

性に優れた LVAS が望まれるとともに、今後も個々の症例に応じた最適な血栓症予防策について検討を進めていく必要がある。

E. 結論

LVAS の長期管理において脳血管イベントの発生予防およびその対策は、LVAS 装着患者の予後改善に重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwashima Y, Yanase M, Horio T, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Toda K, Kawano Y, Nakatani T.: Serial changes in renal function as a prognostic indicator in advanced heart failure patients with left ventricular assist system. *Ann Thorac Surg* 93:816-824, 2012
2. Toda K, Fujita T, Kobayashi J, Shimahara Y, Kitamura S, Seguchi O, Murata Y, Yanase M, Nakatani T.: Impact of preoperative percutaneous cardiopulmonary support on outcome following left ventricular assist device implantation. *Circulation J* 76:88-95, 2012
3. Fujita T, Toda K, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Ishibashi-Ueda H, Kobayashi J and Nakatani T.: Risk factors for post-transplant low output syndrome. *Eur. J Cardio-Thor Surg* 42:551-556, 2012
4. 藤並 潤、宮下史生、豊田一則、築瀬正伸、中谷武嗣：脳循環障害の画像診断 心移植後患者に出現した造影効果を伴う可逆性多発白質脳症。脳と循環 17(3):243-247, 2012.

2. 学会発表

1. Yotsukura H, Seguchi O, Sato T, Sunami H, Murata Y, Yanase M, Fujita T, Toda K, Nakatani T.: Impact of reverse remodeling following LVAD implantation on predicting long-term prognosis during LVAD support period. International Society for Heart and Lung Transplantation. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions, Praha, Czech Republic, 2012.4.18-21
2. Nakatani T, Sase K, Oshiyama.: Initial report of Japanese registry for mechanically assisted circulatory support (J-MACS). International Society for Heart and Lung Transplantation. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions, Praha, Czech Republic, 2012.4.18-21
3. Fujita T, Toda K, Domae K, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Kobayashi J, Nakatani T.: Benefit of tricuspid repair concomitant with left ventricular assist device implantation. International Society for Heart and Lung Transplantation. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions, Praha, Czech Republic, 2012.4.18-21
4. Sato T, Seguchi O, Morikawa N, Sunami H, Murata Y, Yanase M, Fujita T, Toda K, Nakatani T.: A heart transplant candidate of severe pulmonary hypertension with extremely high pulmonary vascular resistance. International Society for Heart and Lung Transplantation. 32nd Annual Meeting and Scientific Sessions, Praha, Czech Republic, 2012.4.18-21
5. Wada K, Ochi H, Takada M, Fujisue S, Oita A, Kohara N, Shishido T, Hori Y, Fujita T, Toda K, Murata Y, Seguchi O, Yanase M, Nakatani T. Efficacy and safety of linezolid for patients with left ventricular assist system. 24th International Congress of The Transplantation Society, Berlin, Germany, 2012.7.15-19
6. Sato T, Seguchi O, Sunami H, Murata Y, Yanase M, Fujita T, Toda K, Nakatani T. Not one month but three month of post-operative BNP level predicts mid-to-long-term prognosis in end stage heart failure patients with left ventricular assist device support. ESC Congress 2012, Munich, Germany, 2012.8.25-29
7. Fukumitsu M, Sata Y, Murata Y, Seguchi O, Yanase M, Noguchi T, Nakatani T, Goto Y, Sugimachi M, Takaki H.: Blood pressure response to exercise predicts successful weaning from LVAD in heart transplantation candidates. ESC Congress 2012, Munich, Germany, 2012.8.25-29. 8.26
8. 中谷武嗣：Current status and perspectives on implantable artificial hearts: NCVC experience. 第76回日本循環器学会学術集会、福岡、2012.3.16-18
9. 中谷武嗣、戸田宏一、築瀬正伸、小林順二郎、藤田知之、瀬口 理、村田欣洋、堀由美子、長岡紀江、植田初江、宮田茂樹、内藤博昭：改正臓器移植法に基づく心臓移植の現状と今後の課題。第112回日本外科学会定期学術集会、シンポジウム、千葉（幕張）、2012.4.12-14
10. 中谷武嗣、築瀬正伸、藤田知之、村田欣洋、瀬口 理、秦 広樹、堀 由美子、長岡紀江、和田恭一、宮田茂樹、植田初江：心臓移植の定着化を目指して。シンポジウム、第48回日本移植学会総会、名古屋、2012.9.20-22

11.瀬口 理、村田欣洋、梁瀬正伸、秦 広樹、藤田知之、
中谷武嗣：植え込み型人工心臓へのパラダイムシフト：
内科医の立場から。シンポジウム、第 16 回日本心不全学
会学術集会、仙台、2012.11.30-12.2

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

研究班全体としては特になし。

2. 実用新案登録

研究班全体としては特になし。

3. その他

特になし。

研究協力者

梁瀬正伸	国立循環器病研究センター移植部
瀬口 理	国立循環器病研究センター移植部
村田欣洋	国立循環器病研究センター移植部
藤田知之	国立循環器病研究センター心臓外科
秦 広樹	国立循環器病研究センター心臓外科

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

—肺高血圧—右心不全に關与する ALL1 シグナル下流で働く TMEM100 の意義に関する研究—

研究分担者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学 第1内科）

研究要旨

心筋症等の心不全に続発する肺高血圧と右心不全は治療に難渋する病態であるが、その分子機序は明らかになっていない。本研究では肺高血圧から右心不全発症への分子機序の解明を目的として、モノクローリン肺高血圧モデルや大動脈縮窄モデルで右室および左室に発現する遺伝子を網羅的に解析し、右心負荷で特異的に増加する遺伝子を探索した。その結果 TMEM100 遺伝子はその候補として同定され、2回膜貫通型の小胞体膜蛋白をコードしていた。TMEM100 は肺高血圧症の発症に關与している ALK1 下流に位置すること、肺血管内皮細胞で最も発現が多く、肺高血圧モデルで初期より発現低下することが示され、肺高血圧 - 右心不全系の病態に關与していることが示唆された。

A. 研究目的

心筋症等の心不全に続発する肺高血圧と右心不全は治療抵抗性でありその発症機の解明が求められている。しかし、その分子機序は解明されていない。我々は、肺高血圧から右心不全に特異的に關与している遺伝子の網羅的解析のため、モノクローリン肺高血圧・右心不全モデルと大動脈縮窄による左心不全モデルの右室と左室を cDNA マイクロアレイで解析した。

B. 研究方法

1) モノクローリン肺高血圧モデルラットと大動脈縮窄モデルラットを作製し、肺高血圧で右室のみで発現亢進する遺伝子、大動脈縮窄モデルでは右室発現亢進しない遺伝子を cDNA アレイを用いて網羅的に検索し、目的の候補遺伝子を同定する。この網羅的解析より TMEM100 を選出した。

2) TMEM100 のモノクローリン肺高血圧での意義を解明する。

3) TMEM100 ノックアウトマウスを作製し、その意義に關して解析する。

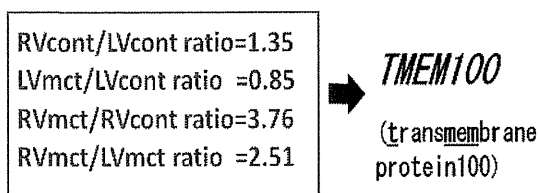
（倫理面への配慮）

奈良県立医科大学の動物実験規約に遵守して研究を実施する。現段階ではヒトサンプルは使用しない。

C. 研究結果

cDNA アレイの結果、検索条件に合う遺伝子の中から、図1のように肺高血圧で右室に特異的に発現亢進する *tmem100* を同定した。*tmem100* 遺伝子はアミノ酸 134 残基よりなる 2 回膜貫通型の蛋白をコードしていた。TME100 は魚からヒトまで極めて構造が保存されていた。

図 1



TMEM100 の体内分布では肺に高度に発現しており次に心臓と骨格筋に発現していた。In situ hybridization では肺での局在は肺動脈血管内皮細胞に発現していた。

モノクローリン肺高血圧モデルを作製すると、TMEM100 の発現は肺高血圧の発症以前より著しく発現が低下していた。

また、興味深いことに遺伝性肺動脈高血圧症の原因遺伝子の一つである ALK1 のリガンドである BMP9, あるいは BMP10 で培養臍帯動脈血管内皮細胞に刺激すると、TMEM100 の発現が用量依存的に著しく増加した(図2)。また、この BMP9 による TMEM100 の遺伝子発現亢進は、ALK1, BNPR2, Smad4 のノックダウンにて有意に抑制さ

れた(図3)、TMEM100がALK1の下流に位置していることが示された。

TMEM100ノックアウトマウス(KO)を作製した。このマウスは胎生9.5-10.5日で全例死亡し、その原因は動脈形成不全であることが示された。

図2. TMEM100 q-PCR

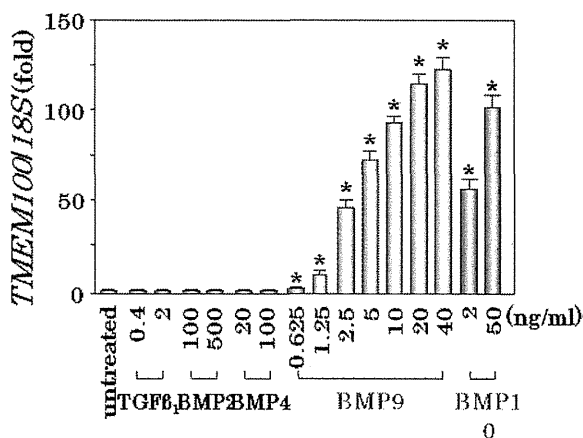
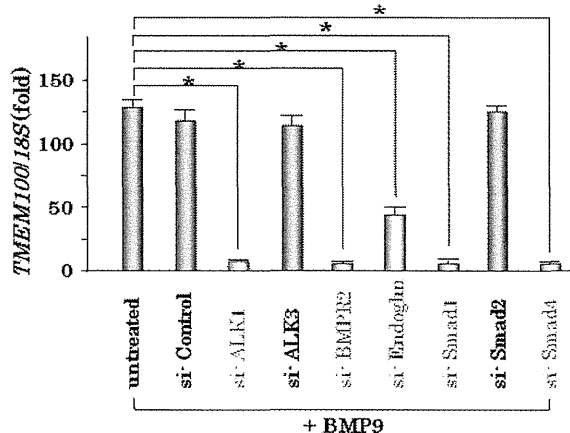


図3. TMEM100 q-PCR



D. 考察

以上のように TMEM100 が肺高血圧症の発症あるいは進展に関与している可能性が示された。

TMEM100 は ALK1 の下流に位置する分子であり、過剰発現系ではあるものの小胞体膜蛋白である GRP78 と結合が示された小胞体蛋白であることが示唆される。TMEM100 の機能そのものは未だ不明であるが、TMEM100KO では Notch 経路の下流で制御されている遺伝子群である Hrt123 の発現が低下しており、TMEM100 は Notch 系との関係が示唆される興味分子で

あることが示唆される。

ALK1 の下流に TMEM100 が存在する可能性が示唆されているが、過去に報告されている ALK1KO のフェノタイプと TMEM100KO のフェノタイプが酷似していることも、この可能性を支持するものである。

また、BMP2/ALK1 が遺伝性肺高血圧症の原因遺伝子であることを考え合わせると、TMEM100 も肺高血圧症発症に関与していることが示唆される。

E. 結論

TMEM100 が肺高血圧症の発症あるいは進展に関与している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Somekawa S, Imagawa K, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato GE, Inada K, Iwamoto T, Mori T, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y

Tmem100, an ALK1 receptor signaling-dependent gene essential for arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis.

PNAS.109(30):12064-12069, 2012

2. 学会発表

Somekawa S, Sakabe M, Hayashi H, Sato G, Inada K, Ito M, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y

Essential Function of Tmem100 for Endothelial Differentiation and Vascular Development Downstream of ALK1 Signaling.

AHA 2012 (American Heart Association Scientific Sessions) November 3-7 (Los Angeles, USA)

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

—心サルコイドーシスの活動性を評価する新しい心筋酸化ストレスマーカーに関する検討—

研究分担者：矢野 雅文（山口大学大学院医学系研究科 器管病態内科学）

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

心サルコイドーシス患者において、炎症性活動性評価及びステロイド効果判定に酸化ストレスマーカーである尿中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)が、有用かどうかについて検討した。

B. 研究方法

1 免疫組織学的検討

心サルコイドーシス患者及び正常心筋患者の剖検心において、特異抗体である抗 8-OHdG 抗体にて左室心筋組織の免疫染色を行い、心サルコイドーシスの患者の心筋組織では、酸化ストレスが亢進しているかどうかを検討した。

2 対象患者

本研究では、当院で入院加療を行っ

た New York Heart Association(NYHA) class I～II の心サルコイドーシス症例 31 例を対象とした。心サルコイドーシス症例は、さらに FDG-PET 検査にて集積の有無を評価することで、活動性のある 17 例と活動性のない 14 例の 2 群に分類した。なお、慢性心不全の対照群として拡張型心筋症(DCM)症例 25 例、全く正常心機能症例（正常な心機能をもった、ボランティアや発作性上室性頻拍、特発性心室細動の症例）30 例を対照群とした。なお、非代償性心不全症例(NHHA 分類 classIII～IV)、急性冠症候群、重症腎機能障

害、悪性腫瘍や膠原病・感染症などの全身性炎症疾患を合併している患者及び喫煙者は、酸化ストレスの原因や起源が複雑となるため除外した。

3 プロトコール

活動性のある心サルコイドーシス(Active SAR)症例、活動性のない心サルコイドーシス(Non-active SAR)症例、DCM 症例、正常心機能(Control)症例の各群において、以下の項目をそれぞれ検討した。1)冠静脈洞と大動脈から血液サンプリングを行い、血中 8-OHdG 濃度を測定し、8-OHdG が心臓で産生されているかどうかを検討した。2)尿中 8-OHdG 濃度（早朝尿）を測定することで、心サルコイドーシスの活動性の程度により、尿中 8-OHdG 濃度に有意差があるかどうかを検討した。3)活動性のある心サルコイドーシス患者にステロイド治療を行い、その臨床的改善・増悪と尿中 8-OHdG 及び 18F-FDG PET の変化を比較検討した。4)尿中 8-OHdG と他の酸化ストレス・炎症性マーカー（尿 8-isoprostane, hsCRP, IL-6, TNF- α ）のどちらが炎症の活動性をよりよく反映できるかどうかについて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、山口大学医学部附属病院の IRB に認可されており、患者さんには、十分なインフォームドコンセントを行った上で施行した。

C. 研究結果

1 患者背景

表1に本研究の患者背景を示す。年齢、性別、BMI、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、尿素窒素値、クレアチニン値、NYHA 心不全重症度、BNP 及び左室駆出率において、活動性のある心サルコイドーシス群、活動性のない心サルコイドーシス群、DCM 群の三群間に全項目で差を認めなかった。

	DCM (n=25)	Active SAR (n=17)	Non active SAR (n=14)	
Age (years)	64.4±16.3	70.1±8.7	65.1±9.4	NS
Gender (M/F)	15/10	8/10	8/6	NS
BMI (kg/m ²)	23.7±7.0	21.2±3.2	21.0±1.7	NS
HR (bpm)	74.1±14.0	66.3±9.2	72.9±14.2	NS
SBP (mmHg)	104±20.8	105±15.9	107±17.1	NS
DBP (mmHg)	68.4±11.4	61.1±8.8	65.6±7.6	NS
BUN (mg/dl)	24.1±10.7	19.4±9.5	28.9±12.7	NS
Cre (mg/dl)	1.1±0.1	0.7±0.2	1.2±0.8	NS
NYHA class	1.7±0.5	1.9±0.7	1.9±0.6	NS
BNP (pg/ml)	385±444	291±231	315±287	NS
LVEF (%)	27.2±15.3	33.7±10.7	30.4±14.0	NS

表1. 患者背景

2 大動脈(Ao)と冠静脈洞(CS)の血清 8-OHdG 濃度の比較

大動脈(Ao)と冠静脈洞(CS)の血清 8-OHdG 濃度の比較を示す。Control 群では大動脈(Ao)と冠静脈洞(CS)の間に血清 8-OHdG 濃度差を認めなかった。DCM 群、Non-active SAR 群においては、冠静脈洞の方が高い傾向にあったが、有意差はなかった。一方、Active SAR 群において、Ao よりも CS の方が有意差に 8-OHdG 濃度が高かった。以上より、Active SAR において、8-OHdG が心臓組織で他の群より多く産生されていることが示唆された。

3 心サルコイドーシス、DCM、正常心機能症例における尿中 8-OHdG 濃度の比較

尿中 8-OHdG 濃度は正常心機能症例より DCM 群で高値となった。また、All SAR 群は DCM 群よりさらに高値であった。All SAR 群ではばらつきが大きかったため、さらに活動性の有無にて Active SAR 群と Non-active SAR 群に分類し、尿中 8-OHdG 濃度を比較した。Non-active SAR 群は DCM 群と差が認められなかったが、Active SAR 群では尿中 8-OHdG 濃度は有意に上昇していた。以上の結果から、正常心機能症例と比較した場合の DCM 群、Non-active SAR 群での尿中 8-OHdG 濃度上昇は、慢性心不全により酸化ストレスが上昇したことに起因すると考えられた。さらに、Active SAR 群では、サルコイドーシスの活動性（炎症）により酸化ストレスが亢進し、尿中 8-OHdG 濃度が上昇したものと考えられた。

4 ステロイド治療前後の 18F-FDG PET と尿中 8-OHdG 濃度の変化

Active SAR に対するステロイド治療の適応は、心室頻拍、高度房室ブロック及び心不全などの臨床症状を認めた症例である。本研究では上記の適応を満たした 14 例に対してステロイド治療を施行した。なお、高齢の症例、活動性の肝炎を合併した症例、ステロイド治療を拒否された 3 例は、ステロイド治療を行わず、対象外とした。治療を行った 14 例のうち、心室頻拍などの臨床症状が改善した 8 例を responder 群、臨床症状が増悪した例や改善しなかった例を non-responder 群と定義した。それぞれ群において、治療の前後での 18F-FDG PET 検査と尿中 8-OHdG 濃度測定を行なった。Responder 群全 8 例では 18F-FDG PET の取り込みは、ステロイド治療前後において全例で低下した。典型例の 18F-FDG PET では心筋への集積がほとんど消失した。一方、non-responder 群 6 例では 18F-FDG PET の取り込みは亢進したか、変化はなかった。典型例の 18F-FDG PET では心筋への集積範囲が広がった。図1のグラフは 18F-FDG PET と同時期に測定した尿中 8-OHdG 濃度である。responder 群では全症例において、治療前に高値であった尿中 8-OHdG 濃度は治療後に低下した。一方、non-responder 群では治療前後において、尿中 8-OHdG 濃度は全症例で上昇した。以上の結果から、responder 群、non-responder 群ともに 18F-FDG PET 集積と尿中 8-OHdG 濃度はパラレルに変化した。

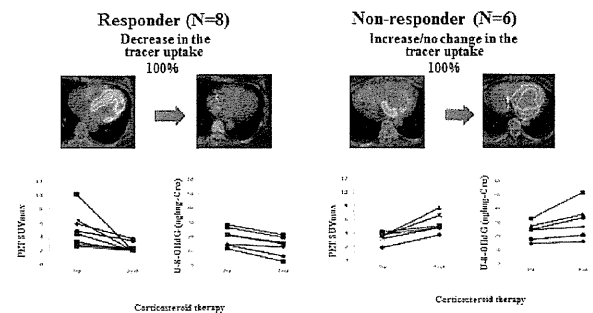


図1. ステロイド治療前後の 18F-FDG PET と尿中 8-OHdG 濃度の変化

D. 考察

本研究では、心サルコイドーシス症例 31 例（活動性のある心サルコイドーシス 17 例、活動性のない 14 例）において、正常心機能症例 (N=30)、DCM(N=25)と比較する

ことにより、酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG が炎症性活動性評価及びステロイド効果判定に、臨床的に有用かどうかについて検討した。活動性のある心サルコイドーシス患者においては、血清の 8-OHdG 濃度は動脈よりも冠静脈洞で有意に高く心臓由来であることが示唆された。

すべての心サルコイドーシス患者の尿中 8-OHdG 濃度は control 群や DCM 群と比較して有意に高値であった。そして、心サルコイドーシス患者を FDG-PET の集積によって活動性の有無で区分すると、活動性のある心サルコイドーシスでは活動性のない心サルコイドーシスや DCM と比較して尿中 8-OHdG の濃度は有意に高値であった。以上の結果から、DCM 群、Non-active SAR 群での尿中 8-OHdG 濃度上昇は同じ程度に経度上昇しており、これは、慢性心不全により酸化ストレスが上昇したことに起因すると考えられた。さらに Active SAR 群では、サルコイドーシスの活動性（炎症）により酸化ストレスが亢進し、その結果、尿中 8-OHdG 濃度が大きく上昇したと考えられた。

また、ステロイド投与前後で、尿中 8-OHdG の濃度変化と 18F-FDG PET 集積の変化を比較すると、responder 群、non-responder 群でいずれもバラレルに変化した。この結果から、ステロイド治療前後で、尿中 8-OHdG 濃度と 18F-FDG PET の変化は有意に相関することが示唆された。このように、ステロイド治療に伴う尿中 8-OHdG の濃度変化は、18F-FDG PET の SUV max と非常によく相関しており、臨床的にステロイド治療の効果判定やステロイド減量時の心サルコイドーシスの再燃を予想するのに有効であることが示唆された。

E. 結論

酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 濃度は、心サルコイドーシス患者において、活動性の評価やステロイド治療の効果判定をするのに臨床的に有用であることが示唆された。

研究協力者：小林茂樹

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hino A, Yano M, Katoh T, Fukuda M, Suetomi T, Ohno M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushik H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res* 96(3) : 433-443, 2012.
2. Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Murakami W, Fukuta S, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. Low-Dose β -Blocker in Combination With Milrinone Safely Improves Cardiac Function and Eliminates Pulsus Alternans in Patients With Acute Decompensated Heart Failure. *Circ J.* 76(7) : 1646-1653, 2012.
3. Susa T, Kobayashi S, Tanaka T, Murakami W, Akashi S, Kunitsugu I, Okuda S, Doi M, Wada Y, Nao T, Yamada J, Ueyama T, Okamura T, Yano M, Matsuzaki M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure. *Circ J.* 76(1) :117-126, 2012.

2. 学会発表

The 16th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, Sendai, 2012.11

- Shigeki Kobayashi, Seiko Fukuta, Wakako Murakami, Hiroki Tateishi, Shinichi Okuda, Tomoko Nao, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki

Oral 「Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Novel Marker for Predicting the Inflammatory Activity in Patients with Cardiac Sarcoidosis」
*J Card Fail*18(10)[Suppl 1] :150

- Masakazu Fukuda, Masafumi Yano, Takayoshi Katoh, Hiroki Tateishi, Masahiro Doi, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masunori Matsuzaki

Poster 「Correction of Defective Calmodulin Binding to the Cardiac Ryanodine Receptor Inhibits Aberrant Ca^{2+} Release in CPVT-associated Channel Dysfunction」
*J Card Fail*18(10)[Suppl 1] :188

The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, 2013.3

- Shigeki Kobayashi, Seiko Fukuta, Wakako

Murakami, Shinichi Okuda, Masahiro Doi,
Tomoko Nao, Yasuaki Wada, Yasuhiro Yoshiga,
Jutaro Yamada, Takayuki Okamura, Takeshi
Ueyama, Masafumi Yano

Oral 「 Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
Predicts the Inflammatory Activity in Patients
with Cardiac Sarcoidosis」

Circ J77[Suppl I] : 1151

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

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

—ミトコンドリア DNA による抗リモデリング効果発現の機序の解明—

研究分担者：砂川 賢二（九州大学医学研究院 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

これまでの研究から、不全心筋においてミトコンドリア機能の低下がその増悪機転に寄与していることが明らかとなっているが、その中でも特に、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のコピー数の維持が重要であることが示されている。現時点で、ミトコンドリア DNA 量の調節には、Transcriptional factor A (Tfam) が関与することが知られており、Tfam の過剰発現が心筋梗塞後モデルマウスの予後を著しく改善することから、その治療ターゲットとなることが示唆される。

本研究では、①mtDNA コピー数の増加そのものが、心臓リモデリングに関与するのか。②その機序はどのようなものか、について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物モデル

動物モデルとして、容量負荷による左室拡大を示す、動静脈シャントモデルを作成した。mtDNA コピー数増加マウスとして、Tfam 過剰発現マウス(TFAM)ならびに Twinkle 過剰発現マウス(TW)を用いた。

動静脈シャント作成後、4週間経過したのちに、血行動態および心機能、心重量、組織、ミトコンドリア機能について検討を行った。また、酸化ストレス指標として、酸化ストレス指標として、8-OH-dG の免疫染色、dihydroethidium を用いた。

C. 研究結果

1) TFAM 過剰発現マウスおよび Twinkle 過剰発現マウスにおける mtDNA のコピー数の増加

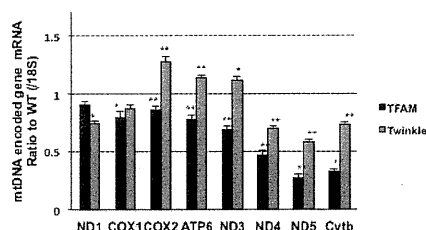
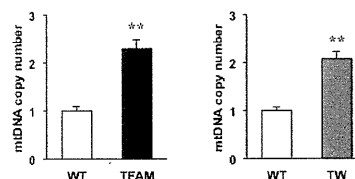


図1. mtDNA コピー数 (上段) およびミトコンドリア呼吸鎖酵素活性 (下段)

mtDNA は、TFAM および TW にて、ともに同程度にコピー数増加を認めた。TW において内因性 Tfam 蛋白の増加は認めなかった。また、これらの遺伝子改変マウスにおいて、ミトコンドリア呼吸鎖の活性は不変または低下を示した。(図 1)

これらの mtDNA 増多マウスおよび野生型マウス(C57Bl/6J)に VO を負荷すると、WT に比較して TFAM, TW 両者において有意に心拡大を抑制し、左室重量の増加、肺重量の増加を有意に抑制し、組織像では、血管周囲の繊維化を抑制した。(図 2, 3, 4)

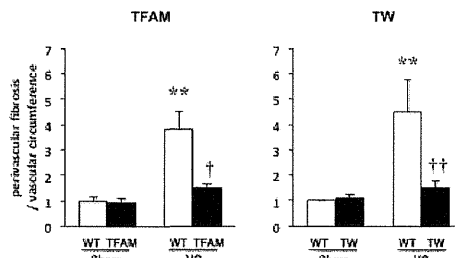
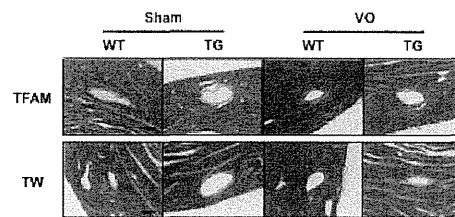


図 4. 血管周囲繊維化の抑制 (MT 染色)

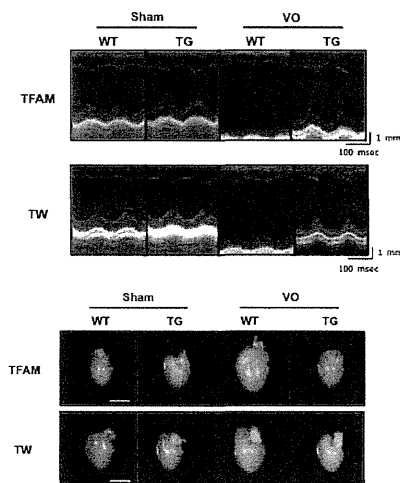


図 2. 心エコーによる左室機能評価ならびに心拡大

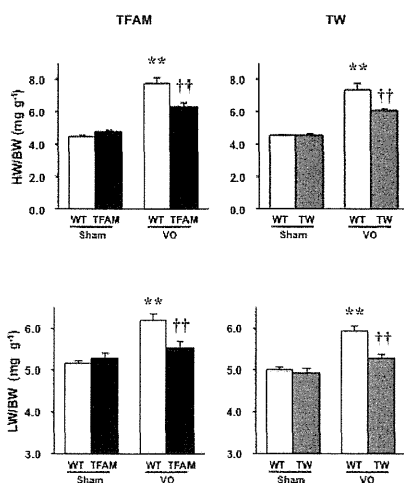


図 3. 左室重量および肺重量の比較

これらの容量負荷に伴う左室拡大、繊維化に特徴づけられる心臓リモデリングを抑制した機序に関して検討を行った。

VO におけるリモデリングには、MMP の活性化が重要な役割を果たしていることが報告されている。我々の実験系においても、VO 手術後、8 週間経過時点で、in situ ザイモグラフィによる MMP の活性化を評価すると、TFAM, TW 両 TG マウスにおいて、ともに有意にその活性化の抑制が観察された。(図 5)

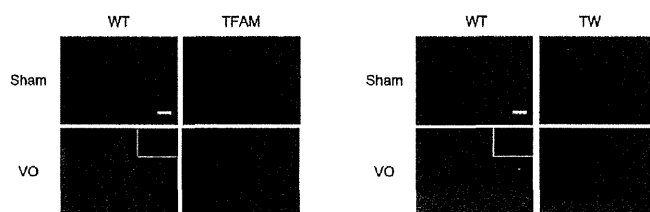


図 5. 心筋 Zymography による MMP 活性化

MMP 活性化抑制の機序を明らかにするために、血行動態 (LVEDP) および左室拡大を伴わない急性期 (手術後 24 時間) における MMP の活性化ならびにそのほかのリモデリング因子についてその mRNA の発現を検討した。(図 6)

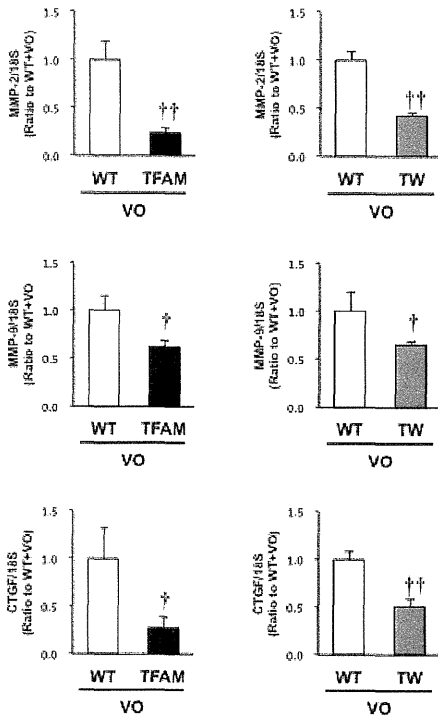


図 6. TFAM, TW における MMP, CTGF の発現

VO 手術後 24 時間時点では、TFAM, TW ともに LVEDP は同程度上昇しているが、その時点ですでに MMP2; MMP9 の mRNA は、TFAM, TW 両者でともに抑制されていた。また同時に、繊維化に関係するとされる CTGF の mRNA も同様に抑制された。

MMP2, MMP9, CTGF は、酸化ストレスによりその発現が制御されていることが知られていることから、我々は、TFAM, Twinkle 過剰発現により細胞内酸化ストレスが抑制されていることが、これらの遺伝子の発現抑制、さらには VO 刺激による左室リモデリングの抑制に関与しているという仮説をたてた。両トランスジェニックマウスから単離したミトコンドリアに、ミトコンドリア特異的な ROS により蛍光を発する NBD-Me-TTP を用いて、antimycin A による complex III の阻害によるミトコンドリア由来の ROS 産生について比較検討した。TFAM, TW ともに、NBD-Me-TTP で評価されるラジカル産生を抑制することが明らかとなった。(図 7)

さらに、酸化ミトコンドリア DNA の定量を行ったところ、酸化ミトコンドリアの量がトランスジェニックマウスではむしろ増加しており、

8-OH-dG の免疫染色で評価した酸化 DNA も増加していることから、増加した mtDNA そのものが、ラジカルスカベンジ作用を有することが示された。

以上の結果から、TFAM, Twinkle の過剰発現により増加した mtDNA が、自身が酸化されることにより redox 関連遺伝子の発現を制御し、苑結果心筋リモデリングに関与することが明らかとなった。(図 8)

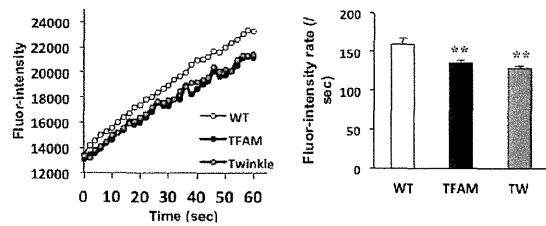


図 7. TFAM, TW におけるフリーラジカル産生能

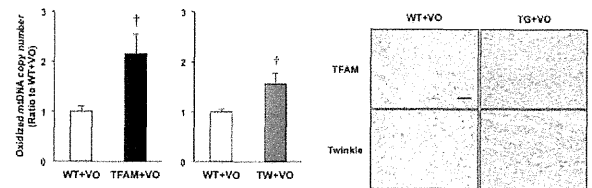


図 8. TFAM, TW における酸化 mtDNA の比較と 8-OHdG の発現

D. 考察

不全心、リモデリング心においてミトコンドリア機能が障害されていることは、動物モデルおよび心不全患者心筋にて示されている。本研究では、ミトコンドリア機能の制御として、ミトコンドリアの量的意義を明らかにすることができた。心不全の発症増悪機転に mtDNA が果たす役割について、新たなエビデンスを得たと考える。今後、mtDNA の増多を可能とする薬剤の開発が可能となれば、新たな心不全の治療戦略となりうるであろう。

E. 結論

TFAM および Twinkle の過剰発現は、全く異なる機序で mtDNA を増加させ、ともに容量負荷による左室リモデリングを抑制する。mtDNA 自身による酸化ストレス消去作

用によって、細胞内レドックスシグナルが減少することがその機序の一部である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Recombinant mitochondrial transcription factor A protein inhibits nuclear factor of activated T cells signaling and attenuates pathological hypertrophy of cardiac myocytes. Fujino T, Ide T, Yoshida M, Onitsuka K, Tanaka A, Hata Y, Nishida M, Takehara T, Kanemaru T, Kitajima N, Takazaki S, Kurose H, Kang D, Sunagawa K. *Mitochondrion*. 2012 Jul;12(4):449-58
2. Saito T, Hirano M, Ide T, Ichiki T, Koibuchi N, Sunagawa K, Hirano K. Pivotal role of Rho-associated kinase 2 in generating the intrinsic circadian rhythm of vascular contractility. *Circulation*. 2013 Jan 1;127(1):104-14.
3. Bionic baroreceptor corrects postural hypotension in rats with impaired baroreceptor. Hosokawa K, Ide T, Tobushi T, Sakamoto K, Onitsuka K, Sakamoto T, Fujino T, Saku K, Sunagawa K. *Circulation*. 2012;126(10):1278-85.

2. 学会発表

1. Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Takeo Fujino, Yuko Hata, Takako Takehara, Ken Onitsuka, Tomoyuki Tobushi, Kazuo Sakamoto, Keita Saku, Takamori Kakino, Kenji Sunagawa, The increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling in Volume Overload Model, 第29回国際心臓研究会日本部会総会, Poster Presentation, 平成24年10月26-27日、福岡
2. Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Kakino T, Sunagawa K. The Increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Inhibits Pathological Remodeling in Cardiac Myocytes. 第29回国際心臓研究会

(ISHR) 日本部会, Poster Presentation, 平成24年10月26-27日 福岡

3. Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Sunagawa K.
4. The Overexpression of Mitochondrial Transcription Factor A Attenuates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Inhibits Pathological Remodeling in Cardiac Myocytes, 第16回日本心不全学会学術集会, Poster Presentation, 平成24年11月30-12月2日、仙台
5. Tobushi T, Hosokawa K, Murayama Y, Sunagawa K: Renal Afferent Nerve Stimulation Induces Baroreflex Resetting without Compromising Arterial Pressure Buffering Function (Poster presentation), 第16回日本心不全学会学術集会, 平成24年11月30日 - 12月2日、仙台
6. Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Sunagawa K. The Overexpression of Mitochondrial Transcription Factor A Attenuates Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Inhibits Pathological Remodeling in Cardiac Myocytes 第16回日本心不全学会学術集会, Poster Presentation, 平成24年11月30日 - 12月2日、仙台
7. Tobushi T, Hosokawa K, Murayama Y, Sunagawa K: Renal afferent nerve stimulation induces baroreflex resetting without compromising arterial pressure buffering function (Poster presentation), 第29回国際心臓研究会(ISHR) 日本部会総会, 平成24年10月26日 - 27日、福岡
8. Tobushi T, Hosokawa K, Murayama Y, Sakamoto K, Saku K, Kakino T, Sunagawa K: Renal Afferent Nerve Stimulation Induces Baroreflex Resetting Without Compromising Arterial Pressure Buffering Function. (Oral presentation), 85th American Heart Association Scientific Sessions, November 3-7, 2012 Los Angeles, USA
9. Tobushi T, Hosokawa K, Murayama Y, Sunagawa K: Renal Afferent Nerve Stimulation Induces Baroreflex Resetting without Compromising

Arterial Pressure Buffering Function, 34th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (August 28 – September 1, 2012 San Diego, USA

10. Masataka Ikeda ,Tomomi Ide ,Takeo Fujino ,Ken Onitsuka ,Tomoyuki Tobushi ,Kazuo Sakamoto ,Keita Saku ,Takamori Kakino ,Henna Tyynismaa ,Hiroyuki Tsutsui ,Anu Suomalainen ,Kenji Sunagawa, The Increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling in Volume Overload Model, 第 77 回日本循環器学会学術集会, Oral Presentation (English)
「Cardiomyopathy/Hypertrophy (Basic) 2」平成 25 年 3 月 15-17 日、横浜
11. Fujino T, Ide T, Ikeda M, Onitsuka K, Hata Y, Takehara T, Sakamoto K, Tobushi T, Saku K, Kakino T, Sunagawa K. Increased Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Excessive Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Inhibits NFAT Signaling in Cardiac Myocytes. 第 77 回日本循環器学会学術集会, 平成 25 年 3 月 15-17 日、横浜

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

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

一心肥大症例における Fabry 病のスクリーニング—

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

Fabry 病は、ライソゾームの加水分解酵素である α -galactosidase A の活性の低下により、セラミドトリヘキソシドなどの糖脂質が組織に蓄積し、多彩な臨床症状を示す遺伝病である。特に腎不全、心筋症や脳梗塞などは重大な合併症である。近年、 α -galactosidase 製剤を用いた酵素補充療法が可能となり、その治療効果が報告されている。したがって、Fabry 病症例を見いだし治療を行うことが重要と考えられる。心肥大は高血圧や肥大型心筋症、Fabry 病などの2次性心筋症に認められ、心肥大は心不全の要因となる。これまでに、心肥大症例に対する Fabry 病のスクリーニングが報告されており、その有病率は0%~12%と、報告によって有病率が大きく異なる。 α -galactosidase 遺伝子には非常に多くの変異や多型が報告されている。近年、E66Qのような、以前は Fabry 病の原因と考えられていた変異が、実際には機能的な変異であることが明らかになっている。本研究の目的は、男性心肥大症例における Fabry 病のスクリーニングを行い病的変異や E66Q のような機能的変異の有病率を明らかにすることである。

B. 研究方法

久留米大学心臓血管内科とその関連施設において、心肥大（心エコーで左室壁厚が13mm以上）を有する男性症例（n=725）を登録した。一次検査では、血清中の α -galactosidase

活性を蛍光発色法にて測定した。一次検査にて Fabry 病が疑われる場合（酵素活性低下例）は、二次検査として白血球中の α -galactosidase 活性を蛍光発色法にて測定した。二次検査で α -galactosidase 活性が低下している症例には α -galactosidase A 遺伝子の遺伝子解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、検体採取は採血のみであり、負担は非常に少ないと考えられる。また、検体は全て連結可能匿名化を行い個人情報管理を行った。

C. 研究結果

心肥大を有する男性症例（n=725）の血清中の α -galactosidase 活性を測定し、4例で酵素活性の低下を認めた（カットオフ値 1.5 nmol/h/m）。1例は非対称性の心肥大を、他の3例は求心性心肥大を認めた。臨床診断は1例は高血圧性心臓病で、他は肥大型心筋症であった。2症例において心房細動とタンパク尿を認めた。いずれの症例においても古典的 Fabry 病の症状は認めなかった。この4例について白血球中の α -galactosidase 活性を蛍光発色法にて測定した結果、3例において優位に酵素活性が低下していたが、ある程度の酵素の残存活性を認めた（正常者

と比べ18~45%)。この3症例について α -galactosidase A 遺伝子の7つのエクソンの塩基配列を解析した。3症例において、エクソン2の196番目のGがCに変異しており、66番目のグルタミン酸がグルタミンに置換されていた(E66Q)。

D. 考察

本研究では、functional mutation とされる E66Q が3例同定されたが、病的意義のある Fabry 病は認められなかった。このことは、男性心肥大症例における Fabry 病は極めて少ないことを示唆している。以前の報告で、0~12%と有病率の variation が大きい、以前の報告の陽性率は高すぎる可能性がある。心肥大症例における Fabry 病有病率の variation は、スクリーニングが行われた地域差、functional mutation をカウントしている、症例数が少ない、スクリーニング方法の違い、などによるのかもしれない。E66Q はエクソン2に位置するミスセンス変異である。この変異を持つ症例の白血球や、この変異 α -galactosidase 遺伝子を発現させた細胞では、ある程度の酵素活性が保たれている。E66Q は α -galactosidase 酵素の活性部位やダイマー形成部位から離れて位置する。最近、韓国人や日本人などアジア系人種に多い遺伝子変異であることが報告されている。以前は病的意義がある Fabry 病の遺伝子変異と考えられていたが、現在では、病的意義のない functional な変異である可能性が高いとされる。E66Q で Fabry 病と診断され酵素補充療法を施行中の症例が問題になっている。他の α -galactosidase 遺伝子変異と共存する可能性があること、また、他の負荷がかかった場合の表現型については未知であることなどから、長期間にわたって経過観察を行う必要があると考えられる。

E. 結論

男性の心肥大症例における Fabry 病は極めて陽性率が低いと考えられる。Fabry 病の診断を行う際、E66Q のような functional mutation の取り扱いに十分注意する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T,

Sakubaba H, Imaizumi T. Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy. *Int J Cardiol* in press

- 2) Oba T, Yasukawa H, Hoshijima M, Sasaki KI, 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
- 3) 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* 35 : 1063-1068, 2012
- 4) Fukui D, Yasukawa H, Sugi Y, Nagata T, Kyogoku S, Futamata N, Oba T, Yokoyama T, Yokoyama S, Ueno T, Kage M, Imaizumi T : Transient reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 160 : 216-219, 2012

2. 学会発表

- 1) Kyogoku S, Yasukawa H, Nagata T, Oba T, Ohshima H, Minami T, Yajima T, Hoshijima M, Aoki H, Knowlton KU, Imaizumi T. Cardiac-Specific Deletion of Suppressor of Cytokine Signaling-3 Prevents Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November3-7, 2012
- 2) Mawatari K, Tahara N, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Kyogoku S, Ohshima H, Minami T, Mizoguchi M, Sugi Y, Adachi H, Imaizumi T. Pioglitazone Decreases Plasma Fibroblast Growth Factor-21 Levels in Patients with Type 2 Diabetes The American Heart Association, The 85th Scientific Sessions, Los Angeles, USA, November3-7, 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

重症心不全関連遺伝子の網羅的解析(Ⅲ)

—代謝性症候群(MetS)に共通する我国固有の心不全遺伝子について—

研究協力者：豊岡 照彦（北里大学 循環器内科）

研究要旨

心不全の臨床像、民族差や治療面の多様性など複雑な症候群であり、医療経済を圧迫する大きな要因である。分子生物学、高速演算装置と膨大な遺伝子を搭載した高集積の microarray の進歩によりヒトゲノムの全容が明らかになり、多遺伝子性疾患の 10 万例以上の患者解析結果が大規模研究も発表されて、その有用性は病態生理学、臨床治療内容や医療経済等に大きく貢献すると期待されている。さらに心不全を対象にした関連遺伝子を核遺伝子の他にミトコンドリア遺伝子の ATP 生産や apoptosis 等の細胞代謝が心機能に直結する生物学的側面と、haplogroup 解析により民族差、国際交流により haplogroup が多様化して、社会的要因による遺伝学的側面が増大すると予想される。今年度は現在投稿論文の審査中で詳細な発表は厳禁されている為に公表を控えるが、研究途中で見出された遺伝子解析に関する諸問題を紹介し、その解決私案を提起して、今後の研究進展に寄与したい。

A. 研究目的

従来から重症心不全の中で民族差が大きく、我国では DCM に起因する症例が、また白人には虚血性の心筋梗塞に続発する症例が多い事は多くの疫学研究に示されていたが、その理由として食生活の相違等の「環境要因」とされたが、その説は実証性に欠ける他、同じ白人でもフランス、イタリアなど南欧には比較的虚血性心疾患の頻度が少ない点などの矛盾を含み、明確な説明は為されていなかった。

更に、近年、核遺伝子の網羅的な SNP を用いた GWAS (Genome-Wide Association Study)により従来の希ではあるが、比較的解析の容易な単遺伝子性(monogenic)疾患から、責任遺伝子の他に、表現系の増悪遺伝子や、改善遺伝子など、複数遺伝子性(polygenic)疾患が集積度の大きいゾーンチップ、高速演算素子と解析アルゴリズムの急速な進歩により 10 万人以上の症例-対照試験による大規模研究も高血圧や高脂血症の関連遺伝子が解明されてきた。今回の研究では重症心不全の民族差の原因に環境要因とは別に遺伝要因の関与を探り、我国の心不全発症に関連する遺伝子から最終的に発症機構の解明と、発症前診断から発症予防に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

上記のように、本稿の内容を国際誌で審査中であり、具

体的な方法と結果公表を禁じており、本稿でも詳細な記載を延期させて頂きたい。症例は通常の薬物治療抵抗性で、複雑な不整脈、家族性負荷や生検/剖検所見を認め、東大、北里大の心不全外来に通院中の難治性患者を対象に、遺伝子診断の倫理委員会承認を得た後に遺伝子検査の対象に登録した。

心筋内膜生検試料を得た症例では心筋自体から、また、通常は抹消静脈血から既報により Genomic DNA を精製した。ミトコンドリアの全ゲノムは比較的短く、全配列を従来の Sanger 法で確定した。

（倫理面への配慮）

本研究は北里大学、東京大学の学内倫理委員会と白人試料はドイツ、Hessen 州のヒト遺伝子取り扱いに関する委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

核内遺伝子について 180 万以上の SNP と CNV をカバーする Genome-Wide Human SNP Array 6.0 により数千箇所の SNP を同定した。Pearson の χ^2 検定、又は Fisher 検定で $p < 5 \times 10^{-8}$ に設定して大幅に絞り込んだ。gSNP、非翻訳領域と同義遺伝子変異を除外して更に縮小した。なお、翻訳に無関係とされた intron 内の SNP (iSNP)が最近、発

現効率に影響する事が判明し、敢えて除外しなかった。この結果を基に欧米の大規模 GWAS 報告で MeS の血圧、体格と血中脂質の 3 要素を比較して日本人、4 家系の独立家系に SNP が全て共通した心不全と突然死症例を同定した。この中に細胞内の ion transporter が含まれたが、この SNP は白人の MAF は数%で、10 万人以上の東洋人に皆無だった。

ミトコンドリアの SNP 解析は核遺伝子に比べ遅れている。幸い、その全ゲノムは 16kbp と短く、今回は全配列を決定し、変異候補部位を従来の Sanger 法で確定した。その結果、上記の 4 家系は現在、日本人に選択的に報告されている固有の haplogroup に属し中国北部から分岐して日本列島に移動後に変異したと予想された。

D. 考察

1. 検査試料の純度について

今回使用した Affymetrix 社製 v6.0 により現在、世界最多の SNP と CNV を同定可能だが高純度の DNA を用いる必要が有る。白血球由来の試料で call rate が 98% 以上を示したが、凍結保存心筋の場合、90~95% と一部不十分だった。特に DCM 心筋は線維化のため精製が難しく、断裂が著しくなる。特に核遺伝子はミトコンドリアに比較して DNA が長いいため、現状の microarray では精度向上に今後の工夫が必要だった。

2. 市販の SNP Array の特性について

今回の array は最多数の SNP を搭載しているが、我々が変異部位を済の SNP を解析者に伏せて検査した結果、その同定率は極めて低かった。これは米国製のジーンチップは白人中心の SNP で、少なくとも心不全の解析に適さない事が示された。今後、独自のチップ開発も必要となる。

3. 変異による表現型の機能変化

遺伝子変異により Phenotype が確認されれば病態との関わりが明確になる。この際に下記の問題が挙げられる。

i) 遺伝子改変動物を作製して生理的意義を検証するには変異部位配列がヒトと同配列を保存している場合に限られる。

ii) 遺伝子の knockout は完全に遺伝子産物(transgene) させる結果、代償機構が働いて機能変化を特定し難い。特に transgene が複合体を形成する場合、複合体全体に knockout が影響して変異自身の機能が不明確になる。

iii) マウスと哺乳類の種差

細胞骨格蛋白の中のジストロフィンの遺伝子欠失により筋ジス

トロフィーが起こる。しかし、ジストロフィンを欠損している mdx マウスは筋ジストロフィーを起こさず、マウスではユトロフィンがジストロフィンの代役をした結果だった。

iv) マウスやラットの小動物とヒト等の大型動物の差

心筋細胞の大きさは小型動物の方が小さいため、細胞容積は表面積より減少する。特に細胞内のイオン出納に関連するチャネル蛋白では心筋細胞膜の関与が小型動物で大きく、生理実験の結果の解釈には注意が必要である。

E. 結論

以上から再生医療の臨床実用化の前に多くの安全面の検証が必要と考える。

研究協力者：徳永勝士(東京大学 遺伝学教室)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyo-oka T, *et al.*, Multidisciplinary approach to genome-wide association study for heart failure based on the different ethnicity. *Medimond Press* (In press).
2. Toyo-oka L, *et al.*, Bigenome analysis to provide genetic evidence for divergent features of heart failure and metabolic syndrome. *Proceedings of IWBBIO Meeting* pp65-67, 2013.

2. 学会発表

1. Toyo-oka T, An overview of the bioinformatics and a new concept of BWAS. An invited Lecture, The 17th World Congress in Cardiology, Toronto, Canada, July 22-24, 2012.
2. Toyo-oka L *et al.*, Bigenome (Nuclear GWAS and Mitochondrial Haplogroup) analysis to provide genetic evidence for divergent features of heart failure and metabolic syndrome. Granada, Spain, March 25-27, 2013.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

上記、Toronto の国際学会で循環器病研究成果が認められ、Albrecht Fleckenstein 賞を授与された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業（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

—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

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 は抗酸化作用を介し抗加齢蛋白として機能していることが示唆されている。本研究では、ドキソルピシン(DOX)による心機能低下におけるSMP30の役割を検討した。

B. 研究方法

12週齢の野生型(WT)マウス、SMP30欠損(KO)マウス、心臓のみ選択的にSMP30遺伝子を高発現したSMP30-TGマウスを用いた。WTマウス、SMP30-KOマウス、SMP30-TGマウスの腹腔内にDOX 20 mg/kg ないし生食を投与した。投与1週間後、心エコー検査を行い、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室短縮率、左室駆出率を測定した。心エコー検査後、マウスをサクリファイし心臓を摘出し、病理組織標本作製した。また、心筋から蛋白を抽出し細胞内シグナルの検討を行った。

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。

(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

心エコー検査では、SMP30 KO マウスは WT マウスと比べ、DOX 投与後の左室短縮率、左室駆出率の低下がより顕著であったが、SMP30-TG マウスでは左室短縮率、左室駆出率は DOX 投与後に変化しなかった。Dihydroethidium (DHE) 染色で心筋での superoxide 産生を検討した。DOX 投与後の superoxide 産生は SMP30-KO マウスで WT マウスより増大し、SMP30-TG マウスでは減少していた。8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (OHdG) 陽性細胞は SMP30-KO マウスで WT マウスより増加し、SMP30-TG マウスでは減少していた。Elastica-Masson 染色で線維化を検討したところ、DOX 投与後の線維化率は WT マウスと比べて SMP30-KO マウスでは増加、SMP30-TG マウスでは低下した。TUNEL 染色陽性細胞は DOX 投与後、WT マウスと比べて SMP30-KO マウスでは増加、SMP30-TG マウスでは減少を認めた。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、Bax/Bcl 比、caspase-3 活性の上昇を認め、SMP30-TG マウスでは抑制された。

D. 考察

SMP30-KO マウスでは WT マウスと比較し、ドキソルビシンにより活性酸素種の産生が増加し、c-Jun-N-terminal kinase リン酸化活性上昇、Bax/Bcl 比上昇、caspase-3 活性が上昇し、アポトーシスが誘導されたと考えられた。SMP30-KO マウスでは線維化も促進され、左室収縮能低下の一因と推察された。一方、心臓選択的に SMP30 遺伝子を過剰発現した SMP30-TG マウスでは、ドキソルビシンに対するこれらの変化はいずれも抑制され、左室収縮機能は良好であった。この結果から、SMP30 は抗酸化作用、抗アポトーシス作用を介して、ドキソルビシンに対して心保護作用を有することが示唆された。

E. 結論

SMP30 はドキソルビシンに対して心保護作用を有し、ドキソルビシン心筋症に対する新規の治療標的分子となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato A, Sakamoto N, Ando K, Kaneshiro T, Uekita H, Sugimoto K, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Satoh S, Takeishi Y: Dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy caused by two different sarcomere mutations, treated with surgical left ventricular reconstruction and cardiac resynchronization therapy with a defibrillator. Intern Med 51:2559-2564, 2012
- 2) Hirose M, Takeishi Y, Nakada T, Shimojo H, Kashihara T, Nishio A, Suzuki S, Mende U, Matsumoto K, Taira E, Yamada M: Nicorandil prevents Gαq-induced progressive heart failure and ventricular arrhythmias in transgenic mice. PLoS One 7: e52667, 2012
- 3) Yamada S, Saitoh S, Machii H, Mizukami H, Hoshino Y, Misaka T, Ishigami A, Takeishi Y: Coronary artery spasm related to thiol oxidation and senescence marker protein-30 in aging. Antioxid Redox Signal (in press) 2013

2. 学会発表

- 1) Miyata M, Suzuki S, Misaka T, Saitoh S, Takeishi Y: Deficiency of senescence marker protein 30 exacerbates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice. Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific Sessions (BCVS 2012): Frontiers in Cardiovascular Science and Novel Therapy, New Orleans, LA, USA, July 2012
- 2) Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Saitoh S, Takeishi Y: Cardiac overexpression of senescence marker protein 30 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. Congress of the European Society of Cardiology 2012, Munich, Germany, August 2012
- 3) Hoshino Y, Saitoh S, Machii H, Yamada S, Misaka T, Miyata M, Mizukami H, Takeishi Y: Coronary artery spasm related to thiol oxidation and RhoA activation in aging model with senescence marker protein-30 deficiency. Scientific Sessions of American Heart Association 2012, Los Angeles, California, USA, November 2012

G. 知的所有権の取得状況

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

—肥大型心筋症と不整脈基質：貫壁性再分極時間のばらつき—

研究分担者：志賀 剛（東京女子医科大学 循環器内科）

研究要旨

背景：肥大型心筋症患者において心臓突然死の予知・予防は生命予後の改善に必要であるが、リスク層別化はまだ十分でない。本研究の目的は、肥大型心筋症の不整脈基質として貫壁性再分極時間のばらつきの寄与について検討することである。方法：植込み型除細動器植込みの適応がある肥大型心筋症 48 例（年齢 57 ± 16 歳、男性 40 例）を対象とし、ハイリスクの拡張型心筋症 147 例、不整脈源性右室心筋症 9 例他の非虚血性心疾患 52 例、さらに虚血性心疾患 92 例を対照として用いた。方法は横断的観察研究とし、植込み型除細動器植込み前に高分解能心電図を行った。結果：肥大型心筋症は他の心筋症に比し、 $T_{peak-Tend}$ dispersion が有意に長かった。結論：心筋症における心室性不整脈機序として肥大型心筋症では貫壁性再分極時間のばらつきを基質とするリエントリーが示唆される。

A. 研究目的

肥大型心筋症患者において心臓突然死の予知・予防は生命予後の改善に必要である。心臓突然死の約 8 割は心室頻拍・心室細動とされているが、肥大型心筋症の突然死予防としてリスク層別化はまだ十分でない。日本循環器学会のよる肥大型心筋症の診療に関するガイドラインでは、一次予防として植込み型除細動器に適応に係わるリスク因子として非持続性心室頻拍、突然死の家族歴、失神、左室壁厚 30mm 以上、運動時の血圧反応以上を挙げており（クラス II a）、必ずしも不整脈基質の指標は入っていない。¹⁾ 肥大型心筋症では QT dispersion が大きく、QT dispersion と突然死の関連が指摘されている。²⁾ さらに肥大型心筋症関連の遺伝子異常を持つキャリアでは QT dispersion が大きいことも指摘されている。³⁾ しかし、運動負荷による QT dispersion の変化は肥大型心筋症患者の突然死予知に役立たないという意見もある。⁴⁾ 一方、貫壁性再分極時間を示すとされる T_{peak-T} end 間隔は肥大型心筋症の突然死予知因子になる可能性も指摘されている。⁵⁾ われわれは、これまでに高分解能心電図（187-channel repolarization interval-difference mapping electrocardiography）を用いて T_{peak-T} end 間隔のばらつきが心不全患者の心室性不整脈発現と関連がある可能性を報告している。⁶⁾

本研究の目的は、肥大型心筋症の不整脈基質として貫壁性再分極時間のばらつきの寄与を検討することである。

B. 研究方法

植込み型除細動器植込みの適応がある心臓突然死リスクを有する肥大型心筋症 48 例（年齢 57 ± 16 歳、男性 40 例）を対象とし、同じく植込み型除細動器植込みの適応があるハイリスクの拡張型心筋症 147 例（年齢 54 ± 15 歳、男性 106 例）、不整脈源性右室心筋症 9 例（年齢 52 ± 16 歳、男性 5 例）、他の非虚血性心疾患 52 例（年齢 55 ± 15 歳、男性 24 例）、さらに虚血性心疾患 92 例（年齢 66 ± 9 歳、男性 82 例）を対照として用いた。方法は横断的観察研究とし、植込み型除細動器植込み前に高分解能心電図と加算化平均心電図を行った。評価項目は高分解能心電図による RT dispersion と $T_{peak-Tend}$ dispersion、加算化平均心電図による f-QRS, RMS40, LAS40 とし、各心筋症あるいは虚血性心疾患患者と肥大型心筋症患者で比較検討した。

（倫理面への配慮）

本研究については東京女子医科大学倫理委員会の承認を得て、全例から文書による同意を得ている。

C. 研究結果

ハイリスクの患者背景として、肥大型心筋症患者は、他の心疾患患者に比して左室駆出率が高く（ $54 \pm 11\%$ ）、QRS 幅が狭い（ 120 ± 33 msec）特徴があった。高分解能心電図