

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790716

研究課題名(和文)

心筋症に対する心筋微量蛋白測定と生理学的指標との関連

研究課題名(英文)

The relationship between protein levels and physiological parameters for cardiomyopathy

研究代表者

平敷 安希博(Hirashiki Akihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10418741

研究成果の概要(和文)：

拡張型心筋症、肥大型心筋症に対し、心筋遺伝子発現、蛋白発現測定と、病態生理パラメータとの関連解析を行い、新しい病態生理の発見や予後指標の開発を目的として平成21-22年度の研究を進めた。拡張型心筋症では、2009年、ドブタミン誘発性機械的交互脈は予後不良因子であることを初めて報告した。また肥大型心筋症では、ミトコンドリア機能は障害されており、その障害が左室収縮および弛緩予備能の低下に関与していることを報告した。

研究成果の概要(英文)：

To clarify pathophysiological mechanisms, we performed the pathophysiological analysis about the amounts of Ca-handling protein mRNAs levels and the hemodynamic parameters in patients with cardiomyopathy. In 2010, we reported that the relationship between dobutamine-induced mechanical alternans and mRNA levels of Ca-handling protein in patients with dilated cardiomyopathy. In 2009, Mitochondria showed functional impairment and morphological disorganization in the left ventricle of HCM patients. These mitochondrial changes were associated with impaired myocardial contractile and relaxation reserves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：慢性心不全、心筋特性、予後予測因子、心機能

1. 研究開始当初の背景

我が国では急速な高齢化に伴い、心不全罹患数、心不全死、心臓関連による突然死は増加

の一途をたどり、心不全に対する早急な対応が迫られている。最近、私たちのグループは、病態生理現象として頻拍誘発性機械的交互脈(pacing-induced mechanical alternans)

に注目した研究成果を報告した。

頻脈誘発性交互脈を有する者は心筋内遺伝子発現に障害を認め、心筋収縮予備能が低下したことを示した。しかしながら心筋の mRNA レベル、miRNA レベルは、その後の蛋白発現、機能に必ずしも一致しない。なぜなら、mRNA が担う遺伝情報は生命の設計図でしかなく、実際の生命活動の大部分はタンパク質が担い機能しているからである。近年、実験装置・技術の進歩で、心筋サンプルがごく微量でも、蛋白の測定が可能となってきた。動物実験では行われているものの、微量サンプルの限界によりヒトでの蛋白レベルでの報告はない。心内膜心筋生検の際に得られた心筋から、微量蛋白測定が可能となれば、これまで我々の蓄積してきた心筋細胞内 Ca^{2+} 関連蛋白の mRNA レベルと蛋白レベルとの関連が明らかになるだけでなく、不全心の病態解明にさらなる一助となり、新たな治療ターゲットとしての役割を担う可能性もある。私たちは、臨床において、病的心における生理学的異常と分子生物学的異常を同時に評価し統合的に病的心の病態を解析する数少ない研究グループとして、これまで成果を出してきている。

2. 研究の目的

拡張型心筋症、肥大型心筋症の病態解明を目指し、これまで蓄積してきた心筋細胞内 Ca^{2+} 関連蛋白 mRNA レベルの測定に加え、新たに蛋白レベルでの定量評価を行うことであった。実際の機能の担い手である蛋白レベルでの定量評価は重要であると考え、本研究計画を立案した。

拡張型心筋症および肥大型心筋症の症例を対象に、

- 1) 心筋細胞内 Ca^{2+} 関連蛋白 (SERCA2, ryanodine 受容体, phospholamban)、 β ARK、AC5、Mst1 に関し、mRNA レベルと蛋白レベルの発現とを同時に解析し、相互関係を明らかにする。
- 2) 心筋特性の指標 (収縮機能: LVdP/dtmax, 弛緩機能: Tau) をはじめとする、血行動態・生理学的指標、心臓超音波検査、心臓 MRI での形態評価、さらに心肺運動負荷試験を用いた運動生理機能評価や血液バイオマーカーとの関連を明らかにする。
- 3) 心不全の悪化や不整脈の出現及び心臓死の有無に関し予後調査を行い、予後規定因子を明らかにする。

3. 研究の方法

拡張型心筋症および肥大型心筋症の臨床に

における生理学的データ、血液生化学データ、心筋生検サンプルの収集にあたりとともに、各疾患の病態形成に関連する心筋細胞内 Ca^{2+} 関連蛋白の mRNA レベルと蛋白発現の両者を同定する。加えて、心筋アポトーシス・繊維化に関連する蛋白も定量評価する。本研究を効率的に遂行するため、臨床部門、基礎部門に各々チームをつくり、専門的に各部門において実行する。具体的には、下図に示す組織に基づき、研究を遂行する。各部門は定期的に会議し、データを共有する。

分子生物学的解析チーム (柴田、成)

- 1) 心筋生検標本の mRNA レベルにおける解析

臨床検査チームにより採取された心筋生検標本 (各疾患それぞれ 4 標本) を心筋細胞内 Ca^{2+} 動態関連 (SERCA2, ryanodine 受容体, phospholamban) mRNA を解析するため cDNA として -80 度で保存し、定量的 RT-PCR 法にて行う。

- 2) 心筋症の候補蛋白質発現量の解析

心筋生検標本から Laemmli のサンプルバッファにより蛋白質を溶出し、SDS-PAGE にて展開後、目的とするタンパク質の特異抗体を用いた免疫化学的手法により、蛋白質発現量を比較する。心筋生検から抽出された蛋白質総量の定量と細胞骨格蛋白質の発現比較を行うことで内部標準とする。既に候補となる蛋白質の抗体の探索と検討に着手しているが、必要があればペプチドを合成し実験動物に免疫することであらたな抗体を作製することも試みる。候補蛋白質は、心筋細胞内 Ca^{2+} 動態関連蛋白 (SERCA2, ryanodine 受容体, phospholamban)、 β ARK、AC5、Mst1 である。免疫染色を行い、心筋細胞内 Ca^{2+} 動態関連である SERCA2, ryanodine 受容体, phospholamban の発現細胞および発現の局在を同定する。

病理組織学的解析チーム (海野、奥村)

Hematoxylin-eosin 染色、Masson trichrome 染色により、心筋肥大、核の大小不同、繊維化などを評価する。それに加えて心筋生検標本をピクロシリウスレッド染色し、collagen volume fraction を計測する。免疫染色用に OCT コンパウンドを用いて心筋生検サンプルを保護し、 -80 度で保存する。

データ解析チーム (平敷、榊原)

各チームで、独自で行われているデータベースを統合し、臨床検査データ、分子生物学的データ、病理組織学的データを解析し、分子生物学、病理組織から得られる心筋障害の重症度と臨床検査データへの関連解析を進める。

4. 研究成果

1) NYHA I あるいは II の拡張型心筋症 102 名を対象とし、糖尿病を合併した群 (DCM-DM 群) と合併しない群 (DCM-alone 群) に分けて研究を行った。糖尿病の診断は、標準的な基準に従った。また、収縮能の指標である LV dp/dt max と弛緩能の指標である T1/2 も同時に測定した。DCM-DM 群 12 例、DCM-alone 群 24 例に対して心筋生検を施行した。得られた心筋組織の繊維化定量値である collagen volume fraction (CVF) を測定するために、ピクロシリウスレッド染色を行った。平均追跡期間は 4.8 年であった。患者全体の平均年齢は 52 ± 11 歳、平均左室駆出率は 35.1 ± 10.3 % であった。二群間において、年齢、BMI、EF、BNP、LV dp/dt max に相違はなかった。しかしながら、T1/2 において DCM-DM 群 (44.4 ± 7.9 ms) が DCM-alone 群 (39.7 ± 5.6 ms, $P < 0.01$) に比較して有意に延長していた。さらに CVF 値に関しては DCM-DM 群 (6.9 ± 1.8%) が DCM-alone 群 (5.2 ± 1.6%, $P = 0.01$) に比較して有意に高値であった。Kaplan-Meier 法を用いた予後における検討では、心血管イベント発症率は DCM-DM 群のほうが DCM-alone 群に比較して有意に高かった。糖尿病を合併した非虚血性左室収縮機能障害における予後悪化の一因として、線維化の増大と弛緩障害の関与が示唆された。

2) 拡張型心筋症 90 名を対象とし、すべての患者にマイクロマンومتر付 pig カテーテルを用いて左室圧を測定した。また、収縮能の指標である LV dp/dt max と弛緩能の指標である T1/2 も同時に測定した。平均追跡期間は 2.5 年であった。60 名は、ペーシング、ドブタミン負荷両方とも交互脈は出現しなかった。20 人はペーシングの時のみ交互脈は出現し、10 名はドブタミン負荷、ペーシング負荷両方とも交互脈が出現した。ドブタミン負荷群において SERCA2a/ phospholamban mRNA レベルが他群と比較し、有意に高値であった。Kaplan-Meier 法を用いた予後における検討では、心血管イベント発症率はドブタミン交互脈出現群が他群に比較して有意に高かった。拡張型心筋症において、ドブタミン負荷にて発症する交互脈は予後不良因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Association of diabetes mellitus with

myocardial collagen accumulation and relaxation impairment in patients with dilated cardiomyopathy.

Sakakibara M, Hirashiki A, Cheng XW, Bando Y, Ohshima K, Okumura T, Funahashi H, Ohshima S, Murohara T. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Mar 15 (査読有)

2. Funahashi H, Izawa H, Hirashiki A, Cheng XW, Inden Y, Nomura M, Murohara T. Altered microRNA expression associated with reduced catecholamine sensitivity in patients with chronic heart failure. *J Cardiol.* 2011 Feb 28 (査読有)

3. Hirashiki A, Izawa H, Cheng XW, Unno K, Ohshima S, Murohara T. Dobutamine-induced mechanical alternans is a marker of poor prognosis in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010 Oct;37(10):1004-9. (査読有)

4. 奥村貴裕、平敷安希博、住田佳陽、清水優子、河野裕治、竹下享典、山田純生、室原豊明 特発性拡張型心筋症患者における Exercise Oscillatory Ventilation に関する検討 心臓リハビリテーション 2010;15:120-125 (査読有)

5. Unno K, Shibata R, Izawa H, Hirashiki A, Murase Y, Yamada T, Kobayashi M, Noda A, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Adiponectin acts as a positive indicator of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2010 Mar;96(5):357-61. Epub 2009 Jul 30. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. Hirashiki A, Okumura T, Shinoda N, Ohshima S, Murohara T. The Complication of Both Sleep-Disordered Breathing and Chronic Kidney Disease are Associated With Poor Prognosis in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. American Heart Association, 83th Scientific Sessions 2010 (Chicago, America, McCormick Place Convention Center), 2010 年 11 月 16 日

2. Okumura T, Hirashiki A, Ohshima K, Sakakibara M, Funahashi H, Yuji K, Takeshita K, Cheng XW, Yamada S, Murohara T. Relationship between myocardial contractile reserve

measured by dobutamine stress testing and peak oxygen consumption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010 (Beijing, China, China National Convention Centre), 16-19 June 2010

3. Hirashiki A, Okumura T, Ohshima K, Sakakibara M, Funahashi H, Ohshima S, Murohara T. Pressure Half-Time is an Independent Predictor of Prognosis in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2010 (Beijing, China, China National Convention Centre), 16-19 June 2010

4. Okumura T, Hirashiki A, Ohshima K, Sakakibara M, Funahashi H, Ohshima Satoru, Kono Y, Takeshita K, Izawa H, Yamada S, Yokota M, Murohara T. The Association Between Myocardial Contractile Reserve By Dobutamine Stress Testing And Cardiopulmonary Exercise Testing Variables In Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. American Heart Association, 82th Scientific Sessions 2009, 2009年11月15日-18日

(Orland, America, Orange County Convention Center)

5. Sakakibara M, Hirashiki A, Cheng XW, Bando Y, Ohshima K, Okumura T, Funahashi H, Ohshima S, Noda A, Izawa H, Murohara T. Diabetes mellitus is associated with impairment of myocardial relaxation and accumulation of collagen in patients with dilated cardiomyopathy. American Heart Association, 82th Scientific Session 2009, 2009年11月15日-18日 (Orland, America, Orange County Convention Center)

6. Hirashiki A, Izawa H, Okumura T, Ohshima K, Sakakibara M, Funahashi H, Yokota M, Murohara T. Pressure-Half time as an independent predictor of prognosis in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. ESC congress 2009 (Barcelona, Spain), 29 Aug 2009 - 02 Sep 2009

6. Hirashiki A, Izawa H, Okumura T, Ohshima K, Sakakibara M, Funahashi H, Murohara T. Dobutamine-induced mechanical alternans is a good useful

predictor of poor prognosis in asymptomatic or mildly patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. ESC congress 2009 (Barcelona, Spain), 29 Aug 2009 - 02 Sep 2009

〔図書〕(計3件)

1. 平敷安希博 野田明子
基礎からの睡眠医学 監修 古池保雄 編
野田明子 中田誠一 尾崎紀夫
2010. 6. 12 p431-435 名古屋大学出版会

2. 平敷 安希博 室原豊明
利尿薬
循環器臨床サピア 8 心不全の急性期対応 責任編集 北風政史 2010. 6. 4 p70-75 中山書店

3. 平敷 安希博 室原豊明
心筋細胞外マトリックスと線維
診療に活かす心機能評価 編 北風政史
2010. 3. 10 p35-39 羊土社

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平敷安希博 (HIRASHIKI AKIHIRO)

名古屋大学医学部附属病院・循環器内科・
病院助教

研究者番号：10418741

(2) 研究分担者 なし

研究協力者

榊原雅樹 (SAKAKIBARA MASAKI) 名古屋
大学医学部附属病院・循環器内科・医員

大島景 (OHSIMA KEI) 名古屋大学医学
部附属病院・循環器内科・医員

奥村貴裕 (OKUMURA TAKAHIRO) 名古屋大
学大学院医学系研究科・循環器内科学・大学
院

坂東泰子 (BANDO YASUKO) 名古屋大学大
学院医学系研究科・循環器内科学・助教

成憲武 (SEI KENBU) 名古屋大学大学院
医学系研究科・循環器内科学・特任講師

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号：