

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23984

研究課題名（和文）心筋エネルギー代謝に着目したファブリー心筋症の病態解明

研究課題名（英文）Revealing the mechanism of Fabry cardiomyopathy by analyzing energy metabolism.

研究代表者

藏本 勇希（Kuramoto, Yuki）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：50843794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ファブリー心筋症におけるエネルギー代謝異常の存在を患者由来iPS心筋細胞モデル及び健常細胞のガラクトシダーゼ遺伝子ノックダウンモデルを用いて示すことができた。エネルギー代謝異常がグロボトリアオシルセラミドの蓄積を介さずに、ガラクトシダーゼ活性阻害のみでも引き起こされていることを見出した。

また、臨床情報とゲノム解析情報を組み合わせたファブリー病患者レジストリーを構築し、ファブリー心筋症進展に関わる遺伝的背景の同定につながる情報を収集することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファブリー心筋症はファブリー病患者の主な死因であり、現在でもファブリー病患者の生命予後は一般人口に比して10-15年短い。ファブリー心筋症の発症時期、重症度は症例毎に様々で詳細な原因は依然として不明である。今回エネルギー代謝異常の機序の一端を明らかにしたこと、また臨床情報-ゲノム情報を連結したレジストリーを構築したことで、バイオマーカーの同定、発症時期、重症化予測につながるものが期待される。またバイオマーカーに介入することで、新たな治療標的を得ることが期待される。今回の研究成果が今後酵素補充療法の適応判断・治療開始時期の判断に役立つことが期待され、医療費削減の観点からも、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Fabry disease is a lysosomal storage disease caused by mutations in alpha galactosidase A (GLA) gene, which result in the accumulation of its substrates, mainly globotriaosylceramide (Gb3). The accumulation in the heart induces Fabry cardiomyopathy, which is the most frequent cause of death in patients with Fabry disease.

The researcher found the dysfunction in energy metabolism in Fabry cardiomyopathy model using iPS cell-derived cardiomyocytes from Fabry disease patients. Dysfunction in energy metabolism could be induced by knockdown of GLA but not by administration of Gb3, suggesting that deficiency of GLA itself can be a trigger for dysfunction in energy metabolism. The researcher also constructed a registry of Fabry disease, combining clinical and genetic information, which is useful for risk stratification of Fabry cardiomyopathy.

研究分野：循環器内科

キーワード：ファブリー病 iPS細胞 エネルギー代謝

### 1. 研究開始当初の背景

ファブリー病は先天性代謝異常症の一つである。ファブリー病患者はライソソーム内の加水分解酵素であるガラクトシダーゼ A (GLA) の遺伝子変異のため、GLA 活性が欠損している。その結果、基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) 等のスフィンゴ糖脂質がライソソーム内に蓄積することで各種臓器障害を来す。特に心筋細胞への蓄積は左室肥大を来し、その後心不全、心筋梗塞、不整脈等を引き起こすことからファブリー心筋症と呼ばれ、罹患者の主な死因となっている。ファブリー心筋症の病態として、患者に対する心臓 MRI や患者由来 iPS 心筋細胞の研究でエネルギー代謝異常のあることがこれまでに報告されている。しかし、その詳細な分子機序は明らかにされていない。

研究代表者はファブリー病患者由来 iPS 細胞を用いてファブリー心筋症の in vitro 評価系を作成した(文献 1)。この実験系によりファブリーモデル iPS 心筋での GLA 活性欠損、Gb3 蓄積が確認できていた。また、所属する大阪大学医学部附属病院におけるファブリー病患者の臨床情報とゲノム情報を組み合わせたレジストリーの作成を進めており、これらを用いてファブリー心筋症におけるエネルギー代謝異常に関しての病態解明を進める準備が整えられていた。

### 2. 研究の目的

(1) ファブリー心筋症の病態形成因子に関して、独自に作成した患者由来 iPS 心筋細胞によるファブリー心筋症モデルを用いて、心筋エネルギー代謝機能の果たす役割を解明する。

(2) ファブリー病患者の臨床におけるエネルギー代謝異常につながる臨床情報・ゲノム解析情報からファブリー心筋症重症化に関わる指標を得る。

### 3. 研究の方法

(1) ファブリー病 iPS 細胞を用いた心筋エネルギー代謝異常の存在と機序を解明する

独自に作成した患者由来 iPS 細胞モデルを用いて、ファブリーモデルにおけるエネルギー代謝異常の存在を確認した。フラックスアナライザーによるエネルギー代謝の評価を行い、ファブリー病心筋に特有の心筋エネルギー代謝異常の詳細を明らかにし、また脂肪酸の利用障害がどの過程で起こっているのかを明らかにした。

(2) ファブリー病患者の臨床におけるエネルギー代謝異常につながる臨床情報・ゲノム解析情報からファブリー心筋症重症化に関わる指標を得るため、大阪大学医学部附属病院に通院中のファブリー病患者 22 名より同意を得て、エクソーム解析を行った。診療情報よりその検査所見、心病変の進行の有無などを調べた。心エコー所見より左室駆出率、左室収縮末期径を取得し、また心筋線維化が進行したファブリー病心病変に見られると考えられる所見(後壁基部の菲薄化、壁運動低下、輝度上昇)の有無を確認した。

### 4. 研究成果

(1) ファブリー病モデル iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の表現型のスクリーニングとして、ハイスピードカメラによる iPS 心筋細胞の収縮性の評価を行った。グルコース含有培地とグルコース非含有培地での収縮速度を比較すると、健常モデルでは有意な差を認めなかったが、ファブリーモデルでは早期にグルコース非含有培地での収縮速度の低下を認めた。エネルギー源の枯渇により収縮性の低下を来すことから、エネルギー代謝異常のあることが確認された。

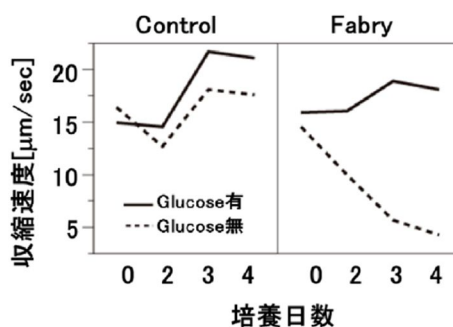


図1 培地中のグルコース有無とiPS心筋収縮性の関係

(2) エネルギー代謝異常を更に詳しく調べるため、フラックスアナライザーを用いて酸化的リン酸化による酸素消費量の測定を行った。心筋細胞の主たるエネルギー源である脂肪酸の代謝を評価するため、Agilent 社の XF Palmitate Oxidation Stress Test Kit のプロトコルに従い、解析前日より低血清培地で培養し、解析 1 時間前に無血清、グルタミン不含、低グルコース培地で培養した。解析 30 分前にパルミチン酸を添加すると、添加しない場合と比較して酸素消費量の増加を認めるが、ファブリーモデルにおいてはこの酸素消費量増加が減弱していた。このことから、脂肪酸利用障害のあることが示唆された(図 2)。

この現象は患者由来 iPS 細胞モデルだけでなく、健常由来 iPS 細胞に対し siRNA を用いて GLA 遺伝子をノックダウンすることによっても確認された。このモデルでは GLA 活性は正常の 50%程度であり、Gb3 の蓄積は認めなかった。一方で、Gb3 の添加によって細胞内に Gb3 を蓄積させるモデルでは脂肪酸添加時の酸素消費量増加は障害されなかった。このことよりファブリー病におけるエネルギー代謝異常は Gb3 蓄積を介さずに GLA 遺伝子欠損により直接的に起こっている可能性が考えられた。

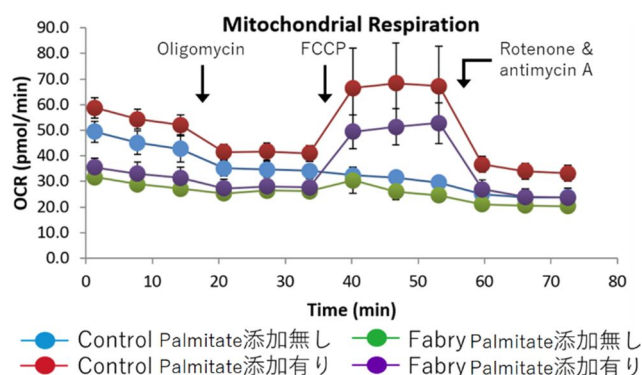


図2 Palmitate添加有無によるiPS心筋の酸素消費量の違い

(3) 培養細胞による解析で、ファブリー心筋症の病態に脂肪酸利用障害というエネルギー代謝異常のあることが示唆された。これをファブリー病患者の層別化に活用できるかどうかを、独自に収集したファブリー病患者のゲノム情報及び臨床情報を用いて検討した。

患者は 31-81 歳(中央値 55.5 歳)の男性 8 名、女性 14 名で、うち男性 5 名、女性 8 名が左室重量係数 > 125 g/m<sup>2</sup> より左室肥大ありと判断された。左室重量係数は年齢に従って増大する傾向を認め、また男性の方が女性よりも若年で左室肥大を示す傾向を認めた(図 3a)。GLA 遺伝子変異は同意取得時点で既に殆どの症例で同定されており、未同定であった症例も今回のゲノム解析にて同定された。12 種類の GLA 遺伝子変異が同定され、6 種類は未報告の変異であり、既報告の変異 6 種類のうち 1 種類は遅発型、残り 5 種類は古典型として報告されていた(図 3a)。

ファブリー心筋症の病態進展指標として GLA 遺伝子変異以外の遺伝的背景因子として、脂肪酸酸化に関わる遺伝子変異の有無を調べたところ、重篤な変異(truncating mutation ないし疾患ゲノムデータベースで病原性変異として登録されている)を 8 名の患者で認めた。このうち 5 名(62.5%)で心エコーにて心筋の線維化を疑う所見を認めた(図 3b、橙色三角印)。一方で変異を認めなかった 14 名のうち、心エコーにて線維化を疑う所見を認めたのは 5 名(35.7%)だった(図 3b、橙色丸印)。脂肪酸酸化に関わる重篤な遺伝子変異があると線維化所見を来しやすいことが示唆されたが、統計学的有意差は認めなかった(p=0.22、カイ二乗検定)。今後更に解析症例数を増やすことで、ファブリー心筋症の重症化の予測が可能な遺伝的背景因子の同定につながることを期待される。

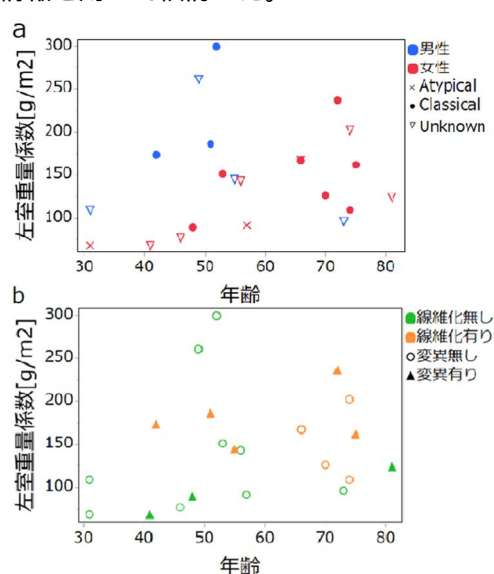


図3 臨床情報とゲノム情報との関連

#### <引用文献>

(1) Yuki Kuramoto, Atsuhiko T Naito, Hiromasa Tojo, Taku Sakai, Masamichi Ito, Masato Shibamoto, Akito Nakagawa, Tomoaki Higo, Katsuki Okada, Toshihiro Yamaguchi, Jong-Kook Lee, Shigeru Miyagawa, Yoshiki Sawa, Yasushi Sakata, Issei Komuro. Generation of Fabry cardiomyopathy model for drug screening using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a female Fabry patient. J Mol Cell Cardiol. 2018 Aug;121:256-265. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30048710 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.246

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏本勇希、朝野仁裕、李鍾國、坂田泰史
2. 発表標題 Disorders in energy metabolism are associated with pathophysiology of Fabry cardiomyopathy unable to be treated by enzyme replacement therapy.
3. 学会等名 第36回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------