

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08470

研究課題名(和文) デュシェンヌ型筋ジストロフィーの心不全発症・進行機序解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of Heart Failure Onset and Progression in Duchenne Muscular Dystrophy

研究代表者

平田 拓也 (Hirata, Takuya)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10800899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の心不全の機序としてオートファジーによる細胞死に注目した。まず、細胞死が起きていることを患者由来iPS細胞から分化させた心筋細胞を用いて、WSTアッセイを行い証明した。LC3のリポフェクションにより、イソプロテレノール(iso)負荷によりオートファジーが亢進することが示された。

次に、DMDモデルマウスのmdxマウスを用いてisoを負荷することにより、心エコーで心収縮の低下、心拡大、心筋組織の線維化の増加、LC3の免疫染色でオートファゴソームの増加を認めた。DMDの心不全にオートファジーが関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで心不全は、どの基礎疾患であれ一律ACE阻害薬、βブロッカーなど抗心不全薬で管理するほかなかった。しかし、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに伴う心不全に関してはオートファジーの亢進が原因になっている可能性があり、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの心不全の進行機序から考えた特異的な新たな治療法として、オートファジーのコントロールが選択肢として挙げられ、新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We focused on the mechanism of heart failure in Duchenne muscular dystrophy (DMD) and examined the involvement of autophagy-mediated cell death. First, using cardiomyocytes differentiated from patient-derived iPS cells, we demonstrated the occurrence of cell death through WST assay. Lipofection of LC3 revealed that autophagy was enhanced by isoproterenol (iso) loading.

Next, using mdx mice as a DMD model, iso loading resulted in decreased cardiac contraction, cardiac enlargement, increased myocardial tissue fibrosis, and increased autophagosome detection by LC3 immunostaining on cardiac tissue. These findings suggest that autophagy is involved in heart failure in DMD

研究分野：小児循環器

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー 心不全 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

- (1) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) による心不全発症は、その予後を左右する。一般的に慢性心不全の治療は、ACE 阻害剤や ブロッカーで行うことが多く、最近では ARNI、SGLT2 阻害剤、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬などの薬の効果が示され、使用されている。しかし、心不全は多種多様な機序で起こり、DMD 特異的な心不全治療の報告はされていない。
- (2) 我々は iPS 細胞から分化させた DMD 心筋細胞 (DMD iPS-CM) を用いて、細胞内のカルシウム濃度が上昇していることを報告した。すでにヒトの DMD iPS-CM でカルシウム濃度の上昇と心不全について報告されており、これは、今までヒトの心筋生検等で取り出した細胞を用いて実験を行っていたことが、iPS 細胞を用いて病態解明が出来ることを示唆する。
- (3) DMD 患者の骨格筋において、細胞内カルシウム濃度の上昇とそれに伴う細胞死により病態が進行すると言われているが、DMD 患者の心筋については不明な点が多い。心筋細胞でも細胞死が起きているという報告が散見されるが、そのほとんどが細胞死の機序の 1 つであるアポトーシスがわずかに DMD 患者で亢進しているというもので、他の細胞死の機序を検討した報告はない。

2. 研究の目的

- (1) DMD 患者の心不全発症・進行機序を心筋細胞無いレベルで解明し、治療法を開発することを目的とする。細胞死が DMD iPS-CM で起きやすいことを証明し、アポトーシス、オートファジーといった細胞死の機序について検討する。アポトーシスやオートファジーの亢進・低下に対してその阻害剤・刺激薬を用いて心筋障害が抑制できるか確認し、治療につなげる。

3. 研究の方法

- (1) DMD iPS-CM で細胞死が起きているか、イソプロテレノール負荷を行い細胞数の減少を WST-8 アッセイ法を用いて評価する。
- (2) その細胞死がアポトーシスによるものかオートファジーによるものかを検討する。アポトーシスについては、TUNEL 染色を行いその陽性率で評価し、オートファジーは GFP-mRFP-LC3 を用いて細胞内のオートファゴソーム数の増加で評価する。
- (3) DMD のモデルマウスである mdx マウスを用い、イソプロテレノールの負荷により心不全が誘導できるか動物用エコー機を用いて壁肥厚や心収縮低下を確認し、その組織を染色し心筋の線維化面積を評価する。
- (4) アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 1、オートファジーのマーカーである LC3、p62 を用い、マウス心筋組織の免疫染色とウェスタンブロット法で評価する。
- (5) アポトーシス阻害剤やオートファジー阻害薬・刺激薬を用い、マウス心筋障害が改善するか、上記の線維化面積とエコーで評価する。

4. 研究成果

- (1) イソプロテレノール負荷により DMD iPS-CM で細胞死が誘導された。コントロール群ではイソプロテレノール負荷により細胞死の誘導は確認出来ず、DMD iPS-CM の脆弱性が示された。

(2) TUNEL 法を用いイソプロテレノール負荷 DMD iPS-CM のアポトーシスの有無を検討したところ、コントロール群に比しイソプロテレノール負荷でアポトーシスが増加する結果は得られなかった (図 1)。一方 GFP-mRFP LC3 を用いイソプロテレノール負荷 DMD iPS-CM のオートファジーについて検討したところ、有意にオートファジーが亢進していた (図 2)。コントロール群ではイソプロテレノール負荷によるオートファジーの亢進を認めなかった。以上より、DMD iPS-CM の細胞死の機序として、オートファジーの亢進が関わっていることが示された。

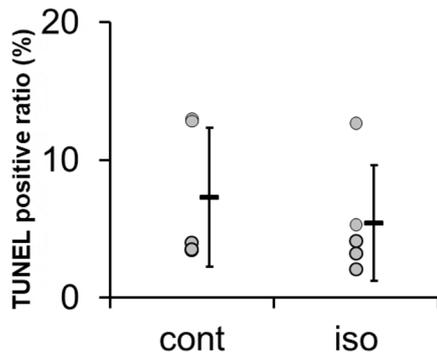


図 1 薬物負荷によるアポトーシスの誘導

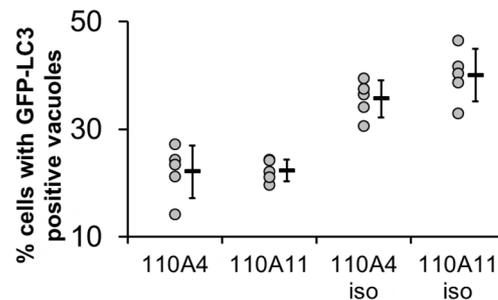


図 2 薬物負荷によるオートファジーの誘導

(3) 12 週 mdx マウスに薬物負荷を行い、16 週で心筋組織の線維化を評価したところ、薬物負荷群で心筋組織の線維化面積の増加を認めた。wild type では線維化面積は変わらなかった (図 3)。心エコーの左室駆出率について薬物負荷前後の変化を評価したところ、mdx マウスで左室駆出率が有意に低下していた。オートファジーについてウェスタンブロット法を用い評価したところ、イソプロテレノール負荷により mdx マウスの心筋でオートファジーの亢進を認めた (図 4)。wild type のマウスでは、イソプロテレノール負荷による心筋線維化や左室駆出率低下を認めなかった。以上より、モデルマウスを用いたアッセイで心不全の進行にオートファジーの亢進が関与している可能性が示唆された。

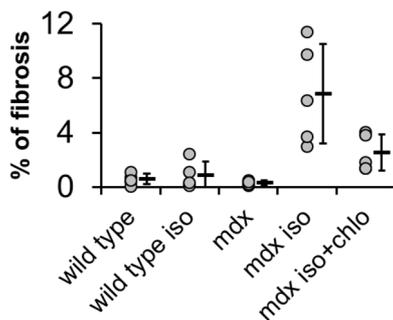


図 3 mdx マウス心筋の線維化

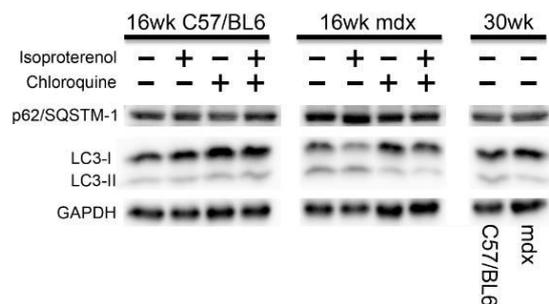


図 4 mdx マウス心筋のオートファジー

(4) イソプロテレノール負荷と同時にオートファジーを抑制するクロロキンを mdx マウスに投与したところ、心筋の線維化は抑制され (図 3)、オートファジーも抑制された (図 4)。クロロキンは DMD 患者の心不全悪化に対して、オートファジーの亢進を抑えることで進行を緩やかにできることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------