

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16523

研究課題名(和文) 家族性拡張型心筋症モデルにおける運動療法の確立

研究課題名(英文) The construction of exercise therapy on DCM model mice

研究代表者

杉原 匡美 (Sugihara, Masami)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80648163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症(DCM)は、慢性心不全(CHF)の原因疾患の一つであり、左心室の拡大と収縮能低下を特徴とする心筋症である。運動療法はCHFでの治療のひとつだが、DCMではCHFの重症化や致死性不整脈が多く、運動療法の効果が明らかでない。ヒト家族性DCMに似た特徴をもつモデルマウス(以下DCMマウス)を用い、若年より頻回(毎日～2日毎)の自発的運動を行ったところ、明らかな寿命延長効果が認められた。更に毎日自発運動を行った群と2日毎に行った群では、より頻繁な自発運動において心機能保護効果があり、イオンチャネルのリモデリングの進行も抑制される傾向があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、循環器内科医としての診療の中でDCMでも適切な運動の効果が推測された症例を経験している。しかし、易不整脈性のため運動プロトコルが決めにくい、進行してから受診する例が多く運動療法を試みる機会を逸しやすい、環境や遺伝的要因、薬物介入によるバラつきが大きい、という点でヒトでの評価が難しい状況が続いている。

本研究では、遺伝的背景の均一なモデル動物を解析できるので効果を定量的に検討できる。また、近年発達している遺伝子診断と合わせ、病態進行に合わせた運動療法のプロトコルの確立に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of major causes of heart failure (HF). Today, exercise is regarded as one of therapies for HF. However, the effects of exercise on patients with DCM have not been established. A knock-in mouse model of human inherited DCM is useful for investigating inherited DCM. Homozygous mice were divided into 3 groups based on the frequency of voluntary exercise: no exercise control, every 2 days (2D) and daily exercise (ED). The 2D and ED groups started running at 1 month of age. At the 2 months of age, mice were sacrificed after an investigation with echocardiography and ECG. Gene expressions of HF- and arrhythmia-related genes in myocardium were quantified by qPCR analysis. Both of 2D and ED groups showed prolonged life span. The cardiac function was significantly improved in ED group. ED group showed attenuated electrical remodeling in the hearts. These results indicate that daily voluntary exercise prevents progression of HF in DCM mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：運動療法 拡張型心筋症 心不全 心室性不整脈

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(DCM)は慢性心不全(CHF)の主要な原因の一つであり、左心室の拡大と収縮能低下を特徴とした心筋症で、約50%は遺伝子変異を伴う家族性である。家族性拡張型心筋症では30~40%が心室性の致死性不整脈により突然死するとの報告があり、その機序はいまだ不明な点が残されている。近年、運動療法はうっ血の改善、心血管系の改善、副交感神経系の活性化などを介してCHFに効果があることが多くの臨床研究で立証されているが、家族性DCMでは心不全の重症化や致死性不整脈による突然死の恐れがあるため、ヒトにおける効果については検討が困難であった。ヒト家族性拡張型心筋症(心筋トロポニンTの1アミノ酸欠損: K210)に基づいた拡張型心筋症モデルマウス(以下DCMマウス)が作出され、若年より左心室の拡大、収縮能低下を示し、致死性不整脈あるいは心不全により生後約70日を半減期として死亡することから、ヒトのDCMの病態を良く再現すると考えられた。研究代表者は大学院においてこのモデルマウスを用いた研究に携わり、心筋のイオンチャネルリモデリング(電位依存性KチャネルやKAchチャネルの減少、T型Ca<sup>2+</sup>チャネルの増加)が心筋細胞膜の易興奮性を惹起して心室性不整脈を引き起こすこと、アンギオテンシン受容体阻害薬(ARB)の投与が個々の心筋細胞の肥大化および心筋組織の線維化、イオンチャネルリモデリングを抑制してDCMマウスの寿命を著しく延長すること等を明らかにしてきた。また、ホイールを用いた自発運動測定は、心不全症状の指標である耐運動能を非侵襲的にモニターする有効な手段であることを見出した。

### 2. 研究の目的

DCMマウスを用いた一連の研究において、幼若時より頻繁に自発運動をさせたDCMマウスは致死性不整脈をほとんど起こさず寿命が延長するという驚くべき結果を得た。一方、低頻度(10日毎)の運動では有効性は見られなかった。これらの結果から、DCMにおいても適切な運動を行うことが、症状の改善や心不全進行の抑制に有効なのではないかと考えた。本研究では、DCMマウスを用い、より有効な運動条件の確立を目指し、異なる様式や頻度の運動が心機能に与える影響を評価した。さらに、細胞、分子レベルの検討により分子メカニズムに迫ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) DCMマウスにおける、より有効な運動プロトコルの確立を目指し、運動を行わないコントロール群、ホイールを2日間設置した後2日間設置しない条件で自発運動を行った群(2日群)とホイールを設置し続けて自発運動を行った群(毎日群)さらにトレッドミルによる強制運動を行った群(TM群)を設けて観察した。TM群では、トレッドミルに5度の傾斜をつけ、1~2日毎に週4回走行させた。速度10m/minで15分間の走行から開始し、段階的に速度を増加させ、最終的に速度20m/minで60分間の走行とした。いずれの群もDCMマウスホモ接合体の雄性を用い、約1ヵ月齢より運動を開始し、2ヵ月齢にて計測およびサンプリングを行った。

(2) 個体は自家繁殖で得たが、雌性のDCMマウスは妊娠、出産で死亡するリスクが高いため、ヘテロ接合体同士で繁殖を行った。

(3) 1ヶ月間の自発運動または強制運動の後、それぞれの群で2ヵ月齢において心臓超音波検査および心電図を測定し、生体における心機能評価を行った。自発運動群では1ヶ月間の走行距離の推移を記録した。心電図に関しては、明らかに脚ブロックを呈するものを除外して検討した。

(4) サンプリングの際に、体重、心重量、肺重量を測定し、心不全および肺うっ血の進行を評価した。同時に下肢筋であるヒラメ筋、足底筋、腓腹筋の重量も測定した。さらに、下肢筋群では、電気泳動を用いてミオシン重鎖からの筋線維組成を分離し、どのような運動を行っていたかを探る手がかりとした。

(5) 左室心筋よりRNAを抽出し、それを用いて心臓に発現するチャンネル蛋白や心不全に関わる蛋白について、qPCRを用い遺伝子発現を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 自発運動における比較

DCMはCHFを呈する進行性の心筋症であり、病態が進行する過程において、交感神経系、レニン-アンギオテンシン系、サイトカインなどが活性化し収縮力の低下を代償しようとする(代償期)が、やがて心拍出量が低下した非代償期に移行し、肺うっ血などの心不全症状が現れる。DCMマウスにおいて、ケージにホイール(直径12cm)を設置しておくだけでホイールの中を走行するため、自発運動とみなせること、2ヵ月齢では1日あたり野生型と同等の走行距離を示し、走行距離の減少が心不全の進行を反映していることを既に報告している。今回、毎日群と2日群において、2ヵ月齢における1日当りの走行距離は、2日群が6.46±0.9 km/day、毎日群が5.58±1.06 km/dayであり、有意差は認められなかった。また、サンプリング直前の走行距離も、2日群が5.13±2.25 km/day、毎日群が



図1 ホイールによる自発運動

の走行距離は、2日群が6.46±0.9 km/day、毎日群が5.58±1.06 km/dayであり、有意差は認められなかった。また、サンプリング直前の走行距離も、2日群が5.13±2.25 km/day、毎日群が

5.52 ± 1.40 km/day とほぼ同等であった。

先行研究で DCM マウスでは野生型に比べ 1 ヶ月齢で既に心重量/体重比が増加しているが、肺重量/体重比は 2 ヶ月齢でも野生型と有意差がなく、2 ヶ月齢では心拡大はあるものの代償期にあると考えられた。コントロール群、2 日群、毎日群の心重量/体重比はいずれも野生型のそれより有意に増加していたが、3 群間では有意差は認められなかった。肺重量/体重比は 3 群とも野生型と有意差がなかった。これらの結果より、1 ヶ月間の自発運動で心不全の進行はみられず、3 群ともに代償期であると考えられ、走行距離の結果にも合致することが確認された。下肢筋では、2 日群と毎日群ともに遅筋であるヒラメ筋/体重比がコントロール群に比べ有意に増加していたが、速筋である足底筋/体重比と、遅筋、速筋の両方で構成されている腓腹筋/体重比は 3 群間で相違はみられなかった。さらに毎日群のミオシン重鎖からみた筋線維組成では、ヒラメ筋で Type 型が増加、Type a 型が低下し、足底筋では Type a 型が増加、Type b 型が低下しており、総じて遅筋の割合が増加し、速筋の割合が減少している傾向であることがわかった。一般に、走行するときは下肢への負荷が少ない状態では遅筋から収縮し、速度などの負荷が大きくなると速筋の動員が進むことから、自発運動では、長距離走のトレーニングのように、負荷の少ない運動を繰り返していたと考えられた。

ヒトにおいて、心電図上での QRS 幅と補正 QT 時間の延長は、それぞれ突然死のリスク因子とされている。DCM マウスの 2 ヶ月齢における 3 群の心電図を比較すると、QRS 幅がコントロール群で 17.78 ± 4.78msec、2 日群で 16.62 ± 2.47msec、毎日群で 16.13 ± 2.41msec と、両運動群で若干短縮がみられたが、有意差はなかった。補正 QT 時間は、コントロール群で 183.78 ± 9.51msec、2 日群で 177.5msec ± 8.4msec、毎日群で 168.9msec ± 10.3msec であり、コントロール群と毎日群のみ有意差が認められた。心臓超音波検査では、左室中隔壁厚はコントロール群と両運動群でほぼ同じであった。左室拡張期径は、3 群間で有意差は認められなかったが、2 日群と毎日群では毎日群で有意に左室拡張が抑制されていた ( $p=0.04$ )。駆出率は、自発運動

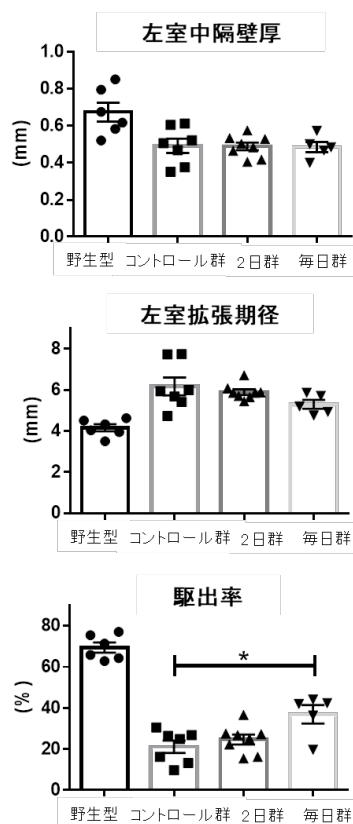


図 2 心臓超音波検査の結果

による改善傾向がみられ、コントロール群とは毎日群のみ有意差が認められた (図 2)。

先行研究において、DCM マウスでは Kv4.2、Kv1.5、KChIP2 等のカリウムチャネルの遺伝子発現が左室心筋で低下しており、この電気的リモデリングが心室性不整脈や突然死を起こしやすい原因となっていることを報告している。2 日群と毎日群ではコントロール群に比べて Kv4.2、KChIP2 の発現低下に抑制傾向がみられたが、毎日群のみに有意差が認められた。また、心筋のミオシン重鎖には 型と 型があり、マウスでは心不全が進行すると 型が 型に置換されていくと言われている。コントロール群では野生型に比べ明らかに ミオシン重鎖の遺伝子発現が増加しているが、2 日群および毎日群ではコントロール群より発現が低下傾向にあり、毎日群のみ有意差が認められた。

以上より、自発運動により DCM マウスにおける病態と心不全の進行が抑制される効果があり、下肢の遅筋の増加との関連が考えられること、より頻度が高い方が有効であることが明らかになった。また、自発運動による寿命延長の機序としては、左室収縮力の低下が抑制されることと、心室の易不整脈性が抑制されることの両方が寄与していることが示唆された。

## (2) 強制運動と自発運動の比較

上記のトレッドミルを用いたプロトコルで DCM マウスに強制運動を行わせ、全ての個体が完走した。傾斜をつけていることや、自発運動群で加速度を測定できなかったため、比較は困難であるが、1 ヶ月間の総運動距離は、TM 群で約 16.95 km、2 日群で 111.55 ± 16.24 km (n=7)、毎日群で 200.11 ± 75.40 km (n=7) であった。

2 ヶ月齢におけるサンプリングで、心重量/体重比と肺重量/体重比はいずれもコントロール群と TM 群で有意差を認めなかった。下肢筋では、ヒラメ筋/体重比、足底筋/体重比、腓腹筋/体重比ともにコントロール群と差がなかった。ヒラメ筋および足底筋の筋線維組成では有意差が認められなかったが、ミオシン重鎖 Type 型と Type b 型の割合が軽度減少し、Type a 型の割合が軽度増加



図 3 トレッドミルによる強制運動

している印象であった。

心電図のQRS時間はコントロール群とTM群で有意差はなく、補正QT時間もTM群で軽度短縮していたが有意差は認められなかった。心臓超音波検査ではTM群で左室中隔壁厚  $0.65 \pm 0.1\text{mm}$  (n=5)と軽度肥厚していた。左室拡張期径は  $5.51 \pm 0.66\text{mm}$  (n=6)とコントロール群に比べやや縮小傾向、駆出率は  $30.9 \pm 5.2\%$  (n=6)と軽度改善傾向であった。一方、左室心筋の遺伝子発現では、TM群のKv4.2、KChIP2の発現はコントロール群とほぼ同様であった。ミオシン重鎖は2日群とほぼ同等の発現変化がみられた。

以上より、強制運動でも左室の拡張および収縮能低下に対する効果が軽度認められたが、左室壁厚が増加しており、自発運動とは心機能改善効果の機序が異なることが考えられた。また、左室の電氣的リモデリングに関しては、強制運動では抑制効果が得られにくいことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Apolipoproteins C-II and C-III as nutritional markers unaffected by inflammation. Isshiki M, Hirayama S, Ueno T, Ito M, Furuta A, Yano K, Yamatani K, Sugihara M, Idei M, Miida T. Clin Chim Acta. 2018 Jun; 481:225-230. doi: 10.1016/j.cca.2018.03.004.

Therapeutic potential of ghrelin and des-acyl ghrelin against chemotherapy-induced cardiotoxicity. Nonaka M, Kurebayashi N, Murayama T, Sugihara M, Terawaki K, Shiraishi S, Miyano K, Hosoda H, Kishida S, Kangawa K, Sakurai T, Uezono Y. Endocrine Journal 64(Suppl.):S35-S39, doi: 10.1507/endocrj.64.S35.

Current smokers with hyperlipidemia lack elevated pre 1-high-density lipoprotein concentrations. Nagao Y, Hirayama S, Kon M, Sasamoto K, Sugihara M, Hirayama A, Isshiki M, Seino U, Miyazaki O, Miida T. J Clin Lipidol. 2017 Jan - Feb; 11(1):242-249. doi: 10.1016/j.jacl.2016.12.012.

The bromocresol green assay, but not the modified bromocresol purple assay, overestimates the serum albumin concentration in nephrotic syndrome through reaction with 2-macroglobulin. Ueno T, Hirayama S, Sugihara M, Miida T. Ann Clin Biochem. 2016 Jan; 53(Pt 1):97-105. doi: 10.1177/0004563215574350.

〔学会発表〕(計12件)

The Comparison of Voluntary and Forced Exercises on Cardiac Function of DCM Model Mice. Sugihara M, Kakigi R, Murayama T, Sakurai T, Miida T, Morimoto S, Kurebayashi N 61th Biophysical Society Annual Meeting, New Orleans, U.S.A. (2/11-2/15), 2017

拡張型心筋症モデルマウスにおける自発運動の頻度と心不全進行との関係. 杉原 匡美, 柿木 亮, 村山 尚, 平山 哲, 森本 幸生, 呉林 なごみ, 三井田 孝 第65回日本臨床検査医学学術集会、東京、2018年11月

Daily voluntary exercise suppresses progression of heart failure in DCM model mice (毎日の自発運動は拡張型心筋症モデルマウスにおける心不全進行を抑制する) Masami Sugihara, Ryo Kakigi, Takashi Murayama, Takashi Sakurai, Takashi Miida, Sachio Morimoto, Nagomi Kurebayashi 第90回日本薬理学会年会、大阪、2019年3月

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：柿木 亮

ローマ字氏名：KAKIGI, ryo

研究協力者氏名：村山 尚

ローマ字氏名：MURAYAMA, takashi

研究協力者氏名：呉林 なごみ

ローマ字氏名：KUREBAYASHI, nagomi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。