

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860598

研究課題名(和文) CD36欠損症における心筋症の発症機序解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cardiomyopathy in CD36 deficiency and development of a novel therapy

研究代表者

中谷 和弘 (Nakatani, Kazuhiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：50648813

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)：CD36欠損マウス(以下KOマウス)における心負荷時の心不全発症の検討では、KOマウスでは心筋に対する圧力負荷時により強い心肥大・心筋線維化を呈しやすく、左室収縮不全から心不全に至ることが明らかとなった。患者iPS細胞由来心筋細胞を用いた検討では、4例のCD36欠損患者、5例の健常人からiPS由来を樹立した。iPS細胞から心筋細胞を作製し、心筋細胞の表現型を比較検討し、心筋症を有するCD36欠損症の心筋異常を改善させる薬剤の開発を目指している。これらの実験から得られた成果を、国際学会・国内学会で発表し、また英文原著論文として現在論文投稿中である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed wild type (WT) mice and CD36 knockout (KO) mice under the pressure overload due to transverse aortic constriction (TAC). By applying a TAC, the survival rate was significantly lower in KO than in WT mice. KO mice with TAC showed an increased hypertrophic and fibrotic changes in cardiomyocytes than in WT mice with TAC. KO with TAC showed reduced left ventricle fractional shortening and resulted in heart failure with systolic dysfunction. We prepared iPS cell from healthy control(n=5) and CD36 deficiency(n=4) with or without cardiomyopathy. We are inducing differentiation from iPS cells to cardiomyocytes. We are analyzing phenotype of cardiomyocytes derived from them. Moreover, we are developing a novel therapy for the abnormal cardiomyocytes derived from CD36 deficient patients with cardiomyopathy. We have reported these data in the scientific meetings and submitted as an original article written in English.

研究分野：医学 循環器内科

キーワード：心筋エネルギー代謝 CD36 心筋症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1). ヒト心筋のエネルギー代謝:

ヒト心筋はエネルギー源として糖および脂肪酸を利用しているが、これらのエネルギー基質利用異常に伴う心機能不全が報告されている。糖尿病性心筋症では糖利用の低下および脂肪酸利用の亢進を認め、心筋の脂質蓄積による心不全を来す。一方、脂肪酸酸化に関わる酵素が欠損する患者では、脂肪酸利用が低下し、肥大型心筋症を伴うと報告されているが、その機序は十分に解明されていない。

(2). CD36 欠損症と心筋障害

CD36 は長鎖脂肪酸の細胞表面トランスポーターであり、心筋にも発現する。

当研究室では血小板の検討から CD36 欠損症を発見し CD36 欠損症は本邦で 0.3% と高頻度に存在しており、脂肪酸アナログ BMIPP を用いた心筋シンチグラフィで完全欠損を来し、一方 FDG-PET での検討では心筋での糖取り込みが亢進していることを見出した。CD36 欠損症の自験例 40 症例のうち 6 例と高頻度に心筋症を発症しており、重篤な心不全を呈する症例もみられる。これらの知見は、心筋代謝障害と心機能低下の関与を示唆するものであり、難治性の心不全の原因の一つとして本疾患の存在を考慮する必要がある。さらに本疾患ではインスリン抵抗性、脂質代謝異常、高血圧が集積することを報告した。CD36 欠損症のマウスモデルである CD36 ノックアウト (CD36KO) マウスは通常の飼育条件では心機能障害を来さないことから、CD36 欠損症は遺伝子異常を背景とし後天的因子(高血圧、高脂肪食など)により心機能異常を来している可能性がある。

(3). CD36 欠損症のマウスモデルでの検討野生型 (WT) マウスと CD36KO マウスの心臓において、一過性虚血再灌流後の心機能回復を比較した報告では、糖代謝を抑制した状態では心機能回復が遅延するが抑制しない状態では心機能回復に差は見られない。これは、CD36 欠損状態では脂肪酸から糖代謝にシフトし心筋のエネルギー状態を維持していることを示唆している。しかし、これらの検討は摘出心による *ex vivo* の検討が主体であり、生存状態での心機能やエネルギー代謝異常の評価が必要とされてきた。また、CD36KO マウスに慢性的な心負荷を与えた場合の生存率や心機能の検証、分子生物学的検討、組織学的検討が必要とされてきた。

(4). iPS・分化転換技術を用いた心筋症の病態解明と治療法開発

心筋症の病態解明・治療法開発を妨げる最大の要因として、心筋症患者から心筋細胞を十分に得られないことが挙げられる。iPS 細胞は細胞ドナーと同一のゲノムを有しており、心筋細胞を含む様々な細胞系譜へと分化することが報告されている。心筋症患者から iPS 細胞を作成、心筋細胞へと分化誘導する

ことで、心筋症の病態における CD36 欠損の役割を解析し、心筋症に対する新規治療薬開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

脂肪酸トランスポーターである CD36 を遺伝的に欠いた CD36 欠損症では心筋細胞での脂肪酸取り込みが障害され糖を主にエネルギー源として用いており、高頻度に心機能低下を伴う肥大型心筋症および拡張型心筋症を合併する。以上から CD36 欠損症は脂肪酸代謝障害に伴う心筋障害を来す好例であると考えられる。本疾患患者ではインスリン抵抗性、脂質代謝異常および高血圧が集積しており、先天的な遺伝子異常にさらに後天的な代謝障害の負荷がかかり心筋障害が出現しているものと推定されるが、その詳細な機序は明らかでなく、特異的な治療法は存在しない。本研究では CD36 欠損症をモデルに長鎖脂肪酸の代謝障害に伴う心筋障害の機序を解明し、治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

WT マウス、CD36KO マウスを対象として、TAC による圧負荷を行い、心筋脂肪酸代謝異常時における圧負荷時の心機能障害の発症機序を明らかにする。具体的には、PET/MRI、NMR によるイメージング技術を用いて脂肪酸・糖代謝、エネルギーリザーブを評価し、qRT-PCR、microarray による遺伝子発現解析および Western Blot 法、プロテオミクス解析によるシグナル・蛋白発現解析、メタボロミクス解析を行い、エネルギー代謝異常の全体像を把握し、心肥大・心不全との関連性を検討し、組織学的所見も含めて病態を把握する。さらに心筋症を発症している CD36 欠損患者と心筋症を発症していない CD36 欠損患者と健常者の末梢血から iPS 細胞を作成した後に、それぞれの iPS 由来心筋細胞において、エネルギー代謝および心肥大・心不全に関連する因子の差異を明らかにするとともに細胞レベルでの異常を是正するためのスクリーニングシステムを確立する。

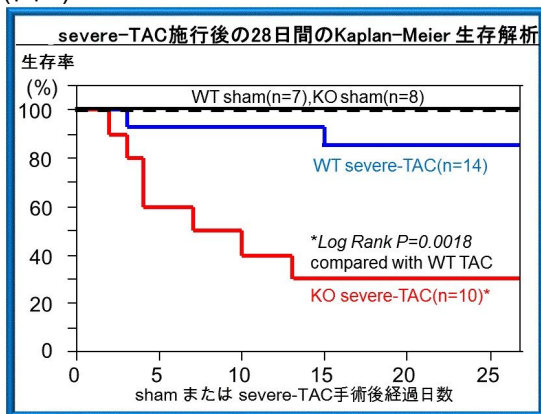
4. 研究成果

(1). CD36 欠損マウス (以下 KO マウス) における心負荷時の心不全発症の検討

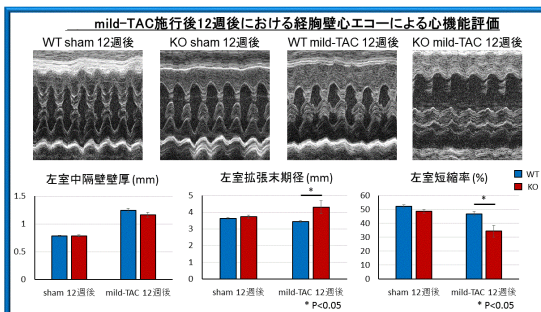
野生型マウス (以下 WT マウス) KO マウスを対象として、大動脈縮窄手術 (以下 TAC) による心負荷を施行した。27 ゲージ針を用いた高度の TAC (severe-TAC) 後の生存率は、WT マウスに比して KO マウスで有意に低かった (図 1)。より詳細に経過を検討するために 25 ゲージの針を用いた軽度の TAC (mild-TAC) を行い、心エコー解析などを行った。mild-TAC 後の左室内腔は、WT マウスでは拡大は認められなかったものの、KO マウスでは徐々に内腔拡大し、TAC12 週後において KO マウスでは WT マウスに比して有意に左室収縮率の低下を認めた (図 2)。分子生物学的解析、組織学的解析所見から KO マウスでは心筋に対する圧負荷時にはより強い心筋線維化を呈し

やすく(図3)左心室収縮不全から心不全に至ることが明らかになった。メタボロミクス解析では、非負荷時では、CD36欠損状態では脂肪酸利用が低下し、糖中間代謝産物が増加、ケトン体中間代謝産物が増加しており、脂肪酸利用から、糖代謝、ケトン体代謝に依存していることが明らかになった。しかし負荷時にはこの糖代謝、ケトン体代謝への依存ではエネルギーが破綻して、心機能低下に陥る可能性があると推察される。今後は負荷時のメタボロミクス解析を行うと同時に、PET/MRI、NMRによるイメージング技術を用いて脂肪酸・糖代謝、エネルギーリザーブを評価する予定である。

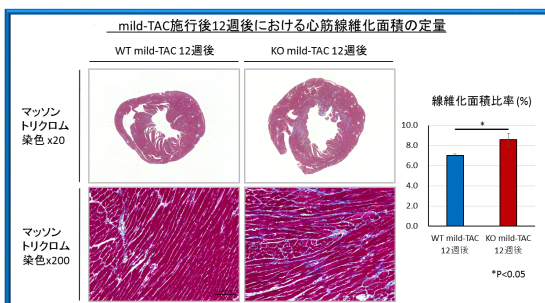
(図1)



(図2)



(図3)

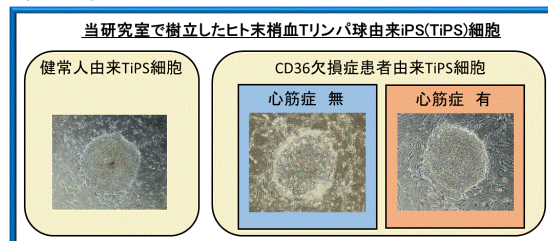


(2). 患者 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた検討

計4例のCD36欠損症患者(心筋症なし2例、心筋症あり2例)健常人5例を対象とした。心筋症の合併の無いCD36欠損症患者(2例)のiPS細胞由来心筋細胞および心筋症を合併

するCD36欠損症患者(2例)由来のiPS細胞を樹立した。一方、健常人5例からiPS由来を樹立した(図4)。今後は樹立したiPS細胞から心筋細胞へ分化誘導し、健常人、心筋症の無いCD36欠損症患者あるいは心筋症合併有のCD36欠損症患者、それぞれのiPS由来心筋細胞の表現型について差別的比較検討し、心筋症を合併するCD36欠損症患者の心筋異常を改善させる薬剤のスクリーニングを行う予定である。

(図4)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

中谷 和弘 Myocardial Energy Production is Preserved by Increased Utilization of Glucose and Ketone Bodies in CD36 Knockout Mice

第78回日本循環器学会学術集会 2015年4月24日~26日 大阪、日本

中谷 和弘 Myocardial energy production is preserved through increased utilization of glucose and ketone bodies in long-chain fatty acid transporter CD36-knockout mice

第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2014年7月10日~11日 東京、日本

中谷 和弘 Impaired Cardiac Function in Long-chain Fatty Acid Transporter CD36 Knockout Mice in a Pressure Overload Condition

第78回日本循環器学会学術集会

2014年3月21日~23日 東京、日本

中谷 和弘 Pressure Overload Induces Hypertrophy and Impaired Cardiac Function in Long-chain Fatty Acid Transporter CD36 Knockout Mice

American Heart Association Scientific Sessions 2013

2013年11月16日~20日 ダラス、米国

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 和弘 (NAKATANI, Kazuhiro)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号：50648813

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：