

201128191A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症に対する

医師主導型治験へのアプローチ

平成 23 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 平野賢一

平成 24 年 (2012 年) 3 月

## 目 次

I.	平成 23 年度研究班名簿	3
II.	総括研究報告	
	原発性中性脂肪蓄積心筋血管症に対する医師主導型治験へのアプローチ	7
	平野 賢一	
III.	分担研究報告	
1.	池田 善彦	
	中性脂肪蓄積型動脈硬化における平滑筋細胞の表現型に関する検討	13
2.	石田 良雄	
	中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の核医学診断に関する研究	15
3.	井田 博幸	
	ポンペ病モデルマウス由来の iPS 細胞の作製とその性状に関する研究	17
4.	裏出 良博	
	中性脂肪蓄積心筋血管症モデル動物に対する中鎖脂肪酸療法の効果について	19
5.	木原 章雄	
	細胞内中鎖脂肪酸代謝の解析	21
6.	木村 正	
	原発性中性脂肪蓄積心筋血管症モデル動物 (ATGL 欠損マウス) における 男性生殖能に関する検討	23
7.	小谷 順一	
	中性脂肪蓄積心筋血管症における侵襲的画像診断	25
8.	隅 寿恵	
	ATGL 遺伝子変異を伴う中性脂肪蓄積心筋血管症 2 症例における ミオパチー症状の経過	27
9.	瀬藤 光利	
	心筋及び冠動脈における脂質局在の可視化	29
10.	千葉 俊明	
	患者 iPS 細胞を用いた血管平滑筋細胞への分化誘導法および 診断法の確立に関する研究	31
11.	千葉 仁志	
	TGCV 患者を血球計数装置で検出する方法及び中鎖脂肪酸食の 血中脂肪酸分画に及ぼす影響の研究	33

1 2. 戸田 達史	
中性脂肪蓄積心筋血管症の分子遺伝学的解析	35
1 3. 朝長 毅	
プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた 中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索	36
1 4. 内藤 博昭	
TGCV 診断法の開発 -CT による冠動脈壁の脂肪蓄積評価法の開発-	42
1 5. 中谷 大作	
中性脂肪蓄積心筋血管症に起因する心不全に対して心臓移植を施行後の エベロリムス投与により動脈硬化の退縮を認めた 1 症例	44
1 6. 中村 浩士	
中性脂肪蓄積心筋血管症に関する調査研究心筋生検組織における ATGL 発現の検討	47
1 7. 福畠 教偉	
移植心における中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の関与に関する研究	49
1 8. 安井 洋子	
遠隔地に居住する A T G L 欠損症への在宅中の M C T 食介入	51
IV. 臨床試験プロトコル	53
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	109

〔 I 〕

平成 23 年度研究班名簿

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症に対する医師主導型治験へのアプローチ研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	平野 賢一	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	助教
研 究 分 担 者	池田 善彦	独立行政法人国立循環器病研究センター 臨床検査部病理	医長
	石田 良雄	関西労災病院 核医学診断部・循環器内科 (兼)	部長
	井田 博幸	東京慈恵会医科大学 小児科学講座	教授
	裏出 良博	(財)大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部門	研究部長
	木原 章雄	北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室	教授
	木村 正	大阪大学大学院医学系研究 産科学婦人科学講座	教授
	小谷 順一	独立行政法人国立循環器病研究センター 心臓血管内科	医長
	隅 寿恵	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座神経内科学	助教
	瀬藤 光利	浜松医科大学医学部 解剖学講座 細胞生物学分野	教授
	千葉 俊明	琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学講座	准教授
	千葉 仁志	北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学講座	教授
	戸田 達史	神戸大学大学院 医学研究科 神経内科学/分子脳科学	教授
	朝長 毅	独立行政法人医薬基盤研究所 プロテオームリサーチセンター	プロジェクトリーダー
	内藤 博昭	独立行政法人国立循環器病研究センター	病院長
	中谷 大作	大阪大学医学部附属病院 ハートセンター	特任助教 (常任)
	中村 浩士	山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学	准教授
福嶋 教偉	大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学	准教授	
安井 洋子	大阪大学医学部附属病院 栄養管理室	室長	
研 究 協 力 者	和泉 徹	北里大学医学部 循環器内科学	教授
	市田 露子	富山大学・医学薬学研究部小児科	准教授
	今泉 勉	久留米大学医学部 内科学講座心臓血管内科部門	主任教授
	今中 恭子	三重大学大学院医学系研究科 修復再生病理学	准教授
	植田 初江	独立行政法人国立循環器病研究センター 臨床検査部病理	医長

大熊 彩	埼玉医科大学 神経内科・脳卒中内科	助教
大塚 哲生	国保 脇野澤診療所	所長
奥村 謙	弘前大学 循環器・呼吸器・腎臓内科	教授
小川 雅也	盛岡友愛病院神経内科	部長
加藤 誠也	琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学講座	教授
北風 政史	独立行政法人国立循環器病研究センター	部長
小林 邦久	福岡大学筑紫病院 内分泌・糖尿病内科	教授
小室 一成	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学	教授
斎藤 能彦	奈良県立医科大学 第一内科	教授
財満 信宏	近畿大学農学部 応用生命化学科応用細胞生物学研究室	講師
澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学	教授
澤井 高志	岩手医科大学 医学部 病理学 先進機能病理学分野	教授
島本 和明	札幌医科大学	学長
鈴木 朗	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
砂川 賢二	九州大学大学院医学研究院 循環器内科	教授
竹中 優	神戸女子大学管理栄養士養成課程	教授
筒井 裕之	北海道大学大学院医学系研究科 循環病態内科学	教授
寺崎 文生	大阪医科大学医学部 内科学III	診療准教授
土井 健史	大阪大学大学院薬学系研究科	教授
土居 義典	高知大学教育研究部医療学系医学部門 老年病・循環器・神経内科学	教授
道勇 学	愛知医科大学 神経内科学	教授
富山 憲幸	大阪大学大学院医学系研究科 放射線医学	教授
永井 良三	東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻 循環器内科	教授
長坂 博範	市立宝塚病院 小児科	部長
長澤 康行	大阪大学大学院医学系研究科 腎臓内科	助教
西野 一三	国立精神・神経センター神経研究所、疾病研究第一部	部長

	橋本千佳子	彩都友絃会病院 健診センター	看護師長
	橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科基礎工学部生体工学領域	准教授
	布田 伸一	東京女子医科大学東医療センター 内科	准教授
	花田 裕典	独立行政法人 国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター	研究員
	濱田 星紀	仁泉会 MI クリニック	院長
	東 将浩	独立行政法人国立循環器病研究センター 放射線診療部	医長
	早坂 光司	北海道大学病院検査・輸血部	主任
	廣江 道昭	国立国際医療研究センター病院 循環器内科学	医師
	堀 正二	大阪府立成人病センター	総長
	前村 浩二	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 循環病態制御内科学	教授
	間賀田泰寛	浜松医科大学 光量子医学研究センター	教授
	松野 一彦	北海道大学病院検査・輸血部	部長
	松崎 益徳	山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学	教授
	宮田 茂樹	独立行政法人国立循環器病研究センター 輸血部	医長
	村上 千恵	青森県立中央病院 神経内科	副部長
	室原 豊明	名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学	教授
	山岸 正和	金沢大学医薬保健研究域医学系循環医科学専攻・臓器機能制御学	教授
	山口 知是	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
	山田 直明	独立行政法人国立循環器病研究センター放射線診療部	医長
	善積 透	川崎病院 診療部 循環器科	技師長
	渡辺 達夫	静岡県立大学 食品栄養科学部	教授
	和田 孝男	大阪大学医学部附属病院 栄養管理室	料理長
事務局	野村 千秋	大阪大学バイオ関連多目的研究施設 平野研究室 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-3 TEL 06-6872-8215 FAX 06-6872-8219 e-mail office@cnt-osaka.com	秘書

〔Ⅱ〕

総括研究報告



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症に対する医師主導型治験へのアプローチ

研究代表者 平野 賢一 大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学 助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)は、研究代表者が我が国の心臓移植症例より見出した新規疾患単位である (Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008)。TGCV は、心筋及び冠状動脈硬化巣にTGが蓄積することによって重症心血管病を来す難病である。2009年からのTGCV研究班の活動の結果、本症は原発性と続発性に分類される。今のところ明らかな原発性TGCVの原因は、細胞内TG分解の必須酵素であるadipose triglyceride lipase (ATGL)の遺伝子欠損である。本研究では一日でも早くこの難病を克服するため、TGCVの診断法及び中鎖脂肪酸 (Medium chain fatty acids, MCFA)を用いた特異的栄養療法の開発を行った。その結果、本症の診断法として、CTなどの既存の画像診断法の他、質量顕微鏡や末梢血多核白血球の空胞化のスクリーニング法が有用であることなどを見出した。さらに、マウスモデルを用いてMCFA療法の有用性について確認しえた (proof of concept)ので、本治療法の有効性安全性を検証するための臨床試験プロトコールを作成した。

研究分担者氏名・所属機関及び所属機関における職名

瀬藤 光利	浜松医科大学 分子解剖学 教授
池田 善彦	国立循環器病研究センター 臨床検査部病理 医長
小谷 順一	国立循環器病研究センター 心臓血管内科 医長
内藤 博昭	国立循環器病研究センター 病院長
中村 浩士	山口大学医学部 地域医療推進学講座 准教授
石田 良雄	関西労災病院 核医学診断部 部長
中谷 大作	大阪大学医学部附属病院 ハートセンター 特任助教
井田 博幸	東京慈恵会医科大学 小児科学講座 教授
安井 洋子	大阪大学医学部附属病院 栄養管理室 室長
木原 章雄	北海道大学大学院 薬学研究院 創薬科学部門 教授
裏出 良博	(財)大阪バイオサイエンス研究所 第二研究部 部長
千葉 仁志	北海道大学大学院 保健科学研究院 保健科学部門 教授
隅 寿恵	大阪大学大学院医学系研究科 情報統合医学講座 助教
戸田 達史	神戸大学大学院 医学研究科 生理学・細胞生物学講座 教授
朝長 毅	独立行政法人 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト プロジェクトリーダー
福嶋 教偉	大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 准教授
千葉 俊明	琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学講座 准教授
木村 正	大阪大学大学院医学系研究科 産科学婦人科学教室 教授

## A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy, TGCV)は、2008年、研究代表者らが我が国の心臓移植症例より見出した新規疾患単位である。中性脂肪が心筋、冠状動脈硬化巣などに蓄積する結果、重症心不全、不整脈などを来す難病である (Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008)。原発性 TGCV の原因は、細胞内中性脂肪分解の必須酵素である adipose triglyceride lipase (ATGL)の遺伝的欠損である。本研究は、1) 診断法開発、2) 本症に対して研究代表者らが開発した中鎖脂肪酸 (Medium chain fatty acid, MCFA) を含有する栄養療法が有効であるか否かを検討する医師主導型治験のプロトコール作成、3) TGCV のモデル動物である ATGL ノックアウト(KO)マウスに対して MCFA 療法の proof of concept を得る。4) MCFA の細胞内動態について明らかにする。5) 原発性 TGCV (ATGL 欠損症)の症例の情報収集する、ことを目的とする

## B. 研究方法

### 1) TGCV 診断法の開発

#### i) 質量顕微鏡

分担研究者である瀬藤らが開発した質量顕微鏡を用いて、TGCV 症例由来の組織 (剖検心や生検標本) を用いて、質量顕微鏡がその診断に有用であるか否かについて検討した。

#### ii) 末梢血多核白血球を用いたスクリーニング法

原発性 TGCV では、心症状の発症以前から末梢血多核白血球の空胞化が認められる。これまでは、末梢血塗抹標本が利用されてきたが、希少疾患である本症の診断効率を高めるため、そのスクリーニング法を開発する。

#### iii) バイオマーカー探索

本症のスクリーニング、治療法効果判定のためのバイオマーカーを探索した。症例由来皮膚線維芽細胞を用いて、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行った。

#### iv) CT、MRI、核医学イメージングを用いた解析

症例及び剖検心臓、ATGL KO マウスを用いて、画像診断法による検討を行い、臨床試験プロトコールの評価項目を決定する。

### 2) 特異的栄養療法のレジメ作成

他施設や遠隔地に居住する症例にも対応するため、試験の feasibility を高めるため標準化した特別食のレジメを作成する。

### 3) プロトコール作成

臨床研究情報センター(神戸)と協力して、医師主導型治験のためのプロトコールを作成する。

### 4) ATGL KO マウスによる MCT 食事療法の効果についての検討

ATGL KO マウスをオーストリア グラーツ大学の Zechner 教授より、得て、以下の実験を行った。離乳直後から MCFA 投与群、コントロール食群の2群に分け、ATGL KO マウスの寿命、心臓への脂肪の蓄積、心機能について、検討した。

### 5) 細胞内中鎖脂肪酸代謝について

症例由来皮膚線維芽細胞を用いて、MCFA の細胞内代謝について検討した。また、合わせて peroxisome-proliferated activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) リガンドの細胞内 TG 含量に与える効果についても検討した。

### 6) 原発性 TGCV 症例、モデル動物における遺伝子変化と MCFA 投与による影響について

原発性 TGCV 2例 (1例は、心臓移植直前50日間、食事療法を実施。もう1例は、非実施)、及び ATGL KO マウスより得た心臓組織における TG 代謝関連遺伝子群について検討した。

### 7) MCFA の生殖能に与える影響

本症においては、長期にわたる MCFA が必要とされる可能性が高いため、その生殖能に与える影響をモデルマウスを用いて検討した。

### 8) 症例の情報収集

日本心不全学会など関連学会、調査研究分野、特発性心筋症研究班、地域医療 (遠隔地医療) と連携して症例の情報を収集する。

### 9) 症例居住地域における住民健診の実施

これまでの調査で、ATGL 遺伝子の同一変異をもつ原発性 TGCV 2例が居住する地域において、住民健診を行った。実施に際しては、行政の協力を得る。健診項目は、問診、採血、心血管機能に関する検査 (心電図、心臓超音波検査、脈波伝搬速度など)、尿検査などとした。

### (倫理面への配慮)

本研究に関与するすべてのものは、「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2008年ソウル修正版)及び「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日改訂版)に従う。

## C. 研究結果

### 1) 原発性 TGCV の診断法開発

#### i) 質量顕微鏡

症例由来心筋生検サンプル、剖検心のホルマリン固定標本、新鮮凍結標本を用いて、TG 蓄積を可視化しえた。本症において、TGは心臓においては心筋細胞に、冠動脈においては血管平滑筋細胞に分布していた。

#### ii) 末梢血多核白血球の空胞化

シスメックス社製、HK-5000 を用いて、解析したところパラメータ CCCが、原発性 TGCV3症例において、ヘテロ保因者9名、正常者41名に比較して、有意に高値を示した。本検査の所要時間は、2分程度であり、スクリーニング法として有用であると考えられる。

#### iii) バイオマーカ探索

症例由来皮膚線維芽細胞を用いたトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析の結果、フィラグリンの過剰発現を見出した。フィラグリンは、上皮に存在する分子で、末梢血中にも存在することが知られており、本症の診断マーカー、治療評価マーカーとなる可能性がある。

#### iv) CT、MRI、核医学イメージングを用いた解析

心筋における TG 蓄積に、CTが有用であることが明らかとなった。また、核医学イメージング法としては、長鎖脂肪酸の放射性アナログである BMIPPを用いたシンチグラムが本症の脂肪酸代謝の評価に有用であることが明らかとなった。

### 2) 特異的栄養療法のレジメ作成

MCFA を用いた食事療法のレジメを作成し、臨床試験プロトコルの添付資料とした。また、遠隔地に居住する症例に対応するため、MCFA を含むクッキーやヨーグルトを開発して、それを用いて治療継続を行った。MCT療法を外来レベルで2年間、継続している症例では、その心機能は、2年間、維持していた。

### 3) 臨床試験プロトコルの作成

臨床研究情報センターと協力して、「原発性 TGCV に対する特異的栄養療法の有効性、安全性に関する介入前後比較試験」のプロトコル作成を行った。概略は、以下：

- i) 症例数 6例
- ii) 2週間の入院
- iii) 単群、対照群非設定介入前後比較試験、非盲検
- iv) 評価項目  
有効性評価項目：栄養療法による脂肪酸代

謝改善効果、血管内皮機能改善効果など  
安全性評価項目：本治療において発生したすべての有害事象

### 4) ATGL KO マウスに対する MCFA 療法の効果について

MCFA 食事療法により、ATGL KO マウスの寿命が有意に延長した。心筋細胞への脂肪の蓄積が抑制され、CTスキャンにて検討した左心室の収縮能も改善が認められた。

また、ヒトとは異なり、雄性の ATGLKO マウスでは精子の運動性がなく、不妊であったが、MCFA 投与により、精子運動性や奇形性の回復が確認できた。以上より、原発性 TGCV モデル動物を用いて、MCT 食事療法の臨床試験実施に向け、proof of concept が得られたと考える。

### 5) MCFA の細胞内代謝について

症例由来皮膚線維芽細胞において、MCFA は、細胞内 TG 含量を低下させた。一方、放射性ラベルされた MCFA は、細胞内で長鎖脂肪酸に伸長されること、その責任分子は、既存の伸長酵素群ではなく、脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase, FAS) であることが明らかとなった。また、最近、マウスモデルにおいてその有用性が示唆されている PPAR $\alpha$ リガンドについて細胞内 TG 蓄積効果を検討したが、有意な変化を認めなかった。

### 6) ATGL 欠損に起因する遺伝子発現変化の種差について

ヒト欠損症心臓及び症例由来皮膚線維芽細胞において、脂肪細胞分化の key player である PPAR $\gamma$ が過剰発現していること、関連転写因子である PPAR $\alpha$ も過剰発現していることを見出した。

一方、ATGL 欠損マウスでは、全く逆に PPAR $\gamma$ 、PPAR $\alpha$ とも発現が著明に低下していた。また、MCFA の伸長に関わるものが明らかとなった FAS は、ヒト欠損症では低下し、マウスモデルでは増加していた。

### 6) 原発性 TGCV 症例、モデル動物における遺伝子変化と MCFA 投与による影響について

MCFA 療法を行った TGCV 症例では、PPAR $\gamma$ 及びその関連遺伝子 (CD36 や FABP4) の発現抑制が観察された。一方、マウスモデルでは、確認しえなかった。

MCFA の伸長に関わる FAS は、MCFA 療法を行った TGCV 症例において、治療後も抑制されていることを確認した。

### 7) 症例の情報収集

日本心不全学会、日本小児心筋疾患学会、心筋生検研究会、日本神経学会など学会、厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特発性心筋症研究班(北風班)に協力を要請した。

また、11月26日に開催した第1回 TGCV 国際シンポジウムにおいて外国人研究者から情報を収集した結果、国内外で25例の原発性 TGCV 症例を把握した。

#### 8) ATGL 遺伝子変異の集積する地域集団の発見

中村、中谷、平野らは、青森県むつ市XX地区において、H23.8.13-15 住民健診を実施し、53名の住民の方の参加を得た。戸田らによる遺伝子解析の結果、ホモ接合体1例、ヘテロ接合体9例を把握した。ヘテロ接合体については、詳細な解析を実施中である。今後、調査を継続する予定。この地区で同定された変異は、大阪地区の2,000名の住民においては、全く検出されなかった(H22年度 分担研究者 花田ら)。検尿検査の結果、本地区は検尿異常の頻度が極めて高いことも明らかになった。詳細な分析を実施中である。

#### 9) 患者支援体制の構築と患者会設立

本患者の支援として構築した体制

- ・ むつ市役所 市長、福祉課。同 脇野沢庁舎福祉課
- ・ 国保脇野沢診療所 大塚哲生医師(研究協力者)らによる訪問医療
- ・ 青森県立中央病院 神経内科 村上千恵子医師(研究協力者)
- ・ 弘前大学 循環器内科 奥村 謙 教授(研究協力者)による心臓発作等の際のドクターヘリ搬送体制

患者会については、年度末をめどに設立を目指し、準備中である。

#### D. 考察

##### 1) 開発した診断法の感受性、特異性について

i) 質量顕微鏡は、TG 自身を分子量から同定できるためその特異度は高い。今後は、診断法として実用化していくため、定量性について検討していく。

ii) 多核白血球の空胞化のスクリーニング法については、同様な空胞化を来すことが知られている Chanarin-Dorfmann 症候群などの末梢血なども検討していく。また、既存の機器では臨床検査技師がデータを見ることが容易でないため、プログラム改良などをシスメックス社と協力していく。

iii) フィラグリンについては、末梢血を用いた測定法を開発していく。

##### 2) TG 及び MCFA 代謝の種差について

ヒト欠損症と ATGLKO マウスの解析により、原因遺伝子が同一でも二次的に生じる遺伝子変化は、全く異なっていることが明らかとなった。我々の検討ではその種差の分子メカニズムは明らかではないが、ヒトの遺伝子疾患の治療法開発においては、種差についても十分検討する必要がある。

##### 3) MCFA の細胞内代謝と MCFA 療法について

MCFA が症例由来皮膚線維芽細胞中で、伸長されること、その責任分子が FAS であることを見出した。さらに、FAS がマウスモデルにおいては、過剰発現している一方で、ヒト欠損症ではその発現が低下していることを見出した。しかしながら、本治療法を実用化していくにあたり、MCFA の細胞内代謝については、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

##### 4) 国際登録システムの必要性

難治性疾患克服研究事業 TGCV 研究班と、最近立ち上げた TGCV 研究会の共催として実施した第1回の TGCV シンポジウムにおいて、以下のコンセンサスを得た。

「本症は、極めて希少であり、国際登録システムを構築して、その情報を一元化、共有し、その診断法、治療法を開発して、その克服に努める必要がある。」

#### E. 結論

原発性 TGCV を一日でも早く克服するため、本症に対する診断法、治療法を開発し、臨床試験プロトコルを作成するとともに、その実用化に向けて準備を行った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

平野賢一 長坂博範  
脂質異常症と脂質蓄積症  
SURGERY FRONTIER 2012, 19(1);23-28

平野賢一  
中性脂肪蓄積心筋血管症  
呼吸と循環 2011,59(11);1115-1119

平野賢一  
中性脂肪蓄積心筋血管症  
Current Therapy 2011,29(10);78

平野賢一  
中性脂肪蓄積心筋血管症  
病理と臨床 2011, 29: 254-256

平野賢一  
中性脂肪蓄積心筋血管症  
総合臨床 2010, 59: 1729-1732.

平野賢一  
Triglyceride deposit cardiomyoavascuopathy.  
The Lipid. 2011, 22(2), 94-97.

Naganuma, T., Sato, Y., Sassa, T., Ohno, Y., and Kihara, A.  
Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7.  
FEBS Lett., 585; 3337-41, 2011

Yamagata, M., Obara, K., and Kihara, A.  
Sphingolipid synthesis is involved in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410; 786-91, 2011

大野祐介, 木原章雄  
極長鎖脂肪酸伸長とセラミド合成「ここまできたセラミド研究最前線 セラミド -基礎と応用-」  
(セラミド研究会編, 食品化学新聞社) 43-49, 2011

## 2. 学会発表

第 108 回日本内科学会講演会 2011.04(東京)  
平野賢一  
「中性脂肪蓄積心筋血管症の臨床的特徴」

第 15 回日本心不全学会 2011.10(鹿児島)  
平野賢一  
シンポジウム 10「二次性心筋症による心不全」

第 20 回日本小児心筋疾患学会 2011.11(東京)  
平野賢一  
「中性脂肪蓄積心筋血管症調査: 日本小児心筋疾患学会の先生方へのお願い」

第 33 回心筋生検研究会 2011.11(京都)  
仲西貴也、松本裕文、池田善彦、植田初江、平野賢一、加藤誠也  
ワークショップ「剖検心組織における ATGL (adipose tissue triglyceride lipase) の発現について」

小出優史、河野浩章、阿部邦子、津田暢夫、前村浩二、平野賢一  
ワークショップ「心筋細胞内脂肪蓄積の家族内発症例」

平野賢一  
特別講演(Keynote Lecture)「History of Human Heart and Triglycerides」

The first international symposium on triglyceride deposit cardiomyoavascuopathy and neutral lipid storage disease 2011.11

Ken-ichi Hirano  
「Triglyceride deposit cardiomyoavascuopathy -A novel clinical entity-」

K.Kobayashi, T.Inoue, T.Inoguchi, K.Hirano, R.Takayanagi  
「RNA Interference-directed Knockdown of Adipose Triglyceride Lipase Enhanced TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 Expression in Human Aortic Endothelial Cells via PKC-dependent activation of NF- $\kappa$ B」

Y.koide, H.Kawano, M.Takeno, K.Abe, N.Tsuda, K.Hirano, K.Maemura  
ポスター「Siblings with Lipid Deposition in Cardiomyocytes」

Y.Ikeda, K.Hirano, N.Zaima, N.Imai, T.Matsuyama, M.Setou, I.Komuro, Y.Sawa, Japan TGCV Study Group, H.Ueda  
ポスター「Characteristic feature with infiltration of less intimal macrophage foam cells of arteriosclerotic lesions in triglyceride deposit cardiomyoavascuopathy (TGCV)」

S.Chiba, K.Hirano, S.Kato  
ポスター「Establishment of the Induction of Vascular Smooth Muscle Cells from the Patient-specific iPS Cells and the fibroblasts」

N.Kawasaki, K.Hirano, Y.Hara, J.Adachi, T.Shiromizu, T.Tomonaga  
ポスター「Biomarker Discovery for Triglyceride Deposit Cardiomyoavascuopathy using Proteome and Transcriptome analysis」

N.Zaima, Y.Ikeda, M.mano, H.Ueda, M.Setou, K.Hirano  
「Triglyceride Deposit Cardiomyoavascuopathy

Associated with Type 2 Diabetes Mellitus]

T.Nakanishi, H.Matsumoto, S.Chiba, Y.Ikeda, H.Ueda, N.Zaima, K.Hirano, S.Kato

ポスター「Relationship between lipid deposition and ATGL expression in human myocardial tissue: A study with autopsy cases」

Y.Yasui, K.Hirano, Y.Ikeda, N.Zaima, Y.Konishi, I.Komuro, N.Fukushima, M.Setou, M.Hori

ポスター「A Dietary Therapy with Medium Chain Triglyceride for Triglyceride Deposit Cardiomyo-vasculopathy」

A. Suzuki, S.Yamaguchi, Y.Ikeda, H.Nakamura, N.Zaima, T.Kimura, U.Urade, K.Hirano

ポスター「Effect of Medium Chain Triglyceride on Adipose Triglyceride Lipase Knockout Mice」

第9回日本機能性食品医用学会 2011.12(大阪)  
平野賢一、財満信宏、池田善彦、眞能正幸、瀬藤光利

「糖尿病性心血管病の新たな病態-中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardio-myovascuopathy)」

第 100 回日本病理学会総会ワークショップ  
2011.04

池田善彦

「中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovascuopathy, TGCV)におけるTG蓄積型動脈硬化」

第 57 回日本病理学会秋期特別総会 2011.11

池田善彦

「Morphological characteristics in the working myocardium in triglyceride deposit cardio-myovascuopathy (TGCV) mimicking HCM and ARVC」

第 53 回日本脂質生化学会 2011.5.

木原章雄

「スフィンゴシン1-リン酸代謝経路の解明:シェーグレン・ラルソン症候群原因遺伝子 ALDH3A2 の関与」

The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II] 2011.6.

Kihara, A.

「The Sjögren-Larsson syndrome-causative gene ALDH3A2 is involved in the sphingosine 1-phosphate-metabolic pathway.」

52nd International Conference on the Bioscience of Lipids 2011.9.

Kihara, A.

「The fatty aldehyde dehydrogenase ALDH3A2 is involved in the sphingosine 1-phosphate metabolic pathway.」

日本ヒトプロテオーム機構第9回大会 2011.07

川崎直子、平野賢一、原康洋、足立淳、朝長毅  
「プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索」

第 34 回 日本分子生物学会 2011.12

川崎直子、平野賢一、原康洋、足立淳、朝長毅  
「プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索」

#### 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

〔Ⅲ〕

分担研究報告

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

中性脂肪蓄積型動脈硬化における平滑筋細胞の表現型に関する検討

研究分担者 池田 善彦 国立循環器病研究センター 臨床病理科 医長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)の冠動脈病変では、中膜の肥厚に加え内膜において泡沫化した平滑筋細胞の増生が認められる。これら泡沫化平滑筋細胞の表現型について病理組織学的検討を行った結果、macrophage scavenger receptor 陰性、CD36 陰性に対し、SM22 $\alpha$  陽性 SMemb 陽性、myosin heavy chain 陽性を示した。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症（triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV）は adipose triglyceride lipase（ATGL）遺伝子変異を原因の一つとする心疾患と考えられる。高度な冠動脈病変では求心性内膜及び中膜肥厚を呈し、泡沫化した平滑筋細胞の増生を特徴とする。

B. 研究方法

10%中性緩衝ホルマリンにて固定されたTGCVの剖検心について、冠動脈を採取し、それらのパラフィン切片標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、エラスチカ・ワンギーソン染色、オイルレッドO染色とともに、macrophage scavenger receptor(MSR)、CD36、SM22 $\alpha$ 、SMemb、myosin heavy chain(MHC)、 $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA)、CD68に対する免疫染色を施行し、対照として心臓移植時に摘出された心臓の冠動脈と比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は病理組織学的解析であり、遺伝子解析は施行していない。摘出心については研究実施前に実施計画に関して大阪大学の倫理委員会から文書による承認を得ている。また、剖検症例についての研究協力の同意は、遺族の自由意思で決めていただいた、臓器の一部の医学研究目的使用について承諾され、すでに署名をいただいている剖検承諾書をもって同意とすることについて当センター倫理委員

会から文書による承認を得ている。

C. 研究結果

対照の冠動脈内膜にはCD68陽性のマクロファージ由来泡沫細胞が優位に浸潤しており、これらはMSR陽性、CD36陽性を示したのに対し、TGCV冠動脈内膜においては $\alpha$ -SMA陽性の平滑筋細胞由来泡沫細胞が優位に浸潤、増生しており、これらはMSR陰性、CD36陰性であった。また、平滑筋細胞由来泡沫細胞の大部分は、SM22 $\alpha$ 、SMemb、MHC陽性であった。

D. 考察

TGCV例の冠動脈内膜病変においては、平滑筋細胞由来泡沫細胞の浸潤、増生が認められるが、これらの細胞には酸化LDL受容体の発現が認められなかった。また、泡沫化平滑筋細胞は合成型から収縮型までの表現型を示していた。酸化LDLの取り込みではなく、細胞内に脂質が蓄積された結果によって泡沫化した平滑筋細胞の浸潤、増生がTGCV冠動脈の求心性肥厚に寄与しているものと想定された。

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症の冠動脈内膜病変には、合成型から収縮型までの表現型を有する平滑筋細胞由来泡沫細胞が優位に浸潤、増生していた。



F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 57 回日本病理学会秋季大会(11/17～19,  
2011)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)の核医学診断に関する研究

研究分担者 石田良雄 関西労災病院 核医学診断部・循環器内科 部長  
(前 国立循環器病センター 核医学診断部 主任医長)

研究要旨

原発性TGCV症例で、長鎖脂肪酸(LCFA)の放射性トレーサであるI-123標識BMIPP ( $\beta$ -methyl iodoacetate pentadecanoic acid)の心筋集積亢進が確認されている。そこで、BMIPP静注後3分から30分までのdynamic imaging (3分/frame)と120分のstatic imagingを組み合わせた撮像プロトコルを採用し、①早期(静注後20分)と後期(同120分)の心筋BMIPP集積度(上縦隔とのカウント比、H/M)、②早期像から後期像への心筋BMIPP洗い出し率(WR)を、TGCVの重症度指標とすることにした。本法のもとで、健常例15例を対象に求めた基準値は、早期像H/M  $3.03 \pm 0.31$ 、後期像H/M  $2.78 \pm 0.43$ 、WR  $19.6 \pm 9.13\%$  (時間減衰補正なし)であった。

A. 研究目的

原発性TGCVで、I-123標識BMIPP(LCFAの放射性トレーサ)を用いた核医学イメージングで、同トレーサの心筋集積亢進が認められ、心筋脂肪酸蓄積の重症度診断への応用が期待されている。さらには、二次性TGCVや糖尿病に由来する心筋脂肪蓄積の早期診断にも有意義であろう。そこで本研究では、同診断に相応しい検査プロトコルならびに評価指標を検討し、健常例を対象に評価指標の基準値を求めた。

B. 研究方法

心筋脂肪酸代謝の動態に鑑みて、ガンマカメラによる正面方向からのplanar撮像法で、I-123 BMIPP 111 MBq 静注後3分から30分までのdynamic imaging(3分/frame)を実施し、さらに120分でのstatic imagingを加える検査プロトコルを考案した。評

価指標は、各時相の画像において心臓部に設定した関心領域内の放射能カウントに基づいて、①早期(静注後20分)と後期(同120分)の心筋BMIPP集積度(上縦隔とのカウント比、H/M)、②早期像から後期像への心筋BMIPP洗い出し率(WR)を求めた。健常例15例(心エコー図正常例)を対象として、同評価指標の基準値を求めた。

(倫理面の配慮)

一般臨床でのルチン検査のデータに基づいたretrospective studyである。

C. 研究結果

全例で検査は安全に実施され、鮮明な画像を撮像できた。健常例の検討から、評価指標の基準値は、早期像のH/Mが $3.03 \pm 0.31$ 、後期像のH/Mが $2.78 \pm 0.43$ 、洗い出し率(WR)が時間減衰補正なしで $19.6 \pm 9.13\%$ であった。

#### D. 考察

I-123 標識 BMIPP の心筋集積像は、心筋細胞の長鎖脂肪酸摂取の状態を反映する。一般的には、静注後 20 分の早期像で評価する方法が採られてきたが、本症のような脂肪酸が心筋に貯留する病態に対しては、時間経過の観察が必要と考えられたため、後期像の撮像を加えた検査プロトコルを考案した。早期像から後期像への心筋 BMIPP 洗い出し率の低下が重要な診断情報と推定される。また、今回の検査プロトコルでは、静注後 3 分から 30 分までの心筋 BMIPP からの BMIPP クリアランスを実測できるため、より定量性の高い指標の抽出が期待できる。

なし

#### 3. その他

なし

#### E. 結論

I-123 標識 BMIPP イメージングを、TGCV や糖尿病などの心筋脂肪蓄積病態の診断に適用する場合、静注後早期から後期への心臓集積の時間経過の観察が有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

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

ポンペ病モデルマウス由来の iPS 細胞の作製とその性状に関する研究

研究分担者 井田博幸 東京慈恵会医科大学小児科学講座 教授

研究要旨

ポンペ病は $\alpha$ -グルコシダーゼ活性低下により発症するリソソーム病のひとつで肥大型心筋症、筋力低下を主症状とする。この病態解明のためポンペ病モデルマウスからiPS細胞を樹立し、そして骨格筋に分化させて、その生化学的、病理学的所見を検討した。今回我々の樹立したiPS細胞はポンペ病の表現を有しており分化誘導した骨格筋細胞は本症に対する治療法の開発や発症メカニズムの解明に有用なモデルになると考えられた。

A. 研究目的

ポンペ病はリソソーム酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素活性低下により、その基質であるグリコーゲンが心筋、骨格筋に蓄積する先天代謝異常症である。本症の病態には不明な点が多く、これを解明するため iPS 細胞をポンペ病モデルマウスから樹立し、そしてその生化学的、病理学的所見を検討し、その有用性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

$\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子ノックアウトマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) の 8 週齢マウスから線維芽細胞を採取し、Oct3/4, Klf4, Sox2 をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞について

- (1) 多分化能を検討した。
- (2) 酵素活性や組織学的所見を検討した。
- (3) 骨格筋に分化させ、それを組織学的

に検討した。

(倫理面の配慮)

本研究は慈恵医大実験動物委員会の認可をうけて行った。

C. 研究結果

1. ポンペ病マウス由来の iPS 細胞の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は正常のそれに比較して著明に低下していた。

( $17 \pm 1.2$  nmol/hr/mg protein vs.  $162 \pm 1.3$  nmol/hr/mg protein)

また、ポンペ病マウス由来の iPS 細胞において PAS 染色, ACP 染色は強陽性を示した。

2. ポンペ病マウス由来の iPS 細胞は胚細胞由来の種々の遺伝子 (Ecat1, Esg1, Fgf4, Nanog など) を発現していた。また、これをヌードモデルの皮下に移植したところ 4 週間後には、アクチン (中胚葉),  $\alpha$ -フェトプロテイン (内胚葉), チュブリン (外胚葉) が免疫組織学的に確認された。

3. iPS 細胞から分化させた骨格筋は embryoid baby 形成 24 時間後から収縮を開