

F. 研究発表

1. 論文発表

Okayama S, Soeda T, Kawakami R, Takami Y, Somekawa S, Ueda T, Sugawara Y, Matsumoto T, Sung JH, Nishida T, Uemura S, Saito Y. Evaluation of coronary artery disease and cardiac morphology and function in patients with hypertrophic cardiomyopathy, using cardiac computed tomography. Heart Vessels. 2013 Dec 11. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

平成 25 年 4 月 12 日-14 日

第 110 回日本内科学会総会

肥大型心筋症における冠動脈疾患の罹患率について

-心臓 CT を用いた検討-

平成 25 年 7 月 18 日-19 日

第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会

肥大型心筋症における冠動脈硬化について

-心臓 CT 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

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

—低用量β1遮断薬は心筋型リアノジン受容体のCa<sup>2+</sup>漏出を抑制し、  
カルシウムハンドリング異常を是正する—

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 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

心筋型リアノジン受容体（RyR2）を介した異常なCa<sup>2+</sup>の漏出は心不全と致死的な不整脈の重要な原因となることが知られている。最近の臨床研究で、頻脈と左室収縮障害を合併した重症急性心不全において、ミルリノンに低用量β1遮断薬ランジオロールを併用することが、ミルリノン単独投与よりも心機能をより改善させることを報告した。このランジオロールの急性効果の機序は、単なる徐拍効果によるものか、あるいはそれ以外の細胞内Ca<sup>2+</sup>ハンドリング是正効果も関与しているかどうかについて検討した。

B. 研究方法

正常および4週間の250bpmの高頻度右室ペースングによるイヌ心不全モデルから単離した左室心筋細胞を用いて、①Ca<sup>2+</sup> transient と Cell shortening の同時記録、②Ca<sup>2+</sup> spark assay、③筋小胞体（SR）内のCa<sup>2+</sup> content の計測を行った。さらに、④心筋型リアノジン受容体（RyR2）とフォスホランパン（PLB）のリン酸化の程度を Western Blot 法にて検討した。

（倫理面への配慮）

すべての実験は1964年のヘルシンキ宣言（医学研究の倫理的原則）に基づいて行った。

C. 研究結果

① Ca<sup>2+</sup> transient と Cell shortening の同時記録

不全心筋細胞ではCa<sup>2+</sup> transient も Cell shortening も低下していた。ミルリノンの投与でCa<sup>2+</sup> transient と Cell shortening は有意に改善したが、ミルリノンと併せてランジオロールを加えて投与すると、Ca<sup>2+</sup> transient と Cell shortening が著明に改善した。

② Ca<sup>2+</sup> spark assay

不全心筋細胞ではCa<sup>2+</sup> spark は増加し、ミルリノンの投与によって著明に増加した。ランジオロールを加えて投与すると、Ca<sup>2+</sup> spark は減少した。

③ 筋小胞体（SR）内Ca<sup>2+</sup> content

ミルリノン投与によりSR内のCa<sup>2+</sup> content は増加し、ランジオロールを併せて投与することでさらに増加した。

④ Western Blot 法

正常心筋細胞ではミルリノンの投与によりRyR2およびPLBのリン酸化レベルがともに有意に増加した。不全心筋細胞ではRyR2のベースラインのリン酸化レベルが、すでに正常心筋細胞に比較して、有意に亢進していた。ミルリノンの投与はRyR2のリン酸化レベルに影響は与えなかったが、PLBのリン酸化を著明に増加させた。ミルリノンとランジオロールを投与すると、RyR2の過リン酸化

を抑制したが、PLBのリン酸化レベルには影響を与えなかった。

#### D. 考察

- ①不全心筋細胞においては、RyR2から拡張期にCa<sup>2+</sup>漏出が起きており、SR内のCa<sup>2+</sup>枯渇と細胞質のCa<sup>2+</sup>過負荷が起きている。その結果、心筋細胞機能の収縮・拡張不全が生じている。
- ②不全心筋細胞に、心抑制のない低用量のランジオロールを投与すると、RyR2から拡張期にCa<sup>2+</sup>漏出が抑制されるため、わずかに心筋細胞機能が改善する。
- ③不全心筋細胞にミルリノン投与すると、PLBのリン酸化を介して、SR内へのCa<sup>2+</sup>取り込みが亢進するが、一方、RyR2からのCa<sup>2+</sup>漏出も著明に増加する。その結果、SR内Ca<sup>2+</sup>contentはわずかに増加する。
- ④全心筋細胞にミルリノンと低用量ランジオロールを投与すると、PLBのリン酸化を介して、SR内へのCa<sup>2+</sup>取り込みが亢進するが、RyR2からのCa<sup>2+</sup>漏出が抑制され、その結果、心筋細胞機能は著明に改善する。

#### E. 結論

ミルリノンに低用量ランジオロールを併用することによる心機能の改善には、低用量β1遮断薬がミルリノンによるRyR2からの拡張期Ca<sup>2+</sup>漏出の増大を抑制することが重要な機序であると考えられた。低用量β1遮断薬によるSRからのCa<sup>2+</sup>漏出抑制には、RyR2の過リン酸化の選択的抑制の関与が示唆された。

本研究における協力者 本学 小林 茂樹

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi S, Murakami W, Myoren T, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Nao T, Wada Y, Matsuzaki M, Yano M, A low-dose β1 blocker effectively and safely slows heart rate in patients with acute decompensated heart failure and rapid atrial fibrillation. *Cardiology*;127:105-113. 2014.
2. Yano M, Okuda S. Does a ripple of Ca<sup>2+</sup> leak develop into a rogue wave that can trigger pathological hypertrophy? *J Am Coll Cardiol*. 2013. in press

##### 2. 学会発表

1. Shigeki Kobayashi, Seiko Fukuta, Wakako Murakami, Shinichi Okuda, Masahiro Doi, Tomoko Nao, Yasuaki Wada, Yasuhiro Yoshiga, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Takeshi Ueyama, Masafumi Yano. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine Predicts the Inflammatory Activity in Patients with Cardiac Sarcoidosis. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Yokohama.2013.3.15.
2. Wakako Murakami, Shigeki Kobayashi, Hiroki Tateishi, Shinichi Okuda, Masahiro Doi, Tomoko Nao, Yasuaki Wada, Jutarō Yamada, Takayuki Okamura, Masafumi Yano. Impact of Myocardial Oxidative Stress on Left Ventricular Remodeling in Patients with Dilated Cardiomyopathy. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Yokohama.2013.3.15.

#### 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

—迷走神経による心不全治療の至適条件検討—

研究分担者：砂川 賢二（九州大学医学研究院 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

慢性心不全において、交感神経の亢進がその病態形成と増悪に重要な役割を果たしていることが知られている。迷走神経刺激（Vagal nerve stimulation: VNS）は心筋梗塞後ラットの心筋リモデリング、予後を改善することが報告され、現在ではその効果はすでに慢性心不全患者を対象に行った臨床研究で、NYHAの改善、左室駆出率の改善が報告されている。しかしながら、このVNSが慢性心不全に有効であることのメカニズムは依然不明であり、刺激強度依存性にその効果が得られるのか、心拍数減少と関連があるのか、など明らかにすべき点が多い。同時に、VNSはその強度依存性に副作用が出現することがわかっており、臨床上の課題である。そこで、本研究は、このVNSの刺激条件について、至適条件を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

我々は、まず、ラットでの慢性心不全モデルに対して、無線にてプログラム可能な植え込み型刺激装置および刺激電極を開発した。（図1）慢性心不全モデルとして、ラット心筋梗塞後心不全ラットを作成し、1週間後に血行動態計測のためテレメトリー植え込みを施行。さらに1週間後おいたのちに心エコーにて心筋梗塞後の収縮能を確認したのちに刺激を開始した。（図2）

刺激条件として、心拍低下が生じる最小出力を100%（max群）とし、その50%、25%をそれぞれhalf群、quarter群

と定義した。つまり、max以外では心拍低下作用は認めない。（図3）シャム群として、植え込みのみ行い、刺激を行わないラットをあわせて評価した。評価は、4週間刺激を行ったのち、心エコーによる心機能評価、心重量、肺重量、BNP、左室拡張末期圧によって、各群を比較した。

図1. 新規開発した植え込み型刺激装置と電極

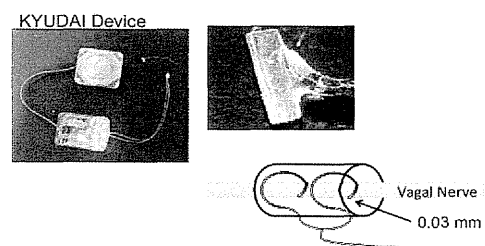
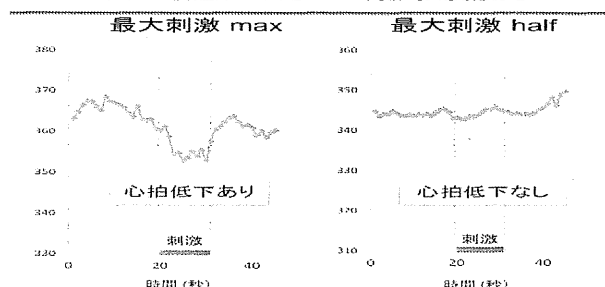


図2. 植え込み型迷走神経刺激の条件検討のためのプロトコル



図3. 最適化のための刺激強度設定



(倫理面への配慮)

動物実験実施に際しては、九州大学動物実験実施規定に則り動物実験計画の承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

新規開発の刺激装置により、VNS4 週後の左室重量・肺重量は、half 群で最も軽く、左室拡張末期圧および BNP は低置を示し、収縮能も保たれていることが明らかとなった。(図 4)

さらに、duty cycle の違いによる抗リモデリング効果を検討するために、5 秒 on 55 秒 off, 10 秒 on 50 秒 off, 20 秒 on 40 秒 off という組み合わせで同様の実験を行った。

(output half, frequency 20Hz, 180 usec)

その結果、10 秒 on 50 秒 off の組み合わせが最も抗リモデリング効果が高いことが示された。(図 5) さらに同様に、パルス幅について検討し、60 usec および 180 usec のいずれかがより効果が高いかを検討し、180 usec でより有効な抗リモデリング効果が得られると判断した。(図 6)

さらに、VNS による抗リモデリング作用の機序として、交感神経活動抑制効果について検討した。

ラット頸動脈洞を単離し、ステップワイズに頸動脈洞内圧 (CSP) を入力し、血圧 (AP)、腎動脈交感神経 (SNA) について計測、中枢弓 (CSP-SNA)、末梢弓 (SNA-AP) の関係を得た。(図 7) 中枢弓は、VNS により下方シフトしたが、末梢弓では同じ直線上を推移することが示された。つまり、VNS では、求心路を介して交感神経が抑制されることが示された。

図4. 出力による抗リモデリング効果の違い

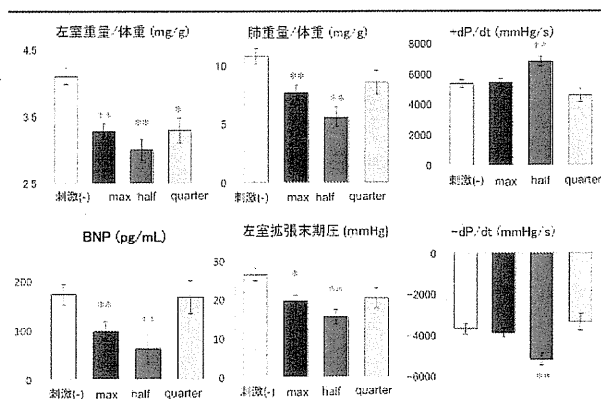


図5. Duty cycleの違いによる抗リモデリング効果の違い

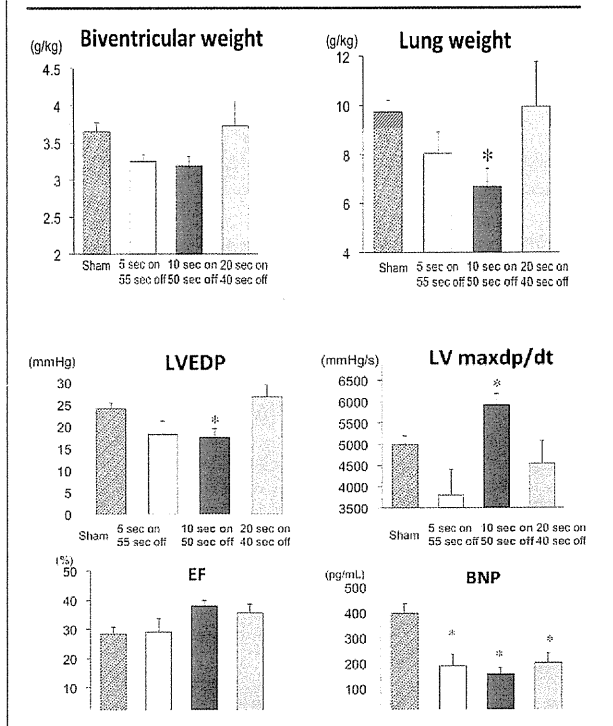


図6. パルス幅の違いによる抗リモデリング効果の違い

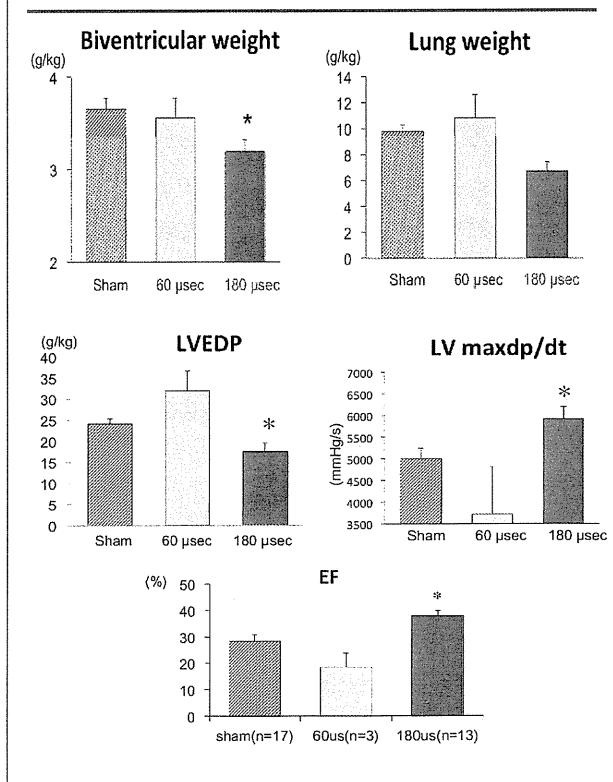
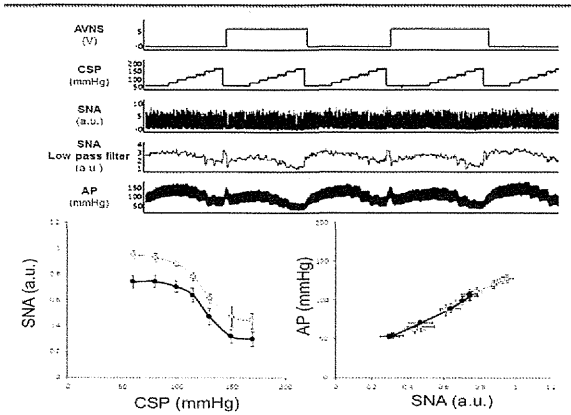


図7. 迷走神経刺激による交感神経活動抑制効果



#### D. 考察

VNS はすでに Boston Scientific 社および BioControl Medical 社によって、心不全患者において刺激装置が開発され、すでに治験が開始されている。今後、心不全患者の予後を改善する新たなデバイス治療としてその有効性が期待されると同時に、副作用軽減の目的とあわせてその刺激条件の最適化およびメカニズムの解明は極めて重要であるといえる。

今回、我々は、心拍数低下を生じない出力において、抗リモデリングの最大効果を得ることができた。つまり、VNS による抗リモデリング効果は、心拍数低下作用によらないことが示されたことになる。さらに有効性の機序を明らかにすることが求められる。

#### E. 結論

本研究により、我々は VNS による心不全治療での最適条件を決定した。刺激強度に加えてパルス幅、duty cycle について、最適な条件を得た。刺激強度の検討から、抗リモデリング効果の発現は心拍数低下に依存しないことが示された。VNS の機序として、求心路を介して VNS により交感神経抑制効果が得られることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. \*Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Corticosterone-activated mineralocorticoid receptor contributes to salt-induced sympathoexcitation in pressure overload mice. Clin Exp Hypertens. In Press, 2014.
2. Matsukawa R, \*Hirooka Y, Ito K, Honda N, Sunagawa K. Central neuregulin-1/ErbB signaling modulates cardiac function via sympathetic activity in pressure

- overload-induced heart failure. J Hypertens. In Press, 2014.
3. Katsuki S, Matoba T, Nakashiro S, Sato K, Koga JI, Nakano K, Nakano Y, Egusa S, Sunagawa K, \*Egashira K. Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Inhibits Atherosclerotic Plaque Destabilization/Rupture in Mice by Regulating the Recruitment of Inflammatory Monocytes. Circulation. 129: 896-906, 2014
4. \*Nagao M, Matsuo Y, Kamitani T, Yonezawa M, Yamasaki Y, Kawanami S, Abe K, Mukai Y, Higo T, Yabuuchi H, Takemura A, Yoshiura T, Sunagawa K, Honda H. Quantification of Myocardial Iron Deficiency in Nonischemic Heart Failure by Cardiac T2\* Magnetic Resonance Imaging. Am J Cardiol. In press, 2013.
5. Funakoshi K, Hosokawa K, \*Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Striking volume intolerance is induced by mimicking arterial baroreflex failure in normal left ventricular function. J Card Fail. 2014; 20(1):53-9.
6. \*Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Telmisartan reduces mortality and left ventricular hypertrophy with sympathoinhibition in rats with hypertension and heart failure. Am J Hypertens. 2014; 27(2):260-7.
7. Watanabe A, \*Ichiki T, Sankoda C, Takahara Y, Ikeda J, Inoue E, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K. Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by inhibition of prolyl hydroxylase domain protein through attenuation of inflammation and extracellular matrix disruption. Clin Sci (Lond). 2014; 126(9):671-8.
8. \*Dhawan A, Acharya S, Bonato P, Mairal A, Sunagawa K. Special section on point-of-care healthcare technologies. IEEE Trans Biomed Eng. 2013; 60(12):3267-8.
9. \*Hirooka Y, Kishi T, Ito K, Sunagawa K. Potential clinical application of recently discovered brain mechanisms involved in hypertension. Hypertension. 2013; 62(6):995-1002.
10. Honda N, \*Hirooka Y, Ito K, Matsukawa R, Shinohara K, Kishi T, Yasukawa K, Utsumi H, Sunagawa K. Moxonidine-induced central sympathoinhibition improves prognosis in rats with hypertensive heart failure. J Hypertens. 2013;31(11):2300-8;
11. Onitsuka K, \*Ide T, Arai S, Hata Y, Murayama Y, Hosokawa K, Sakamoto T, Tobushi T, Sakamoto K, Fujino T, Sunagawa K. Cardiac phase-targeted dynamic load on left ventricle differentially regulates phase-sensitive gene expressions and pathway activation. J Mol Cell Cardiol. 2013 ; 64:30-8.
12. Ogawa K, \*Hirooka Y, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Partially silencing brain toll-like receptor 4 prevents in part left ventricular remodeling with sympathoinhibition in rats with myocardial infarction-induced heart failure. PLoS One. 2013; 8(7):e69053.
13. Tanaka A, \*Ide T, Fujino T, Onitsuka K, Ikeda M, Takehara T, Hata Y, Ylikallio E, Tyynismaa H, Suomalainen A, Sunagawa K. The overexpression of Twinkle helicase ameliorates the progression of cardiac fibrosis and heart failure in pressure

- overload model in mice. *PLoS One*. 2013; 8(6):e67642.
14. Ikeda J, \*Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Takeda K, Fong GH, Sunagawa K. Deletion of *phd2* in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2(3):e000178.
  15. \*Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, Han X, McCurdy S, Sakuda S, Sunagawa K, Boisvert WA. Chitinase inhibition promotes atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Am J Pathol*. 2013; 183(1):313-25.
  16. Matsuura H, \*Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K. Prolyl hydroxylase domain protein 2 plays a critical role in diet-induced obesity and glucose intolerance. *Circulation*. 2013; 127(21):2078-87
  17. \*Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Brain sigma-1 receptor stimulation improves mental disorder and cardiac function in mice with myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013; 62(2):222-8.
  18. Chang HS, Shibata T, Arai S, Zhang C, Yabuki A, Mitani S, Higo T, Sunagawa K, Mizukami K, \*Yamato O. Dihydropyrimidinase deficiency: the first feline case of dihydropyrimidinuria with clinical and molecular findings. *JIMD Rep*. 2012; 6:21-6.
  19. Matsukawa R, \*Hirooka Y, Ito K, Sunagawa K. Inhibition of neuregulin-1/ErbB signaling in the rostral ventrolateral medulla leads to hypertension through reduced nitric oxide synthesis. *Am J Hypertens*. 2013; 26(1):51-7
  20. \*Kishi T, Sunagawa K. Exercise training plus calorie restriction causes synergistic protection against cognitive decline via up-regulation of BDNF in hippocampus of stroke-prone hypertensive rats. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2012; 2012:6764-7.
  21. \*Kawada T, Uemura K, Shimizu S, Kamiya A, Turner MJ, Mizuno M, Sunagawa K, Sugimachi M. Consideration on parameter determination of a new model describing dynamic vagal heart rate control in rats. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2012; 2012:3809-12.
  22. \*Ito K, Hirooka Y, Nakano M, Honda N, Matsukawa R, Sunagawa K. Role of hypothalamic angiotensin type 1 receptors in pressure overload-induced mineralocorticoid receptor activation and salt-induced sympathoexcitation. *Hypertens Res*. 2013; 36(6):513-9.
  23. Rahmawati A, \*Chishaki A, Sawatari H, Tsuchihashi-Makaya M, Ohtsuka Y, Nakai M, Miyazono M, Hashiguchi N, Sakurada H, Takemoto M, Mukai Y, Inoue S, Sunagawa K, Chishaki H. Gender disparities in quality of life and psychological disturbance in patients with implantable cardioverter-defibrillators. *Circ J*. 2013; 77(5):1158-65.
  24. \*Maruoka Y, Nagao M, Abe K, Baba S, Isoda T, Higo T, Sunagawa K, Honda H. Quantification of heterogeneity on 201Tl gated SPECT: evaluation of coronary artery disease. *Clin Nucl Med*. 2013; 38(1):e7-12.
  25. \*Higuchi K, Nagao M, Matsuo Y, Kamitani T, Yonezawa M, Jinnouchi M, Yamasaki Y, Abe K, Baba S, Mukai Y, Higo T, Sunagawa K, Honda H. Evaluation of chronic ischemic heart disease with myocardial perfusion and regional contraction analysis by contrast-enhanced 256-MSCT. *Jpn J Radiol*. 2013; 31(2):123-32.
  26. 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; 127(1):104-14.
  27. Nakano M, Hirooka Y, Matsukawa R, Ito K, Sunagawa K. Mineralocorticoid receptors/epithelial Na(+) channels in the choroid plexus are involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2013; 36(3):277-84.
2. 学会発表
1. Ikeda M, Ide T, Fujino T, Hata Y, Takehara T, Onitsuka K, Tobushi T, Sakamoto K, Saku K, Kakino T, Tyynismaa H, Suomalainen A, Sunagawa K. The Increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling In Volume Overload Model. *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  2. Katsuki M, Hirooka Y, Kishi T, Sunagawa K. Central Sympathoinhibition Ameliorates the Reduction of Splenic Regulatory T Cells with Decreased IL-17 Production in Hypertensive Rats *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  3. Isegawa K, Hirooka Y, Kishi T, Sunagawa K. Azilsartan, New Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker, Would Suppress Morning Surge in Hypertension. *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  4. Kakino T, Saku K, Sakamoto T, Sakamoto K, Akashi T, Tobushi T, Murayama Y, Fujino T, Onitsuka K, Ikeda M, Oga Y, Nishizaki A, Kuwabara Y, Ide T, Sunagawa K. Quantitative Prediction of Impact of Left Ventricular Assist Device (LVAD) on Hemodynamics. *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  5. Honda N, Hirooka Y, Matsukawa R, Ito K, Sunagawa K. Central sympathoinhibition by moxonidine attenuates brain oxidative stress, prevents cardiac remodeling and improves prognosis associated with reduction of sympathetic hyperactivity in rats with hypertensive heart failure. *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  6. Saku K, Sakamoto K, Hosokawa K, Kakino T, Ikeda M, Oga Y, Nishizaki A, Ide T, Sunagawa K. Afferent Vagal Nerve Stimulation Resets the Baroreflex Neural Arc and Inhibits Sympathetic Nerve Activity. *Experimental Biology 2013 (Boston, U.S.A.)*
  7. Honda N, Hirooka Y, Sunagawa K. Central Sympathoinhibition by Moxonidine Improves Prognosis in Rats with Hypertensive Heart Failure. *35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)*

8. Ikeda M, Ide T, Sunagawa K. The Increase of Mitochondrial DNA Copy Number Attenuates Eccentric Cardiac Remodeling in Volume Overload Model. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
9. Isegawa K, Hirooka Y, Kishi T, Sunagawa K. Ideal Depressor Effect of New Angiotensin II Receptor Blocker, Azilsartan, Around Rest-To-Active Phase in Hypertensive Rats. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
10. Kakino T, Saku K, Sakamoto K, Sakamoto T, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Full Support Left Ventricular Assist Device (LVAD) Remarkably Reduces the Infarct Size in Ischemia Reperfusion Model in Dogs. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
11. Katsuki M, Hirooka Y, Kishi T, Sunagawa K. Splenic Regulatory T Cells Were Associated with AT1 Receptors in the Brain in Hypertensive Rats. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
12. Kunita M, Abbe K, Hirooka Y, Hirano K, Sunagawa K. A New Endothelin Receptor Antagonist Macitentan Prevents Endothelin-1 Induced Contraction in Intrapulmonary Arteries in Rats with Severe Pulmonary Arterial Hypertension. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
13. Saito T, Ide T, Ichiki T, Sunagawa K, Hirano K. Vascular Intrinsic Circadian Rhythm of Vascular Contractility under the Regulation of Clock Gene ROR $\alpha$ . 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
14. Sakamoto K, Kakino T, Saku K, Tanaka A, Sakamoto T, Sunagawa K. Prediction of Hemodynamic Impact of the Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO). 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
15. Nagayama T, Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. High Voltage, Not Age and Blood Pressure, of Stimulus Exaggerates Inducibility of Atrial Fibrillation by Rapid Electrical Stimulation in Hypertensive Rats. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
16. Sakamoto T, Kakino T, Sakamoto K, Saku K, Sunagawa K. Baroreflex Induced Changes in Stressed Blood Volume Is the Central Mechanism Preventing Volume Load Induced Pulmonary Edema. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
17. Saku K, Kakino T, Sakamoto K, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Concomitant Vagal Stimulation on Top of Left Ventricular Assist Device Markedly Reduces the Infarct Size in Ischemia Reperfusion Model. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
18. Sunagawa K. Closed-Loop Neuromodulation Integrated into the Native Physiology Saves Many Patients with Refractory Cardiovascular Diseases. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
19. Tobushi T, Kishi T, Hosokawa K, Murayama Y, Sunagawa K. Baroreflex Steepens the Renal Pressure-Diuresis Relation and Contributes to Stabilize Body Fluid Equilibrium. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society 2013 (Osaka, Japan)
20. Saku K, Kakino T, Sakamoto K, Sakamoto T, Akashi T, Hata Y, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Total unloading of the Left Ventricle by circulatory Assist Device (LVAD) strikingly reduces the infarct size in ischemia-reperfusion injury. ESC Congress 2013 (Amsterdam, Netherlands)
21. Saku K, Sakamoto K, Onitsuka K, Tobushi T, Oga Y, Nishizaki A, Kakino T, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Afferent vagal nerve stimulation induced sympathoinhibition may in part attribute to the beneficial impact of vagal nerve stimulation on heart failure. (Amsterdam, Netherlands)
22. Kakino T, Sakamoto K, Saku K, Sakamoto T, Akashi T, Oga Y, Nishizaki A, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Prediction of hemodynamic impact of the venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) (Amsterdam, Netherlands)
23. Nishizaki A, Sakamoto K, Saku K, Ikeda M, Kakino T, Oga Y, Kuwabara Y, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Beneficial impact of vagal nerve stimulation on CHF is not stimulus dose dependent. 24<sup>th</sup> International Symposium on the Autonomic Nervous System 2013. (the Big Island, Hawaii)
24. Oga Y, Kishi T, Saku K, Kakino T, Ikeda M, Nishizaki A, Kuwabara Y, Ide T, Sunagawa K. Volume loading evokes biphasic changes in sympathetic nerve activity via vagally mediated low pressure baroreflex. 24<sup>th</sup> International Symposium on the Autonomic Nervous System 2013. (the Big Island, Hawaii)
25. Saku K, Sakamoto K, Oga Y, Nishizaki A, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Afferent vagal nerve stimulation resets the baroreflex neural arc and inhibits sympathetic nerve activity. 24<sup>th</sup> International Symposium on the Autonomic Nervous System 2013. (the Big Island, Hawaii)
26. Sakamoto T, Sunagawa K. Quantitative



synthesis of baroreflex on dynamic circulatory equilibrium: model based analysis and experimental validation. 24<sup>th</sup> International Symposium on the Autonomic Nervous System 2013. (the Big Island, Hawaii)

27. Honda N, Hirooka Y, Ito K, Matsukawa R, Sunagawa K. Central Sympathoinhibition by Moxonidine Attenuated Brain Oxidative Stress, Prevented Cardiac Dysfunction and Improved Prognosis in Rats With Hypertensive Heart Failure. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)
28. Sakamoto T, Kakino T, Saku K, Sakamoto K, Sunagawa K. Changes in the Vascular Properties, Not the Ventricular Properties, Predominantly Contributes to the Baroreflex Induced Arterial Pressure Regulation. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)
29. Saku K, Sakamoto K, Kakino T, Oga Y, Nishizaki A, Ikeda M, Kuwahara Y, Kishi T, Sunagawa K. Salt Loading in the Presesnce of Baroreflex Failure Predisposes to Pulmonary Edema in Spontaneously Hypertensive Rat. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)
30. Saku K, Kakino T, Akashi T, Sakamoto K, Sakamoto T, Ide T, Kishi T, Sunagawa K. Concomitant Vagal Nerve Stimulation With Total Flow Support of Left Ventricular Assist Device Virtually Nullifies the Infarct Size in Ischemia Reperfusion Model. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)
31. Kakino T, Saku K, Akashi T, Sakamoto K, Sakamoto T, Kishi T, Ide T, Sunagawa K. Total Left Ventricular Unloading Strikingly Reduces the Infarct Size in Ischemia Reperfusion. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)
32. Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Sunagawa K, Hirano K. Crucial Role of Proteinase-Activated Receptor 1 in the Development of Monocrotaline Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. American Heart Association Scientific Sessions 2013 (Dallas, U.S.A)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

国内特許

名称：経皮刺激による血圧安定化装置

特許番号：特許第5366146号 登録日：2013年9月20日

国際特許

名称：STIMULATION DEVICE AND METHOD FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE

種類：米国特許 出願番号：CIP1：14/197,356 出願年月日：2014年3月5日

名称：STIMULATION DEVICE AND METHOD FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE

種類：米国特許 出願番号：CIP2：14/197,441 出願年月日：2014年3月5日

名称：VAGAL NERVE STIMULATOR FOR

#### CIRCULATORY DISEASE

種類：米国特許 出願番号：61/892609 出願年月日：2013年10月18日

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

一心不全関連遺伝子の網羅的解析(IV) BWAS (Bigenome Wide Association Study)の重要性—

研究協力者：豊岡 照彦（北里大学医学部 客員大学院教授）

研究要旨

心筋症に代表される心不全は臨床像、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網羅する microarray 等の進歩でヒトゲノムの解析が進んでいる。多遺伝子性疾患の 10 万例以上の大規模研究も発表されて、その有用性は病態生理学、治療や医療経済等に多大な貢献が期待される。更に心不全の関連遺伝子を核遺伝子と ATP 生産や apoptosis 等の心機能に直結するミトコンドリア遺伝子は haplogroup 解析により民族差の同定にも有用で、遺伝学的側面も増大すると予想される。今年度は過去 3 年間の研究成果を、以下簡略にまとめ、現在某国際誌の依頼論文で詳細な発表は掲載後に公表の予定であるが、研究途上で見出された遺伝子解析に関する諸問題を紹介し、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、その説は実証性に乏しく、明確な説明は為されていない。最近、DCM は従来以上に遺伝的負荷が強く (Hershberger *et al.*, *Nature Review Cardiol.*, 2013)、DCM に代表される心不全(HF)は他の common disease と同様、複数遺伝子の組合せが病態を修飾すると考えられる。

関連遺伝子として、心不全は核遺伝子に加え、ミトコンドリア(mt)遺伝子は ATP 合成に直接影響し、また apoptosis を介して間接的に心機能に影響する。更に、発症率が白人と異なる DCM は ethnicity を反映する mt-haplogroup に依存する事から (Shin *et al.*, *Am J Hum Genet.*, 2000)、核と mt の両ゲノム(bigenome)の解析が重要となる (Toyo-oka *et al.*, *PNAS*, 2004)。今回は過去 3 年の重症心不全の網羅的遺伝子解析結果を纏め、心不全発症に関連する責任遺伝子と、病態を修飾する関連遺伝子の解析結果を報告し、今後の研究方向と治療に貢献する tailored medicine の一助とする。

B. 研究方法

本稿の内容は某国際誌から依頼総説として出版予定で

あり、また昨年米国ではヒト遺伝子情報の知財特許を廃止する方向にあるが、我国を含め、国際的な合意は得られていない。本稿では既に発表・公開した公知の内容に留める。

AHA/ACC と日循の診断基準を満たす心不全患者の血液由来の genomic DNA (n=175) と、mt ゲノムが心不全時に著増する free radical で後天的にも変異する可能性を考え、LVAD 装着時、心移植時または死後 4 時間以内の autopsy 時の試料 (n=95) から whole genomic DNA を単離・精製した。この中に、一部共同研究中のドイツ・Max-Planck 研究所に保管中の心移植手術後の白人試料を加えて、民族差 (ethnicity) を検討した。

(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、白人試料はドイツ国内法を遵守し、Hessen 州のヒト遺伝子研究に関する委員会承認を得た。

C. 研究結果

核内遺伝子について 180 万以上の SNP と CNV を網羅する Genome-Wide Human SNP Array 6.0 により約 7 千箇所の SNP を同定した (添付報告文献を参照)。 $\chi^2$  検定、又は Fisher 検定で  $p < 5 \times 10^{-8}$  に設定して大幅に絞り、更に普遍的に内在する gSNP、非翻訳領域と同義遺伝子変異を除外した。なお、以前翻訳に無関係とされたイントロンの SNP

(iSNP)の一部が最近、当該タパクの翻訳効率に影響する事が判明し、敢えて除外しなかった。また、mt 遺伝子は約 160kb で比較的小さく Sanger 法で全配列を direct sequencing で決定した。その結果、1~22の各染色体、x,y 性染色体と mt-ゲノム上に総計、約 66 万の心不全と関連する allele を同定した。一部患者で親子の遺伝子解析が可能で、de novo 変異が散見されたが有意なアミノ酸置換は稀だった。

更に、患者の臨床症状の一部が社会的にも注目されている代謝症候群(MeS)と重複している点から、上記結果を 10~30 万人規模の欧米の白人中心に報告された大規模 GWAS 報告で MeS の中の血圧 (Ehret *et al.*, *Nature* 2011), BMI (Speliotes *et al.*, *Nat. Genet.*, 2010)と血中脂質 (Teslovich *et al.*, *Nature* 2010) の 3 要素を比較した。

その中に、日本人、4 家系の独立家系に SNP rs13107325 が全てメタボと共通した心不全と突然死家系を見出した。この SNP は白人の MAF は数%を占めたが、8 万人以上の東洋人に皆無だった (Wen *et al.*, *Nat. Genet.*, 2012)。

一方、mt-SNP の解析は核遺伝子に比べ遅れているが、その全ゲノムは 16kbp 余りで比較的短く、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, B5b1a2 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

昨年度報告のように白血球由来の試料では call rate が 98%以上を示したが、凍結保存心筋試料の場合、90~95%と不十分だった。これは心筋が変性して精製が難しい事と、心筋細胞はタパクを多量に含む結果と判明した。これは精製過程を変更して大幅に改善し、今回の結果に至った。

##### 2. 市販 SNP Array の特性について

今回の array は世界で最多数の SNP を搭載しているが、既知の変異遺伝子を用いても同定率は極めて低かった。これは米国製の array が白人中心で、心不全の解析に適さなかった事による。今回は候補 SNP の前後の配列を決定して補完したが、今後、日本人独自のチップ開発が必要となる。

##### 3. 変異による医学・生物学的意義

遺伝子変異により病態との関わりをヒトで証明する事は倫理的に許されない。遺伝子改変動物で立証する場合が多

いが、①変異部位近傍の配列がヒトと同配列を保存している必要が有る、②遺伝子の knockout(ko)は完全に目的遺伝子発現を消失させる結果、代償機構が働いて正確な機能を特定し難い。特に transgene が他タパクと複合体を形成すると、複合体全体の構造と合成・分解等の代謝も変化し、変異自体の機能が不明確になる。③マウスと哺乳類の種差が病態を変化させる。例えばジストロフィンの遺伝子欠損でヒトでは青年期以降、筋ジストロフィーが起こすが、ジストロフィン欠損の mdx マウスではユトロフィンがジストロフィンの代役して症状を呈さない。④マウスやラットの小動物の心筋細胞は小さく、細胞容積は表面積に比べ、ヒトより相対的に少ない。細胞内のイオン輸送に関連するチャネルや transporter 蛋白では心筋細胞膜の関与が大きく、生理実験の解釈には注意が必要である。

#### E. 結論

今後次世代 sequencer による解析が主流になると予想するが添付資料に示したように核ゲノムでは生理的に有意な変異は全 SNP の 1/1000 以下と予想され、時間的にも経済的にも非常に効率が悪い。一方、合理的と予想された exome 配列による病原性変異の同定では明らかな先天性家系でも 1/4 と同定率は限定的であった (Yang *et al.*, *NEJM* 2013)。今後、画期的な algorithm の開発が望まれる。

#### F. 研究危険情報

無し。

#### G. 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* (2012 年内の出版予定は大幅に遅れ、2013 年 10 月となった)。
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

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

上記報告事項なし

# 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

— Phosphodiesterase 3A (PDE3A) の心筋保護作用 —

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 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

Phosphodiesterase 3A (PDE3A)は、細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP の分解を行うだけではなく、心筋細胞のアポトーシスにも関与している。不全心筋では PDE3A の発現が低下しているため、PDE3A 高発現により抗アポトーシス機序による心筋保護効果が得られるかどうか検討を行った。

### B. 研究方法

$\alpha$ -myosin heavy chain (MHC)プロモーターを用いて心臓特異的 PDE3A 高発現マウスを作成し、心臓超音波検査を用いた心機能評価を行った。また、単離心筋細胞にイソプロテレノール刺激を行い、サルコメア短縮率の計測を行った。心保護効果の検討をするため、無酸素/再酸素化刺激による心筋細胞アポトーシスの観察を行い、in vivo で虚血再灌流障害モデルを作成し、心筋梗塞領域の計測を行った。

### （倫理面への配慮）

本実験は福島県立医科大学動物実験倫理委員会に承認を受け行われた。

### C. 研究結果

PDE3A 高発現マウス(PDE3TG)は、野生型マウス(WT)と比較し、PDE3A タンパク発現、PDE3 活性は約 10 倍

であった。心筋内 cAMP 濃度は約 60%と低下していた。心重量/脛骨比は、PDE3TG で増加しており、心筋細胞面積も PDE3TG で増加が認められており、PDE3 高発現により心筋細胞肥大が誘発されていた。しかし、心筋線維化の増加、心筋細胞アポトーシスの増加は認められておらず、約 1 年間の観察における自然予後は、野生型マウスと同等であり、心筋アポトーシス細胞率、心筋線維化の増加を認めなかった。心エコーでは、PDE3TG において左室駆出率、心拍数は低下しており、 $\beta$  刺激薬であるイソプロテレノールへの反応も低下していた。しかし、PDE3 阻害薬であるミルリノン投与すると WT と同程度まで左室駆出率の改善が認められた。単離心筋細胞においても、PDE3TG では、イソプロテレノール刺激に対してサルコメア短縮率の変化が認められなかったが、ミルリノンの投与により WT と同等にサルコメア短縮率の上昇が認められた。単離心筋細胞に対する検討では、PDE3TG 由来の心筋細胞は WT と比較して、コントロールの状態からアポトーシス細胞陽性率は低下していたが、無酸素/再酸素化刺激においても、WT と比較してアポトーシス細胞陽性率は低値であった。しかし、ミルリノンの投与により心筋細胞保護効果は失われ、アポトーシス細胞陽性率は WT と同程度となった。in vivo における虚血再灌流障害モデルでは、WT では虚血心筋内に約 25%の心筋梗塞領域を認めたが、PDE3TG では約 5%と有意に梗塞領域の減少が認められ、虚血領域内のアポトーシス細胞陽性率は低値であった。

虚血心筋領域では、抗アポトーシス作用を持つ Bcl-2 の発現が PDE3TG マウスで上昇しており、虚血再灌流後も Bcl-2 の発現は維持されていた。また、inducible cAMP early repressor (ICER)は、WT において虚血再灌流後に上昇が認められたが、PDE3TG ではその上昇が認められなかった。そのため、PDE3TG では Bcl-2 の発現維持、ICER の発現抑制を介した抗アポトーシス機序により心筋保護効果を発揮したものと考えられた。

#### D. 考察

過去における報告でも不全心筋においては、ICER は PDE3A の発現を抑制し、アポトーシスを誘導することが示されている (Circulation 2005;111;2469-2476)。そのため、PDE3A を高発現することによる心筋保護効果に着目し実験を行ったが、単離心筋、虚血再灌流障害モデルともに抗アポトーシス機序による心保護効果を確認できた。PDE3 高発現マウスは  $\beta$  刺激により産生される cAMP 濃度を低下させるため、左室駆出率、サルコメア短縮率の低下が認められた。心筋細胞肥大が認められたが、その分子機序は不明である。通常左室肥大、左室駆出率低下が認められると心不全を呈し、その自然予後は不良となることが多いが、興味深い事に本マウスでは、自然予後は WT と変わらず、心筋線維化の増加といった病的リモデリングを伴っていない。これは PDE3A が持つ心保護効果の一つを反映しているものと思われるため、今後その機序についても検討を進めて行く予定である。現在 PDE3 阻害薬は、急性心不全治療薬として臨床現場で利用されているが、PDE3 阻害薬の長期投与は不整脈死、突然死の増加を引き起こし、予後を悪化させることが知られている。本研究は逆に PDE3 機能を維持することにより心保護効果が期待できるという新たな視点からの研究である。現在のところ PDE3 刺激薬や PDE3 保護薬のような薬剤は開発されていないが、PDE3 活性は protein kinase C や protein kinase A, cGMP 濃度によっても影響を受けるため、他の経路を介した PDE3 機能調節方法の解明や、PDE3A を高発現した再生心筋の開発等により臨床応用に結びつく可能性を有していると思われる。

#### E. 結論

本研究は PDE3A が無酸素刺激、虚血再灌流障害に対する抗アポトーシス機序を介した心保護効果を有している事を示し、PDE3 機能維持という新たな視点からの心不全治療戦略の確立に有用であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oikawa M, Takeishi Y, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 64: 11-19, 2013
- 2) Iwaya S, Oikawa M, Takeishi Y, et al. Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac remodeling through regulating transforming growth factor- $\beta$  expression. *Int Heart J.* 2014 (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) Oikawa M, Iwaya S, Takeishi Y. Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac remodeling via regulating interaction between  $\beta$ -adrenergic and angiotensin II pathways. 第30回国際心臓研究会 ISHR 日本部会 2013年6月、サンディエゴ

#### 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

—肥大型心筋症の突然死リスク：左室内圧較差の意義—

研究協力者：志賀 剛（東京女子医科大学 循環器内科 准教授）

### 研究要旨

背景：肥大型心筋症患者において心臓突然死のリスク層別化はまだ十分でない。われわれは肥大型心筋症において左室流出路のみならず左室内圧較差の存在が予後に関連することを示した。本研究の目的は、従来の大リスクとともに左室内圧較差が肥大型心筋症に伴う致死性心室性不整脈発現に関係するか検討することである。方法：植込み型除細動器を突然死一次予防として植え込んだ肥大型心筋症 47 例（年齢 56±17 歳、男性 30 例）を対象とし、大リスク因子と左室内圧較差を含めた臨床背景と除細動適切作動・突然死の関係を調べた。結果：各因子単独では有意とならなかったものの非持続性心室頻拍に左室内圧較差（30mmHg 以上）を加えると適切作動・突然死の有意なリスクとなった。結論：肥大型心筋症の心臓突然死リスク因子として左室内圧較差の存在が重要であるかもしれない。

### 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。日本循環器学会に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いる（クラス II a）。<sup>1)</sup>しかし、肥大型心筋症における突然死リスク層別化はまだ十分確立されたものでなく、植込み型除細動器の適応においても議論がある。Maron あるいは McKenna のグループは肥大型心筋症に伴う左室流出路狭窄（Left ventricular outflow tract obstruction, LVOTO）が突然死のリスクになることを報告している。<sup>2,3)</sup>また、そのリスク比は従来リスク因子よりも大であったという結果を示している。<sup>3)</sup>一方、われわれは肥大型心筋症患者において左室中部狭窄（Mid-ventricular obstruction, MVO）も突然死のリスクになることを示した。<sup>4)</sup>本研究の目的は、突然死一次予防を目的に植込み型除細動器（ICD）を植え込んだハイリスク肥大型心筋症患者を対象に、既知の大リスクに左室内圧較差（LVPG）を含めた臨床背景と ICD 作動との関係を検討することである。

### B. 研究方法

東京女子医科大学病院で突然死一次予防目的に植込み型除細動器を植え込んだ心臓突然死リスクを有する肥大型心筋症連続 43 例（年齢 56±17 歳、男性 30 例）を対象とした。なお、左室駆出率 50%未満、明らかな虚血性心疾患の関与がある例は除外した。一次予防の植込み型除細動器適応基準は日本循環器学会のガイドラインに従った。LVPG は、経胸壁超音波検査にて安静時に最大 $\geq$ 30mmHg の圧較差を持った加速血流が左室内に存在するものと定義した。評価項目は、植込み型除細動器適切作動と突然死とし、平均観察期間は 5.4±3.6 年であった。作動および突然死は Kaplan-Meier 法を用い、差の検定は Log-rank 法で行った。さらにリスク因子は Cox ハザードモデルを用いて解析した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は後ろ向き観察研究である。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いる。

### C. 研究結果

患者背景を表 1 に示す。非持続性心室頻拍を有する例が最も多く、LVPG を有する例は 23 名（53%）であった。38 名（88%）が $\beta$ 遮断薬を使用、11 名（25%）がアミオダロンを使用していた。植込み型除細動器の治療設定は、

全例で心室細動ゾーンを 190bpm とし、19 例のみ心室頻拍ゾーンを設定し 155±18bpm とした。観察期間中、1 名が突然死を来し、7 名が植込み型除細動器の適切作動を経験した。

表1. 患者背景

人数	43
年齢(歳)	56±16
男, n(%)	28 (65%)
NYHA functional Class	
I / II / III	23/18/2
(%)	(53/42/5)
左室駆出率(%)	65±9
左房径(mm)	39±8
LVPG ≥ 30mmHg, n(%)	23 (53%)
左室最大壁厚(mm)	20±6
突然死の家族歴, n(%)	14 (33%)
失神, n(%)	17 (40%)
非持続性心室頻拍(NSVT), n(%)	32 (74%)
運動負荷に伴う血圧応答異常(ABPR), n(%)	9 (23%)
心房細動, n(%)	14 (33%)

n(%), 平均±標準偏差

植込み型除細動器・突然死の累積発現率は、3.4%/年であった。(図1)

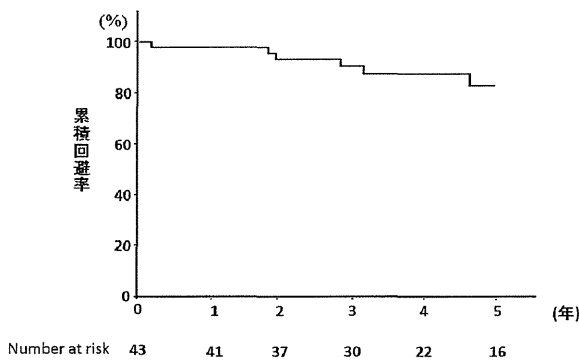


図1. 植込み型除細動器適切作動及び突然死

各リスク因子について検討したところ、本対象例においては植込み型除細動器および突然死の有意な因子とならなかった。(表2) さらにリスク数を加算しても必ずしもハザード比は高くならなかった。

表2. 各因子と植込み型除細動器適切作動・突然死のハザード比

因子	HR	95% CI	P値
失神の既往	1.093	0.251, 4.762	0.906
突然死の家族歴	0.961	0.176, 5.264	0.964
最大壁厚>30mm	0.618	0.075, 5.054	0.653
ABPR	0.620	0.123, 3.121	0.562
NSVT	40.313	0.078, 20714.1	0.246
LVPG	4.382	0.833, 23.057	0.081

このため、リスク因子を組み合わせ、その予測性を検討したところ、非持続性心室頻拍と LVPG の組み合わせが有意なリスクとなった。(ハザード比 5.724, 95%CI

1.124-29.150) 非持続性心室頻拍+LVPGの有無で植込み型除細動器適切作動・突然死の発現をみたところ、両者を有する例では有意に発現率が高かった。(図2)

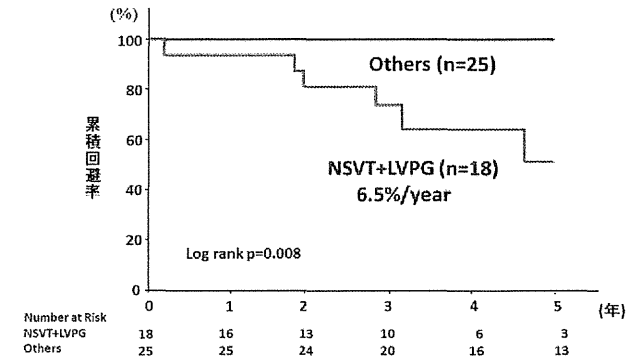


図2. 植込み型除細動器適切作動及び突然死。非持続性心室頻拍(NSVT)+LVPGの有無による比較

なお、非持続性心室頻拍+LVPGの有無で心電学的背景を比較したが両者で有意な差は認めなかった。(表3)

表3. 非持続性心室頻拍(NSVT)+LVPGの有無と心電学的背景

		NSVT+LVPG (n=18)	others (n=25)	P値
12誘導心電図	心拍数(/min)	82±11	64±10	0.5
	QRS(ms)	118±30	109±29	0.34
	QT(ms)	449±41	443±62	0.46
	QTc(ms)	472±94	446±44	0.57
	Tp-e(ms)	81±15	84±18	0.82
体表面マッピング	再分極不均一性あり, n(%)	8/12(67)	8/20(40)	0.14
高分解能心電図	RTc dispersion(ms)	95±14	80±23	0.17
	RTc dispersion(ms)	71±16	54±19	0.11
	Tp-e dispersion(ms)	71±16	54±19	0.11
心室遅延電位	陽性, n(%)	3(17)	5(25)	0.73
	IQRS(ms)	129±30	117±24	0.21
	RMS40(ms)	72±69	83±79	0.78
	LAS40(ms)	26±10	26±12	0.85

#### D. 考察

肥大型心筋症患者を対象とした我々のこれまでの検討では、MVOを有するHCM患者における突然死または致死性不整脈の発生率は10年間で約24%であった。4) 今回の検討では、非持続性心室頻拍およびLVPGを有する患者の適切作動及び突然死の発現率が5年で33%(6.6%/年)であったことから既知の大リスクとして最も多かった非持続性心室頻拍と君合わせることでより高リスクの患者を層別している可能性がある。

研究の限界：単施設で対象例数が少ないこと、イベント数が少ないことが挙げられる。

#### E. 結論

肥大型心筋症患者の心臓突然死リスク因子として、LVPGの存在が重要であるかもしれない。今後、ハイリス

クの肥大型心筋症患者を対象とした前向きの詳細な検討が必要である。

本研究における協力者

鈴木 敦・矢崎恭一郎・萩原誠久 (3名ともに本学)

(参考文献)

- 1) 肥大型心筋症の診療に関するガイドライン (2012年改訂版) . 日本循環器学会ホームページ公開, 2012
- 2) Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi MA, Cecchi F, Maron BJ. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003; 348:295-303
- 3) Elliott PM, Gimeno JR, Tomé MT, Shah J, Ward D, Thaman R, Mogensen J, McKenna WJ. Left ventricular outflow tract obstruction and sudden death risk in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006; 27:1933-1941
- 4) Minami Y, Kajimoto K, Terajima Y, Yashiro B, Okayama D, Haruki S, Nakajima T, Kawashiro N, Kawana M, Hagiwara N. Clinical implications of midventricular obstruction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57:2346-55

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ogiso M, Suzuki A, Shiga T, Nakai K, Shoda M, Hagiwara N. Effect of intravenous amiodarone on QT and Tpeak-Tend dispersions in patients with nonischemic heart failure treated with cardiac resynchronization-defibrillator therapy and electrical storm. *J Arrhythmia* 2014 in press
2. Suzuki T, Shiga T, Kuwahara K, Kobayashi S, Suzuki S, Nishimura K, Suzuki A, Minami Y, Ishigooka J, Kasanuki H, Hagiwara N. Impact of clustered depression and anxiety on mortality and rehospitalization in patients with heart failure. *J Cardiol* 2014 in press

## 2. 学会発表

1. Tsukamoto K, Suzuki A, Shiga T, Yoshida K, Arai K, Ejima K, Suzuki T, Manaka T, Tanimoto K, Shoda M, Hagiwara N. Effect of Persistent Renal Impairment on Mortality in Cardiac Resynchronization Therapy Patients with Nonischemic Heart Failure. *Heart Failure* 2013 2013.5
2. 志賀剛, 鈴木敦, 庄田守男, 萩原誠久. CRT 植え込み患者の予後予測因子: 慢性心不全患者としての長期予後の面から. 第61回日本心臓病学会学術集会 2013.9

## 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

—FHOD3 変異は拡張型心筋症の原因となる—

研究協力者：木村 彰方（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 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

拡張型心筋症（DCM）の20–35%は遺伝性であり、遺伝子変異がその病因となる。これまでに20種類を超える原因遺伝子が報告されているが、それらの原因遺伝子に変異が見出されるのは家族性 DCM 患者の17%程度であり、多くの症例の原因は未知である。

そこで本研究では、新規の DCM 原因遺伝子を同定することを目的として、これまでの遺伝子解析で病因となる変異が見出されていない DCM 患者を対象に、アクチン動態を制御する FHOD3 を候補遺伝子とした変異検索と変異による機能変化を検討した。

B. 研究方法

1. FHOD3 遺伝子変異の検索：既知の原因遺伝子に変異が見出されない家族性 DCM 発端患者 48 名を対象とし、FHOD3 によるアクチン動態制御に関わる機能ドメインをコードする exon 16~exon 25 について、各 exon および隣接するイントロンの塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決定した。得られた変異について、健常対照 400 名および公的データベース（dbSNP, 1000 genome）を検索した。

2. FHOD3 遺伝子変異の機能予測：病変変異であることが示唆された Tyr1249Asn (Y1249N) について、進化的な意義を検討するための種間 FHOD3 配列比較、機能変化予測のための PolyPhen2 解析、およびタンパク構造上の

変化を予測するための SWISS-MODEL による 3D 構造予測を行った。

3. FHOD3 遺伝子変異による機能変化：FHOD3 はアクチン動態を制御し、細胞内での F アクチン/G アクチン比を変化させるおとで、MKL1 の核内移行とそれに引き続く SRF 活性化を制御するため、FHOD3 活性を間接的に測定する系として、NIH3T3 細胞にトランスフェクトした際の SRE-ルシフェラーゼアッセイ系を用いた。この際には、マウス fhod3 コンストラクトにヒト型変異を導入したコンストラクト (Y1388N) を用いた。また、ポジティブコントロールとして、機能欠損を生じることが報告されているマウス fhod3 の人為的変異 (I1127A) を用いた。一方、ラット心筋初代培養細胞に Y1388N コンストラクトを導入し、サルコメア構造異常を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究には、心筋症患者およびその血縁者を対象とした遺伝子解析研究が含まれるが、それらはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って遂行することとして、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を提出し、その承認を受けている（「拡張型心筋症の病因と病態形成機構の究明に関わる研究（研究代表者：木村彰方）」（平成 21 年 4 月 9 日付承認）。また、本研究に関連する組換え DNA

実験「難治性疾患の病因と病態形成機構の解明に関する研究（研究代表者：木村彰方、承認番号 2008-13、平成 20 年 5 月 2 日付承認）」および動物実験「循環器病・難治性疾患の発症・進展に関わる遺伝学的研究（研究代表者：木村彰方、承認番号 10040、平成 21 年 9 月 3 日付承認）」についても、それぞれ学内委員会による承認を受けている。

### C. 研究結果

1. FHOD3 遺伝子変異の検索：家族性 DCM 患者 48 名を対象とした変異検索によって、5つの塩基置換を見出した（図1）。このうち3種（D709D, N984N, V1151I）は既知の遺伝子多型データベースに収録されており、別の1種（R912R）は健常対照にも観察されたため、いずれも疾患とは関連のない遺伝子多型と考えられた。一方、Tyr1249Asn (Y1249N)は健常対照 400 名に見出されず、多型データベースにも存在しないため、疾患関連変異であることが推測された。

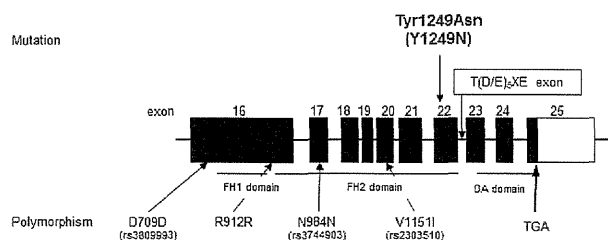


図1 FHOD3 遺伝子解析

また、当該変異を有する患者の家族を調査したところ、この変異は健常である子には遺伝していなかった（図2）

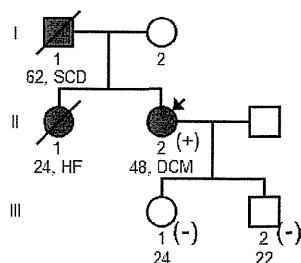


図2 Y1249N 変異を有する患者の家系調査

### 2. FHOD3 遺伝子変異の機能変化予測：

Y1249N 変異の機能変化を予測した。まず、Y1249N は FHOD3 の進化上よく保存されているアミノ酸 (Y) の置

換をもたらすものであり、タンパクの高次構造を変化するものと予測された（図3）。また、PolyPhen-2 による検討ではスコア 0.998 であり、damaging 変異と予測された。

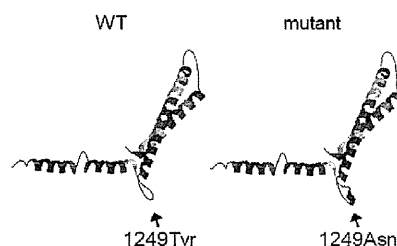


図3 FHOD3 変異による構造変化予測

### 3. FHOD3 遺伝子変異による機能変化：お

Y1249N による FHOD3 機能障害を検討するために、SRE ルシフェラーゼ活性を測定することで、間接的に FHOD3 機能を評価する系を開発した。まず、この系がアクチン動態の変化を反映していることを確認するために、latrunculin A (Lat.A) または latrunculin B (Lat.B) 存在下でアッセイしたところ、fhod3 に依存した SRE ルシフェラーゼ活性の低下が観察された。また、cytochalasin D (Cyt.D) 存在下では fhod3 に依存しない SRE ルシフェラーゼ活性増強が確認された（図4）ことから、このアッセイ系は fhod3 によるアクチン動態制御に基づいた SRF 活性化を反映していると考えられた。

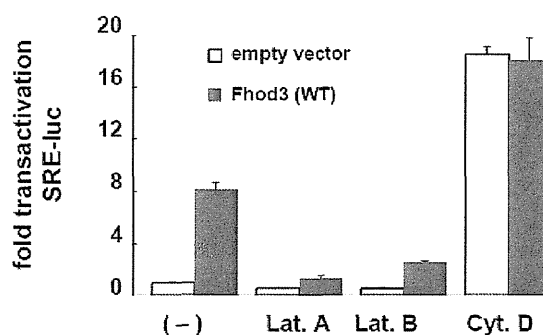


図4 fhod3 依存性 SRF 活性化アッセイ系の樹立

ついで、このアッセイ系を用いて、DCM 患者に見出された Y1249N 変異を fhod3 に導入 (Y1388N; YN) し、ポジティブコントロールである I1127A (IA) とともに機能変化を検討した。その結果、Y1249N 変異をもつ FHOD3 (YN) は正常(WT)に比較して機能が低下していることが判明した（図5）。

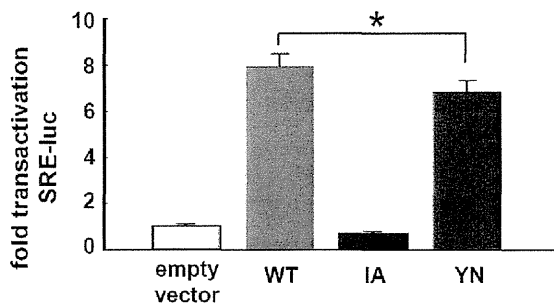


図5 変異 FHOD3 における機能障害

さらに、正常 FHOD3 と 1:1 で共存させた場合でも同程度の機能低下を生じる (図6) ことから、Y1249N 変異による FHOD3 機能障害は dominant-negative 効果によるものと考えられた。

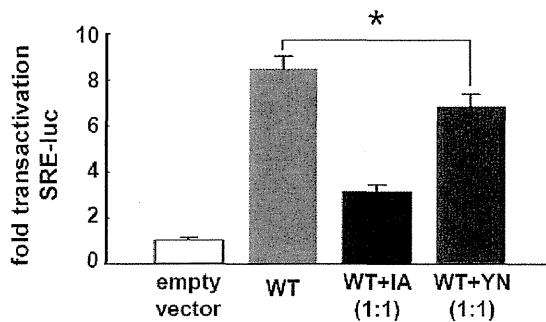


図6 Y1249N 変異の dominant-negative 効果

IA 変異-fhod3 をラット心筋細胞に導入するとサルコメア整合性が維持されることが報告されているため、YN 変異-fhod3 をラット心筋細胞に導入したところ、サルコメア構造には大きな異常は生じなかった (図7)。

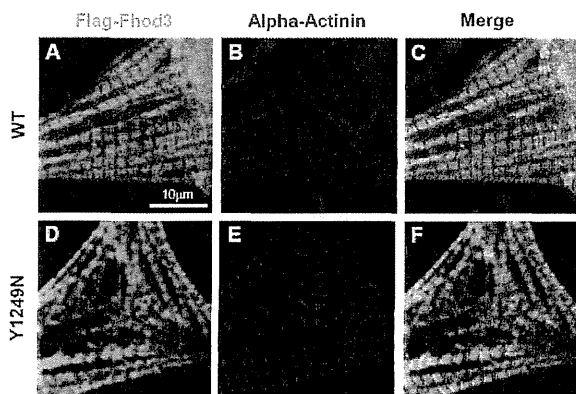


図7 Y1249N 変異はサルコメア整合性に影響しない

#### D. 考察

本研究において、家族性 DCM 症例に FHOD3 変異を同

定した。当該変異は FHOD3 の進化上よく保存されたアミノ酸の変異であり、機能異常を生じることが予測されたため、機能解析を行ったところ、アクチン動態に依存した SRF 活性化が障害されることが判明した。一方、変異 FHOD3 を導入してもサルコメア整合性異常は生じなかつたことから、FHOD3 変異はサルコメア構造異常をもたらすほどの大きな機能異常ではないが、SRF 活性化が障害される結果として、心筋リモデリング異常をもたらすものと考えられた。

#### E. 結論

新規の DCM 原因遺伝子として FHOD3 変異を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Crocini C, Arimura T, Reischmann S, Eder A, Braren I, Hansen A, Eschenhagen T, Kimura A, Carrier L. Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue. *Basic Res Cardiol.* 108(3): 349, 2013.

2. Arimura T, Onoue K, Takahashi-Tanaka Y, Ishikawa T, Kuwahara M, Setou M, Shigenbu S, Yamaguchi K, Bertrand AT, Machida N, Takayama K, Fukusato M, Tanaka R, Somekawa T, Nakano T, Yamane Y, Kuba K, Imai Y, Saito N, Bonne G, Kimura A. Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. *Cardiovasc Res.* 99(3): 382-394, 2013.

3. Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, Nomura T, \*Sumimoto H, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. *Circ J.* 77(12): 2990-2996, 2013.

4. Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, Nakatochi M, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsu MF, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A,

Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M. Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 6(6): 569-578, 2013.

5. Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A, Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y, Kuba K. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest.* 123(12): 5203-5211, 2013.

## 2. 学会発表

1. 木村彰方, 有村卓朗, 武谷立, 石川泰輔, 山野哲弘, 松尾あき子, 辰巳哲也, 野村哲矢, 住本英樹. 家族性拡張型心筋症の新規原因遺伝子の同定: 疾患関連 FHOD3 変異は SRF 活性化能を障害する. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年 11 月 20 日~23 日, 仙台.

2. 木村彰方. 家族性心筋症の遺伝子解析. ゲノム解析懇話会, 2013 年 11 月 21 日, 仙台.

## 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