

### 3. TGCV モデル動物 ATGL KO マウスの心筋を用いたプロテオーム解析による TGCV のバイオマーカー候補タンパク質の探索

9 週齢の ATGL KO マウスおよび、同週齢の野生型 C57BL6J マウスを還流脱血したのち心臓のサンプリングを行った。ATGL KO マウスは脂肪酸として長鎖脂肪酸(long chain fatty acid:LCFA)のみを含む餌と中鎖脂肪酸(medium chain fatty acid:MCFA)を含む餌(脂肪酸の約 75%)を与えた 2 群を使用した。

心筋を破碎後、ウレアを含む溶液で可溶化し、tri-n-butylphosphate /aceton /methanol(1:12:1)で沈殿させることにより、脱脂を行った。得られたタンパク質沈殿物をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で再可溶化し、限外ろ過を用いたバッファー交換により SDS を除去した後、トリプシン消化を行った。トリプシン消化ペプチドを iTRAQ 試薬によって安定同位体標識した後、陽イオン交換カラムを用いて分画し解析用ペプチドサンプルとした。ペプチドサンプルの同定、定量は nanoLC-MS/MS で測定することによって行った。

#### C. 研究結果

1. TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いたプロテオーム解析、トランスクリプトーム解析によるバイオマーカー候補タンパク質の探索

(1) TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いた SILAC 法によるプロテオーム解析

TGCV 患者細胞株と健常人細胞株の SILAC 法を用いたプロテオーム解析により 4632 種のタンパク質が同定された。このうち TGCV 患者細胞株 LC1,LC2 でともに 1.5 倍以上増大していた 18 種と 0.67 倍以下に減少していた 43 種のタンパク質をバイオマーカー候補と判断した。これら発現変動していた 61 種のタンパク質を Ingenuity による機能予測解析にかけると Lipid metabolism がトップに位置することが示された。

TGCV で発現が増大していたタンパク質の中には ATGL の活性を調節することがすでに知られている Perilipin2, ABHD5 などが含まれていた

(2) TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞株を用いたマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

TGCV 患者細胞株と健常人細胞株のマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により 27837 種の遺伝子が同定された。このうち TGCV 患者細胞株 LC1,LC2 でともに 2 倍以上増大していた 180 種と 0.5 倍以下に減少していた 193 種の遺伝子を TGCV 患者細胞株で発現変動していた遺伝子と判断した。

TGCV で減少していた遺伝子の中にはアディポサイトにおいて ATGL インヒビターとして働くことがすでに知られている G0S2 も含まれていた。

2. TGCV のバイオマーカー候補タンパク質フィラグリンの検証

フィラグリンは皮膚の形成に重要なタンパク質であり、大きな分子量を持ったプロフィラグリンとして合成される。フィラグリンはプロテオーム解析において健常人細胞株に比較して LC1 で 3.8 倍、LC2 で 10.3 倍を示し、TGCV 患者細胞株で最も増大していたタンパク質であった。同様にトランスクリプトーム解析でも LC1 で 6.7 倍、LC2 で 19 倍という mRNA レベルでの発現増大を示した。

また、TGCV 患者細胞株で増大していたペプチドはすべてプロフィラグリンと推定される位置のタンパク質から検出された。このことから TGCV 患者細胞株において増大しているのはプロフィラグリンである可能性が示唆された。このフィラグリンを TGCV のバイオマーカー候補と考え以下の実験を行った。

リアルタイム RT-PCR によってフィラグリンの発現定量を行ったところ、健常人細胞株に比較して TGCV 患者細胞株 LC1 で 7.9 倍、LC2 で 16.4 倍であることが確認できた。

PPAR $\gamma$  は核内受容体ファミリーの一つであるが、PPAR $\gamma$  の発現が TGCV 患者の心筋で増大し TGCV の病態に関わることがすでに示唆されている。また、データベース検索からフィラグリンのプロモーター領域に PPAR $\gamma$  の結合領域が存在することが推定され、フィラグリンが PPAR $\gamma$  によって転写調節を受けている可能性が示唆されたため、PPAR $\gamma$  のフィラグリン発現への直接的な関与を HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼ・アッセイによって調べた。その結果、PPAR $\gamma$  の作動薬である rosiglitazone の有無に関わらずフィラグリ

ン・プロモーターの PPAR $\gamma$  に対する特異的な発現応答は見られなかった。

また健常人細胞株に Rosiglitazone を投与しリアルタイム RT-PCR によってフィラグリンの発現を調べたところ、フィラグリンの応答は見られなかった。

さらに TGCV 患者細胞株、健常人細胞株どちらにおいても PPAR $\gamma$ , RXR $\gamma$  の発現が見られなかったことから、TGCV 患者細胞株におけるフィラグリンの発現増大が PPAR $\gamma$  によるものではないことが示唆された。

### 3. TGCV モデル動物 ATGL KO マウスの心筋を用いたプロテオーム解析による TGCV のバイオマーカー候補タンパク質の探索

ATGL KO マウス心筋を用いたプロテオーム解析により 5867 種のタンパク質が同定・定量された。そのうち LCFA 食の ATGL KO マウスで野生型マウスに対し 2 倍以上発現が増大したタンパク質をバイオマーカー候補として選択した。MCFA 食によって ATGL KO マウスの症状が改善することがすでに示されていることから、上記の候補の中で MCFA 食の ATGL KO マウスにおいて、その発現が LCFA 食の ATGL KO マウスの 0.8 倍以下に減少した 14 個のタンパク質を有力な候補と判定した。その中には、脂肪滴上に存在し、ATGL の活性を調節することが示唆されている Perilipin2, 3 が含まれていた。

さらに野生型に比べ ATGL KO マウス (LCFA 食) で 0.66 倍以下に発現減少していたタンパク質 (オス 217 種、メス 134 種)

を Ingenuity による機能予測解析にかけるとオス、メスともに Metabolic Disease がトップに位置することが示された。オスでは、さらに Energy Production や Lipid Metabolism の順位が上昇していた。

また、全同定タンパク質中に含まれるミトコンドリアタンパク質はオス、メスともに全体の 20%弱だったにも関わらず、発現が減少しているタンパク質ではオスで 49.77%、メスで 40.30%であった。その中でも NAD(P) transhydrogenase はオス、メスともに発現量が 10 倍近く減少していた。NAD(P) transhydrogenase はミトコンドリアの内膜に局在し電子伝達系に関与するだけでなく、酸化ストレス応答にも関与することが分かっており、本疾患の病態解明につながる可能性が示唆された。

#### D. 考察

今年度は中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)のバイオマーカー候補の同定のためのプロテオーム解析を中心に研究に取り組んだ。その結果、TGCV 患者細胞株を用いた SILAC 解析で 4632 種、ATGL KO マウスを用いた iTRAQ 解析で 5867 種のタンパク質が同定、定量できた。ATGL 変異検体でのプロテオーム解析は世界でも初めてであり、特にマウス心筋のような複雑な試料においても構成するタンパク質を広範囲にわたって同定できたことはバイオマーカー探索に十分な結果である。

今後は、これらの探索で得られた多くのバイオマーカー候補タンパク質をどう絞り込んでいき、いかに実用化につなげていくかが最重要課題となる。そのためには、TGCV 患者細胞株および ATGL KO マウス

を用いたさらなる検証と、バイオインフォマティクスや実験的手法によるバイオマーカータンパク質の機能的な裏づけが必須である。特に TGCV 患者細胞株で発現が顕著に増大していたフィラグリンに関しては培養上清、患者血清で検出可能かを検討していく予定である。

#### E. 結論

今年度は発病メカニズムに不明の点が多い難病である中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー候補の同定を最重要課題として研究に取り組んだ。TGCV 患者細胞株を用いたプロテオーム、トランスクリプトーム解析および ATGL KO マウスを用いたプロテオーム解析を行い、同定されたタンパク質、遺伝子の中からバイオインフォマティクスを駆使して有用な分子の絞り込みを行った。中でも皮膚の形成に関与するフィラグリンは TGCV 患者細胞株で最も増大していたタンパク質であり、TGCV の有力なバイオマーカー候補であると考えられた。

#### 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

一般講演

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。 日本プロテオーム学会 2011 年会 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP0) 第 9 回大会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日

Naoko Kawasaki, Kenichi Hirano, Yasuhiro Hara, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Takeshi Tomonaga : Biomarker Discovery for Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy using Proteome and Transcriptome Analysis. THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy & Neutral Lipid Storage Disease, Kyoto, November 26, 2011

川崎直子、平野賢一、原 康洋、足立 淳、白水崇、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年會, 2011 年 12 月 13-16 日

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-

研究分担者 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

研究要旨 冠動脈CTアンジオグラフィに基づく冠動脈壁の脂肪蓄積評価法を開発し、臨床例に応用した。CT画像から境界CT値を設定して冠動脈内腔・壁・壁内脂肪成分・石灰化成分を分離し、三次元画像表示・各成分の軸方向グラフ表示・セグメント単位での体積算出を実施、冠動脈壁内の脂肪成分の分布の可視化と量計測が可能であることを確認した。

A. 研究目的

X線CTでは、脂肪組織は低濃度、軟部組織は中等濃度、石灰化や造影剤を含む血液で充満した血管内腔は高濃度を示す。そこで冠動脈CTA画像から境界CT値を設定して冠動脈の各構成成分を分離することで、冠動脈壁の脂肪蓄積評価が可能かを検証する。

B. 研究方法

冠動脈狭窄2例のCTA画像に対し、冠動脈外縁と内腔の境界CT値を設定して外部と内腔形状を抽出し、体積と冠動脈長から平均壁厚を算出。更に壁内の脂肪と石灰化を抽出し、各成分の三次元画像表示・軸方向グラフ表示・セグメント単位での体積算出等を行った。

C. 研究結果

右冠動脈狭窄例（症例1）の三次元表示像と軸方向表示グラフを図1・2に、左冠動脈前下行枝狭窄例（症例2）の同像とグラフを図3・4に示す。両症例の三次元像では脂肪は外膜側を取り巻くように存在することが可視化できた。症例1では推定内径のプロットで#1～2の有意狭窄の連続が示され、同領域の壁は1.4～1.6mmと病理報告（1mm）に比べ肥厚していたが、壁内脂肪体積率は27～28%で増加は無かった。症例2の狭窄領域の壁厚（1.2mm）・壁内脂肪体積率（29%）は、ともに著

しい高値を示さなかった。

D. 考察

X線CTでは脂肪組織は安定した低CT値（-100）を示し、冠動脈壁のような軟部組織のCT値は50程度のため、今回の検討では両者の中間値（-25）を冠動脈外縁境界値とした。またソフトプラーク研究報告よりCT値40を壁内脂肪含有領域の上限とした。上記2例では脂肪成分は冠動脈外周を取り巻くように存在し、壁内脂肪体積率は30%程度であったが、本法で局所的な壁内膜面～中層部の脂質沈着・蓄積がどの程度鋭敏に評価できるかは、今後検証が必要である。

冠動脈狭窄の評価を内腔の断面積ベースで行えることは、本法の大きな利点である。図2A、4Aで正常径部分を結ぶリファレンスラインを採れば、容易にQCA法が適用できる。症例1のような有意狭窄の連続例での、実効狭窄度の判定の研究も展開可能と思われる。

E. 結論

本研究で提示の方法を用いて、冠動脈CTAデータから、狭窄とともに壁性状（肥厚・壁内脂質・石灰化）についての定量評価と三次元表示による可視化の可能なことが明らかになった。従ってTGCV例での冠動脈壁脂質蓄積評価に十分応用できるものと考えられる。

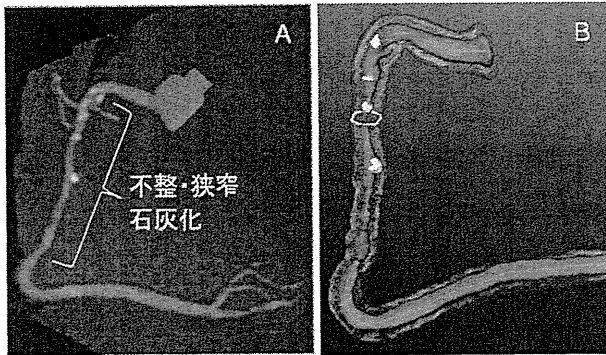


図1 右冠動脈CTA(症例1)  
A: 通常のCTA(MIP法)、B: 三次元表示像

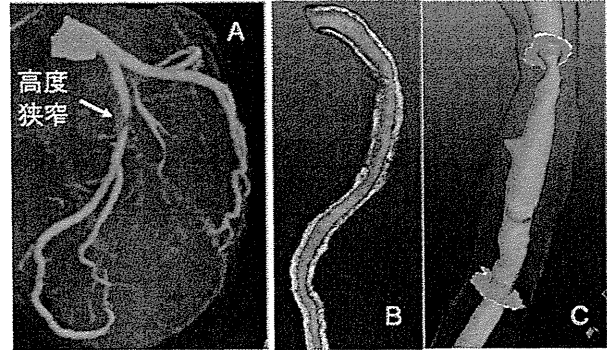


図3 左冠動脈CTA(症例2)  
A: 通常のCTA(MIP法)、BC: 三次元表示像

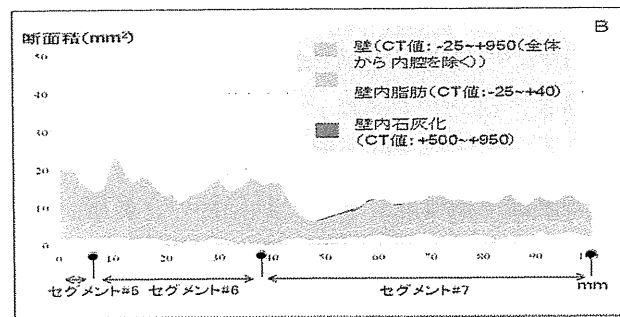
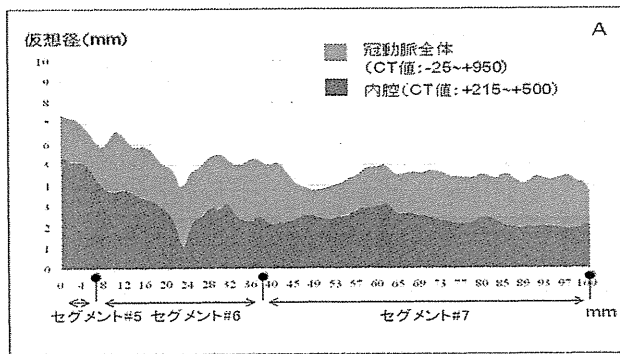


図2 右冠動脈データの軸方向表示(症例1)  
A: 冠動脈全体(内腔+壁)、B: 壁(脂肪・石灰化重ね表示)

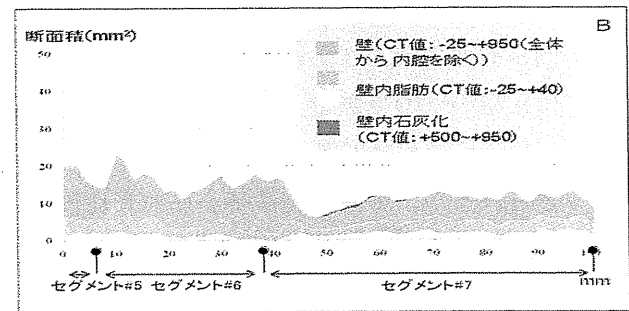
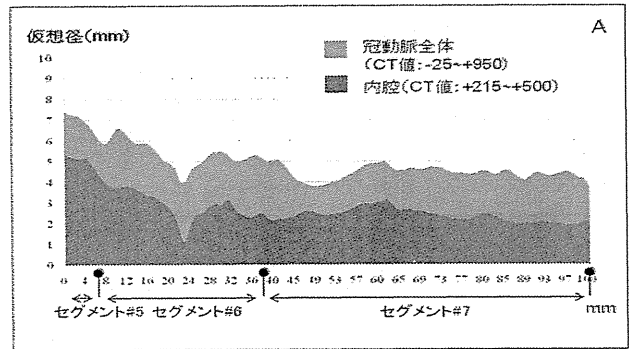


図4 左前下行枝データの軸方向表示(症例2)  
A: 冠動脈全体(内腔+壁)、B: 壁(脂肪・石灰化重ね表示)

F. 健康危険情報

特になし

G. 文献

I 論文発表

1. Watanabe Y, Nakazawa T, Higashi M, Itoh T, Naito H (2011) Assessment of calcified carotid plaque volume: comparison of contrast-enhanced dual-energy CT angiography and native single-energy CT. AJR 196(6):W796-9.

II 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

I. 研究協力者

国立循環器病研究センター 東 将浩・山田直明  
大阪大学医学部放射線医学 富山憲幸

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

研究分担者 中谷大作 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学

#### 研究要旨

症例は45歳男性。中性脂肪蓄積心筋血管症に起因する難治性心不全のため、2008年2月、42歳時に心臓移植を施行。術後の定期的な心筋生検において拒絶反応を認めなかった。3か月時点で、血管内超音波検査（IVUS）上、左前下行枝（LAD）には粥腫（プラーク）を認めなかったが、移植術後1年目のIVUSにおいてLAD近位部に偏心性プラークが出現した。2年目には同部位のプラークは増大傾向を認めたため、エベロリムス2.5mg/dayを開始した。3年目のIVUSにおいて、偏心性プラークは縮小していることが確認された。本症では3ヶ月目のIVUSにおいて偏心性プラークを認めなかったことから、同病変はレシピエントにおける冠動脈病変の進行と考えられる。経過中、偏心性プラークが出現し、エベロリムス投与後にプラーク退縮を認めた症例を経験した。

#### A. 研究背景

中性脂肪蓄積心筋血管症は心臓移植後症例の病理組織よりあきらかになった、難治性疾患の一つである。心臓移植後はしばしば免疫反応が生じ Vasculopathy が生じるとされるが、中性脂肪蓄積心筋血管症後の心臓移植後の経過については明らかではない。最近、本邦において新規免疫抑制剤としてエベロリムスの臨床使用が可能となった。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施行後経過において、このエベロリムス投与後に血管内超音波検査において動脈硬化が退縮した症例を報告する。

#### （倫理面の配慮）

本研究は、カテーテル検査前に書面での同意を取得することにより実施した。

#### B. 研究結果

血液検査上、LDL コレステロールやHbA1cは悪化傾向にあったが（表1）、血管内超音波検査においてエベロリムスを2年目のカテーテル治療終了後に開始したのちに3年目の粥腫体積は減少し、それに伴い、血管内腔は表2のごとく改善した。

#### C. 考察

エベロリムス投与後に血管内超音波検査上、粥腫体積の縮小と内腔の開大を認めた。現時点において、エベロリムスが粥腫退縮する機序については明らかではない。しかしながら、エベロリムスには免疫抑制作用に加え、スタチンのような抗炎症作用を有することが知られている。スタチンはこの抗炎症作用を介して粥腫退縮を認めることから、エベロリムスも炎症反応の改善を介した粥腫退縮作用を認めるかもしれない。

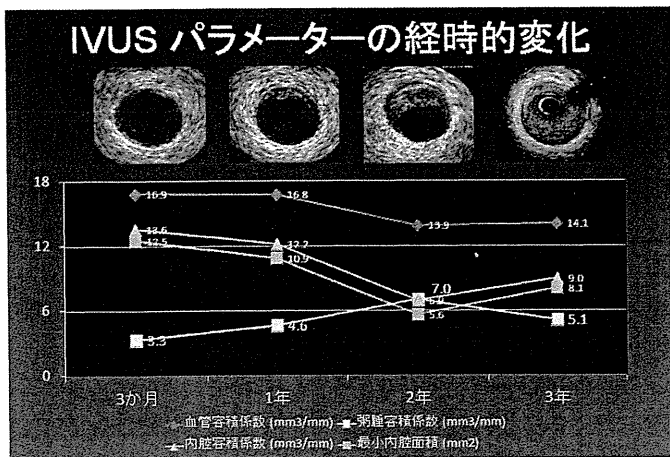
D. 結論

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症例を経験した。エベロリムスの有効性を検討するために多数例での検討が必要と考えられた。

表1 血液検査の経時的変化

	3か月	1年	2年	3年
Cytomegaro virus	(-)	(-)	(-)	(-)
HbA1c (%)	5.1	5.7	5.6	7
T.Cho (mg/dL)	154	193	182	219
LDL-Cho (mg/dL)	90	112	100	128
HDL-Cho (mg/dL)	36	41	49	57
TG (mg/dL)	118	190	165	134

表2 血管内超音波の経時的変化



F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara M, Mizuno H, Mizote I, Nakatani D, Asano Y, Sakata Y, Nanto S, Komuro I. Clinical impact of off-label cardiac resynchronization therapy in end-stage heart failure patients on continuous intravenous inotrope. Clin Cardiol. 2011;34:714-720.
- 2) Nakatani D, Ako J, Tremmel JA, Waseda K, Otake H, Koo BK, Miyazawa A, Hongo Y, Hur SH, Sakurai R, Yock PG, Honda Y, Fitzgerald PJ. Sex differences in neointimal hyperplasia following endeavor zotarolimus-eluting stent implantation. Am J Cardiol. 2011;108:912-917.
- 3) Minamino T, Toba K, Nakatani D, Higo S, Ozawa T: Erythropoietin, progenitor cells and restenosis. Thrombosis and Haemostasis 2012 (In press).
- 4) Shiozaki M, Iso H, Ohira T, Nakatani D, Shimizu M, Sakata Y, Komuro I, Sato H. Longitudinal risk of cardiovascular events in relation to depression symptoms after discharge among survivors of



myocardial infarction. Osaka Acute Coronary Insufficiency Study. Circ J. 2011;75:2878-2884.

- 5) Sakata Y, Nakatani D, Shimizu M, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Hara M, Sumitsuji S, Kawano S, Iwakura K, Hamasaki T, Sato H, Nanto S, Hori M, Komuro I. Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction. J Cardiol. 2011 Sep 14. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 1) Daisaku Nakatani, Incidence, Predictors, and Long-Term Mortality of Recurrent Myocardial Infarction in Patients following Discharge for Acute Myocardial Infarction American Heart Association, Orlando USA (2011年11月)
- 2) 中谷大作, 心臓移植後のエベロリムス投与により動脈硬化の退縮を認めた症例 第112回日本循環器学会 近畿地方会(2011年12月)
- 3) 中谷大作, Clinical impact of recurrent myocardial infarction following Discharge for Acute Myocardial Infarction 第20回日本心血管インターベンション治療学会総会(2011年7月)

和文総説

中谷大作・坂田泰彦・佐藤洋 ; 「急性心筋梗塞の予後規定因子」

日本臨牀 69:105-110,2011

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

なし

3. その他

なし

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

研究分担者 中村 浩士 山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授

研究要旨

心内膜下心筋生検検査にて採取された心筋病理組織における ATGL の発現意義を検討した。  
ATGL 発現強度は血清の中性脂肪値と相関した。

A. 研究目的

脂肪細胞で TG 分解を担う HSL 以外のリパーゼとして ATGL (adipose triglyceride lipase) が報告されている。ATGL は脂肪滴局在タンパク質であり、ユビキタスに発現しているが、脂肪組織に比較的多いことが知られている。Hela 細胞における ATGL RNAi は脂肪滴の顕著な肥大を引き起こす。しかしながら心筋生検組織における ATGL 染色の臨床的意義はあきらかではない。そこで山口大学医学部付属病院循環器内科にて心筋生検検査を行った症例を解析し、心臓組織における ATGL の発現と、各種臨床マーカーとの対比検討を行った。

B. 研究方法

当院において病理臨床カンファレンスを行い診断を確定した心筋症 16 例（拡張型心筋症 7 例、肥大型心筋症 2 例、拡張相肥大型心筋症 2 例、心臓サルコイドーシス 2 例、心臓アミロイドーシス 1 例、心筋炎 1 例、左室緻密化障害 1 例）について、HE、AZAN、PAS、EVG の一般染色に加えて、抗 ATGL 抗体（セルシグナリング社）を用いて免疫染色を行い ATGL 発現強度を半定量化した。同時に、リンパ球、マクロファージ、Tenascin C の炎症マーカーについても免疫染色を行い評価した。血液検査から、BNP、CRP、HbA1c(%)、TG、LDL を、心エコー検査からは、LVEDD、WT、LVEF(%)を算出し、相関

解析を行った。統計解析には SPSS ver19.0 を用いた。

C. 研究結果

心筋組織中の ATGL の発現強度と血中の TG 値には正の相関が認められた ( $p < 0.05$ )。また、有意差はなかったが心筋組織中の ATGL の発現強度と HbA1c(%)には正の傾向を、組織中のリンパ球浸潤とは負の傾向を認めた (図)。

D. 考察

心筋組織中の ATGL の発現強度と血中の TG 値には正の相関が認められたことより、血中の TG が高いと、①細胞内における TG 合成の基質が増加する、②TG 合成活性が上がっているなどの可能性が考えられた。何らかの機序で細胞内の TG 合成が上がっている場合には、ATGL は、Positive feedback 機構として発現が上昇する可能性が考えられた。

E. 結論

心筋組織中の ATGL の発現には中性脂肪の代謝を反映している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

Ishii A, Hoshii Y, Nakamura H, et al. A case of sarcoidosis with pulmonary hypertension exacerbated by Takayasu-like large vessel vasculitis. *Pathology International* 61, 546-550, 2011.

Otuka H, et al. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Journal* 76, 453-461, 2012.

### 2) 学会発表

中村浩士、松崎益徳：ウイルス性心筋炎に対するグルコシルチコイドの心筋保護効果の検討（第II報）. 第2回Molecular Cardiovascular Conference II（北海道／2011年9月3日）

中村浩士、松崎益徳：心臓病理を介した個別臨床カンファレンスの取り組み. 心筋生検研究会（京都／2011年11月25日）

Nakamura H, Niioka H, Hashimoto M, Matsuzaki M. New approach for viral myocarditis by MCT diet. The 1st. International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyopathy & Neuronal Lipid Storage Disease. (Kyoto／2011.11.26)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

## 研究協力者

山口大学医学部公衆衛生学講座 國次一郎

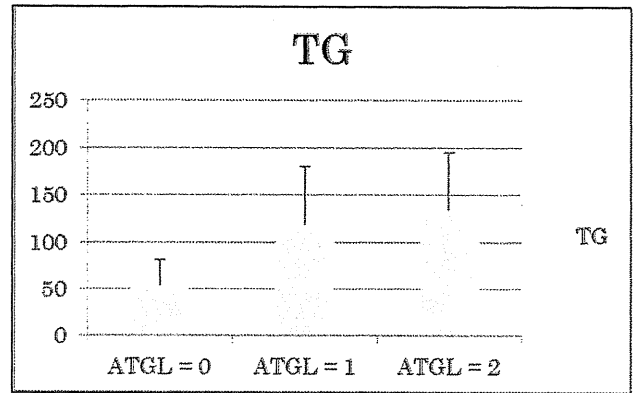


図1 血中トリグリセリド値とATGL発現強度の相関

( $p < 0.05$ )

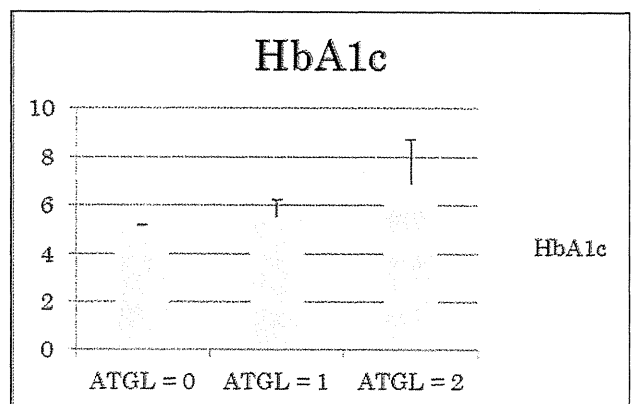


図2 HbA1c (%) とATGL発現強度の相関（有意差なし）

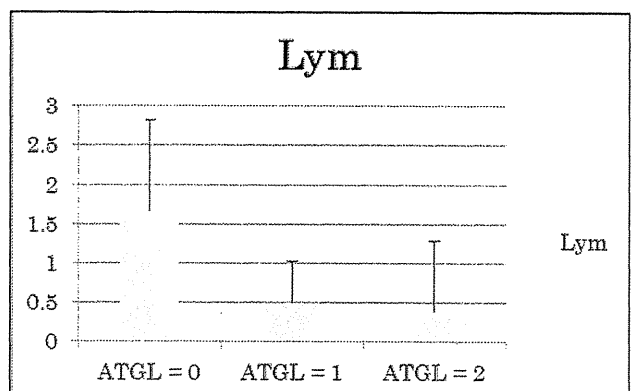


図3 リンパ球浸潤とATGL発現強度の相関（有意差なし）

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

研究分担者 福嶋教偉 大阪大学大学院医学系研究科 重症臓器不全治療学寄附講座 教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は、当院で心臓移植を受けた症例でその存在が明らかとなり、移植時の摘出心を解析して報告された疾患である。本症は、心筋細胞並びに血管平滑筋に脂肪が蓄積して発症すると考えられている。

さて、心臓移植はすでに末期的心不全患者の外科的治療として確立された。しかし、遠隔期の主な死因の1つに移植心冠動脈硬化症(TxCAV)があり、病変の主体は、動脈壁内にレシピエント由来の平滑筋細胞が迷入・増殖し、動脈硬化が発生すると考えられている。本症の動脈硬化は、冠動脈の全長に、全周性に起こるので、病的に本研究班の研究対象としているTGCVに類似している。

本研究では、1. 移植心冠動脈硬化症にTGCVが関与していないか、2. TGDCVの病理学的評価が、移植心冠動脈硬化症に有用か（つまり、初期の病像を生検でとらえられないか）、3. TGDCVの予防・治療が、移植心冠動脈硬化の予防・治療に有用かを、検討した。

具体的には、TGCVの研究の発端となった2症例のroutine biopsyを検討して、TGCVに類似した所見が、切片内の血管に見られないかを検討した。

2症例で、移植後1-4年後に、冠動脈造影、心筋生検を行なった。1症例で2年目にTxCAVを#7に認めたため、エベロリムス(EVL)を開始し、改善傾向にある。また、2症例で、1年後の生検標本の脂肪染色を行なったが、共に陰性であった。2症例とも移植後MCT治療を受けていた。

以上の結果より、1症例でTxCAVを認め、やや通常より速い進行が考えられるが、TGCVとTxCAVの明らかな相関は認められなかった。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は、当院で心臓移植を受けた症例でその存在が明らかとなり、移植時の摘出心を解析して報告された疾患である。本症は、心筋細胞並びに血管平滑筋に脂肪が蓄積して発症すると考えられている。

さて、心臓移植はすでに末期的心不全患者の外科的治療として確立されたが、遠隔期の合併症のために、漸次死亡し、国際的には10年生存率が60%程度である。その主な原因に移植心冠動脈硬化症(TxCAV)があり、病変が進行すると治療手段はなく、再心臓移植しかないと言われている。高脂血症、高血圧、サイトメガロウイルス感染症、拒絶反応を予防すると、TxCAVの頻度や重症度が減少することが知られている。病変の主体は、動脈壁内にレシピエント由来の平滑筋細胞が迷入・増殖し、動脈硬化が発生すると考えられている。動脈硬化は、冠動脈の全長に、全周性に起こるので、病的に本研究班の研究対象としているTGCVに類似している。

本研究では、1. 移植心冠動脈硬化症にTGCVが関与していないか、2. TGDCVの病理学的評価が、移植心冠動脈硬化症に有用か（つまり、初期の病像を生検でとらえられないか）、3. TGD

CVの予防・治療が、移植心冠動脈硬化の予防・治療に有用かを、検討した。

具体的には、TGCVの研究の発端となった2症例のroutine biopsyを検討して、TGCVに類似した所見が、切片内の血管に見られないかを検討することである。

B. 研究方法

TGCVのために拡張型心筋症(DCM)となり、心臓移植を施行した2症例のroutine biopsyと冠動脈造影をretrospectiveに検討した。

移植後1,2,3,4年目の冠動脈造影の際には、intravascular ultrasound (IVUS)を施行した。同時にbiopsy標本を用いて、Oil red染色を行なった。

C. 研究結果

(症例1) 48歳男性、TGCVによるDCM

心不全のため左心補助人工心臓(LVAS)装着後に2007年6月心臓移植を施行。心臓移植後液性拒絶反応を発症し、血漿交換、抗CD20抗体療法、経皮的体外循環(PCPS)を行い救命した。その後の経過は良好で、タクロリムス(FK)、エベロリムス(EVL)、プレドニン(PRD)で内服治療中で

あったが、赤芽球瘍発症し、FKを中止し、ミコフェノール酸モフェチル (MMF) を開始した。移植後MCT療法を行った。

冠動脈造影、IVUS、心筋生検を移植後1,2,3,4年後に行なったが、有意のTxCAVは認めず、拒絶反応はgrade 0であった。Oil red染色でも、脂肪は染色されなかった。

(症例2) 45歳男性、TGCVによるDCM

心不全のため左心補助人工心臓(LVAS)装着後に2008年2月心臓移植を施行。待機中からMCT療法を施行。心臓移植後の経過は拒絶反応、冠動脈硬化については経過良好で、移植後早期にはシクロスポリン (CsA)、MMF、PRDで経過を見ていたが、現在ではFK、EVLで内服治療中である。

冠動脈造影、IVUS、心筋生検を移植後1,2,3,4年後に行なった。1年後には有意のTxCAVは認めず、拒絶反応はgrade 0であったが、2年後に#7に25%の狭窄を認めたため、2010年5月にEVLを開始した。3年後の検査で、狭窄の改善 (max intimal thickness 1.35→1.05mm、luminal area 5.8→8.6mm<sup>2</sup>) した。2012年2月の4年目のIVUSでも冠動脈硬化の進行は認められず、心筋生検もgrade 0であった。生検標本中には明らかな動脈壁の肥厚はなく、Oil red染色でも、脂肪は染色されなかった。

一方、移植後3年目頃から糖尿病を発症し、インスリン療法を開始した。5年目の生検で拒絶反応が認められなかったため、プレドニンを中止し、耐糖能の改善を模索する予定である。

#### D. 考察

TxCAVは心臓移植後の重大な合併症であり、遠隔予後を左右するため、その病態の解明並びに治療法の開発は非常に重要である。

TxCAVの病変の主体は、動脈壁内にレシピエント由来の平滑筋細胞が迷入・増殖し、動脈硬化が発生すると考えられている。動脈硬化は、冠動脈の全長に、全周性に起こるので、病的に本研究班の研究対象としているTGCVに類似している。

仮に、TGCVがTxCAVの発生に関与していれば、通常より早くにTxCAVが発生すること、TxCAVの冠動脈内に脂肪が蓄積したレシピエント由来の

平滑筋細胞が認められるのではないかと考えられる。

そこで、本研究では、TGCVによるDCMのために心臓移植を施行した二例で、移植後のTxCAVの発生と心筋生検の所見に相関がないか検討した。しかし、一例で軽度のTxCAVの発症を認めたが、生検標本にも脂肪蓄積がなかったため、その関係は不明である。

但し、本研究の二例は移植前後からMCT療法が行われ、平滑筋細胞に脂肪蓄積が見られなかった可能性がある。もしそうであれば、MCT療法がTxCAVの予防に有用であることが考えられた。

今後症例を増やし、検討して行きたいと考えている。

#### E. 結果

TGCVのために拡張型心筋症(DCM)となり、心臓移植を施行した2症例において、1例にTxCAVの発症を認めたが、TGCVとTxCAVの明らかな相関は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### 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

なし

##### 3. その他

なし

遠隔地に居住するATGL欠損症への在宅中のMCT食介入

研究分担者 安井洋子 大阪大学医学部附属病院 栄養管理室 室長

研究要旨

当院へ入院しMCT食を体験することで効果があった中性脂肪蓄積心血管症の原因の1つである Adipose triglyceride lipase (ATGL) 欠損患者に対し継続介入を行った。対象者は遠隔地での在宅中であり、独居に近い生活環境であるため社会支援との連携およびMCT食を宅配することにより、MCT食の継続およびMCT食に対するモチベーションの維持につなげた。

A. 研究目的

原発性TGCV(ATGL欠損症)でミオパチーにてQOL・ADLが著しく低下し、調理担当が患者本人である在宅患者に対するMCT食の継続に介入する。

B. 研究方法

遠隔地における在宅患者への介入は、直接介入することが不可能である為、MCT入り食品を宅配にて届ける方法とした。また、少量摂取でMCToil含有量が多いMCTクッキーを独自で開発し、正確な栄養価を把握するため食品分析センターにて解析した。

社会支援担当者へMCT食の介入を依頼し、MCT食の実施状況、食事内容、体重計測を電話にて確認。同時に悩み事やMCT食摂取に対するモチベーションも聞き取るようにした。

C. 研究結果

在宅中はMCT入りクッキーを3種宅配したが、3種の味でも同じものを食べるこ

とは継続できなかった。MCTクッキーを改良し、正確な栄養価を知ることによって摂取継続につなげMCT摂取量を正確に把握することができた。おやつ以外にMCT入りの食事もレパートリーに加えたことでMCT食に対し関心が深まった。また、電話等の介入によりMCT食摂取に対するモチベーションが継続できた。

D. 考察

在宅における介入は、地方および生活環境により冬季における室内温度管理が上手くいかず、気温低下に伴う活動量の低下はADLおよび食事摂取量低下に影響を与えていると考える。そのため、社会支援担当者との連携をとることでMCToil入りのおやつのみならず、MCT食摂取の啓発などの介入ができる。また、MCT食摂取の受け入れについては、電話で悩み事を聞き取ることが間接的に影響を与えたと考える。

## E. 結論

ATGL欠損症のため調理困難である在宅患者には、社会支援担当者との連携によりMCT含有食品やMCT食の長期継続が可能となる。また、患者QOL向上およびモチベーション継続には電話など継続的な介入が必要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

『A Dietary Therapy with Medium Chain Triglyceride(MCT)for Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy』  
International Society for Heart Research  
第27回 ISHR 日本部会総会  
(2010.5.16)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

[IV]

臨床試験プロトコル



原発性中性脂肪蓄積心筋血管症に対する特異的栄養療法の  
有効性及び安全性に関する介入前後比較臨床試験

試験実施計画書（案）

主任研究者： 大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学 平野 賢一

副主任研究者： 大阪大学大学院医学系研究科 重症臓器不全治療学 福寫教偉

大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 長澤康行

大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 中谷大作

20XX年XX月XX日 第0.1版

20XX年XX月XX日

臨床研究倫理審査委員会承認（第1.0版）

財団法人先端医療振興財団 臨床研究情報センター

(機密保持)

機密保持に関する供述：

本試験実施計画書に含まれる情報は、本試験に直接係わる者及び倫理審査委員会委員以外の者に開示してはならない。また、本情報は事前の書面による主任研究者の承諾なしに本試験の実施及び評価以外の目的に利用してはならない。

(遵守すべき諸規則)

本試験に関与するすべての者は「世界医師会ヘルシンキ宣言」及び「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従う。

## 目次

0.	概要	1
0.1.	シエーマ	1
0.2.	目的	2
0.3.	主な適格規準	2
0.4.	目標登録症例数	2
0.5.	試験期間	2
0.6.	試験デザイン	2
0.7.	評価項目	2
0.8.	中間解析	2
0.9.	連絡先	2
1.	目的	4
2.	背景と根拠	4
3.	食事療法	6
3.1.	MCT オイル	6
4.	診断基準と病期・病型・病態分類	7
4.1.	診断基準	7
4.2.	病期分類	7
5.	適格規準	8
5.1.	選択規準	8
5.2.	除外規準	8
6.	説明と同意	9
7.	試験参加の手続きと症例登録・割付	10
7.1.	試験参加の手続き	10
7.2.	症例登録	10
8.	治療計画	11
8.1.	プロトコル治療	11
8.2.	用量・スケジュール変更規準	11
8.3.	治療の中止	11
8.4.	併用治療・支持療法	12
8.5.	後治療	12
9.	有害事象の評価・報告	13
9.1.	有害事象の定義	13
9.2.	有害事象の評価と報告	13
9.3.	予期される有害事象等	13

9.4.	有害事象の緊急報告とその後の対応 .....	13
10.	観察・検査・報告項目とスケジュール .....	15
10.1.	被験者の試験期間 .....	15
10.2.	観察・検査項目及び報告すべき情報 .....	15
10.3.	観察・検査・報告スケジュール .....	16
10.4.	観察・検査・報告項目に関連する基準の定義 .....	17
10.5.	検体の取り扱いについて .....	19
11.	目標登録症例数と試験期間 .....	20
11.1.	目標登録症例数 .....	20
11.2.	試験期間 .....	20
12.	評価項目の定義 .....	21
12.1.	有効性評価項目 .....	21
12.2.	安全性評価項目 .....	21
13.	統計学的考察 .....	21
13.1.	目標登録症例数の設定根拠 .....	21
13.2.	解析対象集団 .....	21
13.3.	解析項目・方法 .....	21
13.4.	中間解析 .....	22
14.	症例報告書の記入と提出 .....	23
14.1.	様式と提出期限 .....	23
14.2.	記入方法 .....	23
14.3.	送付方法 .....	23
14.4.	症例報告書内容の確認と問い合わせ .....	23
15.	試験管理 .....	24
15.1.	進捗管理 .....	24
16.	各種委員会 .....	24
16.1.	効果安全性評価委員会 .....	24
17.	倫理的事項 .....	26
17.1.	遵守すべき諸規則 .....	26
17.2.	説明文書・同意書（様式）の作成と改訂 .....	26
17.3.	実施医療機関における実施許可の取得 .....	26
17.4.	個人情報の保護 .....	27
18.	試験の費用負担 .....	27
18.1.	資金源及び財政上の関係 .....	27
18.2.	臨床試験に関する費用 .....	27