

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20620

研究課題名（和文）豚灌流心の光学マッピングによる筋ジストロフィー心筋症初期病態の機能・形態学的解明

研究課題名（英文）Functional and morphological elucidation of the early pathophysiology of muscular dystrophy cardiomyopathy by optical mapping of pig perfused hearts

研究代表者

志賀 崇徳（Shiga, Takanori）

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：20963482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ベッカー型筋ジストロフィー(BMD)豚心筋症モデルの摘出心臓を用いたex vivo解析により、ジストロフィン欠損による心筋症の初期病態を機能と形態の両輪で解明することを目的とした。この豚モデルの保因雌豚を3回交配させ、生体でのイソフルラン吸入麻酔下での心電図検査を実施した。また、心臓を摘出し、ランゲンドルフ法による灌流心を作成、心電図記録、不整脈誘起、光学マッピング解析を実施した。その結果、生体および摘出灌流心の両方においてイソフルラン麻酔による不整脈発生を再現でき、BMD豚心筋症モデルの有用性を確認した。さらに、BMD豚心筋症の不整脈時の心筋の異常興奮伝播(機能異常)が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトBMD患者では骨格筋機能や呼吸機能が保たれた状態でも、重症心筋症を発症することから、約半数の死因は心筋症である。また、無症状のBMD患者が激しい運動や麻酔処置を契機に不整脈を発症し、突然死する事例も報告されているが、現在の医療では心筋症初期段階での突然死を予防できない。本研究では、豚のBMD心筋症の初期病態における不整脈時の心筋異常興奮伝播(機能異常)を明らかにした。今後は灌流後の心臓の組織病変を形態学的に精査する。不整脈の病理発生機序を解明することができれば、ヒトBMD心筋症の治療研究の重要な起点となり、不整脈の病理診断においてもブレイクスルーとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the early pathogenesis of cardiomyopathy caused by dystrophin deficiency in both function and morphology by ex vivo analysis using excised hearts from a Becker muscular dystrophy (BMD) porcine cardiomyopathy model. The retained sows of this porcine model were mated three times and electrocardiography was performed in vivo under isoflurane inhalation anesthesia. In addition, hearts were excised and perfused hearts were created using the Langendorff method, ECG recordings, arrhythmia induction, and optical mapping analysis were performed. We were able to reproduce the arrhythmogenesis induced by isoflurane anesthesia in both the live and excised perfused hearts, confirming the usefulness of the BMD porcine cardiomyopathy model. Furthermore, abnormal excitation propagation (functional abnormalities) of the myocardium during arrhythmias in BMD porcine cardiomyopathy was revealed.

研究分野：獣医病理学

キーワード：筋ジストロフィー 心筋症 豚モデル ランゲンドルフ灌流心 光学マッピング解析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの筋ジストロフィーは難病に指定される遺伝性筋疾患である。その代表的病型のひとつで、骨格筋病変が軽症のベッカー型筋ジストロフィー (BMD) では、約半数の死因は心筋症である。しかし、軽症の BMD 患者の心臓病理解剖では、不整脈の原因となる形態的变化はほとんど認められず、ジストロフィン欠損による心筋症の初期病態は不明な点が多い。申請者が確立した BMD 豚心筋症モデル (特願 2021-56429) は、心臓に顕著な形態的变化を認めない生後 3 か月齢において、イソフルラン吸入麻酔負荷によりはじめて不整脈を示す。すなわち、BMD 心筋症の初期病態が再現される特色ある動物モデルである。この豚モデルの心臓においてもヒトと同様に形態的变化はほとんど認められないため、病態解明の鍵は機能評価にあると考えられたが、従来の心電図を中心とした機能評価では心筋症の初期病態の本質に迫ることはできず、不整脈時の心臓の異常興奮伝播やカルシウムイオン動態を直接解明する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この豚モデルの心臓を摘出して生体外で拍動させる *ex vivo* 実験系を確立して、異常興奮伝播やカルシウムイオン動態を高速度カメラで光学的に計測し、BMD 心筋症の初期病態を機能と形態の両輪で解明することである。

## 3. 研究の方法

昨年度から本年度にかけて、この豚モデルの保因雌豚を 3 回交配させ、5 頭 (97,98 日齢、53.8~73.0kg) を選抜し、生体でのイソフルラン吸入麻酔下での心電図検査を実施した。生体における不整脈誘起は、アドレナリン (1mg/20ml) を投与することで行った。また、5 頭ずつ選抜 (32~39 日齢、6.5~15.2kg) 心臓を摘出し、ランゲンドルフ法による灌流心を作成、心電図記録、不整脈誘起、光学マッピング解析を実施した (図 1)。灌流心における不整脈誘起は、5mM のイソフルランを脂肪

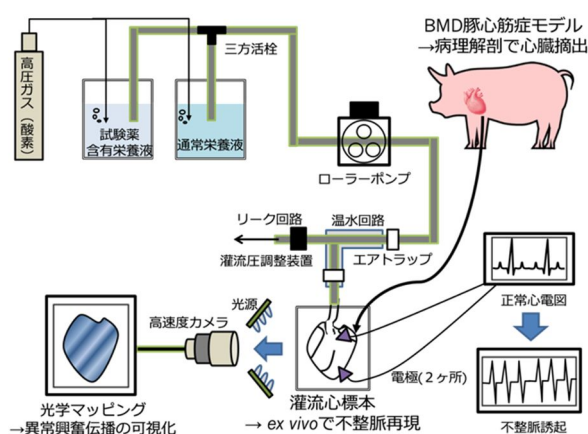


図1：研究方法

乳剤により溶解させた灌流液で 5 分間灌流後、アドレナリン (0.5mg/10ml) を灌流液に注入することで行った。灌流心の光学マッピングは、イメージングシステムに MiCAM03-N256 (ブレインビジョン株式会社) を使用し、心臓を膜電位感受性色素 (RH237) で染色した。

#### 4．研究成果

保因豚生体においては、イソフルラン吸入麻酔下で、アドレナリン (1mg/20ml) を投与することにより、チアノーゼ (図2) および QRS 群の捻れを伴う多形性心室頻拍を示した (図3)。灌流心においては、全ての子豚でイソフルラン灌流のみでは不整脈が誘発されなかったが、非保因の子豚では、アドレナリン注入後に頻拍を示し、稀に期外収縮が認められたのに対し、保因の子豚では、アドレナリン注入後に多形性心室頻拍を示し、心室細動に至った (図4 上段)。さらに、多形性心室頻拍あるいは心室細動に至った保因子豚の灌流心において、灌流液に膜電位感受性色素 (RH237) を添加し、心臓表面の蛍光シグナルの変化を高速度カメラで計測した。その結果、多形性心室頻拍時には右心室の一部で興奮伝播が伝わらない箇所が観察され、心室細動に移行した際には、心室では正常な興奮伝播はほとんど認められず、リエントリーが起きていた (図4 下段)。



図2：保因豚のチアノーゼ

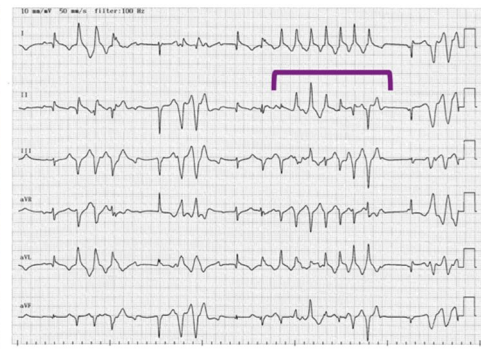


図3：保因豚の心電図

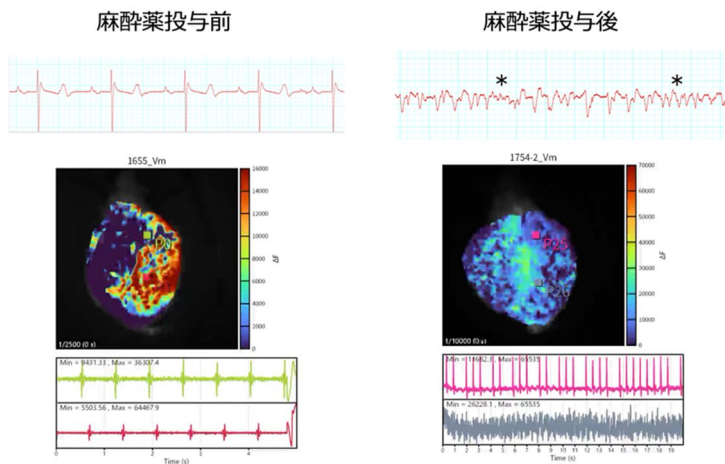


図4：保因子豚灌流心の心電図および光学マッピング解析

以上の結果から、生体および摘出灌流心の両方において、イソフルラン麻酔による不整脈発生を再現でき、BMD 豚心筋症モデルの有用性を確認した。さらに、BMD 豚心筋症の不整脈時の心筋の異常興奮伝播 (機能異常) が明らかになった。今後は、灌流後の心臓の組織病変を形態学的に精査することで、不整脈の病理発生機序を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiga Takanori, Kamiya Yumiko, Ohkubo Mitsuharu, Miyamoto Takashi, Kakinuma Yoko, Kayanuma Hideki, Aoki Takuma, Fujii Yoko, Aihara Naoyuki, Kamiie Junichi	4. 巻 206
2. 論文標題 Cor triatriatum sinister with dextrocardia in association with ostium secundum atrial septal defect, subpulmonary ventricular septal defect and bicuspid pulmonary valve in a pig	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcpa.2023.08.001	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志賀崇徳、相原尚之、神谷有美子、栃内亮太、上家潤一
2. 発表標題 ベッカー型筋ジストロフィー心筋症豚モデルとその摘出灌流心を用いたex vivo評価系
3. 学会等名 第8回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志賀崇徳、神谷有美子、相原尚之、栃内亮太、野口倫子、上家潤一
2. 発表標題 心不全により摘発された豚のベッカー型筋ジストロフィーおよび豚灌流心を用いた不整脈のex vivo評価系
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ブタ心臓組織標本	発明者 志賀崇徳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023- 11500	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------