

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

中性脂肪蓄積心筋血管症における腎障害の研究

研究分担者 長澤康行 兵庫医科大学腎・透析科 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症において、しばしば尿蛋白が認められ腎不全が発症する。また、2型糖尿病の中に、本疾患に関連しているものがあることが報告されている。本疾患の診断基準を作成するにあたって、腎障害に関する基準の作成を行った。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症において、しばしば尿蛋白が認められ腎不全が発症する。また、2型糖尿病の中に、本疾患に関連しているものがあることが報告されている。本疾患の診断基準を作成するにあたって、腎障害に関する基準の作成を行う。

B. 研究方法

中性脂肪蓄積心筋血管症の診断基準を作成するにあたって、本研究の研究班会議において討論を行い、特に腎障害に関しての意見を述べた。

(倫理面への配慮)

特に倫理的な問題はない。

C. 研究結果

2型糖尿病において糖尿病性腎症は代表的合併症である。この腎障害に中性脂肪蓄積心筋血管症により腎障害が関与していると考えられる症例を選択するにあたり、当初腎生検を考慮したが、糖尿病性腎症において腎生検が一般的でないため、検尿異常を認めることで診断項目とした

D. 考察

中性脂肪蓄積心筋血管症の2型糖尿病の進展に関与する症例については、現在研究段階であり、本診断基準の腎障害の項目についても今

後、症例を集積しつつ検討が必要である。

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症の診断基準を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

中性脂肪蓄積心筋血管症における冠動脈プラークの血管内イメージングと病理組織像との対比

研究分担者 羽尾裕之 兵庫医科大学病院病理部 准教授

研究要旨

本研究の目的は TGCV 症例の心移植時摘出心もしくは剖検例を用いて、冠動脈病変の血管内イメージング像と病理組織像を対比し、TGCV における冠動脈プラークの病態を明らかにすることである。本年度は 74 剖検例から採取した冠動脈で、通常の粥状動脈硬化病変を対象に画像と病理の対比を行った。血管内イメージングは病変検出感度が高いものの、病変性状の認識の特異度は低いことが明らかになった。

A. 研究目的

冠動脈病変の評価は、血管造影に加えて光干渉断層法(Optical coherence tomography, 以下 OCT)・血管内視鏡(Coronary angiography, 以下 CAS)などの血管内イメージングが広く臨床応用されている。中性脂肪蓄積心筋血管症(triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, 以下 TGCV)の典型的な冠動脈病変は形態学的に空胞変性を伴った平滑筋細胞による求心性内膜肥厚が特徴的であるが、血管内イメージングによる画像所見は不明な点が多い。TGCV 症例の心移植時摘出心もしくは剖検例を用いて、TGCV の冠動脈病変の OCT, CAS による画像所見と病理組織像を対比し、TGCV の冠動脈プラークの病態を明らかにする。

B. 研究方法

本年度はコントロールとして兵庫医科大学病院における剖検 74 症例から採取した冠動脈で通常の粥状動脈硬化病変を対象に検討した。剖検で採取した心臓から冠動脈を外し、固定前に OCT, CAS により冠動脈プラークの評価を行った。画像を記録後、冠動脈はホルマリン固定を行い約 5mm 間隔で水平断として標本を作製した。

C. 研究結果

OCT で脂質成分に富む不安定プラーク(破綻の危険性の高いプラーク)と診断されたが、組織

学的には細胞外脂質の沈着・微小石灰化・ヘモジデリン沈着・壁在性の器質化血栓を示す安定プラークと判断された症例が約 40%と高率に含まれていた。また CAS で黄色プラークと診断された病変には表層性の石灰化病変が約 30%に含まれていた。血管内イメージングは病変検出感度が高いものの、病変性状の認識の特異度は低いことが明らかになった。

D. 考察

TGCV の疾患概念が広く認知された際、組織が採取困難な冠動脈の評価は、画像診断が重要な役割を果たす。しかし今回の研究からも現在の血管内イメージングには限界点もあり、今後は新たなデバイスでのプラーク画像と病理組織像との対比を行いたい。

E. 結論

血管内イメージングを用いて臨床病理学的に TGCV の病態を明らかにし、OCT, CAS での TGCV の診断基準の確立を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii K, Hao H et al: In-stent Thin-cap Fibroatheroma After Drug-eluting Stent Implantation: Ex Vivo Evaluation of Optical Coherence Tomography and Intracoronary Angioscopy. JACC Cardiovasc Interv. *in press*, 2014

Hao H, Fujii K et al: Different Findings in a Calcified Nodule between Histology and Intravascular Imaging Such as Intravascular Ultrasound, Optical Coherence Tomography and Coronary Angioscopy. JACC Cardiovasc Interv. *in press*, 2014

別紙4

2. 学会発表

Hao H, Fujii K, et al: The true character of lipid rich plaque by intravascular imaging: Message from pathologist to cardiologist. European Society of Cardiology Congress 2013, Amsterdam, Holland, 2013.9

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発（診断機器：冠動脈）の研究

研究分担者 小谷順一 大阪大学大学院医学系研究科 特任講師（常勤）

研究要旨

光干渉断層法 (Optical Coherence Tomography: OCT) を用いて中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) に対する冠動脈診断の応用について剖検心を用いて検討した。対照症例との画像を比較・検討を行い、十分に解析可能な画像が取得された。OCT 診断による TGCV 所見は、特異的な内膜肥厚を認め、生体における診断並びに医薬品介入による病勢の評価の際には、今後重要な診断機器と期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、血管造影で検出が困難な代謝性疾患の早～中期病変を生体における侵襲的画像診断法による組織性状診断を用いて診断する、あるいは診断の補助となる手法を模索する事である。

Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy (TGCV)などの代謝性疾患の問題点として代謝されない物質の細胞内蓄積がある。血管のような管腔臓器においては、血管壁の肥厚による内腔狭小化がびまん性に生じる。主たる血管の評価は冠動脈造影法による狭窄の検出であるが、求心性に内腔狭小が生じた場合は診断が困難である。このような背景から、同様の進行性の冠動脈内腔狭小を呈する移植後冠動脈症においては、血管を断層像として評価できる血管内超音波法 (IVUS) による研究が 1990 年代後期から米国を中心に多く進められてきた。近年、本邦においてもより微細な血管の構造を観察できる光干渉断層法 (OCT) が臨床応用可能となった。今回、我々はこの OCT を用いて血管性状の組織評価が妥当であるかを検証した。

B. 研究方法

TGCV が疑われる症例と通常の動脈硬化を呈した剖検心に対して OCT を施行する。剖検心は、国立循環器病研究センターに保存されている検体を用いた。すでに診断的病理診断が施行されており、冠状動脈が区域ごとに切断

されているために、各血管のもっとも長い区域を観察対象とした。これらの血管 1 枝における組織性状のばらつきの検証を行い（長区域に、任意の 3 部位を選択して短軸を表示する）。短軸像において、内膜 (intima)、中膜 (media)、外膜 (adventitia) の 3 層構造の同定可能と、media+plaque complex における組織性状診断を行った。

（倫理面への配慮）

剖検例に対する研究では、その匿名性はもちろんのこと、生体と変わらない手技による観察を行った。

C. 研究結果

剖検心 3 例のうち、2 例は肉眼においても高度動脈硬化を呈した。いずれの検体も冠状断による幾つかの切片であり冠動脈は幾つかの区域で欠損していた。このため、冠状動脈の評価においては遠位部・中部・近位部においてそれぞれ区域的な評価を行った。しかしながら、内腔を生理食塩水で灌流・充満させる事ですべての標本で約 10mm 長の観察区域は最低確保する事が可能であった。動脈硬化症例においては、血管内の器質化血栓を確認した。通常の動脈硬化性疾患の中では、長軸像及びいずれの短軸像においても内腔は保たれているが血管壁の構造パターンは非動脈硬化部位と全く異なり、3 層構造は消失していた。

一方、TGCV が疑われる症例においては、長軸像ではより明らかであるが、中膜弾性板に含まれる黒色帯は遠位部から近位部にかけて辺縁不明瞭ではあるが連続的に確認可能であり、これは側枝の存在部分でもその構築は均一であった。内膜は均一で厚いがこれに関しても血管内の空間的構築にばらつきがなく、通常動脈硬化とはその様相は大きく異なる。また、通常の動脈硬化に見られる粥腫形成は見られなかった。

D. 考察

通常動脈硬化性疾患は、局所的な斑状の動脈硬化の進行により粥腫（プラーク）が形成されるとされる。これは、病理学の大系や従来の冠動脈造影を基盤とした診断法で明らかになった知見であるが、今回の OCT 所見においても、一致する結果が見られた。特に、今回検討した任意の3部位は長軸像にて狭窄を示さない部分であるだけに、sub-clinical な動脈硬化の検出と云って過言は無い。一方これらの事を利用したのが、今回の TGCV が疑われる症例に対する OCT である。このように比較する事によって、より明らかに肥厚した内膜の存在と、それが斑状・区域性を持たずにほぼ均一に存在することが OCT 画像で提示された。内腔の凹凸がほとんど無く内腔が保たれていることから、冠動脈造影法では異常所見を検出する事は困難であると思われる。しかしながら、このような OCT 所見は特異的で有り、今後の代謝・蓄積性疾患の診断や病勢診断にこのような手法が有用であることが示唆された。

E. 結論

剖検症例に対し、臨床ツールを用いてこれまで診断法が確立していない難病診断へのアプローチを模索した。内腔と血管壁及びその構造を検討することで、これまでの内腔診断に拠る解剖学的検査法の限界が明らかになった。今回のいわゆる AI (autopsy imaging) の知見を元に、OCT を用いた組織診断などの補完診断が今後臨床に導入されることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

主論文としての報告は無し。

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

予定無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

特記すべき事項なし。

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

トリカプリン経口投与による体内動態把握と検出法の検討

研究分担者 瀬川波子 福岡大学医学部 生化学 准教授

研究協力者 山口知是 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 特任研究員

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症の治療薬として開発を進めているトリカプリンは、経口投与を行うと、胃でカプリン酸に分解され、小腸で吸収され、門脈を経て肝臓で代謝されるため、全身に到達しにくいと考えられているが、その体内での動態は完全には解明されていない。経口投与されたトリカプリンの体内動態を明らかにするため、マウスにトリカプリンを経口投与し、小腸灌流法を行い、リンパ管から灌流液を採取し、得られた灌流液に対して液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）による解析を行った。

A. 研究目的

我々は、細胞実験および遺伝子改変動物（ATGL 欠損マウス）を用い、中鎖脂肪酸であるカプリン酸による中性脂肪蓄積に対する有効性を示してきた。また、少数例の中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）症例に対して、市販の中鎖脂肪酸（中鎖脂肪酸含有トリグリセリド）による食事療法を行い、有効性を認めている。

従来、経口投与された中鎖脂肪酸含有トリグリセリドは胃で加水分解を受け、中鎖脂肪酸は門脈を経て肝臓でβ酸化を受けるため、経口投与された中鎖脂肪酸が体循環に入ることはないと考えられてきた。しかし、上記のごとく、経口投与された中鎖脂肪酸含有トリグリセリドが動物およびヒトで心臓・骨格筋などの臓器に効果を示していることから、経口投与された中鎖脂肪酸が体循環に入る経路

が存在する可能性が示唆された。

本研究の目的は、マウス小腸灌流法により得られた灌流液中の脂肪酸組成を明らかにすることで、中鎖脂肪酸の体循環に入る経路について明らかにすることである。

B. 研究方法

トリカプリンを強制投与した野生型マウスを麻酔下で開腹し、マウス小腸灌流法の如く各血管を結紮、灌流を行うと共に、リンパ管へ注射針を装着したチューブを挿入し、自然落下により灌流液を採取した。

採取した灌流液を超遠心法を用いて各リポ蛋白分画へ分離（CM、VLDL、LDL、HDL、LPDS）し測定試料とした。測定試料は液体クロマトグラフィー質量分析法

（LC/MS）を用いて、各リポ蛋白分画にお

けるトリグリセリドの分析を行った。

(倫理面の配慮)

大阪大学の審査委員会の承認をうけ、規定に従い研究を実施した。

C. 研究結果

血清、腸管リンパ管からの灌流液より超遠心法を用いて分離したカイロミクロンイロミクロン (CM) 分画および超低密度リポ蛋白 (VLDL) 分画にカプリン酸を含有するトリグリセリド (カプリン酸と長鎖脂肪酸を含有するキメラトリグリセリド) を検出することができた。

D. 考察

本研究より、経口投与されたトリカプリンの一部は、長鎖脂肪酸とのキメラトリグリセリドの形で小腸リンパ系に入ることが確認できた。小腸リンパ系に認められたキメラトリグリセリドは、肝臓でのβ酸化を受けることなく、体循環に入ると考えられるので、経口投与されたトリカプリンが体循環に入り、全身的な効果を示す可能性が示唆された。また、胃での加水分解を免れるようデザインされた腸溶カプセルなどの投与方法の工夫により、小腸からの吸収効率を増加させることで、bioavailability の高い製剤の開発が可能である可能性も示された。

E. 結論

経口投与されたトリカプリンの一部が、カプリン酸を含有するトリグリセリド (カプリン酸と長鎖脂肪酸のキメラトリグリセリド) の形で小腸リンパ系に入る

ことが示された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K. Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique.

J Lipid Res. 55:(5) 905-918, 2014
First Published on February 25, 2014,
doi:10.1194/jlr.M047761

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

質量顕微鏡法を用いた TGCV 診断にむけた基礎的検討

研究分担者 財満信宏 近畿大学農学部 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV) の特徴は、心筋及び冠状動脈への中性脂肪 (TG) の蓄積である。そのため、本疾患の診断には、病理検体において TG を検出することが重要である。一般的な病理染色では、コレステロールと TG の識別が困難である。本研究では、TG とコレステロールを区別して可視化することが可能な質量顕微鏡法を用い、TGCV 診断に向けた TG 検出のための基礎的な検討を行った。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の特徴は、心筋及び冠状動脈への中性脂肪 (TG) の蓄積である。TGCV の診断のためには、組織上の TG を高感度かつ半定量的に測定することが重要である。質量顕微鏡法による TG の高感度測定法の検討例はないため、本研究では高感度 TG 検出を実現するための前処理方法を検討した。

B. 研究方法

安楽死させた ddY マウスから脂肪組織を採取し、液体窒素で速やかに凍結した。その後、クライオスタットによって 10 μ m の凍結切片を作成した。作成した凍結切片を A 液（未発表のデータのため、非公開とする）、B 液、もしくは C 液で洗浄した後、質量顕微鏡法によって脂肪組織を解析し、TG を検出した。

(倫理面の配慮)

本研究は、近畿大学動物実験委員会の認可を受けて行った。

C. 研究結果

A 液、B 液で処理した切片で検出される TG はコントロール切片と比較し、感度が低下する傾向にあった。一方、C 液で洗浄した切片から検出される TG は 1.5 倍程度検出強度が増加した。

D. 考察

C 液による処理によって、TG 検出の感度が向上することが示された。C 液によって、TG のイオン化を阻害する組織上の分子が除去されたことが原因であると考えられるが、詳細な機構については今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

脂肪組織のTG検出の高感度化に成功した。今後は、この手法によって、筋組織などに存在する微量のTGを高感度に検出できるかどうかを検討する必要がある。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Genetic Mutations in Adipose Triglyceride Lipase and Myocardial Up-regulation of Peroxisome Proliferated Activated Receptor- γ in Patients with Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy.
Ken-ichi Hirano, Tatsuya Tanaka, Yoshihiko Ikeda, Satoshi Yamaguchi, Nobuhiro Zaima, Kazuhiro Kobayashi, Akira Suzuki, Yasuhiko Sakata, Yasushi Sakata, Tatsushi Toda, Norihide Fukushima, Hatsue Ishibashi-Ueda, Daniela Tavian, Hironori Nagasaka, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba, Yoshiki Sawa, Masatsugu Hori
Biochem. Biophys. Res. Commun. In press.

2. 学会発表

Screening for triglyceride deposit cardiomyovasculopathy in type 2 diabetes mellitus patients.
Nobuhiro Zaima, Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ishibashi-Ueda, Mitsutoshi Setou, Ken-ichi Hirano
The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease
(Osaka, JAPAN : 2013.4.19-20)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

中性脂肪蓄積心筋血管症の1例

研究分担者 杉村宏一郎 東北大学大学院医学系研究科 循環器内科 助教
研究協力者 黒田 宙 東北大学大学院医学系研究科 神経内科 助教

研究要旨：

重症心不全を合併した中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）に対し、従来の心不全治療に加え、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を行い、臨床経過を検討した。BNP 1141pg/dl、LVEF 22%と重症心不全、動揺する高CPK血症（86~2724 IU/L）と右上肢にMMT 1-2/5の筋力低下を認めたが、約2年の治療経過で心不全症状、ミオパチーの軽快とともに、BNP値、CPK値も低下した。

A. 研究目的

Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy (TGCV)は心筋障害を合併する稀な代謝性筋疾患である。極めて希少疾患であるがゆえに、診断法だけでなく治療法においても、確立されたものはない。しかし、心筋障害は極めて重症であり、予後の大きく関係していることから、その治療方法に確立が必要であることは明白である。以上から、実際の診療からTGCV症例の特徴、診断方法、治療方法の確立を目指した。

B. 研究方法

当院では2011年2月にTGCVと診断した60歳の男性の一例を、経過観察している。通常的心不全治療に加え、市販の中鎖脂肪酸含有オイルを使用した食事療法を加えることで、その効果を検討した。

C. 研究結果

症例は60歳の男性。2002年1月より拡張型心筋症と診断され、外来で加療を行っていた。クレアチニンキナーゼの高値が持続するため、2010年11月に神経内科へ紹介したが、本人が精査を希望せず、経過を見ることとなった。その後は近医へ通院していたが、2011年より心不全急性増悪を繰り返すようになった。本人の右上肢筋力低下に対する精査の希望があり、2012年2月20日当院神経内科に入院したが、息切れの

増悪と食欲低下があり、BNPも1411pg/dlと上昇したため、23日に心不全の急性増悪の診断で当科に転科となった。NYHA IV度、Swan-Ganzカテーテルでは肺動脈楔入圧27mmHgと上昇、心係数は1.6L/min/m²と著しい低下を認めた。また、左室駆出率（LVEF）は心臓超音波検査で22%と著しく低下していた。強心薬、利尿剤で開始を開始し、内服治療を加え、症状は軽快した。筋生検と心筋生検では、筋細胞内に脂肪滴の蓄積を認め、遺伝子検査ではATGL/triglyceride lipase酵素の遺伝子PNPLA2遺伝子に変異を認めたため、中性脂肪蓄積心筋血管症と診断した。現在はACE阻害薬、抗アルドステロン薬、β遮断薬の心不全治療に加え、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を開始、経過を診ている。LVEFは25%といまだに低値であるが、BNP137pg/dlと心不全は軽快傾向を示している。右上肢のミオパチー症状も軽快している。

D. 考察

TGCVは細胞内中性脂肪(TG)を加水分解する酵素：ATGLの欠損により、心筋細胞内に中性脂肪が蓄積すること、また、エネルギーとして利用できないことから心筋障害を来すことが知られている。TGを構成する脂肪酸には、長鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸があるが、ATGLは長鎖

脂肪酸 TG の加水分解に関与する。そこで、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を行うことで、ATGL 欠損でも代謝可能な中鎖脂肪酸 TG が増えることで、エネルギー利用ができるようになると考えられる。画像診断による心機能的な改善は得られていないが、明らかなBNPの低下と四肢筋力の改善が得られており、食事療法の効果が得られている可能性がある。

E. 結論

TGCV における新たな治療法として中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法は有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M,

A novel mutation in PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: A case report and literature review.

Neuromuscl Disord. In press (2014).

2. 学会発表

1)第2回中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) 国際シンポジウム

2013年4月19日(金)~20日(土)

大阪大学中之島センター

2)第17回日本心不全学会学術集会

2013年11月28日(金)~30日(日)

大宮ソニックシティ

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

予定無し。

2. 実用新案登録

無し

3. その他

特記すべき事項なし。

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

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)活性測定系の
開発に必須の ATGL 活性抑制する抗体作成のための抗原調製

研究分担者 高木敦子

独立行政法人 国立循環器病研究センター 研究所 分子薬理部 室長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)の
早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL 活性測定系を開発することを目的とする。
臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、真に ATGL を測
定していることを、ATGL 抗体によって活性が抑制されることで示すことが必須である。
ATGL に対する抗体の作成に必要な抗原を以下のように調製した。COS1 細胞において発
現された組換えヒト His6-ATGL 蛋白の発現条件および HisTrap カラムでの精製条件を検
討し、蛋白の銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で精製することができた。

A. 研究目的

ATGL 活性測定系を開発し、臨床検体に
応用することで、TGCV の早期発見、早期
治療を可能とすることを最終目的とする。
平成 24 年度の成果である COS1 細胞に導
入した組換え His6-ATGL の生化学的性格
付により確立された、ATGL 活性測定条件
を基に、臨床検体の ATGL 活性測定系の開
発を行う。測定された活性が真に ATGL 由
来であることを確認するため、ATGL 活性
を抑制する抗体の作成のための抗原調製
を平成 25 年度の目的とした。

を、小林邦久先生（福岡大学 筑紫病院
内分泌・糖尿病内科 教授）から譲渡い
ただいた。

プラスミドはアフリカミドリザルの腎臓
由来株化細胞である COS1 にエレクトロポ
レーション法で導入された。His6-ATGL
と His6-CGI-58 精製は可溶化細胞画分よ
り HisTrap カラムクロマト法にて行った。
リパーゼ活性は ^3H -トリオレインを含む
トリオレイン/リン脂質粒子を基質と
して、ウシ血清アルブミン存在下で測定
された。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA とヒト CGI-58
cDNA はヒト白血球から得て、His6 tag を
N 末端にもつ pcDNA4/HisMax C ベクター
(Invitrogen 社)にクローン化されたもの

(倫理面の配慮)

本研究は、一般化した株化動物細胞を
利用するものであるため、倫理面の問題
はないと判断した。動物を使用した実験
は行っていない。組換え DNA 及び放射性

同位体使用の実験の許可は得ている。

C. 研究結果

臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、ATGL のリパーゼ活性以外にもリパーゼは存在すると考えられるので、真に ATGL を測定していることを、ATGL 抗体による活性抑制により示すことが必須である。

市販の ATGL 抗体は、ウェスタンブロットには使用できるが、ATGL のリパーゼ活性を抑制できないことがわかった。ATGL 活性を抑制することができる抗体を作成するため、抗原として使用する活性を保持した精製 ATGL を調製することを試みた。精製出発材料として、COS1 で発現された組換え His6-ATGL 蛋白を含む細胞可溶化液を用いた。HisTrap カラムのアプライ条件、カラム条件、溶出条件を検討し、活性のある状態で、蛋白銀染色法で、単一バンドにまで精製することができた。しかし、純度は高いが、微量しか精製 His6-ATGL が得られないので、COS1 細胞での His6-ATGL 発現の条件検討を行った。エレクトロポレーションキュベットあたり 20 ~ 40 μg DNA 及び、2.5 日、4.5 日、6.5 日の条件を検討し、40 μg DNA で、2.5 日の条件を使用することで、最も効率良く ATGL 活性を得ることができた。現在、抗原とする精製 ATGL 蛋白をこの方法で蓄積している途中である。

ATGL の活性促進因子として CGI-58 が知られている。ATGL 活性測定系に添加する必要がある可能性があるため、同様の方法で、His6-CGI-58 蛋白の精製も行った。

D. 考察

CGI-58 蛋白の真の ATGL 活性促進効果を調べる必要がある。予備的実験では、ATGL と CGI-58 が完全に単一でなかったため、持ち込みも考えられ、その促進効果は 2 倍程度であった。

今回、2 つの蛋白とも精製できたので、促進効果を調べ、ATGL 活性測定系の確立に役立てることができるようになった。

E. 結論

今後、臨床検体を測定していくうえで、つねに、測定されたリパーゼ活性が真に ATGL に由来するものであることを確認するためには、ATGL 抗体の存在下と非存在下での活性を比較する必要がある。HisTrap カラムでの His6-ATGL 精製および発現条件を検討し、蛋白銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で、精製できた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高木敦子、池田康行、小林邦久、平野賢一。

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (adipose triglyceride lipase; ATGL) の生化学的特徴について

第 86 回 日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日-13 日 パシフィコ横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

中性脂肪蓄積心筋血管症に関する調査研究
— 心血管病研究の為のモデル作成と治療について —

研究分担者 中村浩士 山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授

研究要旨

副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して心筋保護的に作用することが報告されているが、心血管病に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。そこで、マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。

A. 研究目的

グルココルチコイドの作用は細胞種によって大きく異なる。グルココルチコイドが心筋細胞では、フォスホオリパーゼ A2、シクロオキシゲナーゼ 2(COX2)の発現を誘導して、プロスタグランジンの産生を促進し、心筋保護に働いていることが報告されている。しかし、心血管病に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。

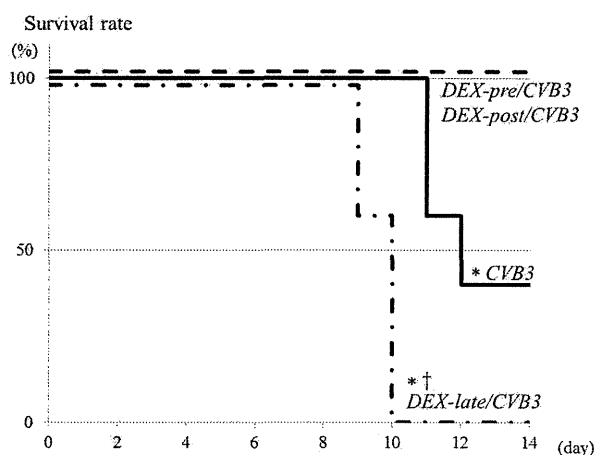
B. 研究方法

マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。3週令♂A/Jマウスに coxsackievirus B3(CVB3)2×10⁴ PFU を腹腔内投与し心筋炎を作成した。CVB3 のみを投与した群（CVB3 群）、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した後、6日目に CVB3 を投与した群（DEX-pre/CVB3 群）、CVB3 を投与した後、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した群（DEX-post/CVB3 群）の3群を作成した。14日後にマウスの心筋を採取し、左室内径、壁

厚、ウイルス力価（TCID₅₀）を測定し、それぞれ3群間を比較した。また COX-2 阻害実験として、NS-398 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を投与した群（NS-398/CVB3）、CVB3 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を接種し dexamethasone 連日投与した群（NS-398/DEX-pre/CVB3 & NS-398/DEX-post/CVB3）の生存分析を行った。

C. 研究結果

CVB3 群は、左室内径の拡張と壁厚の減少、ウイルス力価の上昇を認めたが、DEX-pre/CVB3、DEX-post/CVB3 群においてはその変化は有意に抑制されていた（図1）。NS-398 を用いた阻害実験ではウイルス接種と共に NS-398 を使用した群の方が全例とも超早期に死亡したが dexamethasone の早期投与により生存率を有意に改善した。



D. 考察

マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。

E. 結論

心血管病に対するステロイドの新しい機序として、COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。さらに、この心筋保護効果は感染直後の急性期に限定（時間依存性）されることが確認された。

F. 健康危険情報

副腎皮質ステロイドのひとつであるグルココルチコイドは、大量かつ長期使用に伴いステロイド性糖尿病やミオパチーの有害事象が報告されており、これは中性脂肪蓄積心筋血管症の治療と拮抗する。そのため、使用に際しては投与量、使用する病態や期間、ならびに投与方法等を慎重に検討する必要がある。現段階におけるヒトでの研究には倫理的に問題があるため、動物実験で代替する（山口大学動物使用計画審査：23-S02）。

G. 研究発表

1) 論文発表

Nakamura H, Kunitsugu I, Matsuzaki M,

Fukuda K, Sano M: Diverse stage-dependent effects of glucocorticoids in a murine model of viral myocarditis. *Journal of Cardiology* 61, 237-242, 2013.

Oda S, Fujii Y, Takemoto H, Nomura S, Nakayama H, Toyota Y, Nakamura H, Teragawa H: A Case of heart failure in which coronary spasm played an important role. *Internal Medicine* in press.

Kuno T, Nakamura H, Endo Y, Saito K, Yamazaki H, Motoda H, Numasawa Y, Shimizu K, Takahashi T. Clinical history and colliquative myocytolysis are keys to diagnosis of Shoshin beriberi. *Internal Medicine* submitting.

佐野元昭, 勝俣良紀, 伊藤秀之, 中村浩士: 心臓・腎臓疾患病態形成とプロスタグランジン. *血栓と循環* 21, 172-177, 2013.

2) 学会発表

中村浩士、長谷川明洋、白井睦訓、矢野雅文: ウイルス性心筋炎における CD69 の役割についての検討. 第 35 回心筋生検研究会(東京/2013 年 11 月 1 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法. 中村浩士、松崎益徳、吉田勉、山口 TLO (特開：2002-209473)

An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine. Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida. (米国特許：10-141608)

分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法. 中村浩士、松崎益徳、山口 TLO (特開 2005-229927)

ATGL 欠損マウスを用いた血管障害カフモデルの研究

研究分担者 山田壮亮 産業医科大学第二病理学 講師

研究要旨

ATGL 欠損による脂質代謝異常が動脈硬化を促進させるメカニズムを解明するために、ATGL 欠損マウスを用いて、血管障害モデルの一つであるカフモデルを施行した。ATGL 欠損による脂質（特に中性脂肪）代謝異常は、当モデルにおける外膜側よりの刺激を誘発している可能性が示唆された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は、中性脂肪が心筋細胞や冠状動脈、骨格筋などに蓄積し、重症心不全や冠動脈求心性狭窄、ミオパチー等を惹き起こす疾患である。現在までのところ、TGCV の原因遺伝子として、*adipose triglyceride lipase (ATGL)*が報告されている。*ATGL* knockout mouse、ヘテロ(*ATGL*^{+/+})及びホモ(*ATGL*^{-/-})を用いて、血管障害モデルを作製し、TGCV 発症のメカニズムの一端に触れたい。

B. 研究方法

右大腿動脈にカフを巻き付け留置し、10 日後にカフと共に動脈を採取した。外膜炎や低酸素刺激等を起因とした血管障害モデルの一つ、カフモデルを施行することで、内膜肥厚による求心性狭窄をイメージした。

(倫理面への配慮)

特に手術時において、動物の苦痛を和らげるため、イソフルラン吸入麻酔を施行した。

C. 研究結果

Wild type (C57BL/6J) では、内膜肥厚が軽微なのに対し、*ATGL*^{-/-}と *ATGL*^{+/+}では有意に進展しており、*ATGL*^{-/-}> *ATGL*^{+/+}> WT の順で、各群間

に有意差が認められた。また、WT と比較して *ATGL*^{-/-}では、外膜マクロファージの集簇が有意に高度であった。

D. 考察

当カフモデルでは 'response to injury hypothesis' で最も重要な初期 event である、血管内皮障害が理論上、起き得ない。そこで、動脈硬化発症メカニズムにおける outside-in signaling の重要性が、我々に認識される。これは外膜における炎症細胞（マクロファージを含む）から産生される、TNF- α といった cytokine だけでなく、外膜に豊富に存在する脂肪細胞から産生される adipokine や cytokine も、その大きな一翼を担っていよう。特に後者は、*ATGL* 欠損による脂質代謝異常 (TGCV) と動脈硬化との関連性における研究において、重要な factor の一つになり得ることが、現在までの実験結果より示唆された。

E. 結論

ATGL 欠損による脂質代謝異常は、当モデルにおける外膜側よりの刺激を誘発している可能性があり、今後その signal 経路を模索すべきであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 103 回日本病理学会総会（広島、2014 年）

第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会（東京、2014 年）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ストレプトゾトシン誘発糖尿病マイクロミニピッグの開発

研究分担者 谷本昭英 国立大学法人鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞病理学分野 教授

研究要旨

【目的】 マイクロミニブタにストレプトゾトシン (STZ) を単回投与することで1型糖尿病を誘発し、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) モデルを作製する。

【方法】 1頭のマイクロミニブタに STZを 250mg/kg BW投与し、1型糖尿病を作製する。STZ 投与直後より普通食による飼育を行った。STZ 投与食後のブドウ糖補充は行わない。

【結果】 高血糖状態に加えて、高トリグリセリド血症を誘導することができた。また、メカニズムは不明であるが、Insulin に対する反応性の低下も観察された。

【考察】 今回の実験条件では、STZ 投与直後においてもブドウ糖補充は必要ないと思われる。STZ 250mg/kg 投与でも著明な高血糖に加えて、持続的高トリグリセリド血症が観察された。中性脂肪蓄積心筋血管症は高コレステロール血症を伴わない中性脂肪の蓄積が心血管に見られる病態であり、普通食での飼育でよりヒトの病態に近いと考えられた。

【結論】 マイクロミニブタにSTZ 単回投与により、1型糖尿病と高トリグリセリド血症を誘発することに成功した。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCV のモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

A. 研究目的

研究目的は、マイクロミニブタにストレプトゾトシン (STZ) を単回投与することで1型糖尿病を誘発し、高トリグリセリド血症に基づいて、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) モデルを作製することである。今年度は、STZ の濃度の変更、STZ 投与直後のブドウ糖補充の省略、普通食での飼育を行い、前年度の実験条件と比較検討することで、TGCV の病態にもっとも近いモデルの作成を試みる。

B. 研究方法

実験には9ヵ月齢の雄性マイクロミニブタ1頭を用いた。STZは濃度100 mg/mLで100 mMクエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解し、インフュージョンポンプを用いて、2 mL/min の速度で耳介静脈内に投与した。総量は250mg/kg BWとした。STZ 投与直後から連日、簡易血糖値測定器を用いて、耳介静脈を一部注射針で傷つけて血液を1~2滴得て、血糖値を測定した。

食餌は STZ 投与日から通常飼料を体重の3%/body 与えた。今回の実験では、高コレステロール・高脂肪食負荷は行わなかった。

STZ 投与後4週と6週において、Insulin tolerance test (ITT)を行った。Insulin はそれぞれ、0.1 および0.2 U/kg BW を頸静脈内投与し、投与前、投与後15分、30分、60分、90分および120分後に、血糖値を測定した。

C. 研究結果

STZ 投与後の2日目より、空腹時血糖値が約300~400mg/dL に上昇した。経口GTTにおいては、試験前の絶食によっても血糖値の十分な低下が見られず、ブドウ糖負荷後の血糖値の低下も遅く、グルコースクリアランスの遅延を認めた。ITTにおいては、0.1 および0.2 U/kg BW のいずれのInsulin 濃度でも、血糖値の十分な低下は見られず、Insulin 感受性の低下の存在が示唆された。血中の総コレステロールは約100mg/dL と正

常範囲であったが、トリグリセリドは約 400～700mg/dL であり、持続的な高値が見られた。

現在、飼育継続中 (STZ 投与後 16 週) で、体重が減少傾向にあるが (約 1 kg 減)、健康状態に問題はなく経過している。

D. 考察

STZ の投与条件が 250mg/kg BW でも十分に高血糖を誘導することができた。この間の健康状態は STZ 300mg/kg BW 投与の動物と比較してかなり良好であり、STZ 投与直後においてもブドウ糖補充は必要ないと思われた。

今回実験では、STZ 投与直後から普通に飼育したところ、高トリグリセリド血症が持続性に見られた。同様の高トリグリセリド血症は、前年度にも STZ 投与直後の普通食飼育期間に観察されたが、高脂肪食負荷によりトリグリセリドが低下したことは、興味深い現象であるが、メカニズムや意味は不明である。また、マウスにおいて同様の STZ 誘発性の糖尿病モデルを作成した際には、高トリグリセリド血症にはならない (personal communication) ことが言われており、この点は、マイクロミニブタのヒトの病態モデルを再現する実験動物としての優秀さを示している。

ITT の結果からは、Insulin 感受性の低下が疑われたが、これが持続的高トリグリセリド血症によるものか現在のところは不明であり、今後の検討課題のひとつである。

TGCV は高コレステロール血症を伴わないトリグリセリドの蓄積が心・血管系に見られる病態であり、糖尿病誘導後の長期観察で著明なトリグリセリドの蓄積が見られるようであれば、普通食での飼育のほうが理想的であり、今年度の実験条件は、十分にこれに該当する結果と考察された。

E. 結論

マイクロミニブタに STZ 単回投与により、1 型糖尿病と高トリグリセリド血症を誘発することに成功した。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCV のモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

現在も、高血糖および高トリグリセリド状態のブタを継続して飼育中であり、6 か月以上の飼育後に剖検に付し、生化学的、組織学的および MS imaging による心血管へのトリグリセリドの蓄積を検討する予定である。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし