

令和元年6月25日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08514

研究課題名(和文) ノックインマウスを用いたヒト遺伝性心筋症の病態形成メカニズム解明と治療薬の検討

研究課題名(英文) Evaluation of cardiac function for DCM and HCM knock-in model mouse during early postnatal development

研究代表者

杜 成坤 (DU, Cheng-Kun)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90590646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HCMとDCMはともに若年者突然死や重症心不全を特徴とし、早期診断、早期治療は関連する高死亡率を低減するために重要である。本研究ではDCMとHCMノックインマウスの若年期に着目して、それぞれの病態を解析した。S179Fマウスでは、心肥大が発生する前に、左心室内腔縮小、拡張機能障害、錯綜配列などのHCMの特徴が幼若期で既に発生していることが明らかになった。一方、K210マウスでは、左心室壁が薄くなる前に、内腔拡張、収縮機能障害が幼若期で既に発生していることが明らかになった。また、K210マウスに対するグレリンの胎児期からの早期投与が心臓リモデリングに対する抑制効果を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋症では、心筋トロポニンT(cTnT)などのサルコメア蛋白質において、様々な遺伝子変異が原因として同定されている。しかしながら、ヒト心筋症患者の病態を良く再現した動物モデルはこれまで殆どなかったため有効な治療法の開発が遅れている。我々は、マウスの内在性cTnTの特定部位にヒトDCMを発症させる変異K210とHCMを発症させる変異S179Fを導入した二つのKIモデルの作製に成功した。本研究ではそれぞれの心筋症発症初期の病態形成に関する重要な知見が得られた。今後の若年突然死をはじめとする重要課題に対する理解や、心筋症の病態生理学に対して大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：HCM and DCM are often associated with severe heart failure and sudden death.

Thus, early diagnosis and treatment is paramount for the reduction of its high mortality rate. The chief impetus of this study is to characterize the pathophysiology of knock-in mouse models of HCM and DCM. We showed that the S179F HCM mice developed left ventricular lumen narrowing and LV diastolic dysfunction before cardiac hypertrophy occurred. The K210 DCM mouse model developed LV systolic dysfunction and marked cardiac enlargement before LV wall became thinner. Further, ghrelin treatment (150 µg/kg/d s.c.) from fetal period has a benefit for attenuating cardiac remodeling and systolic dysfunction in the DCM mouse. Phenotypic changes in both mouse models occur at very early postnatal stage before weaning in the HCM and DCM mouse models. This suggests that these models are useful for the exploration of pathogenic mechanisms and therapeutics for very early onset HCM and DCM.

研究分野：心臓生理学

キーワード：心筋症 モデル 早期診断

1. 研究開始当初の背景

世界的高齢化・生活習慣病の増加を背景に、心血管病患者の世界的増加は顕著で、その治療や管理は生命予後・生活の質 (QOL) の保持と直結し、早急に解決を要する課題である。肥大型心筋症および拡張型心筋症は心筋そのものが原因で起こる病気の代表である。肥大型心筋症 (HCM) は、心室中隔の肥大、心筋細胞の錯綜配列と左心室の拡張障害を特徴とし、若年者およびアスリートにおける突然死の主な原因であり、一般集団中では 200 人に 1 人の割合で発症しており、その主な病因は遺伝子変異であることがこれまでの研究で明らかにされている。拡張型心筋症 (DCM) は、心室腔の拡張を伴う心拡大と収縮機能低下を特徴とし、突然死あるいは心不全による死亡を発生し、末期には心臓移植を必要とする重症心不全の原因となる。

我々はこれまでマウスの内在性心筋トロポニン T (cTnT) の特定部位にヒト DCM を発症させる変異 K210、および HCM を発症させる変異 S179F を導入した二つのノックイン (KI) モデルの作製に成功した。

2. 研究の目的

HCM と DCM とともに若年者突然死頻発や重症心不全などを特徴とし、若年期における早期診断、早期治療は関連する高死亡率を低減させるために重要である。そこで、本研究では、幼若期マウスにおける病態形成プロセスとそのメカニズムの究明を進め、早期予防法・治療法の開発に繋げることを計画した。

3. 研究の方法

(1). 実験動物：

ヘテロ接合体同士を掛け合わせて、K210 DCM モデルおよび S179F HCM モデルの野生型 (WT) とヘテロ接合体、ホモ接合体マウスを得て実験を行った。

(2). 心エコー解析：

小動物イメージング解析システム Vevo2100 を用い、K210 DCM モデルおよび S179F HCM マウスに対し、1.5-3%のイソフルラン麻酔下にて M-mode、カラードプラ、パルスドプラ測定によって、心機能評価を行った。

(3). P-V loop

ADVantage™ システムを用いて、K210 DCM モデルおよび S179F HCM マウスに対し、1.5-3%のイソフルラン麻酔下にて、左心室内圧、 dP/dt_{max} 、 dP/dt_{min} を測定した。

(4). 心筋組織化学解析：

心臓を摘出した後、50 mM 2,3-Butanedione monoxime (BDM) を加えた Krebs-Henseleit solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 0.5 mM EDTA-Na₂, 10 mM HEPES, 11 mM D-glucose) にて灌流し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定した。ホルマリン固定心臓をパラフィン包埋した後 5 μm 切片を作製し、Azan 染色と H&E 染色を行った。

(5). SDS-PAGE：

マウスに 300 ul ヘパリンを腹腔投与して 10 分間後に、3%イソフルラン麻酔下にて心臓を摘出した。摘出心臓は 50 mM BDM を加えた Krebs-Henseleit solution で灌流して、左心室から約 100 mg の組織を切り出し、素早く液体窒素に入れ急速凍結をした後、Leammi サンプルバッファ中にホムジナイズし、80 °C で保存した。使用直前に解凍と凍結を 2 サイクルした後、95 °C で 5 分間インキュベートした。サンプルを 12% - 7% のアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。

(6). ウエスタンブロット：

SDS-PAGE 後、セミドライ式プロットング装置 (Bio-rad) を用いて、電気泳動により分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。5%BSA を含む TBS-T (20 mM tris-HCl PH7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) でインキュベートしブロッキングした (室温、振とう)。その後、メンブレンを 3 回洗浄し、一次抗体 (1:1000) を含む TBST で、一晩インキュベート (4 °C) した。

メンブレンを3回洗浄して、1時間二次抗体でインキュベートした(室温、振とう)。その後、3回洗浄し、ECL検出試薬でインキュベート後、シグナルを検出した。

4. 研究成果

(1). M-モード心エコー検査により、S179F HCM ホモマウスの左心室内腔の縮小は0.5ヶ月齢で発生し、年齢の増加に従って進行する傾向が認められた。S179F HCM ホモマウスでは、左心室短軸方向の収縮は異常がないことに対し、左心室長軸方向の収縮が低下することが、1ヶ月齢より発生することが認められた。右心室径/左心室径のratioの増加は3ヶ月齢より発生することが分かった。カラードップラー検査により、左心室拡張機能障害は0.5ヶ月齢では軽度であるが、年齢の増加に従って増悪することが分かった。K210 DCM マウスでは、左心室内腔の増加とEFの減少は0.5ヶ月齢より発生することが明らかにされた。また、野生型より、K210 DCM マウスは、収縮末期左心室容積が生後0.5ヶ月齢より著しく増加することが認められた。

(2). 心筋トロポニンTミスセンス変異S179Fは、このS179Fモデルマウスの心筋ミオフィラメントCa²⁺感受性を増加する結果が得られている。このCa²⁺感受性の増加に対する代償機構の一つとしては、1ヶ月齢では主にphospholambanリン酸化の減少により、3ヶ月齢ではphospholambanリン酸化とSERCA2a発現量の減少によるものであることが、ウエスタンブロット解析で分かった。

(3). イソフルラン麻酔下で体表心電図の検査を行った結果、S179Fホモマウスでは、生後1ヶ月齢の若い時期でもQRS異常が認められた。ガス麻酔下でカラードブラによる左心室拡張機能を評価した結果、ホモマウスでは、左心室IVRT(等容弛緩時間)の延長とE/Aの増大が認められ、生後2週齢から左心室拡張機能障害が発生することが明らかになった。また、P-V loop検査により、生後1ヶ月齢においても左心室内腔縮小、Tauの増加が認められた。

(4). 左心室心筋細胞の配列の乱れ(錯綜配列)と間質線維化の発生は生後2週齢のホモマウスで既に発生することが分かった。

(5). ウエスタンブロット法による左心室タンパクレベルを解析した結果、生後2週齢のホモマウスでは、心肥大が見られなかったものの、イオンチャネルの異常、肥大因子の増加、心筋代謝の異常がすでに心筋内で発生していることが分かった。

(6). 生後1ヶ月齢のK210 DCM KIマウスに対し、治療候補であるコリンエステラーゼ阻害剤による治療効果を検討したところ、ドネペジルの投与がこのDCMマウスの生命予後及び心臓リモデリングへの改善効果が認められた。

また、胎児期投与は有益かどうかを検討するために、生理活性ペプチド・グレリン(150mg/kg/day)を、妊娠している親に、妊娠15日目から出産まで、7日間連続投与した。この投与による効果は生後1ヶ月齢の時点で評価した。その結果、この投与はDCMマウスの左心室内腔拡大と心重量増加を抑制できた；また、この投与はDCMマウスの心臓収縮機能不良に対する改善効果が認められた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

(1). Arimura T, Muchir A, Kuwahara M, Morimoto S, Ishikawa T, Du CK, Zhan DY, Nakao S, Machida N, Tanaka R, Yamane Y, Hayashi T, Kimura A. Overexpression of heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase results in heart failure and conduction disturbance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 1;314(6):H1192-H1202, 2018. (査読有)

(2). Okuda S, Sufu-Shimizu Y, Kato T, Fukuda M, Nishimura S, Oda T, Kobayashi S, Yamamoto T, Morimoto S, Yano M. CaMKII-mediated phosphorylation of RyR2 plays a crucial role in aberrant Ca²⁺ release as an arrhythmogenic substrate in cardiac troponin T-related familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 496(4):1250-1256, 2018. (査読有)

- (3). Hayamizu K, Morimoto S, Nonaka M, Hoka S, Sasaguri T. Cardiogenic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca²⁺ transients. Arch Biochem Biophys. 637:40-47, 2018. (査読有)
- (4). Katare R, Pearson JT, Lew JK, Wei M, Tsuchimouchi H, Du CK, Zhan DY, Umetani K, Shirai M, Schwenke DO. Progressive decrease in coronary vascular function associated with Type 2 diabetic heart disease. Front Physiol. 9:696, 2018. (査読有)
- (5). Ishizu T, Higo S, Masumura Y, Kohama Y, Shiba M, Higo T, Shibamoto M, Nakagawa A, Morimoto S, Takashima S, Hikoso S, Sakata Y. Targeted Genome Replacement via Homology-directed Repair in Non-dividing Cardiomyocytes. Sci Rep. 7(1):9363., 2017. (査読有)
- (6). Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, Shirai M, Pearson JT. Cardiac vagal control in a knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation. Auton Neurosci. 205:33-40,2017. (査読有)
- (7). Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, Shirai M, Pearson JT. Cardiac vagal control in a knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation. Auton Neurosci. 205:33-40, 2017. (査読有)
- (8). Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, Shirai M, Pearson JT. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 312(1):H60-H67, 2017. (査読有)
- (9). Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J, Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S, Yoshimura M. Tissue thrombin is associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol. 228:821-827, 2017. (査読有)
- (10). Fujita A, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Yoshihara T, Arioka M, Igawa K, Tomooka K, Hoka S, Sasaguri T. 2,5-Dimethylcelecoxib prevents pressure-induced left ventricular remodeling through GSK-3 activation. Hypertens Res. 40(2):130-139, 2017. (査読有)
- (11). Mohamed RM, Morimoto S, Ibrahim IA, Zhan DY, Du CK, Arioka M, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3 heterozygous knockout is cardioprotective in a knockin mouse model of familial dilated cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 310(11):H1808-H1815, 2016. (査読有)
- (12). Inagaki T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Yoshimoto M, Shirai M. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion in rats. Free Radic Res. 50(6):645-653, 2016. (査読有)
- (13). Mohamed RM, Morimoto S, Ibrahim IA, Zhan DY, Du CK, Arioka M, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3 heterozygous knockout is cardioprotective in a knockin mouse model of familial dilated cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 310(11):H1808-15, 2016. (査読有)
- (14). Nishii K, Seki A, Kumai M, Morimoto S, Miwa T, Hagiwara N, Shibata Y, Kobayashi Y. Connexin45 contributes to global cardiovascular development by establishing myocardial impulse propagation. Mech Dev. 140:41-52, 2016. (査読有)

(15). 秋山 剛, 清水 秀二, 杜 成坤, 戦 冬雲, 稲垣 董克, 吉本 光佐, 曾野部 崇, 川田 徹, ピアソン ジェームズ. 心臓マイクロダイアリシス法の利点. 循環制御. 38, 208-217, 2017.

(16). 戦 冬雲, 杜 成坤, 森本 幸生, 秋山 剛, Daryl O, Schwenke, 細田 洋司, 寒川 賢治, 白井 幹康, Pearson James. 遺伝性拡張型心筋症に対する新規治療法の開発に向けて. BIO Clinica. (31)101-104, 2016.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1). Du CK, Zhan DY, Morimoto S, Akiyama T, Shirai M, Pearson J. Evaluation of cardiac function in a knock-in mouse model for human DCM at early postnatal stages. The 92nd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. 2019年3月(大阪)

(2). Kurebayashi N, Murayama T, Tamura M, Mori S, Yuasa-Ishigami M, Kagechika H, Suzuki, Kazunori J, Kanemaru, Iino M, Morimoto S, Sakurai T. Effects of Novel RyR2 Inhibitors on Diseased Hearts. 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society. 2019年3月(Baltimore, USA)

(3). Sugihara M, Kakigi R, Murayama T, Miida T, Sakurai T, Morimoto S, Kurebayashi N. The Effects of Frequency of Voluntary Exercise on Cardiac Function in Dilated Cardiomyopathy Model Mice. 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society. 2019年3月(Baltimore, USA)

(4). 杜 成坤, 戦 冬雲, 森本 幸生, 白井 幹康, ピアソン ジェームズ. 肥大型心筋症モデルマウスにおける呼吸と代謝の異常. 第95回 日本生理学会年会. 2018年3月(高松)

(5). 杜 成坤, 戦 冬雲, 森本 幸生, 秋山 剛, 白井 幹康, James T Pearson. 拡張型心筋症ノックインマウスに対するドネペジルの治療効果. 第94回日本生理学会大会. 2017年3月(浜松)

(6). 戦 冬雲, 杜 成坤, 秋山 剛, 森本 幸生, 白井 幹康, James T. Pearson. 拡張型心筋症ノックインマウスにおける心臓交感神経終末ノルエピネフリン動態異常. 第94回日本生理学会大会. 2017年3月(浜松)

(7). 杜 成坤, 戦 冬雲, 森本 幸生, 秋山 剛, 白井 幹康, James T. Pearson. アルツハイマー型認知症治療薬アリセプトの拡張型心筋症ノックインマウスに対する治療効果の検討. 第90回日本薬理学会年会 2017年3月(長崎)

(8). 戦 冬雲, 杜 成坤, 秋山 剛, 森本 幸生, 白井 幹康, James T. Pearson. 拡張型心筋症ノックインマウスにおける心臓交感神経終末ノルエピネフリン動態異常. 第90回日本薬理学会年会 2017年3月(長崎)

(9). Tsuchimochi H, Thambyah H, Edgley AJ, Inagaki T, Waddingham MT, Chen YC, Du CK, Zhan DY, Sukumaran V, Sonobe T, Umetani K, Shirai M, Pearson JT. Beta-blockade prevents coronary microvascular endothelial dysfunction in non-obese salt-sensitive insulin resistant rats on a high salt diet. ESC Congress 2017, 2017年8月26-30日(Barcelona, Spain)

(10). Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, Shirai M, Pearson JT. Cardiac vagal control in knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy. The American Heart Association Scientific Sessions, 2016年11月12-16日(New Orleans, USA).

(11). Pearson JT, Tsuchimochi H, Inagaki T, Du CK, Zhan DY, Schwenke D, Edgley A, Umetani K, Yagi N, Shirai M. FASUDIL PREVENTS CORONARY MICROVASCULAR ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND

CARDIAC CONTRACTILE DYSFUNCTION IN A RAT MODEL OF HYPERTENSIVE DIABETES MORE THAN LOSARTAN.
26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. 2016年9月24-29
日 (Seoul, Korea).

〔図書〕(計 1 件)

1. 杜 成坤, 森本 幸生. 心筋ミオフィラメント Ca 感受性. 心不全(第2版)上巻 -最新の基礎・臨床研究の進歩-, 259-265, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森本 幸生
ローマ字氏名：Morimoto Sachio
所属研究機関名：国際医療福祉大学
部局名：福岡保健医療学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：50202362

(2)研究協力者

研究協力者氏名：戦 冬雲
ローマ字氏名：Zhan Dong-Yun