

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16026

研究課題名(和文) 拡張型心筋症におけるオートファジーの検出と臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Evaluation of autophagy for patients with dilated cardiomyopathy

研究代表者

齋藤 恒徳 (Saito, Tsunenori)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00716631

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)の不全心筋におけるオートファジーを臨床像および分子遺伝学的情報と比較した。心筋の線維化を反映する所見であるMRIガドリニウム遅延造影よりもオートファジーの方がより明敏な予後予測指標であり、DCMではまず細胞が障害され、線維化はそれに続発する現象であると考えられた。また全エクソーム解析の結果、電子顕微鏡による観察でオートファジーを認めない症例にオートファジー関連遺伝子の変異を認めた。遺伝子レベルでのオートファジー不全はDCMの原因となりうることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症(DCM)の不全心筋におけるオートファジーを臨床像および分子遺伝学的情報と比較した。心筋の線維化を反映する所見であるMRIガドリニウム遅延造影よりもオートファジーの方がより明敏な予後予測指標であり、DCMではまず細胞が障害され、線維化はそれに続発する現象であると考えられた。また全エクソーム解析の結果、電子顕微鏡による観察でオートファジーを認めない症例にオートファジー関連遺伝子の変異を認めた。遺伝子レベルでのオートファジー不全はDCMの原因となりうることが実証された。本研究はオートファジーを標的とした心不全の新規治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：We compared autophagy in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy (DCM) with clinical features and genetic information. Autophagy was a more sensitive prognostic predictor than late gadolinium enhancement in cardiac magnetic resonance, which is a finding reflects myocardial fibrosis. In addition, as a result of whole exome analysis, variants in autophagy-related genes were found in cases without autophagy detected by electron microscopy. It has been demonstrated that autophagy deficiency at the genetic level can cause DCM.

研究分野：循環器内科

キーワード：拡張型心筋症 オートファジー 電子顕微鏡 ゲノミクス 全エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

日本における心移植の最も頻度の高い基礎疾患は拡張型心筋症 (DCM) であるが、その心筋障害の機序は解明されておらず、疾患特異的な治療法は確立されていない。DCM の心筋障害の研究が心不全の病態解明および治療法の開発に寄与することが強く予測できる。

電子顕微鏡 (電顕) は超微形態を視覚情報化できる唯一の手段である。申請者らは電顕を用いて DCM の心筋の超微形態が予後予測に有用であると明らかにしてきた (Saito T, et al. Int J Cardiol. 2013;168:144-50, Saito T, et al. Eur Heart J. 2015;36:724-33)。心筋細胞における筋原線維の変性・消失が認められる患者は有意に予後が悪く、またそれらは心機能改善を阻害する因子であった。

オートファジーは細胞の自己成分を細胞内消化器官であるリソソームに運び込み分解する作用である。近年の基礎的な研究から、オートファジーは心筋保護的に働くことが明らかになりつつあるが、様々な制約のため、臨床検体におけるオートファジーの評価は困難である。特に保存検体では組織の固定や包埋過程において、化学的、物理的修飾により組織が損傷し、オートファジーの検出が困難となる。また免疫染色のみで電顕を用いない判定を行うとオートファジーを正確に同定できず誤読する可能性が高い。このためオートファジーに関する臨床研究はあまり進んでいない。申請者らは抗原賦活法とアビジン-ビオチン複合法 (ABC 法) とを併用することにより、DCM 患者の心内膜心筋生検で得られた心筋細胞のオートファジーを電顕で識別することを可能にした (Saito T, et al. Int J Cardiol. 2013;168:4843-4)。この方法を用い、筋原線維の変性・消失が認められる DCM 症例でも、オートファジーが存在する症例は心不全の予後が良好となると明らかにした (Saito T, et al. Autophagy. 2016;12:579-87)。このことは、オートファジー関連遺伝子など、心筋細胞障害に関連する遺伝子変異が DCM の発症に関与していることを示唆する所見である。

これらのヒトの不全心筋におけるオートファジーを予後・画像所見を含めた臨床像や分子遺伝学的情報と比較することにより、DCM 患者の心筋におけるオートファジーのまだ解明されていない臨床応用可能な特徴や、心不全の重症度を予測し悪化を予防する方法を見出すことができると考えられる。

2. 研究の目的

ヒトの不全心筋におけるオートファジーを予後・画像所見を含めた臨床像や分子遺伝学的情報と比較することにより、(1) DCM による心不全の重症度の予測などの臨床応用を可能とすること、および(2) オートファジー関連遺伝子の変異が DCM の原因となりうることを明らかにすることを目的とした。特に(2)は、DCM が単なる心筋の変性疾患ではなく、様々な心筋細胞障害を起こす因子が関与する不均一な症候群として DCM を理解し、これまで開発が困難であった DCM に対する疾患特異的な治療法を確立することにつながると考えられる。

3. 研究の方法

心不全におけるオートファジーの意義を解明し臨床応用へとつなげるために、以下の 2 つの研究を並行して行った。

(1) DCM 患者におけるオートファジーの臨床像および病理像の解明

DCM 患者の心筋生検で得られた組織におけるオートファジーと、DCM 患者の臨床的背景、予後や検査・画像診断結果・その他の組織病理像を含めた様々な所見とを比較した。特に、心筋の線維化を反映する所見である MRI ガドリニウム遅延造影 (LGE) との比較を行った。

(2) DCM 患者におけるオートファジー関連遺伝子および心筋症関連遺伝子の探索

心筋生検を行い、また DNA を抽出できた DCM 患者 32 例の全エクソーム解析を行い、オートファジー関連遺伝子および心筋症関連遺伝子変異と組織変化および臨床像とを照合した。

4. 研究成果

(1) DCM 患者におけるオートファジーの臨床像および病理像の解明

これまでに、初発の心不全時に心筋生検された DCM 症例において、心筋細胞にオートファジーが認められない症例は有意に予後が不良で、多変量解析では家族歴・貧血・筋原線維の変性および消失に加えオートファジー空胞を認めないことが心不全死および心不全再発の危険因子であった。そこでこれらのうち 55 例は造影 MRI による遅延造影を評価していたため解析を進めたところ、遅延造影を認めない症例では上記と同様の結果であり、一方で遅延造影を認める症例ではこの限りではなく、むしろ心筋中層の LGE が予後不良を予測する因子であった。このことから、拡張型心筋症ではまず細胞が障害され、線維化はそれに続発する現象であることが示唆された (Saito T, et al. ESC Heart Failure. 2020;7:682-91)。

(2) DCM 患者におけるオートファジー関連遺伝子および心筋症関連遺伝子の探索

家族歴のない DCM 32 例の全エクソーム解析を行い、オートファジー関連 29 遺伝子およびオートファジー関連蛋白をコードする 15 遺伝子に着目した結果、*ATG2B* (c.1939C>T) および *PSEN2* (c.1262C>T) の変異が DCM の原因である可能性が示唆された。

ATG2B はオートファゴソーム形成に関与する蛋白をコードする遺伝子である。申請者らの症例は電顕による観察で心筋細胞にオートファジー空胞を認めず、オートファジーで処理され消失するはずの異常ミトコンドリアが多数残存していた。

PSEN2 は後期エンドソーム・リソソームにおけるプロテアーゼである γ -セクレターゼを構成するプレセニリン 2 をコードする遺伝子である。この異常により細胞内老廃物の分解が行えず、アルツハイマー病だけでなく心機能障害の原因にもなることが報告されている (Gianni D, et al. *Circulation*. 2010;121:1216-26)。申請者らの症例に認められた *PSEN2* 遺伝子変異 (c.1262C>T) は心機能障害には言及されていない (Yagi R, et al. *Neurobiol Aging*. 2014;35:1780.e1-5)。電顕により本症例では拡張した T 管内に細線維状の物質を認めた。

上記の両遺伝子は American College of Medical Genetics and Genomics のガイドラインにより variants of unknown significant と分類された。同ガイドラインでは、家族歴のない患者には既報などのエビデンスがないと病原性の診断を下すのは難しい。オートファジー関連遺伝子が心筋細胞障害および DCM の原因となるかについては、臨床検体を使用した研究も含めヒトでは検討されていない。このため、両遺伝子変異の病原性の有無を診断するためには遺伝子の機能解析が必須であり、今後の研究課題である。

(3) オートファジー不全に関連する心不全

以上の研究を行いつつ DCM の臨床に携わったことが、研究と臨床の両面に新たな視点を加えることになった。細胞内小器官の障害が心筋細胞にダメージを与え、心筋症および心筋炎を惹起することを、特殊な症例の経験を通じて報告した。

1) ムコ多糖症 IS 型におけるライソソーム障害

ムコ多糖症 I 型のうち軽度の表現型を示す IS 型でも心筋細胞および間葉系細胞のライソソーム障害を認めた。本症例は弁置換術の適応となった (Izumi Y, Saito T, et al. *Eur Heart J*. 2018;39:1863)。

2) 抗ミトコンドリア M2 抗体陽性筋炎に関連する好酸球性心筋炎におけるミトコンドリア障害と心筋炎の治療法についての考察

好酸球性心筋炎で加療中に多発筋炎様の症状および MRI 所見を呈し、抗ミトコンドリア M2 抗体陽性筋炎と診断した。骨格筋 (大腿二頭筋腹側) および以前に採取した心筋組織を免疫組織化学で分析した結果、抗ミトコンドリア M2 抗体の抗原であるミトコンドリアコハク酸脱水素酵素のサブユニット E2 (PDC-E2) が細胞質で陽性となり、ミトコンドリア障害が心筋炎 (好酸球性心筋炎) や筋炎の原因となることが証明された (Saito T, et al. *Eur Heart J*. 2018;39:3480-1)。また、この症例と抗ミトコンドリア M2 抗体が陰性であった好酸球性心筋炎における、浸潤炎症細胞の種類および治療法を比較検討した結果、ともに好酸球以外にも通常の各種 T リンパ球やマクロファージの強い浸潤を認め、副腎皮質ステロイドによる免疫抑制療法が著効していた。このことから、急性心筋炎には原因の如何に関わらず、早期の免疫抑制療法が効果的である可能性が示唆された (Saito T, et al. *Eur Heart J*. 2018;40:1014-5)。

3) Ic 群抗不整脈薬フレカイニドに起因するライソソーム障害およびホスホリピドーシス

Ic 群抗不整脈薬であるフレカイニドはカチオン性両親媒性薬物であり、ライソソーム膜のリン脂質に結合して細胞内消化される。フレカイニド中毒により心筋細胞に顕著なホスホリピドーシスが惹起され、心機能障害および致死性不整脈が発生した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito T, Hayashi M, Shimizu W.	4. 巻 41
2. 論文標題 Phospholipidosis in cardiomyocytes suffering flecainide intoxication.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur Heart J	6. 最初と最後の頁 1141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/eurheartj/ehz833.	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 Saito T, Asai K, Tachi M, Sato S, Mozawa K, Adachi A, Sasaki Y, Amano Y, Mizuno K, Kumita SI, Shimizu W.	4. 巻 7
2. 論文標題 Long-term prognostic value of ultrastructural features in dilated cardiomyopathy: comparison with cardiac magnetic resonance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 682-691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.12662.	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 Saito T, Katayama H, Kodani E.	4. 巻 40
2. 論文標題 Is steroid therapy really banned for lymphocytic myocarditis before excluding viral infection?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur Heart J	6. 最初と最後の頁 1014-1015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/eurheartj/ehy738.	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 Saito Tsunenori, Kodani Eitaro, Katayama Hironori, Kusama Yoshiki	4. 巻 39
2. 論文標題 Eosinophilic myocarditis associated with anti-mitochondrial M2 antibodies: a mechanism underlying the onset of myocarditis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 3480-3481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/eurheartj/ehy246	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 Izumi Yuki, Saito Tsunenori, Sato Shigeru, Shimizu Wataru	4. 巻 39
2. 論文標題 Myocardial alterations in a patient with mucopolysaccharidosis type 1S	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/eurheartj/ehy149	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11件(うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 齋藤恒徳、小谷英太郎、片山博徳、清水渉
2. 発表標題 好酸球性心筋炎における炎症細胞の種類と量についての検討
3. 学会等名 第4回日本心筋症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito T, Asai K, Sato-Saito N, Mozawa K, Oka E, Sato S, Kodani E, Wataru Shimizu.
2. 発表標題 Ultrastructural assist for searching causative genes of dilated cardiomyopathy using next generation sequencer.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤恒徳
2. 発表標題 心筋生検の役立て方と電子顕微鏡の活用
3. 学会等名 第27回日本小児心筋疾患学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤恒徳
2. 発表標題 拡張型心筋症の電子顕微鏡所見の臨床的意義とオートファジー発現に関する因子の探索
3. 学会等名 第86回日本医科大学医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsunenori Saito
2. 発表標題 Clinical utility of myocardial autophagy in patients with dilated cardiomyopathy to predict prognosis and recovery of cardiac function.
3. 学会等名 第81回日本循環器学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤恒徳
2. 発表標題 心内膜心筋生検による病理診断の役割と重要性；拡張型心筋症の心内膜心筋生体標本における電子顕微鏡所見の臨床的有用性
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsunenori Saito
2. 発表標題 Comparison between cardiac magnetic resonance and myocardial ultrastructural features in patients with dilated cardiomyopathy to predict recovery of cardiac function.
3. 学会等名 第21回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤恒徳
2. 発表標題 好酸球性心筋炎の治療中に抗ミトコンドリアM2抗体陽性筋炎を発症した一例
3. 学会等名 第39回心筋生検研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsunenori Saito
2. 発表標題 Eosinophilic myocarditis associated with anti-mitochondrial M2 antibodies: a new evidence of the onset of myocarditis
3. 学会等名 The American College of Physicians Internal Medicine Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsunenori Saito
2. 発表標題 Comparison Between Ultrastructural Features and Causative Genes of Dilated Cardiomyopathy Detected by Whole Exome Sequencing.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Mozawa, Tsunenori Saito
2. 発表標題 Dilated cardiomyopathy includes arrhythmogenic cardiomyopathy as a type with severe myocardial degeneration.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----