

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10141

研究課題名(和文)デュシェンヌ型筋ジストロフィー iPS細胞を用いた心不全発症機序の解明と治療法開発

研究課題名(英文) Revealing mechanisms of cardiomyopathy and development of treatments for Duchenne muscular dystrophy patient cardiomyopathy by using iPS cells.

研究代表者

馬場 志郎 (Baba, Shiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60432382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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は難治性筋疾患で多くが呼吸不全または心不全で死亡する。在宅呼吸器の発展により近年多くの患者さんが心不全で死亡するようになったが、心不全の発症・進展機序は未だ不明である。この心不全の発症・進展に筋細胞の細胞死(オートファジー)が関与していることが判明した。同時に細胞内カルシウム濃度の上昇も心不全発症に関わっている可能性が示唆された。いずれも筋細胞にストレスをかけた状態でより悪化することが判明した。これらの結果から、細胞内カルシウム濃度上昇と細胞死の関連が予想されるが、その研究については現在進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の死因の大多数を占める筋症の発症予防や治療に大きく貢献すると思われる。現在デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の心不全に対する治療は、利尿剤、末梢血管拡張剤、ブロッカーなどの一般的な心不全治療方法しか臨床的には存在しない。心不全発症・進展機序をおさえたい治療法の開発が急務である。今回、オートファジーや細胞内カルシウム濃度上昇が筋症発症に寄与する研究結果を得たことで、オートファジーを抑制するクロロキンや細胞内カルシウムを調整するカルシウムブロッカーやキレート剤が治療に使用できる可能性が示され、臨床応用への道が開かれたと考える。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD), a severe degenerative skeletal and cardiac muscle disease, has a poor prognosis because of progressive dyspnea and heart failure. Recent advances in ventilator support devices have dramatically decreased mortality caused by respiratory distress. Consequently, cardiomyopathy resulting in heart failure is currently the major cause of death among DMD patients. However, mechanisms of developing cardiomyopathy in DMD have not been revealed, yet. Our research results revealed that autophagy, a cell death mechanism, was one of the promising mechanisms which develop cardiomyopathy. In addition, significant elevated Ca²⁺ concentration in cardiomyocytes derived from DMD patient iPS cells (DMD-iPS CMs) was observed. Moreover, mechanical stretching significantly increased the intracellular Ca²⁺ concentration in DMD-iPS CMs. These two phenomena possibly relate and cooperate for developing cardiomyopathy in DMD patients.

研究分野：循環器

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー iPS細胞 細胞死 オートファジー 細胞内カルシウム濃度

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は X 連鎖劣性遺伝の遺伝性致死性疾患で、出生男児 3300 人に 1 人の割合で発症するといわれている。その病態は、ジストロフィン遺伝子異常により骨格筋細胞や心筋細胞のジストロフィンタンパクが欠損し、筋線維の破壊・変性と再生を繰り返すことで進行性の筋萎縮と筋力低下が起こるといわれている。一般的には 10 歳前後で歩行不能、10 歳代後半から 20 歳前後で呼吸筋力低下、心不全を来す。1990 年までの報告では死因の 2/3 が呼吸不全と呼吸器感染症であり、心不全死亡は 17.1% であったが、近年の在宅酸素機器、在宅呼吸器の発達により、1999~2002 年の報告では呼吸不全が約 25%、心不全が 48.1% と逆転している (国内)。この心不全は心筋肥厚を伴う拡張型心筋症で、6 歳で 25%、10 歳で 59% が発症し、最終的な死因の 40% 以上を占め、今後さらに増加すると考えられている。これだけ多くの DMD 患者が心不全に移行しながらも、発症原因または進行機序やその治療法については未だ不明な点が多い。

DMD 患者の心臓は年齢とともに徐々に拡張し心機能低下をもたらす。DMD 患者の骨格筋細胞内カルシウム濃度は正常に比べて上昇しており、これが引き金となり骨格筋細胞障害が起こるといわれている。DMD 患者の心不全発症原因・機序も心筋細胞内カルシウム濃度の上昇が考えられる。細胞内カルシウム過負荷が一般的な心不全発症の原因の一部であることが Matsuzaki らによって報告されている事実と (Circulation 2000, 2003)、DMD 患者疾患特異的人工万能 (iPS) 細胞を用いた我々の基礎実験で、分化心筋細胞内カルシウム濃度上昇が有意に認められたことから、DMD 患者の心不全発症の原因・機序に細胞内カルシウムが大きく関わっていることが示唆される。この解明により DMD 患者の予後改善が大いに期待できる。

我々はジストロフィン遺伝子 Exon44 欠失 DMD 患者皮膚線維芽細胞から DMD-iPS 細胞を既に作製済みである。また Todorova らは、この欠失による DMD 心筋症の発症を報告しており (Am J Med Genet. 2003)、実際 検体を頂いたこの DMD 患者も既に心筋症を発症している。更にはコントロールとして Exon44 欠失を認めない父親と母親の皮膚線維芽細胞からコントロール iPS 細胞 (DMD-iPS 細胞) をすでに作製している。

我々の以前の基礎実験では、細胞内カルシウム濃度を indo-1 を用いて測定したところ、コントロール iPS 細胞由来心筋細胞に比べて DMD-iPS 細胞由来心筋細胞で安定培養時 (非負荷時) に既に細胞内カルシウム濃度上昇が起こっている結果を得ている。この結果から、細胞内カルシウム濃度と細胞死との関連を詳細に検討予定である。

2. 研究の目的

以上の知見や予備実験から以下を本研究の目的とする。

- 1) DMD-iPS 細胞由来心筋細胞の細胞内カルシウム濃度 (代謝) 変化と心筋細胞死について関連性を明らかにする。
- 2) DMD-iPS 細胞由来心筋細胞において、どのタイプの細胞死が有意に起こっているか評価し、またその発生機序を明らかにする。
- 3) 有意に生じる細胞死やその機序が判明した場合、その細胞死を抑制する薬剤で DMD-iPS 細胞由来心筋細胞の細胞死を抑制可能か評価する。
- 4) 以上の研究目的は in vitro のみでなく、自然発症型 DMD モデルマウス (*mdx* マウス) を用いて in vivo でも同様の研究を行う。更には、マウスの心機能についても評価を行う。

3. 研究の方法

ジストロフィン遺伝子 Exon44 欠失を有して心筋症を発症している DMD 患者と Exon44 欠失を認めない父親と母親の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞をすでに作製している。これらの細胞は京都大学 iPS 研究センター (CiRA) で既に細胞株化されている。心筋細胞分化についてはこれら iPS 細胞から Lian らの報告 (Nat Protoc. 2013) に基づいて効率よく心筋分化させ、さらに Tohyama らの方法 (Cell Stem Cell. 2013) を組み合わせることで分化細胞中、心筋細胞を 80-90% まで純化させることに成功している。DMD モデルマウスについては *mdx* マウスを使用する。

1) DMD-iPS 細胞から作製した心筋細胞病態の解析

DMD-iPS 細胞由来心筋細胞とコントロール-iPS 細胞 (Con-iPS 細胞) 由来心筋細胞の細胞内カルシウム濃度 indo-1 を用いた測定で測定する。また細胞にイソプレテレンオールやストレッチチャンバーを用いた負荷をかけた状態で細胞内カルシウム濃度を比較する。カルシウム濃度上昇と同時に細胞死が起こっているか評価するとともに、細胞活性について WST-8 アッセイなどで評価する。DMD-iPS 細胞由来心筋細胞で有意に細胞活性が低下していることが証明されたら、その原因についてアポトーシス、オートファジー、ネクローシスなどについて評価予定である。細胞死の形態について抑制物質を投与した後に有意に生じていると思われる細胞死が抑制されるか評価する。

2) *mdx* マウスの心筋病態評価

mdx マウスとコントロールマウスの心筋細胞について、*in vitro* での結果をふまえてアポトーシスまたはオートファジーまたはネクローシスの細胞死について実験し、*in vivo* においても *in vitro* と同様の現象が起こっているか評価する。心筋負荷についてはイソプロテレノール持続負荷（皮下植え込み型カプセル使用予定）を用いる。*mdx* マウスとコントロールマウス（C57/BL6）で心筋線維化面積、細胞死形態を評価する。*in vitro* と同様に、細胞死を抑制する薬剤を投与することで *in vivo* においても細胞死が抑制されるか評価する。

3) *mdx* マウスの心機能解析

2) の目的から *mdx* マウスの心筋細胞の細胞死が増強している結果であれば、*mdx* マウスの心機能は低下すると予想される。よって、*mdx* マウスとコントロールマウスの心機能を経時的に評価し、心機能の変化を明らかにする。心機能抑制が認められたら、前述同様細胞死を抑制する薬剤で心機能低下抑制効果を認めるか評価する。

4. 研究成果

DMD-iPS 細胞と Con-iPS 細胞から分化した心筋細胞内のカルシウム濃度を Indo-1 で測定した結果、細胞内カルシウム濃度は DMD-iPS 由来心筋細胞で高値であり、また濃度変化も DMD-iPS 由来心筋で有意に大きかった。ストレッチチャンバーを用いた機械刺激後、DMD-iPS 細胞由来心筋細胞内カルシウム濃度はより高値となった。更に心筋細胞にイソプロテレノールを投与すると、DMD-iPS 由来心筋細胞で有意に細胞数低下を認め、WST-8 アッセイでは細胞活性の低下を認めた。この原因究明のため細胞死の検討を行った。イソプロテレノール負荷後の心筋細胞を Caspase-3、TUNEL で染色したが、DMD-iPS と Con-iPS 由来心筋細胞で有意な差を認めなかった。iPS 由来心筋細胞内のオートファゴソーム数を比較すると明らかに DMD-iPS 由来心筋細胞で増加していた。次に *mdx* マウスを用いて実験を行った。電子顕微鏡ではコントロールマウスで認めなかったオートファゴソームを *mdx* マウス心筋細胞内に多数認めた。オートファゴソーム数はコントロールマウスに比べて *mdx* マウス心筋細胞内で有意に多かった。この数はオートファジー抑制効果があるクロロキン投与によって抑制された。左室線維化についても評価したところ、*mdx* マウスで明らかに心筋線維化面積が広く、線維化はクロロキン投与で抑制された。*mdx* マウス、Control マウスの心機能についてエコーを用いて評価を行なった。皮下植え込み型薬剤カプセルを用いた 4 週間の持続イソプロテレノール負荷後、*mdx* マウスの左室駆出率は Control マウスに比べて有意に低下した。この低下はクロロキン投与によって明らかに抑制された。

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 Tsurumi F, Baba S, Yoshinaga D, Umeda K, Hirata T, Takita J, Heike T.	4. 巻 14
2. 論文標題 The intracellular Ca ²⁺ concentration is elevated in cardiomyocytes differentiated from hiPSCs derived from a Duchenne muscular dystrophy patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0213768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0213768. eCollection 2019.	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
---------------------------	-----------------------	----