

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791059

研究課題名(和文)筋ジストロフィー患者の予後改善を目的とした新規治療方針の開発

研究課題名(英文) Establishment of a new therapeutic protocol for cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy.

研究代表者

馬場 志郎 (Baba, Shiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60432382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000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(DMD)患者は経過中、高率に心筋症を発症する。現在、在宅呼吸器を含めた医療技術の進歩により呼吸不全による死亡数が激減し、長期生存が可能となった現在において予後に最も影響する原因は心筋症からくる心不全である。我々は、DMD患者の心筋症発症メカニズムを解明のために、iPS細胞を作成、心筋分化を行った。DMD患者iPS由来心筋細胞内のカルシウム濃度が明らかに高く、常にカルシウム過負荷の状態であることが判明した。また、心筋伸展刺激で明らかに細胞内カルシウム濃度上昇率が高く、負荷刺激においても心筋ダメージが起こりやすいことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Duchenne muscular dystrophy (DMD) frequently causes cardiomyopathy. Because of development of home respirator and oxygen treatment, a death rate by respiratory failure has been remarkably reduced and the patients live longer than before. In contrast, the death rate by heart failure is increasing. To reveal mechanisms of developing cardiomyopathy in DMD patients, we generated iPSC from a DMD patient and differentiated cardiomyocytes from the iPSC cells. When we measured intracellular free calcium ion concentration, calcium level was remarkably elevated in the cardiomyocytes derived from DMD-iPSC cardiomyocytes. Moreover, calcium overload was observed much more clearly in cardiomyocytes derived from DMD-iPSCs than in cardiomyocytes derived from control-hiPSCs after compulsory stretching. These findings indicated that calcium overload is one of the mechanisms for cardiomyopathy in DMD patients. Reducing calcium overload will be one of the treatments for DMD cardiomyopathy patients.

研究分野：小児科

科研費の分科・細目：小児循環器

キーワード：デュシェンヌ型筋ジストロフィー 心筋症 iPS細胞 カルシウム代謝

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは筋線維が大小不同、円形化、線維化、脂肪化などのジストロフィー変化を起こす疾患群の総称であり、Duchenne 型や Becker 型で知られる性染色体伴性劣性遺伝型筋ジストロフィー、福山型などで知られる先天性筋ジストロフィー、その他、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーなどが知られている。その中で Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性筋ジストロフィーの大部分を占め、罹患率は男児の生産児 3,300 人に 1 人と比較的高く、最も重症なタイプの一つとして知られている。病因は、ジストロフィン遺伝子異常からくるジストロフィンタンパク形成不全が疾患の原因と判明しているが、未だ根本的治療はなく、多くの患者さんが 10 歳代で車椅子生活となり、無治療であれば 20 歳前後で呼吸不全、心不全で死亡する。この疾患の予後を大きく左右する因子は、これら呼吸不全と心不全であるが、呼吸不全に対して気管切開法や非侵襲的な陽圧換気法などの手技改善により大きく問題が解決されたと言っても過言ではない。(Muscle Nerve 2011;44:8-19)(Lung 2006;184:205-215) 一方、心不全に対しては ブロッカーやアンジオテンシン変換酵素阻害剤 (ACE 阻害剤)、利尿剤などの薬物投与によってある程度予後が改善するようになったが、未だ満足いくレベルではない。(J Heart Lung Transplant 1999;18:269-274)

ここで、DMD で起こる心不全について注目する。DMD 患者の心筋細胞は健康人の心筋細胞と比べてストレスなどに弱く、心筋障害を容易に起こすことが知られている。(Cardiovasc Res 2001;50:509-515) つまり DMD 経過中、血圧やホルモン、サイトカインといった慢性的なストレスによって脆弱な心筋細胞がリモデリングを起こし、肥大型心筋症や拡張型心筋症へ、更には心不全へと発展する。(Muscle Nerve 2011;44:8-19) ところが臨床の場においては、DMD 患者さんへの心不全に対する投薬開始時期は、定期検診などで偶然に肥大型または拡張型心筋症に気づかれたときや心機能低下が認められた時で、この時には既に DMD 患者さんの心筋細胞のダメージがある程度進行していると思われる。ブロッカーや ACE 阻害剤、スピロラクトンに代表される利尿剤の一部は心筋保護作用を有することは周知の事実であるが、もしこれら薬剤を未だ肥大や拡張といった心筋形態異常や心不全徴候が現れていない DMD 患者さんに予防

的に投与することによって心不全の発症を遅らせたり、心不全を予防できる可能性があると考えられる。

2006 年に山中らによってマウス皮膚線維芽細胞から、2007 年にヒト皮膚線維芽細胞から山中因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) を加えることによって線維芽細胞由来人工万能細胞 (iPS 細胞) が作成できることが報告された。(Cell 2006;126:663-675) (Cell 2007;131:861-872) この iPS 細胞を DMD 患者さんから作成し、心筋分化させれば、DMD 患者さんと同じ遺伝子背景を持つ心筋細胞が作成できる。この心筋細胞を用いて、心筋のストレス反応を電気生理学的手法やミトコンドリア機能測定 (酸素消費測定) などの方法で評価できると考えられる。この評価を心筋保護作用がある薬剤投与前後で行なう、更には投薬開始タイミングをコントロールすることで、心筋細胞に対するストレス反応を、どのような薬剤をどのようなタイミングで投与開始すればより有効に抑えることができるか発見可能と考えられる。

2. 研究の目的

DMD は進行性の筋変性疾患であり、20 歳前後から急速に進行する呼吸不全と心不全が予後決定因子である。心不全に対して ブロッカーやアンジオテンシン変換酵素阻害剤、利尿剤を中心とした治療法が行なわれるが、各々の開始時期については未だ一定した見解がない。DMD 患者の心筋が血圧やホルモンなどの持続的なストレスに弱いのであれば、心筋保護という目的で、心筋症と診断された時点でなく、心筋症発症前の DMD と診断ついた時点で心不全治療を開始すべきと思われる。よって我々は、DMD 患者から作成した iPS 細胞由来心筋細胞を用いてストレスに対する反応を評価し、心不全治療薬の投薬開始時期を決定する。そのために、以下に述べる 5 項目について評価するのが目的である。

- 1) DMD 患者さんから iPS 細胞を作成し、十分にプログラミングされたクローンを選別する。
- 2) 作成した iPS 細胞から心筋細胞を *in vitro* で分化させる。
- 3) 心筋細胞のストレス反応を電気刺激や薬物刺激前後で測定し、DMD 患者 iPS 細胞由来心筋細胞のストレスに対する脆弱性を評価する。
- 4) この心筋脆弱性に対して心筋保護作用を有する薬剤が有効かどうか、有効であればどのタイミングでの投与開始が効果的か *in vitro* の系で評価する。
- 5) DMD モデルマウスに様々なタイミングで *in vitro* で有効であった心筋保護作用のある薬剤を投与し、最も理想的な薬剤開始時期を決定する。

3. 研究の方法

DMD 患者さんとその両親の線維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, cMyc の 4 因子をレトロウイルスによって導入し、既に安定継代培養可能な iPS 細胞株を各々3~5 クローンずつ作成済みである。これら安定継代培養できているクローンの中から未分化性を維持しているクローンを選択した。まず定量的 PCR で Exogene (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) の Silencing 確認し、また定量的 PCR を用いて Endogeneous な Oct4, Sox2, Klf4, cMyc が ES 細胞と比べて同等レベルまで十分に上昇しているクローンを選別した。更にこれに加えて正常ヒト核型を有するものを選択した。その後、免疫染色で NANA O, Oct3/4, TRA1-18 抗体を用いて iPS コロニーの未分化性の確認、免疫不全マウス内でのテラトーマ形成の確認を行った。テラトーマ内の多分化能はヘマトキシリン-エオジン染色で三胚葉分化組織を顕微鏡で同定した。それらのデータをもとに実験に使用する未分化性、多分化能を有する iPS 細胞を選択した。次に選択した iPS 細胞クローンを使用して心筋分化を行った。心筋分化方法は、なるべく均一な心筋細胞を効率的に作成できる Direct Cardiac Differentiation 法を用いた。簡単に述べると、マトリゲルコートした培養皿で未分化無血清培養した iPS 細胞にアクチビン A、骨形成タンパク-4 (BMP-4)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を順に加えることによって分化細胞の 70%前後またはそれ以上の心筋細胞が得られる。(Zhang J et al., International Society of Stem Cell Research 2010 Annual Meeting Abstract and Poster) 得られた心筋細胞の純度を上げるために、山下らが報告した Modified Directed Differentiation 法と VCAM-1 を用いた MACS Sort を使用した。選択した心筋細胞の電気的活動を確認するために MED64 システムを用いて活動電位を記録した。細胞内カルシウム代謝変化を測定するのに Fluoro4 を用いた。またカルシウム濃度を測定するために indo-1 を用いて測定を行った。これらの測定方法を用いて心筋細胞のカルシウム濃度変化を安静自発拍動時とストレッチチャンパーを用いた負荷時に計測した。このストレッチ負荷に対する抑制効果があると思われる ブロッカーを投与して、ストレッチ負荷前後での細胞内カルシウム代謝を測定した。今後、ブロッカー投与時期の検討やカルシウム代謝を直接的に抑制する薬剤についても心筋ないカルシウム代謝の変化について検討予定である。

次に DMD モデルマウスである mdx マウスを用いて、心不全治療薬投与時期を振り分けて心不全進行の評価を行い、適切な心不全薬の投薬開始時期決定を予定した。まず、mdx マウスとコントロールマウスの左

心室機能の評価するためにセボフレン鎮静下で心エコーを行い、左室拡張末期径、左室駆出率を求めた。今後、in vitro で評価した薬剤を投与することで mdx マウスの心筋症を抑制できるか検討予定である。

4 . 研究成果

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) 患者さんとその両親から作成した安定継代培養可能な iPS 細胞株、各々3~5 クローンから線維芽細胞から十分な初期化されたクローンを選別するために、未分化マーカーである NANOG、Oct3/4、TRA-1-81 の免疫染色、定量的 PCR で transgene のサイレンシングの確認、正常核型のチェックを行った。更に多分化能を有するクローンを選別するために免疫不全マウス (NOG マウス) を用いた in vivo でのテラトーマ形成能を確認した。以上の実験後に疾患 iPS 細胞 2 クローン、コントロール iPS 細胞 2 クローン (母親由来 1 クローン、父親由来 1 クローン) を選別した。

続いて、これらの iPS 細胞を前述する方法で心筋分化、純化した。その結果、自発的拍動を有する心筋トロポニン T 陽性の iPS 由来心筋細胞を得た。この心筋細胞の 80~90% が MLC2v 陽性に心室筋細胞であった。MED64 を用いると、自発的な活動電位が定期的に測定でき、電気的にも心筋細胞であると考えられた。これら心筋細胞に Fluor4 を用いて細胞内カルシウム変化を測定したところ、DMD-iPS 由来心筋細胞内のカルシウム濃度がコントロールに比べて有為に高いことが確認された。次に indo-1 を用いて定量的に細胞内カルシウム濃度を測定したところ、R0(rest)、R(peak)、amplitude(R-R0)、いずれにおいてもコントロール iPS 由来心筋細胞に比べて、DMD-iPS 由来心筋細胞で有為に細胞内カルシウム濃度、心筋収縮時の細胞内カルシウム濃度上昇率とも上昇していた。以上の結果より、DMD-iPS 由来心筋細胞の定常状態においてカルシウム過負荷がかかっており、心筋細胞ダメージが起りやすい状況であることが確認された。次に心筋細胞に外的刺激負荷をかけた状態においてのカルシウム濃度変化を測定した。120%の持続的心筋伸展刺激で細胞内カルシウム濃度を測定したところ、コントロールに比べて明らかに DMD-iPS 由来心筋細胞の細胞内カルシウム濃度上昇が高かった。以上より、細胞内カルシウム過負荷が DMD 患者の心筋症発症のメカニズムの一つであると考えられた。この結果のもと、DMD モデルマウスである mdx マウスの心筋症発症抑制の可能性について検討した。基礎検討として、mdx マウス心筋が刺激負荷に弱いかどうか判定するために心エコーを用いて左心室拡張末期径、左心室駆出率について検討した。いずれも安静時には

コントロールマウス同等の値であったが、セボフルレンによる麻酔負荷を行ったところ、mdx マウスで明らかに左心室拡張末期径、左心室駆出率の悪化を認めた。今後、ブロッカーやカルシウム代謝を抑制する薬剤を使用し、これら心機能の悪化を抑制できるか判定する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件(予定を含む))

精神・神経疾患研究開発費「臨床試験の開始を目的とした筋ジストロフィーに対する新たな治療法の開発」班 平成25年班会議

平成25年12月9日

多能性幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療基盤開発

栗屋智就、馬場志郎、平田拓也、鶴見文俊、加藤竹雄、平家俊男

International Society of Stem Cell Research Annual Meeting, Vancouver, Canada

2014, June 18th-21st

A Mechanism of Progressive Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy Patients.

Fumitoshi Tsurumi, Shiro Baba, Toshio Heike et al.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 志郎 (研究実施者)

研究者番号: 60432382

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: