

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08077

研究課題名(和文)左室リバーズリモデリングにおけるオートファジーの病態的意義と治療応用の探索

研究課題名(英文)Significance of Autophagy in Left Ventricular Reverse Remodeling

研究代表者

金森 寛充(kanamori, Hiromitsu)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20456502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内蛋白分解機構の1つである。左室リバーズリモデリング(LVRR)における心筋オートファジーの役割を調べるためヒト拡張型心筋症(DCM)の心筋生検標本を用いた検討を行った。LVRR成功例と非成功例を調べたところLVRR成功例ではオートファジー空胞が多くリソソーム活性の指標であるカテプシンDの発現が増加していた。ロジスティック解析によりオートファジー空胞の数とカテプシンDの発現はLVRRの予測因子であることが示された。またLVRRが成功した症例はその後の心血管イベントが少なかった。以上より心筋オートファジーはDCMの予後予測因子となると同時に治療標的になりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに種々の心不全動物モデルでオートファジーの活性化が治療になることが報告されてきた。しかし比較的短時間の試験であり長期的な効果は不明であった。オートファジーの過度な促進は自己崩壊を招きかねず果たして長期間にわたる活性化が生体にとって有効であるか不明であり、ヒトにおける長期的なデータはなかった。本研究はオートファジー活性が高い方がLVRRを改善し心血管イベントを抑制することを示した。これはオートファジーマーカーが単なる予後予測因子に留まらず治療手段になりうることを示している。オートファジーを介した治療法は確立していないので本研究は新しい治療法・創薬への方向性としても意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cellular process that degrades a cell's own cytoplasmic components. Left ventricular remodeling (LVRR) is known to be a key finding to promise a better prognosis for patients with dilated cardiomyopathy (DCM). To investigate the role of autophagy in LVRR, we used endomyocardial biopsy specimens from patients with DCM [LVRR-positive (n=21), and LV-negative (n=21)]. The number of autophagic vacuoles and cathepsin D expression was increased in cardiomyocytes from LVRR-positive patients than that from LVRR-negative patients. Logistic regression analysis adjusted for age showed that increase in autophagic vacuole number and cathepsin D expression were predictive of LVRR. DCM patients who achieved LVRR experienced fewer cardiovascular events during the follow-up period. These findings suggest that autophagy is a useful marker predictive of LVRR in DCM patients. This provides novel pathologic insight into a strategy for treating the failing DCM heart.

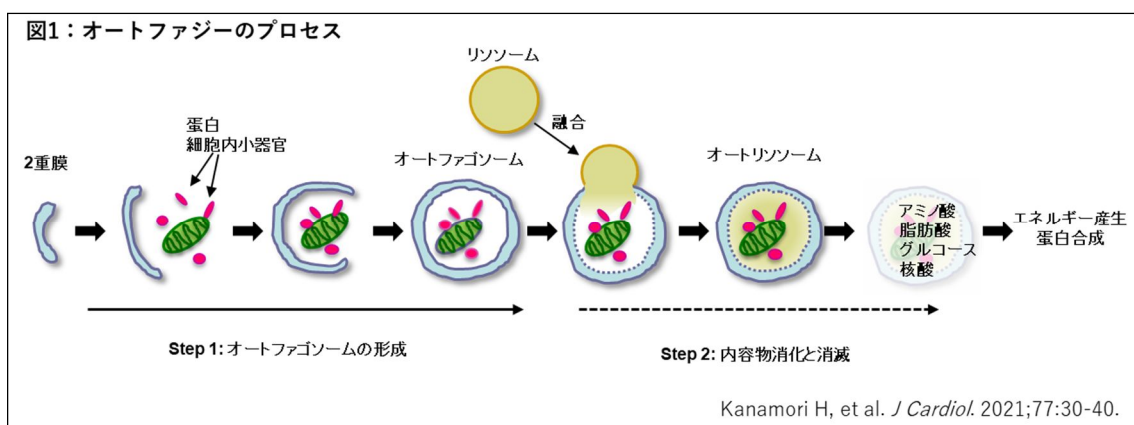
研究分野：j循環器内科学

キーワード：オートファジー 拡張型心筋症 心不全 リバーズリモデリング LC3 カテプシンD

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋は絶え間ない収縮と拡張を繰り返すため多大なエネルギーを必要とする。また細胞内の代謝産物や不要老廃物を処理し恒常性を維持することも大切である。このため自己食食によるエネルギー産生と自浄作用の生理的機構である“オートファジー”は重要である。実際に心筋細胞にはオートファジー空胞がよく観察される。ヒト不全心筋の心筋生検組織にオートファジー空胞の蓄積を確認しているがこの解釈は難しい。オートファジーは分解する基質を二重膜で取り囲みオートファゴソームを形成し、その後リソソームと融合して一重膜のオートリソソームとなり内容物を分解するという2つのステップから構成される。(図1)用語として二重膜のオートファゴソームと一重膜のオートリソソームを合わせてオートファジー空胞と呼ばれている。従ってオートファジー空胞の増加のみでは：i) 心不全に対する代償機構としてオートファジーの亢進状態を示しているのか；ii) 機能不全のためオートファジー空胞が内容物を消化できずに単に細胞内に蓄積しているのかは不明である。この判別はオートファジーを治療応用につなげるには重要である。i)であれば短期的なオートファジーの亢進は細胞の生存に有益であるが長期的な亢進は自己崩壊を招く危険性があり、ii)であれば後半の消化ステップを改善することが治療法になりうるからである。



これまでの国内外の研究を検討するとオートファジーは種々の病態によっては亢進していたり抑制されていたり様々である。病期の本態がそのオートファジーの動態であるのか、病気の結果としてその様な表現型になっているのかは定かではない。いずれにせよベースラインがどうであれオートファジーを促進することにより病態を改善することは概ね一致している。しかし動物実験レベルでは短期実験が主でありヒトの慢性心不全のような長期間疾患でのオートファジー亢進が同様の結果を再現できるのかは不明である。

左室拡大や収縮能の低下を呈した不全心には治療経過の中で増悪する症例と改善する症例がある。後者にみられる心機能の改善と左室形態の変化は“左室リバーズリモデリング (LVRR)”と呼ばれ予後が良い。心不全の原因は様々であるがびまん性に左室壁運動が低下し心拡大を伴う疾患に拡張型心筋症 (DCM) がある。本疾患の約 40%は LVRR が成功し予後がよいとされその予測因子の研究が注目されているが未だ確立したものは無い。心エコーや疫学的なパラメーターが示されてきたがこれらは結果を見ているものであり予測因子にはなるが治療介入は困難である。一方で実際に DCM を含めて不全心筋の心筋細胞にオートファジー空胞が多数存在することは明白であり、オートファジーは細胞内でのエネルギー産生と自浄作用の機構であることから LVRR にはオートファジーの関与が想定される。これまでにヒトを対象とした DCM とオートファジーの所見を横断的に検討した観察研究が少数あるがオートファジーと LVRR を調べた研究は殆ど無い。そこで DCM の心筋生検標本からオートファジー活性を測定し LVRR との関連を調べることにした。

2. 研究の目的

DCM 心不全患者の心筋生検標本におけるオートファジーに関する所見と臨床データ（血行動態、生命予後、心不全の経過）から LVRR におけるオートファジーの意義を解明しその所見が予後予測因子となりうるかを追求する。

3. 研究の方法

当院で 2005 年~2017 年に心筋生検を行った症例から DCM 症例を抽出し臨床データを収集した。LVRR 成功例、LVRR 非成功例に分類し以下の観察項目による比較検討を行った。コントロール症例として心尖部肥大型心筋症やサルコイドーシス、不整脈を原因に心筋生検を施行されたが諸検査の結果、疾患が否定されかつ心機能が正常であった症例を用いた。なお LVRR はベースラインの EF より 10%以上改善しかつ左室拡張末期径が 10%以上縮小したものと定義した。

- 1) 一般病理学的評価：心筋細胞サイズ、粗しょう化、核異型、空胞変性、間質の線維化。
- 2) 免疫染色：オートファジー関連蛋白 (LC3、カテプシン D) の発現。
- 3) 電子顕微鏡：オートファジー空胞・リソソームの同定と定量、性状の観察。

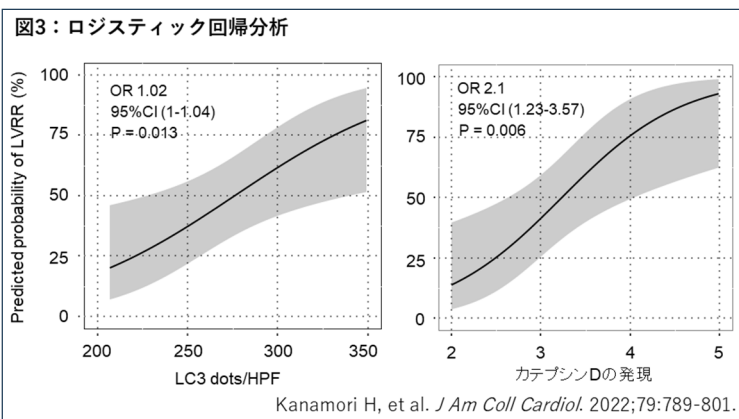
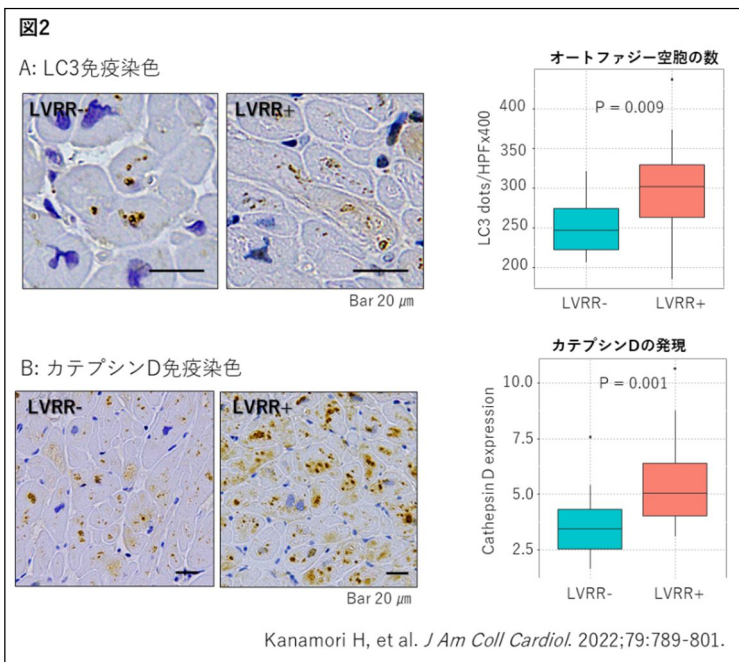
上記のオートファジーに関する所見（免疫染色、電子顕微鏡観察）と病態（心機能、一般病理組織）、予後（心不全の経過、左室リバーシリモデリングの状況）との関連を検討した。

4. 研究成果

当院で施行した心筋生検症例から DCM 症例を抽出し、追跡可能であった症例について心エコー検査結果を後ろ向きに解析した。生検後 48 ヶ月（中央値）の時点で LVRR に成功した症例、LVRR に不成功の症例、各 21 症例を抽出した。2 群のベースラインの臨床的パラメータの比較では LVRR 不成功群では LVRR 成功群と比較し左房径は拡大し、肺動脈血楔入圧が高く、遮断薬の処方が多くみられた。心筋生検の一般病理所見についてコントロール症例と比較し DCM 症例では心筋細胞肥大、線維化率増加、心筋細胞変性、核異型がたが 2 群間に有意差はみられなかった。電子顕微鏡で詳細な観察を行ったところ心筋細胞に注目すると DCM 症例では筋原線維線維の粗鬆化や核の異型に加えオートファジー空胞（オートファゴソーム、オートリソソーム）が多数見られた。そこでオートファジーに関する所見に注目したところ、LVRR 成功群ではオートファジー空胞とリソソームが多数みられ、オートファジー空胞の中でもオートリソソームの割合が大きいことが判明した。一方、LVRR 不成功群ではオートファジー空胞の中でオートファゴソームの割合が大きく、一つ一つのオートファジー空胞のサイズが大きいことが確認できた。さらに観

察範囲を広げ観察するためパラフィン包埋切片を用い光学顕微鏡で観察した。オートファジー空胞とリソソームのマーカーとして LC3 とカテプシン D の免疫染色を用い定量評価を行ったところ LVRR 成功群は LVRR 不成功群と比較しオートファジー空胞の数が多く、リソソームの発現が高いことが判明した（**図 2A,B**）。さらに共焦点顕微鏡を用い LC3 とカテプシン D の蛍光 2 重免疫染色を行ったところ LVRR 成功群では 2 重染色陽性の粒が多く観察されオートファジー空胞の中でオートリソソームの割合が高いことが示された。このことから LVRR する心筋細胞はオートファジー活性が高いことが示唆された。さらにオートファジー空胞の数とカテプシン D の発現と LVRR についてロジスティック回帰分析を行ったところオッズ比は各々 1.02（95% CI: 1.00-1.04, P=0.013）、2.1（95% CI: 1.23-3.57, P=0.006）であった（**図 3**）。さらに各群のその後の心血管イベント（死亡、心不全、致死性不整脈、脳梗塞）を検討したところ LVRR 成功群は LVRR 不成功群と比較し総イベント発生、死亡を除くイベント発生のいずれも有意に抑制がみられた（P<0.001、P=0.001）。

以上より DCM の不全心筋ではオートファジーが亢進しておりオートファジーの活性化が高ければ LVRR しやすいこと、すなわちこれらを示すマーカー（オートファジー空胞の数やカテプシンの発現）が LVRR の予測因子となり DCM の予後予測が可能となりうることを示唆された。このように LVRR の予後を推測できれば徒に薬物治療にこだわらず補助循環治療や移植治療など次の治療ステップへ早期に進める指標となるなど治療方針への応用が期待できる。さらに本研究はオートファジーマーカーの定量が単なる DCM の予後予測のツールとして期待されるだけでなく、オートファジーそのものが治療手段になることを示す。心筋オートファジーは生理的な機構であり刺激により誘導や阻害が可能である。心筋オートファジーは一般にいわれる「善玉」であるが自己貪食なので急性期に短時間促進することはレスキューの様に期待できるものの長期的に促進することが病態の改善につながるかが懸念される点であった。今回の長期的な観察研究ではオートファジー活性が高い方が DCM の予後を改善したことから心筋オートファジーを介した新たな心不全治療法の開発が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 金森寛充 大倉宏之	4. 巻 54
2. 論文標題 拡張型心筋症の予後における心筋オートファジーの重要性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 心臓	6. 最初と最後の頁 1224 1228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanamori H, Yoshida A, Naruse G, Endo S, Minatoguchi S, Watanabe T, Kawaguchi T, Tanaka T, Yamada Y, Takasugi N, Ishihara T, Mikami A, Miyazaki N, Nishigaki K, Minatoguchi S, Miyazaki T, Okura H.	4. 巻 79
2. 論文標題 Impact of Autophagy on Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY	6. 最初と最後の頁 789-801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacc.2021.11.059.	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 -

1. 著者名 Kanamori H, Nakashima T, Yoshida A, Miyazaki T, Mikami A, Okura H.	4. 巻 75
2. 論文標題 Characteristic cardiac capillary pericytes in a Fabry disease patient receiving enzyme replacement therapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hellenic Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 101-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hjc.2023.05.009.	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金森寛充
2. 発表標題 拡張型心筋症の心筋生検から心機能の回復が予見できるか？ 超微形態からのアプローチ 心筋オートファジーの関与 -
3. 学会等名 第31回日本心血管画像動態学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金森寛充
2. 発表標題 電頭を生かす 電頭の神髄、心筋超微形態の有用性
3. 学会等名 第45回心筋生検研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤奨
2. 発表標題 Sodium-glucose cotransporter 2 Inhibitor Displays Cardioprotection in Post-infarction Remodeling through Autophagic Activation Associated with NHE1 Inhibition.
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2024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 分担者	吉田 明弘 (Yoshida Akihiro) (50869906)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	

	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	遠藤 奨 (Endo Susumu)		

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