

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10064

研究課題名(和文)心筋炎治療へ向けたリン酸ジエステル加水分解酵素阻害薬抗炎症効果の基礎研究

研究課題名(英文)A basic study to investigate the pathogenesis of myocarditis in children

研究代表者

斉藤 剛克 (Saito, Takekatsu)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30525035

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)：本研究は、小児の心筋炎の発生機序と、近年注目を浴びているリン酸ジエステル加水分解酵素(PDE)阻害剤の可能性を探る基礎研究である。抗がん剤として使用されるドキソルビシンはしばしば小児心筋炎を起こすが、このドキソルビシンによる影響は感染などで増悪する可能性が本研究でも確認された。一方、リン酸ジエステル加水分解酵素(PDE)を阻害すると、様々な疾患の原因や増悪因子と考えられているmTORシグナルを阻害する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

小児の心筋炎は、薬剤起因性もの以外に、ウイルス感染が契機となるものも多く、様々な種類の感染性病原体でも心筋炎となることが示唆されていることから、小児心筋炎の病態には何らかの炎症の存在が重要と推察される。特に公衆衛生上課題が残るベトナムなどの途上国では小児心筋炎とそれによる心不全が問題視されていることから、本研究の成果は日本のみならず途上国での心筋炎の治療で(比較的安価である)PDE阻害薬の抗炎症作用薬としての可能性を明らかにするものであり、意義あるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：This study is a basic study to investigate the pathogenesis of myocarditis in children and the possibility of phosphodiesterase (PDE) inhibitors. Doxorubicin, which is used as an anticancer agent, often causes childhood myocarditis, but infection may exacerbate the effects of this doxorubicin in this study. On the other hand, inhibition of phosphodiesterase (PDE) has been shown to inhibit mTOR signal, which is considered to be the cause of various diseases and exacerbation factor.

研究分野：小児循環器学

キーワード：心筋炎

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

小児の心筋炎は炎症性細胞の浸潤と心筋細胞の障害により心機能に異常をきたす疾患と定義される。その起因としてウイルス感染によるものが多いが、様々な種類の感染性病原体でも心筋炎となることが示唆され、小児心筋炎の病態には何らかの炎症の存在が重要と推察される。特に公衆衛生上課題が残るベトナムなどの途上国では小児心筋炎とそれによる心不全が問題視されている。

心筋炎による心不全の治療は、後負荷の軽減、循環容量の減少と低心拍出状態の改善を図るため、1) 血管拡張薬（リン酸ジエステル加水分解酵素（PDE）阻害剤）、2) 利尿薬、3) 強心薬が選択される。

細胞内 cAMP および cGMP は共に細胞内セカンドメッセンジャーとして機能し、cAMP はタンパク質リン酸化酵素 A (PKA) や exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を、cGMP はタンパク質リン酸化酵素 G (PKG) を活性化して下流へ情報を伝達する。その結果、血管や気管支の平滑筋を弛緩させ、血管抵抗の減少や気管支の拡張を誘導する。一方、リン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) は、血管や気管支の平滑筋を弛緩させる cAMP と cGMP をそれぞれ AMP と GMP に分解してする酵素で、これまでに 10 種類以上のサブタイプが知られている。

私たちは、リン酸ジエステル加水分解酵素 (PDE) 阻害薬が抗炎症作用効果を有して、PDE 阻害薬が（マウスに川崎病類似血管炎を惹起する）乳酸桿菌体成分 (LCWE) による炎症を抑制することを見出している (1)。一方、気管支ぜんそく治療薬として歴史ある気管支拡張薬（テオフィリン；気管支平滑筋細胞内の PDE 活性を阻害することで増加した細胞内 cAMP が平滑筋細胞を弛緩）が抗炎症作用を有するは知られており、このことは私たちが見出したエビデンスを補強するものと考えられる。

また、私たち身体への病原体の攻撃は病原体そのもののみとは限らず、病原体が産生する毒素なども考慮しなければならない。その代表的な例が食中毒を引き起こす腸管出血性大腸菌でありウエルシュ菌である。私たちは腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素が血液脳関門 (BBB) を構成するグリア細胞を障害することを報告している (2, 3) が、予備的な実験として志賀毒素によるグリア細胞の細胞死を PDE 阻害薬が抑制することを見出した。このデータは PDE 阻害薬には抗炎症作用のほかに、細胞生存の調節作用が存在すること示唆している。心筋や血管平滑筋のアポトーシスはそれらのリモデリングを促進して心筋炎や血管炎の病態を形成すると考えられることから、PDE 阻害薬の抗アポトーシス作用はリモデリングを抑制する点に新たな価値があると思われる。

以上から、私たちは PDE 阻害薬の抗炎症作用が心筋炎の治療薬として有効であるか基礎研究をすることを思い至った。

2. 研究の目的

本研究は、心筋炎を起こす刺激時での細胞内情報伝達経路の観察、PDE 阻害薬のような細胞内 cAMP 上昇をきたす刺激時での伝達経路の観察から、様々な感染性病原体成分や毒素、薬剤誘導性の心筋炎の発生機序とその治療戦略について明らかにする基礎研究である。

3. 研究の方法

In vitro 実験として、薬剤性心筋炎を起こすモデルとしてドキシソルビシン (DOX)、感染性心筋炎のモデルとしてリポポリサッカライド (LPS) で培養細胞を刺激した。また、その併用（共刺激）も行った。

In Vivo 実験として、PDE 阻害剤として働くメチルキサンチン誘導体を飼料に混合し、小動物に与え、生体への影響を観察した。

4. 研究成果

ドキシソルビシン (DOX) 刺激により濃度依存的に細胞死が観察された。また、その際、アポトーシスを誘導する Caspase3 の活性化を見とめた一方、オートファジーのシグナルが観察されなかったことから、ドキシソルビシン (DOX) 刺激による細胞死の多くはアポトーシスと考えられた。

これとは反対に、リポポリサッカライド (LPS) 刺激では細胞増殖を観察した（細胞死は認めなかった）。Caspase3 の活性化も認めなかった。しかし、炎症反応 (NF- κ B シグナル) は亢進していた。

興味あることに、ドキシソルビシン (DOX) とリポポリサッカライド (LPS) の共刺激では、ドキシソルビシン (DOX) 単独と比べ、細胞死の程度も Caspase3 の活性化も亢進していた。このことは抗がん剤治療中に感染が合併すると心筋炎のリスクが増す可能性を示唆している。

一方、メチルキサンチン誘導体を含む食餌は様々な臓器での mTOR 活性を抑制していた。mTOR シグナルの活性化は様々な疾患の原因や増悪因子となることから、このシグナルの抑制は心筋炎も含め様々な疾患の治療や予防につながると考えられた。

<引用文献>

(1) Saito T, Sugimoto N, Ohta K, Shimizu T, Ohtani K, Nakayama Y, Nakamura T, Hitomi Y, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A. Phosphodiesterase inhibitors suppress Lactobacillus

casei cell-wall-induced NF- κ B and MAPK activations and cell proliferation through protein kinase A- or exchange protein activated by cAMP-dependent signal pathway. ScientificWorldJournal, 2012;2012:748572.

(2) Sugimoto N, Leu H, Inoue N, Shimizu M, Toma T, Kuroda M, Saito T, Wada T, Yachie A. The critical role of lipopolysaccharide in the upregulation of aquaporin 4 in glial cells treated with Shiga toxin. J Biomed Sci. 2015;22:78. doi: 10.1186/s12929-015-0184-5.

(3) Sugimoto N, Toma T, Shimizu M, Kuroda M, Wada T, Yachie A. Shiga toxin-2 enhances heat shock-induced apoptotic cell death in cultured and primary glial cells. Cell Biol Toxic. 2014;30:289-99.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

① Sugimoto N, Katakura M, Matsuzaki K, Sumiyoshi E, Yachie A, Shido O.

Chronic administration of theobromine inhibits mTOR signal in rats.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2019; 124: 575-581. (査読あり)

doi: 10.1111/bcpt.13175.

② Yoshida S, Nakanishi C, Okada H, Mori M, Yokawa J, Yoshimuta T, Ohta K, Konno T, Fujino N, Kawashiri MA, Yachie A, Yamagishi M, Hayashi K.

Characteristics of induced pluripotent stem cells from clinically divergent female monozygotic twins with Danon disease.

J Mol Cell Cardiol. 2018; 114: 234-242. (査読あり)

doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.019.

③ 太田邦雄

児童生徒の学校突然死“ゼロ”を目指して - 児童生徒の突然死の現状 -

医学のあゆ, 2017; 262: 1087-1092. (査読あり)

④ 太田邦雄

小児突然死の現状と課題

Fetal&Neonatal Medicine, 2017; 9: 117-121. (査読あり)

⑤ Leu H, Sugimoto N, Shimizu M, Toma T, Wada T, Ohta K, Yachie A.

Tumor necrosis factor- α modifies the effects of Shiga toxin on glial cells.

Int Immunopharmacol. 2016; 38:139-143. (査読あり)

doi: 10.1016/j.intimp.2016.05.022.

[学会発表] (計 6件)

① Naotoshi Sugimoto, Hidenori Iwasaki, Hue Leu, Takekatsu Saito, Keigo Nishida, Kunio Ohta, Akihiro Yachie

Heat facilitates TNF- α induced the phosphorylation of Heat Shock Factor-27 (HSP27) in vascular smooth muscle cells

The 12th International Kawasaki Disease Symposium (国際川崎病シンポジウム)

パシフィコ横浜, 2018

② 太田邦雄

(招待講演) 児童生徒の学校突然死ゼロを目指して

日本蘇生学会第36回大会 (東京) 2017

③ Sugimoto N, Nishimura N, Ohnishi N, Matsumoto T, Kitaura T, Shido O, Yachie A.

Lipopolysaccharide increases the expression level of the aquaporin-4 water channel.

Experimental Biology 2017, Chicago, USA, 2017

④ 杉本直俊, Lue Hue, 清水正樹, 東馬智子, 黒田文人, 和田泰三, 谷内江昭宏

In vitro 解析から見えてきた志賀毒素による中枢神経症状出現のメカニズム

第48回日本小児感染症学会、総会・学術集会、岡山県岡山市、2016年

⑤ 杉本直俊

骨格筋細胞における炎症反応

第30回 運動と体温の研究会、岩手県盛岡市、2016年

⑥ Leu Hue、杉本直俊、清水正樹、東馬智子、和田泰三、太田邦雄、谷内江昭宏
TNF- α augments STX-induced response in glial cells
第118回日本小児科学会学術集会、北海道札幌市、2016年

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔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：太田 邦雄

ローマ字氏名：(OHTA Kunio)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00303280

研究分担者氏名：杉本 直俊

ローマ字氏名：(SUGIMOTO Naotoshi)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80272954

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Leu Than Hue

ローマ字氏名：(LEU Than Hue)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。