

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01700

研究課題名(和文) 心臓と骨の連関から考える運動療法による慢性心不全・骨粗鬆症の革新的治療戦略

研究課題名(英文) Beneficial Effects of Exercise for heart and bone in heart failure

研究代表者

松本 泰治 (Matsumoto, Yasuharu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90600528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、急性心筋梗塞後の慢性心不全動物モデルを用いて、心不全と併存する骨の構造的・機能的異常(心臓と骨の連関)を明らかにし、両者に対する運動療法の効果を明らかにすることである。我々は遺伝子改変マウスモデルに同様の手技で急性心筋梗塞を作成した心機能障害マウスモデルを作成した。また、心筋梗塞モデルに、トレッドミルによる運動療法を30分/日、5日/週行った。遺伝子改変マウスにおいて、心筋梗塞作成後、心筋梗塞群においてSham手術群と比較し、大腿骨の骨密度が有意に低下することが観察された。トレッドミルによる運動療法の結果、心筋梗塞後の骨密度低下を有意に予防した。

研究成果の概要(英文)：We examined whether myocardial infarction (MI) causes reduction of bone mass and the effect of exercise training for bone in mice, and if so, what molecular mechanisms are involved.

We created experimental MI model in 16 week-old male apolipoprotein E-deficient mice. We also performed sham operations in other mice. MI group were randomly assigned to exercise group and sedentary group. Exercise training with treadmill was performed from 1-week after operation to 8 weeks. At 8 weeks after the operation, bone parameters of the femur were measured by quantitative-CT. The bone mineral density of the femur was significantly decreased in the MI-Sed group as compared with the sham group ( $P<0.001$ ), and the MI-Ex group ( $P<0.05$ ). The present study demonstrates for the first time that post-infarction HF reduces bone mineral density and exercise training prevents the reduction of bone mineral density in apolipoprotein E-deficient mice in vivo.

研究分野：循環器内科

キーワード：運動療法 骨 心不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における生活習慣病増加をうけて、心不全や骨粗鬆症の罹患患者数ならびに死亡数が急増している。75歳以上の高齢者における骨粗鬆症関連骨折発症後の5年生存率は、約50%前後であり、一般的な癌より予後不良である。超高齢社会を迎えた日本において、心不全患者が増加している。また、近年の欧米における前向きコホート研究において、急性心筋梗塞や心不全患者では骨折の頻度が高いことが報告され、骨折も要介護の主因のひとつである(20数%を占める)ことから、患者の生活機能レベルの維持や医療費抑制のためにも、心不全・骨粗鬆症の両者に対する積極的予防法・治療法の確立が必要である。現時点において、心不全が直接的に骨粗鬆症を誘発するか否か、また、その分子生物学的機序については全く不明である。

一方、運動療法は心臓のみならず、サルコペニアや骨粗鬆症、認知機能や抑うつなど多くの臓器にわたる疾患に有効性である可能性が示唆されている。実際、我々は運動療法が心不全に伴う骨格筋異常を改善し、さらには、石灰化心臓弁膜症をも予防することを、動物モデルを用いた基礎研究にて分子生物学的に明らかにしてきた。本研究の目的は、この心不全動物モデルを用いて、心臓・骨関連の病態を解明し、両者に奏功する運動療法を探索し、その分子生物学的機序を明らかにすることである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、心不全の動物モデルを用いて、心不全や心不全に起因する骨密度減少の双方に対する運動療法の効果を検討することである。正常な心臓(左)と比較して、心筋梗塞を起こした慢性心不全モデル(右)では、心筋梗塞8週後に骨密度が有意に減少することが判明した。本動物モデルを使用することにより、心不全に起因する骨粗

鬆症に対して、運動療法などの潜在的有効性を新たに見いだすことが可能である。

実際に、我々は急性心筋梗塞を作成した心不全マウスモデルを作成し、心不全マウスにおいては sham 群のマウスと比較して骨密度および骨強度を評価した。心筋梗塞作成後8週の時点で、心筋梗塞群において Sham 手術群と比較し、大腿骨の骨密度が再現性よく有意に低下することが観察された。従って、この新規の心不全・骨関連モデルを用いることにより、運動療法による心臓および骨に与える影響を CT や血清、骨標本を用いた分子生物学的評価を行い、どのような種類の運動を行えば心臓と骨に共にメリットがあるかを解明できる。

超高齢社会を迎えた欧米や日本において生活習慣病が激増している時にこそ、今後さらに増加していくと推定されている慢性心不全や骨粗鬆症による骨折の患者数を減らすための有効な方策の確立が望まれ、本研究は早急に取り組むべき重要性の高い喫緊の課題と考えられる。本研究結果より、運動療法は両疾患による ADL や QOL の低下、高い死亡率を同時に回避させる可能性をもつだけでなく、健康長寿の延長と医療費削減対策を目指す基礎的裏付けを示す重要な予防法・治療法となりうることが十分に期待できる。

### 3. 研究の方法

マウスを用い、週齢8週齢で手術時を行う。マウスの左冠動脈前下行枝結紮術により急性心筋梗塞を作成した心不全マウスモデルを作成する。同様の手技で、冠動脈の結紮だけを行わない Sham 手術群も同時に作成を行う。術後より運動療法を行う群では、トレッドミルによる運動を開始し、安楽死まで運動療法を継続する。安楽死前に心エコー(超音波)検査、採血(生化学検査および骨代謝・骨質マーカーの測定)、さらに心臓と大腿骨の摘出を行い、心

臓と骨を組織学的にも評価する。本研究における主要な解析内容は、心不全の重症度と骨密度の相関関係と心・骨共通の分子機構  
運動療法が骨密度に与える影響 運動療法  
の分子生物学的機序である。

### (1) 急性心筋梗塞による心不全動物モデルの作成

心不全作成のため、高脂血症マウスの左冠動脈前下行枝に結紮術を行う(冠動脈は心臓の表面を走行する動脈で、冠動脈が閉塞すると心筋梗塞をきたす)。マウスは8週齢時に手術を施行する。同様の手術手技で結紮のみを行わない Sham 手術群も作成する。麻酔はイソフルレンによる吸入麻酔を行い、2.0%で導入後に経口的に気管内挿管を行い、1回換気量 250 $\mu$ L、呼吸回数 150~200 回/分の設定で人工呼吸管理する。左第5肋間即開胸後に 8-0 ナイロン糸を用いて左冠動脈前下行枝近位部を結紮し、6-0 絹糸にて閉胸、閉創を行う。

### (2) CT による骨撮影と測定

イソフルラン吸入による深麻酔下で、全採血によりマウスを安楽死させた後に、右大腿骨を採取する。軟部組織を除去し、生理食塩水で洗浄した後、サンプリングチューブに入れ、-20 の冷凍庫で保管する。大腿骨サンプル全体を QCT (quantitative computed tomography ; 定量的コンピューター断層撮影法) で撮影し(LCT-200, 日立-Aloka)、大腿骨長、骨密度、皮質骨厚、骨梁密度の定量的解析(48 $\mu$ m ボクセルサイズ)を行う。また、骨微細構造の画像撮影を、マイクロ CT (ScanXmate-RB090 159, Comscantecno Co. Ltd.) を用いて撮影する(解像度は 12.5  $\mu$ m ボクセルサイズ)。また、QCT にて骨密度を測定した後、右大腿骨の機械的強度を、3点曲げ試験(MZ500S; Maruto) にて測定する。

Load-displacement カーブを描画し、最大荷重、stiffness を算出する。

### (3) 心臓超音波検査

心筋梗塞作成後に、心臓超音波検査(心エコー)を施行し心機能の測定を行う(Vevo® 2100 Imaging System, MicroScan™ Transducer MS-550D Probe, Fuji Film Visual Sonics Inc.)。検査施行時は 37 に加温した検査台の上で、イソフルランによるごく浅い吸入麻酔を行い(導入 2.0%、維持 0.4~0.6%)、心拍数が 500~600 拍/分に保たれた状態で、左室駆出率、左室短縮率、左室拡張末期径、左室前壁厚および左室後壁厚を測定する。

### (4) 骨組織学評価

右大腿骨を採取し、コンパウンドを用いて凍結包埋し、専用の粘着フィルムを使用して 5 $\mu$ m 厚の凍結切片を作成する(Leica CM1950, Leica Biosystems)。各切片を TRAP™ 染色(和光純薬株式会社)を用いて染色し、顕微鏡下に拡大率 100 倍で赤色に染色される TRAP 陽性(破骨細胞が存在し骨吸収が行われている部位)数を計測する(BX50F-3, Olympus Optical Co.)。

## 4. 研究成果

我々は遺伝子改変マウスモデルに同様の手技で急性心筋梗塞を作成した心機能障害マウスモデルを作成した。また、心筋梗塞モデルに、トレッドミルによる運動療法を30分/日、5日/週行った。遺伝子改変マウスにおいて、心筋梗塞作成後、心筋梗塞群において Sham 手術群と比較し、大腿骨の骨密度が有意に低下することが観察された。血中骨代謝マーカーの測定も行い、骨吸収マーカーは心筋梗塞群において有意に上昇を認めた。また骨密度と心臓超音波検査で測定した心機能および骨吸収マーカーとの間に有意な相関関係を認め、骨密度・皮質骨厚と骨強度の間にも有意な相関関係を認めた。トレ

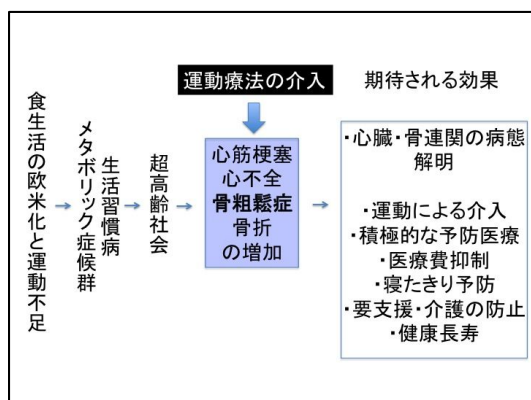
ッドミルによる運動療法の結果、心筋梗塞後の骨密度低下を有意に予防した。骨の免疫組織学的検討を行い、骨密度の低下はRho-kinaseと関連することも判明した。

(1) 申請者ら独自の心・骨連関動物モデル用いた国内外に例のない基礎研究:

定期的有酸素運動は慢性心不全の治療に有効であることは判明しているが、どの種類や程度の運動療法が心不全に起因する骨密度低下の予防に有効であるかは一切わかっていない。本研究により、心臓と骨の双方に有効な一石二鳥の運動療法とその分子機序が解明できる可能性がある。さらに、本研究を基に、今後、臨床展開・研究へと進めるための極めて有用な世界初のエビデンスが得られることに繋がりうる。

(2) 学術的・社会的・医療経済的に大きな波及効果を期待できる予防医学研究:

本研究では、心不全に起因する骨密度低下に対する治療法の介入を検討することにより、心臓と骨などの他臓器とのコミュニケーションの重要性を認識し、単一臓器だけにしぼらず、要介護の原因となり得る複数の疾病を予防することを目的としている。従って、本研究は、社会への貢献、国民の保健・医療・福祉の向上にも繋がると考える。現在、わが国では、食生活の欧米化や運動不足に伴い、メタボリック症候群を始めとする生活習慣病の頻度が増加の一途をたどっている。さらに我が国は超高齢社会を迎えており、



生活習慣病を原因とする心不全や骨粗鬆症の増加、頻回の入退院、それに伴う多種類の薬剤の併用は医療費の高騰を引き起こしており、両疾病に対する効果的・効率的予防治療法の確立は、大幅な医療費抑制をもたらすことが期待される。従って、このトランスレーショナルリサーチの結果は、実際の医療を担当する医師や、行政にも有用な情報を提供し、最終的には日本国民の保険、医療、福祉の向上のみならず世界の予防医学進展に貢献することが期待される(図)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 3 件)

- (1) 松本 泰治, 下川 宏明  
運動療法の長期予後改善の分子生物学的機序  
循環制御 Vol. 38(2017) No. 2 p84-88  
査読無し
- (2) 松本泰治, 下川宏明  
超高齢社会で増える心血管病-「老化」と「心臓リハビリ」の視点から考える高齢者心血管病の予防-臨床医のための循環器診療 No.25 【特集】高齢者心不全治療の新しい考え方-ここが知りたい- 学樹書院 2016年 査読無し
- (3) 松本泰治, 下川宏明  
心臓リハビリの予後改善効果の分子機序  
冠疾患誌 Vol.21 No.1, P 53-57, 2015.  
査読無し

(学会発表) (計 2 件)

- (1) 松本 泰治, 竹内雅史, 金澤正範, 下川 宏明  
「高齢者に対する周術期前後のリハビリテーションの役割」シンポジウム:包括的心臓

リハビリテーションの新たな領域への挑戦,  
第23回日本心臓リハビリテーション学会  
(2017.7.16.)(岐阜県)

- (2) 松本 泰治, 金澤正範, 下川 宏明  
心筋梗塞後の骨の変化と運動療法による  
介入効果:動物モデルを用いた心・骨連  
関 シンポジウム:基礎研究を予防心臓病  
学の未来に活かす. 第22回日本心臓リ  
ハビリテーション学会 (2016.7.17.)(東京  
都)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松本 泰治 (Matsumoto, Yasuharu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 90600528

### (2)研究協力者

金澤 正範 (Kanazawa, Masanori)