

心臓や血管の変化	周産期心筋症とは	発症頻度	発症しやすい妊婦	症状	検査	治療	生活の注意点	次の妊娠
--------------------------	--------------------------	----------------------	--------------------------	--------------------	--------------------	--------------------	------------------------	----------------------

[トップ](#) > [リンク集](#)

リンク集

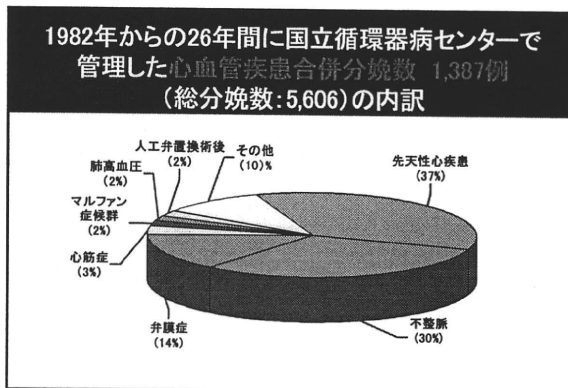
- [周産期心筋症\(医療者向け\)](#)
- [国立循環器病研究センター](#)
- [国立循環器病研究センター病院](#)
- [国立循環器病研究センター 周産期・婦人科](#)
- [厚生労働省](#)

[▲このページの先頭へ](#)

National Cerebral and Cardiovascular Center

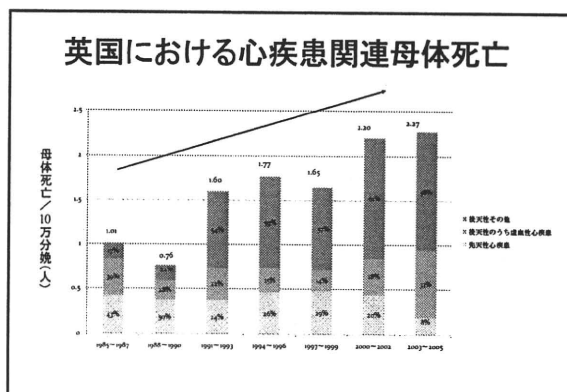
妊産婦と循環器疾患 ～心血管疾患合併妊娠、 周産期(産褥)心筋症の UP to Date～

国立循環器病研究センター
周産期・婦人科
再生医療部
池田 智明



心血管疾患合併妊娠における妊産婦死亡例
(1982～2010年、国立循環器病センター、分娩後1年以内)

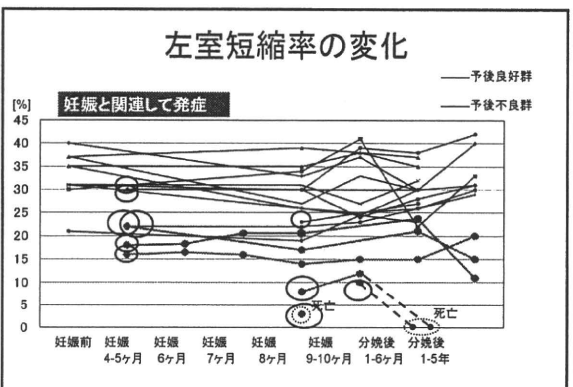
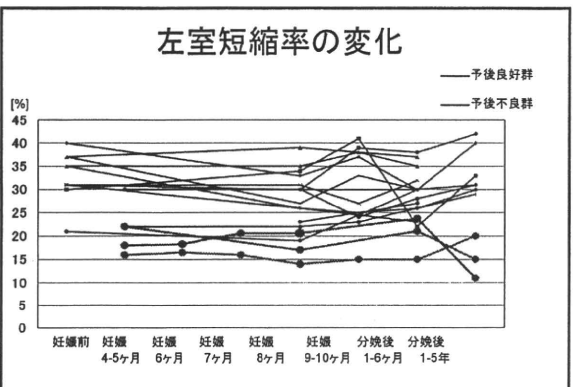
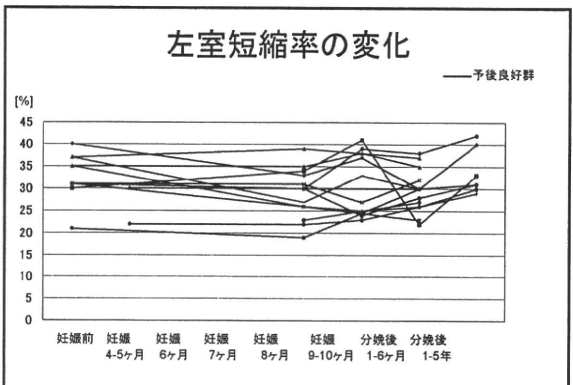
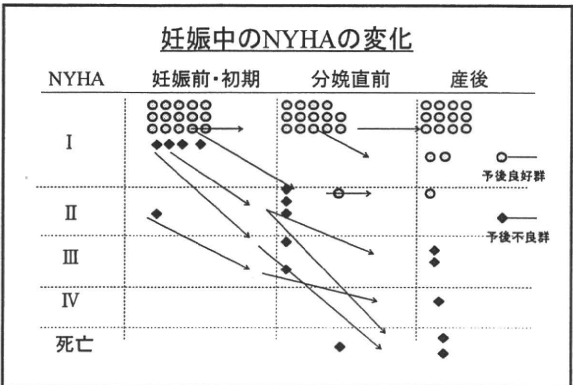
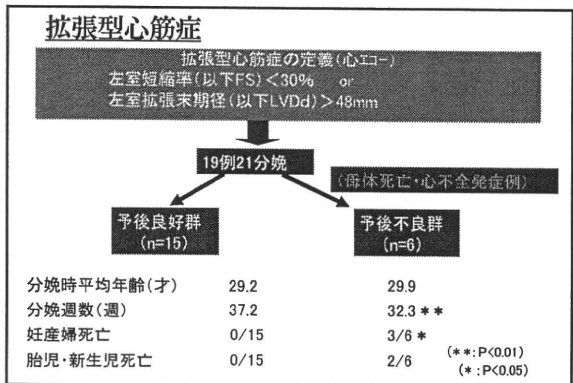
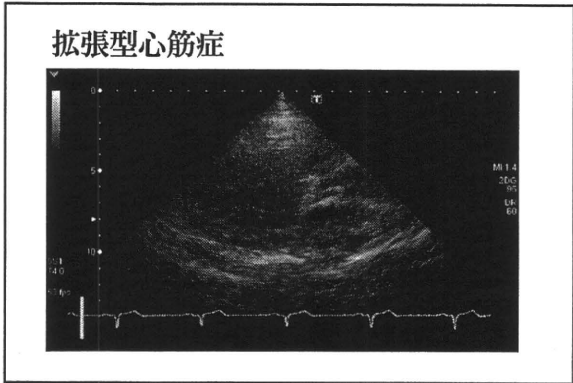
心疾患名	年齢	経産	分娩週数	分娩様式	紹介～分娩	死亡時期	経過
1.原発性肺高血圧症	29	0	32週	帝王切	2日	術中死亡	母体心不全による人工早産、麻酔導入時に母体心停止
2.大動脈弁置換後(機械弁)	35	0	30週	帝王切	23日	3日	抗凝固薬を自己判断で中止血栓形成のため、緊急で開心術
3.拡張型心筋症	24	1	34週	経膈	19日	5か月	不整脈増加のため人工早産
4.拡張型心筋症	27	0	34週	帝王切	2時間	3か月	入院直後母体心不全(LJFD)
5.拡張型心筋症	33	4	27週	帝王切	1時間	術中死亡	孤食強固未受診、甲状腺腫合併(LJFD)
6.完全房室ブロック	36	1	39週	予定帝王切	11日	2.5か月	一時ヘーリングリッド挿入し帝王切。分娩後2.5か月でPulseless VF

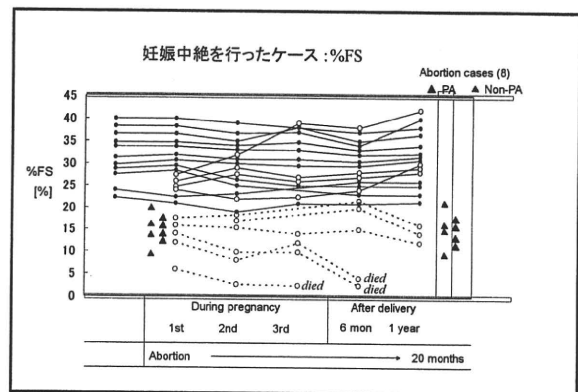
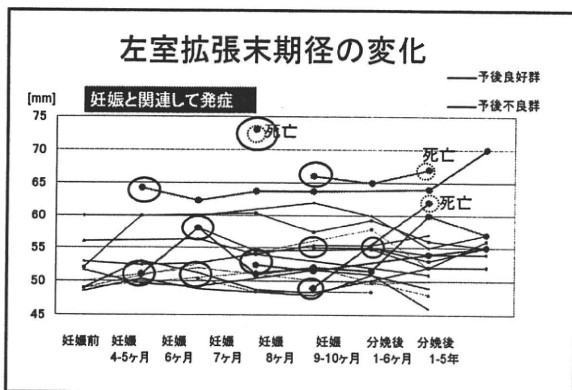
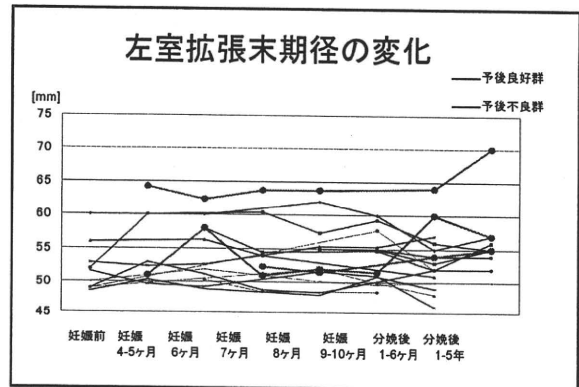
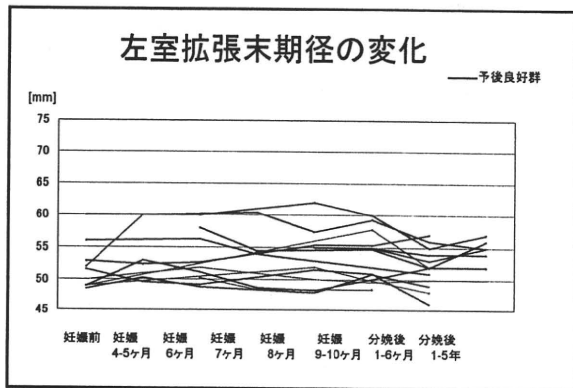


英国における心疾患関連母体死亡の内訳
(2003-2005)

		産褥6週以内	産褥1年以内
後天性	大動脈解離	9	0
	心筋梗塞	12	4
	虚血性心疾患	4	0
	突然死症候群(SADS)	3	9
	周産期心筋症	0	12
	心筋症	1	4
	心筋炎	5	0
	弁膜症	3	0
	心内膜炎	2	2
	その他	2	2
先天性	肺高血圧症	3	0
	その他	3	2
計		47	34

拡張型心筋症合併妊娠
(一部周産期心筋症含む)





周産期(産褥)心筋症 Peripartum Cardiomyopathy (PPCM)

周産期(産褥)心筋症とは

(Demakis JG. Circulation. 1971, NIH workshop recommendations. JAMA. 2000)

- ① 分娩前1ヶ月から分娩後5ヶ月以内に新たに心不全の症状が出現
- ② 心疾患の既往がない
- ③ 他に心不全の原因となるものがない
- ④ 左室収縮能が低下 (LVEF<45~50% or %FS<30%)

母体死亡につながる重要な疾患だが、わが国では大規模な調査が行われたことがなく、実態不明

↓
後ろ向き全国調査を施行

周産期心筋症全国調査

厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業)「乳幼児死亡と妊産婦死亡の分析と対策に関する研究」
(難治性疾患克服研究事業)「わが国初の周産期心筋症の全国疫学的・前方向的産科調査に関する研究」

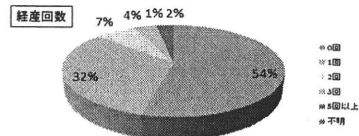
対象施設:循環器専門医認定施設(1030施設)
周産期専門医認定施設(1025施設)
救命救急専門医認定施設(431施設)
全2486診療科、1478施設

対象患者:2007年1月~2008年12月に
診療した新規心不全発症例
登録方法:インターネット登録
登録期間:2009年1月から6月30日



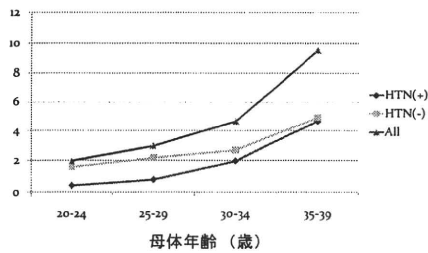
全国調査結果 (アンケート回収率73%)

- 症例数 102例 ⇒ 発症率約1/2万分娩
- 発症年齢 平均32.7歳 (22~43歳)
- 経産回数 初産婦 > 経産婦



年齢別発症率

(人/10万分娩)

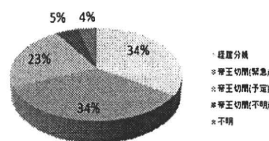
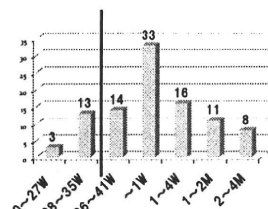


妊娠合併症

- 多胎 15%
 - 子宮収縮抑制剤の使用 14%
 - 妊娠高血圧症候群合併 38%
- 危険因子

- > 2007年の双生児出生率(出産母体総数に占める双胎出産者の割合)は約1~2%
- > 一般に早産率は約6~8%
- > 一般に妊娠高血圧症候群合併は約6%

発症時期と分娩方法



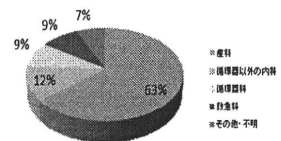
古典的な定義にあたる
妊娠36週~産褥期に
発症したのは80%

帝王切が極めて多い。
わが国の帝王切率は20%弱

初発症状と初診医

- 息切れ 80%
- 咳 37%
- 浮腫 37%
- 倦怠感 24%
- 動悸 20%
- 体重増加 16%

正常妊婦も訴える症状
(軽症例が見逃されている可能性)



普段心不全を見慣れない
医師が初診
(治療の遅れ、連携不足
の可能性)

発症時期別に見た胎児予後

- 妊娠中発症 30人
 - 子宮内胎児死亡 3人
 - 子宮内発育遅延 2人
 - 未熟児網膜症 1人
 - 胎児仮死 1人
 - 敗血症 1人
- 産褥発症 68人
 - 合併症なし



初診時心機能

NYHAの心機能分類

I 3%(不整脈で発見) II 11% III 24% IV 54% 不明 8%

平均左室拡張末期径(LVDd) 56.5mm

平均左室収縮末期径(LVDs) 47.9mm

平均左室短縮率(%FS) 15.8%

平均左室駆出率(LVEF) 31.6%

平均血清BNP 1258pg/ml

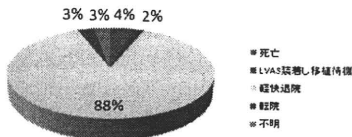
BNP: 正常値<約20pg/ml(施設により正常値に若干の差はあり)

100未満は4人、200未満は6人

➡ 簡易な診断ツール

転帰

母体死亡 4人(心不全死 3人、不明 1人)
LVAS装着し心移植待機 2人



退院症例では、平均入院期間 34.4日

最終診察時心機能 (平均観察期間9.6ヶ月)

NYHA I 70% II 14% III 1% 不明 15%

mean LVDd 49.0mm

mean LVDs 34.8mm

mean %FS 29.6%

mean LVEF 54.6%

mean BNP 44pg/ml

最終的に%FS<30% 33%

死亡や移植待機例も含めると...

心機能低下残存or重症心不全 42%

心機能回復あり: 最終診察時の左室短縮率 \geq 30%
心機能回復なし: 最終診察時の左室短縮率<30%

	心機能回復あり (n=45)	心機能回復なし (n=45)	p-value
初診時左室拡張末期径 (mm)	53.7 \pm 7.3	59.0 \pm 6.2	p<0.01
初診時左室収縮末期径 (mm)	45.1 \pm 8.4	50.2 \pm 7.5	p<0.05
初診時左室短縮率 (%)	16.4 \pm 7.3	15.3 \pm 6.9	ns
初診時左室駆出率 (%)	33.1 \pm 12.1	29.4 \pm 12.5	ns
喫煙歴あり	10人	4人	ns
子宮収縮抑制剤の使用	5人	5人	ns
多胎妊娠	8人	4人	ns
妊娠関連高血圧症合併	23人	7人	p<0.05

早期発見早期治療が重要

国際比較

	日本 2009年 n=102	アメリカ 2005年 n=100	南アフリカ 2005年 n=100	ハイチ 2005年 n=98
平均年齢(才)	32.7	30.7	31.6	31.8
平均妊娠回数(回)	1.7	2.6	3	4.3
初産婦(%)	55	37	20	24
アフリカ系人種(%)	0	19	100	98
高血圧・妊娠高血圧症 候群の合併(%)	42	43	2	4
子宮収縮抑制剤の使用(%)	14	19	9	0
多胎妊娠(%)	15	13	6	6
死亡率(%)	4	9	15	15

(Silwa K, et al. Lancet. 2006より引用改変)

周産期心筋症と拡張型心筋症

Rare Variant Mutations In Pregnancy-Associated or Peripartum Cardiomyopathy

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

遺伝性DCM患者の家族歴を詳細に調べると、周産期心筋症の診断基準に合致する患者が散見され、彼女らにおいても同じ遺伝子異常が見つかった。(PGCMの中にDCMが紛れている！)

Heart Failure

Peripartum Cardiomyopathy as a Part of Familial Dilated Cardiomyopathy

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

Background: Peripartum cardiomyopathy (PPCM) is a rare form of heart failure that occurs in the late stages of pregnancy or the early postpartum period. It is characterized by left ventricular dysfunction and is often associated with a dilated left ventricle. The pathogenesis of PPCM is unclear, but it is thought to be related to a combination of hemodynamic, hormonal, and immunologic factors. Recent studies have identified rare variant mutations in the *LMNA* gene in patients with PPCM, suggesting a genetic component to the disease. These mutations are distinct from those associated with familial dilated cardiomyopathy (DCM) and are thought to be pathogenic. The identification of these mutations provides insight into the pathogenesis of PPCM and may have implications for diagnosis and management.

自験例: 30代女性

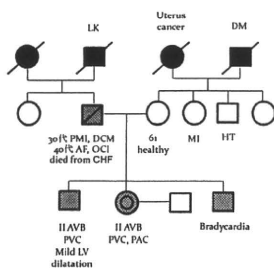
【既往歴】20代より会社の検診にてI度AVブロックを指摘。

30歳:近医にてI度AVブロック、PVCとBNP軽度上昇を指摘され、当院内科受診。NYHA I度。

【初診時検査結果】

UCG	LVDD/Ds = 45/30, %FS = 33%, IVS/PW = 7/7. 各弁も正常
Chest XP	CTR 51%
運動耐容能検査	peak VO2 = 41.0 mL/min/kg (121.6%)とw.n.l.
ECG	I° AV block, V1-V4 low voltage, PAC, PVC合併
BNP	60.8 pg/mL

Family pedigree

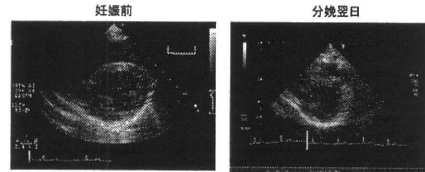


家族歴

父 30代: pacemaker植込、DCM診断
40代: AF、脳梗塞合併
その後CHFにて死亡
兄 PVC、Mobitz II AVB
軽度左室拡大を指摘されている
弟 徐脈を指摘されている

妊娠経過(1)

第1子妊娠時: 妊娠中は、初期・中期・後期に心エコー・ホルター心電図検査を行うも、著変なく、NYHA I度で経過。自然経産分娩となった。
分娩翌日、食後・授乳後にしんどくなるとの訴えが出現。CXP、心電図、ホルター心電図、BNP値は分娩前と変わらず。心エコーにてLV mid~apex contractionのごく軽度低下を認めたのみ(%FS:28%)。産褥半年間、同様の倦怠感、心エコー所見が持続した。



妊娠経過(2)

第2子妊娠時: 妊娠29週で通動がしんどくなったとの訴えあり。心エコー上左室収縮能低下。また、胎児発育も不良であったため、入院管理を行った。入院後、更なる心機能低下を認めなかった。GA 8w1d 26w6d 32w6d

LV Dd/Ds	45/30.0	43/32	44/31
%FS	33%	27%	29%

ブロックが心筋症に先行する家族歴を有しており、遺伝性心筋症を疑い、カウンセリングの後、本人同意の下、遺伝子検査を施行。

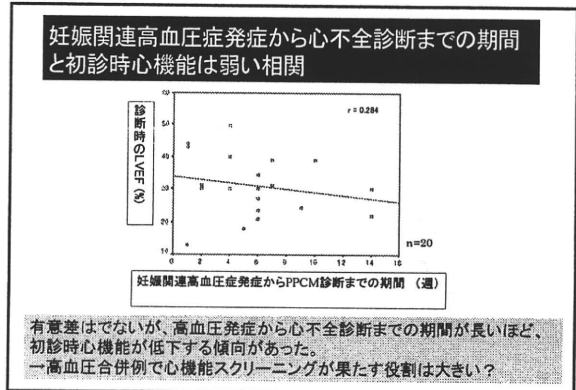
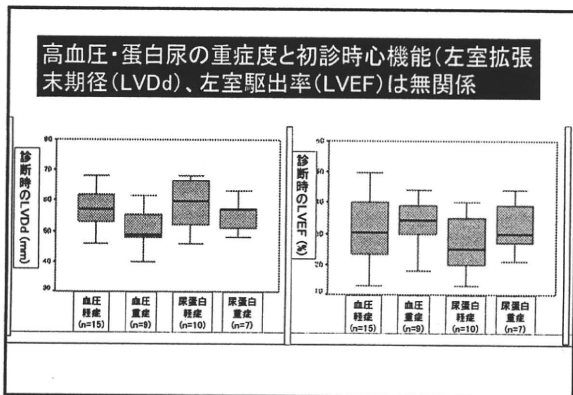
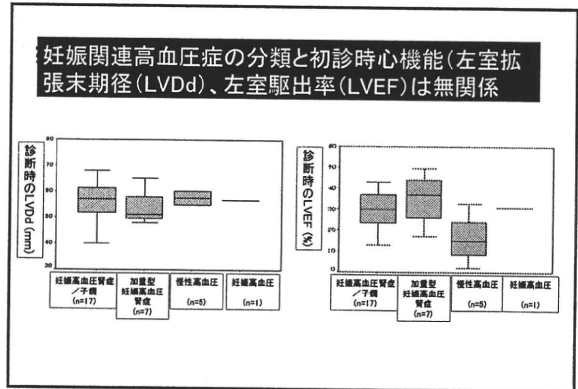
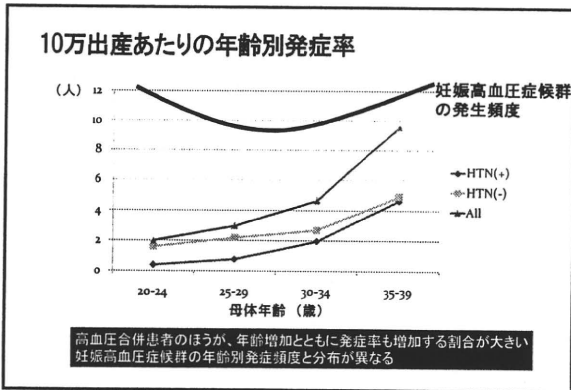
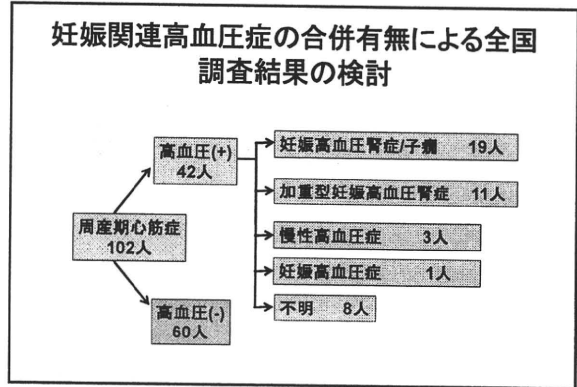
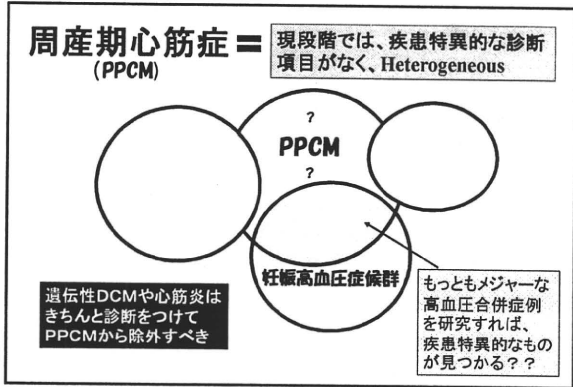
妊娠検査NSVTが頻りに出現したため、20代以降の患者開腹を試みた。しかし、オキシトシン負荷時に胸部不快感を訴え、相談の上予定帝王切開での分娩となった。前回授乳後の倦怠感が強かったことから、ご本人が抗不整脈治療法を選択され、初乳授乳後プロモクリプテン内服を6週間行った。産褥心機能は心エコー上正常下限に保たれたが、ホルター心電図では、自覚症状を伴うNSVT(7連、rate 180)を認め、少量βブロッカーを開始した。

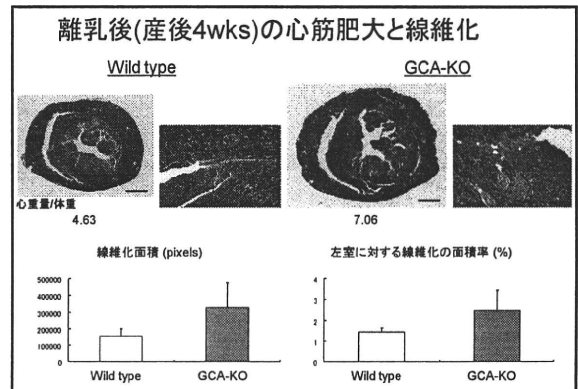
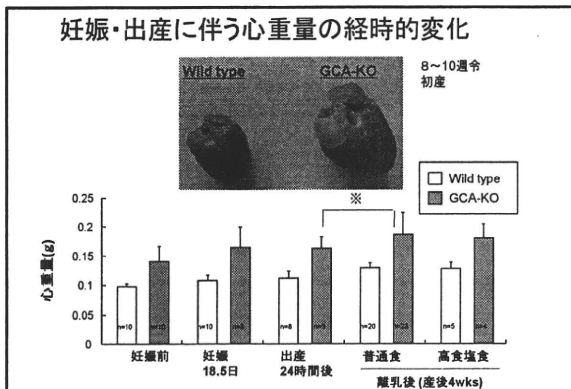
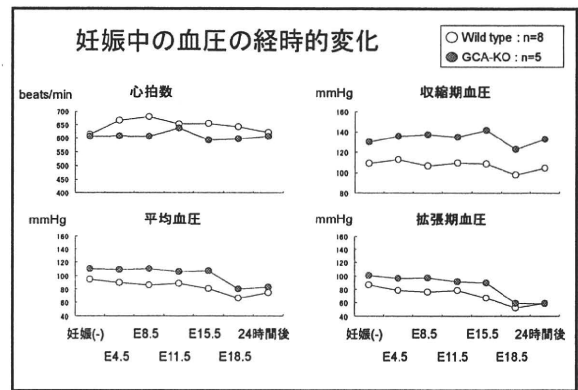
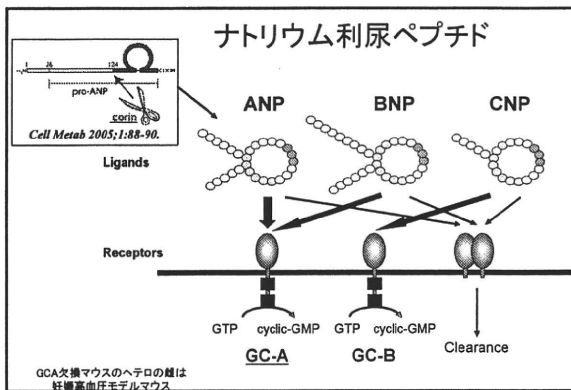
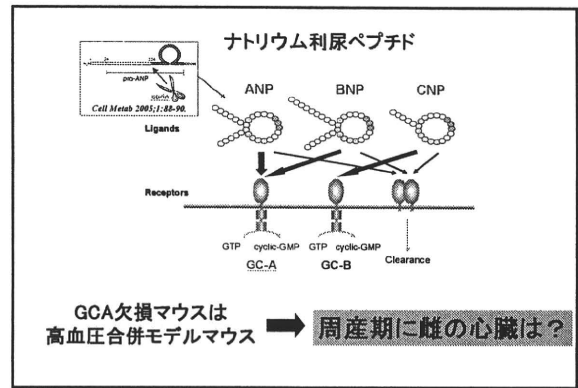
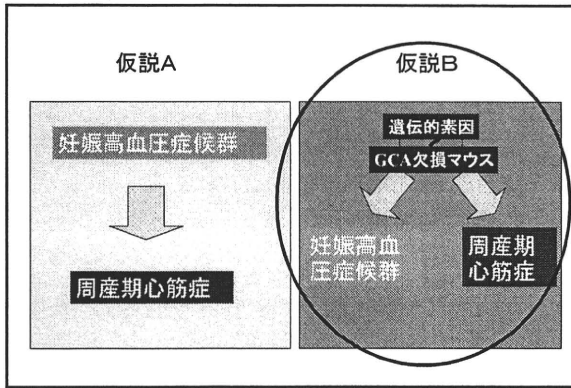


LMNA関連DCM:
核膜蛋白であるlamin Aとlamin Cをコードしている遺伝子(LMNA)のポイントミューテーションにより発症。
家族性DCMの中で最も多い。
初期には刺激伝導系の異常をきたすことが多い。その後DCM、心房粗細動、塞栓症を合併する。
(Mehrotra et al. Curr Opin Cardiol. 2009;24:307-309)

本症例では、LMNA: Exon7、432番目のpoint mutationを認めた
Glu432Stop

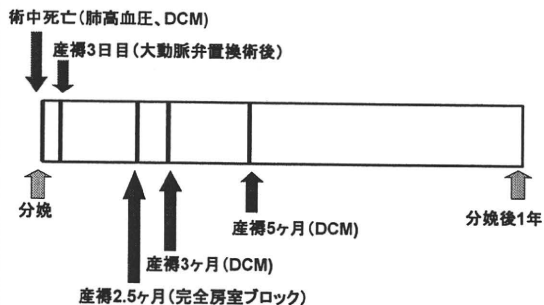
Fatkin et al. N Engl J Med 1999;341:1715-24



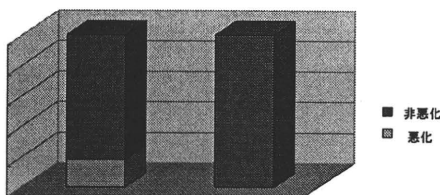
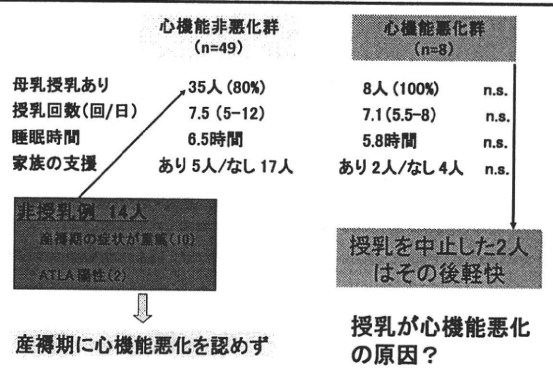
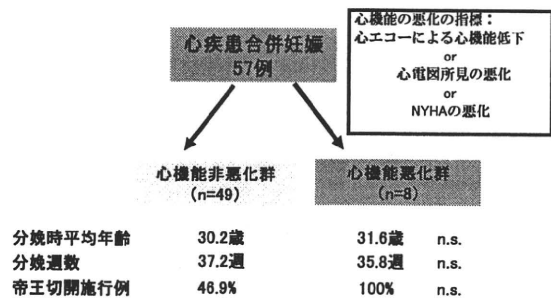


心疾患合併妊娠と授乳

妊産婦死亡時期



授乳に代表される育児負担に着目し、産褥心機能について検討

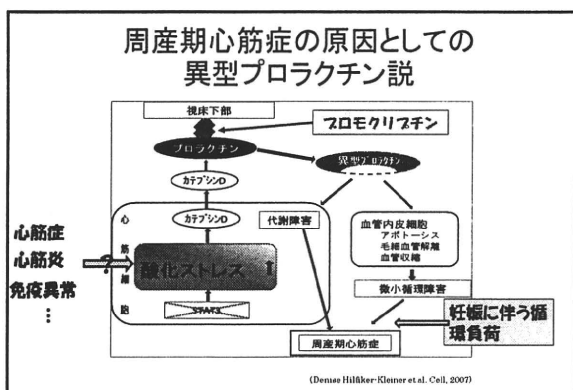
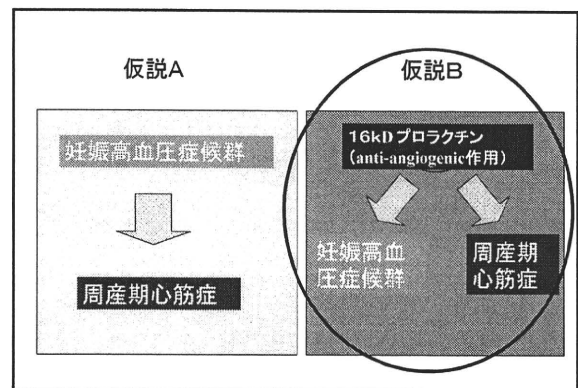
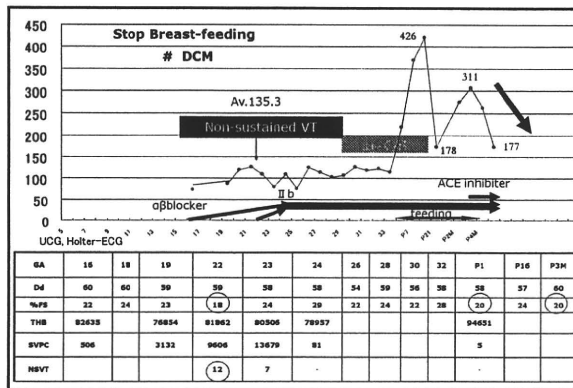


産褥期心機能悪化8例は、すべて授乳をしていた

授乳を中止により心機能が回復した2例

心機能悪化群は、全例授乳を行っていた。しかし、その後授乳を中止した2例(拡張型心筋症1例、僧帽弁閉鎖不全術後1例)は、症状が軽快した。

授乳が心機能悪化の原因か?



最後になりましたが、全国調査にご協力いただいた先生方に深く感謝いたします

国立循環器病研究センター 周産期・婦人科部

研究所 再生医療部 大谷 健太郎

種原 健・代謝内科 岸本 一郎

研究所 生化学部 徳留 健

- ### まとめと考察
- 従来、多産が危険因子の一つとされてきたが、少子化の我が国においては、患者の半数以上が初産婦であった。
 - 初診医は、産婦人科医や一般内科医など、普段心不全患者の診療に携わっていない医師が多かった。その状況下で、血清BNP値は、簡便な診断検査として有用であろう。
 - 危険因子や予後などは、欧米先進国とほぼ同等であった。

産褥期の心エコー、心電図(ホルター心電図)は、時間がかかり、煩雑であることから、育児期間中の褥婦から敬遠されがち!

血中脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)

心不全重症度評価において、鋭敏な生化学的指標として使用されている。

BNP:Brain Natriuretic Peptide

産褥期心機能とBNP値との関連

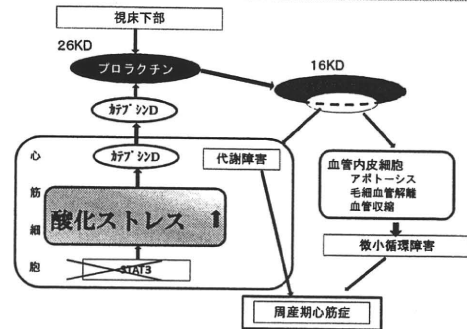
産褥期心機能評価として、血中BNP値は、心機能評価とよく相関する。

BNP値 変化なし (49例)	48	1
BNP値 上昇 (8例)	1	7

BNP値の上昇: 非妊産時もしくは産褥1ヶ月未満の最小値と比較して、産褥3ヶ月以降に、血中BNP値が20pg/ml以上かつ2倍以上に上昇したもの

P<0.0001

異型プロラクチンによる産褥期心筋症発症メカニズム



(Denise Hilfiker-Kleiner et al. Cell, 2007)

切断プロラクチンの周産期心筋症への関与

分担研究者 石田充代 明治大学農学部生命科学科

研究要旨

周産期心筋症患者において、酵素切断を受けたプロラクチン（切断プロラクチン）が心筋障害に関与するという報告がある。

よって本研究では、周産期心筋症や周産期心筋症を含む心疾患合併妊娠において切断プロラクチンが心機能低下に関与しているのかという課題に取り組んだ。その結果、切断プロラクチンは直接的に心筋細胞にダメージを与えないことが明らかになった。そして切断プロラクチンおよびその切断酵素であるカテプシンの測定系を確立することに成功した。

A. 研究目的

プロラクチンは、主に下垂体前葉のプロラクチン産生細胞から分泌される分子量約23kDaのペプチドホルモンである。下垂体前葉の他のホルモンが、視床下部由来の促進因子による制御を受けているのとは異なり、プロラクチンは抑制性の制御を受けている。その最も有名なものは神経伝達物質であるドーパミンである。プロラクチンはドーパミン分泌を刺激することにより、プロラクチン自身が過剰分泌を制御している。

また、プロラクチンは選択的スプライシング、二量体を形成したビックプロラクチン、糖鎖付加、リン酸化そしてプロテアーゼ切断と様々な異型プロラクチンが報告されている。

中でも本来のプロラクチンとは拮抗的作用を有する切断プロラクチンは、抗血管新

生因子作用が多数報告されている（図1）。

血管新生とは胎児や発育中には盛んに行われているが、大人になると創傷治癒、女性性周期に伴う子宮内膜の周期的な肥厚、妊娠中の胎盤増殖や子宮内膜肥厚などに限定されている。この血管新生を阻害するのが抗血管新生因子である。プロラクチンはホルモンの性質上、妊娠時の胎盤や胎児における血管新生と血液循環コントロールに寄与していると考えられる。

実際、切断プロラクチンは *in vitro* および *in vivo* の両方で抗血管新生性を示すことが明らかにされている。例えば、脳血管内皮細胞を切断プロラクチンにて処理すると、アポトーシスを増加させる。

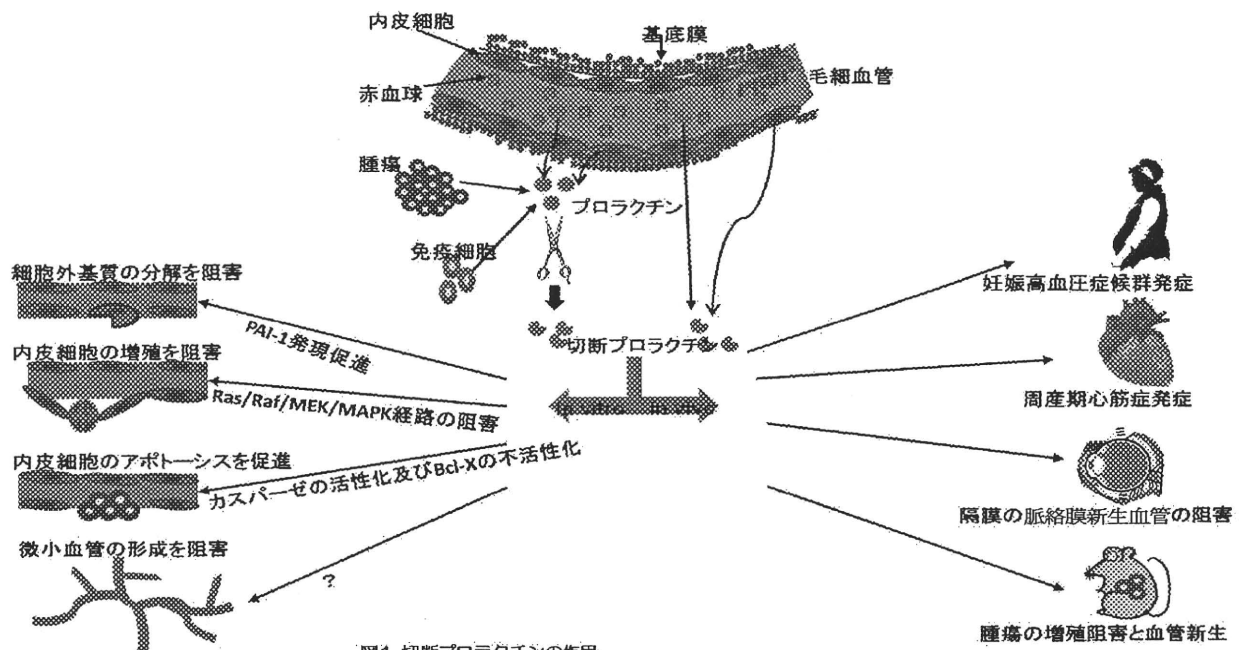
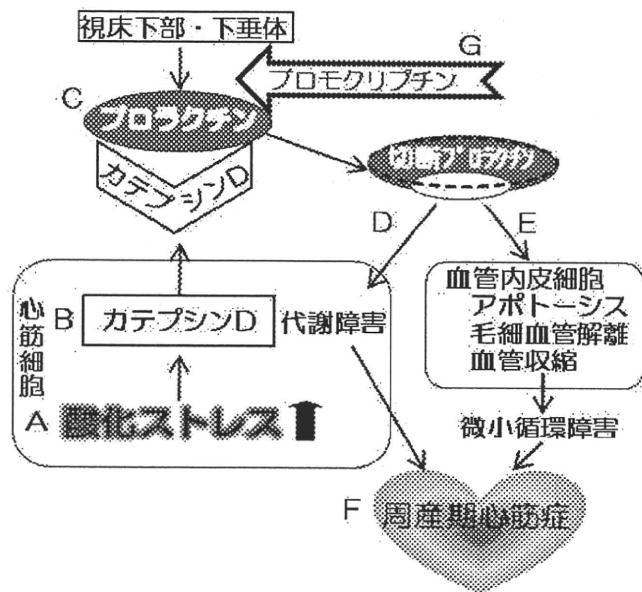


図1. 切断プロラクチンの作用

さらに、脳血管内皮細胞を用量依存的に切断プロラクチンで処理すると $I\kappa B\alpha$ 分解を誘導し、 $NF\kappa B$ の核への移行およびレポーター遺伝子を活性化することでアポトーシスを促進する。切断プロラクチンによる細胞増殖阻害は G1-S および G2-M 相の両方で細胞周期停止を誘導することによることもわかっている。in vivo 実験では、マウスにおいて皮下移植したアデノウイルスベクターに融合したヒト切断プロラクチンは肺癌での腫瘍増殖を阻害し、転移を 50% 抑制した。また、同様のアデノウイルスベクター融合切断プロラクチンは、糖尿病性網膜症モデルマウスにおいて血管新生を阻害し、糖尿病性網膜症患者血清において、切断プロラクチンが検出されたという臨床報告もある。

上記のように、切断プロラクチンの抗血管新生因子としての期待が高まる中、2007 年ドイツハノーファー医科大学の Denise Hilfiker-Kleiner らより切断プロラクチンが周産期心筋症の病因であるという報告

がなされた。彼女らは、周産期心筋症モデルマウス（心筋の Stat3 ノックアウトマウス）において、心筋内酸化ストレスが上昇し、カテプシン D 産生されていることを示した。そしてカテプシン D が血中のプロラクチンを切断し、この切断プロラクチンが心筋細胞の代謝障害や血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こしていることを同定した。さらに、このマウスにブロモクリプチンを投与すると心筋症を発症しないこと、実際の周産期心筋症患者の血清中にも切断プロラクチンが出現していることもあわせて報告した（図 2）。さらにアデノウイルスにより切断プロラクチンを心筋特異的に過剰発現させても周産期心筋症を発症する事を明らかにした。本来のプロラクチンは心筋細胞において、酸化ストレスを減少させ、STAT3 を活性化する。その結果、血管新生と心臓増大によりむしろ周産期心筋症から保護している。このことから、血管新生におけるプロラクチンと切断プロラクチンの相反する作用は、血管新生バランスを維



- A) 妊娠に伴い心血管形成機能が亢進するが、一部の妊婦では酸化ストレスが増加
- B) 酸化ストレス増加に伴いプロラクチンを切断するカテプシンD発現と活性が上昇
- C) カテプシンDによりプロラクチンが切断プロラクチンへ変化
- D) 切断プロラクチンにより酸化ストレスと活性化カテプシンDの影響が加速
- E) 切断プロラクチンが内皮細胞のアポトーシスや毛細血管の解離、心筋細胞内の代謝障害を誘導
- F) 心臓機能不全発症
- G) プロモクリプチン投与でプロラクチン発現を抑制すると心機能が改善

図2. 周産期心筋症発症メカニズム仮説

持するための正と負のシグナルにより臨機応変に対応していると言える (図3)。

そしてもう一つ、切断プロラクチンとの関連が示唆されている疾病に、妊娠高血圧症候群がある。この妊娠高血圧症候群は国立循環器病研究センターの神谷らの報告によると、周産期心筋症との合併率 38%と非常に高い。プロラクチンと妊娠高血圧腎症の関連は30年以上前から研究されており、近年には、妊娠高血圧腎症患者尿中プロラクチン濃度が健常妊娠者と比較して高く、重度になるにつれてプロラクチン濃度が上昇する事や、重症妊娠高血圧腎症患者尿からはプロラクチン断片が検出されたという報告がある。また、妊娠高血圧腎症患者血清中や羊水からも切断プロラクチンが検出され、その羊水は血管内皮細胞増殖因子

(VEGF) による内皮細胞増殖を阻害したという報告もある。さらに、Masumotoらは岡山大学病院において4人の重症な妊娠高血圧症の胎盤において、プロラクチン断片を検出している。これらの結果は、低酸素濃度により酸性環境になってしまった妊娠高血圧症患者の胎盤において、カテプシンDによるプロラクチン切断が起こることを示唆しているのかも知れない。

そこで、本研究では、実験動物及び細胞を用いた基礎実験と検体血清を用いた診断方法の確立の2点から以下の研究を展開した。基礎実験は、ラット心筋株化細胞及び妊娠マウスを用い、切断プロラクチンが増加するだけで、心筋症を発症し得るのかを解析した。診断方法の確立では、プロラクチン切断酵素であるカテプシンD活性と切



図3. プロラクチンと切断プロラクチンの関係仮説

断プロラクチン量を、検体血清を用いて測定した。

B. 研究方法

ラット心筋細胞に対する切断プロラクチンの影響

● 心筋細胞培養

ラット胎児心臓由来の心筋細胞株 H9c2 細胞を用いた。細胞とウシ胎児血清(FBS)は American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、10%FBS とペニシリン、ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社) を培養培地 (growth medium : GM) として用いた。

● 実験動物

Jcl : Wister 系ラットは日本クレア株式会社から購入した。動物室は明期、暗期が共に 12 時間となるように照明管理を行い、1 年を通じて一定の温度、湿度 (22±2℃、60%) となるように空調管理し自由給水、自由給餌 (ラボ MR ブリーダー, 日本農産工業) とした。屠殺はソムノペンチル (共立製薬株式会社) を PBS で 10 倍希釈し、腹腔注射麻酔後、体重 (BW) を測定し、ヘパリン (10unit/ml) 含有飽和カリウム (和光純薬工

業株式会社) PBS を尾静脈注射することにより心停止を誘発させた。

● SDS-PAGE およびイムノブロット

細胞はフルコンフルエント 100mmdish 1 枚分をトリプシン EDTA で処理後、1ml の抽出 Buffer (Tissue Protein Extraction Reagent, Inhibitor Cocktail kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)) に溶解して破碎した。破碎後は、タンパク定量キット 2-D Quant Kit (GE healthcare Japan) にて定量し、タンパク量が等しくなるよう抽出 Buffer で調整した。15%SDS-PAGE を行ない、セミドライ式転写装置を用いて PVDF メンブレン (Millipore K.K.) に転写後、10% EzBlock (ATTO 株式会社) でブロッキングした。一次抗体は N 末端認識抗体 (10052 抗体) もしくは C 末端認識抗体 (10053 抗体)、二次抗体は peroxidase labeled anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) を用い、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore K.K.) にて発光させ、LAS4000 (富士フイルム株式会社) にて検出した。

● RT-PCR および Real Time PCR

細胞の RNA 抽出は 60mmdish 1 枚を用い

		配列	増幅領域
GAPDH	forward	5' - CACCCAGAAGACTGTGGA -3'	313bp
	reverse	5' - TGTTGAAAGTGCAGGAGA -3'	
プロラクチン	forward	5' - GCTGCCAATCTGTTCCGCTG -3' *	270bp
	reverse	5' - ACTCGAGGACTGCACCAAAC -3'	
プロラクチンレセプター	forward	5' - AAGCCAGACCATGGATACTGGAG -3'	253bp
	reverse	5' - AGCAGTTCCTCAGACTTGCCCTT -3'	

DNA1本鎖化	アニーリング	伸長反応	サイクル数
95℃	55℃	72℃	40サイクル
20sec	30sec	1min	

表1. PCRプライマー配列及び条件

RNeasy Mini Kit(QIAGEN K.K.)を使用し抽出した。プロラクチン、プロラクチンレセプターはRT-PCRを行い、GAPDH発現量により半定量を行った。RT-PCRの条件とプライマーを表1に示す。cDNA作成はリバーسكريプトIV(和光純薬工業株式会社)、PCR反応はGo taq Green Master Mix、iCycler(Bio-Rad Japan)を使用して反応を行った。コントロールには未経産メスマウス下垂体を使用した。

Real Time PCRプローブにはTaqManを用いた。内部標準発現遺伝子 GAPDH mm033022949-g1、プロラクチンレセプター mm00599949-m1、VEGF Rn01511606-g1、18s Rn01428915-g1を用いた。機器はLife Technologies Japan Ltd. 7300/7500/7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies Japan Ltd.)を使用した。

マウスへのプロラクチン・切断プロラクチンの影響

● 実験動物

当研究室で系統維持、飼育しているICRマウスを使用しラットと同様に管理した。

● プロラクチン及び切断プロラクチン

マウスプロラクチンはNational Hormone & Peptide Programで購入し、EZ-Link® NHS-PE04-Biotinylation Kit(Thermo Fisher Scientific K.K.)を使用してBiotin標識した。その後タンパク定量を行い、標識をイムノブロットにて確認した。

His-tag付加マウス切断プロラクチンは大腸菌由来で作成し、エンドトキシン濃度による影響がないことを確認した。

● 手術

Micro-Osmotic Pump MODEL1004とMouse Jugular Catheter (Alzet Osmotic Pumps)を使用した。ソムノペンチルで麻酔後、腹腔内もしくは頸静脈のヘカテーテルを挿入した。カテーテル中の血栓形成防止のためにヘパリンを10IU/ml加えた。

● 解剖

投与手術後1週間後に解剖を行った。心重量、体重、脛骨長を計測し、採取した心臓は、上側を固定し組織切片として使用し、下側を液体窒素で凍結した。

● SDS-PAGEおよびイムノブロット

心臓組織を用いてプロラクチンの有無をイムノブロットにて確認した。切断プロラクチンの検出には一次抗体 Rabbit anti-6-His Antibody Affinity Purified (BETHYL Laboratories, Inc.)、二次抗体 Peroxidase Labeled anti-rabbit IgG (Vector Laboratories)を使用した。プロラクチン検出は streptavidin conj. With Peroxidase (ImmunoBioScience Corp.)にて行った。

周産期心筋症におけるカテプシンD測定法の確立

● 患者血清

「周産期心筋症における切断プロラクチン測定法の確立」と同様の検体を用いた。出産後1ヶ月の入院時(心機能悪化後)、プロモクリプチン投与後(心機能回復後)である。比較対照として、出産後1ヶ月の血清3検体と、健常非妊娠者の血清3検体を同時に測定した。入院時の検体は血清ではなく血漿である。

● カテプシンD測定

カテプシン D 活性は Sensolyte 520 Cathepsin D Assay Kit (ANAspec Inc.) を使用し Kit のプロトコルに則って測定した。この Kit ではカテプシン D により基質が分解されると蛍光が増加し、それによってカテプシン D の活性を測定することができる。血清 50 μ L に同量のカテプシン D 基質を加えマルチラベルカウンター (Wallac 1420, Perkin Elmer Japan Co., Ltd.) にてトリプリーケートで測定した。基質分解産物を段階的に希釈して検量線を作成し、これをもとにカテプシン D 活性を求めた。測定間の誤差をなくすために、コントロールとして健康非妊娠者の血清を置き、これをキャリブレーターとした。患者血清のカテプシン D 活性値をキャリブレーターの測定値で割り、表を作成した。

昨年度までの方法との相違点は、血清を希釈せずに使用すること、基質添加後に直ちに単回の測定を行うこと、測定間誤差をなくすためにキャリブレーターを置くことである。この方法により、以前よりも短時間で測定が行え、また多くの検体を一度に測定することが可能となった。なお、本方法はドイツハノーファー医科大学の Dr. Denise Hilfiker-Kleiner を直接訪問する機会を得、ご教授いただいた。

周産期心筋症における切断プロラクチン測定法の確立

● 患者血清

健康非妊娠者および健康妊娠者の血清はボランティアから採血した。周産期心筋症および心不全合併妊娠者の血清は、国立循環器病研究センターもしくは同センターの

神谷千津子氏が総括した周産期心筋症全国調査に協力していただいた施設に入院した患者から採血した。各々の患者について出産前・出産直後・出産後 1 ヶ月の 3 点で採血しそれぞれ①・②・③と表記した。

コントロールとしてヒトプロラクチン (National Hormone & Peptide Program) を用い、切断プロラクチンのコントロールとしてヒトプロラクチンをウシカテプシン D (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社) にて切断したものを使用した。

● 免疫沈降

血清 250 μ L を Albumin/IgG Removal Kit (Merck Chemicals Japan) により前処理後、Protein G-Agarose (Roche Diagnostics K. K.) 50 μ L を 4 $^{\circ}$ C 16 時間インキュベートし IgG を除去した。ヒトプロラクチン抗体 (National Hormone & Peptide Program) を用いて Protein G-Agarose のキットのプロトコル通りに免疫沈降を行った。

● タンパクの分子量と量の測定

免疫沈降サンプル中のタンパク質の分子量と量の測定には Agilent Protein 80 Kit (Agilent Technologies, Inc.) を用いた。Agilent Protein 80 Kit はタンパクの分子量および半定量が可能なシステムで、原理はほぼ SDS-PAGE と同様であるが、少量のサンプルで解析が可能であり、さらに短時間で泳動と検出が出来る。原理の概要は下記の様である。一本鎖にし、蛍光物質を結合させたタンパクを chip に充填したゲル内に注入して電流を流し、蛍光を検出する。検出時間と量で試料中タンパクの分子量と量を計算する。結果は電気泳動図により示され、それぞれのピークのマーカを基準

とした分子量と内部標準タンパクを基準とした半定量的結果が表示される。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立循環器病センター倫理委員会にて、平成 24 年 3 月 31 日までを実施期間として実験許可を得た。以下にその内容を示す。

本研究は、厚生労働省・文部科学省の「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日）」に従って作成されている。事前に本研究の主旨を、被験者に十分に説明したうえで実施する。また、得られたいかなる個人情報についても秘密が厳守されることを保証する。検体検査を分担する明治大学農学部においては、匿名化し、検体番号のみで識別された検体を使用する。得られたデータは匿名化して保存し、統計結果を公開する際には、個人が特定されない項目を集計・解析したもののみ、発表する。コントロールである健常例に於いては、採血検体を頂くため、侵襲を加えることとなる。それ以外の不利益は特にないと考える。

C. 研究結果

ラット心筋細胞に対する切断プロラクチンの影響

● 抗体の交差性

当研究室でマウスプロラクチンを抗原として作製したプロラクチン抗体がラットプロラクチンに対して交差性

があるかどうか検証するため、ラットプロラクチンをウシカテプシン D で切断しイムノブロットを行った。その結果、10052 抗体は約 16kDa のバンドを認識し、10053 抗体は約 8kDa のバンドを認識した。この結果より作製した抗体はラットプロラクチンも認識する事が示された(図 4)。

抗体の交差性が示された上で、H9c2 細胞にタンパクレベルでプロラクチンや切断プロラクチンが存在するのか検証した。その結果、心筋細胞ではプロラクチンおよび切断プロラクチンの存在は認められなかった(図 4)。

● 心臓および心筋細胞でのプロラクチンとプロラクチンレセプター mRNA 発現

ラットから摘出した心臓と培養心筋細胞にプロラクチンやプロラクチンレセプターの mRNA が発現しているか RT-PCR により検証した。プロラクチン mRNA 発現はラットの心臓でも心筋細胞でも確認できなかった。プロラクチンレセプターは心臓でわずかに発現し、心筋細胞では発現していなかった

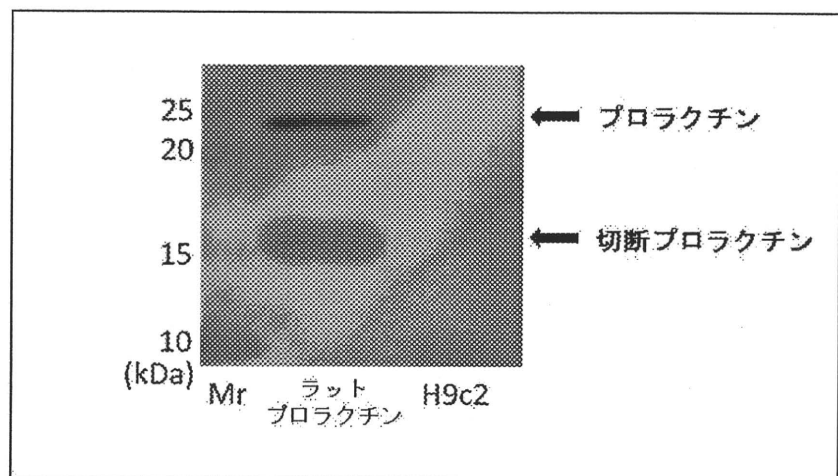


図4.ラットプロラクチンに対するN末端抗体の交差性と心筋細胞におけるプロラクチンおよび切断プロラクチンの存在確認
Mr: マーカー
ラットプロラクチン: ラットプロラクチン2 μ g (2 μ L + ウシカテプシン D200ng (2 μ L) + カテプシンD Buffer (16 μ L)) 37 $^{\circ}$ C10分 サンプル量20 μ L
H9c2: H9c2 60 μ g

(図5)。

- 心筋細胞のミトコンドリア活性に対する切断プロラクチンの影響

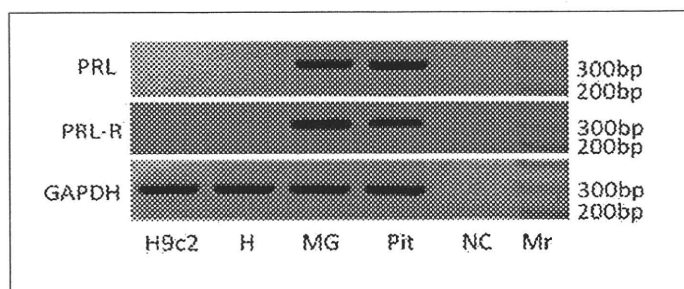


図5. プロラクチンおよびプロラクチンレセプターのmRNA発現

PRL : プロラクチン
PRL-R : プロラクチンレセプター
Mr: マーカー
H9c2 : 培養心筋細胞
H : ラット摘出心臓
MG : 乳腺
Pit : 下垂体
NC : no template control

心筋細胞に対するミトコンドリア代謝活性を測定するために MTS assay を行った。切断プロラクチンは血管新生促進因子による細胞増殖を阻害する報告があるため、FBS1%の GM と 10%の GM で試験を行った。その結果、切断プロラクチン添加群と非添加群に吸光度の差は見られず、切断プロラクチンを GM に添加することによる心筋細胞への、代謝、細胞増殖に対する影響は無いことが判明した(図6)。

- 心筋細胞の VEGF 生産に対する切断プロラクチンの影響

切断プロラクチン存在下で心筋細胞からの VEGF 生産が抑制される可能性を検討するため、分泌タンパク変化量を ELISA により測定した。培養上清中の VEGF 量を測定す

ると、Buffer を添加することにより VEGF 生産量が、低下した。しかし、切断プロラクチンを添加すると回復するという事が判明した(図7)。

「ラット心筋細胞に対する切断プロラクチンの影響」の考察は以下の通りである。心筋株化細胞とラットから抽出した心臓にはプロラクチンの発現が無く、心臓および心筋細胞でのプロラクチン局所生産は無い。しかし、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial

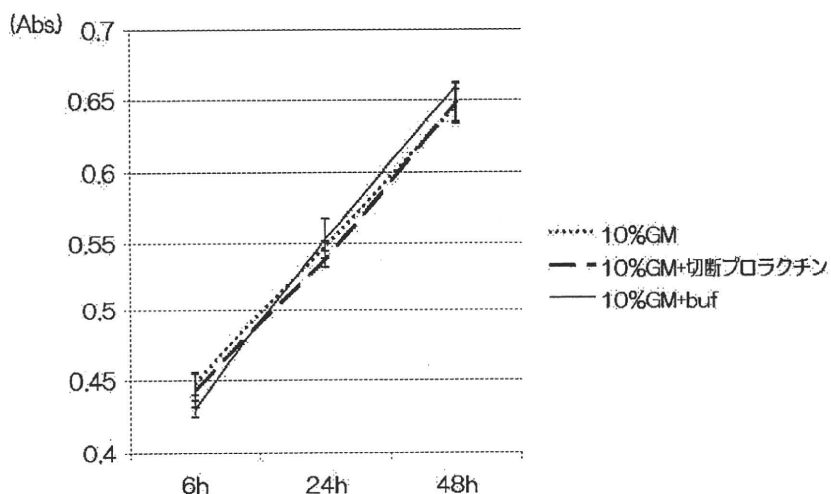


図6. 切断プロラクチンを添加した心筋細胞の MTS assay

Standard err of MEAN : SE
10%GM : FBS10%のGMで培養
10%GM+切断プロラクチン : FBS10%のGMに切断プロラクチンを添加し培養
10%GM+buf : FBS10%のGMにBufferを添加し培養

cell: HUVEC) ではプロラクチン mRNA の発現が確認されている。このプロラクチンは HUVEC の細胞増殖に関与していると考察されている。心臓の場合、通常状態では細胞や心臓自体の体積の増減は無いので、血管新生や血管内皮細胞増殖の促進は必要ない。さらに、血管新生が必要な梗塞などの場合でも、骨格筋や心筋からは強力な血管新生促進因子である VEGF が合成・分泌される。そのため、心臓でプロラクチンを局所的に生産するという、下垂体由来の循環