

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15877

研究課題名(和文) 拡張不全による心不全に対する低出力パルス波超音波治療の有効性を評価する基礎的検討

研究課題名(英文) Basic study to evaluate the effectiveness of low-intensity pulsed ultrasound therapy for heart failure due to diastolic dysfunction.

研究代表者

進藤 智彦 (Shindo, Tomohiko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80781294

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)：LIPUS治療を行ったdb/dbマウスでは、左室拡張機能の低下及び運動耐容能の低下が抑制された。また、心筋の肥大・線維化が抑制され、心筋におけるCa²⁺handling関連蛋白の活性化、およびそれに伴う心筋組織レベルでの弛緩特性の改善が認められた。さらに、Western-blottingによる蛋白発現解析では、内皮型NO合成酵素(eNOS)のリン酸化が有意に増加し、及びその下流分子である可溶性グアニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼG(PKG)の発現の増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HFpEFは今や最も一般的なタイプの心不全となっており、世界中で最も深刻な健康問題の1つとして位置づけられている。HFpEFを対象とした多くの臨床試験が行われてきたが、いまだその予後を改善するための効果的な治療法の確立には至っていない。そのような状況の中、LIPUSが、血管内皮に直接働きかけ、eNOS-NO-cGMP-PKG経路の活性化を介してHFpEFの病態を改善することを動物モデルで実証することができた。HFpEFに対する有効な薬物療法がない中、超音波による物理刺激という従来の薬物療法とは全く異なるアプローチがHFpEFに有効であることが確認されれば、医学的意義は極めて高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the db/db mice treated with LIPUS therapy, the decrease in the left ventricular diastolic function and the decrease in exercise tolerance were suppressed. In addition, hypertrophy and fibrosis of the myocardium were suppressed, activation of Ca²⁺ handling-related proteins in the myocardium, and accompanying improvement in relaxation characteristics at the myocardial tissue level were observed. Furthermore, in protein expression analysis by Western-blotting, phosphorylation of endothelial NO synthase (eNOS) was significantly increased, and the increased expression of soluble guanylate cyclase and protein kinase G (PKG), which are downstream molecules of eNOS, was confirmed.

研究分野：循環器内科学分野

キーワード：心不全 超音波治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 求められる HFpEF 治療法 心不全は先進諸国の主要な死因となっており、その患者数は世界的に増加している。米国においては約 500 万人の心不全患者がおり、毎年 55 万人が新規に心不全を発症している (*Circulation*. 2009;119:e391-e479.)。わが国においても高齢社会の進展とともに心不全患者は増加しており、**2030 年には 150 万人に達すると**予想されている (*Circ J*. 2008;72:489-91.)。

一方、心不全患者の中には、臨床的に心不全の症状・身体所見を有しながらも明らかな**心収縮異常のない症例**が存在することがわかっており、このような心不全は**左室収縮能の保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF)**と呼ばれている。HFpEF は心不全全体の 20~60% を占め、現在、世界的に急増していることが報告されており大きな問題となっている。我が国においても、**HFpEF の患者数および心不全全体における割合は増加傾向であること**が報告されている。これまで、左室収縮能の低下した心不全に対しては、β 遮断薬、ACE 阻害薬等、有効な治療法が開発されてきた。しかし、HFpEF に関しては、数々の大規模臨床試験が実施されてきたにも関わらず、**予後を改善させる有効な治療法は未だ開発されていない**のが現状である (*N Engl J Med*. 2006;355:251-9.)。今後、高齢化の進展とともに心不全患者、特に HFpEF 患者の割合は益々増加することは避けられず、その有効な治療法の開発が急務となっている。

(2) HFpEF の病態について HFpEF は心筋の肥大・間質の線維化といった形態学的特徴を有することが多く、それに伴う心室スティフネスの上昇、左室拡張末期圧の上昇、左室充満の遅延といった拡張障害が主病態とされる (*J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62:13-21.)。その病因として、高血圧や糖尿病、肥満といった合併症や加齢に伴う全身性の炎症、それに引き続く心臓局所での炎症、血管内皮機能障害が原因と考えられている (*J Am Coll Cardiol*. 2013;62:263-71.)。

(3) 低出力パルス波超音波 (LIPUS) について 近年、低出力パルス波超音波 (low-intensity pulsed ultrasound: LIPUS) という低出力の超音波が医療分野で注目されており、生体に対し血管新生作用、骨・軟骨新生作用、創傷治癒作用などの多様な作用を及ぼすことが報告されている。当教室でも、以前より LIPUS による治療法を開発を進めており、**ブタ慢性心筋虚血モデル (図 2: *PLoS One*. 2014;9:e104863.)、マウス心筋梗塞モデル (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:1220-9.)**において有効性と安全性、その分子機序を報告してきた。これらの知

超音波治療の心機能改善効果

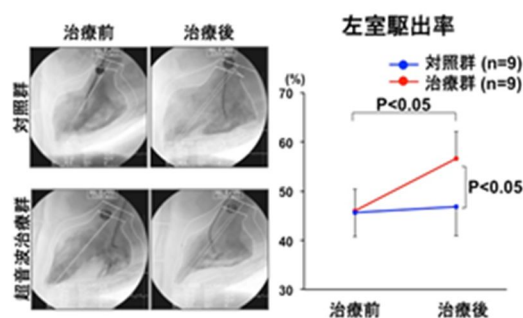


図 1. ブタ慢性心筋虚血モデルを用いた検討

見に基づき、現在、重症狭心症患者を対象に、医師主導治験を全国 10 施設で実施 (研究代表者: 下川) している。さらに、認知症モデルマウスに対する LIPUS 照射は、種々の機序を介して認知機能の低下を有意に抑制した。今後、認知症への臨床応用を目指し、治験の準備を進めている。

(4) LIPUS の HFpEF への応用 我々はこれまで、LIPUS による物理刺激が直接的に血管内皮細胞に働きかけ、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現や活性を誘導することを確認してきた。eNOS とその下流の分子経路 (eNOS-NO-cGMP-PKG 経路) は、種々の心血管系疾患における病態と重要な関連があり、HFpEF においても例外ではない。

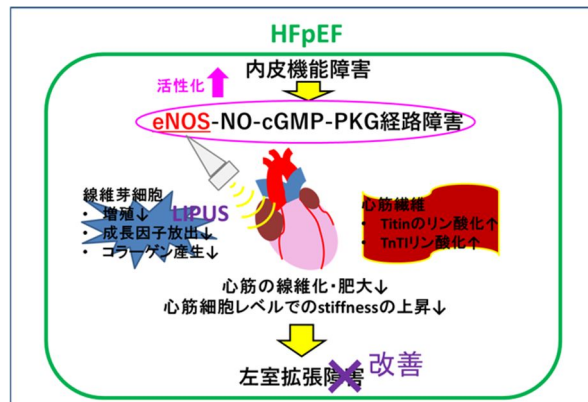


図2 . LIPUS の HFpEF への応用

HFpEF 患者では、血管内皮障害に伴い、eNOS-NO-cGMP-PKG 経路が傷害されている

ことが分かっている (*Circulation*. 2012;126:830-9)。eNOS-NO-cGMP-PKG 経路の障害は、心筋線維芽細胞の増殖、筋線維芽細胞への分化、心筋細胞の肥大を促す増殖因子の放出、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を促し、心筋の線維化や肥大を進行させ (*Circ Res*. 2008;102:185-192.)。さらには、筋原線維の弾力性・伸展性の要因となる構成蛋白 titin やトロポニン I のリン酸化を低下させることで心筋細胞レベルでの stiffness の上昇を招き、左室拡張障害の発症に大きく寄与している (*Circ Res*. 2009;104:87-94.)。今回、我々は、LIPUS が血管内皮細胞に働きかけ、eNOS の発現上昇、活性化およびその下流の分子経路を活性化することで、左室の拡張障害が軽減され、HFpEF の症状と予後を改善させうると考えている。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、低侵襲性治療法である LIPUS を HFpEF に応用し、症状・予後を改善する世界初の治療法を開発することである。基礎的な検討で、LIPUS の HFpEF に対する有効性を示し、最終的には HFpEF を対象とした心臓照射用振動子と発信装置を開発し、知財獲得、治験の実施、ひいては企業導出と薬事承認を目指す。HFpEF に対する有効な薬物療法がない中、極めて低侵襲でもある LIPUS を治療に用いるという視点・コンセプトは我々独自の研究であり、その有効性が示されれば学術的価値は非常に高いと考える。

3 . 研究の方法

本研究においては、動物実験、細胞実験により、LIPUS 照射の HFpEF への有効性・安全性を検証し、最終的には臨床化へ向けて機器開発まで行うことを目指す。

研究期間において、平成 30 年度は HFpEF モデル動物への LIPUS 照射の有効性・安全性を検討するとともに、培養細胞実験にて機序の考察を行い、年度末には研究結果を国際学会で発表することを目標とする。続いて、平成 31 年度には、前年度までの成果を発展させ、遺伝子改変マウスや siRNA を用いた培養実験で LIPUS のより詳細な機序に迫るとともに、最適な LIPUS の照射条件を明らかにするための動物実験も平行して進めていく。また、それまでの成果を論文化する。平成 32 年度には、臨床化に向け治療装置の開発に取り組む。

○平成 30 年度

【HFpEF モデルマウスを用いた検討】 HFpEF モデル動物として広く使用されている db/db マウス(肥満 2 型糖尿病モデルであり、過齢進行性に左室の拡張障害をきたし HFpEF の病態を示す)を用いる。拡張障害の発症後(10-12 週齢)に、LIPUS 照射治療を行う。治療後に心臓カテーテルや心

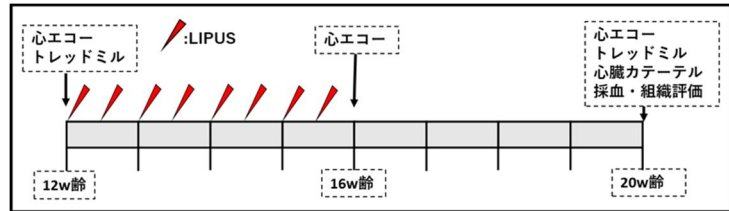


図 3 . 動物実験のプロトコール

エコー、心臓 MRI、ランゲンドルフ灌流心による、心機能および冠微小循環機能の評価、トレッドミルによる運動耐容能の評価を行う。また、採血や心臓組織を用いた種々の組織解析、蛋白発現・mRNA 発現についての解析を行う。さらには、単離心筋細胞の張力測定により心筋細胞レベルでの LIPUS の効果も検討する。分子機構解明の手がかりとして、マイクロアレイ(もしくは RNA シークエンス)やバイオプレックス、メタボロームなどによる細胞内情報伝達系の網羅解析も行い、LIPUS が左室の拡張障害を改善する機序を検討する。

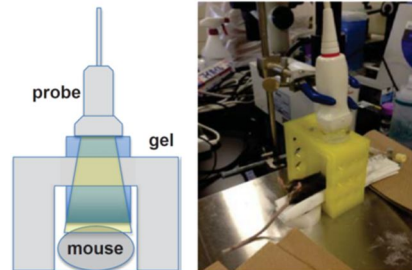


図 4 . マウスへの照射方法

【培養細胞を用いた検討】 左室の拡張障害において、血管内皮細胞、心筋細胞、心筋線維芽細胞といった種々の細胞が様々な形で寄与していることが報告されている。そこで、これらの培養細胞に対し LIPUS 照射を行うことで、遺伝子レベル、蛋白レベルでどのような変化が起こるのかを検討する。

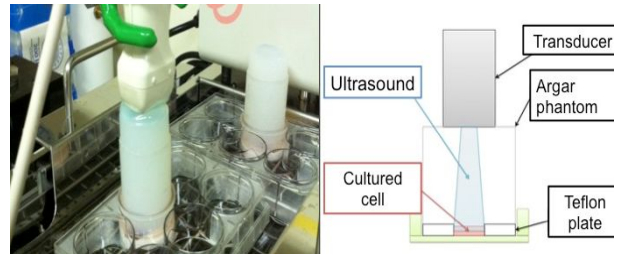


図 5 . 培養細胞への照射方法

○平成 31 年度

【遺伝子改変マウス、siRNA を用いた動物実験での

検討】 前年度まで得られた知見をもとに、遺伝子改変マウスや siRNA を用いた検討を追加し、LIPUS が HFpEF を改善する上でのより詳細なメカニズムの究明を行う。

【より最適な照射条件の探索のための動物実験での検討】 LIPUS を生体に作用させる上で、照射条件(周波数、Duty Cycle、音圧等)の違いはきわめて重要な要素である。種々の照射条件での治療効果を比較検討することで、HFpEF 治療におけるより最適な照射条件を究明する。

○平成 32 年度

【臨床化に向けた LIPUS 治療装置の開発】 HFpEF に対する LIPUS 治療の臨床化に向けて、専用の治療装置の開発を行う。前年度までの検討で得られた最適な照射条件を採用し、かつ、心臓全体に効率的に照射可能な独自の超音波発生装置を想定している。

4 . 研究成果

本研究は、肥満 2 型糖尿病関連の HFpEF モデルマウスとして広く用いられている db/db マウスで検討が行われた。当マウスは、左室収縮能の低下を伴わない経時的な左室拡張能の低下および運動耐容能の低下といった、HFpEF に特徴的な表現型を呈していた。拡張障害の発症後 12 週齢から 16 週齢までの 4 週間、LIPUS 照射を経胸壁的に心臓へ行い、非治療群には LIPUS 照射以外の同様の処置を行った。20 週齢までの心機能や運動耐容能の経時的な変化を追うとともに、分子生物学的、組織学的検討を行った。

LIPUS 治療を行った db/db マウスでは、左室拡張機能の低下及び運動耐容能の低下が抑制された。また、心筋の肥大・線維化が抑制され、心筋における Ca^{2+} handling 関連蛋白の活性化、およびそれに伴う心筋組織レベルでの弛緩特性の改善が認められた。さらに、Western-blotting による蛋白発現解析では、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) のリン酸化が有意に増加し、及びその下流分子である可溶性グアニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼ G (PKG) の発現の増加が確認された。

これらの結果から、本研究者は、LIPUS 治療が HFpEF モデルマウスの左室拡張機能の低下及び運動耐容能の低下を抑制すること、またその機序として、eNOS-NO-cGMP-PKG シグナル伝達経路の活性化及びそれを介した心筋における Ca^{2+} handling の改善が寄与していると結論付けている。

本研究の成果は、下記の学術論文に投稿し accept されている。

Monma Y, Shindo T, Eguchi K, Kurosawa R, Kagaya Y, Ikumi Y, Ichijo S, Nakata T, Miyata S, Matsumoto A, Sato H, Miura M, Kanai H, Shimokawa H. Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates cardiac diastolic dysfunction in mice-A possible novel therapy for HFpEF. *Cardiovasc Res.* 2020;cvaa221. doi: 10.1093/cvr/cvaa221.

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 5.Monma Y, Shindo T, Eguchi K, Kurosawa R, Kagaya Y, Ikumi Y, Ichijo S, Nakata T, Miyata S, Matsumoto A, Sato H, Miura M, Kanai H, Shimokawa H	4. 巻 cvaa221
2. 論文標題 Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates cardiac diastolic dysfunction in mice-A possible novel therapy for HFpEF.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 cvaa221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvaa221.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuto Monma
2. 発表標題 Low-intensity Pulsed Ultrasound Ameliorates Diastolic Cardiac Dysfunction in Mice
3. 学会等名 AHA2019 American Heart Association Scientific Sessions Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門間雄斗
2. 発表標題 Low-intensity Pulsed Ultrasound Ameliorates Diastolic Cardiac Dysfunction in Mice
3. 学会等名 第83回日本循環器学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------