

冠循環の病態生理解明に対する
知識統合型(フィジオーム)アプローチ

《研究の概要》

虚血性心疾患の病態解明、治療に関して、基礎から臨床までの多くの研究がなされている。これらの研究成果を真に臨床に役立てていくためには、個々の成果を有機的に統合することが非常に重要である。本研究では、(1)冠循環とスーパーオキシド、(2)統合型冠循環シミュレータの開発、(3)冠循環の超音波計測、(4)インスリン抵抗性と冠循環、(5)冠循環における NO の計測といったテーマについて、分子レベル(生理活性物質)からシミュレーション、臨床診断までの幅広い研究者の協力の下、各研究成果の統合により、冠疾患の病態解明を目的とした。

(1)冠循環とスーパーオキシド：循環器系疾患における酸化ストレス計測を目指し、アフィニティペプチドを利用した新規スーパーオキシドセンサの開発を進めた。また、動脈硬化の予防として有効とされる継続的な運動負荷が、動脈硬化のリスクファクターへ与える影響について評価した。(2)統合型冠循環シミュレータの開発：マルチスケール心臓シミュレーションモデルを応用した冠循環のシミュレーションにより、心臓の壁の中での血流動態を含む冠循環全体の動態を再現することに成功した。また、新規に開発した微小循環の観察法による小血管とその中を流れる血球成分の動きの観察、さらに心筋細胞の血管に及ぼす影響についても検討を行った。(3)冠循環の超音波計測：小型探触子をもちいて経胸壁アプローチにより冠動脈血流を直接評価する新手法を開発した。また Tissue tracking 法と Tissue Doppler Imaging 法という新しい超音波テクノロジーを使用した局所拡張能異常検出による冠動脈血流評価法を確立した。さらに大動脈弁狭窄症が冠血流の予備能の低下により狭心症をおこすこと、日本人における大動脈弁狭窄症(AS)の進行促進因子が高血圧、糖尿病、肥満であることを明らかにした。(4)インスリン抵抗性と冠循環：冠動脈疾患の病因に重要と考えられている線溶系抑制因子 PAI-1 と、そのレギュレータとしてのフォークヘッド転写因子 Foxc2 の役割を分子生物および細胞生物学的に明らかにすることを目的とした。マウス内皮細胞および脂肪細胞と、トランスフェクションによる遺伝子過剰発現系において、Foxc2 は PAI-1 の分泌に直接関わることを *in vitro* および *in vivo* で示し、個体レベルでの検討準備が進んだ。(5)冠循環における NO の計測：カテーテル型 NO センサの基本評価及び応用性を検討した。高酸化ストレスの実験動物モデルにおける NO の bioavailability の低下、コントロールモデルにおけるニトログリセリン由来の NO の評価、および NTG の耐性発現とその機序の一部が評価でき、血管機能および NO 関連薬剤の有効性などの定量的 *in vivo* 評価法としての有用性を認めた。また、微小循環における NO 産生能や生理的作用への電磁界の影響を検討するためのコントロール実験モデルを確立し、定量的な評価が可能なシステムを構築した。

望月 精一	川崎医療福祉大学 臨床工学教授	冠循環における NO の計測
辻岡 克彦	川崎医科大学 生理学教授	冠循環とスーパーオキシド (平成 18, 19 年度)
遠藤 恒介	川崎医科大学 生理学助教	冠循環とスーパーオキシド (平成 20 年度)
杉浦 清了	東京大学大学院 新領域創成科学研究科教授	統合型冠循環シミュレータの開発
増山 理	兵庫医科大学 循環器内科准教授	冠循環の超音波計測 (平成 18 年度)
辻野 健	兵庫医科大学 循環器内科准教授	冠循環の超音波計測 (平成 19, 20 年度)
藤田 英雄	東京大学 医学部助教	インスリン抵抗性と冠循環

研究報告

I 研究目的

虚血性心疾患の病態解明、治療に関して、基礎から臨床までの多くの研究がなされている。本研究では、分子レベル(生理活性物質)からシミュレーション、臨床診断までの様々な研究成果を統合したフィジオームアプローチによる冠疾患の病態解明を目的とした。

(1)冠循環とスーパーオキシド

循環器系の病態生理学において、スーパーオキシドに代表されるバイオリディカルの活性、生成量の *in vivo* 計測の重要性が高まりつつある。そこで、これまでに開発した SOD 固定化スーパーオキシドセンサを基に、*in vivo* 計測用スーパーオキシドセンサの開発を目指す。また、心臓、腎臓、肝臓、大動脈等の臓器におけるスーパーオキシドと NO の産生量や動脈硬化のリスクファクターが、継続的な運動によりどのような影響を受けるかを明らかにする。

(2)統合型冠循環シミュレータの開発

冠循環の動態を明らかにすることは我が国における大きな健康問題である虚血性心疾患などを解決するために重要であるが臨床研究はもちろん実験的アプローチにも限界があり未だ明らかでない部分が多い。特に微小循環レベルにおける血流の動態解明は病態解明に重要であるが、心臓の壁の中を走行する血管を観察することが技術的に困難であること、また心筋の収縮の影響を大きく受けることなどの理由により研究の進展が阻まれてきた。近年開発されたレーザードップラー流速計、顕微鏡観察装置などは拍動する心臓の中の血流観察を飛躍的に進歩させたが計測の自由度などに課題は残されている。本研究の目的はマルチスケール心臓シミュレーションを応用して冠循環の動態を再現すること、特に心臓の収縮弛緩と微小循環の相互作用を検討することである。ただ

シミュレーションはあくまでも実験研究と補完して問題の解決に役立てるものであり、そのために既往の研究報告に加え自らも微小循環の観察を行うための実験系開発を行うこと、微小循環レベルに影響する心筋細胞の特性を明らかにすることを第二の目的とする。

(3) 冠循環の超音波計測

新規の冠循環評価法の確立を目指し、従来よりも小型の探触子を使用して経胸壁アプローチにより冠動脈の壁構造を描出する直接評価法および新しい超音波テクノロジーを使用した局所拡張能異常検出による冠動脈血流評価法を開発する。これにより、血流がきわめて少ない場合の冠動脈血流の評価、心外膜側に先行して心内膜側より起こる心筋虚血、収縮能異常に先行、遷延する局所拡張能異常の評価を目指す。また、大動脈弁狭窄症(AS)において、冠動脈の狭窄病変がないにもかかわらず、狭心症状を有する場合について、冠動脈の予備能と症状の出現との関連性を明らかにするとともに、ASの進行因子とその機序について心エコーを用いた検討と弁置換術によって得られた大動脈弁における病理学的な検討の2つの面から検討する。

(4) インスリン抵抗性と冠循環

糖尿病およびインスリン抵抗性は虚血性心疾患の危険因子として非常に重要であるにもかかわらず、インスリンが及ぼす冠循環への影響は十分解明されていない。特に、慢性高インスリン血症が内皮機能を修飾し、冠循環に与える病態生理学的についての検討はほとんど行われていない。血管内皮細胞からの線溶系抑制因子 PAI-1 の分泌程度は虚血性心疾患の発症に深く関わることで近年示されてきた。さらにこの発現調節にいくらかの核内転写因子が直接転写調節に関わり、炎症およびインスリンシグナルを仲介するフォークヘッド転写因子が同定されそのメカニズムが明らかになりつつあり、この知見を *in vivo* にて再検証することを目的とした。

(5) 冠循環における NO の計測

循環器系疾患において注目されている血管内皮機能障害について、その定量的評価方法が必要とされる。我々は血管内皮由来 NO 産生能に注目し、カテーテル型 NO センサを世界に先駆けて開発し、実験動物においてその有用性を確認している。本研究では、それを発展させて、ヒトへの応用を可能とするためのデザインの変更、それに伴う性能および安全性の評価を目的とし、滅菌法の検討、強度試験を中心とした耐久性試験と安全性試験を行ない、合わせて動物実験で適用性の検討を行なう。また、本センサの循環動態の定量的評価方法としての応用性を検討するため、予備実験を進めてきた中間周波電磁界を対象とする。電磁界については、高周波領域の熱的作用、低周波領域の発ガン性、あるいは医療機器の誤作動などについての報告はあるが、中間周波領域の研究はほとんどなされていないのが現状である。中間周波電磁界は、最近普及の進んでいる電磁調理器など多くの家電品からも発生することから、非常に注目されているが、これまで科学的根拠のあるデータに基づく議論がほとんどない。本研究により、中間周波電磁界の循環系への影響と NO と酸化ストレスなどが関与するメカニズムが明らかにされると期待される。

II 研究計画及び材料と方法

(1) 冠循環とスーパーオキシド

スーパーオキシドセンサの改良：電極表面へアフィニティペプチドを導入し、そのペプチド導入表面へ SOD を固定化する手法を試みた。アフィニティペプチドは、Au に対しては、MHGKTQATSGTIQS、LGQSGQSLQ- GSEKLTNG、EKLVRGMEGASLHPA を、Pt に対しては、DRTSTWR、QSVTSTK、SSSHLNK(アルファベットはアミノ酸 1 文字表記)をそれぞれ使用した。電極表面にアフィニティペプチドを吸着させた後、アフィニティペプチド固定化電極へ SOD を固定化し、電極を作製した。SOD 固定化が完了した段階でそれぞれ CV(0 ~ +0.5 V vs. Ag/AgCl SCE, 50 mV/s, 10 cycle)を行い、固定化操作の確認およびスーパーオキシドへの反応性を確認した。

継続的な運動による酸化ストレスの変化：水泳運動を負荷したラットをモデルとして用いた。1 日 60 分、週 5 日の水泳を、8 週間負荷し、実施期間中 1 週おきに体重を測定し、2 週おきに血圧測定・血液採取し、血清中の総コレステロール量、HDL 量、トリグリセライド量、総タンパク量を調べた。実験プロトコルの最後に心臓、腎臓、肝臓を摘出・破碎後、超遠心上清をサンプル溶液とし、NO_x 量を酸化窒素分析システム (EICOM) にて測定した。Superoxide 量は MPEC(ATTO)を用いた化学発光法にて測定した。SOD 活性は SOD Assay Kit - WST (DOJINDO)、タンパク定量は Protein Assay Rapid Kit (wako) を用いてそれぞれ測定した。

(2) 統合型冠循環シミュレータの開発

シミュレーション：当研究室で開発中のマルチスケールマルチフィジックス心臓シミュレータに冠循環モデルを組み込むことにより心臓の収縮と冠循環の相互作用を検討する。心臓シミュレータは実際の心臓の CT データに基づく有限要素法モデルであり構造を形成する約 67 万要素のそれぞれに心筋の興奮-収縮連関の分子機構を表す数学モデルが組み込まれており仮想心筋細胞として機能する。洞房結節に始まった興奮は隣接する細胞に伝播し心臓の各部を順次収縮させ血液を駆出する様子が再現される。ここに同様に CT データから再現した心臓表面を走行する冠動脈および静脈をモデル化した。小血管については Kassab(Am J Physiol 194)らによるデータに基づき細小動静脈レベルまで構成し微小循環については二層理論と呼ばれる数学的手法を用いてモデル化した。これにより心筋の収縮による血管への影響を解析することができる。

微小循環の観察：微小循環の観察のためには共焦点顕微鏡を用いた。マウスの心臓を摘出し心外膜側または心内膜側を顕微鏡ステージに置いて観察した。血管の描出のためには FITC デキストランを心臓摘出前に尾静脈から注入した。さらに骨格筋、脂肪組織など収縮による運動がない組織においてはさらに観察の倍率を上げ、特異的な染色を加えることにより白血球、血小板などを観察することができる。

筋収縮の影響の観察：心筋の収縮は組織圧を上げることによって微小血管を圧迫すると考えられている。ここで主に血管と並走する心筋細胞がその短軸方向に力を発生して血管を圧迫しているのではないかとの仮説を検証するため、心筋細胞の中で力を発生する機能を担う筋原線維がその長軸に直交する方向に力を発生するかどうかを原子間力顕微鏡で測定した。

(3) 冠循環の超音波計測

小型探触子を使用した冠動脈血流の直接評価法：連続 300 例において冠動脈（左冠動脈前下行枝）の描出率を検討した。また、虚血性心疾患が疑われた 15 例を対象に心臓カテーテル検査施行時に血管内超音波法（IVUS）による血管径と経胸壁冠動脈エコー法による血管径を同時に測定し比較した。緊急心臓カテーテル検査を施行した前壁領域の急性冠症候群連続 53 例においてカテーテル法による TIMI 分類を経胸壁冠動脈エコーにより予測しえるか否か検討した

新しい超音波テクノロジーを使用した局所拡張能異常検出による冠動脈血流評価法：虚血性心疾患が疑われた患者にトレッドミル運動負荷前および負荷後 5 分に心エコー検査を行った。超音波心臓診断装置（ALOKA, SSD6500）を用い左室壁の各領域における心内膜側 2D tissue tracking circumferential strain を解析した（Tissue tracking 法）。また別の超音波心臓診断装置（TOSHIBA Aplio 770A）を用い拡張早期の peak strain rate を計測した（TDI 法）。冠動脈造影にて 75%以上の狭窄を有意とした。

A S の冠動脈の予備能：A S 16 例（A 群：狭心症あり 8 例、B 群：狭心症なし 8 例）において ATP を負荷しパルスドプラ法により負荷前後の冠動脈血流速度波形を計測し、血流速度増大の程度により冠予備能を求めた。症状の有無と大動脈弁圧較差、冠予備能の関係求めた。

A S 進行の機序：臨床的検討として、兵庫医科大学超音波センターにて心エコー検査を受けた患者のうち、自然弁の A S 患者で、6 ヶ月以上前にも心エコー検査を受けている患者において、大動脈弁口部ピーク血流速度の年次変化（ ΔPV : m/sec/yr）を算出し、A S の進行を促進/抑制する因子を検討した。また、病理学的検討として、大動脈弁置換術の際に摘出された A S の大動脈弁を組織学的に検討した。

(4) インスリン抵抗性と冠循環

FoxC2 の細胞発現レベルと修飾因子の検討：転写因子マウス Foxc2 およびヒト FOXC2 の器官特異的発現を mRNA レベルについて Northern blot により確認実験を行った。Western blot では、マウス、ヒトについて共通抗原認識性を持つ抗ヒト FOXC2 抗体を用い、マウスおよびヒト組織から抽出された lysate を用いて行った。

Foxc2 過剰発現および dominant negative による Gain of function, および Loss of function の確認：培養マウス胎児内皮細胞 (MEEC) を用い、FOXC2 発現ベクターをトランスフェクトさせ、マウス PAI-1 レベルを RT-PCR により半定量的検出を行った。さらに、培養マウス胎児内皮細胞 (MEEC) および、マウス前脂肪細胞 3T3-L1 の系を用い、Foxc2 の DNA binding site に対する dominant negative 蛋白発現ベクターをトランスフェクトしマウス PAI-1 レベルを RT-PCR により半定量的検出を行った。

マウス冠動脈内皮細胞 (Mouse coronary artery cell; MCAEC) 培養系の確立と PAI-1 の発現調節の役割：分離培養が比較的困難な培養系を確立するとともに、Foxc2-PAI-1 の発現調節を再現した。さらに、インスリン添加による PAI-1 発現調節変化を検証した。

(5) 冠循環における NO の計測

冠動脈内に挿入・留置可能にするため、プロトタイプのカテーテル型 NO センサの先端感知部のデザインを変更し、臨床応用のため、引っ張り強度などの力学的耐久性試験、

滅菌方法の検討を行った。また、生物学的な安全性の確認として、細胞毒性の有無の検討など安全性試験を行なった。その結果を踏まえて、動物実験による長時間留置などの条件下における安全性試験を行なった。さらに、糖尿病など血管内皮機能障害が見られる患者の血中 NO 動態を本センサを用いて評価した。

カテーテル型 NO センサの実用性評価として、ヘルムホルツコイルによって発生させた中間周波数電磁界（周波数帯：20 kHz～60 kHz、磁界強度：1～20 μ T）への曝露による評価した。摘出微小血管を圧灌流しながら、径変化自動トレースシステム（既存）で計測し、血管機能として NO および活性酸素種の一つスーパーオキシドを計測した。ヒトへの影響については、上記コイルによって発生した電磁界がヒト指尖末梢循環に与える影響を脈波解析による解析結果に基づいて評価し、その際に血中 NO 濃度と酸化ストレスマーカーの計測を行った。

III 研究成果

(1) 冠循環とスーパーオキシド

スーパーオキシドセンサの改良：数種類のアフィニティペプチドについて検討した結果、Pt への吸着特性を持つ SSSLNK（アルファベットはアミノ酸 1 文字表記）において、サイクリックボルタンメトリーの波形の比較により、SOD 固定化による変化が認められ、印加電位 + 0.5 V では、スーパーオキシドに対する応答性が得られた。

継続的な運動による酸化ストレスの変化：運動により、体重、血中コレステロールなど、いくつかの動脈硬化リスク項目は減少傾向を示した。運動負荷期間 8 週のラットにおいて、肝臓の superoxide 活性が著しく上昇した。SOD については、早期の活性上昇は認められたが、慢性的な運動負荷により活性の増加は認められなくなった。

(2) 統合型冠循環シミュレータの開発

シミュレーション：冠動脈血流が拡張期優位であること、逆に冠静脈血流は収縮期優位であること、収縮初期に冠動脈血流に逆流が認められること（スロッシュ現象）などの冠循環の特徴を再現することに成功した。微小循環レベルにおいても細動静脈、毛細管各々のレベルで実験的に報告されている血流動態と一致する結果を得た。また冠動脈の一部に狭窄を作成しその際に見られる拡張期に特徴的な血流の低下には心筋収縮が大きく関与しているという結果も得ている。

微小循環の観察：FITC デキストランの使用により標本を固定せず、生きたままで観察することができた。脂肪細胞における高倍率での観察においては、血小板などの血球成分の運動を観察することができた。白血球が血管壁をローリングする様子も記録された。

筋収縮の影響の観察：原子間力顕微鏡によって一本の筋原線維を Z, A, I 帯まで区別して観察することが可能であった。また緩衝液のカルシウム濃度を上げることによって筋収縮を再現したとこと押し込み固さの上昇を認めた。

(3) 冠循環の超音波計測

小型探触子を使用した冠動脈血流の直接評価法：前下行枝の血管壁が 227 例（77%）の症例において良好に描出された。また、血管内超音波法（IVUS）との血管径の比較で

は、IVUS の径 $=0.93 \times (\text{経胸壁冠動脈エコーの径}) + 0.17$ $R=0.9$ $P<0.01$ と良好な相関がみられた。急性冠症候群における TIMI 分類法の検討では、エコー上 flow(-) 例は全例 TIMI 分類 0 もしくは 1 であった。エコー上 low(+) 例においては全例 TIMI 2 以上であった。

新しい超音波テクノロジーを使用した局所拡張能異常検出による冠動脈血流評価法：Tissue tracking 法と TDI 法のどちらの手法でも心筋虚血領域で負荷後有意な拡張能の低下を検出することができた。簡便さでは Tissue tracking 法が勝り、検出感度では TDI 法が優れていた。正常領域では負荷後に有意な変化は認めなかった。

A S の冠動脈の予備能：ATP 負荷による冠動脈予備能は症状のある A 群において有意に低値であった。A 群において弁口面積は低値、圧較差は高値であり、A S の重症度が高くなるに伴い、冠動脈の動脈硬化病変がなくとも冠予備能が低下し、狭心症状が起こるものと考えられた。

A S 進行の機序：臨床的検討では、軽症 A S 患者を $\Delta P V$ の中央値にて $\Delta P V$ 高値群と $\Delta P V$ 低値群を比較すると、 $\Delta P V$ 高値群は収縮期血圧の高値、糖尿病の存在、肥満、ACE 阻害薬の不使用と関連していた。病理学的検討では、手術で摘出された狭窄した大動脈弁において炎症性サイトカインである IL-18 とその受容体が発現していた。

(4) インスリン抵抗性と冠循環

FoxC2 の細胞発現レベルと修飾因子の検討：成体マウスにおいて Foxc2 の mRNA は脂肪組織、心臓、腎臓、脳、肺にそれぞれ発現を認めた。ヒトにおいては心臓、腎臓、肺、骨格筋、脂肪組織に発現を認めた。Western Blot においてはマウスで脂肪、肺、心臓、腎臓のほか、膵臓にも発現を認めた。ヒトにおいては肺、心臓、腎臓、膵臓に発現を認めた。

Foxc2 過剰発現および dominant negative による Gain of function, および Loss of function の確認：Foxc2 発現ベクターがトランスフェクトされた MEEC では Foxc2 の mRNA 過剰発現がみられ、かつ PAI-1 の発現レベルも上昇していた。Foxc2 の DNA binding site に対する dominant negative 蛋白が過剰発現された 3T3-L1 および MEEC では、PAI-1 発現レベルは低下していたことが示された。以上の結果から FoxC2 はマウスおよびヒトにおいて実際に臓器特異性に発現しており、PAI-1 の発現調節に関わっていることがそれぞれ in vivo および in vitro で示された。

マウス冠動脈内皮細胞(Mouse coronary artery cell; MCAEC)培養系の確立と PAI-1 の発現調節の役割：培養 MCAEC 系においてはトランスフェクト効率が低いことが判明した。Foxc2 発現ベクターによる蛋白過剰発現系が明らかには再現できなかった。

(5) 冠循環における NO の計測

In vivo 計測に際して必要な滅菌法の検討を行った。滅菌処理によるセンサの性能、特に NO 検出感度と応答速度への影響の有無を検討したところ、電子線滅菌が適用可能であることがわかった。次に、ウサギの大動脈中にカテーテル型 NO センサを留置して、血中 NO 濃度を計測した。アンギオテンシン II 投与により、酸化ストレスの亢進と相まって大動脈血中 NO の bioavailability が減少することを明らかにした。

冠循環における NO 関連薬剤の有効性の評価方法(有効 NO 濃度の測定)としての本方

法の適用性の検討を行った。代表的な硝酸薬（狭心症薬）であるニトログリセリン（NTG）を実験動物（ウサギ）に長期（7日間）投与し、アセチルコリン投与によって血管内皮由来 NO 産生を刺激したところ、NTG 投与後では NO 産生が減弱しており、その原因として活性酸素種の一つであるスーパーオキシドの産生増加が関与していることが明らかとなった。そこで、抗酸化作用のある薬剤を同時に投与したところ、NO 産生がある程度回復されることが明らかとなった。以上の通り、本法が *in vivo* での NO 産生変動の定量的な評価方法となり得ることが認められた。

自作したアンプを用いて、ヘルムホルツコイル（MH-6、LakeShore 社）に中間周波数電磁界（周波数帯：20 kHz～60 kHz、磁界強度：1～20 μ T）への曝露による評価を行った。摘出微小血管（ラットの腸間膜細動脈）を圧灌流しながら、径変化自動トレースシステム（既存）で計測した。携帯型家庭用 IH ヒーターから発生するレベルの中間周波数電磁界（約 10 μ T）に曝露された場合は、1%未満の血管径収縮が認められたものの、有意な変化ではなかった。

IV 考察

(1) 冠循環とスーパーオキシド

スーパーオキシドセンサの改良：全てのアフィニティペプチドにおいて、SOD 吸着操作前後での CV 波形に変化が認められたが、SSSHLNK を除き、スーパーオキシドに対する応答性は認められなかった。SSSHLNK では、スーパーオキシドに対する応答性が確認されたが、既存のセンサとは異なる挙動を示した。これは、SOD 固定化量が少なく、今回使用した系ではスーパーオキシドの生成量が検出限界を超えているか、もしくは従来法とは異なる反応機構をもつ可能性が示唆された。

継続的な運動による酸化ストレスの変化：運動負荷期間 8 週のラットにおいて、肝臓のスーパーオキシド活性が著しく上昇した際、血中では NO の増加が認められており、それにより血圧の上昇が抑制されていると考えられる。また、SOD 活性は運動負荷期間により変化しており、継続的な運動が、酸化ストレスおよび対応するレドックス機能に対してダイナミックな影響を与えることが示唆された。

(2) 統合型冠循環シミュレータの開発

マルチスケール心臓シミュレータを応用し冠循環のシミュレーションに成功した。これはこれまでで最も包括的なシミュレーションであり大血管から毛細管までの血行動態を実験研究の限界を超えて明らかに示したものである。今後さまざまな病態モデルを作成することによって心臓病の解決に大きく貢献できるものとする。モデルの検証および精密化を目指し微小循環の観察系を開発した。ここでも共焦点顕微鏡の応用によって生きたままの循環の観察を可能とした。ただし血球の動きまでを含めた高倍率の観察は現状では動きのない組織でのみ可能であり心臓には応用できない。今後の改良が必要である。心筋側の観察においても筋原線維において血管に対面する軸に直交する方向での固さの変化を記録したがこれを実際の組織での現象に外挿するにはさらなる実験検討が必須である。しかし虚血性心疾患を中心にした冠循環が関わる病態の解明にはこうしたモデル化と実験を組み合わせたアプローチが有用であると思われ今後更なる手

法の改良が望まれる。

(3) 冠循環の超音波計測

小型探触子を使用した冠動脈血流の直接評価法: 小型探触子を用いて経胸壁から冠動脈(左冠動脈前下行枝)の血管壁を描出することは高率に可能であり、その血管径などの計測値は心臓カテーテル検査で得られる計測値と良好な相関が認められることが明らかとなった。

新しい超音波テクノロジーを使用した局所拡張能異常検出による冠動脈血流評価法: Tissue tracking 法と TDI 法のどちらも冠動脈血流の評価に有用であることが示された。

A S の冠動脈の予備能: これまで A S において狭心症が起きる機序として、冠予備能が低下することが原因となっていることが明らかになった。

A S 進行の機序: 臨床的検討からは高血圧、糖尿病、肥満などの動脈硬化の危険因子を厳密にコントロールすることが A S の進行阻止に有用であると考えられた。病理学的検討からは炎症性サイトカイン IL-18 が A S の進行に関与すると考えられた。

(4) インスリン抵抗性と冠循環

内皮細胞および脂肪細胞の PAI-1 発現メカニズムについてその上流の転写因子が明らかになってきているが、本研究では Foxc2 の役割を明確にすることができたと考えられる。Foxc2 はインスリン抵抗性において FOXO1 と競合するように遺伝子調節をしている分子機構も明らかにされつつあり、転写調節ネットワークの一員として今後もその解明が待たれている。なお、本研究は当初最終的に糖尿病モデルラットでの個体レベルの検証を目標としていたが、in vitro の検証にリソースが費やされたため、次の課題としていく方針である。

(5) 冠循環における NO の計測

基礎的特性の検討を経て、動物実験による結果から、本システムによる NO が関係した血管機能変化の定量的評価方法としての性能が確認された。さらに酸化ストレスとのバランスの変化も含めた定量的評価の可能性が示唆され、血管内皮機能障害などの病態の解明、治療法の評価や開発などへの応用も期待される。従来、flow-mediated dilatation (FMD) などによる血管内皮機能評価が行われてきたが、これは NO 以外の因子の影響も含まれる可能性があり、本システムにより初めて in vivo での NO による血管機能の定量的機能が可能となると考えられる。

中間周波数電磁界については、循環動態を含めて生体への影響を検討された例がほとんどなく、ここで開発したシステムにより、循環動態への影響の有無も含めた研究が可能になると考えられ、NO など血管作動物質との関連性についても解明できるものと期待される。

V 研究成果の発表

- 1) Nishimura S, Nagai S, Katoh M, Yamashita H, Saeki Y, Okada J-I, Hisada T, Nagai R, Sugiura S Microtubules modulate the stiffness of cardiomyocytes against shear stress *Circ Res* 98:81-87 (2006)
- 2) Nishimura S, Kawai Y, Nakajima T, Hosoya Y, Fujita H, Katoh M, Yamashita H,

- Nagai R, Sugiura S Membrane potential of rat ventricular myocytes responds to axial stretch in phase, amplitude and speed dependent manners *Cardiovasc Res* 72:403-411 (2006)
- 3) Sugiura S, Nishimura S, Yasuda SI, Hosoya Y, Katoh K, Carbon fiber technique for the investigation of single cell mechanics in intact cardiac myocytes *Nature Protocols* 3:1453-1457 (2006)
 - 4) Imanishi T, Kobayshi K, Kuroi A, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T, "Effects of Angiotensin II on NO Bioavailability Evaluated Using a Catheter-Type NO Sensor," *Hypertension*, 48(6): 1058-1065. (2006)
 - 5) Nishimura S, Nishimura M, Hosoya Y, Fujita H, Katoh M, Yamashita H, Manabe I, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells and blood vessels *Diabetes* 56:1517-26, (2007)
 - 6) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S Adipose tissue remodeling and malfunctioning in obesity revealed by in vivo molecular imaging (Review) *Bioimaging* 15:9-15 (2007)
 - 7) Imanishi T, Kuroi A, Ikejima H, Mochizuki S, Goto M, Akasaka T., "Evaluation of pharmacological modulation of nitroglycerin-induced impairment of nitric oxide bioavailability by a catheter-type nitric oxide sensor." *Circ J.*, 71(9): 1473-1479. (2007)
 - 8) Kawasaki D, Kosugi K, Waki H, et al. Role of Activated Renin-Angiotensin System in Myocardial Fibrosis and Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Diabetic Patients Reversal by Chronic Angiotensin II Type 1A Receptor Blockade, *Circ J* 2007; 71: 524 - 529, (2007)
 - 9) Esumi A, Nakao S, Goda A, et al. Left Ventricular Geometrical Characterization in Patients With Diastolic Heart Failure, *J Echocardiogr* 5: 28-31, (2007)
 - 10) Nakao S, Goda A, Yuba M, et al. Characterization of left ventricular filling abnormalities and its relation to elevated plasma brain natriuretic peptide level in acute to chronic diastolic heart failure, *Circ J* 71: 1412-1417, (2007)
 - 11) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S In vivo imaging revealed local cell dynamics in obese adipose tissue inflammation *J Clin Invest* 118: 710-721 (2008)
 - 12) Nishimura S, Seo K, Hosoya Y, Nagasaki M, Yamashita H, Fujita H, Nagai N, Sugiura S Responses of single ventricular myocytes to dynamic axial stretching *Prog Biophys Mol Biol* 97: 282-297 (2008)
 - 13) Ohnuki Y, Nishimura S, Sugiura S, Saeki Y Phosphorylation Status of Regulatory Proteins and Functional Characteristics in Myocardium of Dilated Cardiomyopathy of Syrian Hamsters. *J Physiol Sci* 58:15-20. (2008)
 - 14) Watanabe H, Sugiura S, Hisada T The looped heart does not save energy by

- maintaining the momentum of blood flowing in the ventricle *Am J Physiol* 294: H2191-H2196 (2008)
- 15) Katayama S, Umetani N, Sugiura S, Hisada T, The sinus of Valsalva relieves abnormal stress on aortic valve leaflets by facilitating smooth closure *J Thorac Cardiovasc Surg* 136:1528-1535 (2008)
 - 16) Imanishi T, Kuroi A, Ikejima H, Kobayashi K, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T, “Effects of pioglitazone on nitric oxide bioavailability measured using a catheter-type nitric oxide sensor in angiotensin II-infusion rabbit,” *Hypertens Res.*, 31(1): 117-125. (2008)
 - 17) Kawasaki D, Tsujino T, Fujii K, Masutani M, et al, Novel use of ultrasound guidance for recanalization of iliac, femoral, and popliteal arteries. *Catheter Cardiovasc Interv.* 71:727-733, (2008)
 - 18) Oka K, Tsujino T, Nakao S. et al. Symptomatic ventricular tachyarrhythmia is associated with delayed gadolinium enhancement in cardiac magnetic resonance imaging and with elevated plasma brain natriuretic peptide level in hypertrophic cardiomyopathy, *J Cardiol* 52(2): 146-153, (2008)
 - 19) Matsumoto M, Tsujino T, et al. Anemia as a Factor That Elevates Plasma Brain Natriuretic Peptide Concentration in Apparently Healthy Subjects, *Int Heart J* 49(5): 577-586, (2008)
 - 20) Yoshida C, Nakao S, Goda A, et al. Value of assessment of left atrial volume and diameter in patients with heart failure but with normal left ventricular ejection fraction and mitral flow velocity pattern, *Eur J Echocardiogr* 10: 278-81, (2009)
 - 21) Naito Y, Tsujino T, Wakabayashi K, et al. Increased interleukin-18 expression in nonrheumatic aortic valve stenosis, *Int J Cardiol.* Feb 12. [Epub ahead of print], (2009)
 - 22) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity *Nat Med* in press (2009)

最後に本研究の遂行にあたり、研究助成頂いた（財）車両競技公益資金記念財団に深謝申し上げます。