

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21139

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたCD36欠損症における心筋障害の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for cardiac impairment in CD36 deficiency with using iPS cell

研究代表者

中谷 和弘 (Nakatani, Kazuhiro)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：50648813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) CD36欠損マウスにおける心負荷時の心不全発症の検討：CD36欠損マウスでは野生型マウスに比して、大動脈縮窄術による圧負荷時に心機能低下により死亡する。CD36欠損状態の心筋では、負荷時に心筋糖取り込み量を十分に増加させることができず、心筋エネルギー産生を維持できず、心筋線維化増生・心機能低下に至りやすいと考えられた。本結果を論文投稿中である。

(2) 患者iPS細胞由来心筋細胞を用いた検討：健康人5名、CD36欠損患者4名のiPS細胞から心筋細胞への分化を行った。CD36欠損の病態を反映しているかどうかを評価しようとしたが、実験系が安定せず現在条件検討を行っている状態である。

研究成果の概要(英文)：(1) Investigation of CD36KO mice hearts under pressure overload condition: CD36KO mice heart showed impaired tolerance of pressure overload with decreased ATP concentration in the heart, eccentric hypertrophic change, and accelerated fibrotic change. These findings suggest that fatty acid uptake through CD36 in the heart is essential to maintenance cardiac energy provision, cardiac function and histological structure under pressure overload. We are submitting these results for the scientific paper.

(2) The analyses with using the cardiomyocytes differentiated from iPS cell lines derived from T lymphocytes donated from the patients: Although we tried to analyze the characteristics of cardiomyocytes from iPS cell lines donated from control patients and CD36 deficient patients, the results were not reproducible. We are exploring the methods.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋エネルギー代謝 長鎖脂肪酸 グルコース CD36 圧負荷 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト心筋はエネルギー源として糖および脂肪酸を利用しているが、通常は7割程度は脂肪酸利用に依存し、残りを糖利用によりエネルギー産生を維持している。エネルギー基質利用異常に伴う心機能不全が報告されている (J.M. Huss, et al. J Clin Invest 2005)。糖尿病性心筋症では糖利用の低下および脂肪酸利用の亢進を認め、心筋の脂質蓄積による心不全を来す (Paulson DJ, et al. Am J Physiol 1982)。一方、脂肪酸酸化に関わる酵素が欠損する患者では、脂肪酸利用が低下し、肥大型心筋症を伴うと報告されている (Kelly DP, et al. N. Engl. J. Med. 1994)、その機序は十分に解明されていない。

### (1) CD36 と心筋障害 :

CD36 は長鎖脂肪酸の細胞表面トランスポーターであり、心筋にも発現する。当研究室では血小板の検討から CD36 欠損症を発見し (Kashiwagi K. et al. Atheroscl Thromb, 1992)、CD36 欠損症は本邦で 0.3% と高頻度に存在しており、脂肪酸アナログ BMIPP を用いた心筋シンチグラフィで完全欠損を来した (Yoshizumi M, et al. J Nucl Med 2000)。一方 FDG-PET での検討では心筋での糖取り込みが亢進していることを見出した (Fukuchi K, et al. J Nucl Med 1999)。CD36 欠損症の自験例 40 症例のうち 6 例と高頻度に心筋症を発症しており、重篤な心不全を呈する症例もみられる。これらの知見は、心筋代謝障害と心機能低下の関与を示唆するものであり、難治性心不全の原因の一つとして本疾患の存在を考慮する必要がある。さらに本疾患ではインスリン抵抗性 (Miyaoaka Y, et al. Lancet 2001)、脂質代謝異常、高血圧が集積することを報告した (Kuwasako T, et al. Diabetes Care 2003, Masuda D, et al. J Lipid Res, 2009)。CD36 欠損症のマウスモデルである CD36 ノックアウト (CD36KO) マウスは通常の飼育条件では心機能障害を来さないことから、CD36 欠損症は遺伝子異常を背景とし後天的因子 (高血圧、高脂肪食など) により心機能異常を来している可能性がある。

### (2). iPS・分化転換技術を用いた心筋症の病態解明と治療法開発 :

心筋症の病態解明・治療法開発を妨げる最大の要因として、心筋症患者から心筋細胞を十分に得られないことが挙げられる。iPS 細胞は細胞ドナーと同一のゲノムを有しており、心筋細胞を含む様々な細胞系譜へと分化することが報告されている。患者から、iPS 細胞を作成、心筋細胞へと分化誘導し、詳細に検討することによって、心筋症の病態における CD36 欠損の役割を解析し、さらには、心筋症に対する新規治療薬となりうる候補物質のスクリーニングが可能である。

## 2. 研究の目的

長鎖脂肪酸トランスポーターである CD36 を遺伝的に欠いた CD36 欠損症では心筋細胞で

の脂肪酸取り込みが障害され糖を主なエネルギー源として利用しており、高頻度に心機能低下を伴う肥大型心筋症および拡張型心筋症を合併する。以上から CD36 欠損症は脂肪酸代謝障害に伴う心筋障害を来す好例であると考えられる。本疾患患者ではインスリン抵抗性、脂質代謝異常および高血圧が集積しており、先天的な遺伝子異常に、後天的な代謝障害の負荷が加わり、心筋障害が出現しているものと推察されるが、その機序は明らかでなく、特異的治療法は存在しない。

本研究では、CD36 欠損マウスを用いた in Vivo 実験、CD36 欠損症患者 iPS 細胞から分化させた心筋細胞を用いた in Vitro 実験によって、長鎖脂肪酸の代謝障害に伴う心筋障害の病態・機序を解明し、新規治療法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1). 野生型マウス (以下 WT マウス)、CD36 欠損マウス (以下 KO マウス) を対象として、TAC による圧負荷を行い、心筋脂肪酸代謝異常時における圧負荷時の心機能障害の発症機序を明らかにする。

圧負荷時の生存率の解析を行う。

圧負荷時の心重量、肺重量の測定を行い心不全死亡の可能性を評価する。

圧負荷後の心機能を、経胸壁心臓超音波で評価する。特に壁厚、内腔、左室短縮率を評価する。

qRT-PCR、microarray による遺伝子発現解析および Western Blot 法、プロテオミクス解析によるシグナル・蛋白発現解析を行う。

糖、脂肪酸、ケトン体をトレーサーとした PET による心筋基質取り込み評価によって、経時的な心筋代謝の変化を解析する。

高速液体クロマトグラフィ、核磁気共鳴装置を用いたクレアチンリン酸/ATP 比測定によるエネルギーリザーブの評価を行う。

心筋のメタボロミクス解析により、糖・脂質代謝産物を網羅的に解析する。

組織学的解析として TUNEL 染色によるアポトーシス評価、免疫染色による血管数の把握を行い、さらに電子顕微鏡を使用し、サルコメア構造の変化、ミトコンドリアの形態変化、核形態の変化を観察する。

圧負荷時の KO マウスに対して心筋保護薬 (アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシン 受容体拮抗薬、受容体遮断薬など)、代謝改善治療薬投与、あるいは食餌 (短鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸、アミノ酸等) による心機能改善効果の検討する。

(2). 心筋症を発症している CD36 欠損患者と心筋症を発症していない CD36 欠損患者と健常者の末梢血から iPS 細胞を作成した後に、それぞれの iPS 由来心筋細胞において、エネルギー代謝および心肥大・心不全に関連する因子の差異を明らかにし、細胞レベルでの異常を是正するためのスクリーニングシステムを確立する。

#### 心筋症の病態解明

最初に、CD36 欠損症患者 iPS 由来心筋細胞の表現型が、CD36 欠損症の臨床病態を反映しているかを解析する。さらに CD36 欠損症における心筋症合併の有無の差により、それぞれの iPS 由来心筋細胞の表現型にどのような差異が存在するかを明らかにする。表現型解析の具体的な方法としては、ラジオアイソトープ (RI) を用いた糖および脂肪酸代謝評価、microarray や RNA-seq を用いた遺伝子発現、組織化学染色や免疫染色を用いた組織像、プロテオミクス解析を用いたタンパク発現、western blot 法によるシグナル解析、パッチクランプ法や Ca 濃度測定を用いた電気生理学的特性、stimulation chamber 内での cell shortening 等を検討する。

#### 心筋症の新規治療法開発

iPS 由来心筋細胞に対し、既存薬ライブラリー、低分子化合物ライブラリーあるいはエネルギー基質 (短鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸、アミノ酸等) を添加し、で把握した心筋症患者 iPS 由来心筋細胞の異常を改善しうる物質をスクリーニングし、CD36 欠損症の心筋症の治療法開発を目指す。得られた知見を用いて、CD36 欠損状態における心筋症患者にとどまらず、さらに広く脂肪酸代謝異常あるいは糖代謝異常を伴う心筋障害を合併する患者の治療にも役立てたいと考えている。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究の基礎実験として、非負荷時の WT マウス、KO マウスの心筋エネルギー代謝を評価した。心筋糖取り込みを小動物用 PET MRI を用いて生存マウスで、可視化、定量し、KO マウスでは WT マウスに比して心筋糖取り込みが亢進していることを見出した。メタボロミクス解析では、心筋 ATP 含量は KO マウスでも非負荷時には保たれており、ケトン体の中間代謝物である、3-ヒドロキシ酪酸の心筋中の含量が KO マウスでは WT マウスに比して多いことが明らかになった。心筋の遺伝子解析を解析したところ、KO マウスで糖代謝およびケトン体代謝にかかわる遺伝子発現が亢進していた。以上から非負荷時の解析では、脂肪酸取り込みが低下している KO マウスでは、糖及びケトン体代謝の亢進によりエネルギー産生を維持していると考えられた。この成果は 2015 年 9 月の英文科学誌 Metabolism (査読あり) に掲載された。

(2). KO マウスにおける心負荷時の心不全発症の検討

KO マウスでは WT マウスに比して、大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷時には、早期に死亡することを見出した。圧負荷時に KO マウスは、WT マウスに比して心重量、肺重量が重く、心不全により死亡することを明らかにした。経胸壁心臓超音波検査では、高度の心機能低下を呈することを見出した。特に超音波で経時的 12 週間解析すると壁厚の肥大の程度は WT マウス、KO マウス間で差がないもの

の、KO マウスでは左室内腔拡大と左室短縮率低下が認められた。(WT マウスではこれらは認めなかった) KO マウスでは遠心性心肥大、左室収縮能低下により心不全に至ると考えられた。心筋糖取り込みを放射性ラベルしたグルコースを経静脈投与し、心筋糖取り込みを評価した。KO マウスでは WT マウスに比較して、非負荷時に心筋糖取り込みが亢進していた。WT マウス、KO マウスともに圧負荷後は心筋糖取り込みが亢進するが、その増加の程度が KO マウスの方が WT マウスよりも小さかった。心筋 ATP 含量を、高速液体クロマトグラフィーで計測した。心筋の ATP 含量は非負荷時は WT マウス、KO マウス間で差はなかったが、圧負荷時は、KO マウスでは WT マウスよりも ATP 含量が少なかった。心筋の線維化を評価するために病理組織学的解析を行ったところ、KO マウスでは WT マウスに比較して、圧負荷時の心筋線維化面積が大きかった。TUNEL 染色では WT マウス、KO マウス間で非負荷時、負荷時ともに、アポトーシスの程度に差はなかった。血管数も同様に WT マウス、KO マウス間で有意差は認めなかった。電子顕微鏡での解析を行ったが KO マウスではミトコンドリアの大小不同化が認められる印象があったが、電子顕微鏡解析を行った検体数は少なく、電子顕微鏡解析については今後さらに検体数を追加した解析を要すると考えられた。

以上まとめると、圧負荷時は、一般的に糖取り込み増加で圧負荷時のエネルギー産生需要増大に対して代償するが、CD36 欠損状態の心筋は、非負荷時の段階で糖取り込みに依存しており、負荷時には糖取り込み量を十分に増加させることができず、心筋エネルギー産生を維持できなくなり、心筋線維化をきたし、心機能低下に至り、心不全死に陥りやすいと考えられた。この成果について、現在、英文科学誌に投稿中である。圧負荷時に KO マウスに薬剤や短鎖脂肪酸投与などの介入を行う実験については、今回の研究期間中には実施できなかったが今後の検討課題としたい。

(3). 患者 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた検討

今年度さらに 2 名の健常人、4 名の CD36 欠損患者の iPS 細胞から心筋細胞への分化を行った。これまでに分化が成功している 3 名の健常人の心筋細胞を含めると合計健常人由来心筋 (n=5)、CD36 欠損患者由来心筋細胞 (n=4) となる。CD36 欠損の病態を反映しているかどうか、すなわち脂肪酸の取り込み低下がみられるかどうか、心筋糖取り込み亢進がみられるかどうかについて放射性ラベル脂肪酸およびグルコースを用いた実験で評価しようとしたが、実験系が安定せず現在条件検討を行っている状態となっており、今後引き続き検討を行う必要がある。

#### 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1件)

中谷和弘(筆頭著者)、渡部直史、増田大作、今泉昌男、下瀬川恵久、小林卓哉、西良雅己、朱 穎竝、岡田健志、川瀬良太、中岡創、内藤篤彦、大濱透、小関正博、岡亨、赤澤宏、西田誠、小室一成、坂田泰史、畑澤順、山下静也 Myocardial energy provision is preserved by increased utilization of glucose and ketone bodies in CD36 knockout mice.

雑誌名：Metabolism. 査読有無；有

発行年：2015年 Sep;64(9)

ページ：1165-74

doi: 10.1016/j.metabol.2015.05.017.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中谷 和弘 (NAKATANI, Kazuhiro)

大阪大学大学院 医学系研究科 循環器

内科学講座 特任研究員

研究者番号：50648813

### (2)研究協力者

小林 卓哉 (KOBAYASHI, Takuya)

嵯峨 礼美 (SAGA, Ayami)