

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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

—iPS細胞を用いた特発性心筋症の病因病態解明に関する研究—

研究分担者：福田 恵一（慶應義塾大学医学部 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計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

iPS細胞は細胞移植治療における魅力的な細胞源であると同時に、患者由来のiPS細胞から作製した心筋細胞を解析することにより未知の病態解明に繋がる可能性があり、大きく注目を浴びている。しかしiPS細胞から分化した細胞集団は、心筋細胞以外にさまざまな非心筋細胞が含まれており、患者由来の心筋細胞のみを正確に評価するためには心筋細胞を効率よく精製する技術が必要である。

本研究では網羅的メタボローム解析を行うことでES細胞と心筋細胞における代謝の違いを明らかにし、心筋細胞のみが生存可能な培養環境を実現することにより、ヒトES/iPS由来心筋細胞を精製することを目的とした。

B. 研究方法

前述の目的を達成するため以下の手順で研究を遂行した。まず、(1) 代謝の違いを明らかにするためにトランスクリプトーム及びメタボローム解析を行う、(2) 代謝の違いを元に仮説を立て、ヒトES及びiPS由来心筋細胞を精製する、(3) 精製後心筋細胞における電気生理学的な機能解析を微小電極法、多電極システム、カルシウムイメージングを用いて行う。最後に、心筋精製のメカニズムを明らかにする代謝解析実験を行う方針とした。

（倫理面への配慮）

京都大学山中教授らによって作製されたヒトiPS細胞の提供を受けた。ヒトiPS細胞を用いる計画は、慶應義塾大学倫理委員会に申請の元、同規定に従い、細胞を扱っている。ヒトES細胞を用いた研究に関しては、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に則り、国の認可及び慶應義塾大学倫理委員会認可の元、人の尊厳を侵すことのないよう研究を行った。

C. 研究結果

【1. ES細胞と心筋細胞の代謝の比較】

マウスES細胞とマウス心筋細胞における代謝を比較するため、Gene arrayを行い代謝酵素遺伝子の発現を評価した。心筋細胞に関してはミトコンドリア色素にて精製した心筋細胞を用いた(Hattori F, Nature Methods)。その結果、ペントースリン酸系、核酸合成、アミノ酸合成、脂肪酸合成系の酵素遺伝子に関してはES細胞で発現が亢進していた。一方でTCAサイクルに関しては心筋で酵素遺伝子発現が亢進していた。解糖系に関しては各々異なったアイソザイムの遺伝子発現が亢進していた。

【2. ES細胞と心筋細胞の代謝の比較】

ES細胞及び心筋細胞におけるエネルギー代謝の違いを比較するため、<sup>13</sup>C グルコース同位体を用いて網羅的メタボローム解析を行った。その結果、解糖系の中間代謝産物

は圧倒的に ES 細胞で多く認められた。ペントースリン酸系、核酸合成、アミノ酸合成においても同様に ES 細胞で多く認められた。一方で TCA サイクルにおいては心筋細胞で多く認められた。Gene array 及びメタボローム解析の結果から、ES 細胞は増殖分裂能が非常に高いため、解糖系が亢進させ、核酸やアミノ酸・脂肪酸合成を活性化している一方で、心筋は増殖分裂能が極めて低く、拍動するために多くの ATP を必要とするため、TCA サイクルを活性化させることでより効率にエネルギーを産生していることが示唆された。

### 【3. 心筋細胞と非心筋細胞における生存率の比較】

胎児期から新生児期の心筋では糖や乳酸が主なエネルギー源である。そこで我々は「ES 細胞にとって必要不可欠である糖を除き、心筋細胞にとってエネルギー源となる乳酸を加える」ことにより、非心筋細胞が死滅し、心筋細胞のみが生き残る環境を作れるのではないかと仮説を立てた。実際にマウス ES 細胞や心筋細胞、さまざまな非心筋細胞を無糖乳酸培地下にて培養したところ、ES 細胞や胎児線維芽細胞は速やかに死滅し、心筋細胞は長時間に渡り生き残ることが示された。

### 【4. ヒト ES 及び iPS 由来心筋細胞の精製】

実際に無糖乳酸培地下にてヒト ES 及び iPS 由来の様々な細胞群の中から心筋細胞のみ選択精製できるか否かを確認したところ、95%以上純化された心筋細胞を回収することに成功した。

## D. 考察

本研究では、心筋細胞や非心筋細胞における代謝特性の違いに注目し、心筋細胞のみが生存可能な代謝環境を作製することによって ES および iPS 細胞由来の心筋細胞を純化精製することが可能となった。そのメカニズムとしては、非心筋細胞では乳酸を効率よく利用できず、無糖培地下 ATP が枯渇することで死滅する一方、心筋細胞では乳酸を効率よく利用し、ATP レベルを維持することによって生存可能であることが示唆された。

## E. 結論

本研究成果により、遺伝子操作や FACS など複雑な技術を用いることなく、細胞によって異なる代謝の特性を利用し、培養液の組成を変えるという安価かつ簡便な方法によ

り、純度の高い心筋細胞を大量に得ることに成功した。この方法の確立は、患者 iPS 由来の心筋細胞の解析や心臓再生医療における最も大きなハードルであった「量」と「質」の問題を克服することができると考えている。今後は、実際に心筋症患者由来 iPS 細胞から分化した心筋細胞を精製し、解析することにより病態解明を目指す予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Distinct Metabolic Flow Enable Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. *Cell Stem Cell* 2013 Jan 3;12:127-37. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013.
2. Myocardial Cell Sheet Therapy and Cardiac Function. Fujita J, Itabashi Y, Seki T, Tohyama S, Tamura Y, Sano M, Fukuda K. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Nov 15;303(10):H1169-82. Review doi: 10.1152/ajpheart.00376.2012.
3. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 2;425(4):755-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.148.
4. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsunashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. *Cardiovasc. Res*. 2012 Sep;95(4):419-29. doi: 10.1093/cvr/cvs206.

### 2. 学会発表

- 1.平成 25 年 3 月 15 日(金)~17 日(日) シンポジウム(3/16) 第 77 回日本循環器学会総会(於:パシフィコ横浜)

## Cardiac Regeneration from Metabolic Approaches

遠山周吾, 服部文幸, 佐野元昭, 福田恵一

- 2.平成 24 年 12 月 3 日(月)~4 日(火) 10 周年記念シンポジウム(英語)Global COE Final Symposium(於:慶應義塾大学信濃町キャンパス) Purification of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes from Metabolic Approaches Shugo Tohyama
- 3.平成 24 年 11 月 30 日(金)~12 月 2 日(日) シンポジウム 第 16 回日本心不全学会学会総会(於:仙台国際センター)メタボロームによる代謝解析を利用した ES/iPS 由来心筋精製法 遠山周吾
- 4.平成 24 年 8 月 25 日(土)~29 日(水) Poster Session *European Society of Cardiology Scientific Session 2012* (Place: Munich, Germany) Metabolic selection for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Shugo Tohyama, Fumiyuki Hattori, Motoaki Sano, Takako Hishiki, Yoshiko Nagahata, Hisayuki Hashimoto, Makoto Suematsu, Keiichi Fukuda
- 5.平成 24 年 6 月 12 日(火)~17 日(日) Poster Session (English) *The 10<sup>th</sup> annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2012* (Place: Kyoto) Metabolic selection for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Shugo Tohyama, Fumiyuki Hattori, Motoaki Sano, Takako Hishiki, Yoshiko Nagahata, Hisayuki Hashimoto, Makoto Suematsu, Keiichi Fukuda

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

F. Hattori and K. Fukuda. WO2007/088874;  
PCT/JP2007/051563, 2007

### 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（難治性疾患等克服研究事業（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

—マウス心腎連関モデルを用いた腎不全による心不全悪化の機構の検討—

研究分担者：磯部 光章（東京医科歯科大学 循環制御内科学講座）

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。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

生活習慣病の広がりに伴い、糖尿病や高血圧に関連した腎機能障害患者数が著しく増えている。腎不全により重度の心不全を引き起こすことや治療効果の低下が問題点である。この病態は心腎連関とよばれており、これを明らかにすることは医学的に解決すべき重要な点である。病態機序の解明には最適な動物モデルの作製が重要となるため、本研究では心腎連関モデルの作製を目指した。またそのモデルを用いた病態解析も同時に行った。

B. 研究方法

マイクロサージェリーの手法を用いてマウス腎不全合併心筋梗塞モデルをした。マウスを麻酔後、左腎の腎動脈の上端と下端を結紮。1週間経過観察を行った後もう右腎を完全に摘出させ腎臓亜全摘モデルを作成した。腎不全モデル作製後4週に心臓の冠動脈前下降枝の血流を遮断することにより心筋梗塞モデルを作成した。このモデルの血圧、心拍数、心エコーにて生理学的指標を計測し、RT-PCRやコラーゲン定量により心不全の程度を非腎不全動物と比較検討した。

（倫理面への配慮）

一匹のマウスに複数回の手術を行うので、ひどい衰弱が見られることがある。その場合、実験

を中止し、すぐに安楽死を行った。

C. 研究結果

腎不全の誘導により血圧、クレアチニン、血漿のレニン活性の上昇が確認でき、心筋梗塞と腎不全との合併より心機能の悪化や梗塞層の進展と菲薄化が認められた。またこのモデルにおける心臓ではコラーゲンの発現、MCP-1、Nox2やNox4などの酸化ストレスが有意に高いことが分かった。これにより腎不全の合併により心筋梗塞後の心筋リモデリングが助長することが確認できた。腎不全によるこれらの変化にはレニン活性の上昇が関わっていると考え、レニン阻害剤であるアリスキレンを投与した。またアリスキレン投与による血圧の低下の影響を確認する為に血管拡張剤であるヒドララジンを投与した群も作製した。アリスキレンおよびヒドララジンは同等の血圧の低下を示したが、ヒドララジン投与群では心機能の改善が見られなかったが、アリスキレン投与群では心機能の改善、コラーゲンの発現の減少および酸化ストレスの減少が認められた。またNoxの阻害剤であるアポサイニンを投与した群も作製しており、これによっても腎不全合併による心筋リモデリングの改善が認められた。これらの結果により腎不全によるレニンの活性が酸化ストレスを誘導し、心不全悪化を誘導したと考えられる。

## D. 考察

心腎連関モデルの解析によって腎不全の存在によって心筋梗塞後の心機能の重症化とリモデリングの亢進を確認することが出来た。心臓と腎臓は距離が離れているので、この二つの臓器間の関係に影響を与える因子として生体内での寿命の長いホルモンやその類似物質がその病態の主体であると考えられる。腎不全を起こした腎臓の傍糸球体上からレニンが産生され、それにより全身のレニン上昇と活性がおこり心筋梗塞心における心筋および炎症性細胞から産生される酸化ストレスおよび炎症がこの病態機構に関係すると考えられる。レニンを含めレニン・アンジオテンシン系は AT1 受容体を介して種々の酸化ストレスや炎症を誘導することは知られている。そのためレニン阻害剤だけでなく、ACE 阻害剤や ARB などの他のレニン・アンジオテンシン系阻害薬も同様に心腎連関に有効であると考えられる。レニン・アンジオテンシンの活性は血圧の上昇を引き起こす。血圧は心血管病のリスクファクターであるが、今回の結果では血圧の調整だけでは有効な病態改善は見られなかった。これにはレニン・アンジオテンシンの血圧上昇以外の直接的な酸化ストレスの亢進が影響していると考えられる。Nox2 と 4 は心臓において心筋リモデリングや肥大など、心血管病の進展に深く関与している。またその発現は AT1 受容体を介していることが知られており、このモデルにおいても Nox の発現が病態悪化に繋がったと考えられる。これらの結果により心腎連関はレニンの上昇とそれによる酸化ストレスの亢進がこの病態に関与していることが示唆された。

## E. 結論

腎不全モデルと心筋梗塞モデルとの組み合わせにより心腎連関モデルを作製することが出来た。また腎不全との合併より心不全の悪化はレニンの活性が重要であることが確認できた。レニン阻害剤は将来の心腎連関治療薬として期待することが出来る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ogawa M, Suzuki J, Takayama K, Senbonmatsu T, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. Impaired post-infarction cardiac remodeling in chronic kidney disease is due to

excessive renin release. Lab Invest. Dec;92(12):1766-76 2012.

### 2. 学会発表

1) Ogawa M, Suzuki J, Hirata Y, Nagai R, Isobe M.

「A direct renin inhibitor negates ischemia-induced cardiac remodeling with chronic kidney disease through oxidative stress reduction in mice」米国心臓病学会(AHA), #AOS.718.01, オーランド, 11月2011年。

2) Suzuki J, Ogawa M, Hirata Y, Nagai R, Isobe M.

「A direct renin inhibitor significantly improves survival and cardiac remodeling after myocardial infarction in the condition of renal failure」米国心臓病学会(AHA) #AOS718.01, シカゴ, 11月2010年。

3) Suzuki J, Ogawa M, Hirata Y, Nagai R, Isobe M.

「Renin angiotensin system play a crucial role in the development of myocardial ischemia reperfusion injury with a condition of renal failure in mice」米国心臓病学会(AHA), #5263, オーランド, 11月2009年。

## 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（難治性疾患等克服研究事業（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

—ミトコンドリア病における複合体V活性測定の意義—

研究分担者：後藤 雄一（国立精神・神経医療研究センター 神経研究所）

**研究要旨** 従来から測定が困難とされている呼吸鎖酵素複合体V（ATP合成酵素）の逆反応（ATP分解活性）は、比較的容易に測定できることが報告されている。われわれは、すでに病因的であると証明されている 8993 変異や 9176 変異を含む 18 例の複合体V領域の点変異を持つ症例（アミノ酸の非同義置換を伴うもの）について ATP 分解活性を測定した。8993 変異や 9176 変異はこの方法で明らかな活性低下を示し、ATP 分解活性で複合体V活性の評価をすることが可能であることを示した。18 例の内、13 例で複合体V活性の低下を認め、さらにその 5 例で複合体I活性低下、1 例で複合体IとIIIの低下も示した。これら 6 例には、mtDNA 上の複合体IとIIIに関連するサブユニットには変異がなく、核DNA上の関連遺伝子の変異が合併しているか、複合体V活性低下による活性酸素が二次的に作用している可能性が考えられた。

A. 研究目的

ミトコンドリア病診断のための生化学検査では一般にミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性測定が行われる。呼吸鎖複合体はミトコンドリア内膜に存在する複合体I-Vの5つの酵素から構成されている。多くのミトコンドリア病の生化学検査では、ATP合成を行う複合体Vの活性測定がその測定が難しいために行われていないのが現状である。しかし、ミトコンドリア脳筋症においても複合体Vの異常は報告されており、正確な診断を行うために測定系の確立が必須であると考えられる。

そこで我々は、以前報告のあった複合体Vの可逆的な反応を利用した酵素活性測定法に着目した。複合体Vの逆反応であるATP分解反応を利用する方法であり、それを基にミトコンドリア病患者検体を用いた生化学検査としての複合体V活性測定法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センター神経研究所では、診断依頼で骨格筋や血液が送られてきており、その中で複合体Vサブユニットに非同義置換を起こす変異を有する18人の患者検体の骨格筋を用いた。

ATP分解反応による活性は、Moravaらの方法を用い、過量のATPの存在下では、ATPの分解がNADHの酸化

反応と共役していることを利用して、NAD<sup>+</sup>をモニターすることで測定した。

（倫理面への配慮）

ミトコンドリア病に関する診療、研究に使用する患者由来の検体に関しては国立精神・神経医療研究センター倫理委員会にて承認された説明文書、同意文書を使用してICを取得している（2001年7月承認、2009年5月改正承認）。

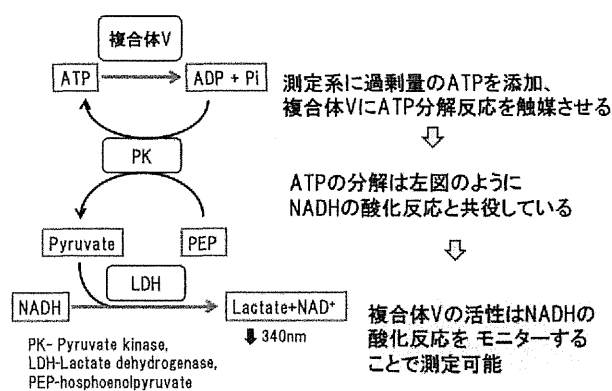


図1 複合体V逆反応の活性測定原理

C. 研究結果

病因性が証明されている、m.8993T>G変異例の結果は、複合体V活性はコントロールの19%にまで低下していた。

さらに、m.9176T>C 変異例を測定すると、複合体 V 活性がコントロールの 30-40% 程度に低下しているとともに、複合体 I と複合体 III も有意に低下していた。

上記 2 例を含めて、ATP6 もしくは ATP8 領域に非同義置換を起こす遺伝子変異を有する 18 例についてまとめると、13 検体で複合体 V 活性が低下していた。その 13 検体のうち、複合体 V 活性のみの低下を示した例は 7 例、複合体 I 活性の低下も示した例が 5 例、複合体 I と複合体 III も低下していた例は 1 例認められた。

mtDNAの複合体Vサブユニットコード領域に非同義置換を有する18検体のうち

複合体V活性低下がみられた検体…13検体 (13/18)

複合体V活性のみ低下 …7/13

複合体 I、Vの低下 …5/13

複合体 I、III、Vの低下 …1/13

複合体 I、III 関連のmtDNA変異なし  
(複合体 I、III 関連の核遺伝子に変異がある可能性)

複合体Vの障害に伴って発生した活性酸素による影響の可能性

図2 複合体V変異患者18例の生化学検査結果内訳

複合体 I、複合体 I+III の活性低下を認めた 6 例には、mtDNA 上に複合体 I もしくは複合体 III に関連するサブユニットに変異を認めなかった。

#### D. 考察

呼吸鎖複合体はミトコンドリア内膜に存在する複合体 I-V の 5 つの酵素から構成され、複合体 I-IV は電子伝達系と呼ばれ、内膜における電子の授受を介して、水素イオン (H<sup>+</sup>) を膜間スペースに輸送する。複合体 V は電子伝達系によって生じた膜内外の H<sup>+</sup>濃度勾配 (電位差、pH 差) を用いて ATP 合成を行う。複合体 I-IV の酵素活性は各々の酵素の基質を添加した反応系において比色定量する方法が広く用いられている。一方、複合体 V の ATP 合成反応は膜内外の H<sup>+</sup>濃度勾配を必要とし、定量的な活性測定には測定に用いるミトコンドリア内膜の均一性を考慮する必要がある。

今回行った ATP 合成酵素の逆反応を用いる複合体 V 活性の測定は、これまで病因性が種々の方法で示されてきた 8993 変異や 9176 変異例で確実に活性低下を証明しており、臨床的にも十分利用可能であると判断した。18 例のうち、

活性低下を示さなかった 5 症例は、変異がヘテロプラスミであったり、アミノ酸置換が同種類のものであったりして、SNP である可能性が高い。

興味深いことは、複合体 V 活性の低下とともに、複合体 I や複合体 III の活性も低下する症例が存在していることである。

本研究で複合体 V 以外の複合体活性の低下を示した 6 例のは、関係する核 DNA 上の遺伝子変異が合併している可能性と、複合体 V 活性低下に伴って発生した活性酸素による二次的な低下の可能性が考えられる。

6 例の中で培養細胞 (筋芽細胞) を有する症例で、呼吸鎖酵素活性を測定したところ、複合体 V 活性低下とともに副五体 I 活性の低下を認めたが、活性酸素除去剤である NAC 処理を行うと複合体 I 活性は晴雨上に復するという preliminary な実験結果を得た。このことは、複合体 V 活性低下による活性酸素の発生が、他の複合体の活性を低下させることを示す可能性を示すものである。

#### E. 結論

複合体 V の活性を ATP 合成酵素分解反応で評価する方法は、臨床的に有用である。複合体 V 活性の低下により、複合体 I や III の低下を認めることがあり、複合体 V 活性の測定を行わないと二次的に引き起こされている複合体 I や III 活性の低下を primary と見誤る可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Hum Mut 34:446-452, 2013
- 2) Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). A

homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 49: 777-784, 2012

- 3) Furukawa R, Yamada Y, Matsushima Y, Goto Y, Harashima H. The manner in which DNA is packed with TFAM has an impact on transcription activation and inhibition. *FEBS OpenBio* 2: 145-150, 2012

## 2. 学会発表

- 1) Goto Y. Mitochondrial disease. Joint Congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 5.27-6.1, 2012
- 2) Goto Y, Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino K, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. The 11th Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012
- 3) 後藤雄一. ヒトミトコンドリアの特性-ヒト疾患の病態基盤. 第12回日本ミトコンドリア学会, 筑波, 12.21, 2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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

—拡張型心筋症における心収縮予備能の測定意義—

研究分担者：室原 豊明（名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学）

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計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

【背景】心肺運動負荷試験(cardiopulmonary exercise testing; CPX)による運動耐容能指標の1つである最大酸素摂取量(peak oxygen consumption; peak VO<sub>2</sub>)は、心不全における予後予測因子として確立されている。また、ドブタミン負荷による左室収縮応答も予後予測に有用であるとの報告がある。われわれは、拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy; DCM)患者38例を対象とした先行研究において、ドブタミン負荷試験による心筋収縮予備能は、peakVO<sub>2</sub>と有意に相関し、独立した規定因子であることを報告した(Okumura T, Murohara T, et al. *Int J Cardiol* 162; 234-239, 2013)。しかしながら、DCMにおける心収縮予備能および運動耐容能と予後との関連に関しては、未だ十分に明らかでない。

【目的】DCM患者において、標準的心不全治療の下で、心収縮予備能および運動耐容能と臨床予後について検討した。

B. 研究方法

対象は、2007年12月から2012年1月までに当院にてDCMと診断された連続52例。全例に、心臓超音波検査、心臓カテーテル検査、ドブタミン負荷試験、CPX、血液検査を実施した。CPXにおいては、エルゴメータを用いた毎分10W漸増ランプ負荷にて症候限界性に運動耐容能評

価を行い、peak VO<sub>2</sub>を測定した。ドブタミン負荷試験においては、左室内腔にマイクロメータ付きピグテールカテーテルを留置し、LV dP/dt<sub>max</sub>を測定した。従来の報告に従い、ドブタミン10 $\gamma$ 負荷時におけるベースラインからのLV dP/dt<sub>max</sub>の増加率( $\Delta$ LV dP/dt<sub>max</sub>(10))を算出し、心収縮予備能の指標と定義した。標準的心不全治療下に、全症例に対し予後追跡評価を行い(平均1040日)、心血管イベント(心臓死および心不全増悪入院)の有無を評価した。

(倫理面への配慮)

インフォームド・コンセントにおいては、書面にて直接本人に検体採取および解析に関する説明を十分に行い、同意を得る。被験者より取得した同意書(2部)のうち、1部は施錠可能なキャビネットに保管する。また、本人控えとして被験者自身に1部を譲渡する。各個人に対して匿名化番号を割り当て、各種検査データはパスワードで保護されたインターネット接続を有しないハードディスク内に保・管理される。さらに、ハードディスクは施錠可能なキャビネットに保管する。得られた検査データは、研究目的以外に使用しない。研究途中での同意の撤回は、いつでも自由意思に基づいて行えるものとし、その際の当該検体は廃棄処分とする。研究結果の分析結果は、個人が同定されないよう十分に配慮した上で国内外学会や論文発表を行う。

## C. 研究結果

平均年齢は 52 歳，左室駆出率および BNP は 34%，178 pg/mL であった。CPX およびドブタミン負荷試験検査時における ACE 阻害薬，ARB， $\beta$  遮断薬の服用率は，それぞれ 23%，50%，56% であった。peak VO<sub>2</sub> は，平均 18.3 mL/分/kg であった。 $\Delta$ LV dP/dtmax(10)は，peak VO<sub>2</sub> と有意に相関した(r=0.38, p=0.006)。心血管イベントに対する心収縮予備能および peak VO<sub>2</sub> の ROC 曲線は概ね一致し，AUC は同等であった(AUC-peak VO<sub>2</sub>=0.691, AUC- $\Delta$ LV dP/dtmax(10)=0.692)。peak VO<sub>2</sub><18 群では，心血管イベントが有意に高く(OR=3.18, p=0.029)， $\Delta$ LV dP/dtmax(10)<60% 群でも高率に心血管イベントを認めた(OR=3.25, p=0.006)。

## D. 考察

本研究においてわれわれは，DCM 患者における peak VO<sub>2</sub> は，ドブタミン負荷試験における左室収縮応答，すなわち心収縮予備能を反映し，予後予測に有用であることを示した。心血管イベントに関する両者の ROC 曲線は一致し，検査精度として同程度であるものと考えられる。peak VO<sub>2</sub> は，心不全の確立された非侵襲的な予後予測指標として，重症心不全患者の心臓移植適応判定基準にも利用されている。しかしながら，このような患者では，運動障害あるいは強い心不全症状のため，十分な運動負荷検査が施行できないことも多い。心収縮予備能を非侵襲的に評価可能な手段の開発が今後の課題であるが，このような患者群の予後予測において，ドブタミン負荷試験と運動負荷試験が相補的に有用であると考えられる。本研究結果は，既に論文文化に向けて提出準備中である。

## E. 結論

本研究から，DCM 患者において，CPX における運動耐容能指標の 1 つである peak VO<sub>2</sub> は，心収縮予備能を反映し，予後予測に有用である。ドブタミン負荷による心収縮予備能評価は，DCM の予後予測において，運動耐容能評価と相互補完的な検査になりうる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Okumura T, Murohara T, et al. Association

between cardiopulmonary exercise and dobutamine stress testing in ambulatory patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a comparison with peak VO<sub>2</sub> and VE/VCO<sub>2</sub> slope. *Int J Cardiol* 162; 234-239, 2013.

2) Shigeta T, Aoyama M, Bando YK, Monji A, Mitsui T, Takatsu M, Cheng XW, Okumura T, Hirashiki A, Nagata K, Murohara T. Dipeptidylpeptidase-4 modulates left-ventricular dysfunction in chronic heart failure via angiogenesis-dependent and -independent actions. *Circulation*. 2012; 126: 1838-1851.

3) Shimazu S, Hirashiki A, Okumura T, Yamada T, Okamoto R, Shinoda N, Takeshita K, Kondo T, Niwa T, Murohara T. Association between indoxyl sulfate and cardiac dysfunction and prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ. J* 2012

4) Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Kito T, Maruyama S, Yuasa D, Matsuo K, Enomoto T, Uemura Y, Miyabe M, Ishii M, Yamamoto T, Shimizu Y, Walsh K, Murohara T. Therapeutic impact of Follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical animal models. *Circulation*. 2012; 126: 1728-1738.

### 2. 学会発表

1) Yasuko K Bando, Toyoaki Murohara. Therapeutic And Diagnostic Significances of Dipeptidyl-peptidase 4 in Diabetic Cardiomyopathy. シンポジウム 19 (英語)「新しい抗糖尿病薬は循環器疾患予防に貢献できるか?」第 77 回日本循環器学会総会 (横浜) 平成 25 年 3 月 15 日

2) Morihiko Aoyama, Yasuko K Bando, Toyoaki Murohara. Dipeptidylpeptidase-4 activation accelerates cardiac fibrosis via MMP2/TIMP2 axis in diabetic heart. Featured Research Session (FRS-066) 第 77 回日本循環器学会総会 (横浜) 平成 25 年 3 月 15 日

3) Toko Mitsui, Yasuko K Bando, Morihiko Aoyama, Toyoaki Murohara. Glucagon-like peptide-1 receptor activation ameliorates metabolic cardiac remodeling via decline in mitochondrial oxidative stress in diabetic heart. Featured Research Session (FRS-069) 第 77 回日本循環器学会総会 (横浜) 平成 25 年 3 月 15 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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

—ゼブラフィッシュモデルを用いた肥大型心筋症の病態解明—

研究分担者：山岸 正和（金沢大学 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。従来個別研究に加え、サブグループ研究班の計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心筋トロポニンIはサルコメア蛋白の一つであり、その遺伝子 (*TNNI3*) 変異は肥大型心筋症 (HCM) を引き起こす。我々は以前、HCM 大家系において *TNNI3* 遺伝子 Lys183del 変異を同定し、変異保因者は40歳以降に左室収縮不全が進行することを報告したが、その機序は不明であった。*TNNI3* 遺伝子変異マウスを作成することは機序解明の一助となる可能性があるが、マウスはHCM発症までに約1年と長期間を要する。一方、小型魚であるゼブラフィッシュでは、受精卵への遺伝子導入後72時間以内に心臓の表現型を直接顕微鏡下に観察し得る。本研究の目的は、(1) *TNNI3* 遺伝子 Lys183del 変異を導入した HCM ゼブラフィッシュモデルを確立し、(2) それを用いて HCM における左室収縮不全進展の新しい機序を解明することである。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュ受精卵に導入する遺伝子変異は、申請者らが HCM の原因として同定し報告したヒトの *TNNI3* 遺伝子 Lys183del 変異とした。導入後の *in vivo* における心機能解析を効率よく行うために、体表面色素の薄いゴー

ルデン・ゼブラフィッシュを使用した。心臓特異的トロポニンI蛋白 (cTnI) 発現および蛍光蛋白による cTnI 発現検出を目的として、MLC-2 プロモーター下流に cTnI-GFP を組み込んだコンストラクトを作成した。遺伝子導入システムは *Tol2* 転移システムを用い、野生型または変異型 cTnI コンストラクトとともに *Tol2* mRNA をマイクロインジェクション法により受精卵に導入した。

(倫理面への配慮)

本研究は金沢大学動物実験規定に沿って手続きを行っており、倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

遺伝子導入48~72時間の時点で、F0ゼブラフィッシュにおいて心臓に高効率に cTnI が発現するラインが確認された。しかしながら48~72時間の時点では、野生型ゼブラフィッシュと比較して変異型ゼブラフィッシュにおける心室および心房サイズの拡大は認められず、心室壁厚の増加も認められなかった。また、心室壁運動についても野生型ゼブラフィッシュと比較して変化は認められなかった。

## D. 考察

野生型および変異型 *TNNI3* (Lys183del)ゼブラフィッシュを作成し、心臓への cTnI 発現が確認された。しかしながら遺伝子導入から 48~72 時間の時点においては、変異型ゼブラフィッシュの心形態や心機能に明らかな異常は認められなかった。同様の結果は HCM マウスモデルを用いた従来の研究でも認められており、圧負荷や薬剤負荷を行うことにより野生型と比較して変異型マウスにおいて心肥大が顕著となったと報告されている。したがってゼブラフィッシュ HCM モデルにおいても、サルコメア変異に加えて何らかの 2nd hit が心肥大や心機能障害の発症進展に必要であると推測される。今後、野生型および変異型ゼブラフィッシュモデルの受精卵にアンチセンス・モルフォリーノオリゴを用いた標的遺伝子ノックダウンを行い、HCM 発症および心不全進展機序の解明を目指す。

## E. 結論

*TNNI3* (Lys183del) 変異を導入したゼブラフィッシュモデルを作成した。今後、本モデルを用いて HCM 発症および心不全進展機序の解明を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] Fujino N, Konno T, Hayashi K, Hodatsu A, Fujita T, Tsuda T, Nagata Y, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M. Impact of systolic dysfunction in genotyped hypertrophic cardiomyopathy. Clin Cardiol. 2013 Mar;36(3):160-5.
- [2] Liu L, Hayashi K, Kaneda T, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Konno T, Tsuda T, Kawashiri MA, Ueda K, Higashikata T, Shuai W, Kupersmidt S, Higashida H, Yamagishi M. A novel mutation in the transmembrane nonpore region of the KCNH2 gene causes severe clinical manifestations of long QT syndrome. Heart Rhythm. 2013 Jan;10(1):61-7.
- [3] Yoshida S, Miwa K, Matsubara T, Yasuda T, Inoue M, Teramoto R, Okada H, Kanaya H, Hayashi K,

Konno T, Kawashiri MA, Yamagishi M. Stress-induced takotsubo cardiomyopathy complicated with wall rupture and thrombus formation. Int J Cardiol. 2012 Nov 1;161(1):e18-20.

### 2. 学会発表

- [1] Takashi Fujita, Noboru Fujino, Tetsuo Konno, Masanori Asakura, Masafumi Kitakaze, Toru Kubo, Yoshinori Doi, Shintaro Kinugawa, Hiroyuki Tsutsui, Issei Komuro, Ryuichiro Anan, Chuwa Tei, Masakazu Yamagishi. Impact of Sarcomere Gene Mutations on Clinical Outcome of Left Ventricular Hypertrophy: Evidence from Comparison with Hypertension-related Hypertrophy. Circulation. 2012; 126: A11940
- [2] Akihiko Hodatsu, Tetsuo Konno, Akira Funada, Takashi Fujita, Kenshi Hayashi, Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi. Compound heterozygosity of Cardiac Myosin Binding Protein C Gene Mutation Worsens Clinical Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy: Evidence from Comparison with Simple Founder Mutation Carriers. Circulation. 2012; 126: A17669
- [3] Kenshi Hayashi, Satoyuki Tani, Li Liu, Hidekazu Ino, Noboru Fujino, Tetsuo Konno, Akihiko Hodatsu, Toyonobu Tsuda, Akihiro Inazu, Haruhiro Higashida, Masa-aki Kawashiri, Masakazu Yamagishi. Functional Characterization of Cardiac Ion Channel Gene Variants in Lone Atrial Fibrillation. Circulation. 2012; 126: A13864

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特記すべきことなし。

### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし。

### 3. その他

特記すべきことなし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（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

—代謝異常に着目した新しい特発性心筋症の診断・治療法の開発—

研究分担者：木村 剛（京都大学大学院医学研究科 循環器内科学）

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計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心臓のポンプ機能の低下に伴う心不全は特発性心筋症に高頻度に合併し予後を規定する。心臓は全身への循環を維持し続けるために拍動し続けるが、そのために膨大なエネルギーを消費する。心臓はエネルギー基質として主に脂肪酸を利用するが、心不全に陥った場合、糖を主に使用する。しかし、このような基質利用の変化が心不全の保護因子なのか悪化因子なのかは明らかでない。本研究では、心臓における解糖系の役割を明らかにするため、解糖系酵素であるホスホグリセリン酸ムターゼ（Phosphoglycerate mutase: Pgam）が心臓のエネルギー代謝と機能にどのような役割を果たしているか検討した。

B. 研究方法

ホスホグリセリン酸ムターゼには脳型（Pgam1）と筋型（Pgam2）が存在し心臓では筋型が主に発現している。ミオシン重鎖プロモーターを用いて Pgam2 を恒常的かつ心臓特異的に強発現するトランスジェニックマウス（以下 Pgam2 マウス）を作成し、心臓のエネルギー代謝および心機能を解析した。

（倫理面への配慮）

実験は京都大学動物実験施設の倫理委員会の許可を得て行われた。

C. 研究結果

Pgam2 マウスは正常に生存し、安静時の心機能、心重量に異常を認めなかった。MR スペクトロスコピーを用いた心臓組織中のクレアチンリン酸量は正常であった。また、糖および脂肪酸の取り込みも正常であった。

Pgam2 の強発現が心臓のエネルギー代謝にあたる影響を検討するため、心臓組織のメタボローム解析を行った。メタボローム解析により以下が明らかとなった。①解糖系において、前半の代謝産物である glucose 6-phosphate（G6P）に変化はなかった。Pgam 前後の代謝産物量（3-phosphoglycerate: 3PG, 2-phosphoglycerate: 2PG, phosphoenolpyruvate: PEP）が増加していた。解糖系の最終産物の1つである lactate に変化は見られなかった。②TCA 回路前半の代謝産物が増加し後半の代謝産物が減少していた。③グルタチオンなどアミノ酸およびその代謝産物に変化がみられた。

Pgam2 の恒常的な強発現が解糖系に与える影響を検討したところ、解糖系の酵素の遺伝子発現の現象がみられ、解糖系の律速酵素である phosphofructokinase（PFK）の活性低下が見られた。

TCA 回路は細胞のエネルギー産生の主たる場であるミト

コンドリアに存在するため、ミトコンドリアを単離しその機能を測定したところ、酸素消費量が低下し、活性酸素種の産生が増加していた。また、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子の全般的な発現低下が見られた。

単離したミトコンドリアの機能異常が見られたため、心臓の機能的な予備能を検討した。①ドブタミン負荷を行った際の心臓収縮予備能が低下していた。②大動脈縮窄を行うと野生型マウスにおいて心機能が保たれていたが、Pgam2マウスは心不全を発症した。

#### D. 考察

Pgam2 強発現は安静時の心機能に影響を与えなかったが、ドブタミン負荷や大動脈縮窄による圧負荷などのストレスに対する抵抗性を低下させた。この原因の1つとしてミトコンドリア機能の低下が考えられる。Pgam2 強発現がミトコンドリア機能を低下させる仕組みは明らかでないが、1つの可能性はPgam2 強発現により解糖系など細胞質に存在するエネルギー代謝経路が攪乱され、その影響がいわゆる“mitochondrial retrograde signal”によってミトコンドリア機能を低下させと考えられる。本検討において、増加していた解糖系の代謝産物である3PG、2PG、PEPはミトコンドリア機能を低下させるとの報告もある。

本研究において安静時において、糖の取り込み、G6P、乳酸に変化がなかったため、少なくとも安静時には解糖系の流れ(flux)は変化していなかったと推察する。解糖系酵素の遺伝子発現の低下と解糖系律速酵素PFKの活性低下を伴っており、恒常的Pgam2強発現に対して解糖系の流れを一定に保とうという代償機能が働いていると考えられ、代謝の頑健性(ロバストネス)の一例と考える。しかし、解糖系の流れは本来灌流心を用いて測定されるべきであり、本研究ではそれを行っておらず本研究の限界の1つである。

ペーシングによる高頻拍刺激による心不全モデルにおいてPgamのタンパク量が増加していたとの報告もあり、Pgamの心不全への関与がさらに検討される必要があると考えられる。

#### E. 結論

解糖系酵素であるPgam2の強発現は心臓のエネルギー代謝を変化させ、心臓のストレス抵抗性を低下させた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ozasa N, Morimoto T, Bao B, Shioi T, Kimura T. Effects of machine-assisted cycling on exercise capacity and endothelial function in elderly patients with heart failure. *Circ J*. 76, 1889-1894, 2012
- 2) Niizuma S, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Kawashima T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Effect of persistent activation of phosphoinositide 3-kinase on heart. *Life Sci*. 90, 619-628, 2012
- 3) Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Kawamoto A, Tamaki Y, Iwanaga Y, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis of liver metabolism in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol*. 161, 130-136, 2012

##### 2. 学会発表

- 1) Kato T, Shioi T, Kawamoto A, Kimura T, Nagakura D, Nakane E, Miyamoto S, Izumi T, Haruna T, Inoko T, Nohara R. Tc-99m Sestamibi washout is a useful method to assess cardiac mitochondrial function and the increased risk of a failing heart: a translational approach to understand the metabolic state of the heart. The 84th Scientific Sessions of American Heart Association, November 3-6, 2012, Los Angeles, USA.
- 2) Kato T, Shioi T, Niizuma S, Kawashima T, Okuda J, Kawamoto A, Soga T, Kimura T. Abnormal liver metabolism and pro-inflammatory responses as modulators of cardiac cachexia in a rat model of heart failure. European Society of Cardiology Congress 2012. August 25-29, 2012, Munich, Germany
- 3) Kato T, Shioi T, Kawashima T, Kawamoto T, Kimura T. Mitochondrial function as a potential mediator of metabolic remodeling in the heart. European Society

of Cardiology Congress 2012. August 25-29, 2012,  
Munich, Germany

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（難治性疾患等克服研究事業（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

一心不全増悪への慢性持続性炎症の関与についての研究；  
不全心におけるミトコンドリア DNA と DNase II の役割—

研究分担者：小室 一成

（東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学・（旧）大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学）

研究要旨

心不全の進展に炎症機転が関与していることが示唆されている。我々は、血行力学的負荷による無菌的炎症を惹起する機序を明らかにするため、不全心筋のオートリソソーム内にミトコンドリア DNA 由来の DNA 蓄積が認められることからミトコンドリア DNA の分解系に着目した。圧負荷によって変性したミトコンドリアはオートファジーによって処理される。取り込まれたミトコンドリア DNA の分解に関与するリソソーム DNase II の心筋特異的欠損マウスは、圧負荷早期に心不全死を呈し、心不全発症に DNase II が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、炎症を惹起する機序については、分解を免れた DNA の非メチル化 CpG モチーフを認識する TLR9 経路が重要であることを TLR9 欠損マウスによって解明した。今後、DNase II や TLR9 を分子標的とした新しい心不全治療への展開が期待される。

A. 研究目的

心不全患者は我が国に200万人以上存在すると推定される。心不全はわが国を含む先進国の主要な死因であり、また、患者の生活の質を低下させている。心不全発症進展機序としては、虚血、線維化、細胞死、炎症、代謝調節など様々な仮説が挙げられている。これらの仮説に基づく心不全の分子機構解明と新たな創薬分子標的に基づく治療法開発が大きな課題となっている。炎症に関わる心臓病態としては、心筋炎のほかに虚血再灌流障害、外傷、敗血症性ショック、移植後拒絶反応などが挙げられる。不全心筋組織においても炎症性細胞浸潤像がしばしば見受けられることから、心不全発症進展にも炎症機転が関わるとの概念が古くから提唱されてきた。心不全における具体的な炎症性因子の関与については、TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの上昇からこれらに基づく炎症機転が心不全の進展において重要な役割を果たしていることが示唆され、サイトカインを標的とした心不全治療が模索されてきた。しかし、抗 TNF $\alpha$  抗体などの心不全治療効果は期待に十分に応えるものではなかった。一方、心筋の虚血再灌流傷害における死細胞除去機構などの内在性素因による炎症などは知られていたが、血行動態負荷による炎症惹起

分子機構は不明である。そこで本研究は、心臓における無菌的炎症の機序を明らかにする目的で、炎症惹起物質としてミトコンドリア DNA に着目した。血行力学的ストレスによりミトコンドリアは変性を受け、細胞内分解系であるオートファジーとリソソームによって分解・処理される。その際、ミトコンドリア DNA の分解にリソソーム内の DNA 分解酵素である DNase II が重要な役割を果たしている。不全心ではオートリソソーム内の DNA 蓄積が認められることから、リソソーム内の DNase II が心不全の発症進展に重要な役割を果たしている可能性があり、DNase II 欠損マウスを用いて解析を行った。

B. 研究方法

マウス心不全モデルとして、横行大動脈縮窄手術 (transverse aortic constriction : TAC) を用いた。野生型マウスでは TAC 術後1週では圧負荷に対する代償反応として心肥大を呈するが、術後10週で代償機構が破綻し心拡大、心収縮力低下をきたし心不全を呈する。野生型マウスに TAC を施行し、心不全期の炎症反応を評価したところ著明な炎症細胞の浸潤を認めた。また高感度の DNA 染色剤 PicoGreen を用いた染色法により不全心においてオートリ

リソソーム内に DNA 蓄積が認められる。

DNA の蓄積という現象が不全心における炎症と関与しているか検討するために、DNase II 遺伝子を心筋細胞において欠失させてリソソーム内にミトコンドリア DNA を蓄積させるという発想から、心筋細胞特異的 DNase II 欠損マウスを作製した。この DNase II 欠損マウスは定常状態においては対照群に比して心臓表現型に有意な差を認めなかった。

細菌やウイルス DNA の非メチル化 CpG モチーフは自然免疫系の TLR9 により認識される。類似構造をもつミトコンドリア DNA も TLR9 に認識されるという報告があり、われわれは DNase II 欠損マウスの圧負荷後の心不全発症メカニズムとして、リソソームに蓄積したミトコンドリア DNA が、同じくリソソーム内に存在する TLR9 シグナルが関与するという仮説をたて、DNase II 欠損マウスに TLR9 シグナルの阻害剤として TLR9 抑制オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を TAC 術前と術後 2 日目に投与した。また、TLR9 欠損マウスを導入し、TLR9 欠損マウス、あるいは、DNase II とのダブルノックアウトマウスの TAC モデルを解析した。

#### (倫理面への配慮)

該当なし。

### C. 研究結果

Deoxyribonuclease 2 (DNase II) はリソソーム内に存在する DNA 分解酵素である。野生型マウスに横行大動脈縮窄圧負荷手術を施行したところ、不全心のみで CD45, CD68 陽性の炎症細胞浸潤を認めた。また心不全期において、オートリソソーム内の DNA 蓄積が認められた。心筋細胞特異的 DNase II 欠損マウスを作製解析した結果、この遺伝子改変マウスは圧負荷手術により早期に心不全による死亡を呈した。本マウスは術後早期 2 日目時点で既に CD45, CD68, Ly6G 陽性炎症細胞浸潤、IL-6, IL-1 $\beta$  mRNA 発現の有意な増加で示される炎症反応を呈した。電子顕微鏡上、オートリソソーム内に存在するミトコンドリア様構造物を認め、さらに免疫電子顕微鏡法では同構造物内に抗 DNA 抗体陽性シグナルが観察された。また蓄積 DNA はミトコンドリア DNA であることが示された。非心筋細胞の関与を除去するため、DNase II 欠損成獣マウスから心筋細胞を単離して検討を行った。その結果、

DNase II 欠損心筋細胞において炎症細胞の関与無しにオートファジー依存性に炎症が惹起されることが明らかとなった。ミトコンドリア DNA は上述の通り非メチル化 CpG モチーフを有し、細菌 DNA と同様に TLR9 に認識される。そこで TLR9 とのダブルノックアウトマウスを作製したところ、炎症並びに心不全の表現型が救済されたため、TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。また TLR9 欠損マウスの解析により、野生型マウスにおける圧負荷後心不全においても TLR9 経路が関与していることが示された。以上より不完全なオートファジーによって分解を免れたミトコンドリア DNA の蓄積および TLR9 経路が、圧負荷不全心における炎症反応に関与していることが明らかとなった。

### D. 考察

このように、われわれの研究は、心臓において生じる無菌的炎症の分子機構に心筋細胞内の未処理のミトコンドリア DNA が関与していることを明らかとした。今回は心不全をターゲットに研究を行ったが、その他の臓器における無菌的慢性炎症性疾患の発症にも同様のメカニズムが関与している可能性がある。

他研究室から、血中に細菌の存在が証明されないにも関わらず systemic inflammatory response syndrome (SIRS) を起こした臨床例において血中に挫滅した組織由来のミトコンドリア DNA が有意に漏出しており、同様に漏出したホルミル化タンパク質とともに炎症の原因となるという報告が 2010 年にされたのを皮切りに、ミトコンドリア DNA の炎症惹起性について注目が集まっている。また、マクロファージにおいてオートファジーが抑制された際に傷害ミトコンドリアから細胞質に漏出したミトコンドリア DNA が NALP3 インフラマソームを活性化するという報告、ROS により傷害を受け酸化されたミトコンドリア DNA が炎症惹起性を持つという報告などが近年されており、ミトコンドリア DNA が内在性の炎症惹起物質であるという説が提唱されている。

### E. 結論

心不全の進展に慢性持続性炎症に関与している可能性は高い。われわれは、圧負荷心不全モデルマウスにおいて、無菌的炎症を惹起するメカニズムとして、心筋細胞内のミ

トコンドリア DNA の蓄積する機序と TLR9 や DNase II が関与している可能性を明らかにした。今後、TLR9 や DNase II を新しい分子標的とした心不全治療への研究展開が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Oka T, Komuro I, *et al.* Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012;**485**:251-255.

### 2. 学会発表

1. Oka T, Komuro I, *et al.* Accumulation of mitochondrial DNA in autolysosome causes inflammation and heart failure through TLR9 signaling. BCVS 2012. New Orleans, USA.
2. Tamai T, Komuro I, *et al.* The role of Rheb-mTORC1 pathway in cardiac developmental growth and pathological hypertrophy. BCVS 2012. New Orleans, USA
3. 岡崇史、小室一成、ほか. 不全心におけるミトコンドリア DNA 分解の重要性. OKN Summit 2012. 大阪.

## 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（難治性疾患等克服研究事業（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

特発性心筋症に対する機能代替法としての補助人工心臓・心臓移植に関する研究

研究分担者：中谷 武嗣（国立循環器病研究センター 移植部）

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計画および遂行を進めた。前年度に引き続き、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解析準備などを進めた。また、研究成果の社会への還元として、心筋症患者を含む心不全患者を対象にした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心不全に対する各種治療法の進歩により、その治療成績は向上してきたが、高度心筋障害を伴う心不全では心臓ポンプ機能の代替が必要であり、補助人工心臓（VAS）や心臓移植が考慮される。しかし、臓器提供の少ない我が国における心移植待機期間は2-3年と長く、臓器移植待機患者の多くが左心補助人工心臓（LVAS）装着下に長期間待機を必要としている。2011年4月からは在宅療法が行える植込型LVAS 2種が心臓移植へのブリッジ例に対して保険償還され、その施行数が増加している。このため、LVASの予後規定因子である脳梗塞や脳出血による脳血管障害や感染症の管理が重要である。そこで今回、各種左心補助人工心臓装着患者における脳血管イベントについて検討を行った。

B. 研究方法

当センターにおいて、2011年4月から2012年7月までに、新規にLVAS装着を行った重症心不全27症例（体外設置型；Nipro-TOYOBO型LVAS12例、植込型；EVAHEART11例/DuraHeart4例、平均年齢； $35.8 \pm 11.5$ 歳、男女比；22:5、平均観察期間； $203 \pm 167$ 日）において、脳血管イベントおよび生存率について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は観察研究で、個人情報特定できないようにデータの取り扱いを行なった。

C. 研究結果

脳血管イベントは、体外設置型および植込型ともに装着後早期にみられる例が多かった

LVAS装着1年の初回の脳血管イベント回避率は、体外設置型 vs 植込型；59.3% vs 66.7%であった（ $p=0.899$ ）。

脳血管イベントの累積発生率（Events/patients year）は、体外設置型 vs 植込型；0.63 vs 1.69であった（ $p=0.46$ ）。

LVAS装着1年の体外設置型および植込型の生存率は90.9% vs 93.3%であった（ $p=0.37$ ）。

D. 考察

LVAS装着患者における脳血管イベントは予後不良因子のひとつであり、発症例においてはその管理に難渋することが多い。厳密な抗凝固療法・抗血小板療法を行うとともに、脳血管イベント発生時には、脳内科・脳外科にコンサルトし、脳梗塞あるいは脳出血に応じて治療を行ってきた。しかし、現状では体外設置型および植込型において、生存率、脳血管イベント発生率に差を認めなかった。生体適合