

三重大学大学院修復再生病理学¹⁾ / 三重県立看護大学看護学部²⁾
/ 国立国際医療センター戸山病院循環器科³⁾ / 筑波大学人間総合科学研究科循環器内科⁴⁾
今中 恭子¹⁾ / 浜本 妙子¹⁾ / 下条 尚志¹⁾ / 吉田 利通¹⁾
/ 林 辰弥²⁾ / 廣江 道昭³⁾ / 佐藤 明⁴⁾ / 青沼 和隆⁴⁾

テネイシンC (TnC) は、多彩な生物活性をもち、組織構築の改変で重要な役割を演ずると考えられる。我々は、最近、拡張型心筋症同様、急性心筋梗塞患者でも、急性期の血中TnC濃度がリモデリングマーカーとしてBNPと同程度に有用であり、両者を組み合わせると非常によい予後予測因子になることを見だし、TnCが心室リモデリングの重要な制御因子の一つであることが示唆された。さらに、TnCノックアウトマウスでは心筋梗塞後リモデリングが抑制されることから、TnCは心室リモデリングの増悪因子であると予想した。次に心臓特異的にテネイシンCを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。TnCが過剰にあるだけでは明らかな変化は見られなかったが、過剰発現マウス心臓では傷害部位に接する心筋間質の線維化が促進される傾向がみられたため、炎症反応の制御への関与が考えられた。in vitroで、TnCはマクロファージの遊走を促進し、サイトカイン産生をあげ、in vivoでTnCノックアウトマウスにangiotensin II負荷した際血管周囲のマクロファージの集簇がすくなく、また、LPS負荷モデルで血中TNF α 、IL6の上昇が野生型より低かった。したがって、TnCは炎症反応のenhancerとして心室リモデリングを制御する可能性が示唆された。

心臓転写因子Zac1の同定と機能解析

慶應義塾大学医学部再生医学教室
湯浅 慎介 / 福田 恵一

Although there are many essential cardiac transcription factors, the mechanisms of heart development and homeostasis remain poorly understood. The transcription factors have the central roles of gene expression and organ morphogenesis. To isolate a novel cardiac transcription factor, we performed gene chip analysis using cardiac myocyte differentiating embryonic stem cells and isolated Zac1, a zinc finger protein which was identified as an anti-proliferative transcription factor. This study was designed to investigate the molecular and functional characterization of Zac1 as a cardiac transcription factor.

[Methods and Result] (1) Whole-mount *in situ* hybridization and immunostaining were performed at mouse embryo stages E7.5, E8.5 and E9.5. Zac1 was strongly expressed in the whole heart from E8.5 embryo. (2) Luciferase constructs under the control of either ANF, BNP or α MHC promoter were co-transfected with Zac-1 expression vector. Zac1 had strong transcription activity for these promoters compared with Nkx2.5, Gata4, SRF, Tbx5 and MEF2C. (3) Gel shift assay revealed that Zac1 was directly associated with ANF promoter. (4) A total of 18 kinds of Zac1 deletion mutants was constructed. Structure-function analysis revealed that the C-terminal of Zac1 had transcriptional activity and the N-terminal had DNA binding activity. (5) Zac1 DNA binding site within the ANF promoter was also determined. It was adjacent to the Nkx2.5 binding site. Luciferase analysis revealed that Zac1 has a synergistic transcriptional activity with Nkx2.5. GST pull down analysis showed that Zac1 5th and 6th zinc finger domains directly bound to Nkx2.5 homeodomain. (6) Zac1 knock-out mouse showed severe cardiac deformity at the embryonic stage. (7) Zac1 knock-out mice showed decreased levels of several cardiac genes. (8) Genechip analysis revealed that the absence of Zac1 expression resulted in the loss of the apoptosis inhibitor gene *Ifi202*, thereby increasing the number of apoptotic cells in the heart.

[Conclusions] These findings indicated that Zac1 is one of the essential cardiac transcription factors, and it inhibits cardiac apoptosis.

北里大学循環器内科¹⁾／理研ヒトゲノムプロジェクト²⁾
／Dept. Exp. Cardiol., Max Planck Inst.³⁾／東北大学先進医工学研究機構⁴⁾
豊岡 照彦¹⁾／田中 敏²⁾／Sawa Kostin³⁾／畠山 華子⁴⁾／Jutta Schaper³⁾／中村 裕輔²⁾

【背景】心筋は最もエネルギーを生産し、かつ消費する組織である。その主な生産部位のミトコンドリアは宿主に細胞内共生して相互に機能補完するが、宿主と独立した生態系を有し、エネルギー生産に必要な酸化的リン酸化酵素の一部も生合成する結果、細胞内呼吸に重要な部位の遺伝子変異は重篤な心不全を来たす。特にミトコンドリア遺伝子は核内遺伝子と異なり、①94%をexonが占め、NCRのintronが少ない、②原始的な環状構造で、核タンパクを欠き、構造的に脆弱で遺伝子変異を起し易い、③好氣的呼吸により必然的にfree radicalを遺伝子の近傍で生産する結果、活性酸素(ROS)が容易に遺伝子を攻撃する、④遺伝子修復に必要な酵素系は細胞質内に偏在してミトコンドリアの遺伝子を修正できず、老化に伴い変異遺伝子が蓄積するなど、生物学的にも多くの不利な特性が報告されている。上記のエネルギー需給関係から1細胞内に数千のミトコンドリアが共存し、全ミトコンドリアが共通の遺伝子変異を示すhomoplasmyと、一部のみ変異するheteroplasmyが報告されている。临床上、その遺伝子変異は発現臓器によりミトコンドリア心筋症や脳筋症として知られる。また、疾患とは無関係に人種によりhaplogroupの違いにより遺伝子配列に地域差が反映される。今回は核内遺伝子の類似配列をミトコンドリア遺伝子変異との誤診を防ぐ目的でミトコンドリアゲノムの全配列を決定した結果を提示し、病態との関連について議論を深めたい。

【方法】所属施設の倫理委員会承認と遺伝子診断の承諾を得た症例について、可能な場合は心移植時の心筋組織、または抹消血からgenomic DNAを既報により精製後、ミトコンドリアの全配列をcapillary法で決定した。①理学的所見、各種検査の結果、DCMの診断が確定し、家系的に独立した日本人患者(n=79、7名で全配列を決定)、②地域差比較のために重症心不全で心移植に至った白人DCM症例(n=14、6名で全配列を決定)、③心疾患群内の対照として、DCMと無関係な心不全所見の無い本態性高血圧や不整脈の日本人症例(n=75、2名で全配列を決定)、④正常対照として、H2a2系haploid groupのヨーロッパ系白人で同定されたCambridge配列を用いた。なお遺伝学的な独立性は異なる染色体上に存在する約25万の核内遺伝子のSNP解析をジーンチップで行い、近縁関係を否定して確認した。heteroplasmyの有無は当該配列をPCR増幅後、前記の配列を参考にして変異部位を選択的に切断する制限酵素を用いて、完全に加水分解後に電気泳動で同定した。

【結果】臨床的に特に重要な変異部位の病原性についてアミノ酸のコード部分(ORF)では①イオン極性、②疎水性、③高次構造の変化、④非翻訳領域(NCR)についてはrRNAとtRNAの配列変異がDCM以外のミトコンドリア性疾患で報告され、かつヒト以外の種にも正常配列が保存された部位から推定した。更にアミノ酸レベルに変異を来さない同義変異と疾患に無関係ない人種差によるhaploid変異が事前に立証されている配列は除外した。以上の条件下に絞り込んだ後に、日本人患者の一部に白人と異なり一個人に複数の遺伝子変異が共存するhomoplasmy症例を認めた。これは新たなhaplogroupを危険因子とするDCM集団の存在を強く示唆する。

心筋症の網羅的遺伝子解析におけるメタ解析

国立循環器病センター
朝倉 正紀／友池 仁暢／北風 政史

特発性心筋症のなかで、拡張型心筋症は予後不良な心筋症の一つである。拡張型心筋症には、遺伝的素因が関わることも知られているが、原因ははっきり特定されていないのが現状である。拡張型心筋症の心筋組織における網羅的遺伝子発現解析による病因究明が行われてきた。しかしながら、拡張型心筋症の重症度も様々であることや網羅的遺伝子発現解析方法も様々であることより、拡張型心筋症の心筋組織における遺伝子発現プロファイルが異なることが知られていた。そこで、従来報告され、公表されている拡張型心筋症の心筋における遺伝子発現プロファイル7つを用いて拡張型心筋症に関連する遺伝子の同定を試みた。具体的には、生データを用いるのではなく、すでに解析されリストアップされた遺伝子リストをもとに、7つの網羅的遺伝子発現プロファイルに共通している存在する遺伝子を探索した。その結果、7遺伝子プロファイル中、4プロファイルにおいて、NPPAの発現上昇が認められた。また、7プロファイル中3プロファイルで、15の遺伝子が共通に存在することが明らかとなった。具体的には、ACTB、ACTC1、ACTN2、ATP2A2、ATP5A1、CRYAB、CRYM、HMG2、NDUFB5、POSTN、PTN、SERPINA3、TCF4、TPI1、UBBであった。今後、これらの遺伝子に注目して検討を進める予定である。



**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>

2009年度第2回研究報告会

2010年2月4日(木)

国立循環器病センター図書館講堂

セッションⅠ：心不全・心肥大1

座長： 北浦 泰（大阪医科大学）

11:00	室原 豊明（名古屋大学）	4
	拡張型心筋症における心機能と腎機能との関連	
11:10	竹石 恭知（福島県立医科大学）	4
	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	
11:20	大津 欣也（大阪大学）	5
	非アポトーシス性心筋細胞死の心不全発症における役割	
11:30	永井 良三（東京大学）	5
	圧負荷心筋リモデリングにおける心線維芽細胞の役割	
11:40	和泉 徹（北里大学）	6
	Color-engineered rat を用いた実験的自己免疫性心筋炎の病態解析	

セッションⅡ：心筋症・心筋炎1

座長： 大津 欣也（大阪大学）

11:50	後藤 雄一（国立精神・神経センター）	6
	ミトコンドリア病認定基準作成と重症度スケール試案	
12:00	北浦 泰（大阪医科大学）	7
	心疾患における S100A8/A9 複合体の発現に関する研究	
12:10	鄭 忠和（鹿児島大学）	7
	Fabry 病モデルマウスからの iPS 細胞の樹立および心筋への分化誘導	
12:20	磯部 光章（東京医科歯科大学）	8
	重症心不全患者に対する Carvedilol および Bisoprolol 導入後の心不全改善効果についての比較	
12:30	松森 昭（京都大学）	9
	C 型肝炎ウイルスと心筋症－HCV 構造蛋白、非構造蛋白の局在について－ (総会・昼食)	

セッションⅢ：心不全・心肥大2

座長： 吉川 勉（慶應義塾大学）

13:30	豊岡 照彦（北里大学）	10
	心筋症関連遺伝子のマス解析の臨床的意義 —各種解析法の精度と費用/効果の比較—	
13:40	下川 宏明（東北大学）	11
	東北地方の心不全患者の現況と標準治療の浸透度について —第二次東北慢性心不全登録研究中間解析より—	
13:50	筒井 裕之（北海道大学）	11
	ナチュラルキラーT細胞の活性化は心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全を改善する	
14:00	斎藤 能彦（奈良県立医科大学）	12
	GC-A シグナルの MR—食塩による心室リモデリングに対する抑制効果	

14:10	福田 恵一 (慶應義塾大学)	12
	ヒト慢性心不全における microRNA 発現プロファイリングと機能解析	

セッションIV：心筋症・心筋炎2

座長： 廣江 道昭 (国立国際医療センター戸山病院)

14:20	吉川 勉 (慶應義塾大学)	13
	心筋梗塞後リモデリングにおける樹状細胞の役割	
14:30	砂川 賢二 (九州大学)	13
	心サルコイドーシスのステロイド治療と心駆出率変化に及ぼす因子に関する検討	
14:40	木村 彰方 (東京医科歯科大学)	14
	カルシウム増感剤による拡張型心筋症発症抑制の試み	
14:50	久保田 功 (山形大学)	14
	Dynamic 99mTc-sestamibi washout curve は、急性心筋梗塞患者における慢性期の心機能を予測する	
15:00	中谷 武嗣 (国立循環器病センター)	15
	心臓移植における抗体関連型拒絶反応への対応	
	(休憩)	

セッションV：心不全・心肥大3

座長： 木村 彰方 (東京医科歯科大学)

15:30	武田 信彬 (東京慈恵会医科大学青戸病院)	15
	トロポニン T 遺伝子変異による拡張型心筋症マウスに対するカンデサルタン の予後改善効果に関する検討	
15:40	今泉 勉 (久留米大学)	16
	ドキシソルビシン誘発性心筋障害におけるサイトカイン機能調節因子の役割の 検討	
15:50	廣江 道昭 (国立国際医療センター戸山病院)	16
	糖尿病性心筋症の病態解明—糖尿病性心筋症は存在するのか?—	
16:00	今中 恭子 (三重大学)	17
	テネイシン C による組織構築改変の分子メカニズム	

セッションVI：心筋症・心筋炎3

座長： 今中 恭子 (三重大学)

16:10	松崎 益徳 (山口大学)	17
	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効果の検討	
16:50	小室 一成 (千葉大学・大阪大学)	18
	拡張型心筋症発症における CaMKII δ と p53 の役割	
17:00	山岸 正和 (金沢大学)	18
	肥大型心筋症の臨床病態と原因遺伝子との関連	
17:10	北風 政史 (国立循環器病センター)	19
	心筋症診断における心臓 MRI と心内膜心筋生検の意義に関する検討	

拡張型心筋症における心機能と腎機能との関連

名古屋大学医学部医学系研究科循環器内科学

平敷安希博／大島 景／因田 恭也／坂東 泰子／林 陸晴／室原 豊明

【背景】慢性心不全において、慢性腎臓病（CKD）の合併は、予後不良因子の一つである。しかし、CKDの合併した拡張型心筋症（DCM）における、心機能および予後への影響は未だ明らかではない。

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

【方法】冠動脈造影検査にて虚血性心疾患が否定された、左室駆出率 50%未満の DCM135 例を、推算糸球体濾過量（eGFR）の値により、normal 群（eGFR > 90 ml/min/1.73m²; 23 例）、mildCKD 群（60 ≤ eGFR < 90 ml/min/1.73m²; 70 例）、moderateCKD 群（eGFR ≤ 60 ml/min/1.73m²; 42 例）の 3 群に分類した。eGFR < 30 ml/min/1.73m² は、除外した。マイクロマノメータ付きピッグテールカテーテルを用い、収縮能の指標として LV dP/dt_{max}、弛緩能の指標として T_{1/2} を測定した。血液検査、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査の各種パラメータを比較検討し、心血管イベント発症の有無を、後ろ向きに比較検討した。

【結果】moderateCKD 群では他の群と比較し、糖尿病の合併が有意に多く、血漿ノルアドレナリン、BNP 値が有意に高値を示した。mildCKD, moderateCKD 群は normal 群と比較し、有意に T_{1/2} の延長を認めた。また多変量解析において、eGFR は T_{1/2} に影響を及ぼす独立した因子であった（p=0.039）。心イベントの発症の有無に関し Kaplan-Meier 法で解析した結果、moderateCKD 群では、他の群と比較し心イベント発症率が有意に高かった（p=0.015）。

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

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

福島県立医科大学医学部循環器・血液内科学講座

竹石 恭知／義久 精臣

【目的】慢性心不全患者の 60-70%に睡眠時無呼吸症候群を合併するとされる。特に中枢性睡眠時無呼吸症に伴うチェンストークス呼吸（Cheyne-Stokes respiration, CSR）は、心不全患者の予後を悪化させる。一方、CSR に対する陽圧換気療法である順応性自動制御換気（adaptive servo ventilation, ASV）療法が心機能及び予後へ及ぼす効果については十分に検討されていない。

【方法】CSR を合併した心不全患者 30 名（平均年齢 56.6 ± 14.2 歳、全員男性、平均左室駆出率 38.0 ± 16.3%、平均無呼吸低呼吸指数 38.3 ± 16.5 回/時、平均中枢性無呼吸指数 23.1 ± 14.1 回/時）を対象とし、2 群（ASV 治療群 15 名、非 ASV 治療群 15 名）へ分割した。

【結果】6 ヶ月後、ASV 治療群にて B 型ナトリウム利尿ペプチド（554.3 ± 201.6 to 214.3 ± 42.9 pg/ml, P < 0.01）、左室駆出率（32.8 ± 4.3 to 42.7 ± 2.1%, P < 0.05）、左室心筋重量係数（190.9 ± 30.6 to 154.2 ± 12.1 g/m², P < 0.05）及び左房容積係数（64.4 ± 5.6 to 56.6 ± 6.5 ml/m², P < 0.05）は改善を示した。一方、非 ASV 治療群では有意な変化を認めなかった。また、退院後追跡調査（平均観察期間 345 日）にて ASV 治療群における退院後の心臓死 + 再入院率は、非 ASV 治療群と比して低い傾向にあったが、統計学的には有意でなかった（Log rank test P=0.11）。

【結論】ASV は CSR を有する心不全患者において、心機能を改善した。一方、予後改善効果は今回の観察期間では明らかでなかった。

非アポトーシス性心筋細胞死の心不全発症における役割

大阪大学大学院医学系研究科内科学講座循環器内科
大津 欣也

心筋細胞死は心不全発症・進展に大きな役割を果たしている。アポトーシス性細胞死は不全心で認められ近年の精力的な研究の結果、その意義が明らかとなってきている。しかしネクローシス性細胞死の心不全の病態生理における役割は明らかではない。我々は以前ネクローシスの本態はサイクロフィリン D 依存性ミトコンドリア膜透過性遷移によりミトコンドリア膜における電気化学エネルギー勾配が消失することであることを報告した。そこでサイクロフィリン D 欠損マウスを用いて心不全におけるネクローシスの関与を検討した。サイクロフィリン D 欠損マウスは基底状態では心形態、心機能に異常は認められなかったこのマウス心に横行大動脈縮索術 TAC により圧負荷を加えた。野生型マウスにおいては TAC 後 4 週間で心拡大、心機能低下を認めたがサイクロフィリン D 欠損マウスではその程度は有意に良好であった。さらに両群間における TUNEL 法で評価したアポトーシス細胞数に差はなかった。従ってネクローシスは心不全発症において重要な関与をしていることが明らかとなった。

圧負荷心筋リモデリングにおける心線維芽細胞の役割

東京大学大学院医学系研究科循環器内科
武田 憲文/真鍋 一郎/永井 良三

【目的】 病態形成における非実質細胞の役割が注目されているが、心筋リモデリングにおける心線維芽細胞の *in vivo* 機能解析は従来困難であった。肥大心の線維芽細胞で強く活性化される転写因子 KLF5 に着目し、圧負荷心筋リモデリングにおける線維芽細胞の *in vivo* 機能解析を試みた。

【方法】 心線維芽細胞で活性化される Periostin プロモーターを用いた Cre マウスを新規作成し、弓部大動脈縮窄による心圧負荷モデルを用いて、KLF5 が発現・活性化した線維芽細胞の役割を検討した。

【結果】 心線維芽細胞特異的 *Klf5* 欠損マウス (*Klf5^{fl/fl}; Postn-Cre*) では、線維芽細胞の増殖抑制・線維化の軽減と共に、心筋細胞肥大も抑制された。一方で心筋細胞特異的 *Klf5* 欠損マウスでは、心筋リモデリングへの影響がなかったことから、KLF5 が発現・活性化した線維芽細胞は、線維化のみならず *in vivo* 心筋細胞肥大にも関与することが示唆された。線維芽細胞からの分泌蛋白をスクリーニングした結果、KLF5 はインスリン様成長因子-1 (IGF-1) の転写制御を担い、IGF-1 は (パラクライン因子として) 心筋細胞の肥大反応を促進した。

更に重度の圧負荷を用いた心不全モデルでは、*Klf5^{fl/fl}; Postn-Cre* の心線維化・心肥大は同様に抑制されたが、著明な左室拡大及び左室収縮機能低下を来し易く、早期に心不全死に陥った。IGF-1 受容体抑制薬 (JB1) を投与した重度圧負荷マウスでも、同様の早期心不全死に至ったことから、線維芽細胞およびその分泌蛋白 IGF-1 は、重度の圧負荷に対する心保護的作用も担うことが明らかとなった。

【結論】 KLF5 を介して活性化された線維芽細胞は、IGF-1 を分泌し心筋肥大作用や心保護作用を担う。心線維芽細胞は、圧負荷後の適正な心筋リモデリングを司る重要な細胞種である。

Color-engineered rat を用いた実験的自己免疫性心筋炎の病態解析

北里大学医学部循環器内科学

柳澤 智義／猪又 孝元／前川 恵美／水谷 知泰
成毛 崇／竹内 一郎／竹端 均／和泉 徹

背景：実験的自己免疫性心筋炎(EAM)は、健常ラットへの心筋炎惹起性 T 細胞株 (MTL)の移注により再現される (tEAM)。しかし、MTL 移注後の体内動態や心臓局所での病態形成に関する検討は乏しい。その背景には、浮遊細胞たる MTL のラベル化が困難なため、移注細胞と宿主由来細胞との分離が不可能であったことがあげられる。

目的：Color-engineered rat を用いて、GFP 発現 MTL (GFP-MTL)を樹立し、体内動態の観察と tEAM としての phenotype を検討する。

方法と結果：5 週齢 Lew-Tg(CAG-GFP)ラットを心筋ミオシンペプチド aa.1539-1555 (CM2)で感作させ、12 日目に屠殺した。腋窩および単径、腋窩リンパ節を摘出し、GFP 発現が確認されたリンパ節細胞浮遊液を調整した。照射下胸腺細胞を抗原提示細胞として用い、CM2 による抗原刺激を繰り返しながら継代培養を行った。樹立した GFP-MTL は、フローサイトメトリー上 97%GFP 陽性であり、84%に CD4 陽性を示した。また、³H サイミジン取り込みによる細胞増殖試験では、従来 MTL と同様 CM2 に抗原特異性を呈した。樹立した GFP-MTL (1×10^7 /rat)を健常ラットの尾静脈から移注した結果、tEAM の心筋炎重症度は同程度 (マクロスコア: 2.0 ± 0.7 vs. 1.2 ± 0.4 , $P=0.53$)であった。共焦点レーザー顕微鏡での組織観察では、GFP-MIT 細胞移注後 5 日目から心臓組織内に GFP-MIT が出現したが、GFP-MIT の心臓内への浸潤は 7 日目をピークに減少し、その後 GFP 陰性の CD4 陽性 T 細胞が浸潤細胞の主体を担うようになった。

結語：GFP 発現ラットを細胞株樹立のソースとして用いることで、MTL のラベル化が可能となった。ラベル化細胞の活用により、臨床 phenotype を変えることなく tEAM の病態解析へと応用できる。

ミトコンドリア病認定基準作成と重症度スケール試案

国立精神・神経センター神経研究所
後藤 雄一

平成 21 年度に新たに 10 疾患が特定疾患として認定され、その中にミトコンドリア病も含まれた。これまで東京都と埼玉県において医療費補助対象疾患とされてきたが、一部の地域だけの補助に対して患者会などから不満が出されていた。また東京都、埼玉県の認定基準が筋力低下を主体とするものであったために、骨格筋症状が軽度でありながら心筋症や腎の症状が主体の患者は認定を受けにくいという傾向があった。今回の特定疾患認定基準は、全身病であるミトコンドリア病の特徴を踏まえ主要臓器の症状がある程度認められれば認定されるように工夫している。一方で、5 万人以上の患者数になると予想されるミトコンドリア機能障害による糖尿病／難聴症例の処遇について腐心した。また母系親族などで各臓器の症状が軽い方々の処遇については重症度スケールの導入を検討した。今年度での適応は断念したものの、種々の臓器症状の重症度スケール試案を作成したので本班会議で報告したい。

心疾患における S100A8/A9 複合体の発現に関する研究

大阪医科大学内科学 III¹⁾ / 京都大学医学部人間健康科学科²⁾ / 国立国際医療センター³⁾

大阪市立医療センター循環器内科⁴⁾ / 大阪市立大学病理病態学⁵⁾

寺崎 文生¹⁾ / 片嶋 隆¹⁾ / 大塚 薫¹⁾ / 藤田 修一¹⁾ / 村上 省吾¹⁾ / 神崎裕美子¹⁾ / 池本 正生²⁾

藤田 正俊²⁾ / 廣江 道昭³⁾ / 成子 隆彦⁴⁾ / 伊倉 義弘⁵⁾ / 上田真喜子⁵⁾ / 北浦 泰¹⁾

【背景と目的】 S100A8/A9 複合体は S100A8 (10.8 kD) と S100A9 (13.2 kD) の 2 つのサブユニットからなる S100 ファミリー蛋白である。ヒトにおいて S100A8/A9 複合体は活性化した好中球やマクロファージに発現し、炎症性疾患において血清濃度が上昇する。既に、本複合体が心サルコイドーシス心筋や不安定狭心症 (UAP) 患者の冠動脈粥状硬化巣で発現が亢進することを報告した。今回は、本蛋白の急性心筋梗塞 (AMI) における動態と発現の局在を明らかにした。

【対象と方法】 AMI55 例および UAP16 例について、1) S100A8/A9 複合体の末梢血血清濃度を発症日から第 8 病日まで ELISA 法により測定、2) 白血球数 (WBC)、クレアチンキナーゼ MB 分画 (CK-MB) と C 反応性蛋白 (CRP) を測定した。また、3) AMI 患者 7 例の剖検心筋を抗 S100A8/A9 抗体、抗 CD66b 抗体および抗 CD68 抗体により免疫二重染色し、本複合体の局在と定量的解析を行った。

【結果と考察】 血清 S100A8/A9 濃度は経日的に UAP 群では変動を認めなかったが、AMI 群では発症後 3~5 日に約 1.5 倍に上昇し最高値となり、発症後 6~8 日も UAP 群より高値であった。また、AMI 患者の剖検心筋には S100A8/A9 複合体陽性の好中球およびマクロファージの高度の浸潤が認められた。従って、血清本複合体は UAP では冠動脈粥状硬化巣に由来するのに対して、AMI では冠動脈粥状硬化巣および梗塞心筋に由来すると考えられる。また、血清 S100A8/A9 濃度の最高値が CK、CK-MB、WBC、CRP 値の最高値と正相関することから梗塞巣の大きさや炎症の程度を示唆されると思われる。以上より、本複合体の血清濃度は AMI の重症度や予後を反映するバイオマーカーになる可能性がある。本複合体の機能と役割については今後更なる検討が必要である。

【結論】 AMI 患者における S100A8/A9 複合体の急性期血清濃度上昇は、梗塞心筋に浸潤した好中球およびマクロファージに由来すると考えられる。本複合体は、AMI で惹起される局所の炎症反応を反映するバイオマーカーになる可能性がある。

Fabry 病モデルマウスからの iPS 細胞の樹立および心筋への分化誘導

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科心筋症病態制御講座¹⁾

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科循環器・呼吸器・代謝内科学²⁾

樋口 公嗣¹⁾ / 吉満 誠¹⁾ / 竹中 俊宏¹⁾ / 鄭 忠和^{1), 2)}

【背景】 近年、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同様の多能性を有し、ES 細胞の問題点である生命倫理や移植時の拒絶免疫を克服可能な細胞として、誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製が可能となった。最近では複数の疾患において疾患特異的 iPS 細胞が樹立され、疾患の病態解明・治療法開発に大きく寄与すると考えられている。我々はこれまで、特定心筋症に分類されている心 Fabry 病・Fabry 病の病態解明・治療法開発に向けて、Fabry 病モデルマウス (Fabry マウス) を用いた検討を行ってきた。Fabry マウス由来 iPS 細胞の樹立、さらに、その細胞からの心筋細胞の作製は、本症の病態解明・治療法開発に有用と考えられる。本研究の目的は、Fabry マウスから iPS 細胞を樹立し、その細胞を心筋に分化させることである。

【方法】 Fabry マウスより樹立した線維芽細胞 (tail-tip fibroblast; TTF) にレトロウイルスベクターを用いて Oct3/4・Sox2・Klf4 の 3 転写因子を導入し iPS 細胞の作製を試みた。iPS 細胞の心筋への分化誘導には、胚様体を作製する標準的プロトコルを用いた。

【結果】 Fabry マウス TTF に Oct3/4・Sox2・Klf4 遺伝子を導入し、3 週間 feeder 細胞上で培養した。形成された ES 細胞様形態を示すコロニーを単離し、フローサイトメトリーで SSEA-1 陽性かつ GFP 陰性を示すクローンに対しアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行った。SSEA-1 陽性・GFP 陰性・ALP 染色陽性を示す細胞をヌードマウスに接種し、5 週後に奇形腫の形成を確認した。奇形腫を形成したクローンでは、マウス ES 細胞と同様に nanog・zfp42・eras・utf1 の高発現を認め、iPS 細胞であることが確認された。このクローンを用いて胚様体を作製し OP9 細胞上で 5-7 日間培養すると、自動拍動能を持つ胚様体が出現した。この胚様体では、免疫組織化学により α -actinin の発現を認め、さらに、心筋特異的マーカー (GATA4, cardiac troponin T, MLC2a) の発現が確認された。

【総括】 Fabry マウス由来線維芽細胞へのレトロウイルスベクターを用いた 3 転写因子導入による iPS 細胞の樹立、およびその細胞の心筋への分化誘導に成功した。これらの細胞は心 Fabry 病・Fabry 病の病態解明や治療法開発に有用であると考えられる。

重症心不全患者に対する Carvedilol および Bisoprolol 導入後の心不全改善効果についての比較

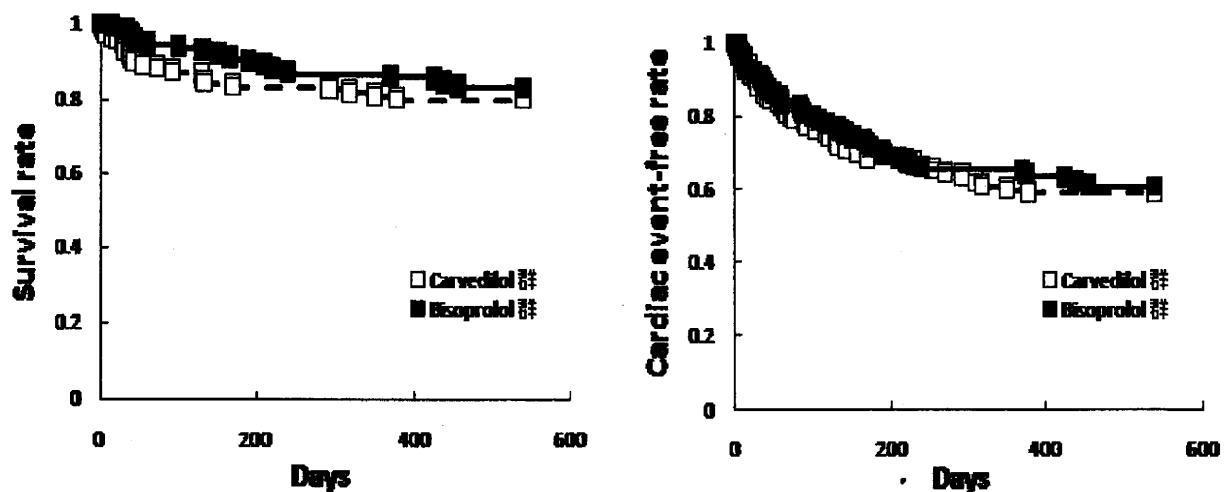
東京医科歯科大学大学院循環制御内科学
磯部 光章

β 遮断薬の Carvedilol および Bisoprolol はともに、大規模臨床試験により心不全患者に対する有効性は証明されているが、両剤の効果を直接比較した研究はほとんど行われていない。我々は、重症心不全患者に対する両剤の効果を、後ろ向きに検証した。

当院に、2005年1月から2008年1月の間に入院した655名の重症心不全患者（NYHA3度および4度）のうち、急性冠症候群、重症肺炎、重症弁膜症、透析患者を除き、両剤を初めて導入した217名（Carvedilol群110名、Bisoprolol群107名）について、導入18か月後の検証を行った。導入前の年齢、性差、既往歴、内服薬、血圧、心拍数、血液データなどの患者特性に有意差は認めなかった。

導入18か月後、生存率および心血管イベント出現率に有意差は認めなかった（図）。両群とも導入前に比べ、血圧、心拍数、左室駆出率、BNP値の有意な改善を認めた。一方、両群の心房細動患者83名（Carvedilol群40名、Bisoprolol群43名）についても検証を行ったところ、生存率および心血管イベント出現率に有意差は認めなかったが、心拍数、BNP値の改善率が、Bisoprolol群でCarvedilol群より有意に大きかった。また、電氣的除細動を行わず、心房細動から洞調律化した患者が、Bisoprolol群でCarvedilol群より有意に多かった（48%対16%； $p=0.03$ ）。

以上の結果から、両剤は同等に重症心不全患者に対して心不全改善効果を有すると考えられた。また、心房細動合併患者に対しては、Bisoprololがより有効である可能性が示唆された。



京都大学大学院医学研究科循環器内科
松森 昭

【目的】われわれのこれまでの研究により、C型肝炎ウイルス(HCV)は種々の病型の心筋症をきたすことが明らかになっている。また、HCV は、肝炎、心筋症のみならず、腎炎、リンパ腫など種々の疾患をきたすことも知られている。われわれは、HCV による多臓器傷害の原因として HCV が白血球に感染することによることを報告してきたが、今回、HCV 構造蛋白に加え、HCV の増殖を示す非構造蛋白の局在について検討した。

【方法】HCV 感染陽性者の末梢血単核細胞(PBMC)および肝臓、心臓、腎臓、骨髄のパラフィン切片を用い、HCV コア蛋白および非構造蛋白 NS4 に対する抗体を用いて ABC 法により免疫染色を行った。また、CD3, CD20, CD68 抗体を用いて二重染色を行った。

【結果】HCV コア抗原の分布を表に示す。

HCV コア抗原陽性細胞の多くは CD68 陽性のマクロファージであることが明らかとなった。

NS4 抗体を用いた検討でも、NS4 陽性細胞は、コア抗原の分布と同様であり、HCV は、主としてマクロファージで増殖することが示唆された。

【表】 肝細胞癌および心筋症剖検心におけるHCVコア抗原の存在

年齢	性	診断	肝臓	心臓	腎臓	骨髄
54	F	HCC	1	1	1	1
58	M	HCC	2	1	1	4
65	M	HCC	2	1	1	3
66	M	HCC	1	1	1	2
68	M	HCC	1	1	1	1
70	M	HCC	2	3	2	4
73	M	HCC	2	2	2	3
76	F	HCC	1	1	1	1
81	M	HCC	1	1	1	3
73	F	HCM	2	2	1	3
81	M	DCM	1	2	1	2
84	F	DCM	2	4	1	2

(Dilated HCM?)

HCC:肝細胞癌

1, 0-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4, 76-100%(全単核球中の陽性細胞の%)

【結論】HCV は肝細胞や心筋細胞などの実質細胞で増殖するのではなく、単核細胞とくにマクロファージで増殖することが明らかとなった。

北里大学循環器内科¹⁾ / 東京女子医大第一病理²⁾ / 理研循環器疾患遺伝子解析チーム³⁾
Dept. Exp. Cardiol., Max-Planck Inst., Bad Nauheim, Germany⁴⁾
豊岡 照彦¹⁾ / 小林 慎夫²⁾ / 田中 敏博³⁾ / S. Kostin⁴⁾
和泉 徹¹⁾ / J. Schaper⁴⁾ / 中村 祐輔³⁾

【背景、および目的】 心筋症の病態と予後に即した治療の開発は患者の QOL 改善と医療財源の有効利用に資する為に極めて重要である。更に、心移植は法改正後もドナー数の圧倒的な不足から需要を賄う事が難しく、その代替策として再生医療・遺伝子治療の早期実現が期待される。複雑な病型、治療効果の差異や予後の決定因子に遺伝的負荷が内在する。先行研究として理研、Post-genome 計画、Case-control study、「SNP 解析によるオーダーメイド医療実現化プロジェクト」に参加して米国製の gene chip による核内遺伝子の探索では心不全関連遺伝子の有望候補が見出されず、また、変異を既に同定した試料を他症例と混在させても変異同定に至らなかった。これは既成の SNP 法による連鎖解析法の限界を示している。一方、欧米と近隣諸国でヒト全ゲノム解析結果が発表され、世界的な知財保護の潮流から我国も積極的な病原性遺伝子の公開特許化が望まれる。

【方法、および結果】 筆者らが開発した核内遺伝子とミトコンドリア遺伝子の合計 2,500 以上の心不全関連ゲノムのデータベースから作製した probe と開発済の SSPE-FCS 法(Hori *et al.*, *Curr.Pharm. Biotech.*, 2003)とミトコンドリア遺伝子の gene chip による全長解析の精度と費用/効果をフォロー中の心筋症患者 81 人で比較し、効率的かつ高精度のマス解析を目指した。なお、従来の SSCP 法による変異検出は遥かに長時間を要し、比較対象からはずした。この結果、既製の gene chip は民族差の大きい遺伝子変異解析に適さなかった。NCBI 発表の sarcomere 遺伝子の SNP/SNV と筆者らのデータベースとは 0.67%一致したに過ぎず、我国独自の chip 開発が急務である。解析には核内遺伝子に加え、ミトコンドリア全ゲノム解析も重要で、その全長解析の結果、多くの病原性遺伝子を同定した。SSPE-FCS 法では 1 セットの probe で 30 分以内に一挙に約 100 人以上の試料の解析が可能であり、double-blind 試験でも全症例の変異を的中して、正確に識別した。この結果、2 名に拡張相を伴う HCM 症例の責任遺伝子として MYH7 とミトコンドリア遺伝子の二重変異も同定した。一方、ミトコンドリア遺伝子配列決定に Resequencing gene chip による microarray は従来の核内遺伝子由来の pseudo-gene に起因する誤診を完全に回避できた。更に全長を Cambridge 配列と比較し、前記症例は我国固有のミトコンドリアハプログループに属することも見出した。以上の microarray 解析費は従来の capillary 法による direct sequencing に比して、諸費用を勘案すると遥かに経済的だった。

【結論】 現状では核内遺伝子解析には SSPE-FCS 法が、一方、ミトコンドリア遺伝子の解析には gene chip による resequencing が最も効率と精度が高かったが、将来は我国固有の遺伝子変異に特化した microarray の開発が望まれた。費用/効果を考慮すると個々の施設でハイレベルの機器設備と多面的な人材(臨床現場からの試料収集+膨大な遺伝子解析+Bioinformatics+医学・生物学的な意味付け)を常時整備することは難しい。近未来で実現の可能性が高い再生医療では遺伝子的に健全な細胞の移植が要求され、前回、筆者が提唱した全国規模の共同利用を目指す Virtual institute の早期実現が期待される。

東北地方の心不全患者の現況と標準治療の浸透度について —第二次東北慢性心不全登録研究中間解析より—

東北大学大学院循環器病態学分野・東北大学大学院循環器 EBM 開発学寄附講座
柴 信行/下川 宏明

【背景】近年の心不全治療の進歩によって心不全患者の予後は改善している。しかしながら、重症心不全患者の予後は未だ不良である。一方、急性心筋梗塞救命率改善、人口構成高齢化を背景にして先進国における心不全有病率は増加している。日本人における心不全患者の特徴と予後を明らかにするために西暦 2000 年 2 月から安定期心不全患者の前向き登録研究：第一次東北慢性心不全登録研究(CHART-1)を開始し西暦 2005 年 12 月に終了した。

【目的と方法】心不全診療の目標は治療から予防へと移りつつある。心不全発症のハイリスク患者におけるうっ血性心不全発症予防の方策解明を目的に西暦 2006 年 10 月から第二次東北慢性心不全登録研究(CHART-2)を開始した。登録対象は、AHA/ACC 心不全診療ガイドラインのステージ B/C/D 患者と全ての冠動脈疾患患者である。本研究開始に先立って東北地区の関連 24 施設と共同して東北心不全協議会を組織して、症例の Web 登録システム開発と研究を補助するコーディネーターによる事務局の開設を行った。

【結果】平成 21 年 12 月末日までに 10,091 名の登録があった。平均年齢は 68.2 歳、男性が 70%を占めた。基礎心疾患の 53%が冠動脈疾患で、特発性心筋症と思われる症例が 13%であった。近年、新しい心血管疾患のリスクとして注目されている慢性腎臓病の頻度は、心不全のステージが B、C、D と進行するにつれてそれぞれ、34%、48%、65%と有意に増加した。ステージ C/D 患者のみを対象に検討すると CHART-1 研究と CHART-2 研究では虚血性心疾患を背景とする症例は、それぞれ 25%から 46%と増加しており心筋症は 33%から 20%と減少していた。一方、心不全の標準治療薬である β 遮断薬の使用頻度について検討すると、CHART-2 研究においてもステージ C、D でそれぞれ、49%、42%と未だ十分とは言えなかった。

【結語】CHART-2 研究は 2010 年 3 月に新規登録を終了し追跡期間を開始する予定である。今後、先行する多施設大規模心不全コホート研究 JCARE-CARD との差異など、日本人の心血管疾患におけるリアルワールドの知見を報告できると考えている。

ナチュラルキラーT細胞の活性化は心筋梗塞後心筋リモデリングおよび心不全を改善する

北海道大学医学研究科循環病態内科学
絹川真太郎/アリソビリン/石森 直樹/筒井 裕之

慢性炎症は心筋梗塞 (MI) 後の心筋リモデリングおよび心不全の進展に関わっていることが知られている。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。これまでに、自己免疫疾患や炎症性疾患において NKT 細胞は防御的な役割を果たしていることが示されている。一方、動脈硬化進展において血管壁の炎症惹起に NKT 細胞が関わっていることが示されている。このように、NKT 細胞は組織炎症において二面性を有すると考えられるが、心不全・心筋リモデリングにおける役割については全く知られていない。我々は MI 後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。MI マウスに NKT 細胞を特異的に活性化する α -galactosylceramide (α -GalCer)を投与すると、生存率は有意に改善した。この結果と一致して、左室径、左室短縮率、左室拡張末期圧および肺重量が改善した。一方、梗塞サイズや血圧・心拍数には影響しなかった。NKT 細胞受容体(V α 14J α 18)遺伝子発現は MI マウスの非梗塞部心筋で梗塞後初期 (7日後)に一過性に増加した。 α -GalCer の投与によって、梗塞後初期の NKT 細胞受容体発現増加をさらに高め、この増加は慢性期 (4週後)まで持続した。NKT 細胞の活性化と並行して、monocyte chemoattractant protein-1、tumor necrosis factor- α および interleukin-10 (IL-10) 遺伝子発現が梗塞後初期に増加し、IL-10 mRNA の増加のみが慢性期まで持続した。NKT 細胞は MI 後の心臓において保護的な役割を果たしていると考えられた。

【目的】アルドステロン (ALD) は高食塩食下ではミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介して心肥大、心線維化などの心リモデリング、および高血圧を惹起する。マウスやラットではアルドステロンは通常食塩食下ではそれらを惹起しない。ナトリウム利尿ペプチド受容体/guanylyl cyclase-A ノックアウトマウス (GC-A KO) は通常食塩食でも心リモデリングの表現型を呈する。我々は選択的 MR ブロッカー (エプレレノン) を用いた実験で MR シグナルが GC-A KO の心リモデリングに深く関与していることを証明した。しかし、その詳細な機序は不明である。また、ALD 誘発性心リモデリングの発症機序や保護機序も不明な点が多い。今回は ALD 誘発性心リモデリングにおける GC-A シグナルと食塩毒性の関係を調べるために GC-A KO と野生型マウス (WT) を用いて種々の食塩条件下で心リモデリングの程度を検討した。

【方法・結果】12 週齢の雄の GC-A KO と WT を低食塩食 (LS) (0.001% NaCl)、通常食塩食 (NS) (0.6% NaCl)、および高食塩食 (HS) (6.0% NaCl) 群に分類しさらに ALD 投与 (100ng/kg/min) の有無でそれらを群分けして 4 週間後に心リモデリングを検討した。今回使用した ALD の投与量では GC-A KO、WT とともに各食塩条件において投与前に比較して血圧上昇は認められなかった。しかし、GC-A KO での NS 群および HS 群では ALD による心リモデリングの増悪が認められた。それ以外の群では ALD による心リモデリングの増悪は認められなかった。これらのデータは GC-A シグナルは ALD 誘発性心リモデリングにおいて食塩の効果に拮抗していることが証明された。また、ALD 投与の無い GC-A KO の HS 群では、GC-A KO での LS 群に比較して心臓での collagen I や BNP の mRNA の上昇が認められた。GC-A KO では高食塩負荷だけで軽度心リモデリングが誘発されていると考えられた。各食塩条件下で GC-A KO と WT 間に血漿 ALD 濃度と心臓における MR の mRNA の発現量に差が認められなかった。従って GC-A KO では食塩依存的に ALD による MR の反応性が増加しているものとも考えられた。

【結論】GC-A KO では NS 群でも ALD による心リモデリングが認められた。GC-A シグナルは ALD による心リモデリングにおいては食塩の効果を増強していると考えられた。

ヒト慢性心不全における microRNA 発現プロファイリングと機能解析

慶應義塾大学医学部再生医学教室

金田 るり / 西山崇比古 / 高田 修治 / 間野 博行
湯浅 慎介 / 牧野 伸司 / 佐野 元昭 / 福田 恵一

低分子 RNA は、蛋白コード遺伝子の翻訳抑制や変性を引き起こすことで、生物の発生過程や癌の病態に深く関与すると知られている。循環器領域においても、心臓の発生、心不全、心肥大、不整脈などの疾患で、その重要性が報告され始めている。しかしながら、ヒト慢性心不全臨床検体を用いた網羅的な microRNA の発現プロファイリングを行っているものは少なく、心臓組織内で機能が解明されているものも極一部に過ぎない。我々は、少量の臨床検体からも低分子 RNA をゲノムワイドに検出可能な解析技術である mRAP 法 (Takada S, et al. *Nucleic Acids Res* 34; 2006) を確立し、ヒト不全心筋 7 例、正常心筋 2 例から、各検体平均 2891 の低分子 RNA 由来 cDNA をシークエンスし、平均 346 リードの microRNA を同定した。不全心筋、正常心筋の両群間において有意に発現量に差のある microRNA は 11 種類認められた。

心不全特異的に発現量の低下が認められる microRNA として、miR-142-3p を同定した。miR-142-3p が心臓組織内においていかなる機能を有するか、ゼブラフィッシュ胚にモルフォリンをインジェクションしノックダウン (KD) 解析を行うと、徐脈、2:1 AV ブロックなどの不整脈、心房筋肥厚、心室収縮障害などが出現し、受精後 7~10 日で致死となる。心臓組織外においては、体節形成異常、血管内を循環する赤血球の消失が認められた。

DNA マイクロアレイ解析では、KD 胚で *mespa*, *tbx16*, *one-eyed pinhead (oep)* 遺伝子の発現亢進が認められた。これら遺伝子のうち一部は、miR-142-3p の直接の標的遺伝子として、上記表現型出現の機序に関与している可能性が示唆される。我々は nodal receptor の co-factor で、心臓発生上重要な機能を有する *oep* 遺伝子に着目した。ルシフェラーゼアッセイでは、*oep* 遺伝子の 3'UTR が、miR-142-3p によって制御されていることを明らかにした。

これらの結果から、miR-142-3p は、心不全特異的に発現量の低下する低分子 RNA で、心臓発生・体節形成・血球形成過程に重要な機能を有し、標的遺伝子 *oep* の発現制御を介していることが示唆された。

心筋梗塞後リモデリングにおける樹状細胞の役割

慶應義塾大学医学部循環器内科¹⁾／獨協医科大学解剖学²⁾
吉川 勉¹⁾／内藤広太郎¹⁾／菅野 康生¹⁾／前川裕一郎¹⁾
河野 隆志¹⁾／松野健二郎²⁾／小川 聡¹⁾／安斉 俊久¹⁾

樹状細胞は抗原提示、T細胞の活性化、Th1/Th2への分化など免疫応答において中心的な役割を果たすことが知られている。心筋梗塞後リモデリングの成立過程における樹状細胞の役割については不明である。本研究は、ラット心筋梗塞モデルを用いて、心筋樹状細胞が梗塞後リモデリングに果たす役割を明らかにすることを目的とした。ウイスター・ラットの左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成し、2週間経過観察した。OX62陽性樹状細胞は心筋梗塞後7日目をピークに梗塞部・境界領域に浸潤することが確認された。心筋梗塞作成後7日間にわたってGM-CSF誘導薬であるロムルチドを投与（GM-CSF群）すると、2週間後の左室最大dp/dtは低値で、内腔は拡張した。一方、G-CSFを同期間投与（G-CSF群）すると、dp/dtは高値で、リモデリングは抑制された。心筋樹状細胞の浸潤はGM-CSF群で増加し、G-CSF群で低下した。梗塞部位におけるtoll-like receptor-2および-4、heat shock protein 70、インターフェロン γ の発現はGM-CSF群で増加し、G-CSF群で低下した。インターロイキン-10はGM-CSF群において低値で、G-CSF群で高値であった。

【結論】心筋梗塞後には梗塞部を中心として樹状細胞が浸潤し、梗塞後リモデリングと密に関連することが明らかとなった。

心サルコイドーシスのステロイド治療と心駆出率変化に及ぼす因子に関する検討

九州大学循環器内科
井手 友美／砂川 賢二

心サルコイドーシスは、心筋症の中でも、進行性で予後不良であり、早期のステロイド治療による介入が必要と考えられる。しかしながら、その治療効果については、大規模臨床研究による検証もなされていない。治療に際しては、日本サルコイドーシス学会による治療ガイドラインにそって、その投与方法が決められているが、減量のタイミングについては担当医師個人の経験・裁量によることも大きく、適切な維持量についても、判断するデータに乏しいことも少なくない。九州大学病院で2000年から2009年12月までに診断・ステロイド治療を開始し、8ヶ月以上のフォローが可能であった心サルコイドーシス15症例について、ステロイド治療後の心エコー上の駆出率の変化に及ぼす因子について後ろ向きに検討した。すべての症例は、心サルコイドーシスガイドラインに沿って、プレドニン30mg/dayまたは60mg/隔日投与され、初回投与量を4週間維持した後は、最低2週間以上の間隔で2.5~5mgごとに減量された。（平均フォローアップ期間1264日）変動効果モデルを用いて解析を行った結果、ステロイド開始日からステロイド10mg未満となった日数に関して、連続変数での交互作用の検定では、ステロイドが10mg未満となった日までの日数が短いことがEFの低下に関連していた（ $P<0.0001$ ）。維持量として、2.5mg~5mgの群と10mgの群では、駆出率変化に有意差はなかった。ステロイド減量に際しては、可能な限り10mg~15mgで長期間維持した後に、さらなる減量を目指すべきであると考えられる。

カルシウム増感剤による拡張型心筋症発症抑制の試み

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野¹⁾ / 東京農工大学獣医学部外科²⁾

東京農工大学獣医学部臨床腫瘍科³⁾ / 九州大学大学院医学研究院臨床薬理学⁴⁾

Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitie Salpetriere⁵⁾

木村 彰方¹⁾ / 有村 卓朗¹⁾ / 佐藤 里香²⁾ / 町田 登³⁾

田中 稜²⁾ / 森本 幸夫⁴⁾ / 山根 義久²⁾ / Gisele Bonne⁵⁾

【目的】 拡張型心筋症 (DCM) の一部は遺伝子変異に起因するが、その原因遺伝子は多種多様である。これまでの研究により DCM 病因変異は心筋収縮のカルシウム (Ca) 感受性の低下を来たすことが判明している。また、心不全の際には心筋の Ca 感受性が低下すると報告されている。そこで、Ca 感受性を亢進させることで DCM における心不全の発症予防が可能かどうかを検討した。

【方法】 DCM モデルマウスである LMNA 変異ノックインマウスを対象として、PDEIII 阻害作用がない Ca 増感剤 (SCH00013) を 2 カ月齢 (心不全発症前) より投与 (10mg/Kg/day) し、心機能評価、心筋病理組織評価、心筋における遺伝子発現解析ならびに生存率評価を行った。

【結果と考察】 Ca 増感剤投与により、血圧は変化しなかったが、LMNA 変異ノックインマウスの生存延長 (50%生存月数: 雄マウス $7.90 \pm 0.26 \rightarrow 8.70 \pm 0.22$ 、雌マウス $9.80 \pm 0.26 \rightarrow 11.14 \pm 0.31$) が観察された。また、心機能評価では %FS 低下が抑制され、心筋線維化の抑制、さらには心筋リモデリング関連遺伝子発現亢進の抑制が観察された。なお、LMNA 変異ノックインマウスでは心不全発症前には心筋 Ca 感受性は変化していなかった。このことは、心筋 Ca 感受性低下の有無によらず、Ca 増感剤による DCM 発症遅延が可能であることを示す。

【結論】 DCM モデルマウスでは Ca 増感剤による DCM 発症遅延が可能であった。

Dynamic ^{99m}Tc-sestamibi washout curve は、急性心筋梗塞患者における慢性期の心機能を予測する

山形大学医学部第一内科

渡邊 哲 / 加藤 重彦 / 久保田 功

背景: ^{99m}Tc-sestamibi (MIBI) は脂溶性カチオン心筋血流イメージング製剤で、心筋細胞への取り込みと貯留は、ミトコンドリア膜電位に依存する。心筋 viability 評価や心機能評価が可能であり、虚血性心疾患のみならず、心筋症や心不全の重症度評価にも応用が期待されている。また心筋からの washout はミトコンドリア機能を反映するとされている。しかし、この washout の評価法は十分には確立されていない。

目的: ^{99m}Tc-MIBI SPECT dynamic scan (0-30 分) と、そこから算出された washout curve の有用性について、急性心筋梗塞 (AMI) 患者を用いて検討を行った。

方法: 当院で緊急冠動脈形成術を施行された AMI 患者連続 54 例 (男性 40 例、平均年齢 67 ± 11 歳) と冠動脈疾患のない対照 7 例を対象とした。退院時と 6-8 か月後の慢性期に ^{99m}Tc-MIBI SPECT を施行した。退院時の SPECT は ^{99m}Tc-MIBI 静注後 0-30 分まで 2 分毎撮影を行う dynamic scan と 60 分後の early scan、180 分後の delayed scan の計 3 回施行した。また dynamic SPECT では、冠動脈領域毎に washout curve を作成した。

結果: 梗塞領域の washout curve の傾きは、非梗塞領域の washout curve の傾きと比較して有意に急峻であり (-0.012 ± 0.004 vs. -0.009 ± 0.003 , $p < 0.0001$)、washout が亢進していた。この washout curve の傾きは、慢性期の梗塞領域および QGS より求めた左室駆出分画と相関した。興味深いことに従来の washout rate (60-180 分) とは相関を認めなかった。さらに washout curve の傾きは、多変量ロジスティック回帰分析で、慢性期の中等度以上の心筋傷害に対する独立した危険因子であった (OR: 0.144, 95% CI: 0.000-0.819, $p = 0.029$)。

結論: Dynamic ^{99m}Tc-MIBI SPECT を用いた washout curve は、AMI 患者の慢性期の心筋傷害の程度を予測しうることを示唆された。今後、心筋症の患者において、この washout curve が重症度評価に有用かを検討したい。

心臓移植における抗体関連型拒絶反応への対応

国立循環器病センター臓器移植部，臨床検査部，心臓血管外科，病理・再生医療部
中谷 武嗣／築瀬 正伸／瀬口 周／村田 欣洋／加藤 倫子／山本 賢
古田 賢二／戸田 宏一／藤田 知之／植田 初江／佐田 正晴

【はじめに】心臓移植後の管理において抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection:AMR) が注目されるようになった。心臓移植待機中に HLA 抗体を有し panel reactive antibody (PRA) 検査において、%PRA が高値を示す症例は AMR ハイリスク群として管理することが重要である。わが国における心臓移植では、ドナー数が少ないことより心臓移植待機期間が長期に及んでいる。このため、待機中に左心補助人工心臓 (LVAS) 装着を必要とする症例が多く、これまでの心臓移植施行例の 80%以上が LVAS 装着例である。このような LVAS 装着例では、装着術および術後の管理において多量の輸血を必要とする症例が多い。このため、同種抗原に対する感作機会が多く、HLA 抗体保有の危険性も高い。また、移植実施時期の予測が難しいため、移植前の脱感作療法も困難である。心臓移植対象および施行患者の管理において産生抗体の推移や既存抗体および特異性を把握することは重要である。

【対象・方法】当センターでは、当初より産生抗体および既存抗体をモニタリングし、移植後管理を行ってきた。これまでの心臓移植施行例は 27 例(男 19 例、女 8 例)で、維持免疫抑制療法は、シクロスポリンまたはタクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、プレドニンの 3 剤併用療法を用いた。HLA 抗体スクリーニング検査としては Flow PRA I & II Screening Test (One Lambda) を、HLA 抗体特異性検査としては Flow PRA Class I Single Antigen (One Lambda) を用いた。また、移植直前および移植後の donor specific antibody(DSA)を検討した。分析機器は FACS Calibur を、測定解析ソフトは Cell Quest を使用した。心筋生検は国際心肺移植学会の診断基準に従った。

【結果】移植時平均年齢 41 歳、待機期間は 29-2748 日であった。24 例は LVAS 装着例で、装着期間 39-1444 日であった。1 例が 4 年 2 ヶ月後に感染症により死亡したが、他の 26 例は生存し最長 10 年を超え外来フォロー中である。HLA 抗体保有例は 13 例(移植前:6 例、移植後産生:7 例)、抗体陰性例が 14 例であった。PRA 高値例においては血漿交換、 γ グロブリン大量療法を行い、心筋生検検査において免疫組織学的染色を追加し、管理を行った。

【考察・結語】心臓移植患者管理においては、AMR を回避することおよび適正に対応することは重要である。このため Flow PRA による既存抗体やその特異性の把握は、AMR を早期に診断するための心筋生検施行時期や脱感作療法の治療効果判定において重要な情報を提供しえる。

トロポニン T 遺伝子変異による拡張型心筋症マウスに対するカンデサルタンの予後改善効果に関する検討

東京慈恵会医科大学循環器内科¹⁾／東京慈恵会医科大学細胞生理²⁾／東京慈恵会医科大学青戸病院内科³⁾
本郷 賢一¹⁾／栗原 敏²⁾／吉村 道博¹⁾／武田 信彬³⁾

遺伝性拡張型心筋症の原因遺伝子の一つとして同定されたトロポニン T K410 欠失変異を、正常トロポニン T と入れ替え作成したノックインマウス (DCM マウス) を用いて実験を行った。DCM マウスでは、収縮タンパク系 Ca 感受性の著明な低下が認められ、これが左室拡張や左心機能低下の主因であると考えられた。また、生後 1 ヶ月過ぎより突然死する個体が出現し、6 ヶ月以内にほぼ全ての個体が死亡することも明らかになってきた。アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) であるカンデサルタンを DCM マウスに経口投与すると、生命予後が顕著に改善することが明らかになった。このメカニズムとして、収縮タンパク系 Ca 感受性の改善効果を予測したが、細胞内 Ca 濃度測定やスキンド標本を用いた実験より、細胞内 Ca 動態及び収縮タンパク系 Ca 感受性に対しては、カンデサルタン投与は影響しないことが判明した。心エコー所見より、左心機能の改善傾向及び左室拡張の明らかな改善を認めたことより、カンデサルタン投与による左室リモデリングの改善が主な作用機序と考えられた。組織学的検討において、DCM マウスでは心筋組織の線維化亢進が認められたが、カンデサルタン投与により線維化の抑制が認められ、心筋リモデリング改善の一因と考えられた。

ドキシソルピシン誘発性心筋障害におけるサイトカイン機能調節因子の役割の検討

久留米大学医学部心臓血管内科循環器病研究所

安川 秀雄/京極 幸子/永田 隆信/大場 豊治/今泉 勉

アントラサイクリン系抗生物質は抗腫瘍効果が強いために抗がん剤として汎用されている。しかし、用量依存性に心筋障害や心不全などの重篤な副作用を誘発するため使用が制限される。塩酸ドキシソルピシン (Dox) 誘発性心筋障害の病態におけるシグナル伝達の分子機序については不明な点が多い。JAK-STAT 経路は心筋細胞の生存シグナルとして重要であり、我々はこれまでに JAK-STAT 経路のネガティブフィードバック因子である suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) をクローニングしその作用機構や生理機能を明らかにしてきた。本研究の目的は、Dox 心筋症モデルマウスを用いて、Dox 誘発性心筋障害の病態における SOCS3 の役割を明らかにすることである。Dox 投与後の野生型マウス (WT) の心臓における STAT3 のリン酸化と SOCS3 の発現をウェスタンブロットで解析したところ、STAT3 のリン酸化は Dox 投与後 3 日目が最大であり、これに一致して SOCS3 の発現誘導を認めた。心筋障害マーカーである血清中の CK-MB の値は Dox 投与後 3 日目にピークとなり、STAT3 の活性化と心筋障害に関連があることが示唆された。Dox 誘発性心筋障害の病態における STAT3-SOCS3 シグナルの役割を明らかにするために心筋特異的 SOCS3 欠損マウス (SOCS3-KO) を作成した。Dox 投与後 14 日目において、左室駆出率の低下と左室収縮期径の拡大は WT に比べ SOCS3-KO で有意に抑制された。Dox 投与後 14 日目において、HE 染色上の心筋障害は SOCS3-KO 抑制され、AZAN 染色上の心筋の線維化は SOCS3-KO で有意に抑制されていた。Dox 投与後 3 日目の血清中の CK-MB の値の上昇は、WT に比べ SOCS3-KO で有意に抑制されていた。さらに、Dox 投与後の心臓における STAT3 のリン酸化は、WT に比べ SOCS3-KO で有意に遷延していた。これらの結果より、Dox 投与後の SOCS3-KO 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、JAK-STAT 系が活性化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。

糖尿病性心筋症の病態解明—糖尿病性心筋症は存在するのか?—

国立国際医療センター戸山病院循環器科・研究所・病理科¹⁾

筑波大学人間総合科学研究科循環器内科・救急部²⁾ / 岐阜大学大学院医学系研究科循環器内科³⁾

廣江 道昭¹⁾ / サブリナ ジェスミン¹⁾ / 遠藤 久子¹⁾

下條 信威²⁾ / 村越 伸行²⁾ / 青沼 和隆²⁾ / 竹村元三³⁾

(目的) 糖尿病性心筋症 (Diabetic cardiomyopathy) との疾患概念は、1972 年 Rubler らによって提唱されて以来、“microvascular disease” か “metabolic disease (myocardial steatosis)” なのか論議が展開されている。動物疾患モデルと分子生物学による実験系の進展によって心筋の器質的・機能的障害をもたらす機序の解明がなされているが、いまだ不明な問題が多い。本研究では、糖尿病性心筋症の病態解明により早期診断法の開発に関する研究により治療に応用することを目的とする。

(方法と結果) 1) 病理形態的観察: 剖検報告書の記載を基に過去 5 年間で、糖尿病 17 症例 (年齢 51 歳 ~ 91 歳、BMI、15.2 ~ 29.4、心重量推定: 心重量 g / 身長 cm = 1.5 ~ 3.6) を対象とした。心筋標本は HE 染色と MT (マッソン・トリクロム) 染色により観察した結果、直径 200 μ 以下の中・小血管の硬化像、内膜肥厚による血管内腔の狭窄、血管周囲心筋細胞を取り囲むように広がる細い線維化を見出した。2 例の生検心筋では、電頭上、心筋細胞はリポフスチン、グリコーゲン、ミトコンドリアの集簇が目立ち、変性所見がある。毛細血管基底膜の肥厚所見が見られた。2) 糖尿病動物モデルでの検討: ストレプトゾトシン投与による I 型糖尿病ラットモデルを作成した結果、心筋内微小血管網の形成異常を伴う心肥大と心機能障害が観察され、心筋 vascular endothelial growth factor (VEGF) と eNOS の低下との関連が示唆された。さらにエンドセリン拮抗薬によって VEGF の上昇と共に心機能の改善が観察された。

(まとめ) 糖尿病に見られる心筋障害には心筋 VEGF 発現の低下に伴う血流障害が一因と考えられる。

組織構築改変を制御する因子として細胞外マトリクスの一種 **Matricellular** タンパクが注目されている。**Matricellular** タンパクは 1. 発生期や組織傷害後の修復過程、癌浸潤などで高いレベルで発現する、2. 膠原線維、弾性線維や基底膜のような構造物をつくらない、3. 強い細胞接着を緩める脱接着作用 (de-adhesion) をもつという共通の性質をもち、その中のいくつかの分子について、細胞表面にある受容体、他のマトリクス分子、成長因子、サイトカイン、プロテイナーゼなどと結合し、その活性を調節することが明らかになっている。テネイシン C (TnC) は 1、2、3 の特徴を示す典型的な **matricellular** タンパクである。我々はこれまで、TnC が拡張型心筋症患者の心室リモデリング進行を制御する重要な因子の一つであり、線維化促進、炎症の反応の増強、間葉細胞の動態制御、特に血管新生の際、中膜平滑筋細胞の分化、動員の促進など多彩な機能をもつことを見いだした。しかし、一つの分子の中に複数の生物活性ドメインをもち、複数のレセプターと結合し、組織、細胞の種類や分化度によって相反するいくつかの機能を示すため、その詳細なシグナル伝達機構は十分明らかになっていない。今回は血管平滑筋細胞の動態制御メカニズムに注目した。ラット平滑筋細胞株 A10 を用いて検討すると、TnC は PDGF-BB による細胞増殖と遊走促進作用を増強した。さらに、TnC 存在下では TnC の受容体の一つであるインテグリン αv 鎖発現と接着斑への集積の増強、PDGFR- β の自己リン酸化の増強、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体で共沈する PDGFR- β 量の増加が促進された。従って、少なくとも、血管平滑筋細胞では、TnC 存在下で、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンと PDGFR の複合体の形成が促進されることにより、PDGF のシグナルを増幅する経路があることが示唆された。

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効果の検討

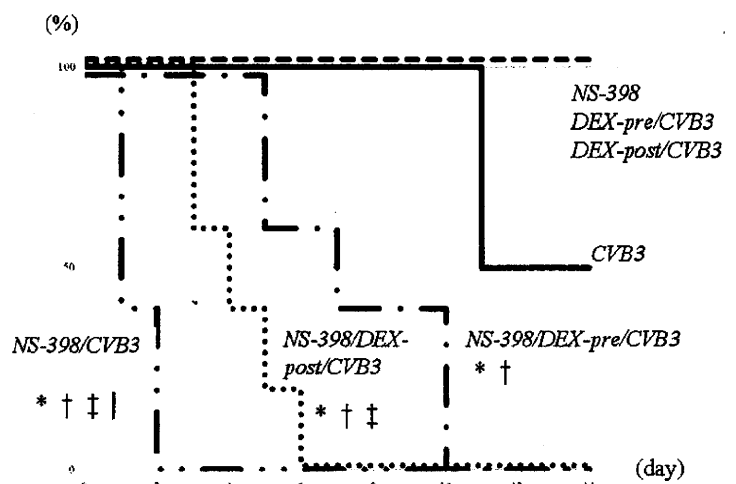
【目的】 グルココルチコイドはストレス時に心筋保護的に作用することが知られている。そこでマウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone (DEX) の効果を検討した。

【方法】 3 週令雄 A/J マウスに coxsackievirus B₃ (CVB3) 2×10⁴PFU を腹腔内接種し心筋炎を作成した。このウイルス接種群に加え、DEX 0.15ml/日を 5 日間投与した後、6 日目にウイルスを接種した群 (前投与群)、CVB3 接種翌日より DEX 0.15ml/日を 5 日間連続投与した群 (後投与群) の 3 群を用いて比較検討した。全群ともウイルス接種 14 日後にマウスの心臓を摘出し、左室内径、壁厚、ウイルス力価 (TCID₅₀) を測定した。さらに COX-2 阻害実験として、NS-398 (3 mg/kg/day) を用い各群の生存率とウイルス力価を比較検討した。

【結果】 ウイルス単独投与群は、左室内径の拡張と壁厚の減少、ウイルス力価の上昇を認めたが、DEX 投与群では先行及び後投与のどちらにおいてもウイルス性心筋炎による組織変化は有意に抑制されていた。更に、ウイルス接種と共に NS-398 を使用した群の方が全例とも早期に死亡した (P<0.05)。

【まとめ】 ウイルス性心筋炎に対する DEX の使用は、生存率と心筋障害を改善した。反対に、ウイルス性心筋炎において COX-2 阻害剤の使用によりマウスの早期死亡が見られることより、ステロイド受容体の下流である COX-2 が心筋保護に関与していると考えられた。DEX はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、DEX による保護効果が、COX-2 の誘導を介している可能性が示唆された。

● Survival curve



拡張型心筋症発症における CaMKII δ と p53 の役割

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学／大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学
小室 一成

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り、その生命予後を改善する新たな治療法の確立が望まれている。拡張型心筋症の原因は多岐にわたるが、その約 30%は遺伝子変異によると考えられている。しかしながら、現在のところ遺伝子変異より拡張型心筋症を発症する機序については未だ不明である。最近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 (mActin-Tg) を新規に作成した。ヒトと同じ遺伝子変異を持つこのモデルマウスはヒト拡張型心筋症と非常に類似した表現型を示し、現在このモデルマウスを用いて、遺伝子変異より拡張型心筋症に至る分子機序に関して検討を行っている。

これまでの検討により、mActin-Tg マウスの心機能低下は p53 依存性の心筋細胞死によってもたらされること、また、心筋における p53 の活性化は CaMKII δ を介するものであることがそれぞれ明らかになった。今回は CaMKII δ 活性化の機序を明らかにするために、以下のような検討を行った。まず単離心筋に Fluo-3 AM をロードし Ca transient を測定したところ、WT と Tg では細胞内 Ca 濃度には有意な差は認められなかった。しかしながら、mActin-Tg マウスを NFAT-luc Tg マウスと交配し mActin-Tg マウス心臓における calcineurin 活性を測定したところ、mActin-Tg マウス心筋では calcineurin 活性が上昇していることが明らかになった。また、心室乳頭筋より作製した skinned fiber を用いて Ca 感受性を測定したところ、mActin-Tg マウス由来心筋の Ca 感受性は低下しており、その低下の程度は 2 ヶ月齢から 10 ヶ月齢までほぼ同程度であった。以上の結果から、mActin-Tg マウスの心筋においては Ca transient で示される細胞全体の Ca 濃度の上昇はみられないものの、calcineurin 活性化につながるような局所の Ca 動態の変化があり、それが CaMKII δ の活性化をきたしているものと考えられた。他の拡張型心筋症モデルと同様に mActin-Tg マウス心筋においても Ca 感受性の低下が認められたが、これが局所 Ca 動態の変化に関与しているかは今後の検討課題であると考えられた。

肥大型心筋症の臨床病態と原因遺伝子との関連

金沢大学循環器内科
藤野 陽／山岸 正和

背景: 肥大型心筋症は、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 β ミオシン重鎖、心筋トロポニン T、心筋トロポニン 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報告してきた。これらサルコメア遺伝子変異が肥大型心筋症例の約 50~60%の原因であると報告されている。この中で特に、個々の家系において臨床病態を解析したところ、心筋トロポニン T や I に伴う肥大型心筋症においては収縮不全や心不全をきたす例が多いことを明らかにしてきた。しかしながら、多数の家系で系統的に原因遺伝子の違いによる臨床病態の差異を比較した場合、同様の結果が得られるか否かについては不明な点が多い。

目的: そこで今回我々は、遺伝子変異を同定した肥大型心筋症について、原因遺伝子の違いにより収縮不全発症頻度に差があるかどうかを検討した。

結果: 遺伝子変異を同定した肥大型心筋症 149 例において、臨床病態の追跡が可能であった。これらの症例を、thick filament の遺伝子群 (心筋 β ミオシン重鎖とミオシン結合蛋白 C)、thin filament の遺伝子群 (心筋トロポニン T、心筋トロポニン I) に分けて比較したところ、全年齢を対象とした場合には両群に差は認められなかった (7/74 vs. 13/75)。しかしながら、40 歳以上の症例のみを対象とした場合、収縮不全の発症頻度には差が認められた (7/52 vs. 13/47, $P < 0.05$)。

結論: 40 歳以上の肥大型心筋症について、心筋トロポニン T や I 遺伝子変異に伴う症例については収縮不全をきたす頻度が高く、より注意深い経過観察・治療が必要であると考えられた。