

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17686

研究課題名(和文) 家族性拡張型心筋症モデルにおける運動療法および薬物とのハイブリッド療法の確立

研究課題名(英文) The construction of combination therapy of exercise and medication on DCM model mice

研究代表者

杉原 匡美 (Sugihara, Masami)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80648163

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)：拡張型心筋症(DCM)は、心不全(HF)の原因疾患の一つであり、左心室の拡大と収縮能低下を特徴とする心筋症である。運動療法はHFでの治療のひとつだが、DCMではHFの重症化や致死性不整脈が多く、運動療法の効果が明らかでない。ヒト家族性DCMに似た特徴をもつモデルマウス(以下DCMマウス)を用い、若年より頻回の自発的運動を行ったところ、明らかな寿命延長効果が認められた。また、アンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)でも治療効果を報告しており、ARB投与群、自発運動群、ARBと自発運動の併用群において、心機能および下肢筋への影響を比較した。野生型のマウスでの自発運動の影響についても検証を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、循環器内科医としての診療の中でDCMでも適切な運動の効果が推測された症例を経験している。しかし、多くのDCM患者においては、進行してから受診する例が多く運動療法を試みる機会を逸しやすい、易不整脈性のため運動プロトコルが決めにくい、環境や遺伝的要因、薬物介入によるバラつきが大きい、という点で評価が難しい状況が続いている。本研究では、遺伝的背景の均一なモデル動物を解析できるので効果を定量的に検討できる。また、近年発達している遺伝子診断と合わせ、病態進行に合わせた運動療法のプロトコルの確立に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of major causes of heart failure (HF). Today, exercise is regarded as one of therapies for HF. However, the effects of exercise on patients with DCM have not been established. A knock-in mouse model of human inherited DCM is useful for investigating inherited DCM. Homozygous mice were divided into four groups based on the administration of angiotensin receptor antagonist (ARB) and voluntary exercise: without drug or exercise control, oral administration of ARB, daily exercise and both of ARB and exercise (BOTH). The all groups started medication and running at 1 month of age. At the 2.5 months of age, mice were sacrificed after an investigation with echocardiography. BOTH group was significantly improved in ejection fraction. On the other hand, exercise group showed less E/e' than the other groups. The weights of soleus muscles in the exercise group were more increased than BOTH group and were thought to be associated with diastolic function.

研究分野：循環器内科

キーワード：運動療法 拡張型心筋症 心不全 心室性不整脈

### 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(DCM)は心不全(HF)の主要な原因の一つであり、左心室の拡大と収縮能低下を特徴とした心筋症で、約 50%は遺伝子変異を伴う家族性である。家族性拡張型心筋症では 30~40%が心室性の致死性不整脈により突然死するとの報告があり、その機序はいまだ不明な点が残されている。また、運動療法はうっ血の改善、再入院率の低下などが報告され、CHF の治療のひとつとして多くの医療機関で取り入れられるようになってきている。その機序として、心血管系の改善、副交感神経系の活性化などが言われているが、家族性 DCM では心不全の重症化や致死性不整脈による突然死の恐れがあるため、ヒトにおける効果については未だ検討が困難である。ヒト家族性拡張型心筋症(心筋トロポニン T の 1 アミノ酸欠損: K210)に基づいた拡張型心筋症モデルマウス(以下 DCM マウス)が作出され、若年より左心室の拡大、収縮能低下を示し、致死性不整脈あるいは心不全により生後約 70 日を半減期として死亡することから、ヒトの DCM の病態を良く再現すると考えられた。研究者は大学院においてこのモデルマウスを用いた研究に携わり、心筋のイオンチャネルリモデリング(電位依存性 K チャネルや KACh チャネルの減少、T 型  $Ca^{2+}$  チャネルの増加)が心筋細胞膜の易興奮性を惹起して心室性不整脈を引き起こすこと、アンジオテンシン受容体阻害薬(ARB)の投与が個々の心筋細胞の肥大化および心筋組織の線維化、イオンチャネルリモデリングを抑制して DCM マウスの寿命を著しく延長すること等を明らかにしてきた。また、ホイールを用いた自発運動測定は、心不全症状の指標である耐運動能を非侵襲的にモニターする有効な手段であることを見出した。

### 2. 研究の目的

DCM マウスを用いた一連の研究において、幼若時より頻繁に自発運動を行った DCM マウスは致死性不整脈をほとんど起こさず寿命が延長するという驚くべき結果を得た。そのため、DCM においても適切な運動を行うことが、症状の改善や心不全進行の抑制に有効なのではないかと考えた。また、上記のように DCM のマウスにおける ARB の効果を既に検討しており、特に日本国内の DCM の患者では ARB を内服している例が多い。これらの結果から、本研究では、DCM マウスにおける若年からの ARB 投与と自発運動の併用について心機能に与える影響を評価した。同時に、同程度の自発運動が野生型のマウスに与える影響の評価も行った。

### 3. 研究の方法

(1) DCM マウスにおける ARB と自発運動の併用について検討するため、ARB 投与群(ARB 群)、ホイールを設置し続けて自発運動を行った群(運動群)、ARB と自発運動の併用群(併用群)、どちらも行わないコントロール群の 4 群を設けた。ARB 群、運動群では約 4 週齢が月齢より ARB 1 mg/kg/日を飲水投与またはホイールを設置し、併用群では同月齢よりその両方を行った。また、運動群および併用群と同等の運動が野生型マウスに与える影響評価するため、自発運動を行わない群(運動なし)と自発運動を行った群(運動有)に分け、同様に観察した。  
(2) 個体は自家繁殖で得たが、雌性の DCM マウスは妊娠、出産で死亡するリスクが高いため、ヘテロ接合体同士で繁殖を行った。  
(3) 1.5~2 ヶ月間の飲水投与および自発運動の後、それぞれの群で 9~12 ヶ週齢において、心臓超音波検査で生体における心機能評価を行った。運動群、併用群では期間中の走行距離の推移を記録した。心臓超音波検査後、サンプリングを行った。  
(4) サンプリングの際に、体重、心重量、肺重量を測定し、心不全および肺うっ血の進行を評価した。同時に下肢筋であるヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の重量も測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) DCM マウスにおける ARB および自発運動

DCM は進行性の心筋症であり、特に家族性の場合は生下時より HF の素因を有し、加齢と共に進行していく病態と考えられる。その過程において、交感神経系、レニン-アンジオテンシン系、サイトカインなどが活性化し収縮力の低下を代償しようとする(代償期)が、やがて心拍出量が低下した非代償期に移行し、肺うっ血などの心不全症状が現れる。これまで、DCM マウスにおいて、ケージにホイール(直径 12 cm)を設置しておくホイールの中での走行を学習し、自らの都合で走行するため自発運動とみなせること、2 ヶ月齢では 1 日あたり野生型と同等の走行距離を示し、走行距離の減少が心不全の進行を反映していることを報告している。

観察期間中において、自発運動を行った 2 群のうち運動群の 1 日あたりの走行距離が運動群は  $7.31 \pm 1.8\text{km}$  (n=7)、併用群は  $6.93 \pm 1.3\text{km}$  (n=6)であり、有意差は認められなかった。また、サンプリング直前 1 日あたりの走行距離が平均走行距離を下回った個体は運動群が 3 匹(その個体における平均走行



図 1 ホイールによる自発運動

距離の64.0%)、併用群が2匹(63.7%)で、この時点でもほぼ同等の耐運動能であったと考えられた。

心臓超音波検査では、4群において、左室壁厚、左室拡張期径は有意差がみられず、いずれの群でも左室が拡大していた。左室収縮能を表す駆出率はコントロール群  $21.73 \pm 6.1\%$  (n=6)、ARB群  $26.93 \pm 5.1\%$  (n=6)、運動群  $27.27 \pm 4.5\%$  (n=5)、併用群  $31.9 \pm 3.6\%$  (n=6)であり、併用群のみ有意差を持って改善していたが、一方、 $E/e'$  は、コントロール群は  $128.8 \pm 71.6$  (n=6)、ARB群は  $115.5 \pm 44.8$  (n=6)、運動群は  $38.7 \pm 9.18$  (n=5)、併用群は  $96.9 \pm 33.1$  (n=6)であり、運動群では明らかに減少しており、拡張能の改善が反映していると考えられた。先行研究では ARB3 mg/kg/日での投与について検討し収縮能が改善しているが、1 mg/kg/日でも若干の効果があり、自発運動との相乗効果が認められることが示唆された。拡張能においては明らかな相乗効果は認められなかった。また、運動群と併用群の耐運動能に差が無かったことから、収縮能の改善のみならず、拡張能の改善でも耐運動能が維持されることが考えられた。

DCM マウス 4 群の心重量/体重では、ARB 群および併用群でコントロール群に比べ有意に減少していた。体重と肺重量/体重比には有意差がみられなかった。これより、心重量/体重比の減少は、拡張能よりも収縮能を反映することが示唆された(図2)。これまでの研究過程で、頻回の自発運動は遅筋であるヒラメ筋の重量を増加させることが分かっている。今回の

4 群では、ヒラメ筋重量/体重比はコントロール群に比べ、運動群では平均値で1.24倍、併用群では1.20倍増加しており、運動群のみコントロール群に比べ有意差が認められた(図2)。また速筋である足底筋重量/体重比と、遅筋、速筋の両方で構成されている腓腹筋重量/体重比は4群間で相違がみられなかった。これより、DCM マウスにおいて、左室の拡張能改善と遅筋が関連すると推測された。また、ARB 投与は骨格筋の増減に対してあまり関与しない結果となった。

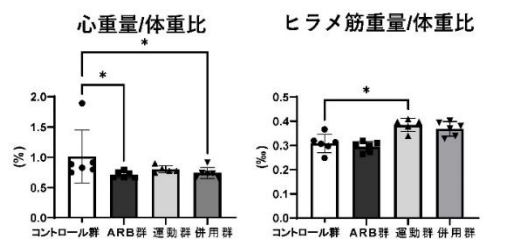


図2 DCMマウス4群の心重量/体重比とヒラメ筋重量/体重比

## (2)野生型における自発運動

DCM マウスにおいては、1ヶ月齢からの自発運動が心機能悪化を遅延することが示唆されたが、運動量(走行距離)には制限を設けず行った自発運動であるため、健常マウスにおいてはどの程度の運動量であるかについては不明であった。そのため、野生型マウスを自発運動しない群(運動なし、n=5)と自発運動を行った群(運動有、n=6)に分け、上記のDCM マウス4群と同様の測定を行った。

心臓超音波検査では両群間で左室中隔壁厚は同等であった。駆出率もまた、運動有で若干低下している個体はみられたものの、有意差は認められなかった。左室拡張期径は運動なしが  $2.81 \pm 0.27$  (mm)、運動有は  $3.28 \pm 0.32$  (mm)であり左室径は有意に拡大していた。運動有では運動なしより  $E/e'$  は運動なしが  $43.1 \pm 11.0$ 、運動有が  $69.7 \pm 18.1$  であり、運動有では有意に拡張能が減弱していた。DCM マウスの運動群とは反対の結果となり、同時にDCM マウス運動群の拡張能と運動なしのそれはあまり変わらない結果となった(図3)。

体重は、運動なし  $26.19 \pm 2.2$  (g)、運動有  $24.53 \pm 0.8$  (g)と、多少運動有で減少している印象ではあったが、有意差は認められなかった。心重量/体重比、肺重量/体重比ともに両群で同等であった。下肢筋については、ヒラメ筋重量/体重比が運動なしで  $0.30 \pm 0.01$  (%o)、運動有が  $0.38 \pm 0.03$  (%o)であり、運動有では1.28倍の増加を呈していた。足底筋重量/体重比、腓腹筋重量/体重比は両群で差がみられなかった。野生型マウスにおいても若年からの自発運動ではDCM マウスと同様の下肢筋の変化をしており、ヒラメ筋重量/体重比増加の程度もDCM マウスとほぼ同様であった。

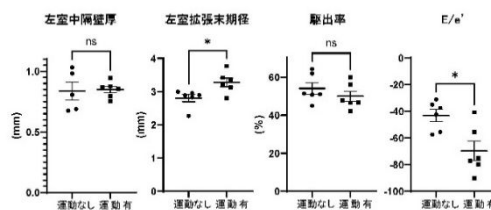


図3 野生型マウスにおける心臓超音波検査

## (引用文献)

- Walsh-Wilkinson E, Arsenault M, Couet J., Segmental analysis by speckle-tracking echocardiography of the left ventricle response to isoproterenol in male and female mice, PeerJ, 2021, 12;9
- Odagiri F, Inoue H, Sugihara M, Suzuki T, Murayama T, Morimoto S, Kurebayashi N et al., Effects of candesartan on electrical remodeling in the hearts of inherited dilated cardiomyopathy model mice, PLoS One, 2014, Jul 7;9(7)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inazumi H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Numaga-Tomita T, Kashihara T, Nakada T, Kurebayashi N, Oya M, Nonaka M, Sugihara M, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Nishikimi T, Motoki H, Yamada M, Morimoto S, Otsu K, Mortensen RM, Nakao K, Kimura T.	4. 巻 130
2. 論文標題 NRSF- GNAO1 Pathway Contributes to the Regulation of Cardiac Ca <sup>2+</sup> Homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation research	6. 最初と最後の頁 234-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.121.318898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masami Sugihara, Ryo Kakigi, Takashi Murayama, Takashi Miida, Takashi Sakurai, Sachio Morimoto, Nagomi Kurebayashi
2. 発表標題 How does voluntary exercise frequency affect cardiac function in dilated cardiomyopathy model mice?
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原匡美, 柿木亮, 村山尚, 三井田孝, 櫻井隆, 森本幸生, 呉林なごみ
2. 発表標題 拡張型心筋症モデルマウスにおける性差による自発運動の効果の違い
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 杉原匡美, 柿木亮, 村山尚, 三井田孝, 櫻井隆, 森本幸生, 呉林なごみ
2. 発表標題 拡張型心筋症モデルマウスにおける自発運動の効果
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柿木 亮  (Kakigi Ryo)		
研究協力者	村山 尚  (Murayama Takashi)		
研究協力者	呉林 なごみ  (Nagomi Kurebayashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------