

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16823

研究課題名（和文）拡張型心筋症の病態解明を目指した非侵襲的心筋性状・代謝MRイメージング法の開発

研究課題名（英文）Novel technique of magnetic resonance imaging for evaluation of myocardial properties and metabolism in dilated cardiomyopathy

研究代表者

上田 淳平（Ueda, Junpei）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員（常勤）

研究者番号：50867562

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）：本研究では、拡張型心筋症の疾患モデルマウスである、C57BL/10-mdx (mdx)マウスを対象として、前臨床用7 T MRI装置を用いた心臓の評価を行った。マウスの心臓のシネMRIを撮像することで、拡張末期、収縮末期における左心室内腔の体積を基に算出した、左心室の心機能を測定した。またfeature trackingという方法を用い、心筋の壁運動を定量化する心筋strain解析を行った。本研究では新たな心臓のcine MRI撮像法を用い、上記の方法でmdxマウスの心臓の評価を行った。それにより、従来の研究ではあまり報告がなかった、若年時のmdxマウスの心機能低下を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症はその病態が完全には解明されておらず、日本においては難病に指定されている。Mdxマウスは拡張型心筋症の疾患モデルマウスとして利用されている。このmdxマウスの心機能の変化をMRIで評価し、心機能の早期の変化を捉え、解明することは、拡張型心筋症の病態の解明の一助になるものと考えられる。本研究では、従来報告されてこなかった、若年のmdxマウスの心機能の変化を、新たな心臓のcine MRI撮像法とstrain解析の手法であるfeature tracking法を組み合わせることで、捉えることに成功した。よって本研究成果は拡張型心筋症の病態解明につながる研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the hearts of C57BL/10-mdx (mdx) mice using a preclinical 7 T MRI system. mdx mouse is a model of dilated cardiomyopathy disease. Cardiac cine MRI was used to evaluate cardiac function of the left ventricle by calculating Left ventricular end diastolic volume, left ventricular end systolic volume and left ventricular ejection fraction. Myocardial strain analysis, which quantifies myocardial wall motion, was also performed by feature tracking method. This study used a new method of cardiac cine MRI imaging to evaluate the hearts of mdx mice using the above methods. In this way, we were able to suggest a reduction in cardiac function in mdx mice at a young age.

研究分野：ライフサイエンス / 放射線科学 /

キーワード：拡張型心筋症 MRI strain デュシェンヌ型筋ジストロフィー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓 MRI の基本的な撮像法である Cine-MRI を用いた心形態・心機能解析は確立されており、臨床において広く利用されている。しかしながら心筋の代謝変化や形態異常が出る以前の性状の変化などを評価する手法は確立されていない。近年 T1 マッピングや T2 マッピングなどを用いた心筋緩和時間測定[1]による心筋組織性状評価が注目を集めており、超音波イメージングで行われてきた心筋のストレイン解析も MRI を用いて可能となっている[2]。また心筋の代謝評価として、従来法である ³¹P-MRS を用いて測定される PCr/ATP 比を心不全患者の予後予測に利用できることが報告されている[3]。しかし本手法は撮像時間が長い為、臨床および前臨床においても利用されることは少ない。そのような中、2014 年ブタを対象として MRI を用いたクレアチン(Cr)の分子イメージング(Cr-CEST-MRI)が報告され[4]、新たな心筋エネルギー代謝の評価法として期待されている。本研究では、心臓疾患による形態変化を伴わない前段階病変を捉えることを目的に、齧歯類を対象とした超高磁場 MRI を用いた非侵襲的心筋性状・代謝イメージングの開発、およびその病態モデルへの適用を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

拡張型心筋症の形態変化を伴わない前段階病変を捉えることを目的に齧歯類を対象とした、超高磁場 MRI を用いた非侵襲的心筋性状イメージングの開発および適用を行うことを目的とした。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (duchenne muscular dystrophy: DMD) は、ジストロフィンタンパク質の欠損によって引き起こされる X 連鎖性の重症進行性筋消耗性疾患である[5-7]。ジストロフィンタンパク質の欠損は拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy: DCM) につながり、青年期に発症することがあるとされている[8,9]。DCM は、過剰な圧力・容積負荷や冠動脈疾患が存在しないのにも関わらず、左心室または両心室の拡張、収縮機能の障害が生じることを特徴とする心筋疾患である [10,11]。筋ジストロフィーのモデル動物である C57BL/10-mdx (mdx) マウスは、遺伝子の Xp21 領域のエクソン 23 に変異を持ち、それによりジストロフィン蛋白の発現が消失する特徴を持っている[12]。DMD の研究は、DMD 患者を対象に行われてきたのと同様に、このジストロフィン遺伝子に変異を持つ mdx マウスを対象としても行われてきた[13,14]。DCM は DMD の主な死因とされており、そのメカニズムは未だ完全には解明されていない[15]。そのため、若齢の mdx マウスの心機能を評価し、DCM の初期病態を解明することは非常に重要である。

本研究では、近年注目されている新規 strain 解析手法である、feature tracking 法を用いた strain 解析を含めた、若齢の mdx マウスの心機能を評価し、mdx マウスの心機能の変化を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

すべての実験プロトコルは、大阪大学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。動物を含むすべての実験手順と動物の飼育は、大阪大学の動物実験ガイドラインおよび米国国立衛生研究所の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に従って行った。

MRI 撮像は、8 週齢 (コントロールマウス 10 匹, mdx マウス 10 匹)、および 12 週齢 (コントロールマウス 10 匹, mdx マウス 10 匹) の 2 回のタイミングで行った。

1.0-2.0% イソフルランを、マウスの鼻と口を覆うマスクを通して吸わせ、全身麻酔下で MRI 撮像を実施した。MRI は心臓シネ MRI を撮像し、心臓の左室短軸(SA)、左室 2 腔長軸(2ch)、4 腔長軸像(4ch)を、self-gated magnetic resonance cine imaging 法を用いた Fast Low angle Shot (FLASH) により撮像した。

SA, 2ch, 4ch における、左室拡張末期と左室収縮末期の両方の時相において、心外膜と心内膜に関心領域を設定し、左室拡張末期容積(left ventricular end-diastolic volume: LVEDV)、左室収縮末期容積(left ventricular end-systolic volume: LVESV)、左室 1 回拍出量(left ventricular stroke volume: LVSV)、左室駆出率(left ventricular ejection fraction: LVEF)、左室心筋重量(left ventricular mass: LVM)を左室短軸像から算出した。加えて、feature tracking 法による strain 解析を行った。心筋の strain 解析では、左心室心筋を対象とし、global radial strain (GRS)、global circumferential strain (GCS)、global longitudinal strain (GLS) の値を算出した。GLS は左室 2 腔長軸(2ch-GLS)および 4 腔長軸像(4ch-GLS)から解析した。統計的評価には各 strain 値のピークの値を用いた。得られた値について、統計的検一元配置分散分析、および Tukey の多重比較検定により統計的検定を行った。統計的有意性は $p < 0.05$ とした (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

12 週齢での MRI 撮像終了後、直ちにマウスをサクリファイスし、心臓の摘出行い、ホルマリンで固定した。固定した心臓を左心室の短軸方向にスライスし切片を作製した。一部の切片はヘマトキシリン・エオシン (H&E) で染色し、一部の切片は免疫染色した。免疫染色は、一次抗体として Dystrophin rabbit polyclonal antibodies を用い、二次抗体として EnVision+ horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit を用いた。

4. 研究成果

(1) 左室短軸, 左室2腔長軸, 4腔長軸シネMRIの視覚評価

左室短軸では、8週齢および12週齢のコントロール群で心筋全体の収縮および拡張が観察された。左室心筋の拡張能については、mdx群とコントロール群間で明確な差は観察できなかった。しかし左室心筋の収縮能については、mdx群ではコントロール群より弱いように見受けられた(図1)。

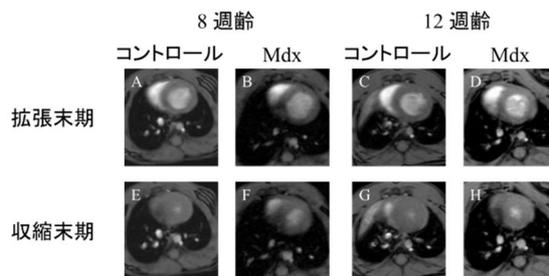


図1 心臓シネMRIの左室短軸像。8週齢のコントロール(A, E), mdxマウス(B, F), 12週齢のコントロール(C, G), mdxマウス(D, H)の画像をそれぞれ提示している。また、上段が心臓の拡張末期(A, B, C, D), 下段が収縮末期(E, F, G, H)となっている。

(2) 8週齢および12週齢のmdxマウス群とcontrol群の心機能比較

LVEDV(図2A)については、8週齢(コントロール, $52.6 \pm 4.9 \mu\text{L}$, mdx, $52.5 \pm 7.9 \mu\text{L}$)および12週齢(コントロール, $55.9 \pm 5.1 \mu\text{L}$, mdx, $60.3 \pm 9.1 \mu\text{L}$)のどちらにおいても、コントロール群とmdx群との間に有意な差は見られなかった。LVESV(図2B)については、8週齢(コントロール, $22.8 \pm 2.6 \mu\text{L}$, mdx, $28.1 \pm 7.0 \mu\text{L}$)ではコントロール群とmdx群の間に有意な差は認められなかった。しかし12週齢(コントロール, $25.8 \pm 3.6 \mu\text{L}$, mdx, $33.9 \pm 5.6 \mu\text{L}$, $p < 0.01$)では、コントロール群と比較してmdx群でLVESVは有意に減少した。LVSV(図2C)については、8週齢(コントロール, $29.9 \pm 2.8 \mu\text{L}$, mdx, $24.3 \pm 2.8 \mu\text{L}$, $p < 0.01$)でコントロール群と比較してmdx群では有意に減少した。しかし12週齢(コントロール, $30.6 \pm 3.1 \mu\text{L}$, mdx, $26.6 \pm 4.2 \mu\text{L}$)では、コントロール群とmdx群の間に有意な差は認められなかった。LVEFについては(図2D), 8週齢(コントロール, $56.6 \pm 2.3\%$, mdx, $47.2 \pm 7.4\%$, $p < 0.01$)と12週齢(コントロール, $53.9 \pm 3.3\%$, mdx, $44.1 \pm 2.7\%$, $p < 0.01$)のどちらにおいてもコントロール群と比較してmdx群で有意に減少した。またmdx群では、8週齢と12週齢の間においても有意な差が確認された($p < 0.05$)。LVM(図2E)については、8週齢(コントロール, $36.3 \pm 3.3 \text{mg}$, mdx, $35.1 \pm 3.8 \text{mg}$)および12週齢(コントロール, $36.7 \pm 4.3 \text{mg}$, mdx, $39.0 \pm 4.0 \text{mg}$)ともにコントロール群とmdx群に有意な差は認められなかった。

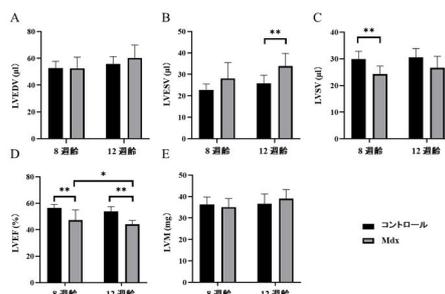


図2 8週齢, および12週齢のコントロール群, mdxマウス群のそれぞれにおけるLVEDV(A), LVESV(B), LVSV(C), LVEF(D), LVM(E)を表したグラフ。LVEDVは左室拡張末期容積, LVESVは左室収縮末期容積, LVSVは左室1回拍出量, LVEFは左室駆出率, LVMは左室心筋重量を表す。図中の*は $p < 0.05$, **は $p < 0.01$ であることを示す。

(3) 8週齢および12週齢のmdxマウス群とcontrol群のstrain解析

strain値に対する統計解析の結果によると、8週齢(control, $22.2 \pm 1.7\%$, mdx, $19.0 \pm 2.0\%$, $p < 0.05$)と12週齢(control, $20.9 \pm 2.2\%$, mdx, $17.2 \pm 2.7\%$, $p < 0.01$; 図3A)のどちらにおいても、mdx群におけるGRSはコントロール群と比較して、有意に減少していた。GCSは、8週齢(コントロール, $-14.6 \pm 0.8\%$, mdx, $-13.2 \pm 0.9\%$, $p < 0.05$)および12週齢(コントロール, $-13.9 \pm 1.0\%$, mdx, $-12.1 \pm 1.4\%$, $p < 0.01$, 図3B)ともに、コントロール群と比較してmdx群では有意に小さかった。2ch-GLSは、8週齢(コントロール, $-14.1 \pm 1.7\%$, mdx, $-11.4 \pm 2.0\%$, $p < 0.05$)および12週齢(コントロール, $-13.5 \pm 1.1\%$, mdx, $-11.3 \pm 1.9\%$, $p < 0.05$, 図3C)ともにコントロール群に対しmdx群では有意に減少した。4ch-GLSについては、8週齢(コントロール, $-14.5 \pm 2.4\%$, mdx, $-15.0 \pm 1.8\%$)および12週齢(コントロール, $-15.4 \pm 2.4\%$, mdx, $-13.4 \pm 1.6\%$, 図3D)ともに

コントロール群および mdx 群で有意な差を認めなかった。

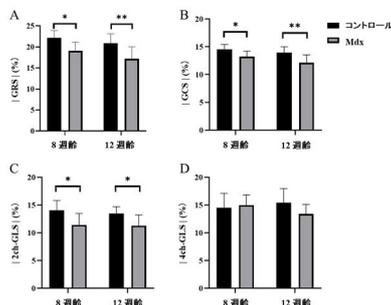


図3 8週齢,および12週齢のコントロール群,mdx マウス群のそれぞれにおける GRS (A),GCS (B),2ch-GLS (C),4ch-GLS (D)の絶対値を表したグラフ。GRSはglobal radial strain,GCSはglobal circumferential strain,2ch-GLSは左室2腔長軸像から計測したglobal longitudinal strain,4ch-GLSは4腔長軸像から計測したglobal longitudinal strainを表す。図中の*は $p < 0.05$,**は $p < 0.01$ であることを示す。

(4) 心筋組織の H&E 染色と免疫染色

H&E 染色の結果では,mdx 群とコントロール群の間に差は認められなかった(図4)。しかしジストロフィンに対する抗体を用いた免疫染色では,mdx 群とコントロール群との間に差異が認められた(図5)。細胞外マトリックスへの染色がコントロール群では観察されたが(図5A,B),mdx 群では観察されなかった(図5C,D)。

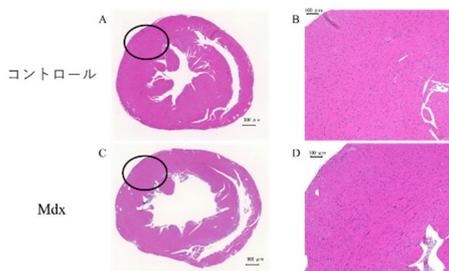


図4 ヘマトキシリン・エオジン染色したコントロール(A,B)と mdx マウス(C,D)の心臓切片。BとDは,それぞれAとCの黒色の円の箇所を拡大したものを表す。スケールバーは500 μm (A,C)および100 μm (B,D)である。

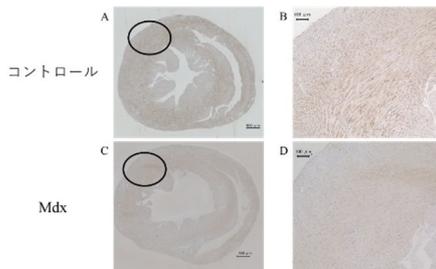


図5 ジストロフィン抗体により免疫染色を行ったコントロール(A,B)と mdx マウス(C,D)の心臓切片。BとDは,それぞれAとCの黒色の円の箇所を拡大したものを表す。スケールバーは500 μm (A,C)および100 μm (B,D)である。

(5)(1)-(4)の結果より得られた本研究における意義,有用性

Mdx マウスに対してCMRを用いた先行研究では,本研究で用いたような若年の mdx マウスでは心機能の低下を示さず,本研究で用いた mdx マウスよりも高齢のマウスにおいては心機能が低下することが多く報告されている[16,17]。しかしこれらの先行研究では,本研究で使用した Feature tracking 法,self-gated magnetic resonance cine imaging 法は使用されていない。本研究では,新しいstrain解析,またself-gated magnetic resonance cine imaging 法を用いた呼吸,心臓の動きに合わせた撮像法を用いることによって,若い mdx マウスにおいても心機能が低下している可能性を示すことができた。

先行研究において高時間分解能で撮像されたCMR画像を用いた先行研究では,生後3か月の mdx マウスで心機能の低下を示すと報告している[18]。この先行研究とは時間分解能が異なるが,我々の研究においても,同様に生後3か月程度の若齢の mdx マウスにおける心機能の低下を示唆している。また本研究の免疫染色では,mdx マウスの心筋細胞の細胞外マトリックスがコントロール群と比較して染色されない結果となった(図5)。この結果は mdx マウスの心機能が低下したと報告している先行研究[20]の免疫染色の結果と一致している。以上のことより,免疫染色では mdx 群とコントロール群の間で心筋細胞に差がみられ,CMR画像においても mdx 群の心機

能の低下が検出された。しかしCMR画像からは、拡張型心筋症の症状である心室肥大は認められなかった。またmdxマウスの心筋細胞には、先行研究[16]で見られるようなH&E染色での壊死領域は認められなかった。したがって本研究の結果は、mdxマウスがDCMと診断される前の段階での心機能の低下を示唆していると考えられる。

本研究報告は、本科研費の援助を受け得ることができた研究成果を論文として発表した、*Evaluation of Cardiac Function in Young Mdx Mice Using MRI with Feature Tracking and Self-Gated Magnetic Resonance Cine Imaging Diagnostics (Basel)* . 2023 Apr 19;13(8):1472.
の内容を一部改変して記載した。

<参考文献>

1. Sophie, M. et al T1 and T2 Mapping in Cardiology: "Mapping the Obscure Object of Desire" *Cardiology*. 2017;138(4):207-217.
2. Teodora, C. et al Magnetic resonance imaging of myocardial strain: A review of current approaches *J Magn Reson Imaging*. 2017 Nov;46(5):1263-1280.
3. Neubauer, S. et al Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy *Circulation*. 1997 Oct 7;96(7):2190-6.
4. Mohammad, H. et al A technique for in vivo mapping of myocardial creatine kinase metabolism *Nat Med*. 2014 Feb;20(2):209-14
5. Jelinkova, S. et al. Dystrophin Deficiency Causes Progressive Depletion of Cardiovascular Progenitor Cells in the Heart. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 5025.
6. Biggar, W.D. et al Duchenne muscular dystrophy: Current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 2002, 401, 88-106.
7. Hoffman, E.P. et al Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989, 2, 1019-1029.
8. Hoogerwaard, E.M. et al Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuro-muscul. Disord*. 1999, 9, 347-351.
9. Schade van Westrum, S.M. et al Cardiac abnormalities in a follow-up study on carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 2011, 77, 62-66.
10. Merlo, M. et al Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail*. 2018, 20, 228-239.
11. Elliott, P. et al. Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J*. 2008, 29, 270-276.
12. Sicinski, P. et al The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. *Science* 1989, 244, 1578-1580.
13. Nowak, D. et al Cardiomyopathy in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy caused by disordered secretion of vascular endothelial growth factor. *Med. Sci. Monit*. 2011, 17, BR332-BR338.
14. Lorin, C. et al Ultrastructural and functional alterations of EC coupling elements in mdx cardiomyocytes: An analysis from membrane surface to depth. *Cell. Biochem. Biophys*. 2013, 66, 723-736.
15. Law, M.L. et al Dysregulation of Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy-Associated Dilated Cardiomyopathy: Mechanisms and Experimental Therapeutic Strategies. *J. Clin. Med*. 2020, 9, 520.
16. Zhang, W. et al Abnormal cardiac morphology, function and energy metabolism in the dystrophic mdx mouse: An MRI and MRS study. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2008, 45, 754-760.
17. Li, W. et al Early manifestation of alteration in cardiac function in dystrophin deficient mdx mouse using 3D CMR tagging. *J. Cardiovasc. Magn. Reson*. 2009, 11, 40.
18. Stuckey, D.J. et al In vivo MRI characterization of progressive cardiac dysfunction in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *PLoS ONE* 2012, 7, e28569.

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 Junpei Ueda, Shigeyoshi Saito	4. 巻 13(8)
2. 論文標題 Evaluation of Cardiac Function in Young Mdx Mice Using MRI with Feature Tracking and Self-Gated Magnetic Resonance Cine Imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics13081472	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田淳平、齋藤茂芳
2. 発表標題 心臓シネMRIを用いたDuchenne型筋ジストロフィーモデルマウスの心機能評価
3. 学会等名 日本放射線技術学会 近畿支部学術大会
4. 発表年 2022年～2023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
---------	---------