

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：34449

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09272

研究課題名(和文) タコツボ型心筋症の発症機構の解明 心筋微量元素とストレス蛋白発現の関連

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of Takotsubo cardiomyopathy - the relationship between stress protein expression and trace elements in a cell culture model of Takotsubo cardiomyopathy

研究代表者

藤岡 重和 (Fujioka, Shigekazu)

大阪保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20319528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タコツボ型心筋症の発症機序は不明であるが、ストレスにより中枢神経から心臓交感神経に強い刺激が送られ、心臓に局限したカテコラミンの瞬間的な過剰放出が契機となるとされる。本研究では、カテコラミン投与ヒト培養心筋細胞において、質量分析法、世界最高性能を有する大型放射光施設(SPring-8) X線蛍光分析装置等の利用により、ストレス蛋白発現ならびに微量元素動態の解明を進めた。その結果、カテコラミン投与により心筋細胞にストレス蛋白が過剰発現し、一部の必須微量元素動態が変化する事実を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タコツボ型心筋症は、精神的、身体的ストレスを契機に発症するが、検査、処置、手術などの医療行為、地震等の自然災害での発症例が多数報告されるようになった。急性期に心原性ショック、心室細動等の致死的不整脈を起こすことから、病因の解明と血液検査等による発症早期における診断マーカーの開発が急務である。今回の研究成果は、タコツボ型心筋症の病因解明と診断マーカー開発に繋がる成果であり、今後も研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：The onset mechanism of Takotsubo cardiomyopathy (Stress-induced cardiomyopathy) remains unknown. However, exaggerated sympathetic stimulation triggered by a stressful event appears to play an important role in Takotsubo cardiomyopathy, and cardiac function may be damaged by excessive catecholamine release in the myocardium. In this study, we investigated the expression of stress proteins and the kinetics of trace elements in human cultured myocardial cells treated with catecholamine using mass spectrometry and X-ray fluorescence spectrometer. We found that catecholamine administration induced the overexpression of some stress proteins and changes in the kinetics of several essential trace elements in cultured myocardial cells.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋症 ストレス 微量元素

## 1. 研究開始当初の背景

タコツボ型心筋症 (Stress-induced cardiomyopathy) は 1990 年代にわが国で疾患概念が確立され、世界に発信された心疾患である。精神的、及び身体的ストレスを契機に発症し、急性心筋梗塞に酷似した胸痛と心電図変化を呈する。心基部の過収縮と心尖部を中心とする広範な無収縮を認め、左室収縮異常の形態が蝸壺に似ていることから、この病名がつけられた。本症の発症機序は不明であるが、ストレスにより中枢神経から心臓交感神経に強い刺激が送られ心臓に局限したカテコラミンの過剰放出が契機となるとされる (N Engl J Med 352(6):539-548, 2005)。実際に、タコツボ型心筋症患者で、冠静脈、及び末梢血のノルエピネフリンおよびエピネフリン濃度が増加していることが報告されている。Paur らは、多量のエピネフリンが心尖部に多く分布する 2 アドレナリン受容体を刺激し、抑制性 G 蛋白へのシグナルスイッチを惹起し心尖部の無収縮を引き起こすと説明している (Circulation 126:697-706, 2012)。シグナルスイッチ現象は慢性的な受容体刺激は protein kinase A を介して抑制性シグナルに切り替わるという概念である。また、ラットの実験で、多量エピネフリン投与により心基部過収縮と心尖部収縮障害を伴う本症類似の病態が報告されている (Circulation 126:697-706, 2012)。本症の契機となるストレスはさまざまで、肉親の死亡、喧嘩などの情動ストレス、喘息発作、感染症、骨折・癌の疼痛などの身体的ストレスが誘因となる。最近では、検査、処置、手術などの医療行為、自然災害での発症例も多数報告されるようになり、急性期に心原性ショック、心破裂、心室細動等の致死的不整脈をきたして死亡することから、病因の解明と血液検査等による発症早期における診断マーカーの開発が急務である。

## 2. 研究の目的

ストレスにより中枢神経から心臓交感神経に強い刺激が送られ、心臓に局限したカテコラミンの瞬間的な過剰放出が契機となるとされるが、本症の発症機序は不明である。どのようなストレス応答が心筋細胞に生じ、いかなる機序でタコツボ型心筋症を発症するのか。本症類似の高度心機能低下をきたす拡張型心筋症患者心筋で、水銀、アンチモン等の有害元素の過剰蓄積が報告されている (J Am Coll Cardiol 33(6):1578-1583, 1999)。また、必須微量元素であるセレン欠乏により心不全を伴う心筋症が発症する地域があり (中国、克山病)、動物実験で心筋ウイルス感染により微量元素異常が報告されている (Biol Trace Elem Res. 76(2):149-160, 2000, Biometals. 13(4):361-367, 2000)。こうした事実から、我々は、カテコラミンによる細胞ストレス応答として、ストレス蛋白が過剰誘導され、細胞内微量元素動態が変化すると考えた。そして、局所的必須元素の分布異常、欠乏あるいは特定元素の過剰状態が心筋細胞傷害を誘発するとの仮説を考えた。この着想に基づいて、本研究では、カテコラミンにより誘導されるストレス蛋白を特定し、ストレス蛋白合成に伴う心筋微量元素動態を明らかにする。次に、その元素が関与すると予想される細胞内代謝、細胞内シグナル伝達機構や細胞応答に関する種々の酵素、サイトカイン、ホルモンを検索し、病因との関連を検討する。また、特定した心筋ストレス蛋白及び微量元素の高感度測定について、本症診断マーカーとしての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

当初研究計画では、本症モデル動物 (ラットの無動ストレスモデル、Circ J 66:712-713, 2002) 心筋において、蛍光免疫染色、質量分析法等によるストレス蛋白の発現解析と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) による微量元素の高感度定量分析を予定していた。しかし、モデル動物の作成が困難であり、研究期間を延長してヒト培養心筋細胞を用いた研究を開始した。カテコラミン投与ヒト培養心筋細胞において、質量分析法、X線蛍光分析装置等を用いて、ストレス蛋白の発現ならびに微量元素動態に関する研究を進めた。今回、高輝度光科学研究センターによる成果公開優先利用課題公募 (2019 年 B 期) に本研究課題が採択され、世界最高性能を有する大型放射光施設 (SPring-8) ナノビーム X 線蛍光分析装置 (理研播磨) の利用が可能となった。現在まで知られていない心筋細胞レベルでの生体微量元素分布、及びカテコラミン投与心筋細胞における微量元素動態が明らかになると期待される。

研究に用いた培養細胞は、ヒト心筋細胞 (PromoCell GmbH, Germany) で、成人心臓 (移植心臓) の心室より単離されており、心筋細胞増殖培地キット (PromoCell GmbH, Germany) を用いて培養した。心筋細胞増殖培地には低血清と最適化されたホルモン類と成長因子が補充されている。正常心筋細胞およびカテコラミン (ノルエピネフリン、エピネフリン) を投与した心筋細胞をパラホルムアルデヒド固定し、測定用試料とした。微量元素分析には、飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いた。そして、高質量分解能条件および高空間分解能条件で、心筋細胞内に存在する元素分析と分布イメージ画像を取得した。測定元素は、K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Se, I, Co, Cr, Mn, Mo, F, Si, As, Ni, V, Sn, Cd, Pb, Li, Al, Pb, B, Br, Sb, Hg, Pt の 30 元素。さらに詳細な心筋微量元素分布分析とカテコラミン投与による心筋微量元素動態解明のため、作成した試料を SPring-8 BL37XU ビームライン (理研播磨) に持ち込み、単一心筋細胞内に測定視野を設定し、ナノビーム X 線蛍光分析装置により蛍光 X 線分析を実施

した。また、蛍光免疫染色、質量分析法等を用いて、単一心筋細胞におけるストレス蛋白発現解析を実施した。

#### 4 . 研究成果

飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いて、K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu, Se, I, Co, Cr, Mn, Mo, F, Si, As, Ni, V, Sn, Cd, Pb, Li, Al, Pb, B, Br, Sb, Hg, Pt の 30 元素を測定し、心筋細胞内に存在する元素を同定した。次に、詳細な心筋微量元素分布分析とカテコラミン投与による心筋微量元素動態解明のため、大型放射光施設 (SPring-8) ナノビーム X 線蛍光分析装置を用いて蛍光 X 線分析を実施した。その結果、100nm の空間分解能、各測定点での露光時間 1.0 sec、silicon drift detector による分析で、鮮明な蛍光 X 線イメージングが得られた。一部の必須微量元素は核周囲に局在しており、細胞質周辺部に多く存在する微量元素も確認された。そして、カテコラミン投与により数種の微量元素分布に変化を認められた。また、ヒト培養心筋細胞を用いた研究で、カテコラミン投与によりストレス蛋白が過剰発現し、核周囲の細胞質に局在化する事実を見出した。現在、特定元素が関与すると予想される細胞内代謝、細胞内シグナル伝達機構や細胞応答に関する酵素、ホルモン等を検索し、病因との関連を検討中である。今回の研究成果は、タコツボ型心筋症の病因解明と発症早期の診断マーカー開発に繋がる成果であり、2020-2022 年度の科研費 (研究課題名: タコツボ型心筋症の発症機構の解明-心筋微量元素動態分析と超微形態学的研究) で研究を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hourai R, Ozawa H, Sohmiya K, Hirose Y, Katsumata T, Daimon M, Ishizaka N	4. 巻 60(3)
2. 論文標題 IgG4-Positive Plasmacytic Infiltration in Aortic Wall and Aortic Valve Surgical Samples and Its Relation to Preoperative Serum IgG4 Levels.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 688-694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.18-490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 宗宮 浩一, 寺崎 文生	4. 巻 77巻増刊号2
2. 論文標題 心臓サルコイドーシス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 302-309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terasaki F, Fujita S, Kanzaki Y, Hirose Y, Ishizaka N.	4. 巻 59
2. 論文標題 Spontaneous reduction in abnormal myocardial uptake of fluorine-18 fluorodeoxyglucose in a patient with cardiac sarcoidosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 647-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.17-315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe M, Yamamoto M, Hayasaki H, Nakamata E, Nagino K, Okamoto K, Yuri Y, Fujii Y, Yurugi Y, Shigemori K, Watanabe K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Measurement of plasma amyloid- precursor protein APP770 concentration in healthy young volunteers: Preliminary study of APP770 as a potential biomarker for Alzheimer's disease diagnosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Allied Health Sci.	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 和田晋一、萩森伸一、仲野春 樹、小河佳織、綾仁悠介、尾崎昭子、稲中優子、櫛原崇宏、河田 了、藤岡重和	4. 巻 38
2. 論文標題 正中法 Electroneurographyによる ENoGとCMAP潜時差との関係.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Facial Nerve Res Jpn.	6. 最初と最後の頁 48-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasaki F, Yoshinaga K	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 New guidelines for diagnosis of cardiac sarcoidosis in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Nucl Cardiol.	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17996/anc.17-00042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sohmiya K, Ishizaka N	4. 巻 56(18)
2. 論文標題 IgG4-related Coronary Periarthritis - In Search of an Optimal Diagnosis and Management Method.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2385-2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9017-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 和田晋一、萩森伸一、仲野春樹、櫛原崇宏、小河佳織、金沢敦子、野中隆三郎、河田了、藤岡重和	4. 巻 37
2. 論文標題 正中法ENoGの予後推定値と治癒期間の乖離性の検討 - 健側CMAP値による測定精度の検証 -	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Facial Nerve Res Jpn.	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasaki F, Ishizaka N	4. 巻 55(9)
2. 論文標題 Cardiac Sarcoidosis and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy -Potential Differential Diagnoses for Arrhythmogenic Ventricular Cardiomyopathy	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 1041-1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.55.6422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤岡重和、大中玄彦、和田晋一	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 たこつぼ型心筋症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 保健医療学雑誌	6. 最初と最後の頁 64-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 伊藤隆英, 寺崎文生, 石坂信和	4. 巻 64 (7)
2. 論文標題 サルコイドーシスや膠原病に伴う心筋症をどう診断するか	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 呼吸と循環	6. 最初と最後の頁 688-696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1404205994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宗宮浩一、山内洋平、坂根和志、大関道薫、宮村昌利、武田義弘、森田英晃、伊藤隆英、星賀正明、石坂信和	4. 巻 25
2. 論文標題 心血管3Dモデルを補助的に用いた病態説明の有意性についてのパイロット的検討	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 未病と抗老化	6. 最初と最後の頁 39-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計19件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 森 禎章、山路純子、廣島玲子
2. 発表標題 Activation CGRP-cAMP-dependent signal transduction pathways upregulate MyHC I mRNA in C2C12 cells.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山路純子、廣島玲子、森 禎章
2. 発表標題 Role of cyclic AMP pathway on expression of MyHC II and IL-6 mRNAs in mouse myocytes.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hana Hayasaki, Yoshiro Sohma
2. 発表標題 Possibility of pain treatment with the Cannabidiol (CBD) through the local GABAergic system in the trigeminal ganglion.
3. 学会等名 BIT 10th World Gene Convention (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山路純子、森 禎章、廣島玲子
2. 発表標題 マウス骨格筋細胞における IL-6 及びミオシン重鎖クラス II のmRNA 発現へのカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の作用
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 禎章、山路純子、廣島玲子
2. 発表標題 C2C12 細胞におけるカルシトニン関連遺伝子ペプチド(CGRP)のミオシン重鎖タイプ I に対する作用
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiaki Mori, Junko Yamaji.
2. 発表標題 CGRP upregulates myosin heavy chain type I messenger RNA through calcineurin-IL-6-independent manner in C2C12 cells.
3. 学会等名 15th International Congress on Neuromuscular Diseases. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junko Yamaji, Yoshiaki Mori.
2. 発表標題 Modulating effects of unsaturated fatty acids on gene expression of myosin heavy chain class I and IIB in C2C12 myocytes.
3. 学会等名 15th International Congress on Neuromuscular Diseases. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiaki Mori, Junko Yamaji.
2. 発表標題 Application of CGRP upregulates MyHC I mRNA through cAMP-dependent manner in C2C12 cells.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Junko Yamaji, Yoshiaki Mori.
2. 発表標題 Essential role of calcineurin but not cAMP in mRNA expression of MyHC II and IL-6 in murine myocytes.
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早崎華、由留木裕子、桑原宏子、渡辺正仁
2. 発表標題 Expression of APP770 in normal and Alzheimer's disease brains.
3. 学会等名 第37回日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田修一、寺崎文生、星賀正明
2. 発表標題 心臓限局性サルコイドーシス症例の検討.
3. 学会等名 第38回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田修一、寺崎文生、前田大智、神崎裕美子、宗宮浩一、星賀正明
2. 発表標題 長期の経過中に18F-FDG PET が陽性化した心筋症の一例.
3. 学会等名 第4回日本心筋症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田晋一、萩森伸一、仲野春樹、小河佳織、綾仁悠介、尾崎昭子、稲中優子、榎原崇宏、河田 了、藤岡重和
2. 発表標題 正中法 Electroneurographyによる ENoGとCMAP潜時差との関係.
3. 学会等名 第41回日本顔面神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田晋一、萩森伸一、仲野春樹、榎原崇宏、小河佳織、金沢敦子、野中隆三郎、河田了、藤岡重和
2. 発表標題 正中法ENoGの予後推定値と治癒期間の乖離性の検討 - 健側CMAP値による測定精度の検証 -
3. 学会等名 40回日本顔面神経学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田修一、寺崎文生、坂根和志、伊藤隆英、石坂信和
2. 発表標題 18F-FDG PET 陰性の心筋症の一例
3. 学会等名 第3回日本心筋症研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宗宮 浩一、伊藤 隆英、藤田 修一、森田 英晃、武田 義弘、星賀 正明、石坂 信和
2. 発表標題 アルブミン/グロブリン比と左室拡張能障害との性特異的関連
3. 学会等名 第65回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宗宮 浩一、伊藤 隆英、藤田 修一、森田 英晃、武田 義弘、星賀 正明、石坂 信和
2. 発表標題 低A/G比は心不全増悪による再入院の予測因子である
3. 学会等名 第65回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高島章伍、高橋秀明、藤阪智弘、宗宮浩一、星賀正明、石坂信和
2. 発表標題 不安定狭心症の診断でPCI施行後に発症したたこぼ心筋症の一例
3. 学会等名 第122回日本循環器学会近畿地方会、
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森洋介、坂根和志、楠本紘史、武田義弘、森田英晃、宗宮浩一、星賀正明、石坂信和
2. 発表標題 F-18FDGの右室集積で発見されたアドリアマイシン心筋症の一例
3. 学会等名 第121回日本循環器学会近畿地方会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	寺崎 文生  (Terasaki Fumio)  (20236988)	大阪医科大学・医学部・教授    (34401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	宗宮 浩一  (Sohmiya Koichi)  (20319544)	大阪医科大学・医学部・准教授    (34401)	
研究 分担者	森 禎章  (Mori Yoshiaki)  (70268192)	関西福祉科学大学・保健医療学部・教授    (34431)	
研究 分担者	早崎 華  (Hayasaki Hana)  (90257866)	関西福祉科学大学・保健医療学部・教授    (34431)	