

平成20・21年度 厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究推進事業
研究報告集

財団法人 循環器病研究振興財団

はじめに

現在、心臓・脳血管疾患は、我が国の3大死因の第2、第3位を占め、その死亡数は国民総死亡の約3割を占めています。中でも脳血管疾患は死亡数こそ減少しているものの、寝たきりや要介護の原因の第1位を占め続けており、また脳血管障害の有病者数は今後しばらくは増え続けると推測されています。

このように国民の健康に大きな影響を及ぼしている循環器疾患の予防・治療対策は、がんの早期発見・早期治療対策とともに、国家の最重要課題であります。このような中で、厚生労働省では、生活習慣病の予防から診断、治療までを網羅して、多面的な生活習慣病対策を推進し、国民が「元気で長生き」する長寿社会を目指して努力しているところであります。その一環として、循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業を実施しておりますが、(財)循環器病研究振興財団ではそれを支援するための外国人研究者招へい、外国への日本人研究者派遣、若手研究者育成活用などによる推進事業を担当しております。

このたび、平成20年度、21年度に実施した各推進事業の採用者から提出された研究実績報告書を取りまとめ、研究報告集を作成致しましたので、ご一読頂ければと存じます。

本報告集に掲載された循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業の成果が活用され、豊かで活力のある長寿社会を築いていくための一助となれば幸いです。

平成22年6月

財団法人 循環器病研究振興財団
理事長 山口 武典

目 次

平成 20 年度

I 外国人研究者招へい事業

- ① ワルファリンで活性が抑制されるビタミンK凝固タンパク質によるワルファリン感受性の個人差に関する研究 9
国立循環器病センター 第一病棟部長 河野 雄平
ニューメキシコ大学医学部 病理・生化・分子生物学部 教授 ウォルター・キーゾー
- ② 慢性心不全におけるヒスタミン受容体H2の役割：遺伝子改変マウスからの証拠 23
国立循環器病センター 臨床研究開発部 部長 北風 政史
南方医科大学 病理生理学講座 教授 リャオ ウリン
- ③ 心原性心停止蘇生後に対する臓器保護、特に脳蘇生と心機能回復に対する対策について 35
国立循環器病センター 心臓血管内科 緊急部長 野々木 宏
アリゾナ大学医学部 教授 カール ビー カーン
- ④ 生活衛生施設が持つコミュニティー機能を活かした健康教育機能の強化と、学童期の子を持つ家族の飲食店や銭湯等の施設利用に関する研究 39
独立行政法人国立健康・栄養研究所 客員研究員 大賀 英史
セルチュク大学教育学部 准教授 ヌルハン ウヌサン

II 若手研究者育成活用事業（リサーチ・レジデント）

- ① 生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究 49
独立行政法人国立健康・栄養研究所
健康増進プログラム 運動ガイドラインプロジェクト 村上 晴香
- ② 日常生活時における身体活動量およびエネルギー消費量の推定法に関する実験的検討 55
独立行政法人国立健康・栄養研究所
健康増進プログラム エネルギー代謝プロジェクト 大河原 一憲

- ③ 保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの診断・管理のエビデンス創出
のための横断・縦断研究 63
 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 高本 偉碩
- ④ 日本人における動脈硬化性大動脈弁膜疾患の発症・進展予防に関する研究 67
 大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター 大谷 朋仁
- ⑤ ヒスタミンと心不全の関連についての検討—H2 レセプターブロッカーは心不全を改善するか 73
 国立循環器病センター 臨床研究開発部 朝野 仁裕

平成 21 年度

I 外国人研究者招へい事業

- ① 循環器薬の薬理遺伝学 79
 国立循環器病センター 研究所病因部 部長 宮田 敏行
 バンダービルト医科大学 医学薬理学部門 医学部、薬理学教授 C ミッチェル スタイン

II 外国への日本人研究者派遣事業

- ① 蘇生後心筋保護における低体温療法・再灌流療法、薬物（ニコランジル・hANP）投与の効果に関する研究 91
 国立循環器病センター 心臓血管内科 レジデント 篠岡 太郎・東 晴彦
 （派遣先）アリゾナ大学 サーバーハートセンター

III 若手研究者育成活用事業（リサーチ・レジデント）

- ① 保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの診断・管理のエビデンス創出
のための横断・縦断研究 99
 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 高本 偉碩
- ② ヒスタミンと心不全の関連についての検討—H2 レセプターブロッカーは心不全を改善するか 105
 国立循環器病センター 臨床研究開発部門 塚本 蔵

平成 20 年度分

I 外国人研究者招へい事業

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

国名：アメリカ合衆国

所属・職名：ニューメキシコ大学 医学部 病理・生化・分子生物学部 教授

氏名：ウォルター・キーソー

所属（英文）：Departments of Pathology, Biochemistry & Molecular Biology,
University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM

職名・氏名(英文)：Professor, Walter Kisiel

2. 主任研究者

所属・職名：国立循環器病センター 第一病棟部長

氏名：河野 雄平

受入研究者

所属・職名：国立循環器病センター 第一病棟部長

氏名：河野 雄平

3. 招へい期間

平成 20 年 10 月 8 日 ～ 平成 20 年 10 月 23 日（16 日間）

4. 共同研究課題

ワルファリンで活性が抑制されるビタミンK凝固タンパク質によるワルファリン感受性の個人差に関する研究

5. 研究活動の概要

10月7日にアメリカ合衆国を出国し、10月8日に日本に入国した。

10月8日から10月11日までの間は、関西医科大学臨床検査医学教室において、小宮山豊講師、高橋伯夫教授兼附属滝井病院病院長、植村芳子教授兼附属枚方病院臨床検査部兼病理部部長、正木浩哉准教授兼附属滝井病院臨床検査部部長、榊田緑講師、さらに臨床検査部では、宗像眞智子附属滝井病院臨床検査部技師長、鈴木玲子附属枚方病院主任臨床検査技師、杉林幸代附属枚方病院主任臨床検査技師らと交えて、循環器疾患の臨床と臨床化学に関し意見交換を行った。10月9日は高橋伯夫および小宮山豊と循環器疾患の臨床検査医学に対する当院での対処に関して議論しコメントをいただいた。特に当研究室で開発して

いる Fc 受容体の特異的 ELISA を最近、冠動脈疾患に応用し、この分野における新しい検査診断法として利用できることを示している部分については有益な議論を展開できた。10月10日は、関西医科大学附属枚方病院臨床検査部と病理部において、循環器疾患を中心にした臨床検査現場の活動について検体検査、生体検査、病理検査の有機的利用法を示し、コメントをいただいた。その後、関西医科大学専門部に移動し、小宮山の指導クラス学生4名と血栓止血系の基礎と臨床などについて約1時間のフリーディスカッションしていただいた後、関西医科大学専門部学舎1号館1階 セミナールーム A において、“Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2” と題した講演会を開催し、質疑応答では李実験動物センター准教授や平川救命センター講師らとウィルス感染、TFPI 関連癌細胞アポトーシス進展およびその過程についても熱心な議論が行われた（参会者、約20名）。

10月12日から10月16日までの間は、国立循環器病センターにおいて、河野雄平部長、宮田敏行部長、本田繁則室長、宮田茂樹医長、小亀浩市室長、武田壮一室長、坂野史明室員、松田泰幸研究員、江浦由佳研究員、岡田浩美研究員、松本幸子研究員、山本ひとみ研究員、秋山正志研究員を交えて、ワルファリンおよび血栓症に関し意見交換を行うとともに、当センターで進めているワルファリンの臨床研究へコメントをいただいた。

10月16日は、国立循環器病センター研究所において、講演会を開催した（参会者、約30名）。

10月17日から10月19日までの間は、兵庫県立大学理学部において、小出武比古教授、若林貞夫准教授、谷口麻衣助教を交えて、アンチトロンビン、ヒスチジンリッチ糖タンパク質等、血栓制御因子に関する意見を交換した。特に、アンチトロンビンについては、ヘパリン非依存性に高活性な組換え変異体の作製について、極めて有用なコメントをいただいた。

10月17日は、兵庫県立大学理学部生命学科生体物質化学II講座主催で、Structure, Function and Biology of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) と題した講演会を開催した（参会者、約20名）。

10月20日から10月23日までの間は、熊本大学医学部循環器内科学教室において、小川久雄教授、杉山正悟准教授、海北幸一講師を交えてワルファリン療法時の出血副作用に関して意見交換を行った。また、財団法人化学及血清療法研究所において、船津昭信理事長、宮本誠二常務理事、中垣智弘部長、濱本高義次長、亀井慎太郎研究員を交えて、TFPI-2の臨床応用の可能性や血友病インヒビター患者の止血管理に関して意見交換を行った。

10月20日は、熊本大学医学部循環器内科学教室で講演会を開催した（参会者、約20名）。

10月21日は、財団法人化学及び血清療法研究所で講演会を開催した（参会者、約30名）。

6. 共同研究課題の成果

心房細動により発症する心原性脳塞栓症は、加齢とともに有病率が増加する。心原性脳塞栓症の一次予防および二次予防には、ワルファリンが現在のところ唯一有効性が確認された薬剤である。しかし、ワルファリンの至適投与量には個人差が大きく、また初期投与量が決定した後も効果が変動するため、投与量の微調整が必要であり、投与量が過剰となった場合の出血などの副作用も多い。最近、ワルファリン投与量の個人差に遺伝子多型が大きく関与し、遺伝子多型の寄与度により、大きく低用量、中用量、高用量群に層化できると報告されている。国立循環器病センターで行った VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型とワルファリン維持投与量の関連研究では、2 つの遺伝子の遺伝型とワルファリン量の関連が見出されたことに加え、同一の遺伝子多型を有する人が日本人では 78% を占めることが判明した。即ち、日本人では、VKORC1 遺伝子ではワルファリンの低用量と関連を示す多型の頻度が高く（アレル頻度、0.91）、一方 CYP2C9 遺伝子ではワルファリンの高用量と関連を示す多型の頻度が高い（アレル頻度、0.97）ことが明らかとなった。特に、VKORC1 遺伝子の多型頻度は白人種と大きく異なった。これが、「日本人のワルファリン維持量が低用量」というこれまでの臨床家の経験を説明すると思われた。このように、日本人の多くが同一多型を有することは、日本人の本薬剤に対する個人差においては、非遺伝的要素の寄与を十分考慮する必要があると考えられた。同じ遺伝型保有者のワルファリン量の個人差は、年齢、体重、併用薬に加えて、食事から摂取するビタミン K 量に影響を受ける可能性が考えられる。日本人は欧米人に比べて野菜摂取量が多く、かつ季節によって摂取する野菜の種類が大きく変わるという日本人の食習慣が、ビタミン K 摂取量の個人差の原因になると考えられ、ワルファリン効果の変動につながるのではないかと考えられる。

ワルファリン量のモニターとしてプロトロンビン時間を測定し、それを国際標準比に換算して適切なワルファリン量をモニターしている。このプロトロンビン時間は、ビタミン K 凝固因子の血中量を反映することが知られている。研究代表者らは、循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業の支援を受け、ワルファリン感受性の個人差を、遺伝子多型とビタミン K 摂取量調査から解析する「ワルファリン至適量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討（通称：Godward Study）」を行っている。そこで、ビタミン K 凝固因子（プロトロンビン、VII 因子、IX 因子、X 因子、プロテイン C、プロテイン S）の研究を 30 年以上進めてこられた Kisiel 教授を招へいし、ワルファリン投与による凝固因子の変動とその評価法に関する研究、およびワルファリンの出血副作用の緊急止血剤としての活性化 VII 因子（VIIa）の有効性に関する研究を行った。あわせて、凝固反応制御機構や血栓形成機構、血管壁傷害機構など、血管病としての血栓症の発症に関して意見交換を行った。

Kisiel 教授は出血症状を示す血友病患者の治療のため、世界で初めて Vlla 因子を用いた先生である。これは 1983 年に Journal of Clinical Investigation 誌に報告されているが、現在のトランスレーショナルリサーチの先駆けとして、高く評価されている。前駆体の VII 因子ではなく、活性型の Vlla 因子が高い止血効果を示すことを示したものである。現在、Vlla 因子は血友病患者の止血だけでなく、止血全般に広く用いられている。ワルファリン投与による出血副作用に対する Vlla 因子の止血効果に関して意見を交換した。

Kisiel 教授は現在、Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) を精力的に研究されている。TFPI-2 は、3 つのクニッツ型トリプシン阻害ドメインをもつ蛋白質である。本蛋白質はトリプシンやプラスミンに阻害活性を示す。C 末端領域には塩基性アミノ酸が集中しており、細胞外マトリックスと結合する。第 1 クニッツドメインの Arg24 が阻害中心残基であり、この残基を Lys に置換すると、プラスミン阻害能がアプロチニンと同じ程度まで強くなる。アプロチニンはプラスミンを強く阻害するので外科手術の際の失血量を抑える目的で用いられる。最近の報告では、アプロチニンを使用すると腎不全、心不全、脳卒中のリスクが増加するといわれて、臨床上前問題となっている。そこで、博士は TFPI-2 の Arg24 を Lys に変異した第 1 クニッツドメイン変異体蛋白質 (第 1 クニッツ R24K 変異体) の性状を調べた。その結果、この変異体はアプロチニンと同様の抗プラスミン活性を示すことを見出し、本組み換え変異体をアプロチニンの代替薬剤とし用い、その有用性を動物実験で示した。こういったように、極めて基礎的な研究をトランスレーショナルリサーチにより臨床へ展開する研究の流れは、私達の今後の研究へ貴重な示唆を与え、Kisiel 教授を招へいした成果の一つである。

国立循環器病センターでは、臨床研究として「ワルファリン至適量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討 (Godward 研究)」を進めるとともに、研究所では血栓症の基礎研究を進めている。血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の病因遺伝子である ADAMTS13 の研究、日本人の静脈血栓症の遺伝的素因であるプロテイン S K196E 変異、糖尿病などの観点から注目を浴びている小胞体ストレスなどの研究を進めている若手研究員が、Kisiel 教授にその成果を紹介し、研究に対してコメントを頂いた。ADAMTS13 の研究では、これまで私達が解析した先天性 TTP 患者の遺伝子解析、私達が開発した ADAMTS13 の蛍光合成基質とそれを用いた約 4,000 名の一般住民を対象にした活性値、これを用いた先天性 TTP 患者頻度の推定、Adamts13 ノックアウトマウスや C 末端ドメイン欠損マウスの血栓能などを紹介した。その他、日本人本態性高血圧に関連を示す遺伝子研究も紹介し、有益なコメントをいただいた。

Kisiel 教授は、関西医科大学、兵庫県立大学、熊本大学、(財)化学及血清療法研究所も訪問された。このように、2 週間ほどの滞在期間中に 5 施設を訪問していただいた。この間、それぞれの施設で血栓制御反応などに関して意見を交換するとともに、研究に対して適切な助言をいただくことができた。Kisiel 教授の招へいは、今後の共同研究に役立つものであった。

7. 成果の評価

主任研究者は「降圧治療および抗凝固治療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究」を進めている。今回、抗凝固療法として広く用いられるワルファリンに関して、米国より Kisiel 教授を招へいた。Kisiel 教授は、ワルファリンが抑制する凝固反応の研究の世界的権威であり、極めて知識が豊富な方である。Kisiel 教授からいただいた本研究へのコメントおよびトランスレーションリサーチの進め方は、今後の研究に大変参考となり、極めて有益であった。また、今後も E メールなどで随時、相談にのっていただけることとなった。

主任研究者 河野 雄平

Research Report to the Japan Cardiovascular Research Foundation

By

**Walter Kisiel, Ph.D.
Professor of Pathology,
Biochemistry and Molecular Biology
University of New Mexico Health Sciences Center
Albuquerque, NM USA**

October 8th –October 23rd, 2008

Overview of Academic Activities

My academic activities during the period of October 8 – October 23, 2008 included a mixture of research discussions and lectures at the National Cardiovascular Center Research Institute (host institution), as well as at four other academic and corporate institutions in Japan that included Kansai Medical University, University of Hyogo, Kumamoto University School of Medicine, and the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kaketsuken) in Kikuchi. Through scientific interactions with my hosts, Drs. Yuhei Kawano and Toshiyuki Miyata at the NCVCRI, as well as my tour of several institutions in Japan during my Visiting Scientist Fellowship, I was afforded a unique glimpse of biochemical research currently ongoing in Japan. I believe this Fellowship was a tremendous opportunity for me to observe outstanding basic, clinical and translational research in Japan, and hopefully provide Japanese researchers with the opportunity to share their views of science with me, and for me to critically evaluate their scientific findings, research design and direction. Inasmuch as I have trained eleven Japanese Post-Doctoral Fellows in my lab over the past 25 years, this visit to Japan also afforded me the opportunity to meet nine former Post-Doctoral Fellows and witness their career development over the years. What follows are my recollections for each institution visited during my Visiting Scientist Fellowship.

1. Kansai Medical University

On October 9, 2008, I had lunch with Professor Hakuo Takahashi and Professor Yutaka Komiyama of Kansai Medical University. Professor Takahashi is the Director of the Kansai Medical University Takii Hospital, and a leading authority on hypertension. Professor Komiyama is in the Department of Clinical Sciences and Laboratory Medicine at Kansai Medical University, and a former Post-Doctoral Fellow who worked in lab for two years (1989-1991) on the kinetic analyses of factor VIIa-tissue factor activation of factors X and IX. During lunch, Professors Takahashi, Komiyama and I had many fruitful discussions regarding hypertension research ongoing in Japan, as well as their current research investigating the usefulness of various clinical assays as diagnostics and predictors of disease progression. Notably, Drs. Takahashi and Komiyama discussed the results of recent studies investigating the causal relationship of soluble FcγRIIIa (CD16) in plasma with carotid maximum intima-media thickness in patients undergoing an annual medical checkup. In addition, Professor Komiyama, whose major responsibility is the implementation of new diagnostic assays in the clinical chemistry lab, described the usefulness of a single radial immunodiffusion assay for the immediate diagnosis of abnormal fibrinogenemia in patients with bleeding episodes.

The following day, October 10, 2008, I was given a tour by Professor Komiyama of the Clinical Chemistry Laboratory at Hirakata Hospital, a teaching hospital associated with Kansai Medical University. The Clinical Chemistry Laboratory was highly sophisticated using state-of-the-art technology to perform thousands of blood assays on a daily basis. Later that day, I presented a seminar to the staff, medical students and graduate students of Kansai Medical University describing our research on the structure, function and biology of human tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), a novel extracellular matrix Kunitz-type serine proteinase inhibitor. In this lecture, I provided (1) a brief history of the discovery of TFPI-2 in my lab, (2) a site-directed mutagenesis analysis of the functional unit of TFPI-2 (its first Kunitz-type domain), (3) the importance of TFPI-2 transcriptional silencing by transformed or tumor cells in regards to their growth and metastatic potential, (4) the induction of caspase-mediated apoptosis in a variety of tumor cells, and (5) its cellular uptake and translocation to the nucleus following incubation with cells that do not synthesize TFPI-2, or by cells that constitutively synthesize this protein either naturally or by genetic engineering. Post-seminar discussions were lively and focused mainly on the role of TFPI-2 in the nucleus, and the possibility that the first Kunitz-type domain of TFPI-2 (KD1) may be a viable substitute for aprotinin in cardio-

pulmonary bypass surgery to inhibit fibrinolysis and disseminated intravascular coagulation, inasmuch as a mutated version of the KD1, R24K KD1, exhibited plasmin inhibitory activity comparable to aprotinin, which was pulled from the market by its manufacturer (Bayer) in late 2007 due to an increasing number of nephrotoxicity episodes in patients undergoing cardio-pulmonary surgery following treatment with aprotinin.

2. National Cardiovascular Center Research Institute

After three enjoyable days of sightseeing in Kyoto and Osaka with former Post-Doctoral Fellows (Drs. Noguchi, Sakai, Kazama, Yamamoto, Komiyama and Kondo), I moved to the NCVCRI on October 14th and was greeted by my host, Professor Toshiyuki Miyata, who serves as the Director of the Department of Etiology and Pathogenesis at the Institute. I also met briefly with Professor Yuhei Kawano, who is the Director of the Division of Hypertension and Nephrology, and discussed his research efforts in hypertension. Dr. Miyata's group performs research on a broad array of topics that include platelet signalling, invertebrate host defense systems, ADAMTS13, ER stress proteins, and genomic analyses of patient susceptibility to hypertension, venous thromboembolism and warfarin resistance. With respect to ADAMTS13, Dr. Miyata's group was one of the first to report on the molecular mechanism whereby a plasma metalloproteinase (ADAMTS13) cleaves a Tyr-Met peptidyl bond within the A2 domain of von Willebrand factor, a multimeric plasma protein essential for platelet aggregation following conformational unfolding by either shear stress or chaotropic agents such as urea. A functional or antigenic deficiency of ADAMTS13 leads to the clinical disorder known as thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Dr. Miyata's group first identified a region in von Willebrand factor from Asp1596 to Arg1668 as a minimal substrate for ADAMTS13, and, based on this information, subsequently developed an elegant functional fluorogenic assay for this proteinase that is currently used worldwide. His group also reported on seven new mutations in the ADAMTS13 gene of Japanese patients afflicted with a catastrophic phenotype of congenital TTP known as Upshaw-Schulman syndrome. These included three mutations at exon-intron boundaries that lead to aberrantly-spliced mRNAs, while four mutations were missense mutations that resulted in no or marginal secretion of ADAMTS13 in expression studies. More recent studies from his lab have shown that a P475S polymorphism in ADAMTS13 results in a protein with lowered proteinase activity and urea lability *in vitro*. Collectively, Dr. Miyata's work on ADAMTS13 is clearly pioneering, and has led to substantial and highly significant new

information on the biochemistry and genetics of ADAMTS13, an essential component of platelet-mediated hemostasis.

While Dr. Miyata's work on ADAMTS13 was very impressive, his use of genomic and epidemiologic approaches to identify risk factors for thrombosis, hypertension and warfarin resistance in the Japanese population was clearly the most memorable and fascinating experience for me at the NCVRC. In this regard, the availability of hundreds, if not thousands, of patient genomic samples at the NCVRC provides a means to test various hypotheses with respect to establishing causal relationships in candidate gene(s) mutations and cardiovascular diseases. The availability of these patient samples to Dr. Miyata, as well as several other researchers, provides a powerful tool for not only establishing statistically-significant genetic relationships to disease, but eventually provide targets that will hopefully lead to clinical intervention. During my visit, Dr. Miyata and several of his staff presented their recent genetic data on candidate genes involved in warfarin resistance, venous thromboembolism and hypertension. With respect to warfarin resistance, Dr. Miyata's group focused on candidate genes controlling γ -carboxylation of vitamin K dependent coagulant and anticoagulant factors that included vitamin K epoxide reductase (VKORC1), γ -glutamyl carboxylase (GGCX), calumenin (CALU) and cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). In these studies, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in VKORC1, GGCX, and CYP2C9 that were associated with the inter-individual differences in warfarin dosage. In a more recent study, Dr. Miyata's group found no statistically significant association between the paralogous gene of VKORC1, designated as VKORC1L1, and the variability of warfarin dose requirement in the Japanese patient population. In the area of venous thromboembolism (VTE), Dr. Miyata's group has focused on genetic mutations or deletions in four key anticoagulant proteins that include protein C, protein S, thrombomodulin and antithrombin that leads to their functional deficiency. His group was the first to demonstrate that a substantial portion of the Japanese population harbors a mutation in protein S (K196E) that predisposes these individuals to a higher risk for VTE due to its deficiency of cofactor function in the protein C anticoagulant pathway. In a large and comprehensive recent study, the entire coding regions of the protein C, protein S and antithrombin genes in 173 patients with VTE were sequenced to assess the frequency of missense mutations in these genes. The results of these studies indicated that 32% (55 out of 173 patients) carried at least one genetic mutation in these three genes, with the K193E mutation in the protein S gene as the most prevalent. In the area of hypertension, Dr. Miyata and his colleagues had previously shown that

genetic variations in the murine and human RGS2 gene partly contributes to the hypertensive phenotype, and subsequently initiated a large genomic study to assess the association of hypertension with three candidate genes that included ADD2, KIAA0789, and M6PR. The results of this study indicate that these three genes potentially predispose individuals to hypertension. However, Dr. Miyata was quick to acknowledge that hypertension is a complex, multi-faceted disease, and it may prove to be very difficult to establish definitive genetic linkages to its etiology and pathogenesis. Finally, I presented a seminar to several researchers at the NCVRC on my final day there concerning TFPI-2 biology, which was received enthusiastically as judged by questions following the lecture. Particularly interesting to this audience was the possibility of using TFPI-2 R24K KD1 as an aprotinin substitute in cardio-pulmonary bypass surgery, as well as the observation that TFPI, an important regulator of tissue factor-mediated coagulation and a homolog to TFPI-2, was also observed in the nucleus of a variety of cells similar to TFPI-2. Following my lecture, my wife and I enjoyed a very delicious dinner with Dr. Miyata and Dr. Hisao Kato, a former colleague of mine at the University of Washington, and the former Director of the Department of Etiology and Pathogenesis at the NCVRC. I left Osaka the following day to journey to the University of Hyogo in Aioi, but had a very strong and lasting impression of the outstanding cardiovascular research performed in Dr. Miyata's laboratory. He and his research group are truly gifted scientists who apply a mixture of biochemical, molecular biological and genetic approaches to address very complex diseases and wide-ranging research problems. I was truly impressed by their productivity and work ethic, and look forward to seeing many more important and significant research findings from this laboratory in the future.

3. The University of Hyogo

On October 17th, I was greeted by Professor Takehiko Koide at the train station in Aioi and escorted to his laboratory in the Faculty of Science at the University of Hyogo where later that afternoon I presented my lecture on TFPI-2 structure, function and biology. Professor Koide and I first met in October, 1974 where we were both research fellows in the Department of Biochemistry at the University of Washington in Seattle, and have continued a long-standing personal and scientific relationship since then. In addition, since his return to Japan in 1977, Professor Koide has trained several Ph.D. students, some of whom subsequently became very successful Post-Doctoral Fellows in my laboratory at the University of New Mexico. Professor Koide's staff currently consists of Associate Professor Sadao Wakabayashi, Assistant Professor Mai Taniguchi, and

several Ph.D. and M.S. degree candidates. His research interests are broad and diversified and include (1) determining the functional role of human plasma histidine-rich glycoprotein (Wakabayashi), (2) elucidating the role of the endoplasmic reticulum degradation-enhancing mannosidase protein (EDEM; Taniguchi and students), (3) characterizing the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway (ERAD; Koide and students), (4) investigating the regulation of the 20S proteasome (Yabe and Koide), and (5) investigating the structural basis for the low inhibitory activity of human antithrombin (Koide and students). Associate Professor Wakabayashi presented his work on histidine-rich glycoprotein (HRG), which has heretofore eluded all efforts to determine a functional role for this protein in blood, despite its very high concentration there. Dr. Wakabayashi presented recent data that suggests HRG may play a role in the human immune response as it, in concert with concanavalin A (con A), augmented cell morphological changes and adhesion of monocytic cell lines to plastic surfaces. In order to demonstrate that this finding was of physiological importance, Dr. Wakabayashi and I discussed the need to discover a blood-borne analog to conA, a plant lectin. In this regard, I suggested that he obtain blood samples from a number of Japanese teaching hospitals or research centers and assay these samples for their ability to augment monocyte adhesion in the presence of HRG. Conceivably, patients with one or more disease states (such as cancer, asthma, etc) synthesize and secrete much higher levels of this putative HRG cofactor into the bloodstream in relation to normal, healthy individuals, which could lead to its identification and purification from patient plasma. Subsequently, in very nice presentations, Dr. Taniguchi and her students presented new data on the function of EDEM 1 and 2 on endoplasmic reticulum quality control. In this regard, EDEMs were shown to only bind to misfolded glycoproteins coming off the ER protein assembly line. Interestingly, co-transfection of EDEM 1 and 2 into cells enhanced degradation of a mutant HRG and an antithrombin P429stop mutant, but did not enhance the degradation of antithrombin deletion mutants. In fact, the secretion rate of one antithrombin mutant was actually enhanced by EDEM co-transfection. Following these presentations, I pointed out to Dr. Taniguchi that, in co-transfection studies, it is very important to know the transfection efficiency and copy number of the EDEM mRNA in order to draw meaningful conclusions regarding their mechanism of action in the cell, and she agreed to do a quantitative RT-PCR to assess this. Finally, Professor Koide's students made presentations regarding their work on designing an antithrombin variant that exhibits higher inhibitory activity by itself comparable to its activity in complex with heparin. In this regard, antithrombin is a major plasma serine proteinase inhibitor and a key

regulator of activated blood coagulation factors. Moreover, heparin enhances its inhibitory activity roughly a thousand-fold. However, complications can arise following heparin infusion in patients with venous thromboembolism such as heparin-induced thrombocytopenia. Accordingly, Professor Koide is attempting to prepare an antithrombin variant by site-directed mutagenesis and expression approaches *in-vitro* that exhibits substantially higher activity than wild-type antithrombin in the absence of heparin. The long-range goal of these studies is to produce a clinically-useful antithrombin preparation that can be infused in patients presenting with thrombosis without heparin. The mutagenesis studies have thus far focused on mutagenesis of Glu255 to produce a structural analog to antitrypsin, which is structurally similar to antithrombin but does not require heparin for its inhibitory activity. Thus far, mutagenesis of Glu255 has resulted in several mutants with higher inhibitory activity (10-fold higher) and further single, double and deletion mutants of antithrombin are planned to increase its inhibitory activity even higher. These latter studies are well conceived and appear to have great translational value and clinical utility. The day after these scientific presentations, Professor Koide and his wife escorted my wife and I by train and ferryboat to Itsukushima Shrine in Akinomiyajima for a very pleasant and enjoyable day of sightseeing.

4. Kumamoto University School of Medicine

On October 20th, I traveled by Shinkansen from Aioi to Kumamoto, and was greeted there by Dr. Takayoshi Hamamoto, a former Post-Doctoral Fellow in my laboratory (1994-1996) who currently is a Research Director at Kaketsuken. Dr. Hamamoto escorted me to the Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences where I met briefly with Professor Hisao Ogawa in the Department of Cardiovascular Medicine. We discussed his recent studies investigating the effects of low-dose aspirin on the primary prevention of cardiovascular events in patients presenting with type-2 diabetes. I also briefly described some of our efforts to patent TFPI-2 R24K KD1 as an aprotinin substitute for patients undergoing cardio-pulmonary bypass surgery. Following our brief visit, we moved to the nearby Yamasaki-Kinenkan Lecture Hall where I presented a seminar on TFPI-2 structure, function and biology. Following my lecture, several very interesting questions were posed by the audience that dealt with the identity of the physiological proteinase regulated by TFPI-2, the functional consequences of a TFPI-2 knockout mouse, the possible role of TFPI-2 in atherosclerotic plaque formation, the mechanism of how TFPI-2 is transduced into cells, and the role of TFPI-2 and TFPI in the nucleus. In addition to these questions, several excellent

suggestions for future research on TFPI-2 were offered by members of the audience. I very much appreciated these suggestions and plan to address them experimentally in the near future. Following the lecture, my wife and I enjoyed a very nice dinner at a teppanyaki restaurant with Drs. Nakagaki and Hamamoto from Kaketsuken, and Drs. Yamamoto and Kaikita from Kumamoto University. Dr. Yamamoto and I discussed his earlier work on complement and blood clotting while he was a fellow working in the laboratories of Drs. Charlie Cochrane and John Griffin at the Scripps Institute in La Jolla, California. In addition, Dr. Kaikita and I discussed his doctoral research at Kumamoto University on the induction of apoptosis in human endothelial cells by TFPI in collaboration with researchers at Kaketsuken. Interestingly, TFPI and TFPI-2 are structural homologs and I informed Dr. Kaikita that our laboratory also observed induction of apoptosis by TFPI-2 in endothelial cells, as well as a wide variety of tumor cells.

5. The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

On the morning of October 21st, Dr. Shintaro Kamei of Kaketsuken escorted me to Kumamoto Castle where we visited the newly-constructed addition to the castle. Following a lunch at a sushi bar, we traveled to the headquarters of Kaketsuken for a tour of the blood fractionation and quality control buildings. Kaketsuken is a for-profit corporation built shortly after the war to provide medical supplies and vaccines to the Japanese population. It has since expanded to include both human and animal vaccines and diagnostic reagents, therapeutic blood products of plasma and recombinant origin, and antitumor drugs. In addition, the company actively partners with several academic institutions in Japan to support basic research in the areas of immunology and blood coagulation, as well as sponsors and financially supports a variety of symposia and international meetings that focus on either immunology, blood products or livestock hygiene. The latter include the annual Aso Symposium, the bi-annual Aso International Meeting, and the annual Livestock Hygiene Seminar. On a personal note, I am very grateful to Kaketsuken, and particularly its President, Dr. Akinobu Funatsu, for supporting travel and per diem expenses for three former Post-Doctoral Fellows (Drs. Nakagaki, Hamamoto, and Kamei) who worked in my laboratory from 1990 to 2000, each contributing greatly to the success of our research mission.

Later that day, Dr. Kamei escorted me to the Kikuchi Research Center where I presented my seminar on TFPI-2, which was enthusiastically received. Following my seminar, several audience members asked questions pertaining to the clinical usefulness of the TFPI-2 R24K KD1

molecule both as an antifibrinolytic agent as well as an antitumor agent. Later that evening, my wife and I had a wonderful and memorable dinner at a French/Italian restaurant in Kumamoto with all my former Post-Doctoral Fellows from Kaketsuken, as well as their family members.

The next day, October 22nd, my wife and I met briefly with President Funatsu and his Executive Director Mr. Miyamoto to express our appreciation to Kaketsuken for hosting us in Kumamoto. We then traveled with Drs. Kamei and Shimose to Mount Aso and viewed the volcano's caldera. We subsequently spent the night at a traditional Japanese hot springs ryokan in the foothills of Mount Aso, which was a very special cultural experience for us. The next day we left Kumamoto by train to return to Aioi and spend a couple more days with our close friends, Professor Koide and his wife Mitsuko, visiting again with his staff at the University of Hyogo and touring Himeji Castle. We finally departed Japan on October 26th to return to the United States.

In closing, I would like to express my sincere appreciation to the Japan Cardiovascular Research Foundation who funded my travel and stay in Japan, as well as to several hosts in Japan who made my stay very worthwhile both from a scientific and cultural perspective. I particularly want to express my deepest appreciation to Professors Kuwano and Miyata for inviting me to Japan, and showering me with their gracious hospitality. I have visited Japan several times, and the hospitality of my Japanese colleagues on every occasion was simply unmatched and greatly appreciated. Moreover, I sincerely hope that my lectures were of scientific benefit to my Japanese colleagues, and that I provided some measure of insight and directional assistance into their research programs following their research presentations to me.

Respectfully submitted this 13th day of November, 2008

Walter Kisiel

Walter Kisiel, Ph.D.

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

国 名 : China 中国

所属・職名 : Department of Pathophysiology, Southern Medical University
南方医科大学 病理生理学講座 教授

氏 名 : Yulin Liao 廖 禹林.

2. 主任研究者

所属・職名 : 国立循環器病センター 臨床研究開発部 部長

氏 名 : 北風 政史

受入研究者

所属・職名 : 国立循環器病センター 臨床研究開発部 部長

氏 名 : 北風 政史

3. 招へい期間

平成 21 年 11 月 16 日 ~ 平成 21 年 12 月 1 日 (14日間)

4. 共同研究課題

慢性心不全におけるヒスタミン受容体H2の役割: 遺伝子改変マウスからの証拠

5. 研究活動の概要

11月16日から11月20日までの間は圧負荷H2R KOマウスと野生型マウスの心エコー解析を行った。

11月21日から11月28日まで上記マウスの心臓HemodynamicとSacrificeをは行った。

11月29日から12月1日までの間は実験Dataを解析した。

6. 共同研究課題の成果

循環器疾患は、日本の死因の第2位と第3位を占める。特に、心血管疾患の死亡原因の主なものの一つとして、心不全がある。日本においては、高齢化社会を迎え、高齢者人口が増加の一途をたどる。また、虚血性心疾患の治療法も急速に進歩し、救命率が向上してきた。このような社会的および医学的状況とともに、心不全患者数の増加は避けられず、将来の社会における重要課題の一つである。また欧米においても、虚血性心疾患への対策は徐々に効果を表しつつあるが、それに引き換え、心不全患者の増加が日本と同様、重要な課題となっていることが報告されている。また、心不全という病態は、心不全患者の予後に関わるだけでなく、心不全患者の生活レベルである生活の質という観点からも重要である。心不全の状態になると、労作時の呼吸困難感が出現し、重症化すると、安静時においても呼吸困難感が出現するようになる。そのため、日常生活を行う上で支障が出現し、重症の心不全になると介護が必要になってくる。そのため、心不全患者への対策は、予後改善は当然ながら、生活の質を改善するための対策も必要となってくる。このように、医学的、社会的に解決すべき課題として、心不全患者の発症予防および進展予防を進めることが必須となっている。現在の発症予防および進展予防においては、薬物療法が主となり施行されている。この薬物療法も近年開発されたものであり、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系阻害薬（RAA系阻害薬）と β 遮断薬が主として使用される。特に、RAA系阻害薬のアンジオテンシン変換酵素阻害薬は、心不全患者に必須の薬剤となっている。これら以外にも、CRTやCRT-Dなどの心室同期療法が行われ、重症心不全患者の新たな治療法として期待されている。しかしながら、心不全の治療抵抗性の患者においては、心臓移植でしか救命できないが、心臓移植の適応条件は大変厳しく、治療法がないまま生活している難治性心不全患者も多い。

そこで我々は、心不全患者における新たな発症予防および進展予防の開発に向けた試みを行っている。まず、国立循環器病センターに入院した心不全患者のデータベース構築を行った。1000名を超える心不全患者の臨床情報をもとに、心不全に関わる因子の探索をデータマイニング法をもとに進めてきた。その結果、糖尿病治療薬である α -グルコシダーゼ阻害薬と消化性潰瘍治療薬であるヒスタミン H_2 受容体遮断薬が、心不全患者の心機能改善に関連していることを見出した。

そこでわれわれは、これらの糖尿病とヒスタミンという2つのターゲットが心不全の新しい発症予防および進展予防に有効ではないかとの仮説に基づき、研究開発を進めている。ヒスタミン H_2 受容体の刺激、遮断による心機能の効果を検討した研究は少なく、臨床研究および基礎研究の両面からの検討を試みている。今回の共同研究においては、ヒスタミン H_2 受容体の心筋障害に対する役割を明らかにするために、基礎実験を進めている。ヒスタミンと心筋障害の関連についての文献的考察として、1) ヒスタミン H_2 受容体は心筋に存在しており、 β 受容体と同様のGs蛋白に結合する、2) ヒスタミン投与により、cAMPを介した陽性変力作用が惹起される、3) ヒスタミン H_2 受容体を投与することにより、心拍出量が低下することなどが知られている。

これらの知見から、ヒスタミンH₂受容体遮断薬は、心不全に対する有効な治療薬であるβ遮断薬と同様に、心不全の進展予防効果が期待できると考えられる。我々は、心不全病態モデルとして、イヌのペースング心不全モデル、ラットの心筋梗塞モデル、マウスの大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルの3つを用いて、研究を進めている。このうち外国人研究者を招へいたことによって得られた効果（成果）は、ヒスタミンH₂受容体遮断薬の効果を分子生物学的に評価するため、ヒスタミンH₂受容体の遺伝子欠損マウスを用いた実験を行うことにより得られた。今回用いたヒスタミンH₂受容体は、全身において欠損しているマウスを用いた。このマウスに対して、横行大動脈において26ゲージの針を用いて、糸による縮窄を行い、心臓に圧負荷をかけ、4週間経過を迫った。その後、縮窄4週間後に心臓超音波検査および左室血行動態評価を行った。4週間という期間は、心肥大から心不全を認める時期に一致するため、採用した。ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの間で、ベースラインにおいて、心機能および心血行動態において、有意な差は認められなかった。大動脈縮窄後4週間において、脈拍および血圧に関しては、両群間で差を認めなかった。しかし、左室拡張末期圧において、野生型では著明な悪化を認めたが、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスでは、その悪化が有意に抑制された。また、左室収縮能において、野生型では著明な低下を認めたが、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスでは著明な低下が改善されていた。その結果と一致するように、心臓超音波検査による左室短縮率においても、野生型で認められた低下が、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスでは、改善することがわかった。また、心不全の臨床的指標である肺うっ血に関しては、野生型では著明に認められたが、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスでは肺うっ血所見が軽減していた。心筋における組織学的検査も行った。野生型では、心肥大および心臓の線維化が著明に認められたが、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスでは、その程度が減弱していた。また、最近注目されている心不全において上昇が認められるアデニル酸シクラーゼ5型が野生型において認められたが、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスではその増加が観察されなかった。これらのヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスを用いた解析から、心不全の進展においてヒスタミンH₂受容体が重要な役割を演じていることが示唆される結果であった。実際の臨床応用に向けて、ヒスタミンH₂受容体遮断薬を用いることにより、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスで見られる効果と同様な結果が見られるかどうかを次に検討した。今回の評価を行うのに用いた実験系は、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスで行った系と同様にした。4週間後の大動脈縮窄モデルにおいて、ヒスタミンH₂受容体遮断薬を投与することにより、ミラーカテーテルによる心血行動態評価において、左室拡張末期圧、左室収縮率の改善効果が明らかとなった。また、tau, dp/dt maxおよびdp/dt minにおいても、ヒスタミンH₂受容体遮断薬により改善することがわかった。また、心臓超音波検査においても、大動脈縮窄により悪化した左室短縮率、心拡大の程度は、ヒスタミンH₂受容体遮断薬により改善することが明らかとなった。また、組織学的検査においても、対照群で認められた心肥大および心臓の線維化は、ヒスタミンH₂受容体遮断薬投与により、それらの程度が軽減することが

明らかになった。このように、ヒスタミンH₂受容体遮断薬による心不全の改善効果は、ヒスタミンH₂受容体遺伝子欠損マウスと同様の結果であった。この2つのマウス心不全モデルを用いた基礎的研究の結果は、臨床において、ヒスタミンH₂受容体遮断薬が心不全の進展予防および発症予防に有効であることを示唆する結果であった。

7. 成果の評価（主任研究者が上記の成果を採択研究課題にどのように反映させたか具体的に記載し、記名すること）

我々は、心不全患者の登録データベースから、心不全の新たな標的として、ヒスタミンをデータマイニング法にて見つけ出してきた。今回の採択研究課題は、ヒスタミンにおける心筋障害のメカニズムの基礎的解明から、ヒスタミン受容体遮断薬の心不全患者への臨床への応用が大きな研究の流れとなっている。小規模の単施設において、ヒスタミンH₂受容体遮断薬が心不全患者において、心不全の進展抑制に有効であることを前向きおよび後ろ向き臨床研究より明らかにしつつある。これらの臨床研究の結果に加えて、招へいた外国人研究者との基礎共同研究より、更なるヒスタミンH₂受容体遮断薬の臨床応用が強く示唆される結果が得られたため、現在、前向きの心不全患者の登録研究を行い、プロペンシティ解析を行うべく準備を開始している。さらに、これらの結果により、観察臨床研究によりエビデンスが確立されれば、エビデンスレベルをあげて、ヒスタミンH₂受容体遮断薬による心不全患者を対象にした心不全進展予防効果の検討を行う介入臨床試験を計画する予定である。

主任研究者 北風 政史

Research Report:

Disruption of H2 Histamine Receptor Increases Resistance to Development of Heart Failure in Pressure Overload Mice

By Yulin Liao (Southern Medical University, China)

Summary: Previous retrospective and small size prospective clinical investigations in our research group implicated that H2 histamine receptor (H2R) blockers are beneficial for patients with chronic heart failure. However, those preliminary results have to be validated by well-designed large scale clinical trial and experimental studies. In the present study, we assessed the influences of H2R disruption on the left ventricular (LV) dysfunction in a murine model of LV pressure overload. H2R knockout mice and their wild type littermates were subjected to transverse aortic constriction (TAC) surgery and were observed for 4 weeks. In response to TAC, H2R knockout mice had a higher echocardiographic LV fractional shortening, a significant lower LV end-diastolic pressure, a larger contractility index and more importantly, a marked lower pulmonary congestion, compared with the wild type mice. Similar results were obtained in wild type TAC mice treated with H2R blocker cimetidine. Histological examinations showed a lower degree of cardiac fibrosis in H2R knockout mice. The expression of type 5 adenylate cyclase was increased in wild type TAC mice but no significant change in H2R KO TAC mice. In cultured neonatal rat cardiomyocytes, cimetidine abrogated the increase of cAMP induced by histamine or isoproterenol. These findings indicated that H2R KO mice were resistant to heart failure induced by pressure overload, and its actions are associated with the down-regulation of adenylate cyclase 5 and inhibition of cardiac fibrosis and apoptosis.

Methods

Mice

H2R (-/-) mice and H2R (+/+) littermates (total 60) were used for experimental study. Generation of mice lacking H2R was previously described by Fukushima et al. Heterozygous H2R mice were bred at our animal facility to produce H2R -/-, H2R +/- and H2R +/+ offspring. To genotype the mice, we carried out polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail genomic DNA using the following primers: M1: 5' AATGTGGTCGTCTGCCTGGCT; M9: 5' TTCTACCTGCCTCTTCTCATC; M10: 5' CTCTGTTGAGGGTGGCGTAC; M15: 5' ACATCTAGCTTCCTCACTGCCTC; 606r: 5' CTGACTAGGGGAGGAGTAGAA. M1 and M10 or M9 and M10 were used to identify wild type mice, M15 and 606r for mutated ones.

Transverse Aortic Constriction Models

All procedures were performed in accordance with our institutional guidelines for animal research that conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Mice (7-8 weeks age, male, body weight 20-28 gram) were anesthetized intraperitoneal with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), intubated with PE-90 tubing, and ventilated using a mouse mini-ventilator with room air. The respiratory rate was set between 100 and 110 per minute. Aortic stenosis was generated by transverse aortic constriction to induce cardiac hypertrophy and heart failure as described previously.

After echocardiography and LV hemodynamic studies were done at 4 weeks following surgery, the mice were sacrificed and their hearts and lungs were extracted for further analysis. For histological examination, hearts were fixed in 10% formalin, whereas the hearts used for molecular analysis were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Echocardiography

Noninvasive transthoracic echocardiography was performed in conscious animals with a Sonos 4500 and a 15-6 L MHz transducer (Philips, the Netherlands). Mice were fixed in position without anesthesia. Two-dimensional short-axis views of the LV were obtained for guided M-mode measurement of the posterior wall thickness (LVPWd), end-diastolic diameter (LVEDd), and end-systolic diameter (LVESd). LV fractional shortening (FS) and the ejection fraction (EF) were calculated as follows: $LVFS = (LVEDd - LVESd) / LVEDd \times 100$, $LVEF = [(LV \text{ end-diastolic volume} - LV \text{ systolic volume}) / LV \text{ end-diastolic volume}] \times 100$. The LV volume was calculated by the formula of Teichholz: $V = [7 / (2.4 + D)] \times D^3$, where V is the LV volume and D is the LV dimension.

Invasive Hemodynamic Study

LV hemodynamics were evaluated before sacrifice. Mice from each group were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg) and were ventilated as mentioned above. A Millar catheter was inserted via the right carotid artery and carefully introduced into the LV to measure the systolic pressure (LVSP), and end-diastolic pressure (LVEDP). Maximum and minimum rates of change of LV pressure (max dp/dt and min dp/dt , respectively) as well as the contractility index (max dp/dt divided by the pressure at the time of max dp/dt) and the exponential time constant of relaxation (Tau) were calculated using Blood Pressure Module software.

Histological Examinations

Hearts were fixed in 10% formalin, then dehydrated and embedded in paraffin, and 6- μ m-thick sections were cut and stained with hematoxylin/eosin or Azan/Mallory.

Real-time PCR

Total RNA was prepared from cultured cardiac myocytes using RNA-Bee isolation reagent (Tel-Test, Inc.) according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to generate cDNA from the extracted RNA. The cDNA thus obtained (1 μ g) was then used for subsequent PCR amplification with primers targeting the genes for type 5 AC and 18S (as the internal control). Expression of type 5 AC was determined using the Taqman real-time PCR assay and an ABI PRISM7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), as described elsewhere. Oligonucleotide primers and TaqMan probes for rat type 5 AC were purchased from Applied Biosystems.

Western Blot Analysis

Proteins were prepared from whole heart homogenates. Then immunoblotting was performed using mouse antibodies directed against Bax or Bcl2 (Sant Cruz Biotechnology) or TGF- β 1. Immunoreactive bands were visualized by the enhanced chemiluminescence method (Amersham) and then were quantified by densitometry with Scion Image software.

Cell Culture and cAMP Measurement

Ventricular myocytes were isolated from neonatal rats at 2 to 3 days of life and cultured as described previously. In brief, cardiomyocytes were incubated for 24-72 hours in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and then grown for 24-48 hours under serum-free conditions. Subsequently, the cells were exposed to 10^{-4} mol/L histamine or isoproterenol (10^{-5} mol/L) for 24 h in the presence or absence of cimetidine (10^{-5} mol/L). Using a cAMP immunoassay (Assay Designs), generation of cAMP in cultured neonatal rat cardiomyocytes was measured as described in the manufacturer's protocol.

Animal Experimental Protocol

Baseline analysis: H2R (-/-) (n = 6) and WT littermates (n = 6) male mice at age of 12 weeks were used to analyze cardiac phenotype by examinations of echocardiography.

Effect of disruption of H2R on heart failure: Mice were divided into four groups: (1) H2R KO (-/-) Sham (n = 9), (2) H2R KO TAC (n = 13), (3) H2R WT Sham (n = 6), (4) H2R WT TAC (n = 13). Mice were observed for four weeks.

Effect of blockage of H2R on heart failure: Another group of H2R WT mice was added (n = 7), H2R blocker cimetidine 200 mg/kg per day was orally administrated for 4 weeks from the 2nd day after TAC. Cimetidine was mixed with 0.5% carboxymethyl cellulose sodium. Dose of cimetidine was decided according to previous reports.

Statistical Analysis

The Student's *t*-test was used for comparisons between two groups, while one-way ANOVA with post hoc analysis by the Tukey-kramer test was employed for multiple comparisons. Results were expressed as the mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

Baseline Data of H2R KO Mice

We investigated the expression of H2R in failing hearts induced by TAC, as showed in Figure 1A, H2R was significantly downregulated in the heart of mice 4 weeks after TAC, implicating that histamine plays some role in diseased heart. To address this issue, we analyzed general H2R knockout mice (Figure 1B).

During development up to the adult, there was no difference in growth rate, body weight, heart and lung weight, echocardiographic findings and left ventricular hemodynamics between wild-type (WT) and KO mice.

Chronic Influence of H2R deficiency on Cardiac Function in TAC Model

We examined the role of H2R deficiency in chronic cardiac remodeling induced by TAC for 4 weeks. LV systolic were similar between the two groups (Figure 1C,D). Compared with WT mice, KO mice had a significant lower LV end-diastolic pressure (Figure 1C,E), a similar heart rate (Figure 1F), a higher LV contractility (Figure 1G), a shorter (but no significance) LV Tau (Figure 1H).

Results of echocardiographic and morphological analysis were showed in Figure 2. A higher LV fractional shortening (Figure 2C) and a lower lung weight/body weight ratio (Figure 5E,F) was noted in H2R KO mice. These results implicate that H2R inactivation attenuates left ventricular dysfunction after TAC.

Pharmacological inactivation of H2R on Cardiac Function in TAC Model

Using H2R blocker cimetidine to treat the wild-type TAC mice, we obtained results similar to H2R KO TAC mice (Figure 3 and 4).

Inactivation of H2R Attenuates Cardiac Fibrosis

As shown in Figure 5, cardiac fibrosis was significantly attenuated in H2R KO TAC mice and cimetidine-treated wild-type TAC mice.

Inhibition of Adenylate Cyclase 5 in H2R KO TAC Mice

Real-time PCR examination noted that the expression of adenylate cyclase 5 (AC5) was increased in wild type TAC mice but no significant change in H2R KO TAC mice. (Figure 6)

Cimetidine Inhibits cAMP Production

In cultured neonatal rat cardiomyocytes, we found that cimetidine abrogated the increase of cAMP induced by histamine or isoproterenol.(Figure 7)

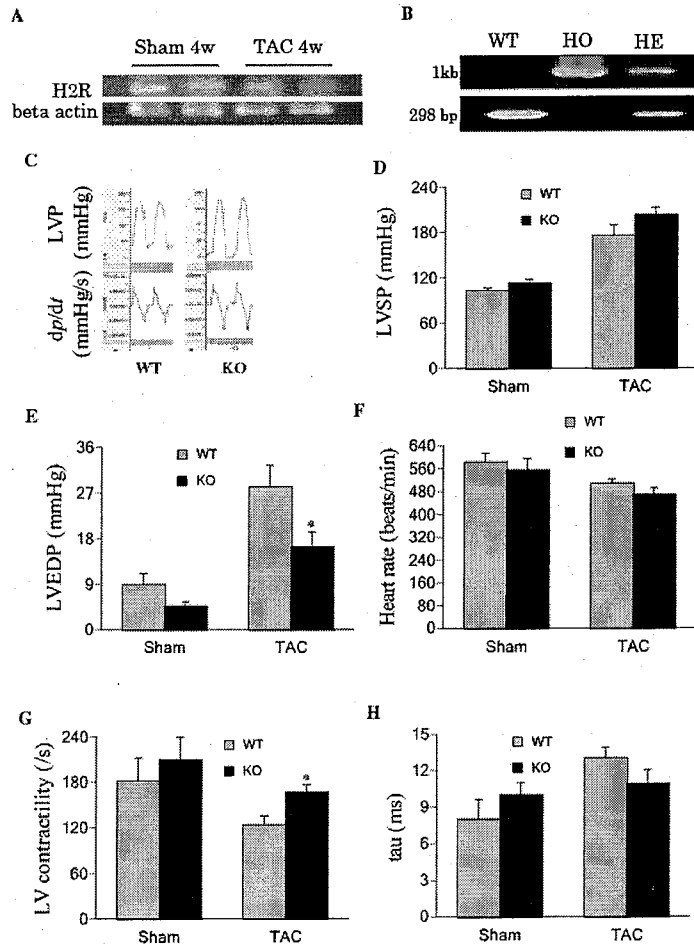


Figure 1

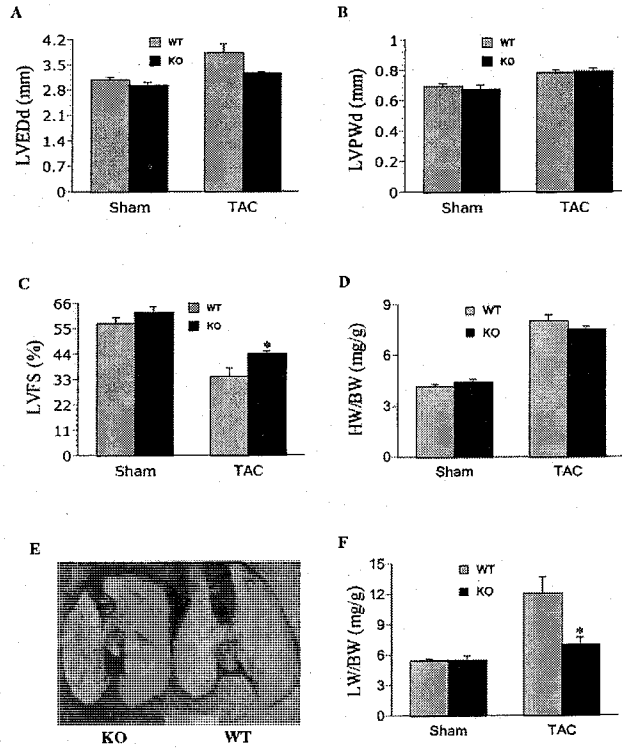


Figure 2

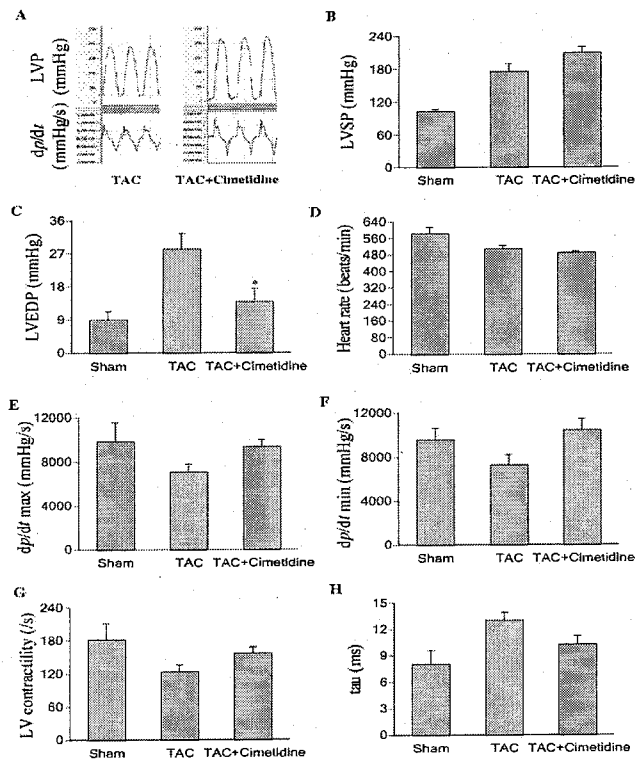


Figure 3

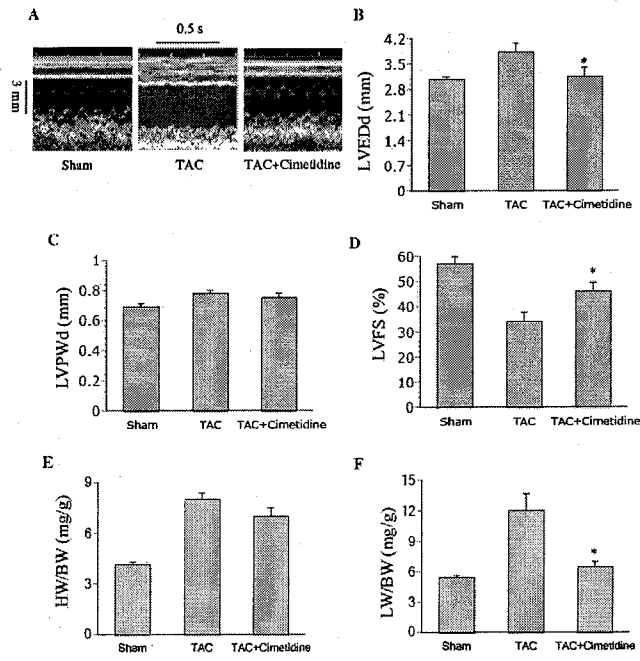


Figure 4

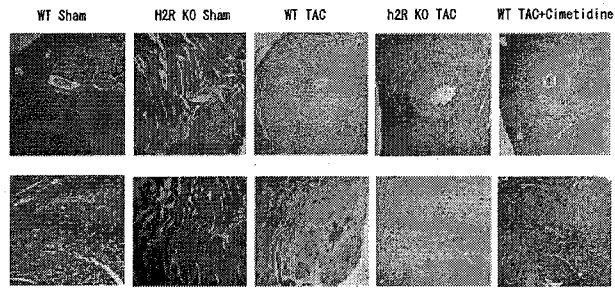


Figure 5

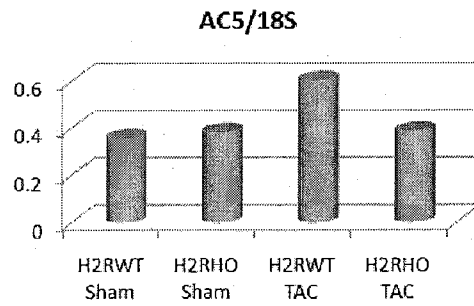


Figure 6

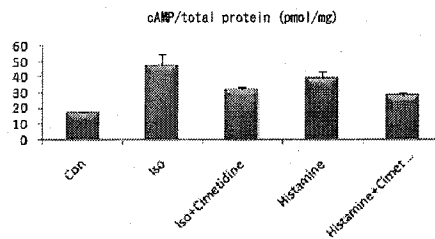


Figure 7

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

国 名 : 米国
所属・職名 : アリゾナ大学医学部 教授
氏 名 : Karl B. Kern (カール ビー カーン)

2. 主任研究者

所属・職名 : 国立循環器病センター 心臓血管内科/緊急部長
氏 名 : 野々木 宏
受入研究者 : 同上

3. 招へい期間

平成 20 年 12 月 9 日～平成 20 年 12 月 19 日 (11 日間)

4. 共同研究課題

心原性心停止蘇生後に対する臓器保護、特に脳蘇生と心機能回復に対する
対策について

5. 研究活動の概要

- 1) 院外心停止・院内心停止の臨床疫学と心肺蘇生法や除細動の効果に関する研究等の意見交換・情報収集
- 2) 蘇生後のケア：心筋保護、低体温、再灌流療法についての意見交換、低体温登録研究に関する共同研究、

6. 共同研究課題の成果

- 1) 院外心停止・院内心停止の臨床疫学と心肺蘇生法や除細動の効果に関する研究について

虚血性心疾患による死亡の半数以上は病院外における突然死であり、循環器疾患治療における救急治療、心肺蘇生領域の重要性が再認識されている。アリゾナ大学は心肺蘇生領域の研究で世界をリードしている。特に、心肺蘇生法の幅広い普及をすすめるためのよりシンプルな心肺蘇生法の開発、検証に力を入れている。われわれは院外心停止者の救命率向上に関する臨床研究から胸骨圧迫のみの蘇生法の有効性を明らかにし、国際ガイドライン改訂に貢献した。更に市民レベルや医療従事者における蘇生法の普及啓発に、心肺蘇生領域の研究で世界をリードしているアリゾナ大学の最新の状況について意見交換を行い、医療従事者への応用について有用性を確認した。また、従来不十分であった院内心停止への対策をはかるため、院内心停止登録の重要性について意見交換を行い、多施設共同研究について有益な意見を交換した。

2) 心原性心停止蘇生後の治療に関する研究

蘇生後脳症や低心機能への対策は、社会復帰率向上のため不可欠なものであり、低体温療法、補助循環下の再灌流療法、治療抵抗性不整脈への治療法はまだ確立されず、先駆的な試みを実施しているアリゾナ大学研究者との交流は新たなエビデンス構築に有益であると考えられた。「心原性ショックの治療」、「蘇生後の低体温療法と冠動脈カテーテル治療の効果と心機能の改善効果」について、意見交換を行った。急性心筋梗塞後のショックには、再灌流療法が必須であり、低心機能からの回復までの期間に機械的補助循環が必要なことと有効な新しい補助装置の紹介があり、今後の適用について意見交換を行った。また、心原性心停止の蘇生後ケアに必要なことは、蘇生後脳症の予防対策と蘇生後低心機能の改善対策が必須であり、そのための臓器保護として低体温療法と緊急冠動脈カテーテル治療、補助循環の必要性について意見交換を行い、今後の心機能改善効果について新たな薬物介入が必要であるとの結論に至り、共同研究含め貴重な意見交換を行えた。

7. 成果の評価

Kern 教授は、心肺蘇生法に関する基礎的・臨床的検討を 25 年にわたりアリゾナ大学のチームと共に実施し、国際ガイドライン改訂におけるリーダーとしての第 1 人者である。すでにアリゾナ大学との共同作業で、我が国からの発信により蘇生に関する国際ガイドラインの改訂が行われた実績がある。したがって、この領域で世界をリードするアリゾナ大学のスタッフと共同研究を行う機会を得たことは、相互にとって有益なことであった。心肺蘇生法の効果の基礎的・臨床的検討を世界に先駆け取り入れ、実践してきた施設の最新の状況を把握するとともに、われわれの研究班で実施している急性心筋梗塞症における蘇生後ケアに関する大規模データ収集について意見交換や共同研究が可能である。また、同施設は心臓マッサージのみの心肺蘇生法に関する基礎的研究だけでなく、実際に単純化された蘇生法を指導した場合の効果を検証するといった研究でも世界をリードしており、われわれの研究における啓発活動において共同作業が可能と考えている。

今後、この機会を利用してこの領域における指導者として厚生労働科学研究の研究者が多くの後進を育成することになり、院外心停止の研究、循環器領域の研究、そして研究支援体制に関する研究を遂行することが期待される。国際共同研究を進めるために、海外と協力し、同時に課題に対処していくことが望ましい。その意味で、今回の事業でアリゾナ大学と臨床研究に関するネットワークを強固にできたことは、大きな成果であると考えます。主任研究者の担当する急性心筋梗塞症と脳卒中に対する超急性期診療体制の構築に関する厚生労働科学研究をはじめとする今後の大規模臨床研究を推進する上で、この成果は十分に反映されると期待される。

主任研究者 野々木 宏

Research Report

Japan Cardiovascular Research Foundation Program for the Invitation of Foreign Scientist

Researcher

Institution The University of Arizona College of Medicine
 UA Sarver Heart Center

Names Karl B. Kern, MD
 Professor of Medicine
 Director, Cardiac Catheterization Lab

Dates December 9-19,2008

Subject / Purpose of Research Visit

The purpose of this visit was to continue to build on ongoing collaborative relationships between US (Arizona) and Japanese (NCVC) clinical researchers. We also shared experiences and ideas related to research for on the clinical epidemiology of out-of hospital cardiac arrest, how to best analyze the effect of cardiopulmonary resuscitation or defibrillation, and how to structure the organization of global collaborative clinical trials on out-of hospital cardiac arrest and other cardiovascular diseases.

Result of the Research Visit

In Tokyo,

On December 9th and 10th, I visited in Tokyo to meet with Dr. Nagao, who was the investigator in J-PULSE project. We discussed the potential challenges in the Utstein-style registry, the new CPR method and the therapeutic hypothermia in Japan. On December 11th, I visited the Tokyo fire department with Dr. Nagao and discussed the differences in emergency systems between US and Japan. the emergency system in Tokyo. On 12th and 13th I had presentations and discussions on University of Arizona resuscitation research to share best practices for the development of the post resuscitation care using the therapeutic hypothermia and coronary intervention. On December 14th we visited to AHA BLS renewal course in JCS-ITC and discussed with Dr. Genka and the instructors about the effective education system.

National Cardiovascular Center

On December 15^h and 16th, I visited the NCVV in Osaka and 17th and 18th at Kyoto University. While there....

- I discussed the current challenges to basic and clinical research in the US and Japan with Dr. Tomoike (Director General of NCVV).
- Dr. Nonogi, Dr. Yokoyama, and other J-Pulse investigators, and I reviewed the current progress and data from the J-Pulse project that is investigating the incidence and etiology of out of hospital cardiac arrest in the Osaka area and the registry for inhospital cardiac arrest. In Kyoto University, I discussed the results in the Utstein Osaka registry with Dr. Kawamura, and Dr. Iwami.
- I toured the several clinical departments and the research institute in NCVV and then discussed similarities and differences between Japan and US. We discussed the NCVV experience in LVAD development and reviewed LVAD use in the US and Japan.
- I gave presentations on the resuscitation science about the new CPR method; cardiocerebral resuscitation and the post resuscitation care for the EMS members, nurses and physicians in Osaka and CCU.
- I and Dr. Nonogi about the collaboration in the future project :PCI in Survivors of Cardiac Arrest—A Multi-Center Registry and Proposal to Evaluate Myocardial Microcirculation Post Resuscitation in Patients

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

国 名 : トルコ

所属・職名 : セルチュク大学教育学部 准教授 (栄養学・食品学博士)

氏 名 : ヌルハン ウヌサン

2. 主任研究者

所属・職名 : 独立行政法人国立健康・栄養研究所 客員研究員

氏 名 : 大賀英史

受入研究者

所属・職名 : 独立行政法人国立健康・栄養研究所 客員研究員

氏 名 : 大賀 英史

3. 招へい期間

平成21年1月16日 ~ 平成21年1月27日 (12日間)

4. 共同研究課題

生活衛生施設が持つコミュニティ機能を活かした健康教育機能の強化と、学童期の子を持つ家族の飲食店や銭湯等の施設利用に関する研究

5. 研究活動の概要

1月16日から1月17日は、生活衛生施設の研究フィールドの一つである東京都文京区にある和風旅館及び施設の近隣の飲食店を活用したワークショップに参加した。参加者に対して、施設機能を活用した、食べ方、身体活動の方法、効果的な休養・ストレス対策 (お茶の飲み方を含む) などの教育を行った過程を参与観察した。

1月19日から1月21日は、国立健康・栄養研究所内にて、分担研究者、協力研究者メンバーを交えて、施設内での健康教育のための情報媒体の内容や、提供方法について、諸外国の先行研究と照らし合わせながら意見交換を行った。

1月21日は国立健康・栄養研究所のイブニングトークにおいて講演会を開催した。(参会者24名)

1月22日から1月23日は、介入フィールドへの情報提供の方法について打ち合わせをし、24日、25日に介入をした内容を1月26日に国立健康・栄養研究所において栄養教育の新たな方法論として検討する研究に従事した。

6. 共同研究課題の成果

主任研究者の研究課題は、人々の暮らしの場ともいえる生活衛生施設（飲食店、喫茶店、居酒屋、銭湯、旅館等）を健康増進に活用する新しいシステムの構築とその効果の評価である。循環器病疾患のリスク要因である食事、飲酒、喫煙等は、行動変容が容易ではないが、専門家の分類とは別に、一般人にとっては広義の“休養”に属するライフスタイルである。

その行動の背景には、従来の医学や栄養学ではあまり立ち入らなかった文化的な要因、すなわち当該個人が属する集団（職場、地域のサークルや組織等）が持つ、余暇生活に関する規範が各人の行動を規定していると考えられる。生活衛生施設の利用スタイルは、健康面から見た良い面も悪い面も併せ、味や規範、スタイルを保持・伝承してきた場ともいえ、この文化的な側面が深く関与している。

そのため、利用者に、健康増進に関する学習を行う場合も、押しつけるのではなく、自然な利用の流れの中で、さりげなく手が伸び、関心が向かう工夫は必要である。本研究では、滞在期間中に、下記の3つのフィールドで介入を行った。

- ①和風旅館におけるワークショップ型のセミナー形式のプログラムに参加した者を対象に、近くの洋食屋を借り切り、味わって食べる食べ方の指導
- ②地域の居酒屋の利用者を対象にした、提供されている食事の食材（野菜）に関する予防医学的効果に関するリーフレットおよび野菜の旬を尋ねるビンゴ形式のゲーム学習教材の利用
- ③珈琲専門店での健康づくりに関する最新の科学的な研究を要約したニュースの情報提供

①と②は、病院や教室で行うものとは、実際の飲食の場で行うものである点、また、料理や飲み物を待っている間の時間と空間を利用する点、また、栄養素そのものの講義ではなく、実際にメニューを選択する際の料理に出てくる食材の理解を促進する点で異なっている。③は、一般的な健康づくりに関する情報は、従来は、教科書に記載せるほど確定した内容であり、情報としての目新しさは少ないが、最新の研究成果のうち、諸外国の第一級のメディアで紹介された情報を日本語で要約した内容であり、タイトルが利用者が関心を示しやすい内容にした学習内容であった。いずれも利用後のインタビューやアンケート調査を行った。以上は共同研究課題であるが、その成果は次のとおりである。

・和風旅館におけるワークショップ型のセミナー

プログラムに参加した者で、主任研究者が昨年度来からの研究により開発した食事法の効果が顕著に現れ、自ら飲食店を利用し、その食事法の普及に努めるようになった。この方法をより学術的に、より普遍的に説明するにあたり、招聘者が関連する英語論文の情報を応用したことにより、諸外国でも実践的な研究が進んでいること、また測定スケールがあることがわかった。

・居酒屋利用者を対象とした予防医学的効果・野菜の旬を学ぶゲーム式学習教材
居酒屋利用者は、グループで利用することが多い。そのため、ビンゴなど集団で楽しめるものを利用することは、健全な競心を刺激し、適度な楽しさのもの、知識の吸収力があることがわかった。また、日頃、食事をしている野菜等に、抗がん作用等が食べている間にわかることが、満足した利用者が多かったことから、栄養教育における影響力が高いことわかった。

・珈琲専門店での健康づくりに関する最新の科学的な研究を要約したニュースの情報提供

珈琲専門店では時間を過ごすために1人で来ることが多く、珈琲を飲んでいる間に手持無沙汰であり、特にアルコールで酩酊していないことから、知的な吸収力が高い状況である。リーフレットをよむ者が多く、さらにもう一杯を注文する傾向がある。値段も安いことから、利用者も長居することにも抵抗がないし、店主も売り上げ向上につながる。その点で店主の協力の得やすさは、比較的高かった。

このうち外国人研究者を招へいたしたことによって得られた効果（成果）は、当該研究者に、英語で説明することで、目的をはじめ、方法論が明確になった。と議論を重ねたことで、日本人研究者では自覚が難しい文化的な特質に我が国の生活文化を、内生的かつ外生的に観察・評価できた。また、英語の学会発表にまとめることで、我が国のある限られた地域での実践の次元を超え、国内外で還元可能な、より普遍的なシステムとして発信することが期待できる。

当該研究者は、研究論文にまとめるのが得意であり、来日する前に、関連した論文を多数レビューしてきていた。栄養教育の専門であるため、飲食店での栄養情報（カロリー等）の提示、食品選択時の意思決定といった学術的な観点からのペーパーが多く、文化論以外の科学的な観点から考察できたことで、国際学会への発表を促された。

7. 成果の評価

主任研究者の研究課題は、都市化が進む社会において、生活衛生施設が潜在的に有する教育機能を最大限引き出した健康増進のシステムの開発を課題である。招聘希望者は、過去の日本での滞在時に数々の日本文化を積極的に学び、一方で、学生時代での英国留学や、研究者としての欧州各国での国際学会で活発な活動を行ってきた。この参加により、これまで切り込みにくかった公衆衛生における生活文化的な側面に光をあてることができた。本年5月にトルコで開かれる国際学会（マルチプルインテリジェンスと教育）、幕張で開かれる国際学会（国際健康教育・ヘルスプロモーション学会アジア大会）で発表するべく登録をした。

主任研究者 大賀 英史

Research Report

Japan Cardiovascular Research Foundation

Program for the Invitation of Foreign Scientists to Japanese Institutions

Researcher

Institution Selcuk University
Education Faculty, Konya/Turkey

Name Nurhan Unusan
Associate Professor

Dates 16th-27th, 2009

Subject / Purpose of Research Visit

The purpose of this visit was to build on going collaborative relationships between Turkish and Japanese nutrition education investigators. The Collaborative Project was to evaluate the feasibility of an intervention aimed at offering health information to change to the desirable health behavior in restaurants and coffee shops.

Result of the Research Visit

On January 16th, I participated in a workshop on Mindfully Eating Style in Hongo. An NIDDM patient made a speech on how he found functional to use mindfully eating approach. Then we had dinner in a French style restaurant-the aim was to practice to eat mindfully.

On January 17th, I and other participants enjoyed traditional Japanese tea by using mindfulness approach. Later I and Dr Oga discussed the potential challenges in applying the mindfulness approach.

On January 19th, I toured the NIHN. I visited Nutritional Education Program and we made some discussions with Dr Aiba. We decided to make a cross-cultural research paper on “child and parent characteristics related to parental feeding practices”.

On January 20th, I and Dr Oga visited Information Center at the NIHN and we had a meeting with Dr Hirota on nutrition education materials.

On January 21th, I and my colleague visited Center for Collaboration and Partnership at the NIHN. I reviewed the current status and data from Japanese population based study of BMI. We had a meeting with Dr. Mizuno on trend of BMI by age and sex in Japan and we decided to make a comparative research paper and we started collecting data while I was there.

On January 22nd, I was invited to deliver an oral presentation. The title was “Developing the Organic Option in Turkey”. After that Dr Oga, Dr Kasaoka, Dr Omori and other 16 NIHN researchers and I discussed the current situation and public awareness on organic products both in Japan and Turkey.

On January 23rd, Dr Omori, Dr Oga and I discussed the differences in eating behavior both in Japan and Turkey.

On January 26th, I and Dr Oga decided to make another paper on the following topic:

- Comparison of mindfulness, perceived stress and health behaviors in university students

As a conclusion Dr Unusan's tenure thought to be highly successful, based on the report, it is promising that the JCVRF would agree.

A practical intervention and discussion records

Learning nutrition at Restaurant and Cafes

Nurhan Unusan, Ph.D

Associate Professor of Nutrition

Selcuk University Konya, Turkey

Hidefumi Oga, Ph.D Guest Researcher

National Institute Health and Nutrition Tokyo, Japan

(Background)

While consumers have become more aware of and interested in nutrition, people are unsure of how to apply nutrition guidelines to their food choices. Restaurant and café house can be modified to provide cues and reinforcements for healthy eating behavior, and to increase the availability of more healthful goods. As a result eating establishments such as Restaurant and café house are a practical setting for health promotion activities, allowing access to a large number of people and satisfying the consumer's need for information about healthy eating.

In Japanese situation, people willingly learn the latest scientific knowledge about Nutrition for health promotion through TV, Newspaper. Fortunately consciousness of people becomes keen. On the other hand, business people who have dinners at pub restaurants as business meeting several time a week. Become think little about nutritional matters in such situation. As they become drunk, they lose the mind to apply nutritional knowledge for selection of food.

(Objectives)

We utilize the place and relationships at café and restaurants to make bridge between academic knowledge and practical situation of food selecting and eating

(Material and Method)

Trial 1. A master of Japanese Pub restaurant educated by researchers gave some nutritional advices or comments to customers. To make up for the master's lack of nutritional knowledge, some colorful information leaflets information

leaflets made by us. They were fit in counter or desk to help customer to get knowledge.

Trial 2. Information leaflets containing the abstract of latest scientific researches for health and nutrition were fit in counter or desk. The information were summarized and translated by famous magazines ie Newsweek or TV ie the BBC news. The customer who showed some interests to the leaflets, the master of cafe made talks with them.

(Results)

No a few customers found the information leaflets and were absorbed in the nutritional knowledge. In Pub restaurant, most of them recovered from drunken condition, tried to order menu of full of vegetable. In cafe people utilize the time for drinking one or 2 cups of coffee, to get information of nutrition. Both of shop masters learned the knowledge to give the small advice to customer as volunteer health educator.

(Discussion)

As a conclusion it can be regarded that the restaurant and cafe are practical learning settings for nutrition. They can make great contribution to the customer who wants to learn nutrition.

(Conclusion)

Giving the customer the information of health promotion by shop masters can help the customer to learn and apply them to their eating behaviors.

平成 20 年度分

Ⅱ 若手研究者育成活用事業
(リサーチ・レジデント)

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名
村上 晴香

2. リサーチ・レジデント期間
平成 20 年 4 月 1 日 ~ 平成 21 年 3 月 31 日

3. 受入機関
名 称 : 独立行政法人 国立健康・栄養研究所
所 在 地 : 東京都新宿区戸山 1-23-1

4. 研究指導者
所 属 : 健康増進プログラム 運動ガイドラインプロジェクト
職 名 : プロジェクトリーダー
氏 名 : 宮地 元彦

5. 研究課題
生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究

6. 研究活動

①概要

平成 20 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において「生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究」に関する研究課題に関し、「身体活動量と生活習慣病危険因子との関連」および「運動行動および摂食行動と生活習慣病危険因子との関連」の分野に関する研究を行った。

②内容

1) 研究背景および目的

生活習慣病は、食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が、その発症・進行に関与する疾患群である。平成 18 年に改訂された「健康づくりのための運動基準 2006」および「エクササイズガイド 2006」では健康増進、特に生活習慣病予防に有効な身体活動量の基準値や目標が提示され、「生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究」では、その基準値の妥当性を検討することを目的に行った。

本研究では、健康な成人を対象に、運動基準を満たす人（活動群）、満たさない人（非活動群）における生活習慣病危険因子の比較、および、非活動群に身体

活動量を増大させるための介入を 1 年間行った際の生活習慣病危険因子の変化について検討を行うこととした。また、生活習慣病には、運動行動以外にも、食習慣の影響も強く受ける。そこで、特に行動という観点から、運動行動、摂食行動が生活習慣病危険因子に及ぼす影響を明らかにすることを目的に行った。

2) 方法

2- 1) 対象者

対象者は、「生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究」に同意した 30 歳から 64 歳までの健康な男女である。ベースライン測定を終了した者は 605 名で、1 年後測定を終了した者は 295 名であった。運動基準である 23EX/週に当たる歩数である 10,000 歩/日および 3.3EX/日を満たしている場合を活動群 (226 名)、満たしていない場合を非活動群 (256 名) とした。また非活動群は、さらに 2 群に分けられ、1 年間の身体活動・運動指導を受ける人 (運動介入群 127 名)、受けない人 (非活動対照群 129 名) に群分けされた。また、ベースライン測定者 605 名の対象者のうち、摂食行動・運動行動質問票に回答した者は 268 名だった。

2- 2) 測定項目

- a. 生活習慣病危険因子 (体重、BMI、体脂肪率、腹囲、血糖、中性脂肪、HDL-コレステロール、血圧)
- b. 現在の身体活動量 (メッツ・時) : 3 次元加速度計による
- c. 過去 1 年間および思春期・青年期の運動歴 : 質問票による
- d. 現在の摂食行動 (摂食の意識的な抑制、感情的摂食、空腹感) :
Three-Factor Eating Questionnaire R21 (TFEQ R21) による

2- 3) 統計解析

すべての測定値は、平均値±標準偏差で示した。ベースラインにおける各変数の比較は対応のない t-test を行い、3 群における 1 年間の変化の比較には、2 元配置の分散分析を用いた。また各群におけるメタボリックシンドロームの該当者・予備群の度数の比較、および生活習慣病危険因子の有無および運動行動の有無との比較には χ^2 検定を用いた。また各変数の関係は、Pearson の相関係数により検討した。生活習慣病危険因子に対する運動行動や摂食行動の寄与に関しては重回帰分析におけるステップワイズ法を用いた。すべての統計の有意水準は危険率 5% とした。

3) 結果および考察

3- 1) 身体活動量と生活習慣病危険因子との関連

本研究において、メタボリックシンドロームの該当者・予備群は、12.3% だった。男女別にみると、男性では 20.7%、女性では 7.7% だった。特定健診・保健指導の対象となる 40 歳以上では、メタボリックシンドロームの該当者・予備群は、男性 31.5%、女性 11.1% だった。

また、ベースラインにおける活動群、非活動群の生活習慣病危険因子の値を表 1 に示した。非活動群は、活動群と比較して有意に腹囲が大きく ($p < 0.05$)、中性脂肪も高い値を示した ($p < 0.05$)。また HDL-コレステロールは、活動群において有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。さらにメタボリックシンドロームの該当者・予備

表1 2群における生活習慣病危険因子の比較

	活動群(n=226)	非活動群(n=256)	p-value
年齢	48.0 ± 9.8	47.4 ± 9.9	n.s.
男性/女性	77 / 149	93 / 163	
身長(cm)	161.1 ± 8.8	162.1 ± 8.3	n.s.
体重(kg)	58.7 ± 10.3	60.1 ± 10.3	n.s.
BMI	22.5 ± 2.9	22.7 ± 3.1	n.s.
腹囲(cm)	79.6 ± 9.0	81.3 ± 8.8	p<0.05
収縮期血圧(mmHg)	117.8 ± 12.9	118.7 ± 14.7	n.s.
拡張期血圧(mmHg)	71.5 ± 10.0	72.2 ± 10.2	n.s.
空腹時血糖(mg/dl)	90.7 ± 8.0	91.0 ± 8.3	n.s.
中性脂肪(mg/dl)	82.2 ± 45.1	92.6 ± 57.6	p<0.05
HDL-C(mg/dl)	67.2 ± 16.5	62.8 ± 15.0	p<0.05

群の割合を比較したところ、非活動群では、該当者・予備群の割合は15%で、活動群(5%)と比較して高い割合だった(p<0.05)。

活動群、非活動対照群、運動介入群の3群における1年間の変化を比較したところ、生活習慣病危険因子の変化に3群間に有意な交互作用は認められなかったものの、腹囲に関しては、運動介入群において減少が大きい傾向を示した(p=0.07)。また、空腹時血糖については、3群の間に有意な交互作用は認められなかったが、ベースラインから1年目において有意な変化を示しており、多重比較検定を行ったところ、活動群および運動介入群においてのみ有意な低下を示した(p<0.05)。メタボリックシンドロームの該当者・予備群の1年後の人数変化については、3群間に有意な差は認められなかった。

3-2) 運動行動・摂食行動と生活習慣病危険因子との関連

本研究では、運動行動および摂食行動が生活習慣病危険因子にどのような影響を及ぼしているかを検討するため、268名を対象に、ベースラインにおいて運動行動、摂食行動を評価した。現在の運動行動は、3次元加速度計による身体活動量(メッツ・時/日)で評価し、268名において平均4.1±2.4メッツ・時/日であった。また過去1年間の運動行動を質問票により評価した。過去1年間に1日合計30分以上の軽く汗をかく運動を週2日以上実施している人は126名(47.2%)で、実施していない人は141名(52.8%)だった。また思春期・青年期における運動行動についても質問票により評価した。小学生から大学生までにおいて運動を定期的に(週2日以上、1回30分以上)行っていたことがある人は168名(62.9%)で、行っていなかった人は37.1%だった。

摂食行動に関しては、TFEQ R21を用いて、評価した。この質問票から1)摂食の意識的な抑制(factor 1)、2)感情的摂食(factor 2)、3)空腹感(factor 3)の3つのカテゴリー別に算出される。これらが高得点の場合は、該当する要因が高度であることを示す。得点の最高値は、factor 1が24点、factor 2が24点、factor 3が36点である。本研究の被験者において、factor 1-3の平均値は、それぞれ13.8±3.1、15.4±4.3、9.6±3.9だった。また、これら各factorを性別で検討すると、factor 2(男性14.3±4.1、女性15.6±4.4、p<0.05)および3(男性8.5±3.5、女性10.1±4.0、p<0.05)において、女性で有意に高い値を示した。また、年齢との相関について検討したところ、女性においては、全てのfactorで年齢との相関が認められた(factor 1: r=-0.142, factor 2: r=-0.220, factor 3: r=-0.265, p<0.05)。また、男性では、factor 2においてのみ有意な相関が認められた(r=-0.285,

p<0.05)。つまり、女性は男性と比較して好ましくない摂食行動を取りがちであり、また加齢と共に摂食行動が改善されることが示唆された。

さらに、生活習慣病危険因子に対して、これら運動行動、摂食行動がどの程度関与しているかを検討するため、各生活習慣病危険因子に対する重回帰分析を行った(表2)。その結果、BMIに対して最も大きく関与している因子として、摂食行動における感情的摂食であった。これは、「さみしくなった時は食べることで慰めている」や「神経質になったときに食べることで落ち着かせようとする」といった感情的摂食が多い人ほどBMIの数値が高くなるという結果であった。また、現在の身体活動量が多い人ほど、BMIは低い値を示し、過去1年間の運動歴がある人は、BMIが低いことが示された。そのほか、生活習慣病危険因子である収縮期血圧や血中グルコース、中性脂肪、HDL-Cは、年齢や性別の影響を大きく受けるものの、いくつかの運動行動や摂食行動の意識的な抑制が影響していることが認められた。

表2 生活習慣病危険因子と行動因子における重回帰分析

	年齢	性別	運動行動			摂食行動			R	p value
			現在の身体活動量	過去1年間の運動歴	思春期・青年期の運動歴	摂食の意識的な抑制	感情的摂食	空腹感		
BMI	-	-	-0.134	0.104	-	-	0.155	-	0.302	P<0.01
収縮期血圧	0.321	-0.159	-	0.131	-	-0.146	-	-	0.371	P<0.01
グルコース	0.200	-0.121	-	-	-	-	-	-	0.215	P<0.01
中性脂肪	0.177	-0.246	-0.093	0.095	-0.163	-0.101	-	-	0.358	P<0.01
HDL-C	-	0.415	0.215	-	-	-	-	-	0.473	P<0.01
メタボリスク数	0.252	-0.303	-	0.136	-	-0.110	-	-	0.386	P<0.01

表内における数値は、ステップワイズ法を用いた際の変数の標準化係数 β を示す。-は、除外された変数を示す。

性別: 男性=1, 女性=2

過去1年間の運動歴: あり=1, なし=2

思春期・青年期の運動歴: あり=1, なし=2

③成果

本研究では、運動基準・運動指針に示された「健康の維持・増進に必要な身体活動・運動量」と生活習慣病危険因子との関連を検討した。ベースラインの横断的データにおいて、運動基準にあたる10,000歩/日および3.3EX/日を満たしている人は、腹囲や中性脂肪、HDL-Cコレステロールといった生活習慣病危険因子に有効であることが示唆された。一方、3群において生活習慣病危険因子の1年間の変化を比較したところ、3群の間に有意な差は認められなかった。1年間という期間では生活習慣病の発症は少なく、それらに有意な変化をもたらすに至っておらず、今後さらに被験者数の追加や、長期間の追跡を行い、生活習慣病の発症をアウトカムとした検討を行うことが必要である。

また、運動行動および摂食行動と生活習慣病危険因子との関連では、各生活習慣病危険因子に対して、どのような行動が影響を及ぼしているかが明らかとなった。これらの結果は、それぞれの生活習慣病危険因子を保有する人に対して、どのような行動を変容させることが効率的であるかを示すものであり、保健指導の現場においても有用な情報であると考えられる。しかしながら、これらデータは横断的データであるため、今後は縦断的に、これら行動が変容することにより、生活習慣病危険因子に改善が起こるかを検証する必要がある。

(論文発表および総説)

M. Miyachi, Y. Ohmori, K. Yamamoto, H. Kawano, H. Murakami, A. Morita, and S. Watanabe. The use of a uniaxial accelerometer to assess physical-activity-related energy expenditure in obese men and women: Saku Control Obesity Program (SCOP). *Anti-Aging*

Med. 5 (1): 1-5, 2008.

村上晴香, 埜 智史, 宮地元彦. 日常生活における身体活動量アップのための保健指導. 栄養日本. In press

(学会発表)

H. Murakami, M Iemitsu, K Yamamoto, H Kawano, Y Gando, Y Omori, K Sanada, M Miyachi. The effect of physical activity on the association between homocysteine levels and MTHFR genotype. APS Intersociety Meeting: The integrative biology of exercise, 2008

村上晴香, 家光素行, 山元健太, 河野寛, 丸藤祐子, 真田樹義, 宮地元彦. 血中ホモシステイン濃度と MTHFR 遺伝子多型の関連に対する身体活動および葉酸摂取の影響. 第 63 回日本体力医学会, 大分, 2008

④主任研究者 (又は受入研究者) の評価

本リサーチ・レジデントは、「生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値策定を目的とした大規模介入研究」において、被験者との測定や介入についての綿密な日程調整等を行い、本研究の円滑な進行をもたらしており、十分な評価が与えられる。また、「運動基準 2006」「エクササイズガイド 2006」において示された基準値の妥当性を、生活習慣病危険因子 (腹囲、血圧、血糖、血中脂質等) との関連から分析し、結果を得ている。また、様々な行動因子 (身体活動・運動行動、摂食行動) の影響についても有用な結果が認められている。これらについては、今後の特定健診・保健指導の現場において非常に有用な情報となり得る。そういった点からも非常に評価できる。

主任研究者 (又は受入研究者) 宮地 元彦

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名

大河原 一憲

2. リサーチ・レジデント期間

平成 20 年 4 月 1 ～ 平成 21 年 3 月 31 日

3. 受入機関

名 称 : 独立行政法人 国立健康・栄養研究所

所 在 地 : 東京都新宿区戸山 1-23-1

4. 研究指導者

所 属 : 健康増進プログラム エネルギー代謝プロジェクト

職 名 : エネルギー代謝プロジェクトリーダー

氏 名 : 田中 茂穂

5. 研究課題

日常生活時における身体活動量およびエネルギー消費量の推定法に関する実験的検討

6. 研究活動

① 概要

平成 19 年度より上記 4 の研究指導者の下において「日常生活時における身体活動量およびエネルギー消費量の推定法に関する実験的検討」に関連するいくつかの研究課題に取り組んできた。平成 19 年度は、研究課題「日常生活でみられる様々な身体活動動作における活動強度の推定」を中心に実施した。平成 20 年度は、平成 19 年度の検討により開発に成功した活動量計を用いて、特に「生活活動を考慮した 3 メッツ以上の身体活動量と歩数との関係」を課題とした実践的研究に着手した。

② 研究内容（中心的に実施した研究）

1) 目的

1995 年に、アメリカスポーツ医学会（American College of Sport Medicine: ACSM）とアメリカ疾病予防センター（Centers for Disease Control and Prevention: CDC）は、共同で疾病予防（主に冠動脈疾患の予防）に対する運動（身体活動）指針を提言した。それは、「1 日 30 分以上の中強度活動をほぼ毎日行なうことが望ましい」といったもので、従来の「運動実践」という考え方から「日常生活活動を含めた身体活動量の増加」を目標とする考えにシフトした。その後、2009 年にいたるまでこの

指針はほぼそのまま用いられている。2008年10月にはアメリカ保健福祉省から「アメリカ人のための身体活動ガイドライン2008」が発表され、ACSM/CDC(1995)の勧告とほぼ同じであるが、週合計運動時間のみによる提言がなされた(中強度活動であれば週150分)。国内において、2006年に健康づくりのための運動基準2006—身体活動・運動・体力—(以下、運動基準2006)が厚生労働省から発表された。そのなかで、健康の維持・増進に必要な身体活動・運動量として、強度が3メッツ以上の身体活動を23メッツ・時/週、運動を4メッツ・時/週実践することが推奨されている。23メッツ・時/週の身体活動量とは、3メッツ以上の強度の身体活動で1日当たり約60分行うことに相当し、歩行中心の活動で考えると、約6000歩(10分当たり1000歩で60分)に、低強度で意識されない歩数約2000~4000歩を加えた、1日当たり8000~10000歩が目安になると示されている。しかしながら、これはあくまでも試算したものであり、23メッツ・時/週と1日当たり8000~10000歩が日常生活環境下で実際に一致するかどうかは検討が必要である。

身体活動は、歩行や走行といった移動を伴う活動と、比較的移動を伴わない活動に大別できる。家事などの日常生活活動は移動の少ない活動の一つといえる。アメリカ人のための身体活動ガイドライン2008や運動基準2006で提言されている推奨身体活動量は、3メッツ以上の強度を条件に、いずれの身体活動で行われた場合も活動量として含む。そのため、歩数と日常生活下における身体活動量との関係を検討する際は、歩数に反映されにくい、移動を比較的伴わない活動も考慮しなければならない。我々はヒューマンカロリメーター(エネルギー代謝測定室)を用いて、ウォーキングおよびジョギングを中心に1日過ごした際のエネルギー消費量および身体活動レベル(1日の総エネルギー消費量を基礎代謝量で除した値)を測定した(Ohkawara et al., Am J Clin Nutr, 2008)。中強度活動の多い日および高強度活動の多い日の身体活動レベルはそれぞれ平均で約1.82と1.74となり、日本人の食事摂取基準(2005年度版)における「ふつう:1.75(1.60~1.90)」、アメリカ人の食事摂取基準(2004)における「Active」の身体活動レベルに区分される(表1)。すなわち、ほとんどの活動を歩行のみにした場合、身体活動レベルを「ふつう(またはActive)」に維持するためには、1日4時間も歩行活動を行う必要があること示唆している。しかしながら、一般的な日常生活下において、多くの人が該当する「ふつう(またはActive)」の身体活動レベルで過ごしている者が、1日4時間も歩いているとは考えにくい。このことから、歩行などの移動を伴う活動以外で稼いでいる活動量が日常生活下において少なくないことが推察される。

表1. 各プロトコルでヒューマンカロリメーターに1日すごした際の身体活動レベル

	活動内容	身体活動レベル
1. コントロールの日	ゆっくり歩行 : 30分×1回 速歩 : 30分×1回 ジョギング : 15分×1回 合計 : 75分	1.42 ± 0.10
2. 中強度活動の多い日	ゆっくり歩行 : 30分×1回 速歩 : 30分×1回 + 15分×11回 ジョギング : 15分×1回 合計 : 240分	1.82 ± 0.14
3. 高強度活動の多い日	ゆっくり歩行 : 30分×1回 速歩 : 30分×5回 ジョギング : 15分×4回 合計 : 180分	1.74 ± 0.15

これまで自由生活下における身体活動の量および質をともに評価する方法として質問紙調査が広く使われてきた。しかしながら、質問紙調査による限界も数多く指摘されており (Dale et al., Human Kinetics Publishers, 2002)、より客観的で精度の高い方法の確立が求められている。我々は3次元加速度を利用し、歩行系活動に加えて日常生活活動も精度よく評価できる活動量計の開発に成功した。そこで、本研究は日常生活活動による活動量を考慮した疾病予防に対する推奨身体活動量と歩数との関係について検討することを目的とした。

2) 方法

1. 被験者

対象者は、健康な成人男性 54 名 (年齢: 38.8 ± 11.5 歳、身長: 171.3 ± 6.3 cm、体重 68.8 ± 11.8 kg、BMI: 23.4 ± 3.6 kg/m²) および成人女性 32 名 (年齢 42.5 ± 12.2 歳、身長: 156.6 ± 5.9 cm、体重 58.7 ± 11.6 kg、BMI: 23.9 ± 4.4 kg/m²) であった。

2. 測定プロトコル

各対象者の身長および体重を測定した。その後、活動量計を2週間装着してもらい、1日の歩数および3メッツ以上の強度による活動量 (メッツ・時) を算出した。対象者には、睡眠および活動量計が水に浸かる活動 (入浴や水泳など) 以外の全ての時間に活動量計を装着するよう指示した。

3. 活動量計

活動量の測定には3次元加速度計 (HJA-350IT オムロンヘルスケア社製) を用いた。同機器の外形寸法は幅 74×高さ 46×奥行き 34mm、質量は 60g で、腰部にクリップにて装着して測定する。歩数および活動量 (メッツ・時) は、専用ソフトを用いて、得られた3次元合成加速度データから算出する。なお、同機器の特徴は、活動タイプによって合成加速と重力加速度の関係性が異なることを利用し、活動量を生活活動と歩行活動に分けて算出できることであり (Oshima et al., NAASO, 2007, Ohkawara et al., NAASO, 2007)、その妥当性は二重標識水法を用いた検討によっても認められている (Hikihara et al., RACMEM (図 1))。

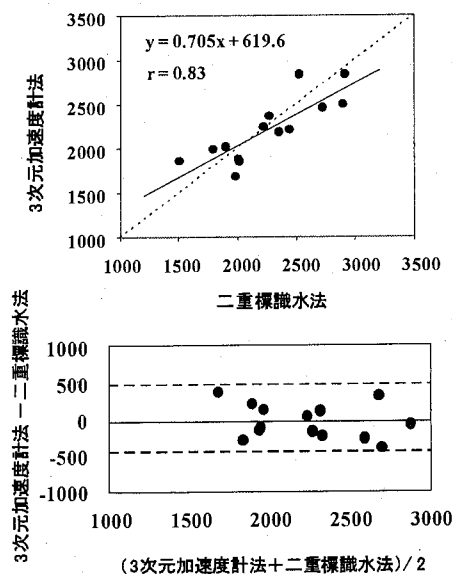


図1. DLW法および3次元加速度計法により求めた総エネルギー消費量(kcal)の関係

3) 結果

本研究の対象者において、歩数は男性が平均 8304 ± 2516 歩/日 (4210~14658 歩/日)、女性が平均 6812 ± 2049 歩/日 (3462~12102 歩/日) であった。強度が3メッツ以上の生活活動は、男性が平均 10.8 ± 9.1 メッツ・時/週 (1.0~40.6 メッツ・時/週)、女性が平均 13.4 ± 8.7 メッツ・時/週 (3.4~40.6 メッツ・時/週) であった。また、強度が3メッツ以上の歩行活動は、男性が平均 23.9 ± 11.2 メッツ・時/週 (3.9~52.6 メッツ・時/週)、女性が平均 13.0 ± 6.0 メッツ・時/週 (3.6~28.3 メッツ・時/週) であった。さらに、強度が3メッツ以上の生活活動と歩行活動を合計した総活動量は、男性が平均 34.7 ± 14.7 メッツ・時/週 (9.0~81.5 メッツ・時/週)、女性が平均 26.4 ± 10.8 メッツ・時/週 (10.6~58.5 メッツ・時/週) であった。

1日の歩数と強度が3メッツ以上の生活活動による週当たりの活動量との間には、男女ともに有意な相関係数は得られなかった (男性: $r = 0.218$, $P = 0.11$ 、女性: $r = 0.230$, $P = 0.21$)。一方、1日の歩数と強度が3メッツ以上の歩行活動による週当たりの活動量との間には、男女ともに有意な相関係数が得られた (男性: $r = 0.874$, $P < 0.01$ 、女性: $r = 0.783$, $P < 0.01$)。また、1日の歩数と強度が3メッツ以上の週当たりの総活動量との間においても、男女ともに有意な相関係数が得られた (男性: $r = 0.798$, $P < 0.01$ 、女性: $r = 0.616$, $P < 0.01$)。

運動基準 2006 で勧告されている健康の維持・増進に必要な推奨身体活動量 (23 メッツ・時/週) に相当する歩数は、男性で 6708 歩/日、女性で 6416 歩/日であった。一方、カウントに含める活動を3メッツ以上の歩行活動のみに限定して考えた場合に得られる23メッツ・時/週に相当する歩数は、男性で 8125 歩/日、女性で 9495 歩/日であった。また、アメリカ人のための身体活動ガイドライン 2008 で勧告されている疾病予防に必要な推奨身体活動量 (中強度活動 (3-6 メッツ) で150分/週、強度活動を4.5メッツで換算して11.25メッツ・時/週) に相当する歩数は、男性で 5107 歩/日、女性で 5048 歩/日であった。カウントに含める活動を3メッツ以上の歩行活動のみに限定して考えた場合に得られる150分/週に相当する歩数は、男性で 5808 歩/日、女性で 6336 歩/日であった。

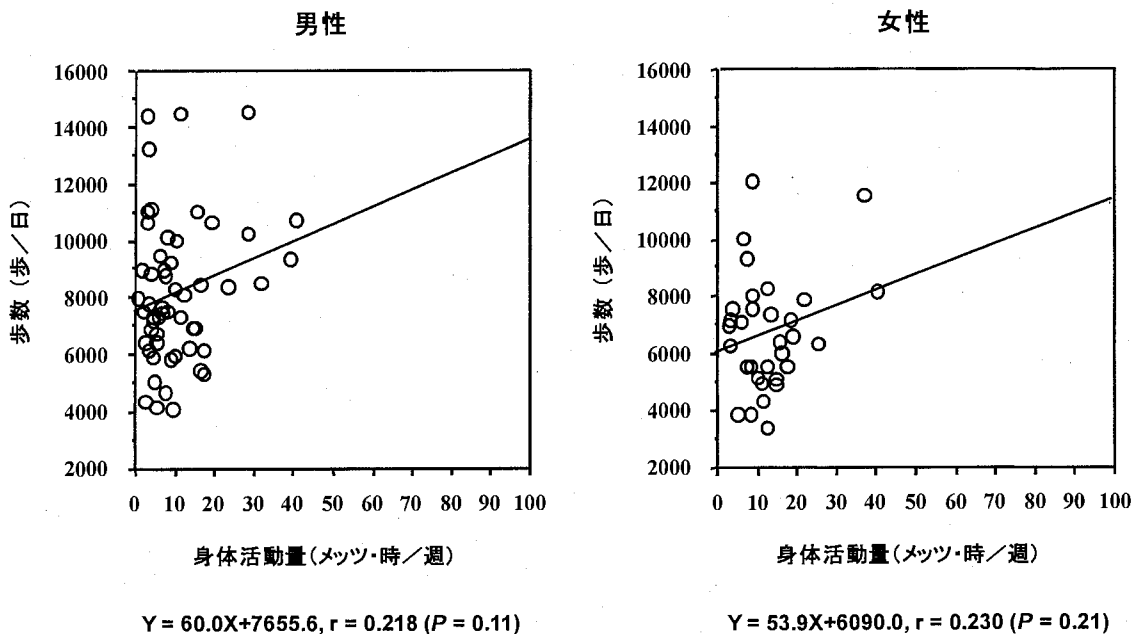


図2. 1日の歩数と週当たりの身体活動量(3メッツ以上の生活活動のみ)との関係

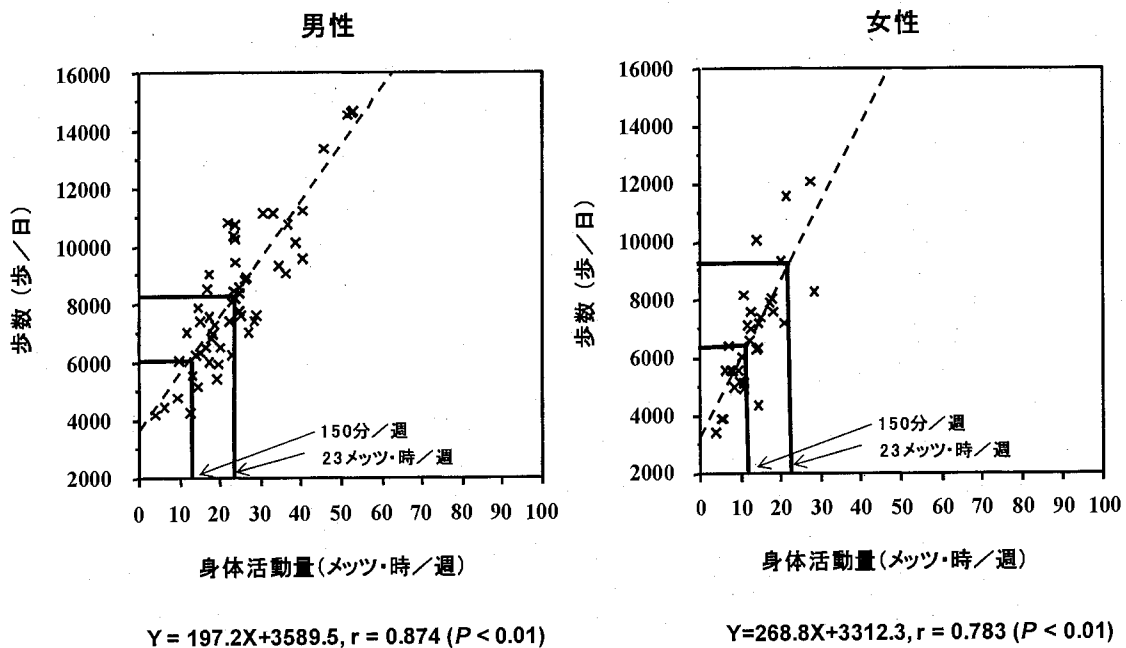


図3. 1日の歩数と週あたりの身体活動量(3メッツ以上の歩行活動のみ)との関係

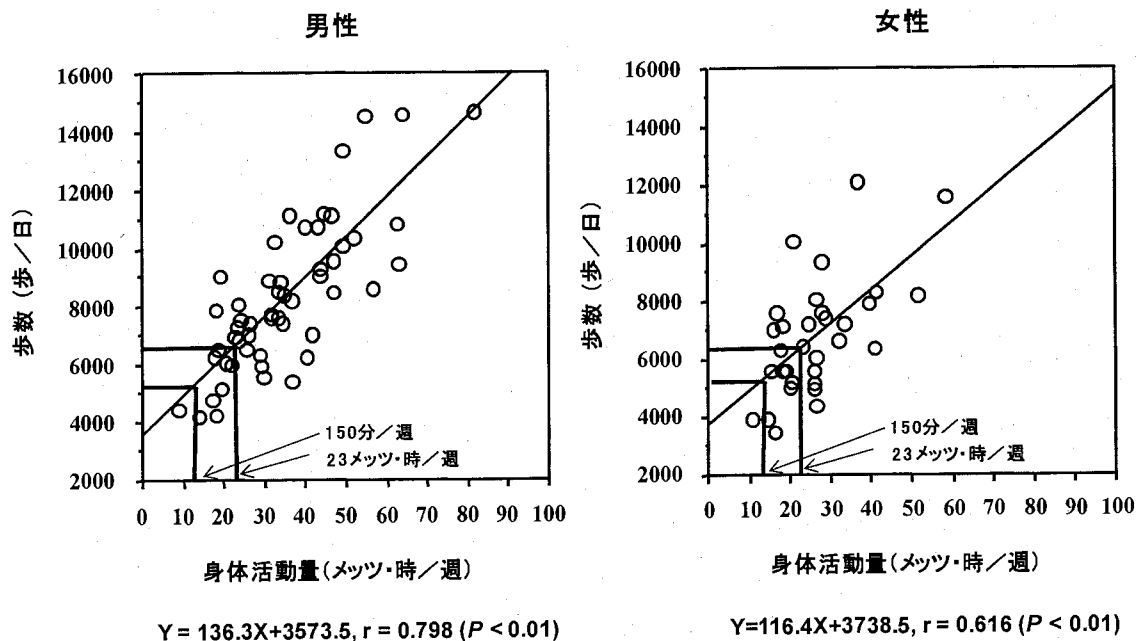


図4. 1日の歩数と週あたりの身体活動量(3メッツ以上の全ての活動)との関係

4) 考察

厚生労働省により発表された運動基準 2006 やアメリカ人のための身体活動ガイドライン 2008 で提言されている推奨身体活動量の評価では、3メッツ以上の強度を条件に、あらゆるタイプの活動もすべて含めて考えなければいけない。そのため、家事などの日常生活活動についても、歩行活動と同様にカウントする必要がある。そこで、本研究では、日常生活活動も妥当に評価できることを特徴とした3次元加速度計を用いて、日常生活活動による活動量も考慮した推奨身体活動量と歩数との関係について

検討した。1日の歩数と強度が3メッツ以上の週当たりの総活動量との関係式から23メッツ・時/週（運動基準2006）に相当する歩数を算出したところ、男性で6708歩/日、女性で6416歩/日となり、歩行中心の活動で考えた場合の目安として示されている1日当たり8000~10000歩よりも明らかに低い値が得られた。このことから、生活活動も身体活動量の増加に貢献しており、歩行活動を高く維持することだけが必ずしも推奨身体活動量を満たす条件ではないことが示唆された。

一方、3メッツ以上の活動が歩行活動のみであると想定し、1日の歩数と強度が3メッツ以上の歩行活動による週当たりの活動量との関係から、23メッツ・時/週に相当する歩数を算出したところ、男性は8125歩/日、女性は9495歩/日であった。これは、歩行中心の活動で考えた場合の目安として示されている、1日当たり8000~10000歩の範囲内であり、3メッツ以上の活動がほとんど歩行活動で占められる対象者には8000~10000歩を目安とすることが妥当であったことを示唆している。また、23メッツ・時/週に相当するかどうかという議論を抜きにしても、1日の歩数を8000~10000歩に維持することが生活習慣病の予防に効果があることはいくつかの論文より示されている（Tudor-Locke et al., MSSE, 2008, Swartz et al., Prev Med, 2003, Thompson et al., MSSE, 2004）ため、望ましい身体活動量としてのひとつの目標値にすることは有用かつ実践的である。

本研究において、3メッツ以上の活動で週150分/週に相当する歩数は、男性で5107歩/日、女性で5048歩/日であった。Tudor-Locke et al. (MSSE, 2008)は、歩数による身体活動レベルの区分として、1) 5000歩/日以下 (sedentary)、2) 5000-7499歩/日 (low active)、3) 7500-9999歩/日 (somewhat active)、4) 10000-12499歩/日 (active)、5) 12500歩/日以上 (highly active) を提唱しており、健康の維持には somewhat active レベル以上が望ましいとしている。また、7500歩/日 (somewhat active の下限値) は週150分/週とおおよそ同等（又はやや高い）の活動レベルであると述べられている。しかしながら、本研究の対象者を用いて週150分/週に相当する歩数を求めたところ、男女ともに6000歩にも満たなかった。これは、測定方法の違いや限界も含め、健康関連指標を歩数から検討した場合と身体活動量全体から検討した場合に生じた差異と考えられる。

国内において、平成12年より「21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）」が開始され、身体活動・運動の目標のひとつに日常生活における歩数の増加が定められた。平成9年の国民栄養調査では、成人男性の平均歩数が1日8200歩、成人女性の平均歩数が1日7282歩だったことから、1日当たりおよそ1,000歩の増加に相当する男性1日9200歩、女性1日8300歩を目標値とした。平成16年には中間評価が実施されたが、国民栄養調査の結果（平成16年）では男女ともに策定時の平均歩数を下回っていた（男性：1日7532歩、女性：1日6446歩）ことで政策上の問題が議論されている。しかしながら、本研究において、23メッツ・時/週（運動基準2006）に相当する歩数は男性で6708歩/日、女性で6416歩/日であり、平成16年度の国民栄養調査の結果であっても運動基準2006で定められた23メッツ・時/週に相当する歩数を上回っていることにある。ただし、本研究の対象者における平均歩数は男性が 8304 ± 2516 歩/日、女性が 6812 ± 2049 歩/日であったことも事実であり、一概に6000-7000歩で十分であるとはいえない。今後はこれらの整合性についても検討していく必要がある。

本研究において、歩数と3メッツ以上の週当たりの総活動量または歩行活動のみによる活動量との関係式から算出した、23メッツ・時/週に相当する歩数の間には、男女ともに大きな差が認められた。特に女性の方が顕著で、平均値だけからみると、総活動量に対する歩行活動と生活活動の割合はほぼ同じであった。本研究の対象者に

専業主婦が含まれていたことなどからも推察されるように、わが国の文化的・社会的背景が結果に影響したといえる。ただし、男性においても、生活活動によって得られた活動量の範囲が 1.0~40.6 メッツ・時/週と幅広く、職業等の違いも総活動量に占める生活活動の割合に影響を与えらるゝと考えられる。今後は、生活スタイルの違いを明確にし、それがどの程度歩数や 23 メッツ・時/週に影響を与えるかを検討していく必要がある。また、先行研究において 3 メッツ以下の活動の重要性も示唆されており (Pate et al, *Exerc Sport Sci Rev*, 2008)、比較的強度が低いタイプの活動が多い生活活動が総エネルギー量にどの程度貢献するのかについても検討していく必要がある。

5) 結論

生活活動も妥当に評価できることが報告されている 3 次元加速度計を用いて検討した結果、運動基準 2006 で健康の維持・増進に必要な身体活動量として推奨されている 23 メッツ・時/週に相当する歩数は、男性で 6708 歩/日、女性で 6416 歩/日であった。一方、カウントに含める活動を 3 メッツ以上の歩行活動のみに限定して考えた場合、23 メッツ・時/週に相当する歩数は男性で 8125 歩/日、女性で 9495 歩/日であった。このことから、歩行以外の生活活動も身体活動量の増加に貢献しており、推奨身体活動量を評価する際に考慮の必要が示唆された。また、今後歩数または身体活動全般に基づいて考えられたと推奨活動量の整合性について検討していく必要がある。

③ その他の研究および活動

②で報告した内容のほかに、ヒューマンカロリーメーターを用いた、身体活動レベルや基礎代謝と体重変動との関連性についての研究を開始した。これらの研究は対象者数がまだ不十分であるため、今後も随時増やしていく予定である。また、平成 19 年度に実施した活動量計の開発との関連で、本年度は子供を対象とした活動量計の開発についても実験を開始した。データ収集自体は終了しており、今後はデータの解析を進めていく。その他、肥満女性を対象とした減量介入試験より、体重変動と日常生活活動との関連についての検討も開始している。

④ 主任研究者 (又は受入研究者) の評価

今年度の主たる課題である「日常生活時における身体活動量およびエネルギー消費量の推定法に関する実験的検討」は、最近開発した革新的な方法 (加速度計法) に基づく結果である。これは、「健康づくりのための運動指針 (エクササイズガイド)」の目玉である“運動以外の身体活動 (=生活活動)”の評価法を確立していくにあたって、一つの客観的で信頼に足る方法論を提示している。

その他、「身体活動後の代謝亢進が 1 日の総エネルギー消費量に与える影響」については、特に評価の高い国際学術誌に掲載された (Ohkawara et al., *Am J Clin Nutr*, 87(5): 1268 - 1276, 2008)。この論文は、2005 年に発表された米国の食事摂取基準において国際的に初めて採用された補正法に問題があることを示している。日本の食事摂取基準においても、非常に価値が大きく、間もなく策定される 2010 年版において、推定エネルギー必要量の決定法に関して引用される見込みである。

以上のように、「日本人の食事摂取基準」における“エネルギー必要量”や「健康づくりのための運動指針」における身体活動量の評価法に関して、貢献度は非常に高く、質・量ともに高く評価されるべき業績を残している。

主任研究者 (又は受入研究者) 田中 茂穂

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名

高本 偉碩

2. リサーチ・レジデント期間

平成 20 年 4 月 1 日 ~ 平成 21 年 3 月 31 日

3. 受入機関

名称 : 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

所在地 : 東京都文京区本郷 7-3-1

4. 研究指導者

所属 : 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

職名 : 教授

氏名 : 門脇 孝

5. 研究課題

保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの
診断・管理のエビデンス創出のための横断・縦断研究

6. 研究活動

①概要

平成 20 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において「保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの診断・管理のエビデンス創出のための横断・縦断研究」に関し、特に心血管疾患の高リスク者を感度・特異度良くスクリーニング可能な、メタボリックシンドロームの診断基準の最適化に必要なエビデンスの構築を目的として研究活動を開始した。

②内容

研究に着手後、平成 20 年度ではさらに 3 つのコホートの参加を得て、北海道端野・壮瞥町、山形県舟形町、福岡県久山町(第 3 集団)、MONKS、広島健診受診者集団、茨城県筑西市協和地区、大阪府八尾市南高安地区、大阪府吹田市、沖縄県豊見城市検診集団、富山職域、愛媛県南西部地区、広島県地域コホート(原爆被爆者及びコントロール集団)の計 12 コホートを統合的に解析するオールジャパンとしての研究体制を整えるとともに、各コホートの状況を詳細に調査の上で、心血管疾患のイベントの定義ならびにメタ解析の対象とするパラメーターに関して統一をはかった。

具体的には、研究の対象とするイベントは、心筋梗塞(確実)・心筋梗塞(疑い)・労作性狭心症(確実)・PCI 症例・脳卒中(確実)・脳卒中(疑い)・急性死・死亡の 8 種類とし、各々の診断基準を表 1 のように定めた。

表1 イベントの診断基準

a: 心筋梗塞 (確実): 心筋梗塞の典型的な症状、すなわち前胸部の 20 分持続する疼痛に加えて、心筋逸脱酵素の正常上限の 2 倍以上の上昇あるいは典型的な心電図所見を認めるものとする。または、剖検によって確認された 1cm 以上の新しい心筋壊死・瘢痕を有するものとする。

*急性冠症候群に対して PCI を施行された症例で、心筋梗塞に至らなかったものは、ここに含めない。

b: 心筋梗塞 (疑い): 心筋梗塞の典型的な症状のみで、心筋逸脱酵素、心電図所見、剖検所見が上記に該当しない、あるいはデータが得られない場合は心筋梗塞 (疑い) として扱う。

c: 労作性狭心症 (確実): 労作性狭心症 (確実) の定義は、狭心発作 (労作によっておこる前胸部の疼痛や絞扼感が、労作をやめることで速やかに消失) が再現性をもって繰り返すものとする。

d: PCI 症例: PCI 症例の定義は、急性冠症候群 (急性心筋梗塞や不安定狭心症を含む) や安定狭心症などに対して、経皮的冠動脈冠動脈形成術を施行されたものとする。

e: 脳卒中 (確実): 脳卒中 (確実) の定義は、脳卒中に特徴的な神経学的所見が 24 時間以上あるいは死亡まで持続し、かつ、CT・MRI によって梗塞性病変や出血性病変が確認されたものもしくは剖検により病変が確認されたものとする。脳梗塞、くも膜下出血、脳内出血の分類は CT・MRI、剖検による。

f: 脳卒中 (疑い): 脳卒中 (疑い) の定義は、脳卒中に特徴的な神経学的所見が 24 時間以上あるいは死亡まで持続したが、CT・MRI を実施していない、あるいは、CT・MRI によって脳卒中の有所見が確認できなかったものとする。

g: 急性死: 急性死の定義は、特に慢性の疾患がなく、発症後 1 時間以内に死亡にいたるもので、心筋梗塞、脳卒中の定義を満たさないものとする。

h: 死亡: 死亡は、原死因 ICD10 による。全虚血性心疾患、急性心筋梗塞、全脳卒中、脳梗塞、くも膜下出血、脳内出血、全循環器疾患の死亡を検討する。

また、メタ解析の対象とするパラメーターは、検診年・フォロー期間・年齢・性・身長・体重・ウエスト(臍レベル)・喫煙状況・アルコール摂取状況・採血時間種別・血糖・HbA1c・糖尿病薬使用の有無・T-chol・HDL-C・TG・高脂血症薬使用の有無・SBP(1回目測定値)・DBP(1回目測定値)・SBP(2回目測定値)・DBP(2回目測定値)・降圧剤使用の有無・心筋梗塞/狭心症の既往・脳卒中の既往・初発の心筋梗塞発症・初発の労作性狭心症発症・最初の PCI・初発の脳卒中発症・急性死・その他の死亡・死因(原死因:ICD10 コード)とし、各々の測定単位、データの形式を表 2 のように定めた。

③成果

<横断研究の中間解析結果>

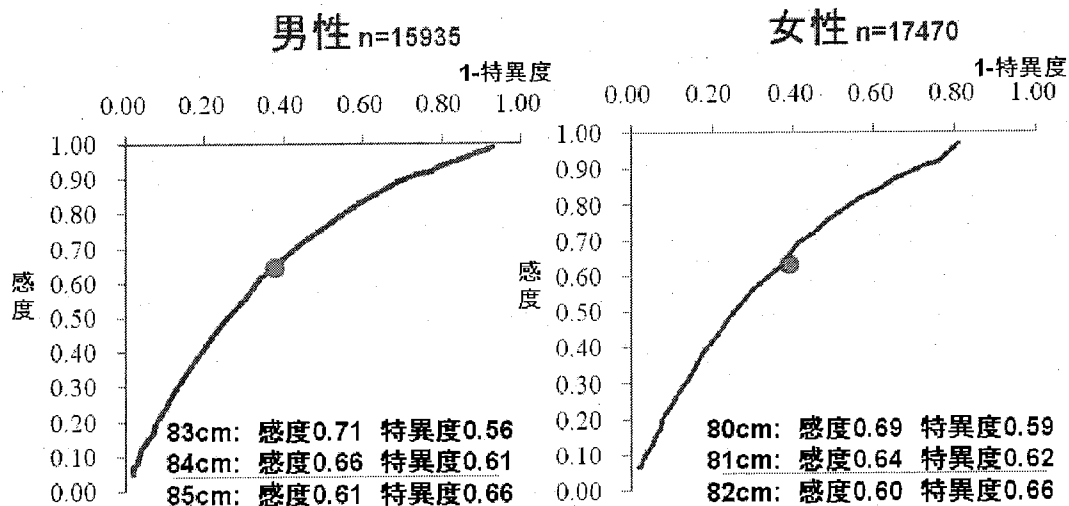
12 コホートのデータを統合して解析した結果、アウトカムをウエスト周囲径高値以外のリスクファクター2つ以上の集積とした場合、ウエスト周囲径の最適のカットオフ値は、男性 84cm、女性 81cm 前後と算出された (図 1)。また、ウエスト以外のリスクファクターのカットオフ値を日本基準に準拠した場合、性・年齢調整のメタボリックシンドロームのオッズ比 (95%CI) は、男性 85cm 以上とそれ未満では 2.97

(2.78-3.17)、女性 80cm 以上とそれ未満では 2.71 (2.52-2.92)であった (図 1)。

表2 メタ解析の対象とするパラメーター

項目名	単位	データの形式	コメント	項目名	単位	データの形式	コメント	項目名	データの形式
検診年		西暦4ケタ		採血時間種別		1=空腹2=非空腹	空腹の定義は「絶食8時間以上」とする	心筋梗塞・伏心症の既往	1=あり、2=なし
フォロー期間		人日	死亡もしくは転出もしくは追跡終了までの期間	血糖	mg/dl			脳卒中の既往	1=あり、2=なし
年齢	歳			HbA1c	%		オプション項目	初発の心筋梗塞発症	
性別	M/F			糖尿病薬使用の有無		1=治療中、2=未治療		フォロー開始から発症までの期間	人日
身長	cm	整数		T-cho	mg/dl			診断	1=確定、2=疑い
体重	Kg	小数点以下1桁		HDL-C	mg/dl			初発の労作性狭心症発症	
ウエスト:臍レベル	cm	小数点以下1桁あるいは整数		TG	mg/dl			フォロー開始から発症までの期間	人日
喫煙状況別		1=現在、2=過去にすった、3=吸わない		高脂血症薬使用の有無		1=あり、2=なし		診断	1=確定、2=疑い
喫煙本数・一日あたり	本/日			SBP (1回目測定値)	mmHg			最初のPCI	
				DBP (1回目測定値)	mmHg			フォロー開始から発症までの期間	人日
アルコール摂取状況別		1=現在のむ、2=過去のんだ、3=のまない		SBP (2回目測定値)	mmHg			初発の脳卒中発症	
アルコール摂取回数・一週あたり	日/週			DBP (2回目測定値)	mmHg			フォロー開始から発症までの期間	人日
アルコール摂取量・一日あたり	合/日	日本酒換算値		降圧剤使用の有無		1=あり、2=なし		診断	1=確定、2=疑い
								急性死(発症から死亡まで1時間以内のもの)	
								フォロー開始から発症までの期間	人日
								その他の死亡	
								フォロー開始から死亡までの期間	人日
								死因(原死因):ICD10コード	

図1 横断研究によるROC解析結果(中間解析)



ウエスト以外のリスクファクターのカットオフ値を日本基準に準拠した場合、性・年齢調整のメタボリックシンドロームのオッズ比(95%CI)は、ウエスト周囲径のカットオフ値を男性85cmとすると、2.97(2.78-3.17)、女性80cmとすると、2.71(2.52-2.92)

<後向き縦断研究の中間解析結果>

7コホートのデータを統合して解析した結果、循環器疾患の発症率(千人年)は男性5.6、女性3.3であり、他の疫学研究と比較しても妥当であると考えられた。

虚血性心疾患の発症を「初発の急性心筋梗塞+急性死」として解析した場合、最適のカットオフ値は男性83cm、女性80cm前後と算出された。また、性・年齢調整の虚血性心疾患の発症ハザード比(95%CI)は、男性85cm以上とそれ未満では1.54(1.12-2.12)、女性80cm以上とそれ未満では1.32(0.83-2.10)であった。この結果は、急性心筋梗塞単独で解析した場合とほぼ同じであった。

但し、ROCカーブのふくらみは少なく、特に女性ではウエスト周囲径のみによる虚血性心疾患発症リスクの予測は男性に比べて困難と考えられた。すなわち、女性でカットオフ値を仮に80cmに変更した場合、他のメタボリックシンドロームのリスクファクターの集積との関連は現行の90cmの場合よりも改善するが、虚血性心疾患の発症予測の観点からは、いずれのカットオフ値も採用することは難しいと考えられた。実際、虚血性心疾患の発症ハザード比は、男性ではウエスト周囲径95cm以上、女性ではウエスト周囲径90cm以上から有意に上昇していたが、各々のカットオフ値における感度は0.32、0.19と低く、「見逃し」も多くなることが示された。

また、脳卒中の発症についても解析を行ったが、ROCカーブはほぼ直線状で、カットオフ値の算出は困難であった。脳卒中のなかで、メタボリックシンドロームとの関連性が高いと考えられる脳梗塞の発症に関して、表3に従って病型データの追加収集を行って解析を行うことが必要と考えられた。

表3 脳卒中の病型分類の追加

【病型】

1. くも膜下出血、2. 脳内出血、3. 脳血栓、4. 脳塞栓、
5. 分類不明の脳梗塞、6. その他分類不明の脳卒中

*注釈:「5.分類不明の脳梗塞」とは、「脳梗塞」と診断できるが「3.脳血栓」か「4.脳塞栓」かの、鑑別診断に至っていないもの。

「6.その他分類不明の脳卒中」とは、脳卒中であると診断できるが、「1.くも膜下出血」か「2.脳内出血」か「脳梗塞(3.脳血栓+4.脳塞栓)」かの、鑑別診断に至っていないもの。

【フォロー開始から発症までの期間】 人日

【診断の手段】

画像診断(CT、MRI等)、または剖検

1=画像または剖検あり 2=画像も剖検もなし

④主任研究者(又は受入研究者)の評価

複雑多岐にわたる12コホートの状況を詳細に調査・分析した上で本研究の全体的なプロトコルを策定して、実務面での様々なハードルをクリアしながら、中間解析結果に示すような着実な研究成果が得られたことは極めて高く評価できる。今後も順調にデータベースの整備とメタ解析を推し進めることにより、心血管疾患の高リスク者を感度・特異度良くスクリーニング可能な、メタボリックシンドロームの診断基準の最適化に必要なエビデンスが構築されることが期待される。

主任研究者 門脇 孝

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名

大谷 朋仁

2. リサーチ・レジデント期間

平成 20 年 4 月 1 日 ～ 平成 21 年 3 月 31 日

3. 受入機関

名 称 : 大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター

所 在 地 : 大阪府吹田市山田丘 2-2

4. 研究指導者

所 属 : 大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター

職 名 : 特任教授 (常勤)

氏 名 : 山本 一博

5. 研究課題

日本人における動脈硬化性大動脈弁膜疾患の発症・進展予防に関する研究

6. 研究活動

①概要

平成 21 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において日本人における動脈硬化性大動脈弁膜疾患の発症・進展予防に関する研究課題に関し、臨床データの検討と大動脈弁硬化モデル作成の動物実験に関する研究を開始した。

②内容

研究に着手後、研究課題である動脈硬化性大動脈弁膜疾患の発症・進展予防に関してまず臨床データの後ろ向き検討を行った。一般的な動脈硬化の危険因子としてこれまでに、高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙などが報告されているが、これらが大動脈弁変性に対しても同様に危険因子となりうるか否かはまだ十分な臨床的データがなく不明である。さらに大動脈弁の石灰化があまり進んでいない状態、つまり大動脈弁の変性初期と考えられる段階では、進展に寄与する因子や予測性につながる因子はほとんど明らかにはなっていない。そこで、まず一般的な動脈硬化の危険因子を中心に弁石灰化変性との関連性について、弁石灰化変性の初期段階の進展性に寄与する因子の検討を行った。また、心臓超音波検査や血液検査などの検討からも弁石灰化変性の進展の予知につながる因子の探索的検討を行った。

臨床データの解析と同時に、大動脈弁の硬化変性あるいは石灰化をきたすモデル動物を確立するための検討も行った。動脈硬化の危険因子である高血圧症、脂質代謝異常症、糖尿病に関連する負荷として高食塩、高脂肪、高シヨ糖という食餌性負荷を加えることで、大動脈弁の石灰化変性をきたすか否かの検討をラットで試みた。

③成果

大阪大学医学部附属病院の心臓超音波検査において、大動脈弁の石灰化が観察されてかつ、2 から 5 年前に心臓超音波検査が行われていた連続 270 例を後ろ向きに検討した。大動脈弁の変性変化は研究課題と同様に心臓超音波検査により次のように評価し、本検討では 2 尖弁は除外した。

- 段階 1 正常または石灰化を伴わない弁尖の軽度輝度上昇のみ
- 段階 2 軽度石灰化（一尖にのみ石灰化）
- 段階 3 中等度石灰化（二尖に石灰化）
- 段階 4 高度石灰化（三尖すべてに石灰化）

270 症例のうち段階 4 の患者が 198 例あり、更にその中の 51 例は 2~5 年前の時点で段階 1 もしくは 2 の軽度弁変性の状態からの変化したものであった。一方、同じように、2~5 年前に段階 1 もしくは 2 の軽度弁変性の状態でも、段階 4 まで変化を認めなかった症例は 59 例であった。そこでこれらの段階 4 まで変化した群（変化大群）と変化しなかった群（変化小群）の 2 群に分けて、その差異に寄与する因子の検討を行った。（表 1）

年齢や性別などの一般的な因子は、変化大群と変化小群とでは差はなく、動脈硬化性危険因子である高血圧症や脂質代謝異常症の存在は、弁石灰化変性の変化の大小と

（表 1）

	変化小群(n=59)	変化大群(n=51)	p value
年齢	70.8±8.5	71.0±7.8	n.s.
性別(男)	38 (64%)	25 (49%)	n.s.
身長 (m)	1.6±0.1	1.6±0.1	n.s.
体重 (kg)	60.1±10.5	57.0±10.9	n.s.
高血圧	44 (75%)	33 (65%)	n.s.
糖尿病	23 (39%)	7 (14%)	0.02
脂質代謝異常症	29 (49%)	15 (29%)	n.s.
冠動脈疾患	25 (42%)	10 (20%)	0.02
脳血管障害	9 (15%)	7 (14%)	n.s.
腎不全	7 (12%)	6 (12%)	n.s.
収縮期血圧	128±16	132±16	n.s.
拡張期血圧	70±11	74±11	0.07
心拍数(回/分)	66±12	66±13	n.s.
心房細動	12 (20%)	12 (24%)	n.s.
観察間隔(年)	3.8±1.0	3.9±0.9	n.s.

関連しなかった。後ろ向きの検討であるので、本検討集団においては一般的な治療が主治医によってなされていたが、そのような状況においては高血圧症、脂質代謝異常症を有することは少なくとも弁石灰化変性を促進する因子ではないと考えられた。

一方、変化大群では、糖尿病と冠動脈疾患の罹患率が有意に少なかった。糖尿病は冠動脈疾患の有無で補正しても独立して弁変性進展と負の関連を認めた。このことは弁変性の初期段階においては糖尿病の罹患患者の方が、弁石灰化変性が進みにくかったと考えられた。

内服薬についても検討を行うと、変化小群では糖尿病治療としての経口糖尿病薬やインスリン治療を受けていた率が有意に高かった（表 2）。経口糖尿病薬の種類で検討してもスルホニル尿素薬、 α -グルコシダーゼ阻害薬、速効型インスリン分泌促進薬などの特定の薬剤をさらに見出すことはできなかった。他の内服治療に関しては、動脈硬化性疾患として位置づけから高コレステロール血症に使用されるスタチン製剤の弁石灰化に対する有用性が、海外では検討されているが、少数例を対象とした臨床研究で有用性を示す報告と、無効とする報告とがある。日本人を対象にした本検討では、後ろ向きの検討ではあるが、スタチン製剤の内服と変性の進展には関連性を認めなかった。また、アンジオテンシン変換酵素阻害薬の進展阻止効果も海外の後ろ向き検討では報告されているものがあるが、本検討では、アンジオテンシン変換阻害薬の内服およびアンジオテンシン II 受容体遮断薬 (ARB) の内服をしていた患者の方が、大動脈弁の石灰化変性の進展が小さかったというわけではなかった。

(表 2)

	変化小群(n=59)	変化大群(n=51)	p value
ACE阻害薬	22 (37%)	13 (26%)	n.s.
ARB	25 (42%)	27 (53%)	n.s.
β 遮断薬	27 (46%)	21 (41%)	n.s.
Ca遮断薬	29 (49%)	25 (49%)	n.s.
スピロラクトン	10 (17%)	4 (8%)	n.s.
抗血小板薬	30 (51%)	22 (43%)	n.s.
ワーファリン	14 (24%)	15 (29%)	n.s.
スタチン製剤	22 (37%)	11 (22%)	n.s.
経口糖尿病薬	13 (22%)	2 (4%)	0.006
インスリン	8 (14%)	1 (2%)	0.04
左室拡張末期径(mm)	50 \pm 6	49 \pm 7	n.s.
左室収縮末期径(mm)	32 \pm 8	31 \pm 8	n.s.
左房径(mm)	41 \pm 7	41 \pm 9	n.s.
大動脈径(mm)	34 \pm 5	32 \pm 4	0.03
左室駆出率(%)	64 \pm 12	66 \pm 12	n.s.

以上のことから、弁の石灰化変性が初期の段階では糖尿病の存在、もしくは糖尿病の治療を受けていた群の方が大動脈弁の石灰化の進展が少ない可能性が示された。そこで次に、弁の石灰化変性が比較的進んでいた段階 3 もしくは 4 の症例での糖尿病と弁変性進展との関係を検討した。石灰化の進んだ状態では石灰化段階を用いた評価が難しいため、大動脈弁通過血流速度の年変化率を石灰化進展の指標とした。その結果、糖尿病を罹患していた方が、罹患していなかった群よりも年変化率は大きかった (0.17 \pm 0.15 vs. 0.08 \pm 0.19 m/s/year, p<0.05)。このことは、弁の石灰化が進んだ状態では糖尿病の罹患が狭窄の進行を進める可能性があることを示すものであり、弁の

初期段階の変化とは相反する結果であった。これらのことから、初期の弁変性の進展と、一旦石灰化が生じた後の狭窄の進展とに対しては、糖尿病もしくは糖尿病治療が異なる寄与をする可能性が考えられた。初期の石灰化形成と狭窄の進行とは同じ機序に基づくものともこれまで考えられていたが、本研究により異なる機序が存在する可能性が明らかとなった。今後の弁石灰化変性の機序解明の研究を進めていく上でもこの点は考慮すべき必要があると考えられ、この成果の一部は日本循環器学会学術集会総会での報告を行った。

心臓超音波検査における検討（表2）では、左室拡張末期径や後壁壁厚、左室駆出率などの指標と石灰化変性との進展性には関連を認めなかった。拡張機能指標の一つである左房径は先の2群ともに41mmと正常より若干増大していたが、群間に差を認めず進展性の予測につながる因子ではなかった。また、大動脈径は変化大群で変化小群に比し有意に低値であったが、予測性につながる感度特異度を有するものではなかった。血液検査値も一般臨床でなされる項目からは進展の予測性につながる項目は見いだせなかった。

次に、大動脈弁の変性もしくは石灰化をきたすモデル動物の確立のための実験を行った。高血圧症をきたすモデルとしては、ダール食塩感受性高血圧ラットに7週齢から8%の高食塩食飼育を行うモデルを用いた。また、脂質代謝異常、糖尿病、高血圧という複数の危険因子を有する状態を目標に、食餌による負荷モデルとして同じくダール食塩感受性ラットを高脂肪・高ショ糖・高食塩食による飼育を行った。高脂肪・高ショ糖・高食塩食の組成はカゼイン25%、アルファコンスターチ14.868%、NaCl7.741%、シュクロース20%、牛脂10.13%、ラード10.13%、大豆油2%、セルロースパウダー5%、AIN93Gミネラル混合3.5%、AIN93ビタミン混合1%、重酒石酸コリン0.25%、第3ブチルヒドロキノン0.006%、L-シスチン0.375%とした。

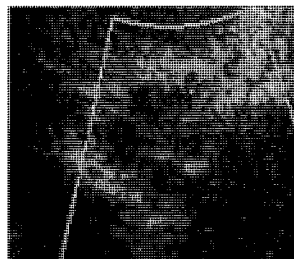
血圧は0.7%通常食では概ね120~130mmHg程度であるのに対し、8%高食塩食飼育では、開始後徐々に血圧は上昇し、10週齢では 178 ± 8 mmHg、13週齢では 219 ± 13 mmHgと著名に上昇し、その後同程度の高血圧状態が維持された。一方、高脂肪・高ショ糖・高食塩食飼育も、開始後3週である10週齢には 153 ± 12 mmHgと上昇し、18週齢で 192 ± 15 mmHgまで上昇した。高食塩食単独に比べると血圧上昇の程度は少し低かったが、その後も24週齢で 186 ± 10 mmHgと18週齢と同程度で高血圧状態が維持された状態であった。

大動脈弁の変性を心臓超音波検査による短軸像で評価を行ったところ、高食塩食飼育のみの高血圧ラットは弁尖のわずかな肥厚が認められた（図1）が、明らかな石灰化変性をきたす個体は生じず、その後、高血圧性の心肥大から心不全をきたして死亡した。死亡した個体の大動脈弁の肉眼的検討でも弁の明らかな変化は確認できなかった。また、高脂肪・高ショ糖・高食塩食飼育ラットの心臓超音波検査での評価においては、高食塩食のみの負荷ラットよりも弁尖の肥厚増加が観察された（図2）が、明らかな石灰化までには至らなかった。一部ラットは組織採取のため打ち切りとなったが、43週齢までに原因不明もしくは心不全のため死亡につき全個体が回収された。

図1



図2



個体死亡時もしくは打ち切り時に大動脈弁組織を採取し、ホルマリン固定のパラフィン切片と OCT コンパウンドによる凍結切片を作成して組織学的な変化を検討した。ヘマトキシリン・エオジン染色における形体観察では、高脂肪・高ショ糖・高食塩食飼育ラットの大動脈弁の弁尖の軽度の肥厚を認めたが、高食塩食のみのラットでは明らかな変化は認められなかった。線維化の評価としてのアザンマロー染色や弾性繊維の評価としてのエラスティカ・ファンギーソン染色では、ともに明らかな変化は認められなかった。また、石灰化に関連するカルシウムの沈着評価のためアリザリン・レッド染色を行ったが、有意なカルシウム沈着は認められなかった。動脈硬化性の石灰化変性にかかわることがこれまでに報告されている osteopontin および osteocalcin などの検討も行ったが、明らかな変化は確認できなかった。これらの検討から、ダール食塩感受性ラットに対する高食塩・高ショ糖・高脂肪食による負荷のみでは大動脈弁の変性はおこっても軽度肥厚に留まり、このモデルでは大動脈弁の硬化変性や石灰化の研究を遂行するには不十分であると考えられた。

④主任研究者（又は受入研究者）の評価

動物を用いた大動脈弁硬化変性モデルの確立のための研究では、モデルの確立には至らなかったがその評価を行う上での検討に貢献した。また、臨床データを用いた研究から得られた知見は、研究課題に対する検討を更に進めていくにあたって新たな着目点を提起するものであり有用な研究成果であったと考えられた。

主任研究者（又は受入研究者） 山本 一博

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名
朝野 仁裕
2. リサーチ・レジデント期間
平成 20 年 4 月 1 日 ~ 平成 20 年 5 月 31 日
3. 受入機関
名 称 : 国立循環器病センター
所 在 地 : 大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号
4. 研究指導者
所 属 : 国立循環器病センター
職 名 : 臨床研究開発部長 (心臓血管内科部長)
氏 名 : 北風 政史
5. 研究課題
ヒスタミンと心不全の関連についての検討
-H2 レセプターブロッカーは心不全を改善するか

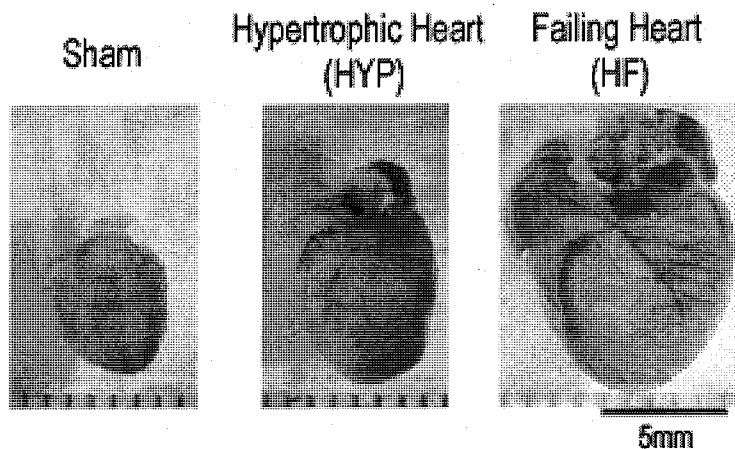
6. 研究活動

①概要

平成 20 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において「ヒスタミンと心不全の関連についての検討-H2 レセプターブロッカーは心不全を改善するか」に関する研究課題に関し、特に心不全病態に関する基礎的検討分野に関する研究を開始した。4 月 1 日より 5 月 31 日の 2 か月間の研究期間において、特にヒスタミン H2 受容体遮断薬が心不全病態における遺伝子発現制御メカニズムに及ぼす検討を行うために、実際のマウス実験モデルの構築を行い、評価検討の指標となる実験系を確立することに主眼をおいて実験を行った。今後は本研究を進めていく上で必要な研究環境を得るために所属部署を移動することとなり、本身分を終了することになったが、本研究を引き続き継続して、当初の目的に沿うべく押し進めていく予定である。

②内容

研究に着手後、心不全病態をエピジェネティックな側面から評価するためのマウスおよびラット培養心筋細胞を用いた *in vitro* 実験系、短期間 (1~2 週) で心不全をきたすマウス大動脈縮搾モデルおよび長期間 (4~8 週) で心不全をきたすマウス大動脈縮搾モデルによる急性心不全、慢性心不全の *in vivo* 実験系を作成した。さらに共同研究者の協力を得て、イヌ心臓ペースング心不全モデルより基礎的実験に用いる心臓組織を採取した。



ヒスタミン H2 受容体遮断薬が *in vitro* および *in vivo* において心筋細胞の遺伝子発現制御機構に及ぼす効果を検討するために、それら薬剤を投与する前段階として、対照群の細胞機能評価項目の検討およびそれらのデータ収集を行った。

遺伝子発現制御機構を評価するための検討項目には、cDNA microarray による遺伝子発現プロファイル、特定遺伝子としてマウスおよびラットの心臓胎児性遺伝子 ANP、BNP、 β MHC、心臓アクチン、GAPDH の定量 RT-PCR 実験検討、RNA polymerase II の心筋細胞における免疫染色および共焦点顕微鏡による観察、BNP、ANP 遺伝子の細胞核内 position 決定のための DNA FISH 法の確立および共焦点顕微鏡による観察、培養心筋細胞を用いたクロマチン免疫沈降法、正常および不全心筋組織を用いた *in vivo* クロマチン免疫沈降法、電子顕微鏡による心筋組織性状変化および心筋細胞核内構造変化の観察を行った。

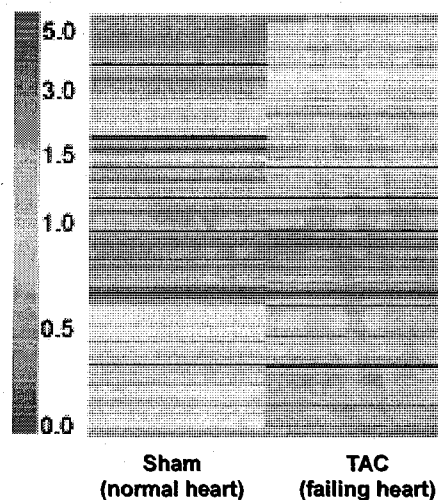
これらの実験系を用いて、心不全病態における心不全病態下における遺伝子発現制御機構を基礎的側面から評価検討し、薬剤負荷時に起きる変化を捉えるための基礎的対照実験を行うこととした。

③成果

Mouse cDNA microarray による心不全遺伝子発現プロファイルを解析し、実際にマウス心不全病態において発現が変化する遺伝子の発現プロファイルの解析および、その中から代表的遺伝子（心臓胎児性遺伝子、ハウスキーピング遺伝子など）を選び、用いている実験系がヒト心不全病態をモデル化出来ていることを確認すると同時に、発現上昇を来たす遺伝子および減少する遺伝子の総数を比較した（図1）。

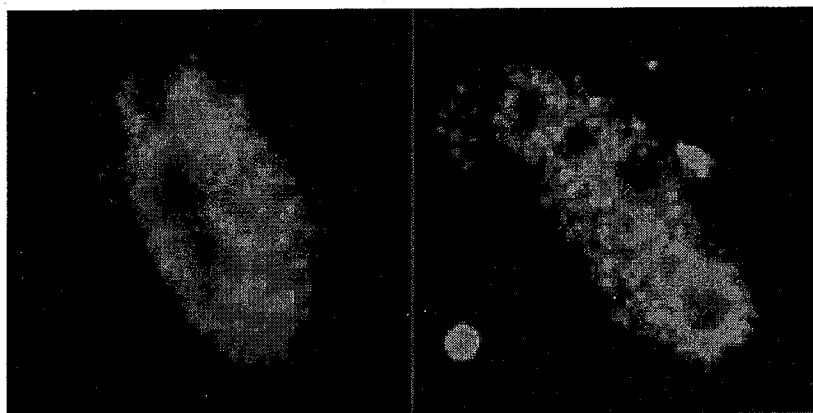
発現上昇する遺伝子の総数が、減少する遺伝子の総数より圧倒的に多いことから、不全心筋細胞においては核内転写が全体的に活性化の方向に傾くことが予想された。

この結果をもとに、細胞核内転写活性化の指標の一つである RNA polymerase II について不全心筋細胞における発現状況を見るために、蛍光免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて



(図1. 遺伝子発現プロファイル比較)

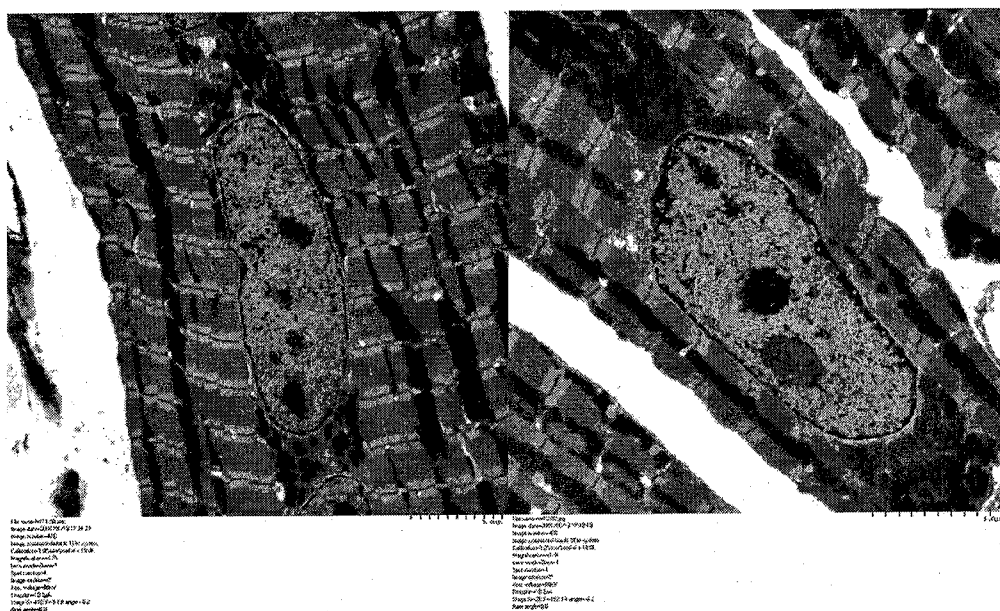
確認し、実際に RNA polymerase II の Focus が正常心筋細胞核内に比して不全心筋細胞核内における総数が多いことを明らかにした (図 2)。



(図 2. 不全心筋細胞の RNA polymerase II 蛍光免疫染色像)

さらに BNP、ANP 遺伝子の細胞核内分布を調べるため、BNP が抑制されている心筋細胞および活性化されている細胞において DNA FISH を行い、その位置効果に依存する遺伝子転写活性化の指標を求めた。

これら遺伝子転写制御が転写因子のみならず、エピジェネティック (後成的) 制御機構を介して働いていることを示すため、電子顕微鏡を用いて細胞核超微細構造を観察し、不全心筋細胞におけるクロマチン高次構造の崩壊を急性期モデルおよび慢性期モデルにおいて明らかにした。特に電子顕微鏡による心筋細胞核の形態を観察する検討については、これまで同様の知見がない新たな検討であることから、マウス、ラット、イヌの心臓組織を用い、動物種での違いについても差のないことを確認した (図 3)。



(図 3. 心筋細胞核の電子顕微鏡によるクロマチン構造の比較)

また分子レベルでの変化を求めるために、あらかじめ培養心筋細胞を用いて、BNP、ANP 遺伝子のゲノム領域における転写 machinery の結合状況および同領域のヒストン修飾変化について検討した。GPCR 受容体の急性刺激応答によるこれらタンパクの分布状況の変化についてさらに検討を進め、エピジェネティックな構成因子の変化を明らかにした。これらの予備的条件検討をもとに、心臓組織におけるクロマチン免疫沈降法を行うこととした。In vivo クロマチン免疫沈降法は組織を均一に固定しながら核内たんぱくを抽出し免疫沈降しなければならず、非常に困難な手技である。様々な条件検討および工夫をすることにより、目的とする精製度を得ることが可能になり、基本的構成要素の免疫沈降について、in vitro における結果と同様の質を確保した実験法に確立することが出来た。その結果、心不全における慢性病態下の心臓組織のエピジェネティックな分子メカニズムを明らかにすることが可能になった。以上のごとくヒスタミン H2 受容体遮断薬が心不全に及ぼす実験手技の基礎的条件検討を終え、今後は同薬剤負荷による細胞機能の変化について分子メカニズムを更に明らかにしていく方針である。

④主任研究者（又は受入研究者）の評価

心不全におけるヒスタミン H2 受容体遮断薬の分子作用機序を明らかにすべく様々な事象を今後明らかにしていく必要がある。今回2ヵ月間の研究により、本研究分野の基礎的検討項目について、特に遺伝子発現制御機構を中心に今後必要となる実験系の立ち上げるとともに、既に幾つかの成果を上げていることが評価される。心不全病態のエピジェネティックな検討については、国内外を通じて非常に先進的な研究技術を有しており、これまでに開発した実験手技を用いることにより、今後更なる成果を積み重ねていくことができると考えられる。

主任研究者 北風 政史

平成 21 年度分

I 外国人研究者招へい事業

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

国 名 : アメリカ合衆国
所属・職名 : バンダービルト医科大学医学薬理学部門 医学部、薬理学教授
氏 名 : C. ミッチェル スタイン
所属 (英文) : Department of Medicine and Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville
職名・氏名 (英文) : Professor of Medicine, Professor of Pharmacology, C. Michael Stein

2. 主任研究者

所属・職名 : 国立循環器病センター 内科高血圧腎臓部門 部長
氏 名 : 河野 雄平

受入研究者

所属・職名 : 国立循環器病センター 研究所病因部 部長
氏 名 : 宮田 敏行

3. 招へい期間

平成 21 年 10 月 20 日 ~ 平成 21 年 10 月 29 日 (10日間)

4. 共同研究課題

循環器薬の薬理遺伝学

5. 研究活動の概要

10月21日から10月23日までの間は、国立循環器病センターにおいて、主任研究者である腎高血圧内科部長河野雄平、脳内科医長長束一行、研究所病因部長宮田敏行、病院輸血管理室医長宮田茂樹、臨床研究センター医長（脳内科医長兼任）山本晴子を交えて、循環器疾患のPharmacogenomics、特に抗血栓薬ワルファリンに関し意見交換を行った。

10月22日は第82回日本生化学会大会（神戸市）のシンポジウム、「血栓症の分子メカニズム：最近の進歩」（オーガナイザー、国立循環器病センター研究所、宮田敏行、京都大学大学院医学研究科循環器内科、堀内久徳）で、” Warfarin pharmacogenomics, an update” を発表し、シンポジウム参加者と活発な討論を行った。（参会者、約100名）

10月23日は国立循環器病センターにおいて、” Pharmacogenetics of warfarin response, clinical implications” と題した講演会を開催した。（参会者、約30名）

10月26日は大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学教室において、楽木宏美教授、神出計講師を交えて降圧薬やワルファリンの薬理遺伝学研究的展望についての討論を行うとともに、午後5時30分から医学部講義棟C講堂にて、「Pharmacogenetics of Warfarin Response - Clinical Implications」と題した講演会を開催した。（参会者、約50名）

10月27日は京都大学大学院医学研究科循環器内科学教室において、木村剛教授、堀内久徳講師、人間健康科学系荒井秀典教授を交えて、循環器疾患のテーラーメイド医療に関し意見交換を行うとともに、午後6時より北病棟5階カンファレンスルームにて、「ワルファリンの臨床薬理学」と題した講演会を開催し活発なディスカッションを行った。（参会者、約40名）

6. 共同研究課題の成果

薬理遺伝学(Pharmacogenomics)は、ヒトゲノムが解明され、ゲノム上の一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)に関する HapMapプロジェクトも終了した現在、ゲノム情報を人類の健康と疾患の予防に用いるための大きな研究領域となっている。この薬理遺伝学により、ヒトゲノムの多様性に基づく薬剤反応性の差異を説明できることが明らかになりつつある。薬理遺伝学の対象となる循環器領域の薬剤として、抗血栓薬のワルファリンが挙げられる。ワルファリンは、ワルファリンの代謝酵素であるCYP2C9の遺伝子多型とワルファリンの標的酵素であるビタミンKエポキシド還元酵素(VKORC1)の遺伝子多型が、ワルファリンの投与量に影響を与えることが明らかとなっている。これまでの経験から、白人は日本人に比べ、多量のワルファリンを必要とされるが、こういった服薬量の違いは遺伝子多型の頻度の違いで説明されるよう

になってきた。

人種間の薬剤反応性の違いが明らかになった現在では、それぞれの人種を対象にした薬理遺伝学研究が重要になる。こういった観点から、白人種や黒人種で行われた薬理遺伝学的研究を、日本人を対象に進められた研究と比較しつつ討論することは、日本人を対象とした薬理遺伝学を進める上で重要である。バンダービルト大学の Stein 教授は、バンダービルト大学の薬理学教室を主宰され、なかでも薬理遺伝学を専門にしておられる研究者である。Stein 教授は薬物反応の個人差の遺伝的背景、遺伝環境因子による血管反応の制御、動脈硬化と炎症との関連に関して極めて精力的な研究を進めている。教授は心臓学と臨床薬理学の橋わたし研究を進めている。特に最近では、Stein 教授は 2008 年の New England Journal of Medicine 誌に、ワルファリンの投与量と VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型に関する研究を行い、ワルファリン投与開始後にプロトロンビン時間国際標準比 (INR 値) が至適領域で安定するには、VKORC1 の遺伝子多型が重要であると報告している。2009 年の報告では、ワルファリン投与初期の研究を更に発展させている。そこで、米国で行われた研究と国立循環器病センターでこれまで行った研究を討論し、循環器領域の薬理遺伝学研究を進めるため、Stein 教授を招へいした。

主任研究者である河野雄平は、厚生労働科学研究費補助金をうけ「降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究」を行っている。本研究は、遺伝子多型情報を用いて、降圧薬および抗凝固薬をより適切に用いるテーラーメイド治療を目指している。降圧薬選択に遺伝子多型情報を用いる研究 (GEANE 研究) は、約 50 万カ所の SNP 遺伝子多型情報と 3 種の降圧薬の降圧効果ならびに副作用情報との関連解析を行い、これらの臨床情報に関連する SNP を明らかにした。また、抗凝固薬ワルファリンの服薬量の個人差に関する研究は、VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型で約 33% が説明されることを報告した。私達は国立循環器病センターのワルファリン服薬患者を対象にワルファリン服薬量と VKORC1 遺伝子多型および CYP2C9 遺伝子多型の関連を既に報告しており、現在、ビタミン K 摂取量の調査を通して、ワルファリン量の予測法を前向きに調査している (Godward 研究)。この前向き研究に関して、Stein 教授と共同研究を行い、ワルファリン療法のテーラーメイド医療の実現を目指す。Stein 教授は、これまでワルファリン投与量の個人差に関する遺伝子多型の研究に加え、アドレナリン受容体の遺伝子多型と β ブロッカーの反応性に関

する研究を進めてきた研究者であり、これら遺伝子多型の人種間の差異に関する研究も発表されており、主任研究者が進める降圧薬と抗凝固薬の遺伝薬理学研究に大変関連の深い研究を行っている。

国立循環器病センターでは、厚生労働科学研究費補助金を受け進めている「ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討、Godward 研究」および現在進めている多施設共同研究「Godward 研究2」に関して、長束一行脳内科医長、山本晴子臨床研究センター室長、宮田茂樹輸血管理室医長、宮田敏行病因部長と討論を行い、適切な助言をいただいた。「Godward 研究」では、国立循環器病センター脳内科に通院してワルファリンの投与を受けておられる患者を対象に、血液検査で遺伝子多型を調べ、食事調査票にお答え頂いて、その内容を分析し、1日あたりのビタミンK摂取量を調べた。その結果、2種類の酵素の遺伝子多型の組み合わせから患者は6つのグループに分かれることが分かった。グループごとにワルファリンの投与量は異なるが、患者の8割は同じグループで、ワルファリンの投与量が1日あたり3mg前後であることが分かった。ビタミンKの摂取量との関係では、ビタミンKを多く食べるとワルファリンの投与量が多く必要になるが、その影響はあまり大きくないことも分かった。白人では遺伝子多型の組み合わせがより多彩であるといわれており、人種の違いによる遺伝子多型の組み合わせの違いが明らかであった。また、「降圧薬感受性遺伝子同定のための前向き多施設臨床試験、GEANE 研究」に関して討論を行った。第82回日本生化学会大会（於：神戸市）シンポジウム「血栓症の分子メカニズム：最近のシンポ」において、Warfarin Pharmacogenetics, An Update と題した講演を行った。国立循環器病センター研究所では、Pharmacogenetics of Warfarin Response - Clinical Implications と題した講演会を開催し、米国でのワルファリンの薬理遺伝学の進捗を紹介頂いた。米国でも、ワルファリン投与前に遺伝型を判定し、遺伝子情報をワルファリン量に反映させている施設はないとのことであった。

大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学講座では、楽木宏実教授、神出計講師とともに、降圧薬やワルファリンの薬理遺伝学研究の展望についての討論を行った。特に、神出講師が国立循環器病センターに在職中に開始した降圧薬選択に遺伝子多型情報を用いる多施設前向き研究（GEANE 研究）に関して議論を行った。また、Pharmacogenetics of Warfarin Response - Clinical Implications と題した講演会を開催した。本講演会には薬学部などからの研究者の参加もあり、大変盛況であった。

京都大学医学研究科循環器内科学教室では、循環器内科学教室木村剛教授、堀内久徳講師、人間健康科学系荒井秀典教授らとともに、抗血小板薬であるクロピドグレルの薬理遺伝学の討論を行った。即ち、プロドラッグであるクロピドグレルは、CYP2C19により活性化体へと変換されるが、このCYP2C19の活性消失変異保有者は、クロピドグレルによるイベント再発抑制が低く、再発率が高いといわれる。これをクロピドグレル抵抗性というが、日本人は欧米人よりCYP2C19の変異保有者が多く、したがってクロピドグレル抵抗性を示す患者が多いと思われる。この問題に関して活発なディスカッションを行った。また、「ワルファリンの臨床薬理学」と題した講演会を開催し活発なディスカッションを行った。

7. 成果の評価（主任研究者が上記の成果を採択研究課題にどのように反映させたか具体的に記載し、記名すること）

主任研究者は、厚生労働科学研究費を受け、「降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究」を行っている。本研究は、遺伝子多型情報を用いた降圧薬および抗凝固薬をより適切に用いるテーラーメイド治療を目指している。降圧薬選択に遺伝子多型情報を用いる研究（GEANE研究）は、ゲノム網羅的遺伝子多型情報と3種の降圧薬の降圧効果ならびに副作用情報との関連解析を行った。Stein教授をはじめとする多くの研究から、遺伝子多型には人種特異性があることが明らかとなっている。事実、ゲノム網羅的に50万カ所のSNPをタイピングしても、日本人には約35万カ所に多型性を認めるのみである。GEANE研究の対象者は日本人であるので、日本人に見られる遺伝子多型を使った降圧薬選択の指標を出せられると思われる。「ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討、Godward研究」および多施設共同研究「Godward研究2」では、対象となる遺伝子はCYP2C9とVKORC1である。日本人では、両遺伝子の多型性に偏りがあるので、約75%の日本人は同じ遺伝子多型を保有する。これは、欧米人とは大きく異なる点である。しかし、日本人でも少ない人数ではあるが、多量のワルファリンを必要とする患者や極めて少量のワルファリンでよい患者がいる。こういった遺伝子多型を保有する患者には、遺伝子多型情報は極めて有用であるとStein教授は強く主張していた。しかし、米国においても、未だ遺伝子多型に基づくワルファリン投与は行われていないのが現状である。国立循環器病センターでは遺伝子情報をより有効に使うため、ビタミンK

摂取量と遺伝子多型情報を用いる Godward 研究を進めている。ワルファリンの維持量の予測にビタミンK摂取量を取り入れた研究はこれまで見あたらず、大変独創的でその成果が待たれる。

Stein 教授は短い滞在にもかかわらず、3つの施設を訪問し、計4回の講演を行い、ワルファリンの橋渡し研究を紹介して下さった。薬理遺伝学の研究を永らく続けておられ多くの事象をご存じであった。また、日本人には活性を消失する CYP2C19 の遺伝子多型頻度が高いので、本酵素がかかわる薬剤は注意が必要である。この観点から、抗血小板薬クロピドグレルの不応性は本邦で行われるべき研究であろう。

主任研究者 河野 雄平

Invited Researcher: C. Michael Stein

Affiliation: Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, United States

Title: Professor of Medicine and Pharmacology

Invitation period: October 20-29th, 2009

Background Pharmacogenetics: Cardiovascular diseases such as hypertension, heart failure, atrial fibrillation and thrombosis are major causes of morbidity and mortality world wide. For many cardiovascular conditions effective treatment is available, but there is a wide variation in response among patients receiving drugs. This variability in response can lead to lack of efficacy in some patients and toxicity in others. The sources of variability in response to drug therapy among patients are due to several factors, but recently the importance of genetic variability has been a focus of considerable research. The ability to define this genetic contribution to variability in response will lead to individualized prescribing – a concept known as personalized medicine. A prototype drug for testing the concept of personalized medicine is the anticoagulant warfarin. The dose of warfarin required for stable anticoagulation varies at least 10-fold among patients, it has a narrow therapeutic index, and common genetic variations in the enzyme that metabolizes warfarin, CYP2C9, and in the target of warfarin, VKORC1, account for approximately 40% of the variability among patients. Substantial work is underway to define other genetic variations that contribute to warfarin response, and the importance of genetic variation on the quality of clinical care. Just as is the case for warfarin, the pharmacogenetics of other drugs such as clopidogrel, antihypertensives and antiarrhythmics are areas of considerable current research interest and effort.

Research activities: Pharmacogenetics

I visited Japan from October 20-29th and gave 4 talks on warfarin pharmacogenetics, 2 in Osaka and 1 each in Kobe and Kyoto. During my stay in Japan I first gave an invited talk at a Symposium at the Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society in Kobe (October 22nd). I attended the symposium, spoke about warfarin pharmacogenetics, and was impressed by the high quality of the science presented.

I then visited with Dr. Toshiyuki Miyata and his group at the National Cardiovascular Center Research Institute in Osaka (Friday October 23rd) where we discussed ongoing research activities in Dr Miyata's laboratory and I met with members of his laboratory.

Dr. Toshiyuki Miyata gave a broad overview on the ongoing work in his laboratory: this included work in several areas including pharmacogenetics, genetics of thrombosis, platelet function, ADAMTS13, as well as the genetics of hypertension. Dr Miyata and I share many common interests, including his work on warfarin. Variability in the *VKORC1* gene contributes to interindividual variability in the maintenance dose of warfarin, but it was unknown whether the *VKORC1L1* gene, a paralogous gene of *VKORC1*, with approximately 50% amino acid homology with the *VKORC1* protein, is also important. Dr Miyata and colleagues determined the relationship between *VKORC1L1* haplotypes and warfarin maintenance dose. They constructed haplotype blocks of the *VKORC1L1* gene using HapMap information from a Japanese population and genotyped patients on stable warfarin anticoagulation using 8 tag SNPs. They showed that none of the SNPs or haplotypes was significantly associated with the stable daily warfarin dose. This is an important finding since, although the *VKORC1L1* protein has significant homology with the *VKORC1* protein, it did not appear to alter function as tested in patients receiving warfarin. Dr. Miyata and his colleagues have also shown an association between warfarin dose and the 8016G>A genotype of the gamma glutamyl carboxylase, a vitamin K dependent enzyme.

In addition to this work on warfarin we discussed studies that have defined the doses of warfarin and other antithrombotic drugs such as clopidogrel in the Japanese population. Of mutual interest was genetic variation in CYP2C9. We discussed his work with novel variants of CYP2C9 that have been discovered in Asian populations. For example, he has found markedly decreased intrinsic clearance of diclofenac (a CYP2C9 substrate) in CYP2C9 *13, *30 and *33. These findings have major implications for individuals with these variants and future studies will be performed to determine the effect of these variants on warfarin dose in vivo. After meeting with Dr Miyata's laboratory I gave a talk in which I discussed the implications of warfarin genetic variants.

At the National Cardiovascular Center I also had a chance to meet Dr. Shigeki Miyata, director of the Transfusion service. His research area focuses on heparin induced thrombocytopenia (HIT) and platelet dysfunction induced by cardio-pulmonary bypass procedure. He described his extensive experience with HIT and the role that his laboratory

plays as a reference laboratory for assays. I was impressed by his extensive experience and expertise, there can be few people in the world with this degree of expertise in the area of HIT.

On Monday October 26th I visited Dr Kei Kamide from the Osaka University School of Medicine. I met with Professor Rakugi, Dr Kamide and the research group and they presented work to me and we discussed areas of interest. Dr Kamide is studying SNPs in hypertension in the Japanese population. With his colleagues he has identified several SNPs in the regulator of G-protein signalling 2 (RGS2) as well as other genes such as 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) and catecholamine-*O*-methyltransferase (COMT) that are associated with hypertension. They have performed a study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) that contribute to variability in response to angiotensin II receptor blockade (valsartan), calcium channel blockade (amlodipine) and thiazide diuretics (indapamide) and to establish the way to predict the most effective drug based on these SNPs in each individual. In this careful clinical study they have developed a unique approach of using combinations of several variants that predict response to different antihypertensive drugs. One of the difficult issues in pharmacogenetics is the demand from journals that studies be replicated. We discussed some strategies by which one could replicate the findings without repeating the identical study - an expensive option. One such option was to randomize patients to genotype based therapy - those receiving genotype based therapy would have their therapy selected according to their genotype, whereas the control group would receive standard therapy. Later, my presentation focused on the factors contributing to variability in warfarin response and the implications of genetics for the future care of patients on warfarin.

On Wednesday October 28th I visited the laboratory of Dr Hisanori Horiuchi in the Department of Cardiovascular Medicine at Kyoto University. I discussed ongoing studies with members of his laboratory. We share mutual interests in the factors contributing to variability in response to clopidogrel. Dr Horiuchi and his group have shown that the rate of clopidogrel resistance is 14% in Japanese patients undergoing coronary stent placement. One of the difficulties all researchers in the area of both "aspirin resistance", and "clopidogrel resistance" face is the choice of technique used to measure platelet response. We discussed the pro's and con's of different methodologies and Dr Horiuchi showed me data regarding a

new technique they are using and I shared data with him on a study we are doing on aspirin resistance in patients with inflammatory diseases. Of great interest regarding clopidogrel resistance in Japanese patients is the role of CYP2C19 genetic variants. Clopidogrel is a pro-drug that is activated to an active metabolite by CYP2C19. The prevalence of CYP2C19 alleles with reduced function is higher in Japanese populations than in populations from the US and Europe - thus one would predict that clopidogrel resistance would be a greater problem in the Japanese populations. This is exactly what Dr Horiuchi has found. Based on CYP2C19 genotype, 11 patients (44%) were classified as extensive metabolizers (EMs), 8 (32%) as intermediate metabolizers (IMs) and 6 (24%) as poor metabolizers (PMs). Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel was $32\pm 14\%$ in EMs, $18\pm 10\%$ in IMs ($P=0.04$ vs EMs) and $16\pm 13\%$ in PMs ($P=0.02$ vs EMs). Thus, they have shown that CYP2C19 polymorphisms are frequent in Japanese, and they markedly affect the antiplatelet effect of clopidogrel in a clinical setting. We discussed ways to address this including genetic testing, point of care phenotype testing, dose modifications and use of an alternate drug such as prasugrel. Again, I gave an overview on warfarin pharmacogenetics.

In all labs I visited I was impressed by the scientific excellence, the collegiality and the work ethic of the individuals I met. In addition to the many rich and excellent scientific discussions during my visit, my wife and I also enjoyed some of the rich and wonderful culture of Japan. We visited many historical sites, temples and parks in Osaka, Kobe, Nara and Kyoto. A special thanks and appreciation to my hosts in Osaka, Dr. Toshiyuki Miyata, Dr Shigeki Miyata, and Dr Kei Kamide, and in Kyoto, Dr Hisanori Horiuchi who made us very welcome and looked after our every need. I thank Drs Yuhei Kawano and Toshiyuki Miyata for the invitation and the agency that made this scientific visit possible.

平成 21 年度分

Ⅱ 外国への日本人研究者派遣事業

研究実績報告書

1. 派遣研究者

所属・職名：国立循環器病センター 心臓血管内科 レジデント
氏名：篠岡 太郎、東 晴彦

2. 派遣先および研究指導者

国名：アメリカ合衆国
所在地：アリゾナ州、ツーソン市
名称：アリゾナ大学、サーバーハートセンター
職名：医学部教授（循環器部門）
氏名：Karl B. Kern

3. 主任研究者

所属・職名：国立循環器病センター 心臓血管内科部長
氏名：野々木 宏

4. 派遣期間

平成 21 年 10 月 1 日 ～ 平成 21 年 12 月 31 日（92 日間）

5. 研究課題

蘇生後心筋保護における低体温療法・再灌流療法、薬物(ニコランジル・hANP)投与の効果に関する研究

6. 研究活動の概要

<アリゾナ大学について>

アリゾナ大学はアメリカ南西部のアリゾナ州第2の都市であるツーソン市に位置する総合大学であり、その創設は 1885 年とアリゾナ州最古の大学として知られている。人口 60 万人のツーソンにおいて、1.5km²の広大な敷地に約 3 万人の学生を擁しており、アリゾナ大学の街といっても過言ではない。

大学付属病院(University Medical Center：UMC)は厳密的には大学からは独立した組織となっており、私立病院の範疇に入れられてはいるものの、州唯一のアリゾナ大学医学部を併設しており、実際には大学組織の一部として機能している。地域の中核を担う急性期病院で、ベッド数は 399 ベッドと日本の総合病院などと比較すると少ないものの在院日数の短い米国においては比較的大規模な病院である。派遣受け入れ機関の Sarver Heart Center (SHC) は UMC 内の循環器領域研究部門であり、UMC に隣

接して6層建ての独立した建物を占有している。同センターは所長の Gordon Ewy 教授を筆頭に、心臓内科・心臓外科の臨床・研究が積極的に展開されており、さまざまな成果を上げている。

<Sarver Heart Center (SHC) CPR グループについて>

今回は Sarver Heart Center 内、CPR(蘇生)グループにて研究を行った。CPR グループは Karl B. Kern 教授を中心としたグループであり、UMC 内の麻酔科・代謝内科の研究者とも密接な連携をとり、研究に取り組んでいる。同グループは全米でも屈指の蘇生領域の研究グループとして知られており、現在までに無数の新たな知見を発信している。

1980年代より、CPR グループはブタを中心とした大型哺乳類での蘇生に関する研究を開始しており、カテコラミン投与が蘇生後短期間の予後を改善するなどの重要な報告を行っている以外にも1990年代初頭には蘇生手技・方法についても多くの報告を行っている。特に、蘇生手技に人工呼吸が必要かどうかの議論においては、蘇生には冠灌流圧が最も重要であるとのデータを動物実験にて提示し、アリゾナ州においては院外心停止症例では胸部圧迫を持続的に行う心脳蘇生法(Cardiovererebral resuscitation)の実施が救急隊員に徹底され、救命率の向上が証明されるなど、その研究結果は臨床応用に至っている。

<派遣までの経緯・準備等について>

我々は集中治療部での研修等における臨床医学での経験から、心肺停止患者において、心肺蘇生にて幸いにも自己心拍が再開したにも関わらず、蘇生後の低心機能により救命でいかなかった症例を経験し、そのメカニズムについて興味を抱いていた。前述の通り、強心薬の投与により蘇生後急性期の救命率の上昇は示されていたが、重症心不全においては強心薬が予後を不良の一因子になりえるとのエビデンスも確立されており、強心薬のみの投与のみでは蘇生後低心機能を予防できず、長期的な救命率の向上にはつながらないのではないかと考えた。その中で、心保護薬として日本では心不全に対して頻用されるようになったカルペリチドや、Pre conditioning 効果があるとされているニコランジルが蘇生後低心機能の予防効果を持ち得るのではないかと推測した。これらの薬剤が蘇生後に良好な転帰を来すかどうかなどを研究した報告は非常に稀であり、ラットなどで検討した例はあるものの、臨床応用できるにはほど遠く十分な知見があるとは言い難い状況であった。

そのような状況の中、2008年12月に当該研究による外国人研究者招聘事業によりSHCのKern教授が来日され、国立循環器病センターにて共同研究に関する意見交換や講演が催された。講演後には、研究代表者である野々木部長と共に蘇生後低心機能についてディスカッションをする機会があり、これらの薬剤の有用性などについても深く議論を行った。その議論の中で、日本ではなかなか行う事が困難である大型哺乳類を用いた実験について、実際に我々2名が米国SHCを訪問し、研究を行う事に関し快

諾をいただき、準備を開始した。同時に、研究代表者の野々木部長の御推薦もあり、循環器病研究振興財団の日本人研究者派遣事業に御採択頂き、今回の派遣に至った。

<実験・研究内容について>

アリゾナ大学 Sarver Heart Center の CPR グループではブタを用いた動物実験を以前より行っており、前述の通り現在の ACLS に影響を与えた多くの成果を報告してきた。我々は動物実験を行なうにあたり必要な一般的な知識を渡米前に勉強し、IACUC (Institutional Animal Care and Utilization Committee) の試験に合格した。

まず、我々はすでに CPR 研究室で始まっていた Eptifibatide に関するプロトコルを踏襲する形で実験を開始した。血小板凝集は、血小板上にあるグリコプロテイン (GP) の IIb/IIIa 受容体にフィブリノーゲンが結合して起こるが、Eptifibatide はその IIb/IIIa 受容体を占拠することにより血小板凝集抑制する薬剤である。また、蘇生後に見られる心機能低下の要因として、心停止時に冠血流がなくなること、または心肺蘇生時に冠血流が低下することで心筋の stunning が起こること、冠血流が回復した後も再還流障害が生じることなどが考えられている。そこで、IIb/IIIa 受容体阻害薬で冠動脈形成術後の微小循環が改善したとの報告もあることから、我々は蘇生後のブタに Eptifibatide を投与することで心筋の微小循環が改善するかを検討した。

平均 34kg のブタをイソフルレンで麻酔し、気管挿管を施行した。その後、人工呼吸器による呼吸管理とし四肢誘導の心電図モニターを装着。右外頸静脈と右総頸動脈からカットダウン法でシースを留置した。右外頸静脈のシースから Swan Ganz カテーテルを挿入し、肺動脈まで進め、wedge pressure、心拍出量を測定した。右総頸動脈のシースからは圧トランスデューサーを挿入し大動脈圧と左室圧を測定。その後、左室造影により左室駆出率を測定した。さらに、前下降枝に Doppler Flow wire を挿入し冠動脈予備能 (CFR) を測定した。これら、ベースラインの血行動態、LVEF、CFR を計測後に右室にペーシング電極を挿入し、電氣的に心室細動 (VF) を誘導し心停止モデルを作成した。VF のまま人工呼吸器もはずし、無治療で経過観察。12 分後に 100 回/分の心臓マッサージと人工呼吸器による 10 回/分の人工呼吸を開始し、アドレナリン 1mg の静注を行なった。CPR 中も心電図、呼気終末炭酸ガス分圧、大動脈圧、右房圧などはモニターされており、収縮期血圧が 50 以上でかつ脈圧が 20 以上となったときに蘇生 (Return of spontaneous circulation 'resuscitation') と定義した。血行動態、Doppler Flow wire による CFR の測定は蘇生後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間後に計測した。

Eptifibatide の蘇生後の心筋微小循環への効果を検討するために、4 群に分けて検討した。Eptifibatide 180mcg/kg を CPR 開始直後にボラスで投与し、蘇生後に 2mcg/kg/min で 4 時間投与した Group 1、CPR 開始直後には Placebo を投与し、蘇生後に Eptifibatide ボラス投与、引き続き 4 時間持続投与した Group 2、CPR 中にも蘇生後にも持続投与を行なった Group 3、プラセボの投与を行なった Group 4 で比較検討した。4 頭のブタがプロトコルを完了できずに死亡したため、Group 1:n=5、Group

2:n=4, Group 3:n=5, Group 4:n=10 となった。結果としては、Eptifibatide が蘇生後の心筋微小循環障害を予防する効果が認められたが、心機能低下を改善するまでの効果は認められなかった。この研究は、論文化し蘇生分野では主要な英文雑誌である「Resuscitation」に投稿中である。

また、蘇生後の低体温療法の効果を検討するため、ブタを 34~35°C に氷で冷却し、上記と同様に VF を誘発し、CPR を施行しながら血行動態や生存率を検討した。近年、蘇生後急性期治療の 1 つとして低体温療法が盛んに行なわれるようになったが、そのエビデンスはまだまだ乏しく比較的大きな動物を用いた実験は数が少ない。このプロトコールにも我々は参加し、実験を行なった。我々の帰国後もまだ実験は引き続き行なわれており、実験が終了後には論文報告が成される予定である。

さらに、ブタの冠動脈前下降枝にプラグを詰めて AMI モデルを作成し、すぐに VF を誘発し CPR を施行した群と、プラグを詰めて 2 週間経過した後(慢性期 MI モデル)に VF を誘発し CPR を施行した群での比較検討も行なった。この研究についても今後論文報告が成される予定である。

なお、派遣当初はニコランジルならびに hANP を用いた薬効評価も検討しており、その薬理効果・期待できる心保護作用、また逆に冠灌流圧を低下させることにより蘇生率が低下する可能性などについて研究指導者である Kern 教授ならびに Ewy 教授らと多くの議論を行った。実験プロトコールについても作成し、実施する予定となっていたが、派遣先研究施設にて実施していたプロトコールが手技上の問題などから進行に遅れが生じたため、現地にて実際に同プロトコールを実施することはできなかった。しかしながら、今後も両施設にて協力体制を維持しながら引き続き実験を継続する予定としている。

7. 派遣事業の成果

今回の派遣事業に関し、低体温療法ならびに蘇生後薬物療法について多くの実験ならびにデータ解析を行う事が出来た。特に、日本では実際に実験を行う事が極めて困難である大型哺乳類(ブタ)の実験を行い、データを共有することが出来たことは大きな成果と考える。

具体的な研究成果として Eptifibatide の実験では論文化が進んでおり、現在英文誌「Resuscitation」に投稿中である。また、低体温療法や性差についての検討等についても引き続きデータ解析・論文化を進めている。

また、派遣中に AHA2009 に参加し、数多くの蘇生研究機関・関連研究機関の研究者と意見交換をすることが出来、多くの知見を得た。それらを踏まえ、今後の研究に反映させる予定としている。

8. 成果の評価

当該研究(主任研究者:野々木 宏)は、急性心筋梗塞症の超重症例への対策を検討し、蘇生後脳症に対する低体温療法や再灌流療法の標準化を検討しているため、蘇生

後の心筋保護についても重要な課題の1つである。派遣された篠岡医師、東医師は、蘇生後ケアの世界的な研究施設であるアリゾナ大学で3ヶ月間の短い期間に2名の利点を活かして効果的な研究成果をあげ、2編の論文にまとめている。今回の研究者派遣は、研究者交換事業の一環であり、まさに招聘した Kern 教授の下で当方からの若手研究者が成果をあげたことで事業の主旨に合致したものと考えられる。引き続き当該研究の推進に今後国内で引き続き同様のテーマで成果をあげる予定であり、研究成果が今後も活かされるものと確信される。

主任研究者 野々木 宏

平成 21 年度分

Ⅲ 若手研究者育成活用事業
(リサーチ・レジデント)

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名

高本 偉碩

2. リサーチ・レジデント期間

平成 21 年 4 月 1 日 ~ 平成 22 年 3 月 31 日

3. 受入機関

名称 : 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

所在地 : 東京都文京区本郷 7-3-1

4. 研究指導者

所属 : 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

職名 : 教授

氏名 : 門脇 孝

5. 研究課題

保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの
診断・管理のエビデンス創出のための横断・縦断研究

6. 研究活動

①概要

平成 21 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において「保健指導への活用を前提としたメタボリックシンドロームの診断・管理のエビデンス創出のための横断・縦断研究」に関し、特にメタボリックシンドロームの診断基準ならびに保健指導対象者の選定と階層化の方法の最適化に必要なエビデンスの構築に関する研究を開始した。

②内容

研究に着手後、平成 21 年度においては、北海道端野・壮瞥町、山形県舟形町、福岡県久山町(第 3 集団)、MONKS(京都職域)、広島健診受診者集団、茨城県筑西市協和地区、大阪府八尾市南高安地区、大阪府吹田市、沖縄県豊見城市検診集団、富山職域、愛媛県南西部地区、広島県地域コホート(原爆被爆者及びコントロール集団)の計 12 コホートを統合したデータベースを構築し、特定健診の対象となる 40 歳~74 歳の男性約 17,000 人、女性約 19,000 人の計約 36,000 人を対象に解析を実施した。

(A) 横断的研究では、ウエスト周囲径と心血管疾患のリスクファクターの重積の関連について解析した。また、(B) 縦断的研究では、ウエスト周囲径と心血管イベント発症との関連、メタボリックシンドロームと心血管イベント発症との関連、ならびに現行の特定健診における保健指導対象者の選定と階層化の方法に準拠した場合の保健指導レベル別にみた心血管イベント発症の予測能について解析を行った。

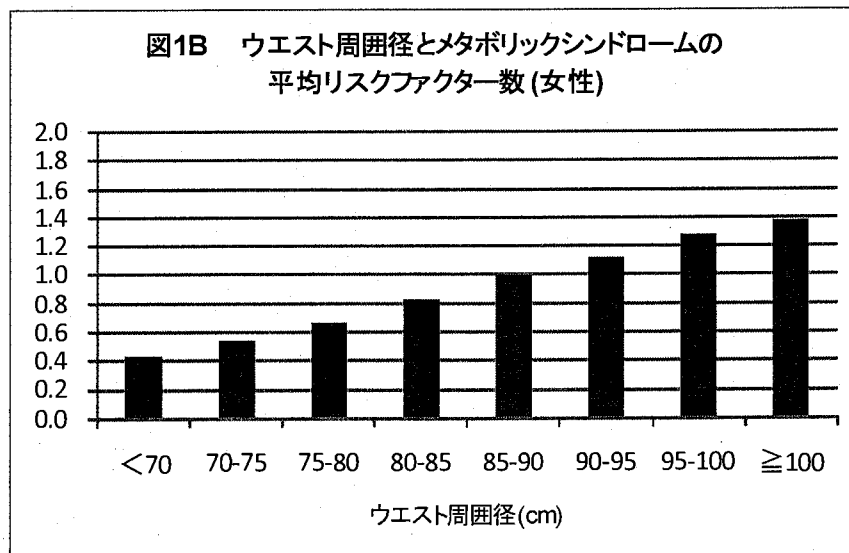
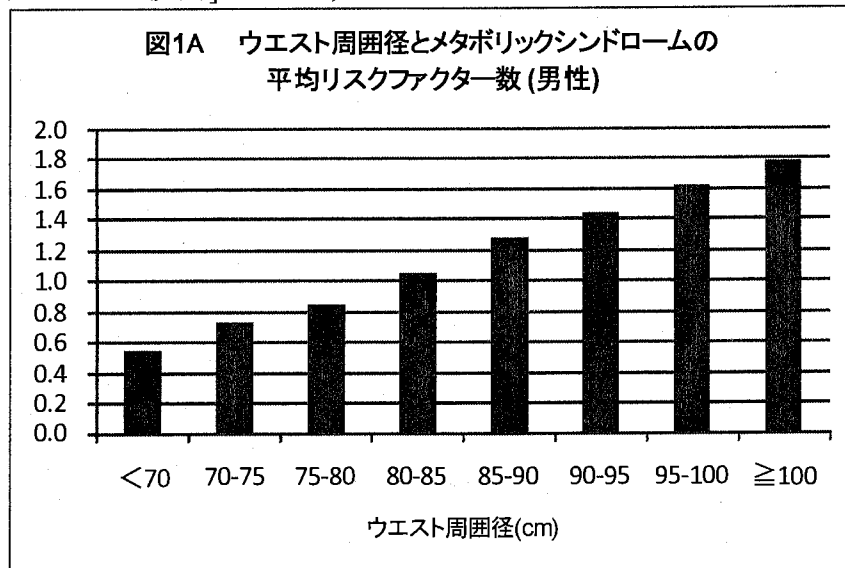
③成果

(A) 横断的研究の結果

①ウエスト周囲径とリスクファクター集積の関係

ウエスト周囲径が増加するに伴い、メタボリックシンドロームの平均リスクファクター数・リスクファクター重積者の割合は増加した。

平均リスクファクター数が1を超えるウエスト周囲径のカテゴリーは男性では80-85cmから、女性では85-90cmからであり、内臓脂肪面積から求めた知見とほぼ合致した[絶対的リスクの検討] (図1A,B)。

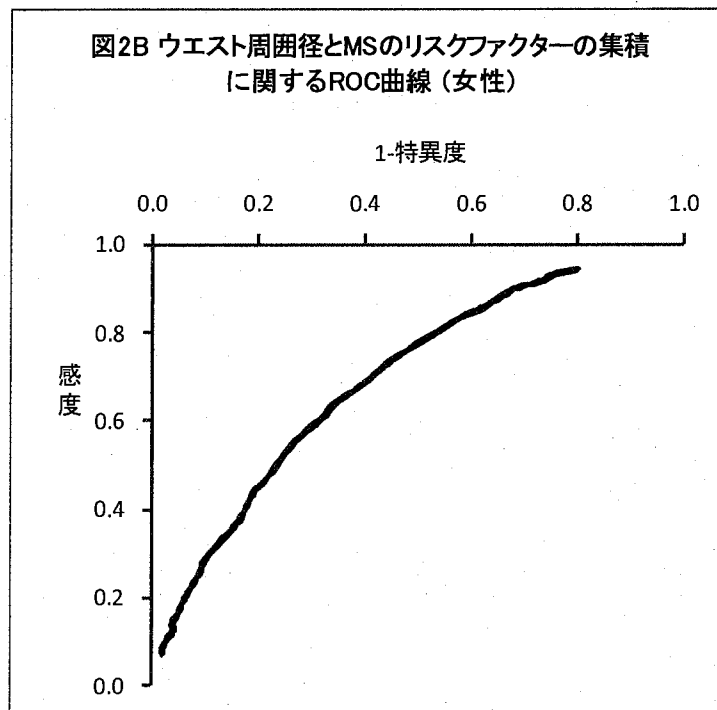
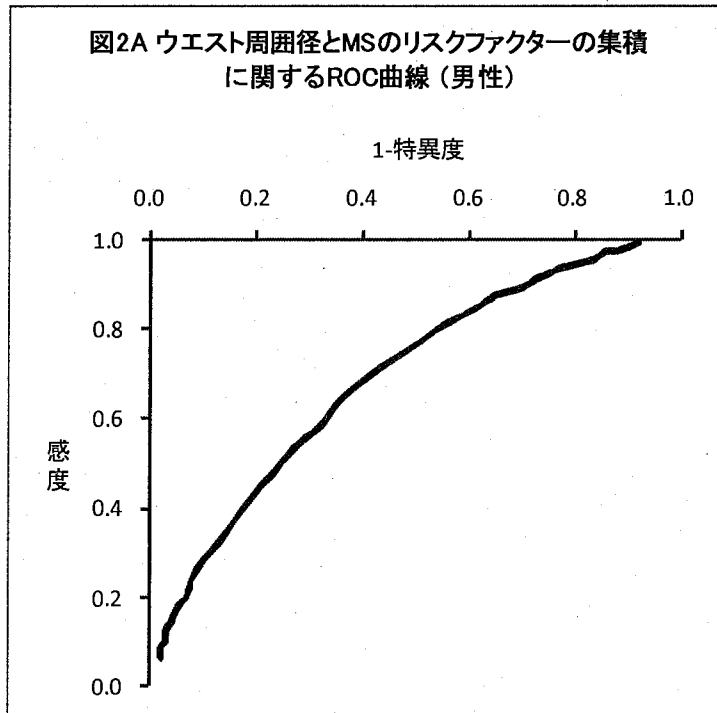


*リスクファクター：血糖高値・血圧高値・脂質異常

また、ウエスト周囲径が増加するに伴い、メタボリックシンドロームのリスクファクター（血糖高値・脂質異常・血圧高値）の2つ以上が重積するオッズ比は単調に上昇していた[相対的リスクの検討]。

②ウエスト周囲径とリスクファクター集積に関するROC曲線解析

ROC曲線解析で感度と特異度の和を最大にするポイントを求める手法により、メタボリックシンドローム(MS)のリスクファクターの重積を予測するウエスト周囲径のカットオフ値は、男性85cm前後(85cmの場合:感度0.64、特異度0.64)、女性80cm前後(82cmの場合:感度0.64、特異度0.65)と算出された[相対的リスクの検討] (図2A,B)。



ウエスト周囲径以外のリスクファクターのカットオフ値を日本基準に準拠した場合、メタボリックシンドロームの性・年齢調整オッズ比 (95%CI) は、男性ではウエスト周囲径のカットオフ値を 85cm とすると 3.14 (2.94-3.36)、女性ではウエスト周囲径のカットオフ値を 80cm とすると 2.83 (2.60-3.08)であった[相対的リスクの検討]。

③リスクファクター集積の予測におけるウエスト周囲径と BMI の比較

ウエスト周囲径ないしは BMI とリスクファクター集積に関する ROC 曲線面積を算出すると、男女ともに、ウエスト周囲径の面積の方が大きかった。

(B) 縦断的研究の結果

① ウエスト周囲径(単独)と心血管イベント

男女ともにウエスト周囲径が増加するほど虚血性心疾患の発症率が上昇し、女性の場合その傾向は統計学的にも有意であった[絶対的リスクの検討]。

また女性の場合では、ウエスト周囲径が増加するほど脳梗塞と合わせた虚血性循環器疾患や全循環器疾患の発症ハザード比も上昇し、統計学的に有意な傾向が認められた[相対的リスクの検討]。

② ウエスト周囲径(単独)と心血管イベントに関する ROC 曲線解析

心血管イベントの発症を予測するウエスト周囲径(単独)のカットオフ値は、男女ともに ROC 曲線がほぼフラットであるため、感度と特異度の和を最大にするポイントを求める手法では決定困難であった。

③ 心血管イベント予測におけるウエスト周囲径(単独)と BMI(単独)の比較

ウエスト周囲径(単独)ないしは BMI(単独)と心血管イベントの発症に関する ROC 曲線はともにほぼフラットではあるが、ROC 曲線面積で比較した場合、男性ではウエスト周囲径の面積の方が大きかった。

④ メタボリックシンドロームと心血管イベント

メタボリックシンドロームの診断におけるウエスト周囲径のカットオフ値を 75～90cm の間に設定した場合、非メタボリックシンドローム群に対するメタボリックシンドローム群の全循環器疾患発症の年齢調整ハザード比は男性 1.5～1.7、女性 1.6～1.8 で、カットオフ値によらず同程度に有意であることが明らかとなった[相対的リスクの検討]。また、ウエスト周囲径のカットオフ値を低く設定するほど、PAF(population attributable risk fraction:人口寄与危険度割合)は増加した(表)。

表 非メタボリックシンドローム群に対するメタボリックシンドローム群の全循環器疾患発症の年齢調整ハザード比 (95%CI) と PAF (95%CI)
-ウエスト周囲径の基準値を変化させた場合の検討-

メタボリックシンドロームにおけるウエスト周囲径の基準値	男性	
	ハザード比	PAF
75cm	1.45 (1.23-1.71)	11.8 (6.1, 17.0)
80cm	1.48 (1.25-1.76)	11.2 (5.9, 16.2)
85cm	1.56 (1.30-1.87)	9.7 (5.3, 14.0)
90cm	1.70 (1.37-2.12)	6.9(3.6, 10.2)

メタボリックシンドロームにおけるウエスト周囲径の基準値	女性	
	ハザード比	PAF
75cm	1.74 (1.43-2.13)	12.7 (7.5, 11.6)
80cm	1.75 (1.42-2.16)	11.0 (6.2, 15.5)
85cm	1.79 (1.42-2.25)	8.7 (4.6, 12.7)
90cm	1.62 (1.21-2.16)	4.3 (1.2, 7.3)

さらに、ウエスト周囲径が現行の基準値を満たす者と満たさない者に層別化して、メタボリックシンドロームのリスクファクター数による全循環器疾患発症の年齢調整ハザード比を検討した。ウエスト周囲径が基準値未満かつリスクファクター数 0 の者を対照群におくと、ウエスト周囲径が基準値を満たす場合・満たさない場合ともに、リスクファクター数の増加とともにハザード比は上昇した[相対的リスクの検討]。

⑤特定保健指導における階層化と心血管イベント

現行の特定保健指導に準じて、ウエスト周囲径と BMI の基準をともに満たさない者を対照群とした場合、全循環器疾患の年齢調整ハザード比(95%CI)は、動機づけ支援レベル群では男性 1.10 (0.91-1.34)、女性 1.42 (1.16-1.74)、積極的支援レベル群では男性 1.64(1.33-2.03)、女性 1.50(1.03-2.20)と有意な上昇を認めた[相対的リスクの検討]。

(C)考察

日本人において、ウエスト周囲径はリスクファクター重積や心血管イベント発症と関連があり、簡便かつ単一の指標としてウエスト周囲径は BMI よりも有用であると考えられた。

ウエスト周囲径が増加すると、心血管疾患のリスクファクターは著明に重積した。絶対的リスクの検討では、男性では 80-85cm から、女性では 85-90cm から、平均リスクファクター数が 1 を超えた。相対的リスクの検討では、ROC 曲線解析ではカットオフ値は男性 85cm 前後、女性 80cm 前後と算出され、その場合のメタボリックシンドロームのオッズ比は、男性 3.14、女性 2.83 であった。

ウエスト周囲径が増加すると、絶対的リスクの検討では、心血管イベントの発症率が上昇することが明らかとなった。

ウエスト周囲径の基準値を 75~90cm の間に設定した場合、非メタボリックシンドローム群に対するメタボリックシンドローム群の心血管イベント発症のハザード比は同程度に有意であることが明らかとなった。また、ウエスト周囲径の基準値を満たさない場合でも、リスクファクターが存在・重積すると心血管イベント発症のリスクが高まることも明らかとなった。

さらにウエスト周囲径の基準値を男性 85cm 以上、女性 90cm 以上とする現行の特定健診における保健指導対象者の選定と階層化の方法は、心血管イベント発症のリスクが高い者の抽出に有効であることが裏付けられた。

以上のことから、メタボリックシンドロームの診断基準におけるウエスト周囲径の位置付けと基準値の設定、ならびに保健指導対象者の抽出アルゴリズムの最適化に関しては、横断的研究ならびに縦断的研究における絶対的リスクの検討・相対的リスクの検討で示された科学的根拠に加え、社会的な医療資源も勘案しながら、予防医学的見地から検討・決定すべきものであると判断する。

④研究代表者の評価

複雑多岐にわたる 12 コホートの状況を詳細に調査・分析した上で本研究の全体的なプロトコルを策定して、実務面での様々なハードルをクリアしながら統合データベースを構築し、上記解析結果に示すような着実な研究成果が得られたことは極めて高く評価できる。

研究代表者 門脇 孝

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名

塚本 蔵

2. リサーチ・レジデント期間

平成 21 年 4 月 1 日 ～ 平成 22 年 3 月 31 日

3. 受入期間

名 称 : 国立循環器病センター臨床研究開発部門

所 在 地 : 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

4. 研究指導者

所 属 : 国立循環器病センター臨床研究開発部門

職 名 : 心臓血管内科部長、臨床研究部長

氏 名 : 北風 政史

5. 研究課題

ヒスタミンと心不全の関連についての検討 (H2 レセプタブロッカーは心不全を改善するか)

6. 研究活動

概要

平成 21 年 4 月 1 日より上記 4 の研究指導者の下において、ヒスタミンと心不全の関連についての検討 (H2 レセプタブロッカーは心不全を改善するか) に関する研究課題に関し、ヒスタミン H2 レセプター遮断薬による心不全改善効果のメカニズムを生化学的、分子生物学的に解析することを目的とし、心筋細胞における H2 レセプターの新たなシグナルの検索を行った。また、ヒスタミンの心筋細胞におけるエネルギー代謝への効果について、生細胞内 ATP 濃度イメージング法を用いて検討を行った。

内容 (内容・成果で 3000 字以上)

心臓には肥満細胞をはじめとするヒスタミン貯蔵部位が存在し、虚血、心筋炎、心不全等の病態で生理活性物質ヒスタミンが放出され、心臓に種々の作用をもたらすと考えられている。現在までに4種類のヒスタミン受容体 (H1 -H2) が発見されており、ヒト心臓では心房、心室ともにH2受容体が豊富に発現している。近年、主任研究者らは新しい情報工学手法を用いた臨床情報解析により、消化性潰瘍の治療薬である“ヒスタミンH2レセプター遮断薬”が、すでにACE阻害薬・β受容体遮断薬で治療されている心不全症例の心機能改善に有効であることを見出した。また、イ

又虚血・再灌流障害モデル、ヒスタミンH2レセプターの欠損マウスを用いた大動脈縮窄心不全モデル、および、成犬ペースング不全モデルにおいて、H2レセプター遮断薬の心保護・心不全予防効果が確認され、成果発表を行っている。さらにイヌペースング心不全モデルでは、慢性心不全に対して最も有効なβ遮断剤と併用することによりさらに心不全が改善することも示され、その機序として心筋中のcAMP濃度がβ遮断剤単独投与群に比しヒスタミンH2レセプター遮断薬併用群でさらに有意に低下するという相加的効果が観察されている。

これらの背景をもとに本研究者は、ヒスタミンH2レセプター遮断薬による心不全改善効果のメカニズムの生化学的・分子生物学的解析およびヒスタミンの心筋細胞におけるエネルギー代謝に対する効果について検討を開始した。

1) 心筋細胞での H2 受容体シグナル制御蛋白質の同定 (H2 受容体のシグナルを制御する未知の結合蛋白質の同定)

ヒスタミン受容体は、7回膜貫通型のG蛋白質共役受容体(GPCR: G protein-coupled receptor)である。GPCRに共通する一般的な基本的機能は、細胞外から情報を受け取ると立体構造の変化が生じ、共役している三量体G蛋白質の活性化を介して細胞内へとシグナルを伝達することであり、そのシグナル伝達の基本的な機構は明らかになってきた。しかし、これらのシグナル伝達はこれまで考えられているほど単純でなく、様々な因子(GPCRの多量体化やリン酸化)によって巧妙に制御を受けていることが報告されており、近年、GPCRに結合しそのシグナルを制御する蛋白質が存在すると考えられている。H2受容体はGs蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼと共役している点で、β1アドレナリン受容体と同様であり、ヒスタミン刺激もcAMPの産生によるPKAの活性化(Gs/cAMP/PKA経路)を介して陽性変力作用を惹起する。しかしながら、不全心では高度かつ持続的なカテコラミン刺激によるβ1アドレナリン受容体のダウンレギュレーションにより、PKA活性が低下しており、このような病態でH2受容体を介するシグナルがどのように心不全の病態を修飾しているのかを解明することは、極めて意義深い。とりわけ心筋細胞において、H2受容体を介する細胞内シグナルとβ1アドレナリン受容体を介するシグナルとの間に何らかの相違点が存在するのかを明らかにすることは、心臓でのH2受容体を介する細胞内シグナル伝達機構の解明、さらには、ヒスタミンH2レセプター遮断薬の心不全改善の分子機序を理解する上で極めて重要であると考えられる。そこで、心筋細胞における7回膜貫通型のGPCRであるH2レセプターの新たなシグナルの検索を開始し、かかる目的のために、心筋細胞のH2受容体に対するGPCR制御蛋白質を同定することに着手した。

2) ヒスタミン刺激と心筋代謝(ATP産生)に関する検討(生細胞内ATP濃度イメージング法を用いた検討)

近年、HeLa細胞および初代培養骨格筋細胞においてヒスタミン刺激がミトコンドリア内カルシウム濃度の上昇を介し、ミトコンドリア内および細胞質内のATP濃度を増加させることが報告された。そこで、心筋細胞においてもヒスタミンが心筋細胞のエ

エネルギー代謝に何らかの影響を与えるかどうか、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して生きた細胞内の ATP 濃度を可視化する蛍光プローブ「ATeam」を用いて検討した。A Team は CFP、バクテリア由来の ATP 結合蛋白質ε、YFP をタンデムに連結した人工蛋白質であり、細胞内に導入させ顕微鏡上で FRET の指標である細胞の YFP/CFP 比を計測する。ATP 濃度が低ければ開いた構造の ATeam の割合が高くなり YFP/CFP 比が低くなり、ATP の濃度が高ければ閉じた構造の ATeam の割合が高くなり YFP/CFP 比が高くなる。本方法は、ひとつひとつの生細胞内の ATP 濃度の局所的な違いやダイナミクスを可視化することができる画期的な方法である。

成果

1) 心筋細胞での H2 受容体シグナル制御蛋白質の同定 (H2 受容体のシグナルを制御する未知の結合蛋白質の同定)

H2 受容体の結合蛋白質を同定するストラテジーとして、アデノウイルスを用いてタグ付きのヒスタミン H2 受容体を強制発現させ、免疫沈降法 (IP) で結合蛋白質を同定する方法を用いた。対照としてβ1 アドレナリン受容体、および Gq 蛋白質共役型受容体であるアンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (AT1) を同様に強制発現させることで、H2 受容体に特異的な結合蛋白質を同定することとした。

GPCR はその構成アミノ酸はほとんどが疎水性アミノ酸であり、非常に特徴的な構造をしているため、強制発現の系で内因性の GPCR に近い形で正しく発現させることができるかが問題となった。そこで、まず 293T 細胞を用いて強制発現系の条件検討を開始した。293T 細胞に GPCR を発現させ IP/Western blot 法で強制発現させた GPCR の発現を確認したところ、本来の分子量よりも高い分子量域にスメアーとして強く認められた。原因として、①目的蛋白質自体の翻訳後修飾 (糖鎖修飾、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など) ②サンプル調整、可溶化の問題 (界面活性剤の種類、還元条件、塩濃度、pH) が考えられ、種々の検討を行ったところ、サンプル処理の最終段階における還元反応に際し、2-メルカプトエタノール (2-ME) を加えて高温でボイルすることが膜蛋白質の凝集を起こしていることが判明した。そこで、2-ME の代わりにボイル不溶性還元剤 DTT を用いたところ、スメアーは消失し本来の分子量と一致した高さで GPCR の発現が認められるようになった。尚、最終の細胞可溶化の条件は、20mM MOPS, pH7.0, 300mM NaCl, 1% CHAPS, 10% Glycerol とした。

次に、強制発現の系では目的の蛋白質が本来の細胞局在とは異なる部位に発現することが多いため、強制発現した GPCR の細胞内局在の確認を行った。COS7 細胞に前述の 3 種類の GPCR を発現させ、免疫染色法で局在を確認したところ、いずれも本来の細胞内局在部位である細胞膜へ発現されているのを確認した。

次に、強制発現させた GPCR が内因性の GPCR 同様に機能しているかの確認を行った。AT1 受容体はリガンドであるアンジオテンシン II が結合すると Gq 蛋白質を介する細胞内シグナルにより小胞体から細胞質内に Ca^{2+} を放出することで、細胞質内 Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇する。293T 細胞は内因性の AT1 受容体を発現していないため、293T 細胞に AT1 受容体を強制発現させた後、アンジオテンシン刺激を加え、細胞質内 Ca^{2+}

の変化を観測することで強制発現した GPCR の機能を確認できる。この結果、AT1 受容体を強制発現させた 293T 細胞でもアンジオテンシン II 刺激により細胞質内 Ca^{2+} の一過性の上昇を認めたことから、強制発現させた GPCR が内因性の蛋白質と協調して機能していると考えられた。

ここまでの結果で、GPCR の強制発現系は内因性の GPCR と同様な細胞内局在および機能を発揮することが確認できた。そこで次に、その結合蛋白質を同定することとした。その戦略としては、アデノウイルスを用いて上述の 3 種類の GPCR を心筋細胞にそれぞれ強制発現させ、 $[^{35}S]$ Met/Cys で RI 標識した後、免疫沈降法で強制発現した GPCR を回収し、回収したサンプルを逆相高圧液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で分離、各フラクションを SDS-PAGE で泳動し、H2 受容体と AT1 受容体、H2 受容体と $\beta 1$ 受容体との間で蛋白質のバンドのパターンを比較することで H2 受容体特異的な結合蛋白質を同定する方法を採用した。その結果、いくつかの H2 受容体特異的なバンドを認めたが、いずれもシャペロン蛋白質や転写・翻訳機構に関連する蛋白質であり、H2 受容体特異的なシグナル制御蛋白質とは考えられなかった。その原因としては、GPCR を強制発現させると、mature form (細胞膜表面に存在) と immature form (小胞体内に存在) ができてしまい、免疫沈降法によって共沈してきた蛋白質がいずれにも由来することが考えられた。

今回、期間内にヒスタミン H2 受容体特異的なシグナル制御蛋白質を同定することはできなかったが、今後は、①リガンド (ヒスタミン) 刺激の有無での検討、②細胞膜分画のみ回収したサンプルを用いた検討、を行うことにより目的の蛋白質を同定することが可能になると考えられる。一方、H2 受容体とシグナル制御蛋白質の結合が不安定なことも考えられることから、ホルムアルデヒドによる架橋反応を行って生化学的な結合を安定させた状態で、結合蛋白質を同定する方法も、今後、検討していく予定である。

2) ヒスタミン刺激と心筋代謝 (ATP 産生) に関する検討 (生細胞内 ATP 濃度イメージング法を用いた検討)

細胞質内 (cyto ATeam) およびミトコンドリア内 (mito ATeam) の ATP 濃度を可視化する蛍光プローブ「ATeam」を共同研究者より譲渡して頂いた。まず、アデノウイルスベクターに「ATeam」を組み込み、培養心筋細胞でも発現できるようにした。次に、新生仔ラット培養心筋細胞および HeLa 細胞に ATeam を発現させた後、ヒスタミン刺激を行い、蛍光顕微鏡で細胞質内およびミトコンドリア内の ATP 濃度を測定した。従来の報告通り、HeLa 細胞ではヒスタミン刺激により細胞内の ATP 濃度の上昇を確認できたが、培養心筋細胞ではヒスタミン刺激による明らかな細胞内 ATP 濃度の変化を認めなかった。ただし、まだ数回の検討しかできておらず、今後、細胞培養の条件 (starvation の有無、低酸素下での検討等) を変えて評価を継続していく予定である。

研究主任者の評価

本研究は、ヒスタミン H2 受容体の心筋細胞でのシグナリングを解明するために、心筋細胞特異的な H2 受容体シグナル制御蛋白質を同定することを目的とした画期的な研究である。研究者は期間内に H2 受容体シグナル制御蛋白質を同定することはできなかったが、その基礎となる方法論を確立した。今後の検討により、心筋細胞特異的な H2 受容体シグナル制御蛋白質の同定およびその分子メカニズムの解明が期待される。また、GPCR は細胞表面受容体の中で最大のファミリーを構成しており、現在、臨床で使用されている医薬品の約半数が GPCR を標的としており、GPCR とその関連蛋白質は創薬のターゲットとして重要な位置を占めている。本方法は、H2 受容体に限らず、その他の GPCR に対してもその応用が可能であり、将来的な有用性が高いと期待される。

一方、ヒスタミン刺激と心筋代謝（ATP 産生）に関する検討では、最先端の技術を応用して心筋細胞での ATP 濃度の評価を行っている。従来の細胞内 ATP 濃度を測定する方法は、多数の細胞をすりつぶした抽出液中の ATP をホタルルシフェラーゼの発光などを用いて測定する方法であったため、細胞や組織が持つ ATP の時間的、空間的情報を得ることは不可能であった。「ATeam」の導入によりヒスタミンの心筋細胞のエネルギー代謝（ATP 産生）に対する作用が、より詳細な検討が可能となると考えられる。

これらの基礎的研究により、今後、H2 受容体遮断薬の心不全改善効果の分子メカニズムの解明が期待される。

主任研究者 北風 政史

平成 20・21 年度厚生労働科学研究費補助金
循環器疾患等生活習慣病対策総合研究推進事業
研究報告集

発 行 平成 22 年 6 月
発行所 大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号
国立循環器病研究センター内
財団法人 循環器病研究振興財団
TEL 06-6872-0010
FAX 06-6872-0009