った。抗NDUFV1抗体群では有意な心/体重比増加と左室径の拡大、DHE染色の好染性が認められたことより、心筋内 NDUFV1 の低下による心筋リモデリングには、酸化ストレスが関与していると考えられた。DCM の発症および進展には、自己抗体による“mitochondria attack”と、酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。

## 拡張型心筋症におけるドブタミン負荷に対する心筋収縮特性応答低下の分子病態生理学的機序の解明

名古屋大学医学部附属病院検査部(循環器・呼吸器部門)<sup>1)</sup> / 名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学<sup>2)</sup>

平敷安希博<sup>1)</sup> / 室原 豊明<sup>2)</sup>

【目的】拡張型心筋症(DCM)ではカテコラミン刺激に対する反応性が低下していることが知られている。今回我々はDCM患者を対象にドブタミン負荷試験中の左室圧を計測し左室収縮予備能を評価するとともに、心筋細胞における収縮関連タンパク遺伝子発現との関連について検討した。

【方法】対象はNYHAクラスIあるいはIIのDCM患者46例。左室内にマイクロメーター付きカテーテルを留置し、ドブタミン  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与に伴う  $\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}}$  の変化量( $\Delta\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}}$ )を評価した。また、左室後壁より心筋生検を施行し、心筋生検標本における心筋収縮関連タンパクのmRNA発現量を測定した。

【結果】 $\Delta\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}}$  およびドブタミン投与前のLVEFにより患者を3つのグループに分けた(Group I ( $\Delta\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}} > 100\%$ ,  $\text{LVEF} > 25\%$ , 18例)、Group II a ( $\Delta\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}} 100\%$ ,  $\leq \text{LVEF} > 25\%$ , 17例)、Group II b ( $\Delta\text{LVdP}/\text{dt}_{\text{max}} \leq 100\%$ ,  $\text{LVEF} \leq 25\%$ , 11例))。Group I と Group II a とではドブタミン投与前の血行動態指標には差が無かった。Group II a、Group II b では Group I に比べ  $\beta 1$  アドレナリン受容体、SERCA2a、phospholamban の mRNA 発現量が低下していた。さらにこの2グループでは Group II に比べ血漿ノルエピネフリン濃度が高値、また  $^{125}\text{I}$ -MIBG 心筋シンチグラムにおける delayed H/M が低値であった。

【結論】心不全症状の軽い症例でも、ドブタミン負荷に対する収縮応答性の低下した患者では既に心筋細胞内シグナル伝達異常が認められた。ドブタミン負荷試験を用いた心筋収縮予備能の評価は、比較的軽症のDCM患者のリスク層別化、治療方針の決定に有用である可能性が示唆された。

### 【参考文献】

1. Ungerer M, et al. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1993;87(2):454-463.
2. Naqvi TZ, et al. Myocardial contractile reserve on dobutamine echocardiography predicts late spontaneous improvement in cardiac function in patients with recent onset idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(5):1537-1544.
3. Hirashiki A, et al. Prognostic value of pacing-induced mechanical alternans in patients with mild-to-moderate idiopathic dilated cardiomyopathy in sinus rhythm. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(7):1382-1389.

## たこつぼ心筋症発症仮説の病理形態学的検討

順天堂大学<sup>1)</sup>／鈴鹿医療科学大学神経解剖学・病理学<sup>2)</sup>  
河合 祥雄<sup>1)</sup>／山田 京志<sup>1)</sup>／鈴木 宏昌<sup>1)</sup>／長浜 真人<sup>2)</sup>

【背景】たこつぼ型心筋障害の機序として、Wittsteinらは多枝攣縮による心筋気絶、微小血管攣縮(による気絶)、心筋炎、カテコラミンによる急性心筋障害、(交感)神経性心筋気絶、心尖部における $\beta$ アドレナリン受容体密度増加をあげている。それらは病理形態の立場からは十分に検討されていない。

【目的】病理所見からこれらの仮説を検証し、病態生理学的に必要な補助仮説を追記する。

【方法】諸施設から提供された生検例・剖検例からたこつぼ心筋症の病理所見を抽出し、その心室病変組織像から諸仮説を検討した。

【結果】巣状の凝固壊死病変が乏しいこと、個々の心筋細胞の障害(単一心筋細胞障害:好酸性染色性の亢進、筋収縮帯形成、融解)とその集簇像の発症は循環障害では説明困難である。間質細胞浸潤は局所性に障害心筋細胞に伴う形をとり、心筋細胞障害の乏しい部位でのびまん性小円形細胞浸潤(心筋炎)は見られない。たこつぼ心筋症に見られる形態変化はカテコラミン心筋障害像に類似するが、障害を受けた心筋細胞が隣接心筋細胞との結合を失い、心筋segmentationが散見されること、障害心筋細胞の頻度が心室部位により差のあることは循環カテコラミン増加による直接障害だけでは説明困難である。

【考察】単一心筋細胞障害像は、心筋細胞障害が隣接心筋細胞に波及することを防止するために、心筋細胞間の機能的連絡を遮断する機序の存在を示唆する。

## 慢性腎不全合併心不全(心腎連関)モデルの作成～その病態メカニズムと治療法の解明にむけて～

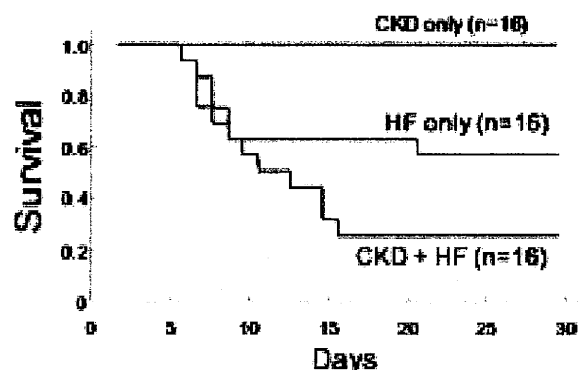
九州大学循環器内科  
井手 友美／砂川 賢二

慢性腎不全(CKD)は、心血管病の独立した危険因子であることは多くの臨床研究から示されているが、十分な動物実験が行われていないことからその機序や最適な治療法については未だ不明な点が多い。今回われわれは、慢性腎不全合併心不全マウスを作成し、その病態解析を行ったのでここに報告する。

【方法】マウスに5/6腎摘を作成し、慢性腎不全モデルを作成した。4週間経過したのちに心筋梗塞を作成し、さらに4週間経過したものをCKD-HFマウスとし、Sham-sham(Sham)、CKD-sham(CKD)、Sham-HF(HF)、CKD-HFマウスの4群において解析を行った。(各n=16)

【結果】4群間で血圧、脈拍に有意差を認めなかった。CKD群は、Sham群と比し有意なBUN、Crの上昇および貧血を有し、(BUN:  $41.7 \pm 2.3$  vs  $74.3 \pm 6.4$  mg/dL,  $P < 0.01$ , Cr:  $0.12 \pm 0.03$  vs  $0.34 \pm 0.04$  mg/dL,  $P < 0.01$ , Hb  $13.6 \pm 0.3$  vs  $11.2 \pm 0.3$  g/dL,  $P < 0.05$ )、CKD-HF群およびHF群においては、血圧、脈拍および心エコー上のLVDdに有意差なかった。HF群に比してCKD-HF群では、HF群と比し、非梗塞部心重量の増加( $4.1 \pm 0.1$  vs  $5.4 \pm 0.2$  mg/gBW,  $P < 0.01$ )、左室拡張末期圧のさらなる上昇( $10.2 \pm 1.0$  vs  $15.4 \pm 1.8$  mmHg,  $P < 0.05$ )、組織学的なコラーゲン分画の増加( $8.1 \pm 0.8$  vs  $11.1 \pm 0.1$  %,  $P < 0.05$ )、心筋細胞の肥大( $320 \pm 8$  vs  $354 \pm 11$   $\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ )を有意にみとめた。CKD合併により、心不全の予後は不良であった。(下図)

【結論】CKDの存在により、心筋梗塞後の心不全において血行動態ならびに心収縮力は不変であったが、リモデリングを促進し、拡張能が低下し、死亡率が増加することが示された。



## 「最適化された細胞外環境を用いた心筋細胞移植の検討」

慶應義塾大学医学部再生医学教室

牧野 伸司／福田 恵一

近年の分子生物学、細胞生物学の進歩により骨髄細胞、ES細胞、iPS細胞など心筋細胞に分化可能な細胞ソースは確保された。これらの細胞ソースを用いて難治性心不全に対する細胞移植による心筋再生医療を実現する場合に必要なことは、適切な細胞の足場である細胞外マトリックス環境と、適切な濃度と種類の細胞増殖因子の供給である。これらのどれが欠けても心筋組織再生の効率低下を招き、心臓再生医療のための必要条件といてよい。現在までのところ、細胞外マトリックスの知見が最も乏しく、*in vivo*における安定した心筋細胞の分化誘導や維持の系が確立されていないため、心不全に対する細胞移植療法の臨床試験は劇的な効果が得られていない。

我々は化学変異剤ENUを用いたメダカ変異体スクリーニングより心臓特異的に表現型をもつメダカ突然変異体を得た。この心室筋形成不全突然変異体から心臓形成のメカニズムを解明して治療に応用したいと考えて解析を進めている。野生型の心臓は心房と心室が連動して二相性のリズムで拍動するのに対して、変異体の心臓は心房、心室の境界は不明瞭であり拍動も一相性の心房のみの拍動リズムであった。血管系は正常であり心房が拍動するのにも関わらず、心室筋が正常に形成されず心室内腔が大動脈に開通しないという表現型を示した。この突然変異体の原因遺伝子を解明、遺伝子の機能解析を行うことで、「心室筋増殖、心筋維持」というこれまで解明されたことのない現象を紐解くことができると考えた。遺伝学的手法により候補遺伝子は、細胞外マトリックスであるプロテオグリカンに絞られた。プロテオグリカンは脊椎動物の細胞外マトリックスの主要成分であり、多様な分子群を結集し組織構築に寄与する。最近までプロテオグリカンは生物活性など持たない物理的な支えと考えられてきた。しかし最近、接触している細胞の増殖、発生、再生などを能動的に制御していることが分かってきた。このプロテオグリカンの心筋増殖や維持に働く作用点を明らかにして、これを人工的に細胞外基質として利用すること、糖鎖の作用点をターゲットとした創薬の開発を検討している。

## 遅筋型骨格筋芽細胞による拡張型心筋症 (DCM) の移植条件の最適化

東京大学医学部器官病態内科<sup>1)</sup>／北里大学医療系大学院循環器内科<sup>2)</sup>／武蔵野大学薬学部<sup>3)</sup>

／新潟大学医療工学科<sup>4)</sup>／東北大学加齢医学研究所医療工学科<sup>5)</sup>

豊岡 照彦<sup>1, 2)</sup>／手塚あさき<sup>1)</sup>／河田登美枝<sup>3)</sup>／中澤 幹夫<sup>4)</sup>

／増井 藤子<sup>1)</sup>／金野 聡<sup>5)</sup>／仁田 新一<sup>5)</sup>

\*以下、*Biochem Biophys Res Commun.* 369:270-6, 2008で代用

Clinical efficacy of skeletal myoblast (skMb) transplantation is still controversial whether this treatment produces beneficial outcome in patients with dilated cardiomyopathy (DCM). Based on immunological tolerance between wild-type and DCM hamsters with the deletion of d-sarcoglycan (SG) gene, skMb engraftment in TO-2 myocardium ( $3 \times 10^5$  cells in approximately 100mg heart) was verified by the donor-specific expression of d-SG transgene constitutively produced throughout myogenesis. At 5 weeks after the transplantation, the cell rates expressing fast-myosin heavy chain (MHC) exceeded slow-MHC in  $\delta$ -SG<sup>+</sup> cells. Fifteen weeks after (corresponding to approximately 12 years in humans), fast MHC<sup>+</sup> cells nullified, but the d-SG<sup>+</sup> and slow MHC<sup>+</sup> cell number remained unaltered. These skMbs fused with host cardiomyocytes *via* connexin-43 and intercalated disc, modestly improving the hemodynamics without arrhythmia under continuous and unrestricted monitoring, when engrafted skMbs were sparsely disseminated, as verified in autopsied myocardium. These results provide us evidence that 1) selective and dissemination-delivery of slow-MHC<sup>+</sup> skMbs, but not the mixture with fast-MHC<sup>+</sup> skMbs as were the case in the all preceding studies including human trial (preliminary report of Menasche's mass-study in AHA), is promising for repairing DCM heart using histocompatible skMbs in future and 2) development of regenerative medicine using immunologically tolerant cell-transplantation should be targeted after exactly examining and repairing gene-defective condition, if any.

## MMP-9 活性の抑制を介したクラリスロマイシンによる急性および慢性移植心拒絶反応の抑制

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学  
磯部 光章

【背景】心臓移植後の拒絶は、未だに解決されていない問題である。クラリスロマイシンは、広く臨床で使われている薬剤であり、抗生物質としてのみならず、多能性のある薬剤として認識され始めている。

【方法】我々は、クラリスロマイシンによる移植心拒絶後リモデリングの抑制効果を確認するため、マウス心臓移植モデルを用いた。急性拒絶モデルにおいてクラリスロマイシンは有意に移植心の生着を延長し、心筋間質への細胞浸潤や線維化の程度も抑制した。また、慢性拒絶モデルにおいてクラリスロマイシンは冠動脈病変の進展を抑制した。これらの機序を解明するため、サイトカインをRPAで検討したところ、IFN- $\gamma$ 、IL-6などの転写活性が薬剤により抑制されていた。また、MMP活性をザイモグラム等で検討したところ、MMP-9の活性が抑制されていたが、MMP-2には変化がなかった。培養実験では、PDGF-BBで刺激した平滑筋細胞の増殖がクラリスロマイシンにより抑制された。

【結論】クラリスロマイシンはMMP-9活性を抑制する事により、移植心拒絶による心筋リモデリングを制御する。これらの効果は自己免疫性心筋炎や心筋虚血後の心室リモデリングにおいても確認されている。クラリスロマイシンは安全性が高く、一般に使用されている薬剤であり、広く循環器疾患への応用が期待される。

## 左心補助人工心臓(LVAS)による長期補助

国立循環器病センター臓器移植部  
中谷 武嗣

【はじめに】心臓移植は末期心不全に対する治療選択として欧米では定着しているが、わが国では心臓移植待機期間が数年に及ぶことから、心臓移植へのブリッジとして左心補助人工心臓(LVAS)による長期補助を余儀なくされている。この管理経験を検討することは、心臓移植の代替手段として期待されているLVASによる長期在宅療法における管理を検討するうえで重要と考えられる。

【目的】当センターで管理を行ったLVAS装着患者の転帰・経過・合併症などから管理上の問題点と今後の展望について検討する。

【方法】1994年3月から2000年12月までに、当センターで管理を行った心臓移植対象としてLVAS装着を行った89例を、2000年以前に装着した34例(前期群：男性24例、34 $\pm$ 15歳)と、2001年以降に装着した55例(後期群：男性37例、35 $\pm$ 12歳)にわけ、それぞれの転帰・経過・合併症を後ろ向きに検討した。

【結果】平均装着期間は後期群が長期に及んだ(366 $\pm$ 327日 vs. 647 $\pm$ 349日  $p<0.01$ )。死亡率は後期群で有意に低かった(64% vs. 31%  $p<0.01$ )。死因は前期群においては脳血管障害(CVA)が55%と最も多かったが、後期群においてはCVAと感染症が35%であった。また、CVAについては、発症率は両群で有意差を認めなかった(47% vs. 38%)が、発症後の生存率は後期群で有意に高かった(6% vs. 48%  $p<0.01$ )。感染症においては、死亡率は両群で有意差を認めなかったが(15% vs. 11%)、感染症による死亡までの平均装着期間は後期群で有意に長期に及んだ(256 $\pm$ 203日 vs. 750 $\pm$ 329日  $p<0.01$ )。

【考察および結語】2001年以降のLVAS装着患者の死亡率は30%程度となり、平均装着期間も600日以上に延長した。致死的合併症であるCVAや感染症に対する治療法の検討が良好な成績につながっているとおもわれる。しかしCVAや感染症の発症率は同等であり、今後これらの予防の検討が重要であるとともに、さらにCVAや感染症の起こりにくいQOLの良好なシステムの臨床導入が望まれる。

## 特発性心筋症におけるミオパラジン変異の解析

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野<sup>1)</sup>/<sup>2)</sup>東京女子医大東病院内科<sup>2)</sup>  
/大阪医大第三内科<sup>3)</sup>/Mayo Clinic<sup>4)</sup>/Baylor College of Medicine<sup>5)</sup>  
木村 彰方<sup>1)</sup>/有村 卓朗<sup>1)</sup>/布田 伸一<sup>2)</sup>/寺崎 文夫<sup>3)</sup>/北浦 泰<sup>3)</sup>  
/Michael J. Ackerman<sup>4)</sup>/Jeffrey A. Towbin<sup>5)</sup>

**【目的】**特発性心筋症には肥大型心筋症(HCM)、拡張型心筋症(DCM)、拘束型心筋症(RCM)などの種々の病型があるが、例えば心筋トロポニンI遺伝子の異なる変異がHCM、DCM、RCMのそれぞれに見出されることから、心筋症には原因遺伝子のオーバーラップがあると考えられる。我々は以前にRCM同胞例にミオパラジン(MYPN)変異(Q529X)を見出したが、この同胞例における兄はHCM様、妹はDCM様の病理所見を呈していた。そこで、本研究ではMYPN変異がHCM症例、DCM症例に見出されるか否かを明らかにすることを目的とした。また、種々の病型において見出された変異については機能変化を検討した。

**【方法】**既知の原因遺伝子に変異が見出されていないHCM患者484名、DCM患者328名、一般健常者520名を対象として、MYPN遺伝子の全域についてdenatured HPLC法およびダイレクトシーケンス法によって変異を検索した。変異のうちHCM病態およびDCM病態において見出されたY20CおよびQ529Xについて、GFP-tag遺伝子を用いた細胞内分布の検討、ラット心筋細胞および筋原細胞株導入による形態変化、免疫沈降法によるCARPとの結合性検討を行った。また、Y20Cではトランスジェニックマウスにおける心筋機能異常を検討した。

**【結果】**以前にRCM患者に見出した終止変異(Q529X)に加えて、HCM患者に終止変異(R885X)およびミスセンス変異(Y20C、K153R、A217E、V410A、P841T、L1161I、およびP1112L)を見出した。一方、Y20CはDCM患者にも見出された。これらは一般健常人には見出されず、進化的に保存されたアミノ酸の変化を伴うため、病因変異であると考えられた。Q529Xはラット心筋細胞のサルコメア形成異常をもたらした。一方、Y20Cはそのような形態異常はもたらさないが、CARP結合性が減少し、筋原細胞株においてMYPN核内移行の障害と分化異常が認められた。Y20CトランスジェニックマウスではHCM様の心室肥大と心筋収縮機能異常が観察された。

**【総括】**ミオパラジン変異は異なる機能異常を介して種々の心筋症病態をもたらす。

## 肥大型および拡張型心筋症におけるカルシウム関連遺伝子解析

金沢大学医薬保健研究域・医学系・臓器機能制御学(循環器内科)<sup>1)</sup>/金沢大学医薬保健研究域・保健学系<sup>2)</sup>  
山岸 正和<sup>1)</sup>/藤野 陽<sup>2)</sup>

**【背景】**肥大型および拡張型心筋症は、心臓突然死や心不全を発症する特発性心疾患であり、その早期発見は心臓死を予防する上で重要な課題である。我々はこれまで主に、心筋トロポニンTとIそしてミオシン結合蛋白C遺伝子変異に伴う肥大型心筋症家系を中心にその臨床像を明らかにしてきた。これらサルコメア遺伝子変異が肥大型心筋症例の約60%、拡張型心筋症例の約5%の原因であると報告されているが、それ以外の症例では原因が不明である。一方、サルコメア遺伝子変異を導入したマウスでは心肥大発症に先んじて心筋内カルシウム代謝に異常があることが報告され、カルシウム関連遺伝子変異が心筋症を発症する可能性が示唆された。

**【目的】**本研究の目的は、日本人心筋症患者において、1)カルシウム関連蛋白であるフォスフォランバンおよびFKBP12.6の遺伝子変異を検索すること、2)変異が検出された場合、その臨床像を明らかにすること、である。

**【方法】**北陸地方を中心として心筋症例を集積し、肥大型心筋症380家系、拡張型心筋症140家系について変異を検索した。心筋症例の末梢白血球からgenomic DNAを抽出し、PCR-SSCP法により変異のスクリーニングを行った。PCR-SSCP法にて異常バンドが認められたものに関しては直接シーケンス法を用いてDNA配列を解析し、RFLP法にて確認を行った。

**【結果】**肥大型心筋症2家系、拡張型心筋症1家系でフォスフォランバン遺伝子変異を検出した。FKBP12.6遺伝子には、変異は認められなかった。心尖部肥大型心筋症の臨床像を示す家系Aの発端者にてフォスフォランバン遺伝子変異Ile38Thrを、肥大型心筋症家系Bの発端者にて同遺伝子変異Ile45Valを検出した。拡張型心筋症家系Cの発端者では、フォスフォランバン遺伝子変異Arg14delを検出した。今後、各症例の臨床像の詳細な検討、各家系の家族調査、および遺伝子変異に伴う機能異常の解析を進める予定である。

**【結語】**カルシウム関連遺伝子のうち、フォスフォランバン遺伝子の変異が肥大型および拡張型心筋症の原因となることが示唆された。

## トロポニンT遺伝子変異による拡張型心筋症マウスの細胞内Ca動態に関する検討

東京慈恵会医科大学循環器内科<sup>1)</sup>／東京慈恵会医科大学総合診療部<sup>2)</sup>／東京慈恵会医科大学青戸病院内科<sup>3)</sup>  
本郷 賢一<sup>1)</sup>／吉村 道博<sup>1)</sup>／鈴木 英明<sup>2)</sup>／武田 信彬<sup>3)</sup>

拡張型心筋症の原因遺伝子として多くの心筋収縮蛋白系遺伝子変異が同定されてきている。中でも収縮調節蛋白トロポニン遺伝子変異の頻度は比較的高く、また突然死を含めた予後の悪さについても報告されてきている。今回、トロポニンT遺伝子変異に伴う拡張型心筋症のモデルマウスとして、トロポニンT K410欠失変異のノックインマウス(DCMマウス)が作成され、このマウス心筋における細胞内Ca動態につき検討を行った。DCMマウスでは、ヒトDCMと同様に心拡大及び著明な心機能低下が認められた。また、生後約6ヶ月の間に明らかな心不全徴候を呈する前に突然死することが明らかとなった。細胞内Ca動態を評価するため、DCMマウスの左心室より乳頭筋標本を摘出し、張力測定用トランスデューサーに装着後、標本の表層細胞内にCa感受性発光蛋白エクオリンを圧注入した。標本に電気刺激を与え、エクオリンの光信号(CaT)と収縮張力を同時測定した。DCMマウス心筋では、収縮張力の著明な低下にも関わらずCaTの増大を認め、また、張力の時間経過の短縮及びCaTの時間経過の延長を認めた。上記の結果は、収縮蛋白系Ca感受性の著明な低下に起因しているものと考えられた。

## 心不全の病態に関わるスプライシングバリエーションの探索－エクソンアレイを用いた解析から－

国立循環器病センター

朝倉 正紀／伊藤 慎／廖 禹林／金 智隆／浅沼 博司／友池 仁暢／北風 政史

様々な疾患の病態に、スプライシング機構が関与する報告がある。しかし、心不全の病態におけるスプライシング機構の役割については不明である。我々は、新しく開発されたエクソンアレイにより、心不全におけるスプライシングパターンの解析を行い、心不全の病態に関わるスプライシングバリエーションを同定することを試みた。エクソンアレイを用いて、大動脈縮窄マウスによる不全心サンプル(n=4)とマウス正常心サンプル(n=4)におけるエクソン発現プロファイルを作成した。心不全で2倍以上の発現変化をエクソンレベルで認めたものは、756遺伝子中の3677プローブであった。756遺伝子中、253遺伝子においてスプライシングパターンの変化を認めた。代表的なスプライシングパターンの頻度は、cassette typeが18.2%で、alternative splice site 28.0%、alternative promoter 12.6%であった。このスプライシングパターンが変化した253遺伝子の遺伝子発現レベルを検討したところ、140遺伝子で発現レベルの変化を認めた一方、113遺伝子では変化を認めなかった。この113遺伝子は通常のマイクロアレイでは発見できず、これらの遺伝子が心不全の病態解明の新たなターゲットになる可能性が示唆された。エクソンアレイには、多くの課題があることも分かったが、心不全の病態解明となる新たなターゲットを探索する有用なツールであると思われる。



**厚生労働省慢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>**

**2008年度第2回研究報告会**

2009年3月3日(火)

国立循環器病センター図書館講堂

セッションⅠ：心不全	4
座長： 友池 仁暢(国立循環器病センター)	
10:35 久保田 功(山形大学)	4
血清終末糖化産物ペントシジン高値は心不全の危険因子である	
10:45 和泉 徹(北里大学)	4
標識下心筋炎惹起性T細胞株を用いた実験的自己免疫性心筋炎の病態解明の試み	
10:55 小室 一成(千葉大学)	5
心不全の病態と治療	
11:05 竹石 恭知(福島県立医科大学)	5
心不全における血清中neopterin濃度の臨床的意義	
セッションⅡ：再生・治療	6
座長： 小室 一成(千葉大学)	
11:15 鄭 忠和(鹿児島大学)	6
新生児 $\alpha$ -galactosidase A欠損マウスを用いた心Fabry病の遺伝子治療の検討	
11:25 永井 良三(東京大学)	6
心筋リモデリングにおける転写因子KLF5の役割	
11:35 福田 恵一(慶應義塾大学)	7
ヒトiPS由来心筋細胞の機能解析について	
11:45 砂川 賢二(九州大学)	7
(未)	
 <総会>	
セッションⅢ：心筋症(1)	8
座長： 山岸 正和(金沢大学)	
13:00 松森 昭(京都大学)	8
心筋症の新分類に関する提案	
13:10 松崎 益徳(山口大学)	8
拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討	
13:20 豊岡 照彦(東北大学)	9
心筋症の遺伝子診断における網羅的解析の重要性	
13:30 河合 祥雄(順天堂大学)	10
病理から見た「たこつぼ心筋障害」の機序	
セッションⅣ：心筋症(2)	10
座長： 武田 信彬(東京慈恵会医科大学)	
13:40 川名 正敏(東京女子医科大学附属青山病院)	10
肥大型心筋症における心房細動と突然死の関連について	
13:50 山岸 正和(金沢大学)	11
肥大型心筋症の臨床病型と遺伝子多型との関連	

14:00	室原 豊明(名古屋大学) .....	11
	HCM患者におけるミトコンドリア機能および形態変化と、心筋収縮および弛緩予備能の関係	
14:10	北浦 泰(大阪医科大学) .....	12
	$\beta$ 遮断薬は拡張型心筋症における心筋の駆出後収縮 (postsystolic shortening: PSS) を軽減する	
14:20	中谷 武嗣(国立循環器病センター) .....	12
	体外設置型左心補助人工心臓(LVAS)装着患者の予後および合併症の検討	

<休憩>

セッションV: RAS系 .....	13
座長: 室原 豊明(名古屋大学)	
15:00 斎藤 能彦(奈良県立医科大学) .....	13
	アルドステロンによる心肥大・線維化増強作用におけるGC-Aの意義
15:10 磯部 光章(東京医科歯科大学) .....	13
	心腎連関心不全モデルにおけるRAAS系の関与について
15:20 小川 聡(慶應義塾大学) .....	14
	糖尿病性心筋症におけるRAS系の役割
15:30 今泉 勉(久留米大学) .....	14
	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

セッションVI: 病態・機序 .....	15
座長: 斎藤 能彦(奈良県立医科大学)	
15:40 武田 信彬(東京慈恵会医科大学) .....	15
	ラミニン $\gamma$ 1鎖プロモーター遺伝子の転写発現調節における検討
15:50 廣江 道昭(国立国際医療センター) .....	15
	霊長類拡張型心筋症モデルを用いたテネイシンCの診断意義の検討
16:00 今中 恭子(三重大学) .....	16
	テネイシンCによる心臓血管新生の制御
16:10 大津 欣也(大阪大学) .....	16
	ネクローシス性心筋細胞死の制御機構解析
16:20 北風 政史/友池 仁暢(国立循環器病センター) .....	17
	心筋細胞生存におけるEGF family-ErbB受容体シグナルの役割解明

●セッション外

筒井 康之(北海道大学) .....	18
	心不全におけるインスリン抵抗性・耐糖能障害の機序と役割
木村 彰方(国立循環器病センター) .....	18
	特発性心筋症におけるフクチン遺伝子変異の解析

## 血清終末糖化産物ペントシジン高値は心不全の危険因子である

山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野  
渡邊 哲/小山 容/久保田 功

【背景】終末糖化産物(AGE)の一つであるペントシジンは非酵素的に蛋白の糖化や酸化により産生される。AGE受容体(RAGE)は多様な組織において発現しており、AGEと結合することで酸化ストレスや細胞内シグナル伝達を介して、サイトカインや炎症メディエーターの産生を引き起す。我々は血清ペントシジンが心不全の危険因子となるか検討を行なった。

【方法と結果】連続141名の心不全患者と18名の対照患者において血清ペントシジンをELISA法により測定した。観察期間の中央値は479日で、心臓死および心不全増悪による入院をエンドポイントとした。血清ペントシジン濃度は、NYHAクラスⅢおよびⅣの重症心不全患者で、NYHAクラスⅠおよびⅡの軽症・中等症患者より有意に高値であった( $P<0.0001$ )。また心イベントを認めた患者では、心イベントを認めない患者に比べて、血清ペントシジン濃度は有意に高値であった( $P<0.001$ )。単変量Coxハザード試験では、年齢およびNYHAクラス、ペントシジン、クレアチニン、尿酸、BNP、左室収縮末期容積、左室心筋重量が有意な心イベント予測危険因子であった。多変量Coxハザード試験では、血清ペントシジン高値は、独立した心イベント予測因子であった(ハザード比1.88, 95%CI 1.23-2.69,  $P<0.002$ )。心不全患者をペントシジン濃度で4群に分けたところ、ペントシジン濃度が最も低い群に比べ、最も高い群では心イベントの発症リスクは4.52倍高かった。

【結論】血清ペントシジン濃度は心不全患者の独立した予後予測因子であり、この新しい指標は心不全患者のリスク層別化に有用である。

## 標識下心筋炎惹起性T細胞株を用いた実験的自己免疫性心筋炎の病態解明の試み

北里大学医学部循環器内科学

猪又 孝元/成毛 崇/柳澤 智義/和泉 徹

【背景】心筋ミオシン免疫によって惹起されるラット自己免疫性心筋炎ではCD4陽性T細胞が病態形成の主座にあり、これまで我々はリンパ節単離細胞から心筋炎惹起性T細胞株を樹立し、*in vitro*実験への展開を可能にした。しかし、移入細胞の体内動態や心筋病変部での分布は不明のままであり、*in vivo*系での病態解明には移入細胞の標識化が求められる。

【目的】心筋炎惹起性T細胞株へのGFP遺伝子導入を試行する。

【方法および結果】GFP発現レトロウイルスベクター(pLEGFP-N1)を用い、bulk culture法および限界希釈法を用い遺伝子導入を試みた。しかし、このベクターはNIH3T3などの接着細胞には容易にトランスフェクトするが、浮遊細胞である心筋炎惹起T細胞株へのトランスフェクトは①低速遠心、②packaging細胞との共培養、③ウイルス産性の純化、を通じても不可能であった。

【今後の展望】①ウイルスベクターの変更(pLenti6.3/V5-DEST)、②LEW-Tg(CAG-EGFP)1Ysラットからの心筋炎惹起性T細胞株を樹立、にて心筋炎惹起性T細胞株のGFP発現を目指す。

拡張型心筋症は、最終的に心不全に至る予後不良の疾患である。拡張型心筋症の原因は多岐にわたるが、その原因の一部に遺伝子変異があることが明らかとなった。現在では拡張型心筋症の約30%は遺伝子変異によると考えられているが、遺伝子変異によりなぜ左室内腔が拡大し、収縮不全をきたすかについては未だ不明である。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考えられる。我々は拡張型心筋症の発症機序を解明することを目的に拡張型心筋症モデルマウスを新規に作成した。その拡張型心筋症モデルマウスでは野生型マウスと比較しがん抑制遺伝子であるp53が増加していた。拡張型心筋症マウスとp53ヘテロノックアウトマウスを交配させると、拡張型心筋症マウスで認められた心内腔の拡大や心収縮力の低下が改善した。以上の結果より、遺伝子変異による拡張型心筋症発症にはp53が重要な役割を担っていると考えられた。現在、p53が増加する機序及びp53の増加による心内腔の拡大と心収縮力の低下の機序に関して検討中である。

### 心不全における血清中neopterin濃度の臨床的意義

福島県立医科大学医学部内科学第一講座<sup>1)</sup>／山形大学医学部器官病態統御学講座循環・呼吸・腎臓内科学分野<sup>2)</sup>

竹石 恭知<sup>1)</sup>／佐々木敏樹<sup>2)</sup>／久保田 功<sup>2)</sup>

【背景】Neopterinは活性化されたマクロファージから産生される酸化ストレスのマーカーである。

【目的】本研究の目的は心不全症例における血清中neopterin濃度の臨床的意義を検討することである。

【方法】心不全の加療のため入院となった198名(平均年齢68歳、男性116名)とコントロール群62名(平均年齢66歳、男性37名)を入院時に採血し、血清中のneopterin濃度をELISAで測定した。急性冠症候群、炎症性疾患、腎機能低下、悪性疾患の合併例は除外した。基礎疾患の内訳は拡張型心筋症57名、虚血性40名、弁膜症51名、高血圧性14名、その他36名であった。左室拡張末期径は54mm(平均)、左室駆出率は49%(平均)、BNP 200pg/ml(中央値)であった。心臓死、心不全増悪による再入院をエンドポイントとし、719日間(中央値、5-1825日)の追跡調査を行った。

【結果】血清neopterin値はNYHA分類がI度～IV度と重症になるのに伴い上昇した(P<0.0001)。追跡期間中、55例にイベントの発症を認めた。イベントを認めた群では、尿酸、高感度CRP、BNP、neopterin値が高く、eGFRが低値であった。Neopterin値が高いほど、高頻度に心血管イベントの発症を認めた。Coxハザード解析では、Na、BNPとneopterinが独立した予後予測因子であった。

【総括】血清neopterin値は心不全の重症度と予後を予測する新しいマーカーとなることが示唆された。



## ヒトiPS由来心筋細胞の機能解析について

慶應義塾大学医学部再生医学教室<sup>1)</sup>／慶應義塾大学医学部循環器内科<sup>2)</sup>／東京医科歯科大学生体材料工学研究所<sup>3)</sup>

村田 光繁<sup>1, 2)</sup>／遠山 周吾<sup>2)</sup>／田中 智文<sup>1)</sup>／野村 典正<sup>3)</sup>／服部 文幸<sup>1)</sup>  
／江頭 徹<sup>2)</sup>／湯浅 慎介<sup>1, 2)</sup>／安田 賢二<sup>3)</sup>／福田 恵一<sup>1)</sup>

近年、幹細胞生物学の発展に伴い難治性心不全の治療手段として再生医療および細胞移植医療の実現が期待される。従来、難治性疾患に対する移植療法の供給源として幹細胞が有用であると考えられており、中でも胚性幹細胞(ES細胞)はそのすぐれた増殖能や多分化能から臨床応用が期待されているが、生命倫理的問題や移植に伴う拒絶免疫などの問題が障壁となっていた。最近、山中らはES細胞の多能性維持に関わる数種類の転写因子を線維芽細胞に導入することにより細胞の初期化を誘導しES細胞と同等の増殖能・多分化能を有する誘導多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS cell)を作成することに成功した。このiPS細胞は、移植が必要な患者自身の細胞から作製可能であるためES細胞のもつ生命倫理、移植時の拒絶免疫等の問題を克服可能な細胞供給源として期待されており、今後iPS細胞を用いた再生医療が急速に発展することが予想される。しかし、これまでヒトiPS由来心筋細胞の報告はほとんどなく、その機能は不明である。

そこで、今回我々は、京都大学(山中研究室)より供与を受けたヒトiPS細胞クローンにつき、ヒトES細胞と同様の手法を用いてヒトiPS由来心筋細胞を作製し、その電気生理学的特性を検討した。ヒトiPS由来自己拍動胚様体(EB)を多電極チップ(MEA)にのせ、細胞外電位(field potential:FP)を記録したところ、Na<sup>+</sup>電流、Ca<sup>2+</sup>電流およびK<sup>+</sup>電流を反映するスパイクを認め、心筋細胞から記録したFPと同様な形状であった。Na<sup>+</sup>チャネル遮断薬であるキニジンを投与したところ、FP振幅は濃度依存的に減少しwashoutにより回復した。さらに、FP間隔はCa<sup>2+</sup>チャネル阻害剤投与により濃度依存的に短縮し、K<sup>+</sup>チャネル阻害剤E4031投与により延長した。一方、PCRによる遺伝子発現解析を行ったところ、ヒトiPS由来心筋細胞ではこれらのチャネル遺伝子の発現を認めた。以上の結果より、ヒトiPS由来心筋細胞には心臓の電氣的活動に必須なイオンチャネルが発現し機能していることが確認された。

(未)

九州大学循環器内科  
井手 友美／砂川 賢二

従来、心筋症の定義、分類は1995年に発表されたWHO/ISFCによるものが広く使われていたが、近年、AHAおよびESCから新たな提案が行われている。

しかし、これらの分類は病因、形態、心機能などによる分類が混在している点に問題がある。

治療の観点からは、1. 病因(遺伝子異常、感染など)、2. 形態(肥大、拡張、左室、右室)、3. 心機能(収縮不全、拡張不全)、4. 電気生理学的異常(イオンチャネル、刺激伝導系など)による分類が重要であると考えられる。われわれは、国際心筋症、心不全学会(ISCHF)において、これらに基づく心筋症の新分類を検討しているが、当心筋症研究班においても討議して戴きたく、今回、提案をさせて戴くことにした。

#### A New Classification of Cardiomyopathies

- |  |                                 |                                  |                |              |
|--|---------------------------------|----------------------------------|----------------|--------------|
| I. Etiological Classification                  | A. Genetic                      | B. Infections                    | C. Nutritional | D. Unknown   |
| II. Anatomical (Structural) Classification     | A. Dilated                      | a. LV                            | b. RV          |              |
|  | B. Hypertrophic                 | a. Septum                        | b. Diffuse     | c. Free wall |
|  |                                 | d. Apex                          |                |              |
| III. Physiological (mechanical) Classification | A. Systolic failure/dysfunction | B. Diastolic failure/dysfunction |                |              |
|  | C. Both                         | D. Nomal                         |                |              |
| IV. Electrical Classification                  | A. Ion channel disorders        | B. Conduction system disease     | C. Others      |              |

#### Comparison of Classifications of Cardiomyopathies

WHO/ISFC Classification	Proposed Classification
DCM (with viral infection)	I B, II A a, III A
DCM (with gene mutation)	I A, II A a, III A
HCM (with gene mutation outflow obstruction)	I A, II B a, III B
Apical HCM (with unknown cause)	I D, II B, III B
Apical HCM (with HCV infection)	I B, II B d, III B
ARVC/D (with gene mutation)	I A, II A b, III B
ARVC/D (with HCV infection)	I B, II A b, III B
Long QT Syndrome	IA, IV A

#### References

- Richardson P, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841-842.
- Maron BJ, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006;113:1807-1816.
- Elliott P, et al. Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial disease. *Eur Heart J* 2008;29:270-276.

#### 拡張型心筋症における抗ミトコンドリア抗体の検討

山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学<sup>1)</sup> / 山口大学附属病院臨床 治験センター<sup>2)</sup>  
中村 浩士<sup>1)</sup> / 久保 誠<sup>1)</sup> / 松田 晋<sup>1)</sup> / 松崎 益徳<sup>1)</sup> / 梅本 誠治<sup>2)</sup>

拡張型心筋症(DCM)の発症と進展機序にウイルス性心筋炎後の慢性化や自己免疫機序が想定されている。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Coxsackie 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、ウイルス再感染が抗心筋抗体の産生を引き起こしDCMの発症に関与している可能性を示唆している。しかも、それらの対応抗原の多くはミトコンドリア内の蛋白であった。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。

【方法】拡張型心筋症(DCM)患者4名の血清を用いた自己抗原のプロテオミクス解析から、候補蛋白の同定を行った。次に、DCM発症における自己免疫機序の関与を知る目的で、心内膜下心筋生検検査にて採取された心筋サンプルを用いて、ミトコンドリア内の蛋白である数種類の候補蛋白について測定した。マウスに対する抗ミトコンドリア抗体投与実験により組織と心機能評価を行った。

【結果】心筋内aconitaseやNDUFV1の蛋白量は左室拡張末期径と有意な相関( $p < 0.05$ )を認め、心筋内aconitaseやNDUFV1が心筋リモデリングに関与した可能性が示唆された。次にA/Jマウスに対して抗aconitase抗体、抗NDUFV1抗体を用いた投与実験を行った。抗NDUFV1抗体群では有意な心/体重比増加と左室径の拡大、DHE染色の好染性が認められた。

【考察】DCM患者血清からはミトコンドリア蛋白が心筋抗原として同定され、これらの抗原蛋白とcoxsackievirus B3のシーケンスの解析から、高い相同性と抗原性を持つエピトープが種を超えて検出された。マウスとヒトのDCMの発症には、これら複数のエピトープによる“B-cell epitope spreading”が関与し、ミトコンドリア蛋白が自己抗体の標的となっている可能性が示唆された。

## 心筋症の遺伝子診断における網羅的解析の重要性

北里大学医療系大学院循環器内科<sup>1)</sup> / 東北大学先進医工学研究機構生命機能科学分野<sup>2)</sup>  
/ 東京大学医学部器官病態内科<sup>3)</sup> / 理化学研究所ゲノム医科学研究センター疾患関連遺伝子研究グループ<sup>4)</sup>  
/ Dept. Exp. Cardiol., Max-Planck Inst., Bad Nauheim<sup>5)</sup> / 東京大学医学部人類遺伝学教室<sup>6)</sup>  
豊岡 照彦<sup>1, 2, 3)</sup> / 島山 華子<sup>2)</sup> / 田中 敏博<sup>4)</sup> / Sawa Kostin<sup>5)</sup> / Jutta Schaper<sup>5)</sup> / 徳永 勝士<sup>6)</sup>

【研究目的】従来、原因不明とされた拡張相を伴う肥大型心筋症の病因を明らかにする目的で家族性に突然死を呈し、本病形を示した家系について核内遺伝子に加え、心機能上重要な位置を占めるミトコンドリアの遺伝子の重複変異を本年度研究班の前期班会議で報告した。今回は新たに開発されたMicroarrayによるresequencingを用いた遺伝子解析技術の信頼性と有効性を検証する。同時に前回示した日本人とCaucaseanのDCM症例における人種差の検出能力を検討する。

【方法】倫理委員会と同意頂いたDCM患者(日本人 $n=6$ , Caucasian  $n=2$ )の抹消血、または心移植時に摘出、冷凍保存した心標本からGenomic DNAを既報により精製した。16,159塩基対のミトコンドリアゲノムの配列を約20箇所に分割し、各部分を旧来法により全配列を決定した。この際にPCRによるpseudogene等の増幅による誤認を回避する目的で各部分の中央部にprimerを再度設定して同一部位を2回以上配列決定して変異を確認した。更にCambridge配列との相違点を事前に同定した。この結果を伏せて、Affimetrix社製GeneChip® Human Mitochondrial Resequencing Array 2.0を用いて網羅的な検討を試み、結果の変異検出能力、精度、検査時間と費用を人件費も含めて従来の配列決定法と比較した。

【結果】今回のGene Chipによるミトコンドリアの全ゲノム解析では誤認は皆無であったが、機器のみによる配列はヘテロプラスミーが低下により配列不明と機械が判断した。この箇所はミトコンドリアの機能ドメインと関連し、個人差が大きく、ミトコンドリアの全ゲノムの3.7%を占めたが、日本人とCaucaseanの間に不明率に有意差は認められなかった。更に筆者らが考案したalgorithmで再判定した変異部位は16箇所に激減した。その部位は既に報告した3箇所と一致したが、新たな変異として13箇所が見出された。今後、その機能解析が待たれる。また以前報告した日本人とCaucaseanに認めた各々固有の変異(Shin *et al.*, *Am.J.Human.Genet.*, 2000)は今回も漏れなく上記のalgorithmで同定された。従来法による遺伝子診断には1人分のsampleの検査に専属実験者が約1ヶ月の時間と、人件費の他に、sequencerの購入経費を別にして、消耗品費用も含め、約40万円を要したが、今回のGene Chip法で48時間の実験と諸費用は約半額に低減した。

【考察および結語】ミトコンドリアの変異解析は疾患遺伝学から人種や民族差にわたる幅広い研究分野において、信頼性の高い情報をもたらす。今回のGene Chipに新たなBioinformaticsと演算法を加えた結果、ヘテロプラスミーの突然変異も含めた効率的で経済性に優れた方法が開発され、多数の候補遺伝子の同定が期待された。また、既知の核内遺伝子の変異同定にも日本人固有のGene chipを作製すれば短時間で多数の責任遺伝子の検出法を提供すると予想され、頭書の重複遺伝子解析など多面的・総合的な活用が可能となる。

## 病理から見た「たこつぼ心筋障害」の機序

順天堂大学<sup>1)</sup>／鈴鹿医療科学大学神経解剖学・病理学<sup>2)</sup>／朝日生命成人病研究所付属丸の内病院<sup>3)</sup>  
河合 祥雄<sup>1)</sup>／鈴木 宏昌<sup>1)</sup>／末吉 徳芳<sup>1)</sup>／長浜 真人<sup>2)</sup>／芦田 映直<sup>3)</sup>

【背景】一過性収縮不全である「たこつぼ心筋障害」の発症機序は明らかではない。たこつぼ心筋障害の病理像は、心筋分節化segmentation、一個から数個単位の心筋細胞障害、それに対する細胞反応(障害心筋処理過程)と見ることができる。心筋分節化は介在板での隣接心筋細胞との離解であり、(正常心筋細胞と変性)心筋細胞間のGap junction(結合)が変化したことを示唆する。先に細胞障害があつてGap結合が閉鎖したのか、Gap結合閉鎖が先行して細胞障害が発生したのかは明かではない。Gap結合閉鎖(閉口)が先行したかどうかは、心筋細胞障害のない部位でのGap結合を観察することにより検討しうる。

【目的】動物実験モデル、たこつぼ型心筋障害剖検例での心室筋細胞Gap結合の異常の有無を抗Cx43抗体染色により検討する。

【方法】家兔迷走心筋電気刺激モデル剖検心2例(1週後、直後)、対照(1週後)1例とヒト剖検例4例に抗Cx43抗体を含む各種染色を施し、心筋細胞障害と介在板でのコネキシン43発現を観察した。

【結果】家兔迷走心筋電気刺激後急性期剖検例において、心基部の心筋細胞障害(単一心筋細胞障害)が確認され、刺激後1週後例では同部の間質に線維化、血管透過性亢進(墨汁沈着)を見た。直後剖検例の心筋障害部位付近では介在板でのコネキシン43発現は減少しており、刺激後1週後例の心筋障害近接部位では他の部位と同様程度のコネキシン43発現が認められた。ヒト剖検例では抗Cx43抗体染色で介在板は染色されなかった。

【考察】心筋segmentationの形態像は、合胞体としての心筋細胞(複数)障害を示唆すると考えられる。心筋細胞障害の危険要素が心筋のある部位にAt randomもしくは局所全体に生じた場合、組織内の広範なGap junctionが、あるリスクに対応して閉鎖またはサイズを減少させ、cell to cell communicationを制限するといった機序が示唆される。これが収縮機能の低下・伝導速度の低下に関連している可能性も想定されよう。この場合、必ずしも細胞障害は伴わないので、たこつぼ心筋症での壁運動異常と障害心筋細胞数の少なさとの乖離を説明するのかもしれない。ヒト剖検例ではより症例を重ねての検討が必要である。

## 肥大型心筋症における心房細動と突然死の関連について

～閉塞性肥大型心筋症(HOCM)と非閉塞性肥大型心筋症(HNCM)の比較検討～

東京女子医大循環器内科<sup>1)</sup>／東京女子医大附属青山病院循環器内科<sup>2)</sup>  
八代 文<sup>1)</sup>／南 雄一郎<sup>1)</sup>／梶本 克也<sup>1)</sup>／萩原 誠久<sup>1)</sup>／川名 正敏<sup>2)</sup>

【背景】肥大型心筋症における肥大型心筋症関連死および突然死と心房細動との関連についての検討はほとんどない。そのため、今回我々はHOCMとHNCMにおける心房細動の長期予後に及ぼす臨床的意義について検討した。

【方法】当院で診断され経過観察されたHOCM 76症例とHNCM 350症例についてretrospectiveに検討を行った。肥大型心筋症関連死(突然死、心不全死、脳梗塞死)と突然死発症率をHOCMとHNCMそれぞれで比較検討した。平均経過観察期間は12±7年。

【結果】HOCM 76症例およびHNCM 350症例において、それぞれ15症例(20%)、104症例(30%)で心房細動を認めた。HOCM群およびHNCM群共に、心房細動合併例の肥大型心筋症関連死は非合併例と比べて有意に高率であった(それぞれ37.5% vs. 5.0%; p=0.0003, 13.5% vs. 6.9%; p=0.025)。同様に両群に共に、心房細動合併例で有意に突然死が高率であった。さらに、心房細動を合併したHOCM群では心房細動を合併したHNCM群よりも突然死率は有意に高かった(25% vs. 7.7%; p=0.032)。

【結論】HOCMおよびHNCM群において心房細動と突然死発症との有意な関連がみられた。さらに、突然死発症率は心房細動を合併したHOCM群で心房細動を合併したHNCM群に比して有意に高かった。したがって、HOCM、HNCM両群において心房細動は突然死を含む長期心血管死の重要な予後因子であることが示唆された。

## 肥大型心筋症の臨床病型と遺伝子多型との関連

金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学(循環器内科)<sup>1)</sup> / 金沢大学医薬保健研究域保健学系<sup>2)</sup>  
山岸 正和<sup>1)</sup> / 藤野 陽<sup>2)</sup> / 舟田 晃<sup>1)</sup>

【背景】肥大型心筋症の3大予後規定因子は、突然死、心房細動による塞栓症、および心不全である。肥大型心筋症患者の約60%にサルコメア遺伝子変異があると報告されており、原因遺伝子の違いによって臨床病態が異なることが示されている。しかしながら、特定の遺伝子変異を有する同一家系内においても各個人の臨床病態は異なっており、さらなる因子によって修飾されていると考えられる。

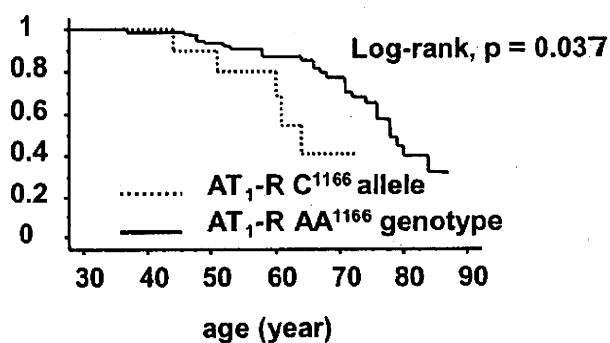
【目的】今回我々は、renin-angiotensin系の遺伝子多型に着目し、その多型がサルコメア遺伝子変異を有する肥大型心筋症患者の病態の差異に与える影響を検討した。

【方法】原因遺伝子変異が同定された肥大型心筋症患者135名を対象として、心臓超音波所見、心房細動の発症頻度、発症時期を検討した。

【結果】angiotensin-converting enzyme (ACE) の insertion/deletion (I/D) 多型では、D allele 群が II genotype に比べより収縮能が低下していた (31% vs 37%  $p < 0.05$ )。32名 (23%) に心房細動を認め、Angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>-R) A/C<sup>1166</sup> 多型において、C allele 群が AA genotype に比してより早期に心房細動を発症していた (log-rank,  $p < 0.05$ , Figure 1)。心房細動の発症頻度は各遺伝子多型で差がなかった。

【結語】ACE-D allele 多型と AT<sub>1</sub>-R C<sup>1166</sup> allele 多型は、それぞれ肥大型心筋症例の左室収縮能および心房細動発症時期に影響を与える可能性が示唆された。

probability of remaining free of AF



## HCM患者におけるミトコンドリア機能および形態変化と、心筋収縮および弛緩予備能の関係

名古屋大学循環器内科  
平敷安希博 / 海野 一雅 / 室原 豊明

【背景】心筋収縮および弛緩予備能はエネルギー消費する反応を反映しているが、それらの異常とミトコンドリア機能との関係は肥大型心筋症 (HCM) 患者において明らかでない。

【方法】左室駆出率60%以上のHCM患者を対象に、安静時および右心房ペースング中に両心室カテーテルを施行した。同時に右心室中隔より心筋生検を行った。<sup>99m</sup>Tc-sestamibi (MIBI) を施行し、安静時の早期像および後期像からwashout rate (WR) を算出した。心筋生検サンプルを用い、定量的 mRNA 解析および電子顕微鏡による観察を行った。

HCM患者を以下のように2群に分けた； グループA(正常群) = 正常なforce-frequency relation (FFR) を示しかつpressure half-time ( $T_{1/2}$ ) が30ms未満のもの、グループB(異常群) = 異常FFRを示すか、 $T_{1/2}$  が30ms以上のもの。

【結果】MIBI WRは $T_{1/2}$ と有意な相関関係 ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.01$ ) を示した。また、WRはグループB群においてより高値を示した。電子伝達系酵素のmRNA発現は、グループAにおいてより高値を示した。電子顕微鏡を用いた観察では、グループBにおいてミトコンドリアの大小不同が顕著で、クリスタ等の構造も乱れていた。

【結語】安静時の収縮機能が正常なHCM患者でもミトコンドリア機能異常や形態異常があることが示唆された。それらの異常は、心筋収縮および弛緩予備能の異常と関係していた。

$\beta$ 遮断薬は拡張型心筋症における心筋の駆出後収縮 (postsystolic shortening: PSS) を軽減する：  
組織ドプラ法による解析

大阪医科大学内科学III

伊藤 隆英/川西 泰徳/二井 理恵/寺崎 文生/北浦 泰

【背景】左室心筋は大動脈弁閉鎖時をピークとする収縮パターンを示すが、拡張型心筋症 (DCM) など左室の収縮機能が著しく低下している場合は、そのピークが遅延して大動脈弁閉鎖後、すなわち拡張早期にずれ込む現象が見られる。この現象は駆出後収縮 (postsystolic shortening: PSS) と呼ばれ、左室心筋セグメント相互の収縮性に心周期を通じての左室圧変動が加わるために起こるものと考えられている。PSSを来した心筋セグメントは駆出に寄与しないため収縮機能が障害された左室の収縮効率をさらに低下させるのみならず、拡張早期に生じる収縮が左室拡張機能を障害する可能性がある。近年、心臓超音波検査の進歩により、心室の正確かつ詳細な収縮拡張動態が把握可能になった。特に組織ドプラ法は局所心筋の動態把握および解析に極めて有用である。DCM患者では $\beta$ 遮断薬が左室収縮機能を改善させることが示されている。本研究ではDCM患者に超音波組織ドプラ法を施行し、 $\beta$ 遮断薬投与前後にPSSの頻度および程度を解析、同薬剤のPSSに与える影響について検討した。

【方法】対象はDCM患者19名 (女性12名、平均年齢59歳)。左室長軸3断面の心基部および中部の計12点より組織ドプラ波形を抽出し、収縮期のピーク速度 ( $V_{SYS}$ )、拡張早期 (等容弛緩期) のピーク速度 ( $V_{IVR}$ ) を計測した。このとき、 $V_{IVR}$  が  $V_{SYS}$  より大きい場合にPSSありとした。また、PSSありのセグメントにおいては、 $V_{IVR}$  と  $V_{SYS}$  の差分 (マグニチュード) を計測した。計12セグメント中のPSSの数、および総マグニチュードについて、 $\beta$ 遮断薬投与前後において評価した。 $\beta$ 遮断薬はカルベジロールを1.25mg/日より開始、2~3カ月の間に最高10mg/日まで漸増した。

【結果】カルベジロールの投与量は平均7.4mgであった。 $\beta$ 遮断薬投与により左室拡張末期径は $66 \pm 5$ mmから $62 \pm 7$ mmに減少、左室駆出率は $29 \pm 8\%$ から $33 \pm 9\%$ に改善した。組織ドプラによる解析では、全12セグメントにおいて $V_{SYS}$ の増高と $V_{IVR}$ の低下を認めた。その結果、PSSの数は $2.8 \pm 3.0$ から $0.8 \pm 1.4$ 個に減少、総マグニチュードは $3.3 \pm 4.7$ cm/secから $1.3 \pm 2.8$ cm/secに減少した。

【結論】 $\beta$ 遮断薬投与によりDCM患者におけるPSSが軽減する。従って、本症における $\beta$ 遮断薬の左心機能改善機序にPSS軽減が関与している可能性が示唆される。

## 体外設置型左心補助人工心臓 (LVAS) 装着患者の予後および合併症の検討

国立循環器病センター臓器移植部・心臓血管内科・心臓血管外科

中谷 武嗣/篠岡 太郎/加藤 倫子/中島育太郎/小田 登/築瀬 正伸/船津 俊宏/小林順二郎

【はじめに】我が国の心臓移植待機患者は、多くが左心補助人工心臓 (LVAS) 装着下に長期間待機を必要としており、待機中の死亡率も低くない。当センターでは1994年より慢性心不全急性増悪例にもLVASを適応するようになり、2001年からはLVAS及び心臓移植患者に対する専門病棟が稼働した。さらに、第9因子製剤及び抗MRSA薬のリネゾリド (商品名: ザイボックス<sup>®</sup>) を使用することができるようになり、LVAS装着下での長期補助成績が向上していると考えられた。そこで、今回、当センターにおける体外設置型LVASにおける長期予後、合併症、死因を後ろ向きに比較・検討した。

【方法】1994年から2007年までに体外設置型東洋紡製国循環型LVASを装着した69例について検討を行った。1994年~2001年までの装着例をGroup A (30例)、2001年~2007年の装着例をGroup B (39例) とし、各群の平均補助期間、予後、合併症等を検討した。

【結果】平均補助期間はGroup Bが有意差をもって長く ( $673.9 \pm 341.5$  days vs.  $369.3 \pm 337.2$  days,  $p < 0.001$ )、1年および2年生存率も同様にGroup Bが有意差をもって良好であった ( $82.8\%$  vs.  $40.0\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $44.0\%$  vs.  $16.6\%$ ,  $p < 0.03$ )。脳血管疾患での死亡率もGroup Bで有意に低く ( $10.3\%$  vs.  $36.7\%$ ,  $p < 0.02$ )、感染症死については有意差を認めなかったものの、Group Bで低い傾向を認めた。リネゾリド、第9因子複合体製剤の使用群は有意とはいえないものの、長期補助において良好な傾向を示した。

【考察および結語】体外設置型LVAS装着例においてもLVAS関連合併症の適切な対応により長期生存が可能となってきた。第9因子複合体製剤およびリネゾリドなどの脳血管疾患および全身感染症に対する治療選択肢の増加が長期補助を可能にした一つの要因であると示唆された。心臓移植は末期心不全に対する治療選択として欧米では定着しているが、わが国ではドナー不足から心臓移植待機期間が数年に及ぶため、心臓移植へのブリッジとしてLVASによる長期補助を余儀なくされている。体外設置型LVASの管理経験を検討することは、心臓移植の代替手段として今後期待されている植込み型LVASによる長期在宅療法における管理を検討するうえで重要と考えられる。

アルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体(MR)系と食塩の心室リモデリング作用を解明するために、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系と機能的に拮抗関係にあるナトリウム利尿ペプチド系の受容体ノックアウトマウス(GC-A KO)を用いてEPLのGC-A KOの心室リモデリングに及ぼす効果および、その逆に高食塩下で、アルドステロンを投与しその効果を検討する。

GC-A-KOにEPLを100mg/Kg投与すると、左室重量の低下と左心室の線維化が有意に抑制された。同時に収縮期血圧も約20mmHg低下したが、このEPLによる効果はヒドララジンで同程度に血圧を低下させるだけでは観察されず、EPLの血圧を介さない効果と考えられた。

次に高食塩摂取下(6% NaCl)にアルドステロンを4μg/day/miceで4週間、GC-A-KOと対象マウスである野生型マウスに投与すると、野性型マウスでは血圧も心室重量、心室線維化も変化させなかったが、GC-A-KOでは、血圧は上昇させなかったが、心室重量と心室の線維化を有意に悪化させた。

マウスは、ラットと異なり、高食塩下でアルドステロンを投与しても野生型では心室リモデリングが生じないが、GC-A-KOではアルドステロンのシンシツリモデリング促進効果が観察された。ANP系とアルドステロン系との相互関係が示された。

#### 心腎連関心不全モデルにおけるRAAS系の関与について

東京医科歯科大学大学院循環制御内科学<sup>1)</sup> / 東京大学 先端臨床医学開発講座<sup>2)</sup>  
磯部 光章<sup>1)</sup> / 小川 真仁<sup>1)</sup> / 鈴木 淳一<sup>1, 2)</sup>

【背景】臨床において心腎連関が注目されているが、その病態形成機序についてはよく知られていない。心不全と腎不全の連関にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)が重要な役割をはたしていると考えられる。RAASは心不全や腎疾患におけるキーファクターであることが知られており、RAAS阻害薬は心不全や腎不全の治療としても広く使われている。今回我々は心腎連関心不全モデルを作成しRAAS阻害による病態の変化について検討した。

【方法】マウス心腎相関心不全モデルは5/6にあたる腎臓を摘出後、さらに心臓の冠動脈結紮による心筋梗塞を起こさせる事により作成した。RAAS阻害薬として直接的レニン阻害剤であるアリスキレンを2.5mg/kg、25mg/kgの用量で連日投与した。

【結果】心腎連関心不全モデルによる血圧の上昇は25mg/kgのアリスキレンの投与により有意に抑制されたが、2.5mg/kgではその効果は見られなかった。マウスの生存率は無治療群では77%程度であるが、2.5mg/kgでのアリスキレン投与では100%となった。腎不全を伴ったマウスは腎不全を持たないマウスと比べて有意に左室駆出率が低下していた。アリスキレン投与により左室駆出率は改善し、25mgの投与群は2.5mg投与群よりも強い左室駆出率の改善が見られた。病理学的には、心腎相関心不全モデルでは左室厚の減少や左室内周囲径の増加が見られたが、アリスキレン投与により改善していた。

【結論】RAAS阻害剤であるアリスキレンは心腎連関心不全における突然死や心機能悪化を抑制する。血圧への影響を与えない低用量でもその効果が確認された。以上より、RAASは腎不全時の心不全増悪に深く関わっている事、レニン阻害剤であるアリスキレンがその病態を改善することが示された。

【目的】糖尿病患者において冠動脈疾患をはじめとする心血管系合併症の頻度は多く、死因の主座を占めている。一方で、フラミンガム疫学調査などでは糖尿病患者において心不全発症のリスクが高いことが報じられている。糖尿病の存在は収縮障害と拡張障害を惹起することが知られているが、その分子メカニズムについては明らかではない。本研究は、アンジオテンシン受容体ノックアウト(KO)・マウスを用いて、糖尿病性心筋症におけるRAS系の役割を明らかにすることを目的とする。

【方法】9週令のKOマウスおよび野生型(WT)マウスにストレプトゾトシン200mg/kg(KO-DM, WT-DM)あるいは生理食塩水(KO-C, WT-C)の腹腔内注射を行い、糖尿病を惹起した。さらに6週間後に心エコー検査、血行動態測定後に心筋を採取し、分子生物学的解析を行った。

【結果】左室内圧+dp/dt、内径短縮率や拡張末期圧にはWT-DMとWT-Cの間で差はなかった。WT-DMはWT-Cに比べて、E/A比( $1.30 \pm 0.21$  vs.  $1.99 \pm 0.17$ ,  $p < 0.05$ )およびdp/dt( $-3337 \pm 351$  mmHg/sec vs.  $-4915 \pm 201$  mmHg/sec,  $p < 0.05$ )は低値であり、時定数は延長していた( $18.2 \pm 1.6$  msec vs.  $12.9 \pm 1.0$  msec,  $p < 0.05$ )。左室内径短縮速度もWT-DMにおいて低値であった( $1.94 \pm 0.09$  sec<sup>-1/2</sup> vs.  $2.45 \pm 0.15$  sec<sup>-1/2</sup>,  $p < 0.05$ )。KO-DMとKO-Cの間ではこれらの指標に差はなかった。WT-Cに比べてWT-DMでは、アンジオテンシノーゲンmRNAは2.3倍に、アンジオテンシン・タイプ1a受容体mRNAは1.7倍に増加していた。筋小胞体SERCA2aの蛋白レベル( $p < 0.05$ )とmRNAレベル( $p < 0.05$ )は共にWT-DMで低値であった。全フォスフォランバン(PL)mRNAレベルには両群間で差はなかったが、リン酸化PLはWT-CよりもWT-DMで低値であった( $p < 0.05$ )。KO-DMとKO-Cの間ではSERCA2aやPLに差はなかった。

【結論】ストレプトゾトシン誘発I型糖尿病では拡張障害を主徴とする心筋障害を呈した。RAS系を介するカルシウム・ハンドリング異常がその背景にあるものと思われた。

## 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

IL-1やTNFなどの炎症性サイトカインがエンドトキシンショックやエンドトキシンによる左心機能障害を促進することが知られている。一方で、G-CSF、leukemia inhibitory factorやcardiotrophin1はこれらの病態を改善させることが報告されている。興味深いことに、エンドトキシンによる左心機能障害を抑制するこれらのサイトカインはJAK-STATを活性化し、suppressor of cytokine signaling-3(SOCS3)によって負に制御される。本研究の目的は、エンドトキシンによる左心機能障害におけるJAK-STAT経路とその制御因子であるSOCS3の役割について検証することである。心筋特異的SOCS3ノックアウトマウス(SOCS3-CKO)にLPS(30mg/ml)を投与し、左心機能障害、アポトーシス、アポトーシス関連分子の発現、ミトコンドリア障害などについて野生型マウス(WT)と比較評価した。LPS投与3時間後において、左室駆出率(LVEF)は両グループにおいて著明に低下した。LPS投与6時間後、WT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た。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 caspase 3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。これらの結果より、LPS投与のSOCS3-CKOの心臓では、心筋細胞のサイトカインに対する感受性が亢進し、ミトコンドリア障害が抑制されることによって左心機能障害が抑制されると考えられた。