

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—駆出率の保たれた心不全における圧反射異常の役割に関する検討—

研究分担者：砂川 賢二（九州大学大学院医学研究院 循環器内科）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来の個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓MRI検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

駆出率の保たれた心不全(HFpEF)の病因は未だに明らかにされていない。

HFpEFの危険因子である高血圧、高齢は同時に動脈硬化の危険因子である。一方で動脈硬化は血管壁の肥厚と質的变化を引き起こすため、頸動脈壁の伸展性が妨げられる。頸動脈洞圧受容体は血管壁内の伸展受容器であるため頸動脈の伸展性の低下は圧反射異常を来す。

疫学研究により HFpEF 患者は少量の容量負荷で急速に肺水腫を来することが知られている。圧反射系は強力な血圧・負荷血液量の制御系であるため、我々は圧反射異常が HFpEF の発症に重要な役割を果たしているとの仮説を立てた。

我々はこの仮説を検証すべく、正常心機能ラットの圧反射異常モデルを作成し、容量不耐性を評価した。

B. 研究方法

正常左室機能のSDラット5匹を麻酔下に頸動脈洞を隔離しサーボポンプに接続、頸動脈洞圧(CSP)は体血圧と独立して制御した。圧反射正常群はCSPに体血圧を入力し、圧反射異常群は定常圧を入力した。デキストランを段階的に静注して左房圧(LAP)と大動脈圧(BP)を測定(図1)し、LAP 20 mmHgに達するデキストラン量(臨海負荷容量: Critical V)、平均体血圧を推定した。

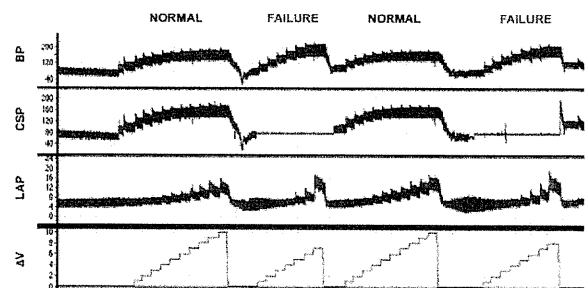


図1. 圧記録の一例

同一のラットで、頸動脈洞への入力を正常と異常と交互に行い、血圧(BP)、左房圧(LAP)を記録した。

(倫理面への配慮)

全ての手技、動物の飼育は九州大学大学院医学薬学研究院動物実験委員会によって審査された。

C. 研究結果

正常群と圧反射異常状態を比較すると、10 mL/kgの容量負荷に対する左房圧変化は、圧反射不全により増強された。(4.0±2.1 vs. 12.8±7.4 mmHg, p<0.05)。また、左房圧が20 mmHgに達するデキストラン量Critical Vは有意に減少(17.2±1.9 vs. 11.2±1.6 ml/kg, p<0.01)しているにもかかわらず、その臨海負荷時の平均体血圧は、圧反射異常群で有意に上昇した。(151.4±18.8 vs. 178.8±17.8 mmHg,

$p < 0.05$)。 ΔV (約 6.0 mL/kg)は生理的負荷血液量の 3 分の 1 に達しており、圧反射異常は容量耐性に大きな影響を与えていると考えられた (図 2)。

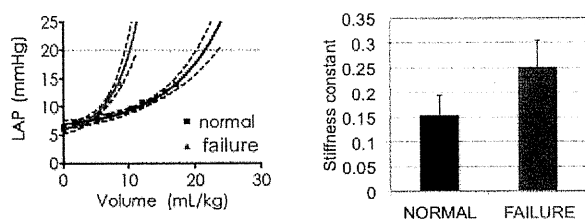


図 2. 左房圧(LAP)と負荷量(Volume)の関係

負荷容量-左房圧関係は、単指数関数 ($LAP = e^{A \cdot \Delta V} + B - 1$) により良好に曲線適合でき、これにより血管床のスティフネス定数 (A) を得ることができる。5 匹のラットから得られたスティフネス定数は圧反射不全にすることで有意に上昇した。A: スティフネス定数、B: オフセット

D. 考察

今回我々は、頸動脈洞を完全に隔離し、圧を制御可能とした上で、頸動脈洞に一定圧を入力することで、圧反射不全モデル動物を作成できた。左室機能が正常であるにもかかわらず、圧反射不全状態にすることで、著しい容量不耐性が生じることが明らかとなった。

従来、HFpEF は収縮能が保たれているため、拡張不全によって生じると考えられてきた。実際に、多くの HFpEF 患者は高血圧による求心性肥大を伴っているが、一方で左室肥大をターゲットとした ACE 阻害剤、アンジオテンシン受容体拮抗薬による治療は、HFpEF の予後改善効果をもたらすには至っていない。左室スティフネスの上昇のみでは、FHpEF に伴う急性肺水腫を説明することはできなかった。

今回、肺水腫を来すと考えられる限界負荷容量は、圧反射不全状態では、有意に低く、生理的ストレスボリュームの 25% をも示した。これは 50 kg の人に換算すると、300 mL に相当し、わずかな容量変化分に対して容易に左房圧、体血圧が上昇する病態を示している。

E. 結論

心機能正常圧反射異常モデルにて著しい容量不耐性が生じた。圧反射異常は HFpEF において重要な役割を果たしていると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Hosokawa K, Funakoshi K, Tanaka A, Sakamoto T, Onitsuka K, Sakamoto K, Tobushi T, Fujino T, Saku K, Murayama Y, Ide T, Sunagawa K. Artificial baroreflex system restores volume tolerance in the absence of native baroreflex. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011: 697-699, 2011.

2. 学会発表

- Funakoshi K, Hosokawa K, Sunagawa K, Baroreflex failure may play a major role in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction. 第 50 回日本生体医工学学会 2011 年 4 月 29 日～5 月 1 日 東京
- 船越公太、砂川賢二. 圧反射異常は駆出率の保たれた心不全において重要な役割を果たす. 第 32 回循環制御医学会総会 2011 年 6 月 10 日～11 日 富山
- Ide T, Arai S, Sunagawa K. Standard tapering regime of steroid therapy for cardiac sarcoidosis causes further LV dysfunction, The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society Aug 3-4, 2011, Yokohama
- Hosokawa K, Funakoshi K, Tanaka A, Sakamoto T, Onitsuka K, Sakamoto K, Tobushi T, Fujino T, Saku K, Murayama Y, Ide T, Sunagawa K. Artificial Baroreflex System Restores Volume Buffering Function in the Baroreflex Failure Irrespective of Left Ventricular Systolic Function *Experimental Biology* 2011 (April 9-13, 2011, Washington, USA)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—心筋虚血再灌流傷害における SOCS3 の役割について—

研究分担者：今泉 勉（久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来の個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓 MRI 検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

急性心筋梗塞の急性期死亡率は冠動脈形成術による再灌流療法により著しい改善が得られている。しかしその一方で、虚血再灌流障害による心筋障害が予後悪化に要因となることが問題であり、虚血再灌流障害を抑制する新たな戦略が必要と考えられる。近年 JAK/STAT を介したシグナル伝達経路の活性化が心筋の生存促進に最も重要であるとの報告が相次いでなされた。Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3)は G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)、EPO (erythropoietin)や LIF (leukemia inhibitory factor)などのサイトカインによって発現が誘導され、サイトカインの心筋生存シグナルを強力に負に制御するネガティブフィードバック因子である。本研究の目的は、「サイトカインシグナルのネガティブフィードバック因子であるSOCS3を心筋特異的に欠損させ、心筋細胞のサイトカインシグナルが効率よく伝達されるマウスを作成し、虚血再灌流障害における心筋特異的 SOCS3 欠損の効果について検証すること」である。

B. 研究方法

虚血再灌流障害（1時間の虚血後に再灌流）の表現型の差を心筋特異的 SOCS3 ノックアウトマウス (SOCS3-CKO)と野生型のマウスで比較を行った。心筋障害はエバンスブルーと TTC 染色で、心機能は心エコーで評価した。心筋のアポトーシスの検出は TUNEL 染色で行った。またサイトカインの発現、シグナ

ルの活性化とSOCSの発現を real-time PCR で確認し、心筋特異的 SOCS3 欠損が虚血再灌流障害の病態に与える影響を検討した。さらに、microarray 解析を行い、網羅的に遺伝子発現について比較評価を行った。

C. 研究結果

野生型マウスにおいて、再灌流20分後より STAT3 のリン酸化を認め3時間後にはリン酸化の抑制を認めた。SOCS3 の発現をウェスタンブロットで検出したところ、再灌流3時間後より高度の発現をみとめ、再灌流後早期に SOCS3 が STAT3 の活性化を抑制していることがわかった。再灌流1時間後の心臓組織における STAT3 を活性化するサイトカインの発現を real-time PCR で観察したところ、G-CSF と interleukin-6 (IL-6) の高度の発現を認め、LIF も優位に発現が増加していた。虚血再灌流障害による梗塞範囲は SOCS3-CKO において優位に抑制された。再灌流6時間後の TUNEL 陽性細胞は SOCS3-CKO において優位に少なかった。再灌流3日後の心機能を心エコーで評価したところ、SOCS3-CKO において左室拡張末期径は小さく左心収縮能は保持されていた。再灌流6時間後の心臓組織を用いて microarray 解析を行ったところ、CXCLファミリーケモカインや IL-1beta, TNF などの炎症性サイトカインの発現が SOCS3-CKO において優位に抑制されていた。

D. 考察

実験レベルにおいて、急性心筋梗塞と虚血再灌流障害におけるG-CSFやEPOによる心保護作用は明らかではあるが、臨床での効果はいまのところ定かではない。しかし、その投与時期や投与方法などプロトコールを検証する必要があると考えられる。また、G-CSFやEPOを投与するとこれらの刺激そのもので内因性のSOCS3が誘導され、その効果が制限されている可能性がある。本研究の結果は、心筋細胞におけるSOCS3の発現を抑制できれば、G-CSFやEPOが虚血心筋へ効率よく作用することができることを示している。今後、SOCS3が再灌流障害の治療標的となる可能性がある。SOCS3-CKOにおいて再灌流障害による心筋障害が抑制される機序については、抗アポトーシス作用や抗炎症によると考えられた。最近、STAT3はミトコンドリア機能保持にも重要であることが報告されており、今後、SOCS3-CKOの心筋におけるミトコンドリア機能や酸化ストレスの状態などについても検証していく必要がある。

E. 結論

心筋特異的にSOCS3を欠損させることにより虚血再灌流による心筋障害が抑制される。その機序として、炎症経路の抑制が重要である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Mawatari K, Oba T, Nagata N, Kyogoku S, Koga M, Imaizumi T: Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol* 147: 258-264, 2011
2. Takayama N, Kai H, Kudo H, Yasuoka S, Mori T, Ane-gawa T, Koga M, Kajimoto H, Hirooka Y, Imaizumi T: Simvastatin prevents large blood pressure variability induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways. *Hypertens Res* 34:341-347, 2011
3. Ueda S-I, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, Imaizumi T: Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 178:591-598, 2011

4. Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki K-I, Futamata N, Fukui D, Mawatari K, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Nakamura K, Kang D, Yajima T, Knowlton KU, Imaizumi T: Cardiac-specific deletion of SOCS-3 prevents development of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 59: 838-852, 2012
5. Ohmura H, Yasukawa H, Minami T, Sugi Y, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Aoki H, Imaizumi T: Cardiomyocyte-specific transgenic expression of lysyl oxidase-like protein-1 induces cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res* in press

2. 学会発表

1. Nagata T, Yasukawa H, Oba T, Pradervans S, Mawatari K, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Sasaki K, Yajima T, Hoshijima M, Knowlton KU, Imaizumi T. Prevention of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Cardiac-Specific SOCS3 Knockout Mice by Inhibiting Pro-inflammatory Pathways. (The American Heart Association, The 84th Scientific Sessions, Orlando, USA, November12-17, 2011)
2. Oba T, Yasukawa M, Nagata T, Kyogoku S, Futamata N, Mawatari K, Minami T, Sugi Y, Fukui D, Aoki H, Imaizumi T: Activation of Hypoxia Inducible Factor-Erythropoietin Pathway May Prevent Acute Myocardial Injury During Remote Ischemic Preconditioning. (The American Heart Association, The 84th Scientific Sessions, Orlando, USA, November12-17, 2011)
3. The role of dendritic cells in the pathogenesis of heart failure. Yasukawa H, Sugi Y, Ohshima H, Imaizumi T. (The XX World Congress of the ISHR, International Society for Heart Research, Kyoto, May 13-16, 2010)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—高血圧性左室肥大パターンによる心機能障害の比較：心エコーを用いた心時相解析による検討—

研究分担者:鄭 忠和（鹿児島大学大学院 循環器・呼吸器・代謝内科学）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓MRI検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

高血圧症例において、左室肥大は独立した予後規定因子である。一方、左室肥大パターンにより予後が異なり、求心性肥大で最も予後不良であると報告されている。しかしながら、肥大パターンと左室機能障害との関係について未だ十分に検討されていない。本研究の目的は、Tei indexを含めた心エコー指標を用いて高血圧性左室肥大パターンと左室機能障害の関係を検討することである。

B. 研究方法

対象は、未治療の本態性高血圧症連続60症例（男性30例、女性30例、平均年齢50 ± 14歳）。心エコー法を用いて、左室心筋重量係数および左室相対壁厚を算出し、①正常型②求心性リモデリング③遠心性肥大型④求心性肥大型の4つの肥大パターン群に分類した。また、左室駆出率、僧帽弁E/A比、左室Tei index、駆出時間、等容収縮時間、等容拡張時間をそれぞれ求めた。

（倫理面への配慮）

本研究対象の患者全員に対しインフォームド・コンセントを得たうえで、鹿児島大学病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) 正常型22例、求心性リモデリング9例、遠心性左室肥大型12例、求心性左室肥大型17例であった。2) 左室心筋重量係数は、収縮期血圧 ($r=0.34, p<0.01$)・左室駆出率 ($r=-0.33, p<0.05$)・僧帽弁E/A比 ($r=-0.30, p<0.05$)・左室Tei index ($r=0.50, p<0.0001$)とそれぞれ有意な相関を認めた。多変量解析では、左室Tei indexのみが左室心筋重量係数の独立した規定因子であった ($p<0.01$)。3) 左室Tei indexおよび等容収縮時間は、求心性肥大型が他3群全てと比較し有意に増大していた ($p<0.05$)。等容拡張時間は、求心性肥大型において正常型およびリモデリングと比較し有意に延長していた ($p<0.01$)。駆出時間は、4群間に有意差を認めなかった。

D. 考察

未治療の本態性高血圧症例において、総合的心機能指標である左室Tei indexと左室心筋重量係数との間に有意な相関を認めた。また、左室Tei indexの構成因子である等容収縮時間（収縮機能指標）および等容拡張時間（拡張機能指標）も、左室心筋重量係数と相関を認めた。特に等容収縮時間は、Tei indexの3つの構成因子のなかで左室心筋重量係数と最も強い相関を認め、左室駆出率が正常であっても左室肥大に伴って左室収縮障害を来していることが示唆された。

高血圧性左室肥大症例において、求心性肥大型が最も予後が悪いことが報告されているが、本研究の検討では左室 Tei index・等容収縮時間・等容拡張時間のいずれもが、4群のなかで求心性肥大型において最も増大しており、収縮および拡張機能低下に伴う総合的な心機能障害が予後と関連する可能性が示唆された。

E. 結論

高血圧性肥大に伴う心機能障害の評価において、左室 Tei index は従来の心機能指標と比べより良い指標と考えられた。未治療の本態性高血圧症例において、4つの肥大パターンのなかで求心性左室肥大型が最も心機能障害が強いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takasaki K, Miyata M, Imamura M, Yuasa T, Kuwahara E, Kubota K, Kono M, Ueya N, Horizoe Y, Chaen H, Mizukami N, Kisanuki A, Hamasaki S, Tei C. Left Ventricular Dysfunction Assessed by Cardiac Time Interval Analysis Among Different Geometric Patterns in Untreated Hypertension. *Circ J*. 2012. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Takasaki K, Miyata M, Imamura M, Yuasa T, Kuwahara E, Kubota K, Kono M, Kisanuki A, Hamasaki S, Tei C. Left Ventricular Dysfunction Assessed by Cardiac Time Analysis Among Different Geometric Patterns in Untreated Hypertension
第15回日本心不全学会学術集会・シンポジウム「心不全の一次予防」. 2011年10月13日～15日, 鹿児島

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

一心不全の関連遺伝子と修飾遺伝子の GWAS 解析—

研究協力者：豊岡 照彦（北里大学医療系大学院）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術と患者治療に還元することを大目標とする。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓MRI検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

申請時の研究計画に従い、国内外の心不全患者からの研究用試料の収集と、網羅的な遺伝子解析を実施して、幅広い疾患概念の「心不全」を分子生物学的に診断し、今後の発症前診断、予後予測と治療法の選別に寄与する。

B. 研究方法及び倫理面への配慮

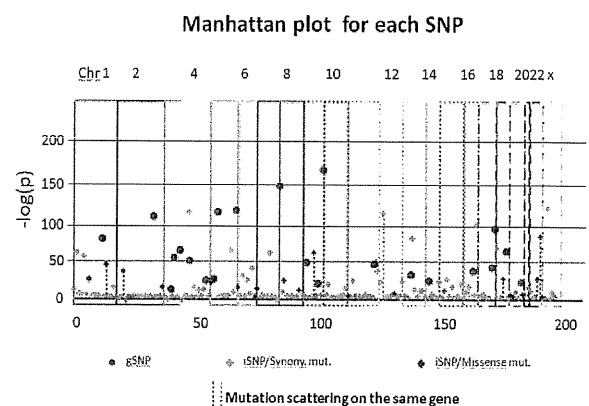
国内では筆者が東京大学・医学部・附属病院・器官病態内科・心不全外来で診療した心不全患者と北里大学・医学部附属病院・循環器内科受診中の心不全患者で遺伝子診断を受諾頂いた患者、37名の末梢血から Genomic DNA を精製した。国際的には心不全の発生頻度と元疾患の民族差による多様性に注目して、その遺伝子背景を探った。共同研究に快諾頂き、所属施設内の倫理委員会の承認が得られたドイツで出張実験を実施した。具体的には、白人患者に特化して、試料を採集した。Max-Planck 研究所内の共同研究者らが心移植手術時に摘出して、冷凍保存中の DCM 患者由来の心筋組織の1部(約 100mg)から既報に従い Genomic DNA を精製した。また、ドイツでは同一試料を光顕と電顕パルで病理学的解析を行った。

これと並行して理化学研究所主催でポストゲノムプロジェクトの Case-control study に筆者が応募、参加して、心不全患者(100名)、正常対照者(100名)について、心不全関連遺伝子のデータ分析を行った。この際には DNA に直

接触せずに、理研の測定結果を筆者が作製したデータベースを基本にして、多くの bioinformatics 情報を多面的に解析する遺伝学的な data mining を実施した。

C. 研究結果

1検体当たり平均、約150万の膨大な遺伝子変異(SNP)と網羅的な遺伝子解析を完了した試料総数は未だ不十分で、その解析にも汎用機では処理能力に限界があった。高性能の演算機、独自開発の演算ソフトと、患者データの機密厳守の為に外部と完全に遮断した大容量の独立した記憶媒体が必要となった。具体的な責任遺伝子や、修飾遺伝子示す事は下記の理由で止められている為に、下記の各 SNP の Manhattan plot を示すに留め、言及を避けたい。



D. 考察

得たデータは医学的にも生物学的にも、また人種差も含む極めて興味ある結果を多数含み、今回の研究のテーマ選と解析法の妥当性を示唆している。特記すべき点として、個別の遺伝子変異に加えて、複数遺伝子の干渉作用による病態修飾が考えられた。なお、要旨内の心臓 MRI と MRS の組合せにより *in vivo* で心筋症の代謝的診断として有用な事を筆者らが丁度 20 年前に報告した(Toyo-oka *et al.*, Noninvasive assessment of cardiomyopathy development with simultaneous measurement of topical ¹H- and ³¹P-magnetic resonance spectroscopy, *Circulation*, 1992)。その臨床実用化に至るまでの、息の長い研究の継続性が重要なことを痛感する。

E. 結論

具体的な研究方法と内容の公開には研究に参加協力頂いた研究者と所属機関の承諾が必要であり、手続き終了後に、関連学会と文献で発表する予定である。今後、関係省庁にも協力頂き、年度途中でも関連遺伝子の診断精度を挙げるために研究規模を拡大したい。近未来で実現可能性の高い遺伝子治療、ES 細胞や iPS 細胞による再生医療を実現する際に遺伝子的に健全な試料を用いることは必須条件であり、今回の研究結果の多面的な利用が可能となる。本研究を臨床に還元する大規模研究に発展できれば研究に協力頂いた患者さんへの報恩となり、本研究に積極的な御支援を頂いた貴班に御礼申し上げる。

F. 研究発表

1. 論文発表

森田 敏宏, 豊岡 照彦 高感度心筋トロポニン T による心不全の予後予測。毎日メディカルジャーナル 9: 5~7, 2011

2. 学会発表

T. Toyo-oka, S. Kostin, T. Izumi, L. Toyo-oka, J. Schaper, & K. Tokunaga. Recent bioinformatics and ultrastructure-based gene-identification responsible for complicated familial cardiomyopathies with the ethnicity. European Society of Cardiology (Heart Failure) May 23, 2011, Gothenburg, Sweden.

3. 書籍発表

T. Toyo-oka, T. Tanaka, L. Toyo-oka & K. Tokunaga. A novel algorithm from personal genome to the pathogenic mutant causing mitochondrial cardiomyopathy. *In Genes and Cardiac Function*. Ostadal, et al. (eds), Springer Verlag, pp85~92, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

〔出願〕 計(1)件

発明者 発表制限中、産業財産権の名称 非公開、権利者 北里大学、産業財産権の種類、番号、非公開、出願年月日 発表制限中、国内・外国の別、発表制限中。

2. 実用新案登録

特に無い。

3. その他

特に無い。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—加齢と心不全：Senescence marker protein 30 の機能解析—

研究協力者：竹石 恭知（福島県立医科大学医学部 循環器・血液内科学講座）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来の個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓MRI検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

Senescence marker protein 30 (SMP30)は加齢に伴い減少する分子量 34 kDa のタンパク質として同定された。その後の解析により SMP30 は抗加齢蛋白として機能していることが示唆されている。我々は SMP30 の心臓リモデリングにおける役割について検討した。

B. 研究方法

野生型(WT)マウスに大動脈狭窄手術を行い、圧負荷肥大心を作成した。そして左室心筋での SMP30 発現レベルはシャム手術を行ったコントロール群と比較した。

また、10 週齢の WT マウスと SMP30 ノックアウト(KO)マウスに心エコー検査を行った。次いでマウス皮下にインフュージョンポンプを植込み、アンジオテンシンⅡを持続投与した。アンジオテンシンⅡ投与 2 週間後、SMP30 KO マウスと WT マウスの血圧を測定後、心エコー検査を行った。その後サクリファイスし、心重量を測定、病理組織標本を作製した。また、心筋から RNA と蛋白を抽出し、p21 など老化遺伝子の発現、細胞内シグナルの検討を行った。

(倫理面への配慮)

研究プロトコールは遺伝子組み換え実験安全委員会、動物実験委員会にて承認され、研究は

遺伝子組み換え実験安全管理規則および動物実験指針に従い行われた。

C. 研究結果

WT マウスにおいて、大動脈狭窄による圧負荷作成 1～2 日後に、左室心筋での SMP30 の蛋白発現の増加を認めた。

10 週齢の WT マウスと SMP30 ノックアウト(KO)マウスに心エコー検査を行ったところ、心機能は両群間で差を認めなかった。アンジオテンシンⅡ投与 2 週間後、収縮期血圧、拡張期血圧は両群ともに上昇し、両群間で差を認めなかった。心エコー検査では、SMP30 KO マウスは、WT マウスと比べて左室収縮能および拡張能の低下と左室拡張末期径の増大を認めた。SMP30 KO マウスでは、WT マウスと比べて心重量および心筋細胞の横断面積は有意に大きく、また心筋組織の線維化の進行を認めた。老化の生化学マーカーである senescence associated-β-gal 染色では、陽性心筋細胞数は WT マウスと比べて SMP30 KO マウスで有意な増加を認めた。また、SMP30 KO マウスでは老化遺伝子の一つである p21 遺伝子の発現が増加していた。また、SMP30 KO マウスは WT マウスより有意にアンジオテンシンⅡによる活性酸素種の増加を認めた。SMP30 KO マウスでは WT マウスより c-Jun-N-terminal kinase のリン酸化活性の上昇、

Bax/Bcl 比の上昇、Tunnel 陽性細胞数の増加を認めた。

D. 考察

SMP30 KO マウスでは WT マウスと比較し、アンジオテンシン II により活性酸素種の産生が増加し、c-Jun-N-terminal kinase リン酸化活性の上昇、Bax/Bcl 比の上昇、アポトーシスが促進されたと考えられた。また線維化も促進され、そのため、左室収縮能、拡張能が低下し、左室径が増大したものと推察された。この結果から、SMP30 は心臓でアンジオテンシン II に対する抗酸化作用、抗アポトーシス作用を有することが示唆される。

E. 結論

SMP30 は抗酸化作用、抗アポトーシス作用を介してアンジオテンシン II による心臓リモデリングを抑制することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ando K, Ishibashi T, Ohkawara H, Inoue N, Sugimoto K, Uekita H, Hu C, Okamoto Y, Takuwa Y, Takeishi Y: Crucial role of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RhoA/Rac1-dependent signaling pathways in thrombin-stimulated endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 18: 762-773, 2011
- 2) Kamioka M, Ishibashi T, Ohkawara H, Nagai R, Sugimoto K, Uekita H, Matsui T, Yamagishi S, Ando K, Sakamoto T, Takuwa Y, Wada I, Shiomi M, Maruyama Y, Takeishi Y: Involvement of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RAGE activation signaling pathways. *J Cell Physiol* 226: 1554-1563, 2011
- 3) Yoshihisa A, Owada T, Ando K, Sato T, Suzuki S, Sugimoto K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Adaptive servo ventilation improves cardiac dysfunction and prognosis in heart failure patients with Cheyne-Stokes respiration. *Int Heart J* 52: 218-223, 2011

2. 学会発表

- 1) Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Saitoh S, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 inhibits angiotensin II-induced cardiac remodeling. Scientific Sessions of American Heart Association 2011, Orlando, Florida USA, November 2011
- 2) Mizukami H, Saitoh S, Yamada S, Machii H, Takeishi Y: Senescence marker protein-30 deficiency impairs myocardium-induced dilation in coronary arterioles associated with reactive oxygen species in aging. Scientific Sessions of American Heart Association 2011, Orlando, Florida USA, November 2011
- 3) Yamada S, Saitoh S, Mizukami H, Machii H, Takeishi Y: Aging impairs endothelium-dependent dilation via thiol-oxidation in coronary arterioles in SMP 30 deficiency mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2011, Orlando, Florida USA, November 2011

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—非虚血性拡張型心筋症を有する植込み型除細動器患者での腎機能障害が適切作動に及ぼす影響—
研究協力者：志賀剛、鈴木敦、庄田守男、川名正敏、萩原誠久（東京女子医科大学 循環器内科）

研究要旨

非虚血性心筋症を有し植込み型除細動器(Implantable Cardioverter Defibrillator; ICD)治療患者を対象に、腎機能障害と致死性不整脈発現との関連性について検討した。1990年から2008年までに、当院でICDを植え込まれた非虚血性拡張型心筋症患者連続274例を対象とし、後ろ向きに検討を行った。評価項目は、VT/VFに対する適切作動、頻回作動及び死亡の有無とした。推算糸球体濾過量 $<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ を腎機能障害とした。96人(35%)が腎機能障害を有し、平均観察期間27ヶ月間において適切作動及び頻回作動は、腎機能障害群で有意に作動率が高かった(いずれも $P<0.01$)。また、多変量解析より腎機能障害は適切ショック作動に対する有意な独立因子(HR1.85, 95% CI 1.24-2.77, $p<0.05$)であった。ハイリスクの非虚血性拡張型心筋症患者において、腎機能障害は致死性心室性不整脈発現の独立した危険因子になることが示唆された。

A. 研究目的

腎機能障害は疫学調査からも死亡や心血管イベントの独立した危険因子であることが知られている。一方、突然死は心不全患者における死因の大きな原因のひとつである。近年、高リスクの心不全患者における植込み型除細動器(Implantable cardioverter-defibrillator:ICD)の生命予後改善効果が、これまでのいくつかの大規模臨床試験により証明されている。過去に腎機能低下がICD患者の死亡に係わる危険因子であること、さらに心室性不整脈に対するICDの作動と関連性を示す報告がなされている。しかし、これらの報告のほとんどは虚血性心疾患患者であり、虚血イベントが一部心室性不整脈の発現に関与している可能性がある。非虚血性心疾患患者においてもICD治療の有用性は証明されており、腎機能障害はその死亡に係わる危険因子であることは知られている。しかし、非虚血性心疾患患者において腎機能障害が致死性不整脈発現に関連するかわかっていない。

今回、非虚血性拡張型心筋症を有するICD患者における腎機能障害と致死性不整脈発現との関連性について検討した。

B. 研究方法

1990年から2008年12月までに、東京女子医科大学病院でICDを植え込まれた非虚血性拡張型心筋症患者274例

を対象とし、後ろ向きに検討を行った。

観察は、3~6ヶ月ごとにICD外来で2009年3月まで行った。評価項目は、ICDの適切作動、頻回作動(Electrical Storm; ES)、適切ショック作動及び死亡の有無とした。心室頻拍(VT)または心室細動(VF)に対するICDの抗頻拍ペーシングまたはショック作動を適切作動、心室性不整脈によらないICDの作動を不適切作動と定義した。抗頻拍ペーシングとショックを含むICD作動を要したVT/VFの発現は、ICDのinterrogateから得られたイベント記録とその心内波形記録から判断した。ESは、停止様式によらず、24時間以内に互いに連続しない3つ以上のVTまたはVFのイベントと定義した。

腎機能は推算糸球体濾過量(estimated glomerular filtration rate; eGFR)はModification of Diet in Renal Disease Studyの推算式から算出し、腎機能障害は植込み時の $e\text{GFR}<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ とした。

累積生存率あるいはICD作動率はKaplan-Meier法を用い、差の検定にはLog-rank法を用いた。P値は0.05未満を有意差の判定とした。ICDの適切作動の危険因子を評価するために、年齢、性別、左室駆出率 $<35\%$ 、二次予防、QRS幅 $>120\text{ms}$ 、 β 遮断薬、アミオダロン、 $e\text{GFR}<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ を含め、Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京女子医科大学倫理委員会から承認を得て行い、患者個人データは匿名化を行い収集した。

C. 研究結果

274例のうち96人(35%)が腎機能障害を有していた。腎機能障害群では腎機能正常群に比し年齢が高く(62±11歳 vs. 49±17歳, $P<0.01$)、BNP値が高く(387±379pg/mL vs. 246±302pg/mL, $P<0.01$)、ヘモグロビン値も低かった(12.5±2.1g/dl vs. 13.6±1.6g/dl, $P<0.01$)。平均観察期間27ヶ月間に、39例(14%)が死亡し、腎機能障害群で有意に生存率は低かった($P<0.01$)。累積4年生存率は腎機能障害群で68%、非腎機能障害群は78%であった($p=0.006$)。累積ICD適切作動率は腎機能障害群が非腎機能障害群に比し有意に高く($P=0.0001$)、二次予防植込み($P=0.003$)と一次予防植込み($P=0.046$)でも同じで、ESも有意に高かった($P=0.003$)。また、多変量解析では腎機能障害が適切作動に対する独立した因子(HR1.85, 95% CI 1.24-2.77, $p<0.05$)であった。

さらに、植込み後1年間にeGFRが15mL/min/m²以上増悪した患者例(74人)では、非増悪患者(133人)に比し適切作動のリスクが高かった(HR2.50, 95% CI 1.39-4.52, $p=0.002$)。

D. 考察

今回、腎機能障害(eGFR<60ml/min/1.73m²)患者では、一次予防あるいは二次予防に係わらずICD適切作動の頻度が高かった。従来危険因子である左室駆出率、QT間隔や心室外収縮数には腎機能障害群、非障害群で差がなく、独立した因子であった。さらに腎機能増悪も作動に関係していた。過去の研究からは腎機能障害において古典的な動脈硬化機序あるいは腎特異的機序が冠動脈病変を進行させることで虚血を介した不整脈イベントの言及がほとんどであった。しかし、腎機能障害と不整脈発現の直接的な関係について示された報告はほとんどない。腎機能障害を有する非虚血性心疾患患者では、交感神経活性やレニン・アンジオテンシン系の亢進、電解質異常、貧血、容量負荷や圧負荷が不整脈のトリガーとして働き、さらに心筋症における電氣的・構造的リモデリングが進行している可能性がある。

E. 結論

ハイリスクの非虚血性拡張型心筋症患者において、腎機能障害は致死性心室性不整脈発現の独立した危険因子になることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi A, Shiga T, Shoda M, et al. Impact of renal dysfunction on appropriate therapy in implantable cardioverter defibrillator patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *Europace* 11:1476-82, 2009
- 2) Takahashi A, Shiga T, Shoda M, et al. Gender difference in arrhythmic occurrence in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels* 25:150-4, 2010
- 3) Nakai K, Takahashi S, Suzuki A, et al. Novel algorithm for identifying T-wave current density alternans using synthesized 187-channel vector-projected body surface mapping. *Heart Vessels* 26:160-7, 2011

2. 学会発表

- 1) Saito T, Suzuki A, Shiga T, et al. Renal Dysfunction and the Incidence of Ventricular Arrhythmias in Heart Failure Patients Receiving Cardiac Resynchronization Therapy Defibrillator. (第76回日本循環器学会) *Circ J*, 76巻 Suppl. I, p2576, 2012.
- 3) Suzuki A, Shiga T, Yagishita D, et al. Persistent of Renal Dysfunction and Mortality in Heart Failure Patients with cardiac Resynchronization Therapy. (第76回日本循環器学会) *Circ J*, 76巻 Suppl. I, p1154, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

拡張型心筋症の病因 BAG3 変異は心筋サルコメアの整合性異常とアポトーシス亢進を来す

研究協力者：木村 彰方（東京医科歯科大学・難治疾患研究所）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓 MRI 検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

拡張型心筋症（DCM）の20-35%は遺伝性であり、遺伝子変異がその病因となる。これまでに20種類を超える原因遺伝子が報告されているが、それらの原因遺伝子に変異が見出されるのは家族性 DCM 患者の17%程度であり、多くの症例の原因は未知である。最近欧米人 DCM 家系に Z 帯構成要素である BAG3 の遺伝子異常が報告され、さらにそれらとは異なる BAG3 変異が筋原線維ミオパチー（MFМ）患者で報告されているが、BAG3 遺伝子異常による機能変化は明らかではない。

そこで本研究では、わが国の拡張型心筋症患者集団を対象とした BAG3 変異の検索を行うとともに、日本人患者に見出された変異に起因する機能異常を解明する。さらに、DCM 関連変異と MFМ 関連変異の機能異常の違いを証明する。

B. 研究方法

互いに血縁関係のない家族性 DCM 患者 72 名についてダイレクトシーケンス法を用いて BAG3 遺伝子変異を検索した。変異が検出された場合には、可能な限り家系解析を行うとともに、健常者集団 400 名における当該変異の有無を検討した。ついで、DCM 特異的と考えられる2種類の変異、健常者集団にも見出された稀な遺伝的多型、および MFМ 変異について、新生児ラット心筋細胞(NRC)、

H9c2 細胞（心筋細胞株）、C2C12 細胞（筋芽細胞株）への遺伝子導入を行い、サルコメア整合性異常、代謝ストレス時のアポトーシス亢進、ドキシソルピシン誘導性アポトーシス亢進、低血清による分化誘導時の筋管形成異常などを細胞生物学的に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究には、心筋症患者およびその血縁者を対象とした遺伝子解析研究が含まれるが、それらはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って遂行することとして、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を提出し、その承認を受けている（「拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（研究代表者：木村彰方）」および「肥大型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（研究代表者：木村彰方）」、いずれも平成21年4月9日付承認）。また、本研究に関連する組換え DNA 実験「難治性疾患の病因と病態形成機構の解明に関する研究（研究代表者：木村彰方、承認番号 2008-13、平成20年5月2日付承認）」および動物実験「循環器病・難治性疾患の発症・進展に関わる遺伝学的研究（研究代表者：木村彰方、承認番号 10040、平成21年9月3日付承認）」についても、それぞれ学内委員会による承認を受けている。

C. 研究結果

家族性 DCM 患者 72 名中の 2 名に BAG3 変異 (Arg218Trp および Leu462Pro) を見出した。いずれも進化的に保存されたアミノ酸の置換をとまなうこと、家系内で DCM と共分離すること、健常人には見出されなかったことから、DCM 関連変異であると考えられた。一方、それら以外にも多数の変異を見出したが、一般健常者にも検出されること、進化的に保存されたアミノ酸の置換でないことから、遺伝的多型であると考えられた (図 1)。

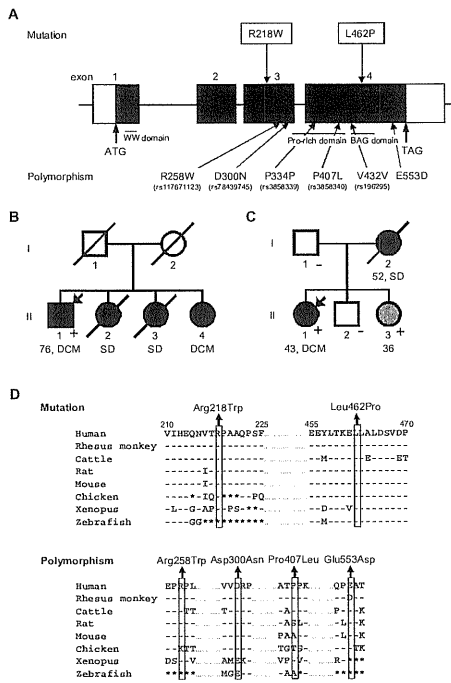


図 1 家族性 DCM に検出された BAG3 変異

検出された BAG3 変異による機能異常を解明するために、2 種の DCM 関連変異 (Arg218Trp, Leu462Pro)、既報の MFМ 関連変異 (Pro209Leu)、および健常者にも見出される遺伝的多型 (Arg258Trp) について、細胞生物学的に検討した。まず、NRCs に正常もしくは変異 BAG3 を導入したところ、DCM 関連変異 (Arg218Trp および Leu462Pro) はサルコメア整合性異常を来すことが判明した (図 2)。

このような変化は正常 BAG3、遺伝的多型 (Arg258Trp) および MFМ 関連変異 (Pro209Leu では生じないことから、DCM 関連変異に特徴的な機能異常であった。さらに、これらの NRCs を TUNEL 染色したところ、DCM 関連変異が導入された NRCs では TUNEL 陽性となり、アポトーシスが誘導されていた (図 3)。

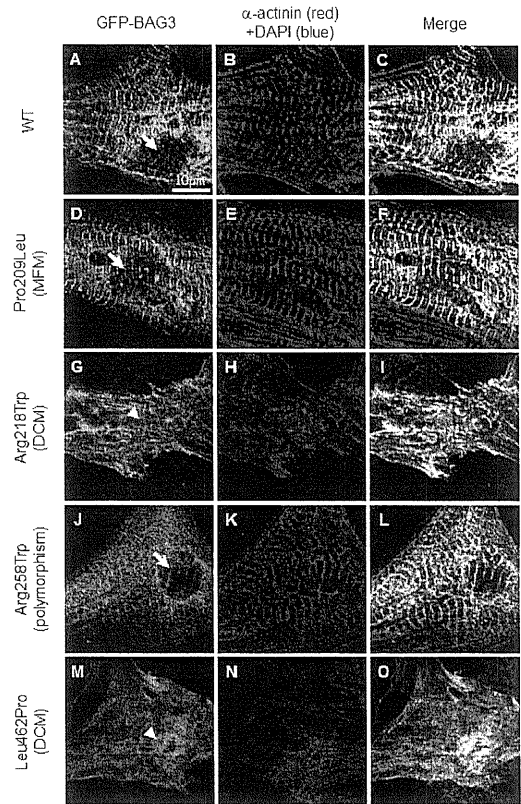


図 2 BAG3 変異による NRC のサルコメア整合性異常

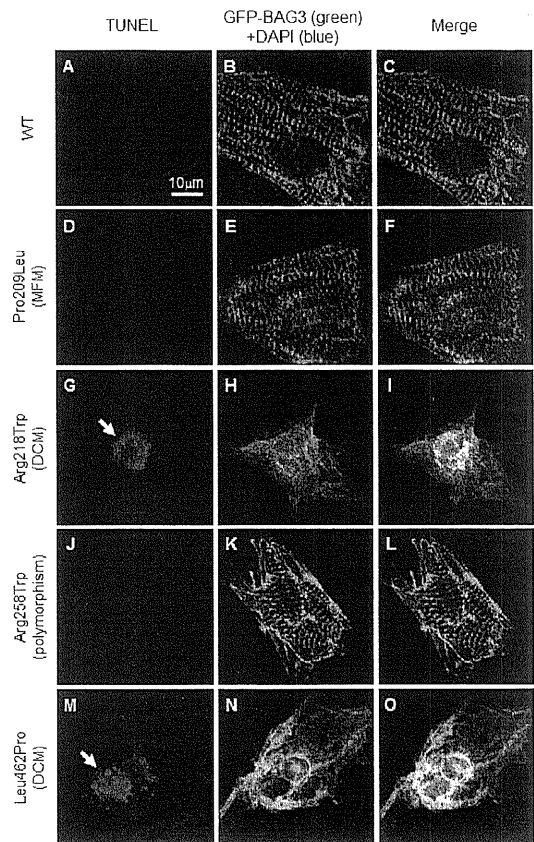


図 3 BAG3 変異による NRC のアポトーシス誘導

ついで、正常あるいは変異 BAG3 遺伝子を心筋由来の H9c2 細胞に導入し、安定な形質転換細胞を得た。これらの形質転換細胞をドキソルビシン存在下で培養したところ、DCM 変異を導入した H9c2 ではアポトーシスが亢進していたが、MFM 変異や遺伝的多型ではこのような現象は観察されなかった (図 4)。

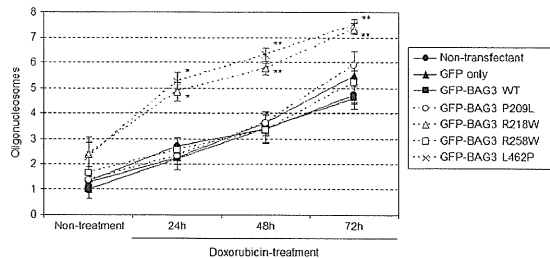


図 4 BAG3 遺伝子導入 H9c2 細胞はドキソルビシン感受性アポトーシスが亢進する

NRC および H9c2 などの心筋細胞では DCM 関連変異による機能異常が検出されたが、MFM 関連変異にはそのような機能変化がなかった。そこで、骨格筋由来の C2C12 細胞に正常もしくは変異 BAG3 遺伝子を導入し、低血清培養による筋管形成を観察したところ、MFM 変異が導入された H9c2 細胞に特異的に細胞融合の遅延が観察された (図 5)。

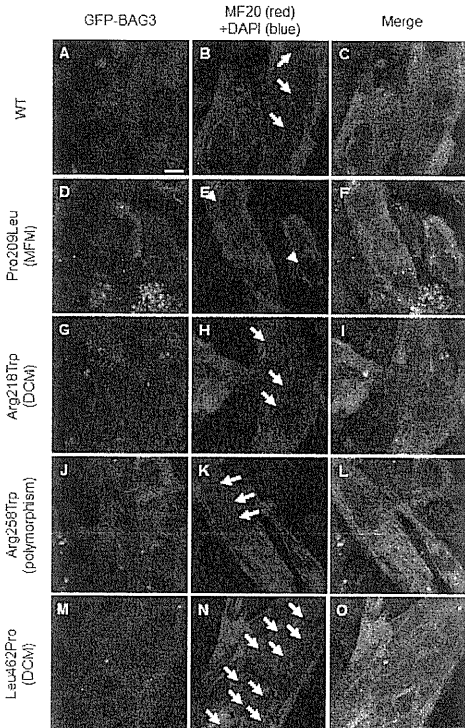


図 5 MFM 関連 BAG3 変異は C2C12 の分化 (細胞融合) を遅延する

D. 考察

家族性 DCM に見出された 2 種類のミスセンス変異は、いずれもが心筋細胞のサルコメア整合性を障害し、アポトーシス感受性を亢進することが判明した。BAG3 はクリスタリンや HSP70 と結合すること、アポトーシスを抑制することが知られていたが、本研究で心筋症関連変異がアポトーシス抑制機能を喪失することが判明した。我々は以前にクリスタリン変異が家族性 DCM の原因となることを報告しているが、これらの事実は、DCM の一部はアポトーシス異常に起因することを示す。一方、MFM 関連変異にはアポトーシス亢進作用は認められなかった。しかしながら、MFM 関連変異は骨格筋細胞の分化誘導を障害することが判明し、そのような効果は DCM 関連変異にはなかった。このことは、DCM 関連変異と MFM 関連変異は、まったく異なる機能変化を引き起こすことで、それぞれ異なる臓器 (心筋と骨格筋) の疾患病態をもたらすことを示す。

E. 結論

BAG3 変異は新たな DCM 原因遺伝子である

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kimura A: Contribution of genetic factors to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: the cause of dilated cardiomyopathy: genetic or acquired? (genetic-side). *Circ J* 75(7): 1756-1765, 2011.

2) Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Baba Y, Hirota T, Hayato K, Yamasaki N, Matsumura Y, Otsuka H, Arimura T, Kimura A, Doi YL: Genetic screening and double mutation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J* 75(11): 2654-2659, 2011.

3) Arimura T, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A: Dilated cardiomyopathy associated BAG3 mutations impair the Z-disc assembly and enhance the sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat* 32(12): 1481-1491, 2011.

4) Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida E, Ayusawa M, Nunoda S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T,

Ashizawa N, Kimura A: Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J* 76(2): 453-461, 2011.

5) Purevjav E, Arimura T, Augustin S, Huby A-C, Takagi K, Nunoda S, Kearney DL, Taylor MD, Terasaki F, Bos JM, Ommen SR, Shibata H, Takahashi M, Itoh-Satoh M, McKenna W, Murphy RT, Labeit S, Yamanaka Y, Machida N, Park JE, Alexander PMA, Weintraub RG, Kitaura Y, Ackerman MJ, Kimura A, Towbin JA: Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations. *Hum Mol Genet*, 21(9): 2039-2053, 2012.

2. 学会発表

1) Arimura T, Kimura A. Heart-specific Small Subunit of Myosin Light Chain Phosphatase Activates Rho-associated Kinase and Regulates Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1. 第75回日本循環器学会学術集会, 2011年8月3日, 横浜.

2) Arimura T, Ishikawa T, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair the sarcomere assembly and increase the sensitivity to apoptosis. The 14th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea, October 28, 2011.

3) 有村卓朗, 石川泰輔, 布田伸一, 河合祥雄, 木村彰方. BAG3変異は心筋細胞のZ帯整合性異常とアポトーシス感受性増強を介して拡張型心筋症を引き起こす. 第56回日本人類遺伝学会, 2011年11月10日, 幕張

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

—モデルマウスを用いた拡張型心筋症病態形成における RAA 系の意義の検討—

研究協力者：吉村 道博（東京慈恵会医科大学 循環器内科）

研究要旨 遺伝性拡張型心筋症の原因遺伝子の一つであるトロポニン T 欠失変異 ($\Delta K210$) を導入したノックインマウス (DCM マウス) を用いて直接レニン阻害薬 (DRI) の効果につき検討した。DRI 投与により、DCM マウスの心機能の改善及び心筋線維化の抑制効果とともに、予後改善効果も認めることが明らかとなった。細胞内 Ca 動態についての検討より、DCM マウスで生じていた細胞内 Ca 濃度変化の増大と収縮張力の低下が、DRI により一部改善することが明らかになった。RT-PCR による線維化及び炎症に関連する因子の検討では、線維化マーカーの一つである CTGF の mRNA 発現が DCM マウスで著明に上昇しており、DRI 投与により抑制されることが明らかとなり、また炎症性サイトカインでは、IL-6 が DCM マウスで上昇傾向にあり、DRI 投与により IL-6 発現が著明に抑制されていた。以上の結果より、DRI が DCM 治療において有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

拡張型心筋症 (DCM) は心不全の原因疾患として重要である。一方、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系が心不全の病態形成・維持に重要であることも周知の事実である。これまで RAA 系の阻害には、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) やアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) が用いられてきたが、最近 RAA 系を最上流で抑制する直接レニン阻害薬 (DRI) が使用可能となり、心不全治療における有用性も期待されている。本研究では、DCM に起因する心不全に対する DRI の有効性を検証する目的で、遺伝子変異により作成された DCM のモデルマウス (DCM マウス) を用いて DRI の効果につき検討を行った。

B. 研究方法

遺伝性拡張型心筋症の原因遺伝子の一つであるトロポニン T 欠失遺伝子変異 ($\Delta K210$) を、Cre-loxP システムを用いて正常トロポニン T と入れ替えたノックインマウスを用いて実験を行った。ヘテロ接合体同士を掛け合わせ、ホモ接合体を DCM マウスとして、wild type マウスをコントロールとして使用した。4 週齢までに尻尾生検より PCR により DCM マウスを同定し、浸透圧ポンプを用いて DRI (アリスキレン 50mg/kg/日) を投与した。心機能評価は、心エコー (SSD-5000, ALOKA Co. Ltd.) に

13-MHz トランスデューサー (UST-547) 適用して、M モードにて計測を行った。細胞内 Ca 動態評価には、左室乳頭筋標本に細胞内 Ca 感受性発光蛋白エクオリン法を適用し、細胞内 Ca 濃度と収縮張力を同時測定した。組織学的検討は、ホルマリン固定後の心臓標本から矢状断及び横断切片を作成し、H-E 染色による外観検索と Masson trichrome 染色による線維化評価を行った。線維化及び炎症に関与する因子についての検討には、RT-PCR による mRNA の定量評価を用いた。生存率の検討は、Kaplan-Meier 法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京慈恵会医科大学の動物実験ガイドラインに則り、実験動物委員会による承認を得た後に行った。

C. 研究結果

DCM マウスでは、8-10 週齢において、心重量の増大と心室腔の著明な拡大を認めた。心エコーによる心機能評価では、左室腔の拡大及び著明な左心機能低下が認められた。DRI 投与により、心拡大及び心機能の改善が認められた。細胞内 Ca 動態の検討では、DCM マウス心筋では細胞内 Ca 濃度変化の増大傾向と収縮張力の著明な低下を認め、収縮蛋白系 Ca 感受性の低下が認められた。DRI 投与はこ

の Ca 感受性低下を部分的に改善する可能性が示された。DCM マウス心筋では心筋組織線維化が増大しており、DRI 投与により線維化が抑制されていることが明らかとなった。線維化マーカーの一つである CTGF 発現は、DCM マウス心筋で著明に亢進しており、DRI 投与により抑制されていた。炎症性サイトカインの一つである IL-6 発現が DCM マウスで増加傾向にあり、DRI 使用により IL-6 発現が著明に抑制されることが明らかとなった。長期 DRI 投与の結果、DCM マウスの予後が著明に改善することも明らかとなった。

D. 考察

これまで心不全治療において、ACEI または ARB を用いた RAA 系抑制の有効性は確立している。最近使用可能となった DRI (アリスキレン) も、心不全治療薬としての可能性が期待されているが、その有効性に関する検討は未だ不十分である。今回の DCM マウスを用いた検討では、DRI による心臓リモデリング及び心機能改善効果に加えて予後改善効果も明らかとなり、DCM に起因する心不全治療に有用な可能性が示された。心機能改善には細胞内 Ca 動態の関与が、またリモデリング改善効果には炎症性サイトカインを介した線維化の抑制が関与していることが示唆された。予後改善効果のメカニズムについては今後の更なる検討が必要であるが、心機能及び線維化改善が関与している可能性は考えられた。

E. 結論

上記の結果より、DRI が心不全治療の新たな選択枝の一つとなる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi H, Kawai M, Komukai K, Ogawa T, Minai K, Nagoshi T, Ogawa K, Sekiyama H, Taniguchi I, Yoshimura M. Impact of chronic kidney disease on the severity of initially diagnosed coronary artery disease and the patient prognosis in the Japanese population. *Heart Vessels* 2011 Jul;26(4):370-8.
- 2) Nojiri A, Hongo K, Kawai M, Komukai K, Sakuma T, Taniguchi I, Yoshimura M. Scoring of late

gadolinium enhancement in cardiac magnetic resonance imaging can predict cardiac events in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol* 2011 Nov;58(3):253-60.

- 3) Ota M, Anan I, Morimoto S, Minai K, Komukai K, Ogawa T, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M. Severe lasting coronary spasm detected by multi-detector row computed tomography. *Int J Cardiol*. 2011 Dec 15;153(3):e62-4.

- 4) Komukai K, Minai K, Arase S, Ogawa T, Nakane T, Nagoshi T, Kayama Y, Abe Y, Morimoto S, Ogawa K, Fujii S, Sekiyama H, Date T, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. The impact of body mass index on the clinical outcomes of patients hospitalized with congestive heart failure. *Circ J*. 2012;76(1):145-51.

2. 学会発表

- 1) Nojiri A, Hongo K, Kawai M, Komukai K, Sakuma T, Taniguchi I, Yoshimura M. New Scoring Method of Delayed Enhancement in Cardiac Magnetic Resonance Imaging. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Yokohama, 2011, August.

- 2) Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Direct Renin Inhibition Improved Cardiac Remodeling and Survival in Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2011, Orland, 2011, November.

- 3) Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Compensatory Increase in the Ca²⁺ transient Is Important for Contractile Recovery of Dilated Cardiomyopathy in Mice. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, 2012, March.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

<本研究の協力者>本郷賢一、川井真、森本智

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性心筋症に関する調査研究

霊長類モデルを用いた拡張型心筋症のリスク層別化システム開発

研究協力者：今中 恭子

（三重大学大学院医学系研究科 修復再生病理学・三重大学マトリックスバイオロジー研究センター）

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として設立されて以来、疫学的・基礎的・臨床的研究を継続して行ってきた。分子生物学や遺伝学の進歩のもと、特発性心筋症に関する新たなエビデンスが蓄積されてきた一方、これらのエビデンスを臨床に還元できていないのが現状である。本研究班では、蓄積されたエビデンスを分析し、診療技術に還元することを大目標とする。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の設立に向けて、計画を進めた。具体的には、心臓MRI検査の心筋症診断への有用性、サルコイドーシスの診断、肥大型心筋症の我が国全体の遺伝子変異の状況などを検討する予定である。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者及び家族に対するセミナーを開催した。

A. 研究目的

心不全の病態における慢性炎症の関与が注目され、難治性心不全を示す拡張型心筋症患者には高頻度でいわゆる慢性心筋炎が含まれると考えられるが、正確に診断する方法は確立されていない。我々は、これまでに、活動性炎症部位に特異的に発現する細胞外マトリックス分子、テネイシンC(TN-C)に注目し、血中TN-Cが病変局所での発現を反映して上昇し、血中TN-Cの高い拡張型心筋症患者の長期予後が悪いことを明らかにした。さらに、TN-Cは心臓に特異的な分子ではないため、アイソトープ標識抗TN-C抗体を用いてラットモデルで心筋内炎症性病変の画像化に成功した。これらの知見に基づき、心不全患者の血中TN-Cを測定し、TN-Cの高いグループを高リスク群として画像診断を行い心筋内にTN-C陽性病変を認めた症例は、活動性炎症を伴う進行性の心筋疾患として免疫抑制療法など積極的治療の対象とするという診断システムが、適切な治療法を選択するために有効であると考えた。そこで、霊長類を用いて診断システムのシミュレーション実験を行い、有用性と実現可能性を検証する。

B. 研究方法

1) 1) インジウム標識抗TN-C抗体 Fab' (^{111}In -

抗TN-C-Fab')を用いた霊長類心筋炎症病変のSPECTによるイメージング 心筋症サルの抗TN-C抗体SPECTによるイメージングに先立ち、霊長類のイメージング条件の設定を行った。健常オスカニクイザル(8歳、体重5.3kg)を用い、開胸下で左前下行枝を完全結紮して心筋梗塞モデルを作成し4日目に、撮像5.5時間前に ^{111}In -抗TN-C-Fab' (76Mbcq), 0.5時間前に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (740MbcqMbcq)を静注し、PRISM2000XP(島津製作所)でDual SPECTを撮像した。撮像後、心臓を摘出して凍結切片を作成し、autoradiography (ARG)を行った。ARGに用いた切片を抗TN-Cを用いて免疫染色し、また近傍組織のホルマリン固定・パラフィン切片を作成した。

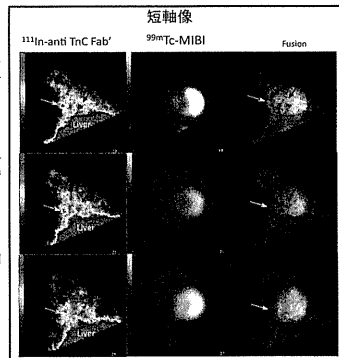
2) 心筋症サルコロニーを用いた診断シミュレーション 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで飼育されている自然発症心筋症家系を含むカニクイザルコロニーの110頭の血中TN-CをELISAによって測定し、高い個体について、BNP測定、心エコー図、心電図、胸部レントゲン、MRIを行い、拡張型心筋症と診断される個体を抽出する。インジウム標識抗テネイシンC抗体Fab'を用いたSPECTによる抗体イメージングを行った後、犠牲剖検し、心筋組織を病理組織学的、免疫組織学的に解析し比較した。

(倫理面への配慮)

本研究における手技、動物の管理は法律第105号「動物の愛護および管理に関する法律」、日本学術会議「動物実験の実施に関するガイドライン」を遵守し、「独立行政法人医薬基盤研究所動物実験規定」および日本霊長類学会動物実験指針の「サルを用いる実験遂行のための基本原則」に従った。

C. 研究結果

1) SPECTにより、左室^{99m}Tc-MIBI欠損領域および、右室に¹¹¹In-抗TN-C-Fab'の集積を認めた。ARG、免疫組織科学的解析と比較し、



投与した¹¹¹In-抗TN-C-Fab'の集積が、左室梗塞巣周囲の炎症(黒矢印)、および開胸術に伴う右室外膜・心筋炎(白矢印)に伴うTN-C発現に一致することが確認された。

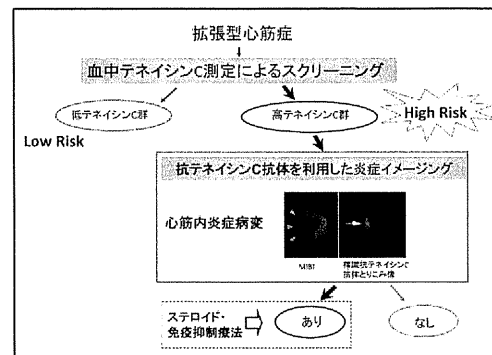
2) 血中TN-Cを2010年1月、2011年6月の2ポイント測定し、80ng/ml以上の個体を抽出し、心エコーで左室機能不全(EF42%)、両室拡張、MRIで、両室拡張、左室のびまん性の壁運動低下を認めたDCMサル(♂14.1歳)とコントロールサル(♂10.2歳)を1)の条件で

¹¹¹In-抗TN-C-Fab'と^{99m}Tc-MIBIのDual-SPECTを行った。コントロール、DCMとも¹¹¹In-抗TN-C-Fab'の肝臓への集積がめだつが、心臓内に¹¹¹In-抗TN-C-Fab'明らかな取り込みは見られず、^{99m}Tc-MIBIの欠損もみられなかった。in vivo planerでも¹¹¹In-抗TN-Cの取り込みに明らかな所見はみられなかったため、心臓を摘出してex vivo planer, ex vivo SPECT, ARGを行ったが、意味のある集積を認めなかった。剖検所見で、DCMサルでは両室、特に右室の強い拡張がみられたが、組織学的には明らかな変化を認めず、TN-Cの発現もみられなかった。

D. 考察

医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで飼育されているカニクイザルコロニーは、自然発症心筋症家系を含み、今回の研究を開始する前の剖検心を用いた検討により、病期によってはTN-C発現を伴う炎症性病変を伴

う個体が認められたが、コロニー全体の心臓病変は多彩で不均一であり、下の流れ図に示すような



TN-Cを用いた拡張型心筋症患者のリスク層別化と個別最適化治療法の選択システムの検証を行うのに適したモデルと考えた。

今回我々が術前にDCMと診断して対象に選んだサルは、血中TN-Cは高値を示したが、¹¹¹In-抗TN-C-Fab'を用いたSPECTで心臓内に活動性炎症性病変がないと診断され、剖検所見で炎症を伴う組織病変がないことが確認された。最近、心不全を全身性慢性炎症賭する考え方が注目され、実際、心不全患者に高サイトカイン血症を伴うことが多い。TN-Cは、心臓の炎症性病巣の間質細胞だけでなく、肝臓のIto細胞をはじめ肺、脾など全身臓器の間質細胞が産生能力を持ち、一般に、炎症性サイトカインなど、炎症に関わる分子の多くは産生を促進する。今回のDCM個体は、心不全に伴う全身性炎症の結果、高TN-C血症を示したと考えられ、高TN-Cを示す心不全群のうち、ステロイドや免疫抑制療法の対象となる心サルコイドーシスや慢性心筋炎とは異なる病態と診断できた。また、鑑別にはTN-C抗体を使った画像診断が必須であり、今回、臨床に近い条件で霊長類の病変画像化に成功したことは、実現可能性を強く支持すると思われる。

E. 結論

TN-Cを指標とした心不全の診断と治療方針決定システムの有用性と実現可能性を霊長類モデルを用いて検証した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto H, Imanaka-Yoshida K. Matricellular proteins: New molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc Ther.* 2011 (Epub ahead)