

Fujiu K, Nagai R, Dynamic Homeostasis in Stress Responses of Heart through Heart-Kidney Interaction, Symposium, 第 17 回日本心不全学会学術集会、大宮、2013

Fujiu K, Nagai R, Regulation of cardiac contractility by monocyte/ macrophage lineages, International Symposium on Development of Medical Technologies for Treating Intractable Cancers and Cardiovascular Diseases, Tokyo, Japan, 2013 (invited speaker)Fujiu K, Manabe I, Shibata M, Nagai R, Komuro I, Cardiac Macrophages Facilitate Atrioventricular Conduction and Right Ventricular Function after Right Ventricular Pressure Overload, the ISHR XXI World Congress, Sandiego, USA, 2013

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特願 2014-037339

発明者 藤生克仁、真鍋一郎、柴田宗彦、永井良三、大村智、中野洋文、砂塚敏明、廣瀬友靖、山地賢三郎、木戸博
発明の名称 新規 PDK4 阻害薬を有効成分として含有する心不全の治療および予防薬

出願人 国立大学法人 東京大学、 学校法人北里研究所、
国立大学法人徳島大学

出現日 2014年2月27日

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

—直接リプログラミングによる心臓再生法の開発—

研究分担者：福田恵一（慶應義塾大学医学部 循環器内科 教授）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマにした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心筋は再生能力がないため、心臓障害後は線維芽細胞の増殖により線維瘢痕化し心不全に至る。我々は心臓線維芽細胞を生体内において直接心筋細胞へ分化転換できれば新しい心臓再生治療につながる可能性があると考え研究を開始した。これまでに *in vitro* の実験系でマウス心臓線維芽細胞に心筋細胞特異的な3つの転写因子（Gata4, Mef2c, Tbx5, 以下 GMT）を導入することで、iPS細胞のような幹細胞を経ることなく直接心筋様細胞（誘導心筋細胞）を作製することに成功した（Ieda et al, Cell, 2010）。本研究課題ではこの心筋直接リプログラミングによる新しい心臓再生研究をさらにすすめ、(1) ヒトの心臓線維芽細胞から直接心筋細胞を作製すること、(2) マウス心筋梗塞モデルを用いて直接リプログラミングにより生体内で内在性心臓線維芽細胞を心筋に転換することを目標とした。

B. 研究方法

(1) ヒトの線維芽細胞から直接心筋細胞を誘導

ヒト心臓線維芽細胞および皮膚線維芽細胞を培養して心筋誘導を行った。マウスで有効であった3つの遺伝子 Gata4, Mef2c, Tbx5 のみではヒト細胞の心筋誘導に不十分であることが分かった。そこで新たに心筋細胞特異的に発現している11の遺伝子の中からヒト心筋リプログラミングに必須の因子をスクリーニングした。

(2) 生体内で内在性心臓線維芽細胞を心筋に直接転換

生体内で心臓線維芽細胞を直接心筋細胞へ転換できるか検討した。マウス急性心筋梗塞モデルを作製して、開胸下で直接マウス心筋梗塞部位に遺伝子導入を行った。陰性対照では線維芽細胞から心筋細胞への誘導はみられなかった。

（倫理面への配慮）

ヒト細胞を用いた実験はすべて大学の倫理委員会に申請書を提出し認可を得た。また全例で同意書を取得。

C. 研究結果

これまで心筋のマスター遺伝子は長い間発見されていなかったが、複数の遺伝子の組み合わせにより心筋誘導できるという仮説のもと遺伝子探索を開始した。その結果、*in vitro* の検討でマウス心臓線維芽細胞から心筋様細胞への分化転換に必要な遺伝子群として、心臓特異的な3つの転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5) の同定に成功した(Ieda et al, Cell, 2010)。また急性心筋梗塞モデルマウスを用いた *in vivo* の研究では心臓に Gata4, Mef2c, Tbx5 を直接導入して内在性心臓線維芽細胞を心筋様細胞に生体内で転換することに成功した(Inagawa et al, Circ Res, 2012)。さらにヒト線維芽細胞の心筋誘導には Gata4, Mef2c, Tbx5 にさらに心臓特異的な2因子(Myocd, Mesp1)を加えた5因子が必要であることを見出した(Wada et al, PNAS, 2013)。

D. 考察

ヒトの線維芽細胞から直接心筋細胞誘導には新たに心筋細胞特異的に発現している 11 の遺伝子の中からヒト心筋リプログラミングに必須の因子をスクリーニングした。その結果、GMT にさらに 2 因子(Myocd, Mesp1)を加えて 5 因子(GMTMM) にすることでヒト心筋誘導効率が著明に改善することを見出した。GMTMM により誘導されたヒト心筋様細胞は心筋特異的な遺伝子発現を示し、心筋に特徴的な生理機能も確認できた (Wada et al, PNAS, 2013)。

生体内で内在性心臓線維芽細胞を心筋に直接転換は 3 つの心筋リプログラミング遺伝子 (GMT) を同時に発現できるポリシストロニックベクターを開発し、このベクターにより成熟した心筋様細胞の誘導効率を改善できた (Inagawa et al, Circ Res, 2012)。本研究成果は各マスメディアでも大きく報道されて社会的にも大きな反響があった。

E. 結論

本研究はこれまで不可能と考えられていた心臓に内在する線維芽細胞を直接心筋に変えるという全く新しい概念の画期的な研究であり、iPS 細胞などの幹細胞を用いた再生医療の課題を一気に解決することが可能である。本法の成功により心筋再生において細胞移植の必要もなくなり、心臓再生研究を大きく前進させることが期待される。この心筋直接誘導による心臓再生治療は健康推進効果のみならず、日本国への経済的効果も計り知れない。

F. 研究発表

1. 論文発表 (原著論文)

1. Wada R, Muraoka N, Inagawa K, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Kaneda R, Suzuki T, Kamiya K, Tohyama S, Yuasa S, Kokaji K, Aeba R, Yozu R, Yamagishi H, Kitamura T, Fukuda K, Ieda M. Induction of Human Cardiomyocyte-like Cells from Fibroblasts by Defined Factors. *Proc Natl Acad Sci US A*. 110 (31):12667-72. (2013).

2. 学会発表 (代表的な招待講演のみ記載)

1. Masaki Ieda, 第 77 回日本循環器学会学術集会 プレナリーセッション, “Direct Conversion of Fibroblasts into Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors”, 横浜 2013.3.15-3.17.

2. Masaki Ieda, American Heart Association Basic Cardiovascular Sciences 2013, “Induction of Cardiomyocyte-like Cells by Defined Factors”, Las Vegas, Nevada, USA 7.22 発表

7.25 Gladstone Institute Seminar “Progress and Perspectives of Direct Cardiac Reprogramming” San Francisco, California, USA, 2013. 7.22-24.

3. Masaki Ieda, American Heart Association Scientific Sessions 2013, The Best of Circulation Research Symposium, “Induction of Cardiomyocyte-like Cells in Infarct Hearts”, Dallas, USA, 2013. 11.16-20.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号 PCT/US2011/033938・出願日 2011 年 4 月 26 日・発明者 Masaki Ieda, Deepak Srivastava
発明の名称 Methods for Generating Cardiomyocytes・出願人 J David Gladstone Institutes

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

—ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける選択的 IKK 阻害剤の効果の検討—

研究分担者：磯部光章（東京医科歯科大学 循環制御内科学 教授）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマにした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心筋炎はウイルス感染、薬物、放射線などによって心筋に炎症を起こす疾患であり、重症な場合は心不全や拡張型心筋症につながることもあるが、有効な治療法はまだ存在しない。転写因子 NF- κ B は感染や炎症性サイトカインなどの刺激により活性化され、免疫反応において重要な役割を果たす。我々の過去の研究において NF- κ B デコイの遺伝子導入によって心臓特異的に NF- κ B の活性化を阻害したところ、心筋炎が軽減されることがわかった。このことから、NF- κ B が自己免疫性心筋炎の進行に関わる主要な因子である可能性が示唆された。本研究ではこの結果を踏まえ、近年開発された新規薬剤である選択的 IKK 阻害剤 IMD-0354 を用いてラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて NF- κ B を標的とした治療介入を試みた。

B. 研究方法

LEW/CrI/CrIj 系統のラットの足蹠にブタ由来心筋ミオシンと *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra を含む完全フロイントアジュバントを等量混合したエマルジョンを注射することによりラット自己免疫性心筋炎モデル (EAM) を作製した。作製した EAM に対し、IMD-0354 (15mg/kg/day) または溶媒 (無治療群) を腹腔内投与した。その後、全てのラットは 21 日目に安楽死させ、心臓および脾臓を摘出した。この時摘出した心臓より病理切片を作製し、各種染色により心筋組織の傷害の程度を判定した。

また、摘出した心筋組織より、タンパクと RNA を抽出し、ウエスタンブロット法および Real time RT-PCR 法にて NF- κ B の活性および炎症性メディエーターの遺伝子発現を調査した。さらに EAM の脾臓より単離した脾細胞に IMD-0354 を添加し、ミオシンで刺激後の T 細胞の増殖および Th1 サイトカイン (IFN- γ および IL-2) の産生に及ぼす影響を調査した。

(倫理面への配慮)

本研究には動物実験を伴うが、東京医科歯科大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た。この承認された実験計画書に基づいて実験を行った。

C. 研究結果

無治療群の心臓では心筋組織に広範囲に及ぶ細胞浸潤および線維化が観察された。心筋組織に浸潤していた細胞は CD4 陽性 T 細胞とマクロファージの数が多く、CD8 陽性 T 細胞もそれらよりは少数であったが存在していた。一方で、IMD-0354 投与群ではこのような心筋組織の傷害は改善された。また、無治療群の心臓では Th1 サイトカインのインターフェロン- γ (IFN- γ) およびインターロイキン 2 (IL-2)、ケモカインの Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) といった心筋炎の進行に関わる炎症性メディエーターの mRNA 発現の増強や NF- κ B の活性化がみられたが、これらの反応は IMD-0354 の投与によ

て抑制された。これらの結果から、自己免疫性心筋炎に対して IMD-0354 が治療効果を及ぼすことが示唆された。次に IMD-0354 の効果の標的となる細胞を特定するため、EAM における NF- κ B の活性化の局在を調査した。その結果、EAM の心臓と脾臓において、CD4 陽性 T 細胞で NF- κ Bp65 のリン酸化が検出された。そのため、EAM から摘出した脾細胞を用いて、T 細胞に対する IMD-0354 の効果を調査した。結果として、抗原であるミオシンの刺激によって誘導された T 細胞の増殖および Th1 サイトカインの IFN- γ や IL-2 の産生は IMD-0354 の添加によって、用量依存的に抑制された。以上のことから、IMD-0354 は NF- κ B の活性化阻害作用によって T 細胞の抗原刺激による活性化を抑制し、心筋炎に対しての治療効果を有することが示唆された。

D. 考察

実験の結果、EAM への IMD-0354 の投与により、心臓における NF- κ B 活性化が阻害され、それに伴い、炎症細胞浸潤による心筋組織の傷害および心臓での炎症性メディエーターの遺伝子発現が抑制された。この時の NF- κ B の活性化は心臓に浸潤している CD4 陽性 T 細胞でみられ、さらにはその貯蔵源の一つである脾臓においても、CD4 陽性 T 細胞で NF- κ B の活性化が検出された。このことから EAM における NF- κ B の活性化は心臓局所的なものではなく全身に循環する T 細胞で起きている事が示唆された。また、我々の EAM の脾細胞を用いた実験では、IMD-0354 は抗原刺激によって誘導される T 細胞の活性化を抑制することが示唆された。EAM において抗原として認識されたミオシンは樹状細胞やマクロファージによって貪食され、その後、脾臓などのリンパ組織に移行し、T 細胞に対してミオシンのエピトープを抗原提示すると考えられる。この時、抗原提示を受けた T 細胞では NF- κ B の活性化が起こり、サイトカインの産生誘導を介して T 細胞が活性化し、エフェクター T 細胞への分化・増殖が起こると考えられる。エフェクター T 細胞の中でも特に CD4 陽性 T 細胞は自己免疫性心筋炎を引き起こす主要な役割を果たす細胞であることが知られている。ミオシンに感作された CD4 陽性 T 細胞が血流にのって全身に循環し、心臓に到達した時に、樹状細胞から再びミオシンの抗原提示を受ける。この刺激によって、T 細胞の NF- κ B の活性化

が心臓で再度起こり、種々のサイトカインやケモカインを放出することでマクロファージや CD8 陽性 T 細胞といった他の炎症細胞を心臓に動員し、活性化させて心臓特異的な炎症を惹起させると考えられる。以上のことから、自己免疫性心筋炎においてはリンパ組織での T 細胞の活性化とその後の心臓での炎症反応に T 細胞の NF- κ B の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、生体に投与された IMD-0354 は血流を介して、全身に循環し、NF- κ B の活性化を全身的に阻害するものと考えられる。そのため、EAM において IMD-0354 は心臓とリンパ組織双方における T 細胞の NF- κ B の活性化を抑制することができると考えられる。このことから IMD-0354 による NF- κ B の活性化を全身的な阻害が T 細胞の活性化を抑制することで心筋炎に対して治療効果を及ぼすのではないかと考えられる。

E. 結論

結論として、IKK 阻害剤 IMD-0354 による NF- κ B の活性化の全身的な阻害が心筋炎の新たな治療法として有望であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe R, Azuma RW, Suzuki J, Ogawa M, Itai A, Hirata Y, Komuro I, Isobe M. Inhibition of nf-kappab activation by a novel ikk inhibitor reduces the severity of experimental autoimmune myocarditis via suppression of t-cell activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 305 (12), H1761-1771, 2013.

2. 学会発表

1. R. Watanabe, J. Suzuki, M. Ogawa, S. Muto, A. Itai, Y. Hirata, R. Nagai, M. Isobe. A Specific IKK Inhibitor Suppresses Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats. American Heart Association Scientific Sessions, APS.504.01-Heart Failure: Cardiotoxins, Viruses and Inflammation, November 12-16, 2011, Orlando USA.

2. Ryo Watanabe, Jun-ichi Suzuki, Masahito Ogawa, Yasunobu Hirata, Ryozo Nagai, Mitsuaki Isobe. A Specific IKK Inhibitor Suppresses Experimental Autoimmune Myocarditis in Rats. 第76回日本循環器学会学術集会、Heart Failure (Pathophysiology) 2、2012年3月16~18日、福岡

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

—ミトコンドリア病患者における核遺伝子病因検索—

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 部長）

研究要旨 ミトコンドリア病の病因遺伝子はミトコンドリア DNA (mtDNA)と核 DNA コードの遺伝子に大別される。核遺伝子原因検索のために、シーケンスキャプチャー技術によって全ゲノム中で対象領域を選択的に抽出する方法を用いた。具体的には約 800 のミトコンドリア関連タンパク質をコードする遺伝子配列を調べるために、7368 箇所のエクソン領域をキャプチャーする Haloplex ターゲットエンリッチシステムを用いて解析を行った。さらに、病因変異の絞り込みを迅速かつ合理的に行うために、解析に用いる検体をミトコンドリア呼吸鎖酵素の生化学的解析の結果によって選定した。今回は mtDNA 翻訳異常を呈し、複数のミトコンドリア呼吸鎖酵素活性の低下が認められた 2 検体についての結果を報告する。それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が見いだされた。この方法を用いて、さらに他の症例の病因検索を進める予定である。

A. 研究目的

現在ミトコンドリア病患者の約 60%において原因遺伝子が特定されておらず、そのほとんどが核遺伝子であると予想されている。そして、これまでに同定されている核コードの 1500 個余りのミトコンドリア関連タンパク質の中で、原因遺伝子として報告されているのはわずか 200 個程度にとどまる。そこで本研究はミトコンドリア病患者の核遺伝子病因変異を網羅的に探索し、原因遺伝子を特定することを目的とした。

B. 研究方法

原因遺伝子の絞り込みを迅速かつ合理的に行うため、解析に用いる検体をミトコンドリア呼吸鎖複合体の生化学検査において異常を呈した検体とした。次世代ゲノムシーケンスを効率的かつ低コストで行うためにシーケンスキャプチャー技術を用いた。ミトコンドリア関連タンパク質をコードする約 800 遺伝子をシーケンスの対象として選定した。その後、Haloplex ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent)を用いて選定した遺伝子のエクソン領域を網羅する 7368 箇所をキャプチャーし、次世代シーケンサーにて解析を行った。

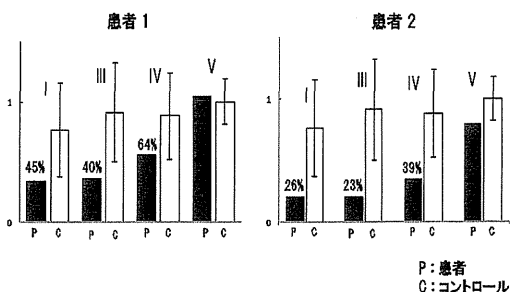
(倫理面への配慮)

国立精神・神経医療研究センター倫理委員会での承認を受けて研究を実施した。

C. 研究結果

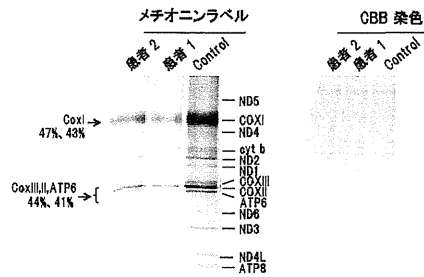
mtDNA 翻訳異常を呈し、複数のミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性の低下が認められた 2 検体(患者 1、2)の解析を行った(図 1、図 2)。

図1 生化学検査の結果(呼吸鎖複合体酵素活性)



患者の骨格筋を用いた生化学検査において呼吸鎖複合体-IVの活性を複合体IIの活性でノーマライズした値を示す。コントロールはミトコンドリア病でない5名の値。検体1、2も複合体I、III、IVの活性低下が認められた。

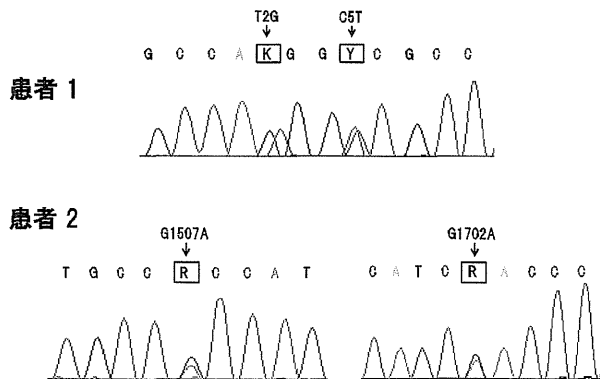
図2 生化学検査の結果 (翻訳活性)



患者由来筋芽細胞を用いて、細胞質の翻訳を停止させた状態で35Sメチオニンを用いてパルスラベルし、ミトコンドリア翻訳活性を検出した。左図はミトコンドリアの翻訳産物を示し、右図は同量のタンパク質が泳動されていることを確認するためのGBB染色像である。患者においてミトコンドリア翻訳活性がコントロールの40-50%に低下していた。

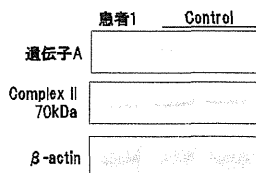
患者 1 については mtDNA のコピー数に関与することが示唆されている遺伝子 A、患者 2 については核酸合成関連の遺伝子 B が原因遺伝子候補として見いだされた。両遺伝子ともミスセンス変異を複合ヘテロ接合性に認め、サンガー法にてシーケンスの確認を行った(図 3)。

図3 サンガー法による変異箇所のフェノグラム



患者 1 の遺伝子 A の発現を Western blotting にて調べたところ、コントロールと比較して顕著に低下しており、ほとんど検出されなかった(図 4)。

図4 患者1における遺伝子Aの発現 (Western blotting)



患者由来筋芽細胞のセルライゼートを用いてWestern blottingを行った。患者において遺伝子Aのタンパク質がほとんど検出されなかった。

D. 考察

患者 1 は変異により遺伝子 A の発現が低下し mtDNA のコピー数の減少が引き起こされたために mtDNA 翻訳異常を呈した可能性が考えられる。原因遺伝子を特定するために現在表現系回復実験を行っている。患者 2 については患者 1 と同様の解析が進行中である。今後はこの方法でさらにミトコンドリア機能異常が認められる検体について解析を行い、原因遺伝子の特定を進める。

E. 結論

本研究は適切に選定した検体を用いることでミトコンドリア病核コードの原因遺伝子の特定が効率的かつ比較的 low cost で行うことができることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Itagaki Y, Matsuzaki K, Nakura M, Nishino I, Goto Y, Sasaki M. Unusual exocrine complication of pancreatitis in mitochondrial disease. *Brain Dev* 35:654-659, 2013 August
2. Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. *Brain Dev* 36: 180-182, 2014 Feb
3. 後藤雄一：ミトコンドリア脳筋症. 疾患・症状別 今日の看護. 南江堂, 東京, 771-773 頁, 2013
4. 後藤雄一：ミトコンドリア病, 2339 頁-2342 頁(内科学, 第 10 版, 朝倉書店, 東京) 2013

2. 学会発表

1. 竹下絵里, 石井智弘, 栗津緑, 新庄正宜, 長谷川奉延, 三木純, 日高義彦, 本林光雄, 熊谷悦子, 後藤雄一：巣状糸球体硬化症による慢性腎不全を呈したミトコンドリア DNA9155A>G 変異の 2 例. 第 116 回日本小児科学会総会, 広島, 4.20, 2013
2. 竹下絵里, 三牧正和, 西野一三, 埜中征哉, 後藤雄一：ミトコンドリア病の遺伝子診断には、long PCR 法、サザンブロット法、全周シーケンス法を用いた解析と総合的な判断が必要である. 第 55 回日本小児神経学会総会, 大分, 6.1, 2013
3. Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa T, Miki J, Hidaka Y, Motobayashi M,

- Kumagai E, Goto Y. Novel mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. International Congress of Pediatrics 2013, the 27th Congress of the International Pediatric Association, Melbourne, Australia, 8.24-29, 2013
4. Ito S, Hirano Y, Nakano K, Goto Y, Ohtani Y, Shimada S, Ishigaki K, Funatsuka M, Oguni H, Osawa M, Nahgata S: The first case of infantile-onset spinocerebellar ataxia in Japan caused by novel autosomal recessive Twinkle/C12orf2 mutations. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
 5. Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
 6. Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Mitochondrial dysfunction is the barrier against cellular reprogramming. but not the maintenance of pluripotency. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
 7. Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. *in vitro* neural modeling of various mitochondrial disorders using patient-derived iPS cells. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
 8. Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Molecular pathogenesis and iPS-cell-based disease modeling of MELAS caused by a mutation in anticodon-stem of *MTTW* gene. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

上記について報告事項なし

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

—肥大型心筋症における Force-Frequency Relation 評価の意義—

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 教授）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマにした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

【背景】生理的にはペースング頻度の上昇に伴い心筋収縮力は増大することが知られているが(Force-frequency relation: FFR, Bowditch 効果), 不全心では FFR に異常を認め、収縮予備能の異常を反映するとされる。われわれは先行研究において、HCM における FFR には、ペースング頻度の上昇に伴い収縮力が増加する Monophasic パターンと、ある刺激頻度以上になると収縮力が低下する Biphasic パターンの 2 種類があり、後者は収縮関連蛋白 mRNA の発現異常に基づくことを報告した(Somura et al. Circulation. 2001; 104: 658-663)。しかしながら、運動中の突然死の原因の 1 つとされる HCM において、FFR と予後との関係は十分に明らかでない。

【目的】収縮能の保たれた HCM 患者における FFR と予後との関連を検討し、FFR 異常の背景にある病態生理を究明することを目的とした。

B. 研究方法

左室駆出率が 50%以上を保たれた NYHA 分類 I あるいは II 度の HCM 患者 81 例を対象とした。左室内に 6Fr マイクロマノメータ付きピッグテールカテーテルを留置し、10 拍/分きざみで 80 拍/分から 140 拍/分まで心房ペースング負荷を行い、LVdP/dt_{max} を測定した。FFR の種類により、Monophasic pattern (M 群: 59 例)と Biphasic pattern (B 群: 22 例)に分類し、予後追跡調査を行った。

(倫理面への配慮)

インフォームド・コンセントにおいては、書面を用いて、直接患者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は施錠可能なキャビネットに保管する。個人情報においては、各被験者に対して連結可能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存・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。連結表は、施錠管理のもと別に保管し、データのみでは直接的に患者個人を同定できないようになっている。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。研究データの解析結果は、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 57.5 歳、BNP 値は 131.5pg/mL、左室駆出率は 71%であった。家族歴および NYHA 分類において、両群間に有意な差を認めなかった。B 群では M 群に比べ、BNP 値は有意に高値であり(M 群 45.0 vs B 群 129.9 [pg/mL], p=0.003)、左室重量係数は有意に高かった(M 群 141.5 vs B 群 168.5 [g/m²], p=0.02)。観察期間中に突然死 3 例、致死性不整脈 3 例、心不全増悪による入院 2 例を経

験した。予後解析では、複合心血管イベントはB群で有意に多く(p=0.001)、Cox 比例ハザード解析では、FFR における Biphasic パターンは独立した予後予測因子であった(HR=8.35, p=0.009)。そこで、FFR 異常の病態生理学的背景を究明するため、心筋構成蛋白の潜在性変化があるか否かを、各群患者心筋検体のウェスタンブロットにより評価した。SERCA2a 蛋白発現量はB群で有意に低下しており(p=0.017)、Troponin I 発現量もB群で有意に低下していた(p=0.045)。

D. 考察

本研究は、収縮能の保たれた無症候～軽症状のHCMにおいてFFRと長期予後との関連を示した初めての報告である。B群では、M群に比し高率に心イベントを来した。左室流出路狭窄は、予後不良因子の1つとされる。安静時左室流出路狭窄を認めない69例においても同様の結果を認め、B群(n=17)ではM群(n=52)に比べ予後不良であった(p<0.001)。運動時の血圧上昇不良・低下も、突然死の予測因子の1つとして報告されている。運動負荷検査を施行しえた43例における研究では、4例のみに血圧反応異常を認めたのみであり、両群間に心イベント発生率に有意差を認めなかった。心尖部肥大型心筋症は、日本人に多い予後良好なタイプとされる。本研究では27%に同タイプを認めたが、B群およびM群間に差は認めていない。さらに本研究では、FFRの背景にある病態生理の解明のためにCa²⁺ハンドリング関連蛋白の発現をみたが、SERCA2aおよびTnIの発現はB群で有意に低下しており、先行研究におけるmRNA発現異常と同様に、蛋白レベルにおいても発現異常を認めた。先行研究結果を支持する結果となり、潜在的な収縮機構障害の責任分子として収縮関連蛋白発現変化が示唆された。FFRは侵襲を伴う検査ではあるが、無症候～軽症状のHCMにおいても、既知の予後予測因子では同定できない潜在的な収縮障害をFFRは早期に誘発でき、予後予測に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

収縮能が保たれた無症候あるいは軽症状のHCM患者において、潜在性の収縮障害はFFRによって誘発でき、心イベントのリスク評価に有用である。FFRの異常は、収縮に関連する心筋構造蛋白の低下を反映しうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashi D, Ohshima S, Murohara T et al. Increased (99m) Tc-sestamibi washout reflects impaired myocardial contractile and relaxation reserve during dobutamine stress due to mitochondrial dysfunction in dilated cardiomyopathy patients. J Am Coll Cardiol. 2013 May 14; 61(19): 2007-17.

2) Yamada T, Hirashiki A, Murohara T et al. Relationship of myocardial fibrosis to left ventricular and mitochondrial function in nonischemic dilated cardiomyopathy - a comparison of focal and interstitial fibrosis. J Card Fail. 2013 Aug; 19(8): 557-64.

3) Monji A, Bando YK, Murohara T et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Aug 1;305(3) H295-304.

2. 学会発表

1) Ryota Morimoto, Takahiro Okumura, Toyoaki Murohara. Impaired force-frequency relation pattern as a novel predictor of prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. European Society of Cardiology Congress 2013 (Amsterdam) 31 Aug. - 4 Sept. 2013

2) Akinori Sawamura, Takahiro Okumura, Toyoaki Murohara. Abnormality of Nighttime blood pressure fall as a Novel Prognostic Marker in patients with Dilated Cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas) 16-20 Nov. 2013

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

－ 肥大型心筋症の発症進展における USMG5 の機能的意義解明を目指した研究 －

研究分担者：山岸正和（金沢大学 循環器内科 教授）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマにした市民公開講座を開催した。

A. 研究目的

心筋ミオシン結合蛋白 C はサルコメア蛋白の一つであり、その遺伝子 (*MYBPC3*) 変異は肥大型心筋症 (HCM) を引き起こす。我々は以前、北陸地方の HCM 大家系において *MYBPC3* 遺伝子 Int21DSG+1A 変異を同定し、本変異が心筋ミオシン結合蛋白 C のトランケーションを来すことにより左室肥大に関与することを報告した。しかしながら、*MYBPC3* 遺伝子変異が HCM を引き起こす機序は依然として不明な点が多い。以前、我々はマウス HCM 心で行った DSAGE 解析において、新規の分子 (USMG5: Up-regulated during Skeletal Muscle Growth 5 homolog) の発現が HCM 心筋において亢進していることを明らかにした。*USMG5* 遺伝子は DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) 蛋白をコードし心臓を含む全身に広く発現するが、その機能は未知であり、また HCM 発症におけるその関与も不明である。本研究の目的は、*MYBPC3* 変異 HCM ゼブラフィッシュを用いて、HCM 発症進展における DAPIT の役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

MYBPC3 変異 HCM ゼブラフィッシュは、*MYBPC3* に対するアンチセンス・モルフォリーノオリゴを受精卵に導入することで作成した。次に、WT 群 および *MYBPC3* 群の受精卵に *USMG5* に対するアンチセンス・モルフォリ

ーノオリゴを導入し、*USMG5* ノックダウンによる心室サイズや心収縮能・心嚢液の出現頻度を 3 群間 (*MYBPC3* 群・WT-*USMG5* 群・*MYBPC3-USMG5* 群) で比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに従い、また金沢大学動物実験委員会の承認から承認を得た。

C. 研究結果

ゼブラフィッシュから mRNA を抽出し、RT-PCR 法により *MYBPC3* のエクソンスキップが確認された。アンチセンス・モルフォリーノオリゴ導入後 72 時間の時点において、顕微鏡下に心形態および機能の観察を行ったところ、WT 群と *MYBPC3* 群において心房径や心室径・心収縮能に差異は認められなかった。一方、*MYBPC3* 群・WT-*USMG5* 群・*MYBPC3-USMG5* 群の比較において、心嚢液量は WT-*USMG5* 群で中等量、*MYBPC3-USMG5* 群で高度に認められた (定量心嚢液量: *MYBPC* 群 vs. WT-*USMG5* 群, $p < 0.05$; *MYBPC3* 群 vs. *MYBPC3-USMG5* 群, $p < 0.01$)。また心室径は *MYBPC3-USMG5* 群で有意な減少が認められた (*MYBPC* 群 vs. WT-*USMG5* 群, $151 \pm 10.0 \mu\text{m}$ vs. $161.3 \pm 9.0 \mu\text{m}$ $p = \text{N.S.}$; *MYBPC3* 群 vs. *MYBPC3-USMG5* 群, $151 \pm 10.0 \mu\text{m}$ vs. $141 \pm 5.5 \mu\text{m}$ $p < 0.05$)。

D. 考察

本研究により、*MYBPC3* 変異ゼブラフィッシュモデルにおける *USMG5* (DAPIT)ノックダウンにより、small heart および高度な cardiac edema が出現することが明らかとなった。*USMG5* 遺伝子がコードする DAPIT 蛋白は、ミトコンドリアにおける ATP 産生酵素近傍の F0 領域に位置することが知られている。培養細胞において、*USMG5* のノックダウンにより細胞内 ATP の産生が有意に低下することが最近報告された (Ohsakaya et al. J Biol Chem 2013)。これらの観察結果より、*MYBPC3* 変異ゼブラフィッシュモデルにおける *USMG5* ノックダウンは、心筋での ATP 産生の低下を来とし、small heart および cardiac edema の出現を招くものと推察された。今後、新生仔マウス心組織において *MYBPC3* および *USMG5* のノックダウンを行い、心筋細胞形態や細胞内の ATP 動態を解析する予定である。

E. 結論

USMG5 (DAPIT) が HCM の発症進展に関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Fujita T, Fujino N, Anan R, Tei C, Kubo T, Doi Y, Kinugawa S, Tsutsui H, Kobayashi S, Yano M, Asakura M, Kitakaze M, Komuro I, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Ino H, Yamagishi M.

Sarcomere gene mutations are associated with increased cardiovascular events in left ventricular hypertrophy: results from multicenter registration in Japan.

JACC Heart Fail 2013;1:459-466.

[2] Wang F, Demura M, Cheng Y, Zhu A, Karashima S, Yoneda T, Demura Y, Maeda Y, Namiki M, Ono K, Nakamura Y, Sasano H, Akagi T, Yamagishi M, Saijoh K, Takeda Y.

Dynamic CCAAT/enhancer binding protein-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene.

Hypertension 2014;63: 281-288.

[3] Kawashiri MA, Hayashi K, Konno T, Fujino N, Ino H, Yamagishi M.

Current perspectives in genetic cardiovascular disorders: from basic to clinical aspects.

Heart Vessels 2014;29:129-141.

2. 学会発表

[1] Akira Funada, Noboru Fujino, Masakazu Yamagishi.

Impact of Combined Abnormalities of Troponin-Gene Mutations and Renin-angiotension System Polymorphisms on Occurrence of Atrial Fibrillation in Hypertrophic Cardiomyopathy: Results from Clinical and Genetic Analyses of Genotyped Patients

AOS.518.01, Scientific Sessions 2013, American Heart Association (Dallas).

[2] Kenshi Hayashi, Noboru Fujino, Tetsuo Konno, Toyonobu Tsuda, Kanazawa Univ Graduate Sch of Med, Kanazawa, Japan; Yoko Imi (Hashida), Takekatsu Saito, Kunio Ohta, Kanazawa Univ, Kanazawa, Japan; Hidekazu Ino, Masa-aki Kawashiri, Masakazu Yamagishi

Impact of New LQTS Diagnostic Criteria on Detection of Long QT Syndrome with Carrying Gene Mutations

APS.400.0923. Scientific Sessions 2013, American Heart Association (Dallas).

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 教授）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマ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。ミトコンドリアは心臓におけるエネルギー産生に重要な役割を果たすが、生体内でミトコンドリア機能を評価する方法はきわめて限られている。

B. 研究方法

Technetium-99m sestamibi ($^{99m}\text{Tc-MIBI}$) は、心臓核医学検査に用いられ、SPECT 画像における相対的シグナル強度の評価は心筋虚血の診断に広く用いられている。また、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の心筋細胞内へ取り込みと保持の絶対量は培養心筋細胞においてミトコンドリア膜電位に依存することが知られている。

$^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の心臓組織への絶対量を測定することにより、

(1) $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ により生体内で心臓のミトコンドリア膜電位評価が可能であるか、(2) 心不全モデルにおいて $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ はどのように変化するか、について検討した。

(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

テトラメチルローダミンエステル(TMRE)は、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ と同様に脂溶性の陽性荷電分子でミトコンドリア膜電位の測定に頻用される。正常ラットの摘出灌流心を用いてTMREのシグナル強度と $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度を比較したところ、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ は TMRE と同程度の感度でミトコンドリア膜電位を測定できることが分かった。Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)はミトコンドリアの脱共役化剤であり、ミトコンドリア膜電位を消失させる方向に働く。摘出灌流心を用いた検討で、CCCP は $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度を低下させた。また、CCCP を投与されたラットでは $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度は低下した。以上の実験により、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の絶対量測定によりミトコンドリア膜電位の測定が可能であると思われた。

次に、高血圧性心不全モデルである高食塩食を食餌として投与したダール食塩感受性ラットに $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ を投与した。通常食を食餌として投与したダール食塩感受性ラットを対照群とした。ダール食塩感受性ラットにおいては心重量の増加がみられたが、心筋組織重量あたりの $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度は、心重量と負の相関を示した。心臓ごと1個に換算したまた、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度は、対照群と差がなかった。 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ のシグナル強度は、脂肪酸アナログである

¹²⁵I-15-(p-iodophenyl)-9-R,S-methylpentadecanoic acid (¹²⁵I-9MPA) の保持と正の相関を示した。^{99m}Tc-MIBI のシグナル強度は、心臓超音波によって求められた心拍出量と相関しなかった。

D. 考察

^{99m}Tc-MIBI の組織重量あたりのシグナル強度は心重量と負の相関を示し、心臓 1 個あたりに換算して正常心と肥大心で差がなかったことについては、2 つの可能性があると考えられる。すなわち、(1) 肥大心において組織重量あたりの心筋血流量が正常心より減少していた、および、(2) 肥大心においてミトコンドリア膜電位が低下していた、という可能性である。本研究では心筋血流量は測定していないので、結論はえられないが、^{99m}Tc-MIBI のシグナル強度が心拍出量と相関しなかったことは、後者の可能性を示唆すると思われる。

E. 結論

^{99m}Tc-MIBI により生体内で心臓ミトコンドリア膜電位の解析が可能であった。1 つの心不全モデルにおいて、^{99m}Tc-MIBI のシグナル強度は心重量と負の相関を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okuda J, Niizuma S, Shioi T, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Kawamoto A, Tanada Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Soga T, Takemura G, Kondoh H, Kita T, Kimura T. Persistent overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, modifies energy metabolism and reduces stress resistance of heart in mice. PLoS One. 12, e72173, 2013.

Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol. 57, 72-81, 2013

2. 学会発表

Tanada Y, Shioi T, Kawamoto A, Okuda J, Kimura T. Branched-chain amino acids ameliorate heart failure in rats. The 85th Scientific Sessions of American Heart Association, November 16-20, 2013, Dallas, USA

Tanada Y, Shioi T, Kawamoto A, Okuda J, Kimura T. Branched-chain amino acids prevent heart failure in rats. Gordon Research Conferences, Biology of Aging, August 11-16, 2013, Lucca, Italy.

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 部長）

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。引き続き、特発性心筋症における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目的とした。各分担研究者および研究協力者において、特発性心筋症およびかかる疾患によって惹起される心不全を中心とした課題に対して、臨床研究および基礎研究の様々なアプローチから解明を進めた。また、心臓サルコイドーシスの診断基準の改訂や肥大型心筋症における遺伝子変異の解析等をサブグループ研究として進めた。さらに、研究成果の社会への還元として、心筋症患者における大きな課題である突然死をテーマ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臓移植待機期間は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、2013年からは心臓移植へのブリッジとしては、原則として植込型LVAS装着を行ってきた。今回その早期成績を検討する。

B. 研究方法

当センターにおいて、2011年4月から2013年12月までに、植込型LVAS装着を行った重症心不全36例（EVAHEART14例、DuraHeart4例、HeartMate-2 18例）の成績を検討した。なお、5例は体外設置型（Nipro-TOYOBO LVAS）からの移行例であった。平均年齢は40.2 ± 12.5歳、男女比は31:5、原疾患は拡張型心筋症が最も多く27例であった。

（倫理面への配慮）

植込型補助人工心臓による心臓移植へのブ

リッジ治療は、保険診療に基づくもので、対象となる患者および家族に対しては、十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

手術死亡（術後30日以内）はなく、遠隔期死亡は2例で、ともに、脳合併症（術後64日 m 術後838日）によるものであった。なお、平均LVAS補助期間は420（37-944）日であった。2例は心臓移植が実施され、他の32例は心臓移植待機中である。累積生存率は2年で97.2%、脳合併症会費率は2年で39.2%、Drive line感染回避率は2年で28.5%であった。また、退院・在宅管理に至った症例は27例で、復学1例、復職2例であり、移植に至った2例も退院・在宅管理に至った症例であった。また、再入院は19例で74回認めており、Drive line感染が40回と最も多く、脳合併症（9回）、不整脈（6回）、機器不調（4回）などであった。

D. 考察

植込型LVASの選択できる機種が増加し、体格の小さい症例に対する適応も可能となり、その成績は良好である。また、植込型LVASによる在宅管理を積極的に行なう状況になってきた。しかし、LVASにおける問題点としての脳血管障害、皮膚刺入部感染および機器トラブルによる再入院例を多く認めている。

E. 結論

植込型 LVAS の導入により、重症心不全患者においても在宅管理が行える状況となってきた。しかし、Drive line 感染、脳血管障害、機器トラブルなどへの対応については、今検討を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwashima Y, Yanase M, Horio T, Seguchi O, Murata Y, Fujita T, Toda K, Kawano Y, Nakatani T: Impact of ump replacement on outcome in advanced heart failure patients with left ventricular assist system. *Artificial Organs* 37(7):606-614, 2013

Suwa H, Seguchi O, Fujita T, Murata Y, Hieda M, Watanabe T, Sato T, Sunami H, Yanase M, Hata H, Nakatani T: Paracorporeal ventricular assist device as a bridge to transplant candidacy in the era of implantable continuous-flow ventricular assist device. *J Artif Organs* (in press). DOI 10.1007/s10047-013-0731-3
Fujita T, Kobayashi J, Hata H, Seguchi O, Sato T, Yanase M, Murata Y, Sunami H, Nakatani T: Aortic valve closure for rapidly deteriorated aortic insufficiency after continuous flow left ventricular assist device implantation. *J Artif Organs* 16:98-100, 2013

中谷武嗣、秦 広樹、藤田知之、小林順二郎、村田欣洋、瀬口 理、築瀬正伸、堀 由美子、和田恭一、植田初江、宮田茂樹、内藤博昭：心臓移植および補助人工心臓の経験。胸部外科 66(1): 63-67, 2013

中谷武嗣、築瀬正伸、藤田知之：臓器移植法改正後の心臓移植。心臓 45(3) 255-258, 2013

中谷武嗣、瀬口 理、村田欣洋、佐藤琢真、角南春樹、築瀬正伸、堀 由美子、和田恭一：植込型左室補助人工心臓装着患者における PT-INR 自己管理。CLINICIAN 13(624): 1140(116)- 1146(122), 2013.

2. 学会発表

築瀬正伸、佐藤琢真、角南春樹、村田欣洋、瀬口 理、秦 広樹、藤田知之、小林順二郎、宮田茂樹、植田初江、中谷武嗣：国立循環器病研究センターにおける重症心不全に対する集学的治療。第 49 回日本移植学会総会、ワークショップ、京都、2013.9.5-7.

中谷武嗣、築瀬正伸、藤田知之、秦 広樹、瀬口 理、村田欣洋、佐藤琢真、角南春樹、堀 由美子、西岡 宏、和

田恭一、植田初江、宮田茂樹、小林順二郎、内藤博昭：わが国における植込型補助人工心臓導入後の心臓移植の現状と今後の展望。第 61 回日本心臓病学会学術集会、シンポジウム、熊本、2013.9.20-22.

中田則子、坂口幸子、堀 由美子、中屋貴子、西岡 宏、上の町かおり、和田恭一、碓山泰匡、藤田知之、築瀬正伸、中谷武嗣：重症心不全病棟での補助人工心臓管理におけるメディカルスタッフ連携の推移。第 61 回日本心臓病学会学術集会、熊本、2013.9.20-22.

堀 由美子、大石恵美子、酒井恵理子、中屋貴子、坂口幸子、西岡 宏、畑中 晃、和田恭一、上ノ町かおり、長松耕平、築瀬正伸、藤田知之、中谷武嗣：植込型左心人工心臓装着患者のメディカルスタッフの連携。第 61 回日本心臓病学会学術集会、熊本、2013.9.20-22. 9.21.

角南春樹、中島誠子、渡邊琢也、稗田道成、佐藤琢真、村田欣洋、瀬口 理、築瀬正伸、秦 広樹、藤田知之、堀 由美子、和田恭一、中谷武嗣：当院における植込型左室補助人工心臓装着患者の外来治療モニタリング。第 51 回日本人工臓器学会大会、横浜、2013.9.27-29.

藤田知之、秦 広樹、瀬口 理、村田欣洋、築瀬正伸、島原佑介、佐藤俊輔、中谷武嗣、小林順二郎：LVAS 植込み時における右心不全と三尖弁形成術の有用性。第 51 回日本人工臓器学会大会、横浜、2013.9.27-29.

築瀬正伸、中島誠子、渡邊琢也、稗田道成、佐藤琢真、角南春樹、村田欣洋、瀬口 理、坪井志穂、堀 由美子、秦 広樹、藤田知之、小林順二郎、中谷武嗣：植込型 LVAS の Bridge to candidacy (likely)症例に対する適応拡大の検討—NCVC における Nipro-TOYOBO LVAS の経験から—。第 32 回日本心臓移植研究会学術集会、シンポジウム、さいたま、2013.11.30.

Funasako M, Seguchi O, Chinen D, Kamiya C, Hieda M, Watanabe T, Sato T, Sunami H, Murata Y, Yanase M, Hata H, Fujita T, Kobayashi J, Nakatani T: Successful recovery with biventricular assist device and bromocriptine administrations in a patient with life-threatening peripartum cardiomyopathy. ISHLT 33rd Annual Meeting Scientific Sessions. Montreal, CANADA, 2013.4.24-27.

Sato T, Seguchi O, Nakajima S, Hieda M, Sunami H, Murata Y, Hata H, Yanase M, Fujita T, Nakatani T: Brain natriuretic peptide levels at two months after LVAD implantation predict long-term survival. 8th European Mechanical Circulatory Support Summit. Paris, France., 2013.12.4-7.

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

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

佐藤琢真 国立循環器病研究センター移植部

角南春樹 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

堀由美子 国立循環器病研究センター移植部・看護部

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

1. Proton MR spectroscopy による心筋内脂肪蓄積の評価
 2. 肥大型心筋症における冠動脈病変の評価 -心臓 CT を用いた検討-
- 研究分担者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学 第1内科 教授）

研究要旨

1. Proton MR spectroscopy による心筋内脂肪蓄積の評価

Proton MR spectroscopy (MRS) を用いて心筋内脂肪蓄積を非侵襲的に評価することが、近年可能になった。糖尿病性心筋症では心筋内脂肪蓄積が増加しており拡張能障害と密接に関係していることが報告されているが、その他の心筋症では不明な点が多い。肥大型心筋症 (HCM) 患者 22 例に対し MRS を実施した。HCM において、心筋内脂肪蓄積は年齢、空腹時血糖、HbA1c、トリグリセライド、LDL-C、尿酸、eGFR、および BNP のいずれとも相関関係は認められなかった。一方、左室駆出率とは正の相関関係が認められ心筋内脂肪蓄積が少ないほど左室収縮能が低下した。さらに、左室心筋重量と負の相関関係が認められ心筋内脂肪蓄積が少ないほど左室肥大が増悪した。HCM において、心筋内脂肪蓄積は患者の背景因子よりもむしろ HCM の病態そのものと関連していた。

2. 肥大型心筋症における冠動脈病変の評価 -心臓 CT を用いた検討-

肥大型心筋症患者 (HCM) の多くは予後が良好であるが、少数とはいえ無視できない数の患者が心臓突然死、心不全、および心房細動を発症しその予後は不良である。冠動脈疾患 (CAD) は心臓突然死や心不全の重要な原因の1つであり、心臓カテーテル検査を用いた研究では HCM 患者の予後に悪影響を与えることが報告されている。しかしながら、HCM に合併する CAD の罹患率やその予測因子はこれまでに十分検討されていない。HCM 患者 51 例に対して心臓 CT を実施し HCM 患者における CAD の罹患率とその予測因子について検討した。Agatston score は 198.8 ± 312.0 であり冠危険因子数と正の相関を示した ($r = 0.32, p < 0.05$)。8 例 (15.7%) に CAD が認められた。糖尿病が CAD の独立した予測因子であった。HCM における CAD の罹患率は約 16% で稀ではなく、とくに糖尿病を合併した症例においては積極的に CAD の検索をすべきである。

1. Proton MR spectroscopy による
心筋内脂肪蓄積の評価

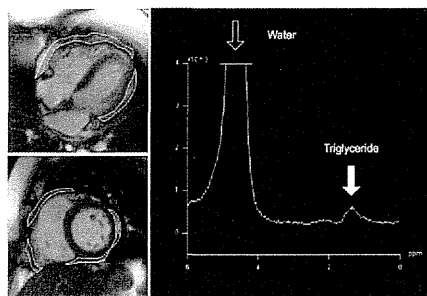
A. 研究目的

Proton MR spectroscopy (MRS) を用いて心筋内脂肪蓄積を非侵襲的に評価することが、近年可能になった。糖尿病性心筋症では心筋内脂肪蓄積が増加しており拡張能障害と密接に関係していることが報告されているが、その他の心筋症では不明な点が多い。

本研究の目的は、MRS を用いて肥大型心筋症における心筋内脂肪蓄積を評価し、背景因子や心機能・形態との関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は心臓 MRI による精査が必要であり同意が得られた肥大型心筋症患者 22 例 (68.0 ± 12.2 歳、男性 13 例) である。撮影装置は 1.5T MR スキャナー (Siemens Avanto) であり、シネ画像と遅延造影画像から構成されるルーチン検査に MRS を追加した。MRS は造影前に実施した。4 腔像と短軸像のシネ画像を参考にしながら心室中隔に関心領域を設定し、収縮末期にトリガーを設定し積算回数 10 回で撮像した。TE 30 ms に設定した。心筋内脂肪は、過去の報告から (脂肪の振幅) / (水の振幅) $\times 100$ (%) により表した。



(倫理面への配慮)

心臓 MRI を実施する大和橿原病院の規約に遵守して研究を実施する。本研究はルーチンの心臓 MRI 検査に MRS を追加するのみであり、薬剤投与を含む新たな侵襲を患者に加えることはない。

C. 研究結果

対象患者のうち 9 例が高血圧を、5 例が糖尿病を、10 例が脂質代謝障害を、7 例が肥満を合併していた。心筋内脂肪蓄積は年齢、空腹時血糖、HbA1c、トリグリセライド、LDL-C、尿酸、eGFR、および BNP のいずれとも相関関係は認められなかった。一方、左室駆出率とは正の相関関係が認められ心筋内脂肪蓄積が少ないほど左室収縮能が低下した。さらに、左室心筋重量と負の相関関係が認められ心筋内脂肪蓄積が少ないほど左室肥大が増悪した。

D. 考察

肥大型心筋症における心筋内脂肪蓄積は高血圧、糖尿病、および脂質代謝異常などの背景因子と関連しなかった。心筋内脂肪蓄積が少ないほど左室収縮能が低下し左室心筋重量が増加したことから、心筋内脂肪蓄積は患者の背景因子よりもむしろ肥大型心筋症の病態そのものと関連していると考えられる。

一方、糖尿病性心筋症では心筋内脂肪蓄積が多いほど拡張能が低下していることが報告されている。本研究の結果と合わせて考えると、心不全の病態には心筋内脂肪蓄積が増加するタイプと減少するタイプが存在すると考えられる。

肥大型心筋症において、心筋内脂肪蓄積が予後評価にそして治療方針決定に有用であるかどうかについては、今後、検討していきたい。

E. 結論

少数例での検討ではあるが、肥大型心筋症における心筋内脂肪蓄積は高血圧、糖尿病、および脂質代謝異常などの背景因子よりも、肥大型心筋症の病態そのものに強く影響されている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okayama S, Uemura S, Saito Y. Evaluation of epicardial and intra-myocardial fat in a patient with mitochondrial cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2013 Jul 31;167(2):e43-5.

2. 学会発表

平成 24 年 6 月 16 日

第 113 回日本循環器学会近畿地方会

MRS により心筋内脂肪蓄積を評価しえた糖尿病合併心尖部肥大型心筋症の 1 例

平成 24 年 9 月 14 日-16 日

第 60 回に本心臓病学会学術集会

Proton MR spectroscopy による心筋内脂肪蓄積評価の試み

平成 26 年 3 月 8 日

第 37 回循環器内科・外科フォーラム

肥大型心筋症における心筋内脂肪蓄積と心機能・形態との関係 -Proton MR spectroscopy を用いた検討-

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

2. 肥大型心筋症における冠動脈病変の評価

-心臓 CT を用いた検討-

A. 研究目的

肥大型心筋症患者 (HCM) の多くは予後が良好であるが、少数とはいえ無視できない数の患者は心臓突然死、心不全、および心房細動を発症し予後が不良である。冠動脈疾患 (CAD) は心臓突然死や心不全の重要な原因の 1 つであり、心臓カテーテル検査を用いた研究では HCM 患者の予後に悪影響を与えることが報告されている。しかしながら、HCM に合併する CAD の罹患率やその予測因子はこれまでに十分検討されていない。

本研究の目的は、心臓 CT を用いて HCM 患者における CAD の罹患率とその予測因子を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象は HCM 患者 51 例 (68.6 ± 11.8 歳、男性 31 例、女性 20 例) である。冠危険因子として年齢、性別、高血圧、脂質代謝異常、糖尿病および現在の喫煙習慣を評価した。さらに、心臓 CT を用いて Agatston score、冠動脈狭窄、石灰化プラーク、非石灰化プラーク、および混合性プラークの有無を評価した。

(倫理面への配慮)

心臓 CT を実施する奈良県立医科大学と大和橿原病院の規約に遵守して研究を実施する。本研究は過去の心臓 CT 検査のデータを後ろ向きに解析する観察研究であり、新たな侵襲を患者に加えることはない。

C. 研究結果

Agatston score は 198.8 ± 312.0 であり冠危険因子数と正の相関を示した ($r = 0.32$, $p < 0.05$)。何らかの冠動脈狭窄が 42 例

(82.4%) に、50%以上の有意狭窄が 8 例

(15.7%) に認められた。非石灰化プラークと

混合性プラークはそれぞれ 14 例 (27.5%) と 11 例 (21.6%) に認められた。多変量解析では糖尿病が 50%以上の有意狭窄の独立した予測因子であった。

D. 考察

肥大型心筋症における冠動脈疾患の罹患率は約 16%で稀ではなかった。また、Agatston score も 198.8 ± 312.0 であり、冠危険因子数の増加とともに上昇した。このことから、肥大型心筋症患者においても、一般患者と同様に冠危険因子のコントロールが重要であると考えられた。冠動脈疾患の独立した予測因子は糖尿病であり、とくに糖尿病を合併した症例においては積極的に CAD の検索をすべきである。

E. 結論

肥大型心筋患者において冠動脈疾患の合併は稀ではなかった。50%以上の冠動脈狭窄の独立した予測因子は糖尿病であった。糖尿病合併肥大型心筋症例では冠動脈疾患の精査が必要である。