心不全難治化のメカニズム解明と新しい治療法の開発

所属機関　久留米大学　医学部
研究者名　甲斐久史

≪研究の概要≫

種々の心疾患の終末像である慢性心不全の我が国における罹病率は100万人程度で新たな患者発生は10-20万人/年とされている。高齢化の進行と、急性心筋梗塞などの急性心不全治療の進歩により、今後、慢性心不全患者は増加することが予想されている。本研究では、①心不全慢性化・難治化のメカニズムにおける免疫・炎症の関与、とくに樹状細胞の関与を解明し、心不全の慢性化・難治化を未然に防ぐ予防法・治療法の開発をこころみ、また樹状細胞が心不全難治化のリスク層別化のマーカーとなりうるか検討した。心筋構成タンパク（ミオシン重鎖）に感作した樹状細胞をマウスに移植することで、実験的心筋炎が誘発されることを明らかにした。また、心不全急性増悪期の患者において末梢血樹状細胞数が減少、活性化されることをみいだし、さらに樹状細胞数の回復遅延と心不全の難治化に相関があることを明らかにした。②重症心不全の研究に必須である霊長類を用いた心不全モデルを開発した。心不全の根本的治療となることが期待されるカルパインやδ-サルコグリカン遺伝子導入法を開発した。今後、霊長類心不全モデルなどにおいて治療効果を検討する。一方、拡張型心筋症患者の心筋標本においてディストロフィンの変性・発現低下が心不全発症に関与する可能性を示唆する所見を得た。③重症心不全の根本的治療の一つとして筋芽細胞を用いた再生療法とその治療効果を強化するための遺伝子治療の併用療法の基礎実験を行った。

甲斐　久史	久留米大学医学部 准教授	研究の統括 心不全増悪における免疫因子の関与の検討
豊岡　照彦	東北大学先進医工学研究機構 教授	大型動物における重症心不全の遺伝子・再生医療の実用化
河田　登美枝	武蔵野大学薬学部 教授	筋芽細胞を用いた再生療法と遺伝子療法の併用による重症心不全治療の開発

研究報告

Ⅰ　研究目的

研究の目的

代表研究者甲斐はこれまで心筋とくに心筋内血管周囲の炎症性変化に着目して、心不全の発症機序について研究を進めてきた。その結果、高血圧性拡張障害の病態に血管周囲を主座とする fibro- inflammatory change が重要であるという新しい概念を確立した。さらに、圧負荷および容量負荷不全心における網羅的遺伝子発現解析を行い心不全発症機序について研究を進めてきた。また、研究分担者豊岡・河田は、拡張型心筋症モデルハムスターにおける原因遺伝子を解明し、その欠損遺伝子を心筋細胞に補充する実験的遺伝子治療を確立した。しかし、心不全が慢性化し難治化するする機序は不明であるとともに、一旦、現在の薬物治療や遺伝子治療をもってしても不全化した心筋細胞の機能を回復することは不可能である。

そこで本研究は、心不全難治化のメカニズムを明らかにするとともに、不全心の根本的改善を目指して、新しい治療戦略を開発することを目標とする。具体的には、
①炎症細胞制御の最も上流に位置すると考えられる樹状細胞を介した免疫＝炎症系の慢性心不全が難治化する過程への関与を臨床的に明らかにし、心不全の増悪・難治化の新しい概念を確立するとともに、それに基づく新規治療法・診断指標を開発すること、
②研究分担者との協力により心不全進展後の治療法として、心筋に分化し合併症の少ない骨格筋芽細胞を用いた細胞移植、遺伝子治療＋細胞移植などの画期的な心不全の根本治療を開発する。

研究の意義

種々の心疾患の終末像である慢性心不全の我が国における罹病率は 100 万人程度で新た

な患者発生は10-20万人/年と想像されている。高齢化の進行と、急性心筋梗塞などの急性心不全治療の進歩により、今後、慢性心不全患者は増加することが予想されている。重症心不全の予後は、近年の薬物治療、ペーシング療法などの非薬物療法の進歩にかかわらずきわめて不良である。また、慢性心不全のためQOLが損なわれ頻回に入院を繰返す患者が増加している。これは患者やその家族にとって大きな苦痛であるのみならず、医療費の増加の一因となっている。そこで、心不全慢性化・難治化のメカニズムを解明し、それに基づいて、難治化のリスク層別化のマーカーを見いだし、さらには心不全の慢性化・難治化を未然に防ぐ予防法・治療法を開発することが必要である。また、いったん不全化した心筋細胞を正常化することは遺伝子治療をもってしても困難である。そこで心不全進展後の治療法として、心筋に分化し得る骨格筋芽細胞を用いた細胞療法などの開発が望まれる。

Ⅱ　研究計画および方法

１．心不全増悪における免疫因子の関与の検討（担当：甲斐）

炎症反応は慢性心不全の独立した予後不良予測因子である。本研究は、免疫＝炎症反応のオン＝オフの制御をする樹状細胞の臨床的研究と基礎的研究により、まったく新しい心不全の遷延化・難治化の予防法・指標の開発を図る。免疫＝炎症反応の中心的役割を担う樹状細胞は病態の根本的機序を反映しているため患者の難治化リスク層別化に有用だと考えられる。本研究では樹状細胞を指標とした新しい心不全診療の確立を目指す。

１．心筋炎モデルにおける樹状細胞の意義の解明

ラット骨髄より樹状細胞を分離・培養するシステムを用いて、心筋構成蛋白ミオシン重鎖(MHC)で感作した樹状細胞が心臓にいかなる影響を及ぼすのか、組織学的解析、分子生物学的解析、小動物用心エコーによる心機能解析など）を検討した。また、抗炎症作用を有するスタチンでex vivoにて樹状細胞を前処置する効果につき検討した。

２．慢性心不全急性増悪における樹状細胞の意義の解明

前向き臨床試験により、急性心筋梗塞、急性心筋炎、慢性虚血性心不全、慢性非虚血性心不全をそれぞれ約１００症例登録。FACS法による末梢血中樹状細胞の数、活性化レベル測定とともに、臨床症状・臨床所見（BNP,心エコー所見など）を継時的に評価し、相関関係を検討する。また、疫学的解析により、心不全による入院、心事故発症、心不全死、総死亡などとの関係を解析する。その結果を踏まえて、心不全の慢性化・難治化のリスクを層別化し新しいテーラーメード医療を実現する。また、基礎的研究により、心不全の病態における樹状細胞の役割を細胞レベル・分子レベルで明らかとし、遷延化・難治化を予防する新しい薬剤・核酸医薬の開発、樹状細胞の関与する免疫寛容誘導による心不全治療な

どの画期的な治療戦略を打ち立てる。

２．重症心不全の遺伝子・再生医療の実用化（担当：豊岡）

１．calpain・δ-sarcoglycan を用いた遺伝子治療

当研究室で多種類の RNAi により m-calpain のﾉｯｸﾀﾞｳﾝに必要な特異的配列、2 種を同定し、その生理機能を、研究初期には、その s h RNA と m-calpain とは無関係な哺乳類に存在しないｸﾗｹﾞが発現する対照遺伝子として GFP の s h SCR を作成して、RISK 活性が不明だった骨格筋細胞株で抑制の可否を検討した。最後に最も有効な s h RNA から演繹した cDNA を作成して、これを transfection 効率の高いｱﾃﾞﾉｳｲﾙｽ vector に組込んだ Ad_shRNA-*CAPN2* と対照用の Ad_shSCR を作成する。また、同様の手法でδ-sarcoglycan(SG)遺伝子発現を Ad_SCR、および Ad_d-SG を作成してﾉｯｸﾀﾞｳﾝの可否を検討して、先天性 DCM ﾊﾑｽﾀｰと細胞骨格ﾀﾝﾊﾟｸの発現を分子生物学、免疫組織学、およびﾀﾝﾊﾟｸ工学的に比較した。

２．拡張型心筋症心筋標本を用いた検討

心不全の重症化機構は不明な部分が多く、その解明は拡張型心筋症の病態解明と治療開発に極めて重要である。従来、筆者らが用いた各種の心不全モデルについて Dys と、その関連ﾀﾝﾊﾟｸ(DAP)が心不全の重症化とともに崩壊して行く病態を示したが、このプロセスがヒトにも共通した現象か厳密に検証する必要が有る。本年度はﾄﾞｲﾂ Max-Planck 研究所、J. SchaperS. Kostin 教授と共同して移植手術時に患者と倫理委員会の承認を得た心筋標本に発現している Dys と DAP の量を Westren blotting で、局在部位を免疫染色で検討する。これらの病態と臨床検査所見の中で収縮能を心臓ｴｺｰ検査で、血行動態を心臓ｶﾃｰﾃﾙ検査により検討する。共同研究者が液体窒素下に保管していたﾋﾄ症例で心移植に至った NYHA 分類Ⅲ～Ⅳ度の最重症 DCM (n=14)、虚血性心筋症(ICM, n=4)および重症心筋炎(n=6)患者の心摘出後に液体窒素保存の心筋標本の中で倫理委員会の承認が得られた試料を供与頂いた。平均年齢 50.5 才、対照には何らかの理由で移殖に至らなかったﾄﾞﾅｰ(n=3)からの心標本を用い、また正常ﾗｯﾄ心筋を内部標準として、各ﾀﾝﾊﾟｸの発現量を補正した。解析には筆者らが各 SG の遺伝子をｸﾛｰﾆﾝｸﾞして塩基配列を決定後(Sakamoto *et al., PNAS,* 1997)、演繹したｱﾐﾉ酸配列のﾕﾆｰｸ配列部分から作製した site-directed antibody と市販抗体を用いた。

３．霊長類を用いた心不全モデルの開発

心不全の重症化機構は未だ不明な点が多く、その病態解明、新たな治療戦略と診断法の開発にはﾋﾄに近い種を用いた疾患ﾓﾃﾞﾙの開発が必須である。小動物では心筋の生理機能が薬物に対する反応や Ca^{2+} 代謝などが大きく異なり、ﾋﾄへの発展・応用を考慮すると霊長類を用いることが望ましい。今回、我々はｶﾆｸｲｻﾞﾙでﾍﾟｰｽﾒｰｶｰ心室頻脈刺激によりﾋﾄ病態を反映する心不全ﾓﾃﾞﾙの作製を試みた。その過程で筆者らが提唱している心不全の重症化機構、即ち、

心筋細胞内 Ca^{2+}ｲｵﾝ濃度の上昇→心筋細胞内因性のﾀﾝﾊﾟｸ分解酵素の活性化→細胞膜を裏打ちするｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの加水分解→細胞膜の脆弱化による更なる心筋細胞内 Ca^{2+}ｲｵﾝ濃度の上昇による悪循環で心筋細胞の変性､壊死を来す作業仮説（Yoshida *et al.*, *Cardiovasc.Res.*, 2003; Toyo-oka *et al.*, *PNAS*, 2004; Takahashi *et al.*, *Cardiovasc.Res.*, 2005）の検証を目的とした。定法により全身麻酔下に、開胸して、単極刺激用ﾘｰﾄﾞ線を心先部に埋め込み､ｼﾞｪﾈﾚｰﾀｰ（CMP 社製）を皮下に包埋後に、閉胸した。手術創が治癒した一週間後に A、B 群に分け頻脈刺激を開始した。A 群では 3 週間 250bpm、その後 290bpm で 2 週間頻脈刺激し、B 群では 4 週間 300bpm で頻脈刺激を行った。A 群では 3 週間 250bpm、その後 290bpm で 2 週間頻脈刺激し、B 群では 4 週間 300bpm で頻脈刺激を行った。両群とも頻脈刺激前と刺激後 1 週間毎に胸部ﾚﾝﾄｹﾞﾝ撮影(後→前像､および右→左側面像)、心電図、心ｴｺｰ図、そのｶﾗｰﾄﾞﾌﾟﾗｰ検査､心臓ｶﾃｰﾃﾙによる血行動態検査を行う｡血算・血液生化学検査として、一般的な検査(TP. Albumin, GOT, GPT, Al-P, LDH, BUN, Cr, 血糖値, Na, K, Cl)に加えて、特異的な心筋障害の程度を CPK, Tn-T で、また心不全の程度を血清 BNP 値を酵素抗体法で検討した｡最終的に､心筋の病理・組織学的に検討する目的で、頻脈刺激終了時に剖検を行った。更に、A 群では心筋細胞膜の透過性を *in vivo* で検討するために、剖検前にｴﾊﾞﾝｽﾌﾞﾙｰ（EB）を投与して病理組織学的に分析した。

３．筋芽細胞を用いた再生療法と遺伝子療法の併用による重症心不全治療の開発（担当：河田）

現在、心不全が重症化する機序は不明で、その進行を止める薬物は開発されていない｡最終的な治療法は心臓移植である。今研究では心不全進展後の治療実験として、骨格筋芽細胞(SkMb)及び脂肪細胞由来の幹細胞（adipose-derived stem cells; ADSCs）が心筋に分化しうるかを検討した。実験動物として、拡張型心筋症ハムスターの TO-2 と、これに対して拒絶反応がないことを確認している同種異系の 3 週齢のゴールデンハムスター（GH）を用いた。

1. SkMb の移植：GH の下肢より無菌的に骨格筋を摘出し、既報に従い骨格筋芽細胞を継代培養する。移植前に、この細胞に DAPI による核ラベルおよび DiI による蛍光色素ラベルを行い、無血清 DMEM にて～3×10^6 個/30μl になるように調整する。

5-6 週齢の TO-2 を麻酔、開胸し、培養 SkMb を左室自由壁に注入する。経時的に超音波診断装置にて収縮能を測定する。実験終了時に、収縮能及びカテーテル法にて心血行動態を測定し、心機能の改善を非移植群の TO-2 と比較検討する。動物の心臓を摘出し、凍結組織とする。組織の連続切片を作製し、δ-SG、fast-myosin heavy chain（MHC)と slow-MHC、connexin43 の各特異抗体にて免疫染色を行い、それぞれの蛋白発現を観察する。

2. ADSCs の移植：C57Bl/6N マウスの背部皮下褐色脂肪組織細胞を採取し、ADSCs を維持培養する。この細胞が自己拍動する事を観察したら、“心筋分化細胞”と定義する。同様に GH の背部皮下褐色脂肪組織細胞を採取して、心筋分化細胞を効率よく得る培養条件を検討する。最終的には ADSCs に DAPI による核ラベルを行い、血清 DMEM にて～10^6個/30μl になるように調整し、心不全が進展している 40 週齢の TO-2 の心筋に移植する。SkMb と同様の方法で心機能測定及び免疫組織学的検討を行なう。

Ⅲ　研究成果

１．心不全増悪における免疫因子の関与の検討（担当：甲斐）

１．心筋炎モデルにおける樹状細胞の意義の解明

マウス骨髄より単核球成分を採取、GM-CSF 存在下で培養することによって、$CD11c^+$ 細胞が 90%以上を占める mDC を得た。ex vivo で樹状細胞を MHC で感作した後、マウスに尾静脈より移植した。28 日後には、心不全を認めた。組織学的には心筋における著明な炎症細胞浸潤と心拡大が認められ、心筋炎による心不全と考えられた。この炎症細胞浸潤は、多核球、単核球が中心で、炎症は右室、心外膜側に有意であった。心エコー上、左室拡大と左室収縮率の低下を認めた。この MHC 感作樹状細胞による心筋炎モデルを用いて、抗炎症作用を有するスタチンの効果を検討した。すなわちスタチンを ex vivo で MHC 感作樹状細胞に投与し、脱感作や炎症抑制が生じるかを検討した。スタチン処理 MHC 感作樹状細胞を移植したところ、明らかな炎症、心機能の改善はみられなかった。現在、培養系でスタチンの適正投与量を含め、スタチン処理の効果を検討中である。

２．慢性心不全急性増悪における樹状細胞の意義の解明

慢性心不全急性増悪患者において、急性期、すなわち入院時 48 時間以内に末梢血中の樹状細胞（mDC, pDC ともに）数が著減しボトムとなった。この減少の程度は必ずしも BNP・CK-MB 上昇度、左室駆出率低下度とは相関しなかった。CD40, CD83, CD86, CCR7 発現レベルを検討したところ、これら樹状細胞の活性化マーカーが亢進していた。治療により心不全が改善した症例では、樹状細胞数が mDC, pDC ともに正常者のレベルまで改善し、活性化マーカー発現も低下した。心不全治療抵抗性で臨床所見改善に乏しい症例ではこれらの改善が見られなかった。退院時樹状細胞数改善群と非改善群において、一年後の生存率、心機能および再入院率に有意差はみられなかった。現在、急性心筋梗塞後の樹状細胞数・活性化についても検討中である。

２．重症心不全の遺伝子・再生医療の実用化（担当：豊岡）

１．calpain・δ-sarcoglycan を用いた遺伝子治療

上記2種の配列を同定し、①ほぼ完全にm-calpainのﾀﾝﾊﾟｸ発現と酵素活性を、完全に抑制することに始めて成功した。②筋細胞に共存するcalpainのisoformの、μ-calpainとcalpain-3には全く影響しなかった。③驚くべき事に導入細胞のfusionとmyotube形成が阻害され、完成したmyocyteが発生しなかった(下記文献1)。④対象的に、下記(5)のδ-SGのﾉｯｸﾀﾞｳﾝは筋細胞の分化や増殖にも影響しなかった。即ちcalpain-2は筋発生を選択的に、かつ直接に制御しており、我々も含め世界中がﾉｯｸｱｳﾄに失敗した理由も説明された。その詳細な機構解明は今後の大きな課題である。また、同様の手法で作製したAd_SCR、およびAd_δ-SGの配列も強力でδ-SGのﾀﾝﾊﾟｸ発現を完全に抑制した。但し、発現の抑制期間が短かく、1週間以上の長期ﾌｫﾛｰには3日間隔で追加投与が必要だった。得られた主な結果として、①δ-SGがﾉｯｸﾀﾞｳﾝされて発現が抑制されると、他のα-, β-とγ-SGの発現も正常発現の1/3から半分程度にまで減少した。②しかしα-, β-とγ-SGのmRNAの発現ﾚﾍﾞﾙは影響されず、代償的な増強は認めなかった。③更に、心筋細胞と異なり、筋細胞として自発収縮を来たさないことは筋収縮に伴う細胞膜の伸展から独立して議論が可能となる点で有用である。その結果、δ-SGのﾉｯｸﾀﾞｳﾝに伴うα-, β-とγ-SGのdown-regulationはtransfectionに伴う細胞膜の脆弱性に伴う結果ではないと予想され、実際、培池中に放出される筋細胞に特異的なCPK(creatine phosphokinase)の酵素活性はδ-SGのﾉｯｸﾀﾞｳﾝを行わなかった細胞や、δ-SGとは無関係の哺乳類には発現しないRNAi (scramble RNA)による対照実験でも全く上昇しなかった事から、実証された(下記文献10)。④また上記(5)のcalpain-2とは対象的にδ-SGのﾉｯｸﾀﾞｳﾝは筋細胞の分化や増殖にも影響しなかった。以上から、δ-SG遺伝子のmutationが骨格筋細胞で筋ｼﾞｽﾄﾛﾌｨｰ様の病変を示した理由は不明のままであった。

２．拡張型心筋症心筋標本を用いた検討

privacy の保護も有り、個別ﾃﾞｰﾀの公表を控えるが、平均年齢は DCM 群、ICM 群、myocarditis 群と対照群で、48.9±11.4、58.2±6.2、42.3±11.9、61.7±4.2 才と若年者に心筋炎後の移殖患者が多く、比較的高齢者の donor も多い点が注目された。移殖直前の LVEF は各群平均、17.0±5.0、11.7±4.7、23.3±11.7、60.0±3.3%と DCM 群と ICM 群は低下が目立った。LVD d は各群平均、71.5±9.3、68.2±10.0、64.5±14.0、45.0±6.0mm と DCM 群と ICM 群は拡大が顕著であり、LVEDP は各群平均、30.9±9.9、29.0±3.7、30.0±14.7、16.3±9.8mmHg と予想通りだったが、donor も脳死状態からの蘇生術施行後のためか、やや高めな場合が散見された。免疫組織染色の検討は 1 人から約 20 箇所について行ない、Dys の崩壊した心筋細胞では現在進行中であるが、Dys の崩壊像が不全心筋内にﾊﾟｯﾁ状に認められた。また、Western blotting による発現量の検討結果、心不全症例の全例に Dys の断裂と断片化が認められ、その像は必ずしも各 SG の発現量とは相関しなかった。一部の症例は Dys を全く発現せず、Duchenne、または Becker 型筋ｼﾞｽﾄﾛﾌｨｰとの合併を考えさせる興味深

い所見を得た。

３．霊長類を用いた心不全モデルの開発

A群では刺激開始後4週で心拍数、収縮期動脈圧(SAP)、左室内径短縮率(FS)の低下と左房の拡大が認められた。血液検査ではまた、血中BNP値は動物の個体差が大きかったが何れも4から5週目に上昇した。しかし中心静脈圧(CVP)は上昇せず、心不全としては軽度～中等度であった。病理組織学的検査では、左室自由壁と左心室壁に中等度から重度の線維化を認めた。線維化は心外膜よりも心内膜側で著明だった。また空胞変性も観察された。更に、ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの免疫染色とEBの蛍光二重染色の結果、ｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの崩壊像が左右両心室と乳頭筋(PM)に認められ、この細胞と一致して細胞質内にEBが観察された。一方、B群では2例が頻脈刺激開始後1週間で死亡し、2例が4週間まで頻脈刺激を行うことができた。刺激開始後1週で左右両心室(下図、右上、1-4週目)、左心房の拡張、SAP、FSの低下およびBNPの上昇が認められた。さらに1例では刺激開始後4週でCVPの上昇(16mmHg)、FSの著明な低下、BNP値の持続上昇、僧帽弁および肺動脈弁の逆流、肝静脈の拡張、剖検では胸水と腹水の貯留を認め、重症心不全病態を呈した。

３．筋芽細胞を用いた再生療法と遺伝子療法の併用による重症心不全治療の開発（担当：河田）

1. SkMbの移植

移植5週後にTO-2の心筋細胞にDiIの蛍光あるいはDAPIによる核の染色が認められ、それらの細胞および周囲の細胞にδ-SGの発現が認められた。非移植群TO-2心筋細胞にはδ-SGの発現は認められなかったことより、GHのSkMbがTO-2ハムスターの心筋に生着した事が示される。

GHの骨格筋細胞では約80%がfast-MHC、20%がslow-MHCであった。TO-2にSkMb移植後のδ-SGを発現している細胞にも、fast-MHC及びslow-MHCの発現が認められ、δ-SG発現細胞に対する割合で示すと、それぞれ66%及び23%であった。さらに一部の細胞の介在板にはconnexin 43も発現していた。

移植15週後では、δ-SGを発現している心筋細胞の数は5週後より少なくなっていたが、そのδ-SGを発現している細胞の80%に、slow-MHCが発現し、fast-MHCの発現はほとんど認められなかった。connexin 43も発現していた。拡張型心筋症ハムスターの心機能の改善は明確ではなかったが、不整脈は認められなかった

2. ADSCsの移植

マウス及びGHとも、心筋分化細胞を認めた。マウスより効率は悪いが、GHより得られたADSCs由来の心筋分化細胞を心不全が進展しているTO-2に移植し3週間後に収縮能を測定

したが、改善は認められなかった。免疫組織学的所見では、 DAPI による核の染色が 4 例中 3 例に認められ、DAPI 陽性細胞の 1 例にδ-SG の発現が認められた。

Ⅳ　考察

１．心不全増悪における免疫因子の関与の検討（担当：甲斐）

１．心筋炎モデルにおける樹状細胞の意義の解明

MHC で感作された骨髄由来樹状細胞により自己免疫性心筋炎に類似した組織所見を呈する心筋炎が惹起される事が明らかとなった事の意義は大きい。すなわち、心筋炎の機序の一端に免疫＝炎症反応のオン＝オフの制御をする樹状細胞が関与することが明らかとなり、今後、樹状細胞の活性化を標的とすることで、心筋炎や心不全に対する根本的治療法の開発が可能となるかもしれない。今後は、樹状細胞の活性化制御機序および樹状細胞による心臓における免疫・炎症系の活性化機序の解明が必要である。

２．慢性心不全急性増悪における樹状細胞の意義の解明

慢性心不全急性増悪期に樹状細胞が活性化され、そのため末梢血中から心臓あるいはその他の臓器にホーミングすることが示唆された。また、末梢血樹状細胞数回復が遅延する症例において、心不全治療への抵抗性、重症化が認められたことは、慢性心不全の重症化・遷延化に樹状細胞の関与する免疫・炎症が関わっていることを示唆するものできわめて興味深い。今後は、心不全の急性増悪時の樹状細胞感作物質の同定を中心に研究を展開したい。

２．重症心不全の遺伝子・再生医療の実用化（担当：豊岡）

不明だった calpain-2 の細胞生理的な意義を同定した点でこの成果は極めて大きい。今後、calpain-2 が fusion の際に分解するﾀﾝﾊﾟｸを同定することは筋細胞発生と一般的な細胞融合機構に直結する大きな問題提起と認識する。

２．拡張型心筋症心筋標本を用いた検討

末期重症心不全では他のモデル動物と同様に Dys と、その関連タンパクの崩壊が認められた。詳細は共同研究者らの了解が得られた段階で発表する予定である。また,上記研究とは別に心筋変性に関ると考えられる心筋細胞内の calpain-2 の発現を RNAi、shRNA およびその cDNA を用いて大きな生物学的意義を同定した。

３．霊長類を用いた心不全モデルの開発

ｶﾆｸｲｻﾞﾙにおいて頻脈刺激による軽～中等度の心不全病態、さらにﾋﾄの症例と同様(Kawada *et al.*, *BBA* review, 2005)にｼﾞｽﾄﾛﾌｨﾝの崩壊と細胞膜透過性の亢進が同一細胞で観察された。これはﾋﾄの病態を反映し、心不全の解析に有用なﾓﾃﾞﾙとなる。また刺激心拍数

を増加することにより重症心不全ﾓﾃﾞﾙの作成が可能となり、本ﾓﾃﾞﾙを活かして遺伝子治療、再生医療の比較(Tezuka *et al.*, *BBRC*, 2008)へと発展が期待される。

３．筋芽細胞を用いた再生療法と遺伝子療法の併用による重症心不全治療の開発（担当：河田）

SkMb は 15 週という長期にわたり心筋に生着し、connexin 43 と介在板を介して、TO-2 の心筋と融合していた。骨格筋は速筋だが、心筋は遅筋であり、今回の移植では slow-MHC の方が多く発現していた。slow-MHC を多く含む SkMb を広範囲に移植する事ができれば、拡張型心筋症による心筋変性が改善できる事が示唆された。ハムスターの ADSCs も心筋に分化し生着する事が示された。しかし、ハムスターの ADSCs から得られる心筋分化細胞の効率はマウスに比べ、1/10 程度であり、継代培養も不可能であった。より効率のよい培養条件の検討が重要課題である。両者とも、自己細胞を用いる方法であり、拒絶反応は回避できる。今後、効率のよい培養条件、広範囲な移植方法を開発し、臨床応用を目指したい。

Ⅴ　研究成果の発表

代表研究者

甲斐久史

書籍

1. 永田　剛、甲斐久史、今泉　勉：新目で見る循環器病シリーズ９　心不全−診断・治療・管理−　心臓カテーテル検査による血行動態の診断.（堀正二編）、メディカルビュー社、東京. 86-97, 2006.
2. 甲斐久史：ISH ハイライトーLate-Breaking Basic Session、pp130-132、メディカル・ジャーナル社、東京、2007.
3. 原田晴仁、甲斐久史：ONE POINT ADVICE 遺伝子診断を診療にどう活かすか. 新・心臓病診療プラクティス 10　心筋症を識る・診る・治す、磯部光章、松崎益徳編、文光堂、東京：37, 2007.
4. 甲斐久史：最新医学別冊　新しい治療と診断の ABC 53. 二次性高血圧−血管性・心臓性高血圧.（菊池健次郎編）、最新医学社、東京 pp.197-203.

雑誌

1. Tahara N, Kai H, Ishibashi M, Nakaura H, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T. Simvastatin attenuates plaque inflammation. -Evaluation by

fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48 (9):1825-1831.

2. Kai H, Mori T, Tokuda K, Takayama N, Tahara N, Takemiya K, Kudo H, Sugi Y, Fukui D, Yasukawa H, Kuwahara F, Imaizumi T. Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II- *Hypertens Res* 29 (9):711-718, 2006.
3. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Perivascular Inflammation and Hypertensive Cardiovascular Remodeling. *Curr Hypertens Rev* 2006;2 (4):263-269.
4. Tahara N, Kai H, Nakaura H, Mizoguchi M, Ishibashi M, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T. The Prevalence of inflammation in carotid atherosclerosis. -Analysis with fluorodeoxyglucose-positron emission tomography -. *Eur Heart J* 2007; 28 (18):2243-2248.
5. Kai H, Tahara N, Ishibashi M, Imaizumi T. *Reply to a letter to the Editor*. Simvastatin attenuates plaque inflammation. -Evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2007;49 (19):1991-1992.
6. Tahara N, Kai H, Yamagishi S, Mizoguchi M, Nakaura H, Ishibashi M, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T. Vascular inflammation evaluated by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is strongly associated with the metabolic syndrome . *J Am Coll Cardiol* 2007;49 (14):1533-1539.
7. Koga M, Kai H, Yasukawa H, Yamamoto T, Kato S, Kusaba K, Tahara N, Kai M, Egashira K, Kataoka T, Imaizumi T. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-g function blocking in ApoE-KO mice. *Circ Res* 2007 2007;101 (4): 348-356.
8. Kusaba K, Kai H, Koga M, Takayama N, Ikeda A, Yasukawa H, Seki Y, Egashira K, Imaizumi T. Inhibition of intrinsic interferon-g function prevents neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 2007;49 (4):909-915.
9. Koga M, Kai H, Yasukawa H, Kato S, Yamamoto T, Kawai Y, Kusaba K, Seki Y, Kai M, Egashira K, Kataoka T, Imaizumi T. Postnatal blocking of interferon-g function prevented atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res* 2007;30(3):259-267.

10. Kanahara M, Kai H, Toyomasu K, Yoshida T, Hiraki T, Sagawa K, Imaizumi T. Characteristic Features of QRST Integral Mapping in Patients with High-Risk Brugada Syndrome. *Circ J* 2007; 71 (1): 63-69
11. Mizuta Y, Kai H, Mizoguchi M, Osada K, Tahara N, Nakaura H, Kuwahara F, Imaizumi T. Long-term treatment with valsartan improved cyclic variation of the myocardial integral backscatter signal and diastolic dysfunction in hypertensive patients -The echorcardiographic assessment- *Hypertens Res* 2008; 31(10):1843-1849..
12. Takeshita Y, Katuski Y, Katsuda Y, Kai H, Saito Y, Arima K, Sasaki K-I, Imaizumi T. Vitamin C reversed the malfunction of peripheral blood-derived mononuclear cells in chronic smokers through the anti-oxidative property. *Circ J* 72(4):654-659, 2008.
13. Kanahara M, Kai H, Okamura T, Wada T, Suda K, Imaizumi T, Sagawa K. Usefulness of high concentration calcium chloride solution for correction of activated partial thromboplastin time (APTT) in patients with high hematocrit value. *Thromb Res* 2008;121 (6):781-785.
14. Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, MD, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T. Mutant MCP-1 Therapy Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Malignant Melanoma in Mice. *Biochem Biophys Res Comm* 2008;365 (2):279-284.
15. Kudo H, Kai H, Koga M, Takayama N, Mori T, Ikeda A, Yasuoka S, Kajimoto H, Mifune H, Kato S, Hirooka H, Imaizumi T. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II-mediated chronic inflammation. *Hypertension* (*under revision*).
16. Takemiya K, Kai H, Yasukawa H, Tahara N, Kato S, Imaizumi T. Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension in rats. *Basic Res Cardiol* (*under revision*).
17. Kai H. Novel noninvasive approach for visualizing inflamed atherosclerotic plaques using fluorodeoxygucose-positron emission tomography *Geriatr Genentol Intern* *(under review)*.
18. Takayama N, Kai H, Kudo H, Kajimoto H, Yasuoka S, Mori T, Anegawa T, Ikeda A, Imaizumi T. Rho A- and Ras-ERK-mediated pathways play a role in aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats with exaggerated blood pressure

variability. *Hypertension* (*in submission*)

19. Mori T, Kai H, Koga M, Ikeda A, Fukui D, Yasukawa H, Kai M, Imaizumi T. Estrogen withdrawal prolonged vascular inflammation and oxidative stress and aggravated diastolic function in pressure-overloaded female rats. *Hypertension* (*in submission*).
20. Sugi Y, Yasukawa H, Kai H, Fukui D, Futamata N, Koga M, Imaizumi T. Mobilization and activation of peripheral blood dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol* (*under revision*).

分担研究者

豊岡照彦

1. Miyata S, Takemura G, Kawase Y, Li Y, Okada H, Maruyama R, Ushikoshi H, Esaki M, Kanamori H, Li L, Misao Y, Tezuka A, Toyo-oka T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Autophagic cardiomyocyte death in cardiomyopathic hamsters and its prevention by granulocyte colony-stimulating factor. *Am.J.Pathol.* 168:386-97, 2006.
2. Yamazaki T, Suzuki J, Shimamoto R, Tsuji T, Ohmoto Y, Toyo-oka T, Omata M, Ohtomo K, Nagai R. Focalized contractile impairment at hypertrophied myocardium proven in consideration of wall stress in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. Heart J.* 47:247-58, 2006.
3. Toyo-oka T. and Kumagai H. Cardiac troponin levels as a preferable biomarker of myocardial cell degradation, in *"Regulatory mechanisms of striated muscle contraction"*, Eds. Ebashi S. and Ohtsuki I. Springer (Berlin) pp-241-249, 2006.
4. 豊岡 照彦. 駆出率が保持されている心不全と低下した心不全。毎日メデイカルジャーナル 1090-1093, 2006.
5. 豊岡 照彦、増井藤子。心筋細胞のジストロフィンと、その関連蛋白-その崩壊による心不全の重症化機構と治療戦略-日本臨床 65:132-9, 2007.
6. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, Masui F, Konno S, Nitta S, Toyo-oka T: Which skeletal myoblasts and how to be transplanted cardiac repair? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 270-276, 2008.
7. Honda M, Masui F. Kanzawa N. Tsuchiya T. Toyo-oka T. Specific knockdown of calpain-2 blocks muscle cell development without commitment of calpain-1. (In submission).

河田登美枝

1. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, Masui F, Konno S, Nitta S, Toyo-oka T: Which skeletal myoblasts and how to be transplanted cardiac repair? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 270-276, 2008.
2. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, Masui F, Konno S, Nitta S, Toyo-oka T. Preferential expression of connexin43 on naturally selected slow-muscle fibers after skeletal myoblast transplantation to the heart with dilated cardiomyopathy (*in submission*).