of G-CSFR is not well understood (Stratos et al., 2007; Naito et al., 2009). We proved that BM-derived cells were not directly involved in skeletal muscle regeneration by G-CSF; however, BM-derived cells expressing G-CSF ligand can stimulate skeletal muscle proliferation through myoblast-specific expression of G-CSFR. This study demonstrates for the first time that the factors involved in the inflammatory process switch on the process of skeletal muscle regeneration.

Clinically, G-CSF is used to treat patients with neutropenia resulting from immunosuppressive chemotherapy, severe congenital neutropenia, life-threatening infections, and stem cell harvesting (Hammond et al., 1989; Molineux et al., 1990; Welte et al., 1996). Interestingly, myalgia is one of the main side effects of G-CSF administration in humans (Taylor et al., 1989). We may speculate that innate skeletal muscle regenerates itself to some extent to adapt the physiological turn over, that G-CSF injection stimulates small population of these skeletal myoblasts, and that the burst of skeletal myocyte proliferation gives rise to myalgia. The safety and side effects of G-CSF have been studied in several clinical settings (Anderlini and Champlin, 2008). Therefore, a clinical trial of G-CSF for human skeletal muscle injury may be warranted. The results of this study underline the importance of G-CSF in skeletal muscle development and regeneration and strengthen the case for using G-CSF as a skeletal muscle regeneration therapy.

MATERIALS AND METHODS

Whole-mount in situ hybridization. Mouse embryos were removed from wild-type Institute of Cancer Research pregnant mice on E10.5. Whole-mount in situ hybridization was performed as described previously (Yuasa et al., 2005). The full-length cDNAs for mouse *c-met*, *pax3*, *myoD*, and *mrf4* (available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession numbers NM_008591, NM_001159520, NM_010866, and NM_008657 [listed as *myf6*], respectively) were provided by M.E. Buckingham (Pasteur Institute, Paris, France). The full-length cDNA for mouse *csf3r* (GenBank accession number NM_007782) was provided by S. Nagata (Osaka University, Suita, Osaka, Japan; Fukunaga et al., 1990). The probes were generated using T3 or T7 RNA polymerase.

Animals. The *myf5 nlacZ* mice were a gift from S. Tajbakhsh (Pasteur Institute; Tajbakhsh et al., 1996). The $csf3r^{-/-}$ mice were a gift from D.C. Link (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; Richards et al., 2003). All the experimental procedures and protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Keio University and conformed to the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Immunofluorescence. Mouse embryos on E8.5, E9.5, E10.5, and E11.5 were fixed in 4% paraformaldehyde for 3 h and embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura) for frozen sectioning. The samples were incubated with Triton X-100 for 5 min at room temperature, washed, and incubated with the following primary antibodies: anti–G-CSFR (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-Pax3 (1:200; American Type Culture Collection), anti-Pax7 (1:50; R&D Systems), anti-MyoD (1:50; Dako), antimyogenin (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), antidesmin (Dako), anti–G-CSF (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti–α-actinin (1:1,000; Sigma-Aldrich), and anti-GAPDH (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After overnight incubation, bound antibodies were visualized with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 or 546 (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). For BrdU staining, a BrdU labeling kit (Roche) was used. After antigen retrieval using HistoVT One (L6F9587; Nacalai Tesque) and blocking, BrdU staining was performed as described in the manufacturer's protocol.

Myoblast culturing. C2C12 mouse myoblasts (American Type Culture Collection) were cultured in DME/10% FBS (Invitrogen). The medium was replaced with DME/2% horse serum (Invitrogen) to induce differentiation. Recombinant mouse G-CSF (R&D Systems) was added on the indicated days. Inhibition of G-CSF signaling was analyzed by administering an anti–G-CSFR neutralizing antibody (R&D Systems).

Western blotting. C2C12 cells were treated with G-CSF. Cell extracts were prepared at 0, 5, 10, 15, 30, 45, and 60 min after G-CSF stimulation. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane, followed by immunoblotting with anti–phospho-STAT3, anti–phospho-AKT, anti–phospho-ERK, anti–phospho-JNK, and anti–phospho-p38MAPK antibodies (all from Cell Signaling Technology) and horseradish peroxidase–conjugated anti IgG, followed by development with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent reagent (Thermo Fisher Scientific). The same membrane was retrieved and reblotted with anti-STAT3, anti-AKT, anti-ERK, anti-JNK, and anti-p38MAPK antibodies (all from Cell Signaling Technology), respectively.

Luciferase analysis. C2C12 cells plated in DME were transfected with Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The APRE luciferase plasmid was provided by A. Yoshimura (Keio University, Shinjuku, Tokyo, Japan) and used at a dosage of 100 ng. The administered dosages of G-CSF were 37.5, 125.0, and 375.0 pg/ml. CMV-*Renilla* luciferase was used as an internal control to normalize for variations in transfection efficiency. All of the proteins were expressed at similar levels, as confirmed by Western blotting.

Skeletal muscle injury model. 10 μM cardiotoxin (*Naja mossambica mossambica*; Sigma-Aldrich) diluted in 100 μl PBS was injected into the rectus femoris muscles of BL6/J mice using a 27-gauge needle and a 1-ml syringe. The needle was inserted deep into the rectus femoris longitudinally to the knee. Cardiotoxin was injected along the length of the muscle. The mice in the control group were injected with 100 μl PBS. Mice (treated and control groups) were sacrificed at various time points after cardiotoxin injection, and blood samples (1.0–1.5 ml from each mouse) were collected in heparin-rinsed syringes.

Handgrip strength testing. 10 μM cardiotoxin (Sigma-Aldrich) diluted in 100 μl PBS was injected into forearm muscles of BL6/J mice. Five training sessions were performed during which the animals were held, facing the bar of the grip strength meter (Muromachi Kikai), while the forearm was gently restrained by the experimenter. When the unrestrained forepaw is brought into contact with the bar of the grip strength meter, the animal grasps the bar, after which the animal is gently pulled away from the device. The grip strength meter measures the maximal force applied before the animal released the bar.

BM transplantation. BM cells were harvested from 8-wk-old enhanced GFP (EGFP)-transgenic mice. After irradiation with a single dose of 9.0 Gy, the unfractionated $EGFP^+$ BM cells (1×10^6 cells) were injected via the tail vein, as described previously (Kawada et al., 2006). To assess chimerism, peripheral blood cells were collected from the recipient mice 60 d after BM transplantation, and the frequency of $EGFP^+$ cells in the population of peripheral nucleated blood cells was determined in a FACS sorter (BD) after hemolysis was induced with ammonium chloride to eliminate erythrocytes.

Statistical analysis. The data were analyzed using the StatView J-4.5 software (SAS Institute, Inc.). Values are reported as means ± SD. Comparisons among groups were performed by one-way analysis of variance. Scheffe's F test was used to determine the level of significance. The probability level accepted for significance was $P < 0.05$.

Downloaded from jem.rupress.org on April 27, 2011

Online supplemental material. Fig. S1 shows the effect of G-CSF on myoblast differentiation in C2C12 cells and myoblasts harvested from $csf3r^{+/+}$ and wild-type mice. Fig. S2 shows histological analysis of cardiotoxin-injured skeletal muscle from day 1 to 28. Fig. S3 shows the chimerism of hematopoietic cells before and after BM cell transplantation and quantitative analysis of the areas of the skeletal myocyte sections in the $csf3r^{-/-}$ and $csf3r^{+/+}$ mice with BM transplantation. Online supplemental material is available at http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20101059/DC1.

This study was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the National Institute of Biomedical Innovation.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 26 May 2010
Accepted: 11 February 2011

REFERENCES

Aarts, L.H.J., O. Roovers, A.C. Ward, and I.P. Touw. 2004. Receptor activation and 2 distinct COOH-terminal motifs control G-CSF receptor distribution and internalization kinetics. *Blood*. 103:571–579. doi:10.1182/blood-2003-07-2250

Adams, G.R., F. Haddad, and K.M. Baldwin. 1999. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 87:1705–1712.

Anderlini, P., and R.E. Champlin. 2008. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood*. 111:1767–1772. doi:10.1182/blood-2007-07-097543

Armand, A.-S., C. Pariset, I. Laziz, T. Launay, F. Fiore, B. Della Gaspera, D. Bimbaum, F. Charbonnier, and C. Chanoine. 2005. FGF6 regulates muscle differentiation through a calcineurin-dependent pathway in regenerating soleus of adult mice. *J. Cell. Physiol.* 204:297–308. doi:10.1002/jcp.20302

Avalos, B.R. 1996. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 88:761–777.

Biressi, S., and T.A. Rando. 2010. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:845–854. doi:10.1016/j.semcdb.2010.09.003

Blau, H.M., C.-P. Chiu, and C. Webster. 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*. 32:1171–1180. doi:10.1016/0092-8674(83)90300-8

Bober, E., G.E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham, and H.H. Arnold. 1991. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* 113:1255–1265. doi:10.1083/jcb.113.6.1255

Bober, E., T. Franz, H.H. Arnold, P. Gruss, and P. Tremblay. 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*. 120:603–612.

Buckingham, M., and D. Montarras. 2008. Skeletal muscle stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:330–336. doi:10.1016/j.gde.2008.06.005

Chargé, S.B.P., and M.A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84:209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003

Chazaud, B., C. Sonnet, P. Lafuste, G. Bassez, A.-C. Rimaniol, F. Poron, F.-J. Authier, P.A. Dreyfus, and R.K. Gherardi. 2003. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* 163:1133–1143. doi:10.1083/jcb.200212046

Clever, J.L., Y. Sakai, R.A. Wang, and D.B. Schneider. 2010. Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C1087–C1099. doi:10.1152/ajpcell.00388.2009

Cottler-Fox, M.H., T. Lapidot, I. Petit, O. Kollet, J.F. DiPersio, D. Link, and S. Devine. 2003. Stem cell mobilization. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*.419–437.

Demetri, G.D., and J.D. Griffin. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 78:2791–2808.

Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 279:1528–1530. doi:10.1126/science.279.5356.1528

Fukunaga, R., Y. Seto, S. Mizushima, and S. Nagata. 1990. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:8702–8706. doi:10.1073/pnas.87.22.8702

Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401:390–394.

Hammond, W.P. IV, T.H. Price, L.M. Souza, and D.C. Dale. 1989. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N. Engl. J. Med.* 320:1306–1311. doi:10.1056/NEJM198905183202003

Harada, M., Y. Qin, H. Takano, T. Minamino, Y. Zou, H. Toko, M. Ohtsuka, K. Matsuura, M. Sano, J. Nishi, et al. 2005. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 11:305–311. doi:10.1038/nm1199

Hareng, L., and T. Hartung. 2002. Induction and regulation of endogenous granulocyte colony-stimulating factor formation. *Biol. Chem.* 383:1501–1517. doi:10.1515/BC.2002.172

Hosaka, Y., T. Yokota, Y. Miyagoe-Suzuki, K. Yuasa, M. Imamura, R. Matsuda, T. Ikemoto, S. Kameya, and S.i. Takeda. 2002. α1-syntrophin–deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J. Cell Biol.* 158:1097–1107. doi:10.1083/jcb.200204076

Jostes, B., C. Walther, and P. Gruss. 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* 33:27–37. doi:10.1016/0925-4773(90)90132-6

Kassar-Duchossoy, L., E. Giacone, B. Gayraud-Morel, A. Jory, D. Gomès, and S. Tajbakhsh. 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19:1426–1431. doi:10.1101/gad.345505

Kawada, H., S. Takizawa, T. Takanashi, Y. Morita, J. Fujita, K. Fukuda, S. Takagi, H. Okano, K. Ando, and T. Hotta. 2006. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*. 113:701–710. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563668

Kuang, S., and M.A. Rudnicki. 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14:82–91. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.004

LaBarge, M.A., and H.M. Blau. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 111:589–601. doi:10.1016/S0092-8674(02)01078-4

Le Grand, F., and M.A. Rudnicki. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:628–633. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.012

Lescaudron, L., E. Peltékian, J. Fontaine-Pérus, D. Paulin, M. Zampieri, L. Garcia, and E. Parrish. 1999. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul. Disord.* 9:72–80. doi:10.1016/S0960-8966(98)00111-4

Megeney, L.A., R.L.S. Perry, J.E. LeCouter, and M.A. Rudnicki. 1996. bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. *Dev. Genet.* 19:139–145. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)19:2<139::AID-DVG5>3.0.CO;2-A

Messina, G., and G. Cossu. 2009. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes Dev.* 23:902–905. doi:10.1101/gad.1797009

Metcalf, D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111:485–491. doi:10.1182/blood-2007-03-079681

Molineux, G., Z. Pojda, I.N. Hampson, B.I. Lord, and T.M. Dexter. 1990. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 76:2153–2158.

Downloaded from jem.rupress.org on April 27, 2011

Naito, T., K. Goto, S. Morioka, Y. Matsuba, T. Akema, T. Sugiura, Y. Ohira, M. Beppu, and T. Yoshioka. 2009. Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3alphabeta signals. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105:643–651. doi:10.1007/s00421-008-0946-9

Philippou, A., A. Halapas, M. Maridaki, and M. Koutsilieris. 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 7:208–218.

Pitchford, S.C., R.C. Furze, C.P. Jones, A.M. Wengner, and S.M. Rankin. 2009. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell.* 4:62–72. doi:10.1016/j.stem.2008.10.017

Rantanen, J., T. Hurme, R. Lukka, J. Heino, and H. Kalimo. 1995. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab. Invest.* 72:341–347.

Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri, and M. Buckingham. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature.* 435:948–953. doi:10.1038/nature03594

Rhodes, S.J., and S.F. Konieczny. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3:2050–2061. doi:10.1101/gad.3.12b.2050

Richards, M.K., F. Liu, H. Iwasaki, K. Akashi, and D.C. Link. 2003. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 102:3562–3568. doi:10.1182/blood-2003-02-0593

Sabourin, L.A., and M.A. Rudnicki. 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57:16–25. doi:10.1034/j.1399-0004.2000.570103.x

Sakuma, K., K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto, and T. Totsuka. 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1497:77–88. doi:10.1016/S0167-4889(00)00044-6

Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardí, and P. Muñoz-Cánoves. 2008. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 7:33–44. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.011

Shi, X., and D.J. Garry. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20:1692–1708. doi:10.1101/gad.1419406

Shimoji, K., S. Yuasa, T. Onizuka, F. Hattori, T. Tanaka, M. Hara, Y. Ohno, H. Chen, T. Egasgira, T. Seki, et al. 2010. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell.* 6:227–237. doi:10.1016/j.stem.2010.01.002

Solomon, A.M., and P.M.G. Bouloux. 2006. Modifying muscle mass - the endocrine perspective. *J. Endocrinol.* 191:349–360. doi:10.1677/joe.1.06837

Stratos, I., R. Rotter, C. Eipel, T. Mittlmeier, and B. Vollmar. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J. Appl. Physiol.* 103:1857–1863. doi:10.1152/japplphysiol.00066.2007

Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, and M. Buckingham. 1996. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature.* 384:266–270. doi:10.1038/384266a0

Tapscott, S.J., R.L. Davis, M.J. Thayer, P.F. Cheng, H. Weintraub, and A.B. Lassar. 1988. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science.* 242:405–411. doi:10.1126/science.3175662

Taylor, K.M., S. Jagannath, G. Spitzer, J.A. Spinolo, S.L. Tucker, B. Fogel, F.F. Cabanillas, F.B. Hagemeister, and L.M. Souza. 1989. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor hastens granulocyte recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol.* 7:1791–1799.

Venters, S.J., S. Thorsteinsdóttir, and M.J. Duxson. 1999. Early development of the myotome in the mouse. *Dev. Dyn.* 216:219–232. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199911)216:3<219::AID-DVDY1>3.0.CO;2-J

Weintraub, H. 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 75:1241–1244. doi:10.1016/0092-8674(93)90610-3

Welte, K., J. Gabrilove, M.H. Bronchud, E. Platzer, and G. Morstyn. 1996. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 88:1907–1929.

Yan, Z., S. Choi, X. Liu, M. Zhang, J.J. Schageman, S.Y. Lee, R. Hart, L. Lin, F.A. Thurmond, and R.S. Williams. 2003. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* 278:8826–8836. doi:10.1074/jbc.M209879200

Yang, X.M., K. Vogan, P. Gros, and M. Park. 1996. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development.* 122:2163–2171.

Yuasa, S., Y. Itabashi, U. Koshimizu, T. Tanaka, K. Sugimura, M. Kinoshita, F. Hattori, S. Fukami, T. Shimazaki, S. Ogawa, et al. 2005. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23:607–611. doi:10.1038/nbt1093

Yuasa, S., T. Onizuka, K. Shimoji, Y. Ohno, T. Kageyama, S.H. Yoon, T. Egashira, T. Seki, H. Hashimoto, T. Nishiyama, et al. 2010. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* 106:1083–1091. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.214130

Zaruba, M.M., H.D. Theiss, M. Vallaster, U. Mehl, S. Brunner, R. David, R. Fischer, L. Krieg, E. Hirsch, B. Huber, et al. 2009. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell.* 4:313–323. doi:10.1016/j.stem.2009.02.013

Downloaded from jem.rupress.org on April 27, 2011

Expertise

心不全における交感神経の分化転換

Cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves in heart failure

金澤英明，福田恵一（慶應義塾大学医学部循環器内科）

心不全の治療戦略において重要なのは，病態解明の進歩である。心不全の原因疾患は，高血圧，心臓弁膜症，虚血性心疾患，心筋症など多岐にわたり，その病態生理も複雑であるが，心臓には豊富な交感神経支配があり，心不全の病態に心臓交感神経の関与がきわめて重要であることは，これまでの研究，臨床で明らかとなっている[1-3]。心不全では持続的な交感神経活性の亢進に伴って，心筋組織中のNE（ノルエピネフリン）含有量は減少し枯渇する[4]とされているが，その詳細なメカニズムや意義については未解決な部分も多い。
一方，心不全時の心筋細胞において胎児型遺伝子が発現することが知られているが，われわれは心不全病態下の心臓交感神経においても，幼若化と称される胎児型遺伝子の発現が起こること[5]，さらには心臓から分泌されるサイトカインを介して，心臓交感神経の分化転換が生じることを明らかにしてきた[6]。
これらの現象は，心不全における心臓交感神経異常の病態解明の一端を担うものと考えられ，心不全の新たな治療の標的となる可能性がある。
本稿では，心不全における心臓交感神経異常に関する最新の知見と心不全の病態との関連について解説する。

321

心臓自律神経の解剖，機能

心臓には自律神経である交感神経，副交感神経，さらに感覚神経の分布があり，さまざまな生理的反応に対する作用を司っている。心臓交感神経の中枢は延髄に存在し，そこからの神経線維は脊髄の中間外側核を経て，交感神経幹の神経節（上頸神経節，星状神経節，上胸部神経節）で節後神経に乗り換えて心臓に達する。心臓に到達した交感神経は，冠動脈に沿って心表面を走行し，その後，心筋内に分布するとされている。一方，副交感神経は，延髄にある迷走神経背側核を中枢として神経線維を出し，心房中隔，左房後壁に分布する心臓神経節を経て神経を乗り換え，交感神経とは反対に心筋の内側を走行し，心筋内に分布するとされている（図1）[7,8]。

交感神経終末では，チロシンからカテコラミン合成酵素であるTH（tyrosine hydroxylase）やDBH（dopamine β-hydroxylase）の作用によってドパミンを経てNE（ノルエピネフリン）が合成され，貯蔵顆粒に蓄えられる。上位からの刺激により開口分泌（exocytosis）が起こり，シナプス間隙にNEが放出される。このNEが心筋細胞表面のβアドレナリン受容体に結合することで陽性変力・変時作用の効果が発現する。しかし，放出されたNEの95%は交感神経終末に再び取り込まれ（uptake 1），再利用されることとなる。また，遊離したNEは交感神経終末に存在するα_2受容体を介してネガティブフィードバックによりNEの放出抑制に働く（図2）[9]。

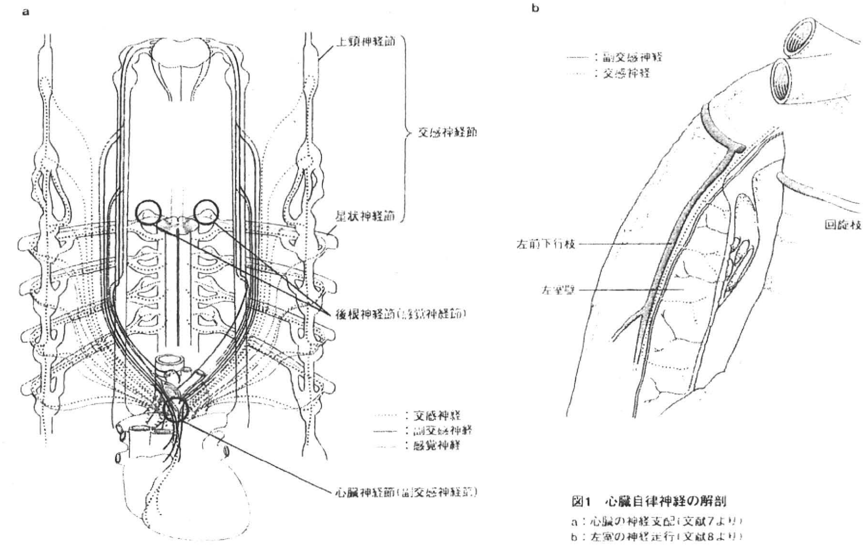


図1　心臓自律神経の解剖
a：心臓の神経支配（文献7より）
b：左室の神経走行（文献8より）

1342-6591/10/¥400/論文/JCOPY

心不全における交感神経異常とその原因

心不全では，持続的な交感神経活動の亢進が認められる。これは破綻していく循環動態を維持するための重要かつ最も基本的な代償機転であるが，その一方では，さらなる心筋傷害，心機能低下をまねき，電気生理学的には致死性不整脈の源となり，最終的には心不全の進展を助長する予後不良の因子である[3,10]。

これまで，心不全における心臓交感神経の異常は，交感神経終末における spilloverの亢進，uptake1の障害により，心筋組織中のNE含有量の低下，MIBGの欠損像としてとらえられてきた[1]。しかし，NEの前駆体であるドパミン，および律速合成酵素であるTHの発現増加はなく，逆にその発現が低下し，交感神経のdenervation(脱神経)と表現されてきた[11,12]。

以上のように，心不全における交感神経異常の原因が示されてきたが，特にTHの発現がなぜ低下するのかなど，その分子生物学的なメカニズムや意義についてはいまだに明確にされていない。

心不全における交感神経の幼若化

心不全病態下では，心筋細胞においてβ型ミオシン重鎖，骨格筋型α-アクチンなどの胎児型遺伝子が発現してくることが広く知られている。

われわれは，ラットにモノクロタリンを投与し肺高血圧を惹起することにより右室肥大・右心不全モデルを作製した。その右室心筋では神経成長因子(NGF)の発現が亢進し，心臓交感神経が過剰分布(hyperinnervation)したものの，逆にその機能は低下の方向を示し，TH，DBH活性は低下し，NE含有量，NE再吸収量も減少した。さらにこれらの交感神経において，幼若神経のマーカーであるPSA-NCAM (highly polysialylated neural cell adhesion molecule)の発現を確認した。以上の結果から，心不全における心臓交感神経は幼若化(脱分化現象)を惹起することが明らかとなった[7]。

サイトカインによる交感神経機能転換

1974年，心筋培養上清を培養交感神経細胞に加えることによって，アドレナリン作動性交感神経をコリン作動性神経に分化誘導する，つまり，培養神経細胞においては神経伝達物質をノルエピネフリンからアセチルコリンに転換(switching)する現象が報告された[13]。この現象はneurotransmitter switching，またはcholinergic differentiationとよばれるようになった。さらに，1989年，この分化誘導する物質が白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor；LIF)であることが同定された[14]。その後，この受容体の分子的解明から，この因子がIL-6とよばれるサイトカインの一種と同じファミリーに属するものであることが明らかにされた。その他，IL-6ファミリーであるCNTF(ciliary neurotrophic factor)，OSM(oncostatin M)，CT-1(cardiotrophin-1)に加え，ニューロトロフィンファミリーであるBDNF(brain-derived neurotrophic factor)，NT-3(neurotrophin-3)といった液性因子はLIF同様にアドレナリン作動性交感神経をコリン作動性神経に分化誘導するcholinergic differentiation factor(コリン作動性分化因子)といわれており，標的臓器からの逆行性シグナルとして，軸索伸張，神経の生存，死，シナプス形成だけではなく，神経伝達物質の機能決定にも影響しているとされている[15]。

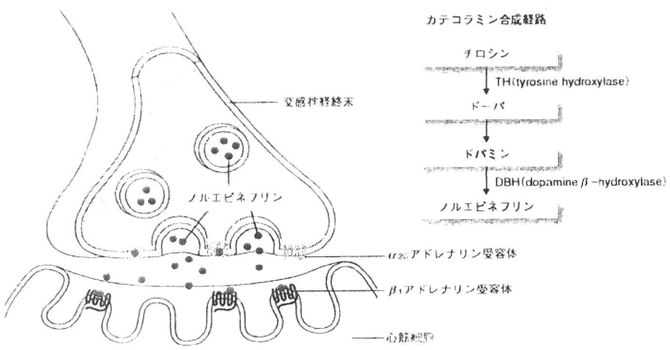


図2 交感神経終末の模式図とカテコラミン合成経路
(文献9より)

心不全における交感神経の分化転換

これまで，cholinergic differentiationは*in vitro*で確認されてきた現象であるが，最近，われわれは心不全における心臓交感神経異常に関する新しいメカニズムを明らかにした[6]。

まず，Dahl食塩感受性ラットを用いて心不全モデルを作製し，心臓交感神経の特異的マーカーであるTHに対する免疫染色を行った。その結果，左室のTH陽性神経線維は減少し，左室心筋組織中のNE含有量もコントロール群と比較して有意に低下していた。しかし，副交感神経マーカーであるCHT(choline transporter)に対する免疫染色を施行したところ，左室心外膜の交感神経線維内にCHT陽性神経線維を多数認めた。さらに，その一部は交感神経マーカーであるTHと副交感神経マーカーであるCHTの両方の染色性を有している神経線維の存在が確認された(図3a)。

次に，この現象が交感神経終末のみならず，交感神経節でも生じているかどうかを確認するために，心不全ラットの星状神経節の免疫染色を行った。その結果，交感神経終末と同様に副交感神経マーカーであるChAT(choline acetyltransferase)陽性の神経細胞体を多数認めた(図3b)。

ところで，近年，心不全の病態にさまざまなサイトカインが関与していることが明らかとなっている。その中でもLIFやCT-1の発現が，心不全の心筋で有意に上昇していることはよく知られている[16,17]。

そこで，不全心筋から分泌されたLIFが神経機能になんらかの変化を与えている可能性について検討した。

まず，αMHC(alpha myosin heavy chain)-CreマウスとLIF-floxマウスを交配することによって，心筋特異的にLIFを強発現させたマウスを作製し，生体内でのLIFによる心臓交感神経のコリン作動性神経への分化転換(cholinergic differentiation)が誘発されるかを検討した。その結果，心臓交感神経終末および星状神経節において，カテコラミン作動性マーカーの発現低下とコリン作動性マーカーの発現亢進を認めた。以上の結果から，生体内においてもLIFがcholinergic differentiationにおける重要な因子であることが確認された。

さらに，DBH-Creマウスとgp130-floxマウスを交配し，交感神経特異的にgp130受容体をノックアウトしたマウス(gp130-conditional knock out；gp130-CKO)を作製した。このマウスを用いて低酸素曝露肺高血圧モデルを作製した。対照マウス肺高血圧モデルの心臓交感神経系ではcholinergic differentiationが確認されたが，gp130-CKOマウスでは，この現象が抑制された。この結果から，cholinergic differentiationは，gp130受容体を介した現象であることが強く示唆された。また，肺高血圧モデルの生存曲線において，gp130-CKOマウスの予後が対照マウスに比較して悪化する結果であった。このことから，gp130受容体を介したcholinergic differentiationは，生体保護的に作用している可能性が考えられた。

最後に，心不全患者の剖検例の心臓交感神経系においてもコリン作動性神経への分化転換(cholinergic differentiation)が惹起されていることが確認された。

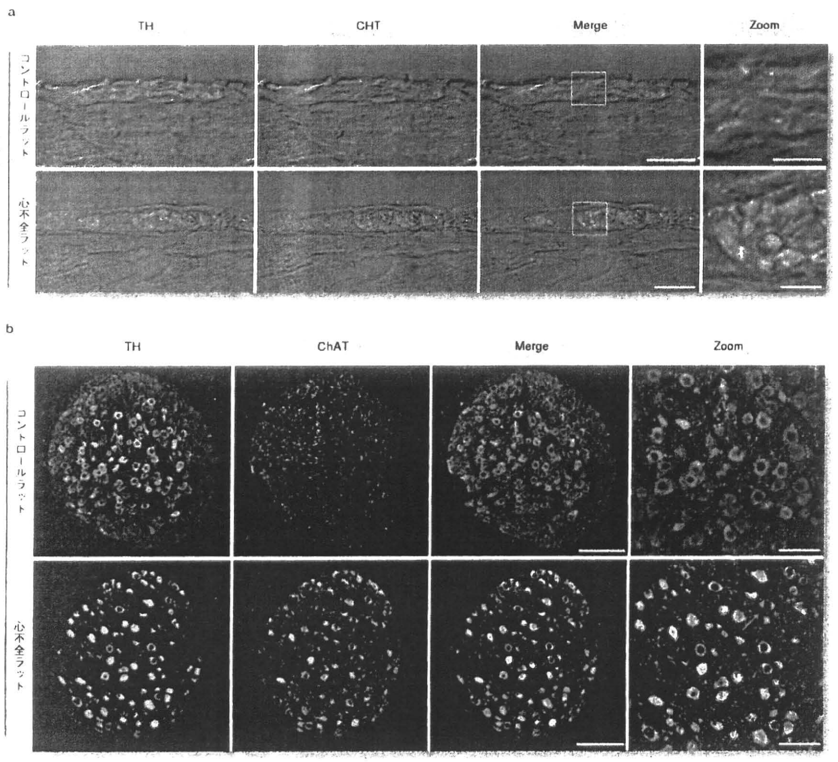


図3　Dahl食塩感受性ラットにおける左室および星状神経節の蛍光免疫染色(文献6より)

a：コントロールラット，心不全ラットの左室心外膜側における二重蛍光免疫染色。TH(カテコラミン作動性神経：赤)，CHT(コリン作動性神経：緑)を示す。心不全ラットでは，CHT陽性神経線維(▲)が増加している。

b：コントロールラット，心不全ラットの星状神経節における二重蛍光免疫染色。TH(カテコラミン作動性神経：赤)，ChAT(コリン作動性神経：緑)を示す。心不全ラットでは，ChAT陽性細胞(↑)が数多く認められる。

以上より，不全心筋から分泌されるサイトカインのgp130受容体を介した作用によって心臓交感神経の分化転換(cholinergic differentiation)が起こっていることが明らかとなった(図4)。

まとめ

今回，われわれは心不全における心臓交感神経の分化転換という新しい概念の提唱と心不全の病態との関連を明らかにした。今後，その分子生物的なメカニズムのさらなる解明が，新たな治療戦略への道筋となる可能性を期待したい。

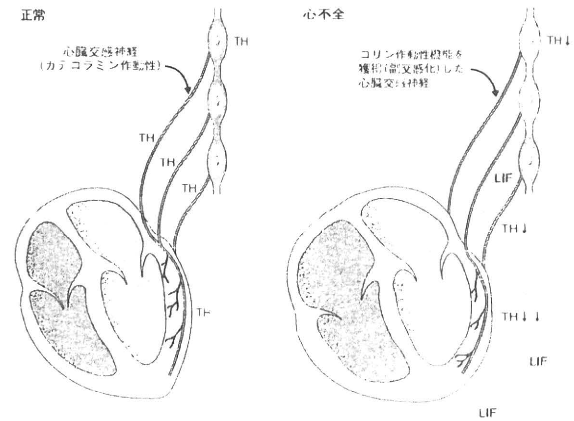


図4　心不全におけるcholinergic differentiationの概念図

文献

1) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al: Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. N Engl J Med 311: 819-823, 1984.
2) Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, et al: Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). Circulation 82: 1724-1729, 1990.
3) Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, et al: Beta-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. J Clin Invest 89: 803-815, 1992.
4) Chidsey CA, Kaiser GA, Sonnenblick EH, et al: Cardiac Norephinephrine Stores in Experimental Heart Failure in the Dog. J Clin Invest 43: 2386-2393, 1964.
5) Kimura K, Ieda M, Kanazawa H, et al: Cardiac Sympathetic Rejuvenation: A Link between Nerve Function and Cardiac Hypertrophy. Circ Res 100: 1755-1764, 2007.
6) Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, et al: Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. J Clin Invest 120: 408-421, 2010.
7) 家田真樹，福田恵一：[illegible] Heart View 11: 1369-1374, 2007.
8) Raul D, Mitrani RD, Zipes DP: Clinical neurocardiology: Arrythmias. Neurocardiology. (Armour JA, Ardell JL, eds), Oxford University Press, New York, 1994, p365-396.
9) Small KM, Wagoner LE, Levin AM, et al: Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. N Engl J Med 347: 1135-1142, 2002.
10) Cao JM, Fishbein MC, Han JB, et al: Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. Circulation 101: 1960-1969, 2000.
11) Backs J, Haunstetter A, Gerber SH, et al: The neuronal norepinephrine transporter in experimental heart failure: evidence for a posttranscriptional downregulation. J Mol Cell Cardiol 33: 461-472, 2001.
12) Himura Y, Felten SY, Kashiki M, et al: Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. Circulation 88: 1299-1309, 1993.
13) Patterson PH, Chun LL: The influence of non-neuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons. Proc Natl Acad Sci USA 71: 3607-3610, 1974.
14) Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, et al: The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. Science 246: 1412-1416, 1989.
15) Glebova NO, Ginty DD: Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. Annu Rev Neurosci 28: 191-222, 2005.
16) Eiken HG, Øie E, Damås JK, et al: Myocardial gene expression of leukaemia inhibitory factor, interleukin-6 and glycoprotein 130 in end-stage human heart failure. Eur J Clin Invest 31: 378-379, 2001.
17) Zolk O, Ng LL, O'Brien RJ, et al: Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. Circulation 106: 1442-1446, 2002.

323

● 総 説

循環器系疾患の遺伝子学

*1 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 専任講師
*2 慶應義塾大学医学部 循環器内科 教授

村 田 光 繁*1　福 田 恵 一*2

要旨

1980 年代後半から，分子遺伝学的手法の進歩に伴い多くの遺伝性疾患の原因遺伝子の同定が行われ，さらに 1990 年代後半からのヒトゲノム研究は加速的に疾患発症における遺伝子異常の関与を明らかにしてきた．循環器系における遺伝性疾患として心筋症や致死性不整脈などが詳細に検討され，多数の変異遺伝子が同定され，その種類や変異部位によって表現型や予後に違いがあることが明らかとなった．また昨今では，これらの遺伝情報に基づいた日常診療が行われるようになり，将来テーラーメイド医療に発展することが期待されている．

は じ め に

一般に，ヒトの疾患は遺伝要因と環境要因により発症し，その組み合わせや割合により発症年齢や重症度などの表現型が決まると考えられている．つまり，単一遺伝子が疾患の遺伝要因の大半を決定し，その病態生理と密接に関係している単一遺伝子疾患と，環境要因や相互作用するさまざまな遺伝子多型が複合的に影響して発症する多因子疾患に大別される．前者の頻度は高くなく，染色体領域の多型を用いた連鎖解析により遺伝子異常が同定され，循環器領域では心筋症や家族

キーワード：単一遺伝性疾患，心筋症，致死性不整脈，再生医療，
テーラーメイド医療

性致死性不整脈などがこれにあたる．一方，後者は高血圧や虚血性心疾患などで頻度は高いが，個々の遺伝要因が疾患の病態やリスクに及ぼす影響は高くなく，しかも複数存在するため，その同定は容易ではない．また，ある集団での出現頻度が高い遺伝子変異がこれらの疾患の発症に関与するとは限らず，出現頻度が低いものの疾患発症リスクが高い変異も発見されることがあるため（common disease rare variant hypothesis），多因子疾患の感受性遺伝子同定には，質・量ともに優れた大規模集団を対象とした多面的なアプローチが必要である．本稿では，前者の単一遺伝子疾患について，これまで明らかになっている原因遺伝子と病態との関連を中心に概説する．

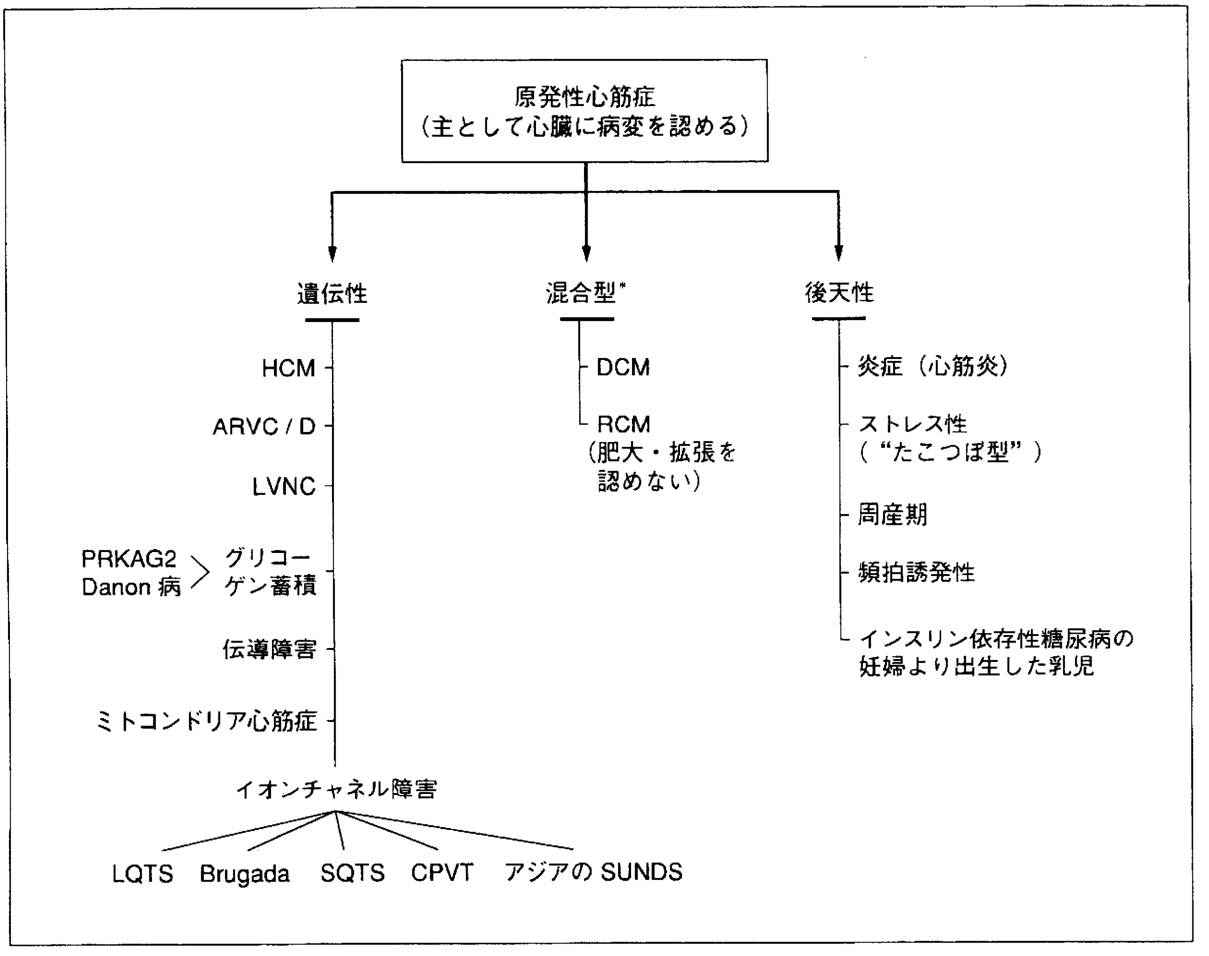
心　筋　症

心筋症は心筋の器質的あるいは機能的異常に基づく心疾患の総称である．最近の分子遺伝学の発展により，心筋症の原因遺伝子が次々と同定され新たな疾患概念が解明されたのに伴い，2006 年に新たな定義と分類が提唱された[1]．この分類では，「心筋症は心筋の機械的・電気的機能不全を伴うさまざまな心疾患」と定義されており，病変が心臓に限局している原発性（primary）と全身疾患の心病変である二次性（secondary）に分類される（図１）．原発性心筋症はさらに，遺伝性（genetic），混合性（mixed），後天性（acquired）に分類されている．本分類では，従来心筋症の枠に含まれていなかったイオンチャネル病や心臓伝導障害なども電気的機能不全に該当するため心筋症と分類されており，遺伝性心疾患の大部分が心筋症に分類されることになる．しかし，これらの疾患はすでに遺伝性不整脈疾患としての概念が確立されているため，本稿では別に概説する．

１．肥大型心筋症（HCM）

HCM の半数が常染色体優性遺伝形式に従う家族歴を認めることから，連鎖解析や候補遺伝子アプローチが行われ，多くの原因遺伝子が同定されている[2]．当初心筋 β ミオシン重鎖，トロポニンTや α トロポミオシンなどのサルコメアタンパク遺伝子に変異を認めたことから，HCM の心肥大はサルコメア収縮力低下を代償するために生じたものと考えられた[3]．しかし，その後の関連遺伝子検索により，サルコメ

図1　原発性心筋症（臨床上問題となる疾患経過が心筋に限定される，または主に含まれる疾患）
（文献[1]より引用改変）



遺伝性と非遺伝性病因により分類した.
*：主に非遺伝性疾患名で，遺伝子に起因する家族性疾患は症例のごく少数においてのみ報告されている.
HCM：肥大型心筋症，ARVC / D：不整脈源性右室心筋症 / 異形成症，LVNC：左室心筋緻密化障害，
LQTS：QT 延長症候群，SQTS：QT 短縮症候群，CPVT：カテコラミン誘発性多形性心室頻拍，
SUNDS：夜間突然死症候群，DCM：拡張型心筋症，RCM：拘束型心筋症

ア収縮をむしろ抑制するトロポニンⅠやサルコメアに直接関係しないタイチン（TTN）[4]や Tcap[5]などのタンパクに変異が同定されたことから，変異による収縮力低下は必ずしも1次的な現象ではなく，ストレッチ張力の増加が細胞内 Ca 感受性を亢進することによる拡張機能障害が，HCM の病態の主体であることが提唱されている.

表1に原発性心筋症原因遺伝子を示したように[2]，多くの病因変異が同定されているが，変異遺伝子の種類や同一遺伝子であっても変異部位によって病態や予後に差異があることが明らかとなってきた．心

表1　原発性心筋症原因遺伝子の多様性（文献[2]より引用改変）

心筋症病型	遺伝形式	原因遺伝子シンボル	コードタンパク
HCM / DCM / RCM / LVNC	AD	*MYH7*	cardiac β-myosin heavy chain
HCM / DCM / RCM / LVNC	AD	*TNNT2*	cardiac troponin T
HCM / DCM	AD	*TPM1*	α-tropomyosin
HCM / DCM	AD	*MYBPC3*	cardiac myosin binding protein-C
HCM	AD	*MYL3*	ventricular myosin essential light chain
HCM	AD	*MYL2*	ventricular myosin regulatory light chain
HCM / DCM / RCM	AD	*TNNI3*	cardiac troponin I
HCM / DCM / LVNC	AD	*ACTC*	cardiac α-actin
HCM / DCM	AD	*TTN*	titin，connectin
HCM / DCM	AD	*TNNC1*	cardiac troponin C
HCM	AD	*MYH6*	cardiac α-myosin heavy chain
HCM / DCM	AD	*CSRP3*	muscle LIM protein，MLP
HCM	AD	*CAV3*	caveolin-3
HCM / DCM	AD	*TCAP*	titin-cap，Tcap，telethonin
HCM / DCM	AD	*VCL*	metavinculin
HCM	AD	*JPH-2*	junctophilin-2
HCM	AD	*OBSCN*	obscurin
HCM	AD	*MYOZ2*	myozenin，calsartin-1
HCM / DCM	AD	*ANKRD1*	CARP
DCM / RCM	AD	*DES*	desmin
DCM / LVNC	AD	*LMNA*	lamin A / C
DCM	AD	*SAGD*	δ-sarcoglycan
DCM	AD	*ACTN2*	α-actinin-2
DCM / LVNC	AD	*LDB3*	cypher，ZASP，oracle
DCM / HCM	AD	*PLB*	phospholamban
DCM	AD	*ABCC9*	K_{ATP} channel
DCM	AD	*SCN5A*	cardiac Na channel
DCM / HCM	AD	*CRYAB*	αB crystallin
DCM	AD	*PSEN1*	presenilin-1
DCM	AD	*PSEN2*	presenilin-2
DCM	AD	*FHL2*	four and half LIM protein-2，FHL2
DCM	AD	*LMNA4*	laminin α4
DCM	AD	*ILK*	integrin-linked kinase
DCM	AD	*MYPN*	myopalladin
DCM	AD	*CHRM2*	acetylcholine receptor
DCM	XR	*DMD*	dystrophin
DCM	XR	*EMD*	emerin
LVNC / DCM	XR	*TAZ*	tafazzin，G4.5
DCM	XR	*FKTN*	fuktin
ARVC / DCM	AR	*DSP*	desmoplakin
ARVC / DCM	AR，AD	*JUP*	plakoglobin
ARVC	AD	*PKP2*	plakophilin-2
ARVC	AD	*TGFB3*	TFGβ3
ARVC	AD	*RYR2*	ryanodine receptor 2
ARVC	AD	*DSG3*	desmoglein 3
LVNC	AD	*DTNA*	α-dystrobrebin

AD：常染色体優性，XR：伴性劣性（X連鎖性），AR：常染色体劣性
その他の略語：巻末の「今号の略語」参照

筋肥大の表現型は心筋トロポニンT遺伝子変異例のほうが β ミオシン重鎖遺伝子変異より軽度であるが，心臓突然死はトロポニンT遺伝子変異例のほうが不良である．

蓄積病は HCM 類似の心肥大病態を呈するが，病理学的，臨床的にも HCM とは全く異なる疾患単位である．一般に，Pompe 病，Danon 病および Fabry 病などの蓄積病では心筋以外の臓器が同時に侵されることが多いが，それらの一部は他臓器症状がほとんどなく，心筋障害が前面に出ることがある．それらは，心 Fabry 病，一部の Danon 病，アデノシン 5'-一リン酸（AMP）活性化タンパクキナーゼ変異症などであり，特に AMP 活性化タンパクキナーゼ変異症は，ウォルフ・パーキンソン・ホワイト（WPW）症候群を伴う HCM 多発家系の原因として，連鎖解析で原因遺伝子が同定された．蓄積病のほとんどは当該酵素の活性低下および欠損に起因するため劣性遺伝形式をとるが，AMP 活性化タンパクキナーゼ変異症は酵素活性が上昇したことによるものであり，優性遺伝形式をとる．

2．拡張型心筋症（DCM）

DCM 患者の 20 ～ 35 % に家族歴を認めるが，遺伝形式は家系ごとに異なる．多くは常染色体優性遺伝であるが，常染色体劣性遺伝，伴性劣性遺伝や母性遺伝形式をとるものもある[6]．このうち，常染色体優性遺伝形式の家系を対象にした連鎖解析と候補遺伝子アプローチが行われ，これまでジストロフィン（DMD），ラミン A／C（LMNA），デスミン（DES），δ-サルコグリカン（SAGD），心筋アクチン（ACTC），メタビンキュリン（VCL），TTN，ホスホランバン（PLB），KATP チャネル（ABCC9），サイファー（LDB3），α-B クリスタリン（CRYAB），心筋 Na チャネル（SCN5A），CSRP3，TCAP，LIM タンパク（FHL2），ラミニン α4（LMNA4），ミオパラジン（MYPN），RNA 結合モチーフタンパク 20（RBM20）などの変異が，DCM の病因と成りうることが報告された．これらの遺伝子群をみると，DCM では HCM 同様にさまざまな遺伝子異常により同一の病態を来しうること（病因の不均一性），また同一遺伝子異常の変異部位により異なる病態を呈しうること（病態の不均一性）が分かる．DCM の原因遺伝子として当初発見されたものの多くが細胞骨格の整合性維持にか

かわるものであったことから，DCM の病態の主体は収縮力伝達機構の異常による細胞骨格病であると考えられていた．しかしながら，HCM と同様にさまざまな原因遺伝子が同定され，特にサルコメアタンパク異常も発見されたことから，HCM と DCM を原因遺伝子から区別することは困難である．

3．不整脈源性右室心筋症（ARVC）

ARVC は，右室優位の心拡大と心機能低下，右室起源の重症心室性不整脈を特徴とし，病理学的に右室自由壁における脂肪浸潤と心筋細胞の脱落ならびに線維化を認める心筋疾患である．家族歴を持つ症例は 30 ～ 50％ と報告されているが，臨床症状や理学的所見が非特異的な所見にとどまることもあり，正確な数字は定かではない．本疾患の遺伝的多様性は顕著で，常染色体優性遺伝の原因遺伝子座として，14q24（ARVC1），1q42-q43（ARVC2），14q12-q22（ARVC3），2q32.1-q32.3（ARVC4），3q23（ARVC5），10q12-p14（ARVC6），10q22.3（ARVC7），6p24（ARVC8），12p11（ARVC9），18q12.1-q12.2（ARVC10），18q12.1（ARVC11）が，常染色体劣性遺伝するものとして 17q21 が報告されている．このうち，原因遺伝子が同定されているものとして，ARVC1 はトランスフォーミング増殖因子(TGF)β3[7]，ARVC2 はリアノジン受容体（RyR2）[8]，ARVC8 はデスモプラキン（DSP）[9]，ARVC9 はプラコフィリン（PKP2）[10]，ARVC10 はデスモグレイン 2（DSG2）[11]，ARVC11 はデスモコリン 2（DSC2）[12] などがある．ARVC1 は，TGFβ3 活性が亢進する結果，心筋の線維化や脂肪変性が促進されることや細胞間接着因子の発現調節機構の障害が関与している可能性が示唆されている．デスモソーム関連遺伝子変異では，心筋細胞どうしの正常な結合が失われ，心筋の構造が脆弱化しさまざまな障害を引き起すと考えられている．ARVC の病変が右室優位である理由は明らかではないが，左室にも病変を有する症例が 75％ という報告もあり，DCM と鑑別が困難な場合がある．本疾患は進行性の疾患であり，突然死の原因として重要であり，突然死の予防には植込み型除細動器が有効である．

致死性遺伝性不整脈

致死性遺伝性不整脈疾患は，心筋イオンチャネル，細胞膜タンパク，および受容体などをコードする遺伝子変異により機能障害を来し，致死性不整脈を発症して心臓突然死を来す疾患群であり，イオンチャネル病と言われている．家族性 QT 延長症候群（LQTS）の原因遺伝子が同定されたのを皮切りに，Brugada 症候群，QT 短縮症候群（SQTS），カテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT），家族性心房細動（AF），先天性洞不全症候群などの原因遺伝子が明らかとなってきた．しかし，遺伝子変異が同定される割合は決して高くなく，今後のさらなる詳細な解析が期待される．

1．QT 延長症候群（LQTS）

日常診療で最も頻繁に遭遇する遺伝性不整脈疾患である．心電図上における QT 間隔延長を特徴とする症候群であるが，表現型（心電図所見）の発現には個人差があり，罹患家系員の約 25～50％の QT 間隔は正常または境界域である．LQTS は活動電位の再分極過程の異常で，内向き電流である Na 電流や Ca 電流の増加および外向き電流であるK電流の減少による QT 間隔延長によって早期後脱分極をトリガーとして多形性心室頻拍（torsade de pointes：TdP）を発症し，失神や突然死を来す．先天性 LQTS の遺伝形式としては，難聴を伴い常染色体劣性遺伝である Jervell and Lange-Nielsen 症候群と，難聴を伴わない常染色体優性遺伝である Romano-Ward 症候群の2つに分類される（表2）．前者はまれで（先天性 LQTS の1％以下）ほとんどが後者である．Romano-Ward 症候群は原因遺伝子の種類により現在 12 のサブタイプに分類されており，中でも LQT1, LQT2, LQT3 で全体の 90％以上を占める．これら LQT1～3 は，特に詳細に検討されており，サブタイプごとの患者指導や治療法が確立されており，サブタイプ分類が臨床上重要である．安静時の心電図波形，発作の状況やエピネフリンによる負荷検査により，ある程度遺伝子型を推測できるとされるが，境界領域や紛らわしい所見の場合は表現型だけで遺伝子型を断定するのは困難であり，遺伝子解析による確定診断が必要である．

表 2　遺伝性不整脈原因遺伝子

サブタイプ	発症率（一部遺伝子型中の率）	遺伝子	タンパク	タンパク機能	イオン電流
QT 延長症候群					
Romano-Ward 症候群					
1	42 ～ 54 %	*KCNQ1*	$K_v7.1$	α-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
2	35 ～ 45 %	*KCNH2*	$K_v11.1$	α-subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 減少
3	1.7 ～ 8 %	*SCN5A*	$Na_v1.5$	α-subunit Na^+ channel	I_{NaL} 増加
4	<1 %	*ANK2*	ankyrin-B	adaptor protein	—
5	<1 %	*KCNE1*	minK	β-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
6	<1 %	*KCNE2*	MiRP1	β-subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 減少
7	Rare	*KCNJ2*	Kir2.1	α-subunit I_{K1} channel	I_{K1} 減少
8	Rare	*CACNA1C*	$Ca_v1.2$	α-subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca,L}$ 増加
9	Rare (1.9 % in one study)	*CAV3*	caveolin-3	component of caveolae (co-localizes with $Na_v1.5$ at sarcolemma)	I_{NaL} 増加
10	<0.1 %	*SCN4B*	β4	β-subunit Na^+ channel	I_{NaL} 増加
11	Rare (2 % in one study)	*AKAP9*	Yotiao	mediates I_{Ks} channel phosphorylation	I_{Ks} 増加（β-アドレナリン刺激中）
12	Rare (2 % in one study)	*SNTA1*	α1-syntrophin	regulates Na^+ channel function	I_{NaL} 増加
Jervell and Lange-Nielsen 症候群					
1	<1 %	*KCNQ1*	$K_v7.1$	α-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
2	<1 %	*KCNE1*	minK	β-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
QT 短縮症候群					
1	Three families	*KCNH2*	$K_v11.1$	α-subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 増加
2	Two case reports	*KCNQ1*	$K_v7.1$	α-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 増加
3	One family (two members)	*KCNJ2*	Kir2.1	α-subunit I_{K1} channel	I_{K1} 増加
Brugada 症候群					
1	10 ～ 30 %	*SCN5A*	$Na_v1.5$	Na^+ channel（I_{Na}）	I_{Na} 減少
2	Rare（one family）	*GPD1-L*	GPD1-L	regulates intracellular $Na_v1.5$ trafficking	I_{Na} 減少
3	<8.5 %	*CACNA1C*	$Ca_v1.2$	α-subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca,L}$ 減少
4	<8.5 %	*CACNB2*	$Ca_v\beta2$	β-subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca,L}$ 減少
5	<1 %	*SCN1B*	β1	β-subunit Na^+ channel	I_{Na} 減少
6	<1 %	*KCNE3*	MiRP2	β-subunit $I_{to,fast}$ channel	$I_{to,fast}$ 増加
カテコラミン誘発性多形性心室頻拍					
1	60 ～ 70 %	*RYR2*		ryanodine 受容体	SR Ca^{2+} 放出
2	Rare (7 % in one study)	*CASQ2*		calsequestrin	SR Ca^{2+} 放出
家族性心房細動					
2	One family	*KCNQ1*	$K_v7.1$	α-subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 増加
4	Two families	*KCNE2*	MiRP1	β-subunit I_{Kr} channel (may modulate I_{Ks} channel)	I_{Ks} 増加
6	One family	*KCNJ2*	Kir2.1	α-subunit I_{K1} channel	I_{K1} 増加
7	One family	*KCNH2*	$K_v11.1$	α-subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 増加
8	One family	*GJA5*	connexin40		
9	Three families	*KCNA5*	$K_v1.5$	α-subunit I_{Kur} channel	I_{Kur} 増加

当初 LQTS は，活動電位再分極を担うイオンチャネル機能の異常でありこれらのチャネル遺伝子の異常が原因であると考えられたが，LQT4 のようにチャネル，トランスポーターや受容体などの膜タンパクを細胞膜に裏打ちするアンキリンBの遺伝子異常により膜タンパクの局在が障害され，2次的にチャネル機能が障害されうることが示された．このように，チャネル遺伝子そのものに異常がない場合は従来の方法では変異遺伝子同定は困難であり，原因遺伝子同定率が高くない原因の1つと考えられる．

また，原因となる遺伝子変異が明らかな家系内でも，家族構成員の表現型や臨床病態は異なり，浸透率が低い場合がある．つまり，発端者は通常重症な表現型を呈することが多いが，同一家系内で同じ変異を有していながら，全く異常所見を呈さない非浸透患者が存在する(不完全浸透)．これらの同一家系内での不完全浸透には，年齢，性別，交感神経緊張などの環境因子に加えて，遺伝子多型の有無が修飾因子として関与する可能性がある．Na チャネル α サブユニットをコードする SCN5A の遺伝子多型である H558R は白人の約 30％ に認めるが，LQT3 原因遺伝子である SCN5A のミスセンス変異 M1766L のチャネルトラフィッキング異常を正常化することが報告されている[13]．

2．Brugada 症候群

Brugada 症候群は，特発性心室細動（VF）のうち，12 誘導心電図の V1 から V2 の右側胸部誘導における特徴的な ST 上昇を呈する症候群である．VF の初回発作の平均年齢は 40 ～ 50 歳であり，男性に多く日本を含めたアジア地域に多いのが特徴である．我が国で古くから知られている“ポックリ病”の一部と考えられている．Brugada 症候群では，心室筋活動電位の第 1 相（脱分極直後の一過性再分極）に流れる内向き電流の減少および外向き電流の増加によって活動電位プラトー電位（Phase 2）の過分極が生じ，右室流出路の心外膜側で第 1 相を形成する一過性外向き電流が強く発現するために，心電図の右側胸部誘導 ST 上昇を呈する．また，心外膜での Phase 2 出現時期が遅延し，Phase 0 とは独立した活動電位を生じることによって(Phase 2 reentry)，極端に短い連結期の期外収縮が生じ VF を発症

する．Brugada 症候群は，原因遺伝子の種類により6つのサブタイプに分類されている．1998 年に Chen らが Brugada 症候群に SCN5A の loss of function 変異（BS1）を発見した後[14]，しばらく新たな原因遺伝子は同定されなかったが，2007 年に glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like（GPD1-L）遺伝子変異（BS2）[15]が，2008 年に Na チャネル β サブユニット遺伝子変異（BS5）[16]の loss of function 変異が発見された．同時期に，QT 短縮を合併する家系で心筋L型 Ca チャネル $\alpha 1$ 変異（BS3）および $\beta 2b$ サブユニット遺伝子変異（BS4）の loss of function 変異[17]および KCNE3 変異による一過性外向きKチャネル（Ito）の gain of function 変異（BS6）[18]が相次いで報告された．しかし，本症候群の遺伝子異常が発見される率は約 20％であり，さらに未知の遺伝子異常やその他の環境因子の関与が推測されている．

3．QT 短縮症候群（SQTS）

心電図上 QT 間隔短縮（QTc＜360 ms）を特徴とし VF を来す疾患である．活動電位再分極時の外向き電流増大と内向き電流減少により生じると考えられている．これまで，I_{Kr}，I_{Ks}，I_{K1} 電流をコードするKチャネル遺伝子 KCNH2，KCNQ1，および KCNJ2 の gain of function 変異が同定されている[19]．

4．カテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）

CPVT は，心臓に器質的異常を伴わず 10 歳前後で発症し，ストレスや運動によって誘発される多形性心室頻拍，2方向性心室頻拍を特徴とする疾患である．また，30 歳までの死亡率が 30～35％と言われており，予後不良の遺伝性疾患である[20]．1999 年，Kontula らは常染色体性優性遺伝形式を示す2家系を報告し，2001 年，Priori らは 1q42-q43 に存在する心臓リアノジン受容体遺伝子（RyR2）の変異が関与していることを明らかにした．さらに，同年 Lahat らは，常染色体劣性遺伝形式を示す CPVT 家系において calsequestrin 2 遺伝子変異を報告した．いずれも，心筋細胞内の筋小胞体からの Ca^{2+} リークを引き起し，遅延後脱分極を介して致死的不整脈を発症する．

5．家族性心房細動（AF）

AF は通常高齢者に発症し，多くは器質的心疾患や甲状腺機能異常

などを伴っているが，15～30％は基礎心疾患を持たないlone AFである．この中に濃厚な家族歴を有し若年発症する家系にイオンチャネルの異常を有する家系が存在し[21～23]，現在5種類のKチャネル遺伝子とconnexin 40遺伝子の変異が同定され，9種類のサブタイプに分類されている．Kチャネル遺伝子変異によるタイプは，外向き電流のgain of function変異による活動電位短縮に伴う有効不応期短縮がAF発症に関係している．

6．先天性洞不全症候群，進行性心臓伝導障害

本症候群は，刺激伝導系の障害により脚ブロック，完全房室ブロックを来す疾患で，Lenégre病とも呼ばれている．原因遺伝子としてSCN5AとHCN4変異が報告されているが，特にSCN5A遺伝子変異の場合は，Brugada症候群やLQTSとのオーバーラップを示すことがある[24]．

おわりに

本稿では遺伝性循環器疾患，特に単一遺伝子疾患を概説した．単一遺伝子疾患の原因遺伝子の同定とその機能解析から，病態に対する理解は急速に進んだが，単一遺伝子疾患の同一家系内の浸透率は必ずしも高いわけではなく重症度も多種多様であることから，環境要因や遺伝子多型などのゲノムの多様性が付加的に表現型を修飾しているものと考えられる．現在，多因子遺伝性疾患を含めた遺伝性疾患の遺伝的要因を同定するため多角的な解析が行われており，遺伝情報に基づいたテーラーメイド医療が将来期待されている．しかし，前述のように遺伝情報のみから患者の病態を把握することには限界があり，網羅的解析の結果を個々の患者にあてはめることは必ずしも容易ではない．最近，再生医療，特に人工多能性幹（iPS）技術の発展により患者自身の細胞を作成し，表現型の多様性に対応できる可能性が出てきた（詳細は他稿に譲る）．今後，再生医療を用いたさらなる遺伝子学の発展が期待される．

文　献

1) Maron BJ, et al: Contemporary Definitions and Classification of the Car-

diomyopathies, An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation **113**: 1807–1816, 2006.

2) Kimura A, et al: Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. J Hum Genet **55**: 81–90, 2010.

3) Thierfelder L, et al: α–tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardioyopathy. Cell **77**: 701–712, 1994.

4) Satoh M, et al: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. Biochem Biophysi Res Commun **262**: 411–417, 1999.

5) Hayashi T, et al: Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol **44**: 2192–2201, 2004.

6) Mestroni L, et al: Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogenity. J Am Coll Cardiol **34** (1): 181–190, 1999.

7) Beffagna G, et al: Regulatory mutations in transforming growth factor–b3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. Cardiovas Res **65** (2): 366–373, 2005.

8) Tsio N, et al: Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Hum Mol Genet **10**: 189–194, 2001.

9) Rampazzo A, et al: Mutation in the desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Am J Hum Genet **71**: 1200–1206, 2002.

10) Gerull B, et al: Mutations in the desmosomal protein plakophilin–2 are common I arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Nat Genet **36**: 1162–1164, 2004.

11) Awad M M, et al: DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Am J Hum Genet **79**: 136–142, 2006.

12) Syrris P, et al: Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyipathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin–2. Am J Hum Genet **79**: 978–984, 2006.

13) Ye B: A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. Physiol Genomics **12**: 187–193, 2003.

14) Chen Q, et al: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. Nature **392** (6673): 293–296, 1998.

15) London B, et al: Mutation in glycerol–3–phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1–L) decreases cardiac Na+ current and causes inherited arrhythmias. Circulation **116**: 2260–2268, 2007.

16) Watanabe H, et al: Sodium channel beta 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. J Clin

Invest **118**: 2260–2268, 2008.

17) Antzelevitch C, et al: Loss–of–function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST–segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. Circulation **115**: 442–449, 2007.

18) Delpon E et al: Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol **1**: 209–218, 2008.

19) Gaita F, et al: Short QT sundrome: a familial cause of sudden death. Circulation **108** (8): 965–970, 2003.

20) Kontula K, et al: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: recent mechanistic insights. Cardiovasc Res **67**: 379–387, 2005.

21) Chen Y H, et al: KCNQ1 gain–of–function mutation in familial atrial fibrillation. Science **299** (5604): 251–254, 2003.

22) Yang Y, et al: Identification of a KCNE2 gain–of–function mutation in patients with familial atrial fibrillation. Am J Hum Genet **75** (5): 899–905, 2004.

23) Xia M, et al: A Kir2.1 gain–of–function mutation underlies familial atrial fibrillation. Biochem Biophys Res Commun **332** (4): 1012–1019, 2005.

24) Grant A O, et al: Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. J Clin Invest **110**: 1201–1209, 2002.

MINING COLUMN 1 [解説]

末梢血0.1mLからのiPS細胞樹立技術

関 倫久　湯浅慎介　福田恵一　慶應義塾大学 医学部 循環器内科

iPS細胞は，生体内のどのような細胞にでも分化可能な，人工的に作製された幹細胞であり，再生医療への応用が期待されている。これまで皮膚などの人体を構成するさまざまな組織の細胞からiPS細胞が作製されてきたが，臨床応用に際し，細胞採取の侵襲性や樹立の際のホストゲノムの損傷などの問題点があった。
われわれは，これらの問題を解決するために，リンパ球の一つであるT細胞と，特殊な遺伝子の運び屋であるセンダイウイルスを組み合わせることにより，わずかな血液からゲノムの遺伝子を傷害することなくiPS細胞を作製することに成功した。本稿では，この新たな樹立法に至った経緯および実際の樹立法について概説する。

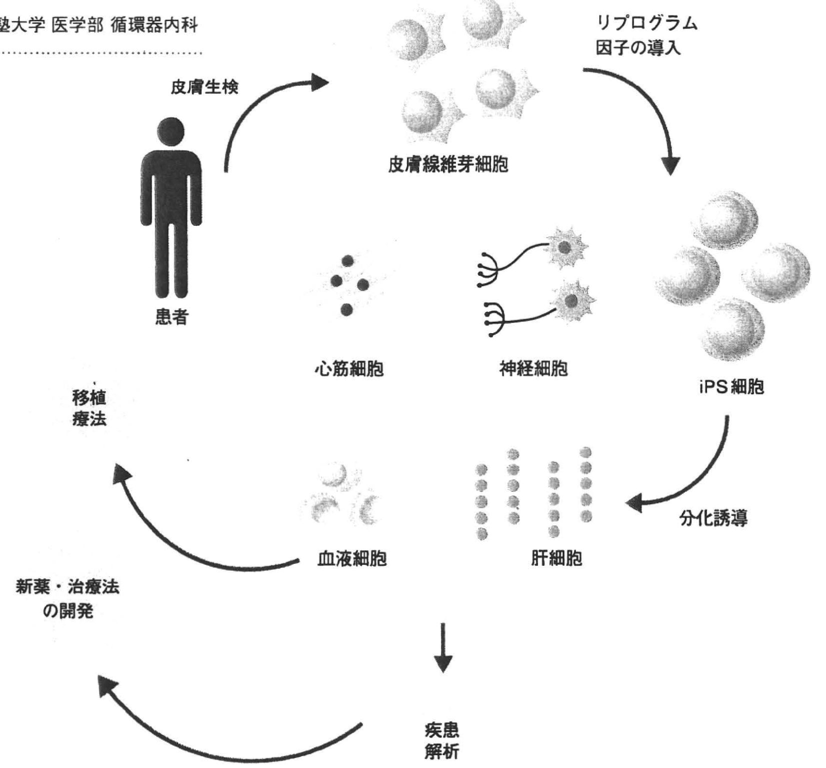


図1　iPS細胞の臨床応用

iPS細胞の臨床応用の方法として，患者自身の細胞による移植療法の実現，患者から作製したiPS細胞を用いた新薬・治療法の開発が挙げられる。

iPS細胞は，生体内のどのような細胞にでも分化できる「人工多能性幹細胞」である。京都大学の山中伸弥教授らが2006年にマウスで(1)，そして2007年にヒトでiPS細胞の樹立に成功し(2)，体細胞を直接的に初期化することが可能であることを示すとともに再生医療の新たな可能性を示した。

これまで，多能性と自己増殖性をあわせもつ胚性幹細胞(ES細胞)の研究が進められてきたが，ES細胞は受精卵から細胞を取り出し，それを培養することによって作製される多能性幹細胞の一つであり，受精卵を破壊する必要があることから倫理的問題があった。また，ES細胞は患者自身の細胞から作製することが困難なため，移植の際の免疫拒絶の問題が指摘されていた。

iPS細胞はこの倫理的問題，免疫拒絶の問題を解決する新たなツールとなる可能性を秘めており，世界中から大きな注目を浴びることとなった。iPS細胞がもつ高い増殖能と，生体を形成するさまざまな組織の細胞に分化できる多能性によって，ES細胞同様に細胞移植治療，いわゆる再生医療への応用が期待されている(図1)。

このように注目されているiPS細胞であるが，将来的な細胞移植療法への応用においては腫瘍化の可能性が危惧されている。iPS細胞樹立の際に導入される遺伝子には，がん遺伝子が含まれており，ひとたびiPS細胞が樹立されればこのような導入遺伝子はサイレンシングされ発現しなくなるが，サイレンシングがおこらない場合や，いったんサイレンシン