

動物モデルを用いた筋壊死と尿中代謝物の相関の実証
(心筋症モデルでの心筋壊死と薬物投与効果および尿中代謝物の関係)

分担研究者 岩田裕子 国立循環器病研究センター 研究所分子生理部 室長

【研究要旨】

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。Duchenne 型筋ジストロフィーにおいて骨格筋における病態進行と造血器型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(H-PGDS)によるPGD₂産生が相関することが強く示唆されている。そこで、拡張型心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂産生の亢進が関連している可能性を検証するため、心筋症及び心筋変性のモデル動物(ハムスター、マウス)を用いた解析を行った。拡張型心筋症ハムスターと心筋症マウスにおいて、心筋障害と関連した尿中PGD₂代謝物の増加を確認した。これは病態動物心筋組織、特に心筋組織間に存在する肥満細胞に多く局在が確認されたH-PGDSの増加と一致していた。また、心筋症等心筋変性モデル動物にH-PGDS 阻害薬を投与することにより、心筋症病態の進行が抑制される可能性が示された。

A. 研究目的

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。これまでに、Duchenne型筋ジストロフィーの病態進行と造血器型PGD合成酵素(H-PGDS)によるプロスタグランジン(PG)D₂産生が相関することが強く示唆されている。そこで、心筋症心筋組織においても同様に、筋壊死に伴う病態進行とPGD₂産生の亢進が関連している可能性を検証するため、拡張型心筋症のモデル動物(ハムスター、マウス)を用いた解析を行った。

B. 研究方法

δ-sarcoglycan を欠損した拡張型心筋症モデルハムスターおよび糖鎖異常による拡張型心筋症マウス、収縮蛋白異常による拡張型心筋症マウス、心筋変性マウスモデルを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。心筋変性マウスモデルは *mdx* マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin (T3) を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した。H-PGDS 阻害薬(30mg/kg/day)または溶媒(PBS)を 3 週間、皮下投与し、組織の繊維化と心機能を指標に、薬効を評価した。繊維化はマッソントリクローム染色により確認した。心機能は、心機能は、小動物用超音波高解像度イメージングシステム(VISUALSONICS)を用いて、麻酔下で非侵襲的に評価した。

B. 研究方法

δ - sarcoglycan を欠損した拡張型心筋症モデルハムスターおよび糖鎖異常による拡張型心筋症マウス、収縮蛋白異常による拡張型心筋症マウス、心筋変性マウスモデルを用いた。対照として、同週齢の野生型動物を用いた。心筋変性マウスモデルは *mdx* マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin (T3) を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した。H-PGDS 阻害薬(30mg/kg/day)または溶媒(PBS)を 3 週間、皮下投与し、組織の繊維化と心機能を指標に、薬効を評価した。繊維化はマッソントリクローム染色により確認した。心機能は、小動物用超音波高解像度イメージングシステム(VISUALSONICS)を用いて、麻酔下で非侵襲的に評価した。

PGD₂ 産生量の変動を評価するため、代謝ケージを用いて暗期(12時間)に採尿し、PGD₂の尿中安定代謝物 11,15-Dioxo-9-hydroxy-2, 3, 4, 5-tetranorprostan-1, 20-dioic acid (tetranor-PGDM) を液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリーを用いて測定した(LC: 資生堂、MS/MS: AB Sciex)。心筋組織における H-PGDS の含量は H-PGDS 抗体を用いたイムノプロットにより、局在は組織切片を心筋(cTnI 等)、肥満細胞(トリプターゼ等)、マクロファージ(CD11b 等)特異的蛋白等の各々抗体と H-PGDS 抗体との二重染色により同定及び解析を行なった。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、国立循環器病研究センターの動物実験指針に準拠して実施した。研究計画は動物実験委員会の承認を得ている。また、麻酔使用等により動物愛護上の倫理的配慮を行い、適切な環境のもとで飼育管理を行った。

C. 研究結果

拡張型心筋症モデルハムスターにおいて、心筋症病態の発症前後(4週齢及び16週齢)で比較すると、16週齢で尿中代謝物量が高くなる傾向が見られた。また、16週齢では野生型ハムスターとの比較でも高値を示した。さらに、2種類の心筋症モデルマウスにおいても検討し、野生型マウスと比べ高値を示す症例が認められた。

心筋症ハムスター及び拡張型心筋症マウス、T3 投与心筋変性マウスでは、野生型動物、T3 非投与マウスに比べ、心臓組織での H-PGDS 蛋白質の発現量の増加が観察された。心筋組織を用いた免疫染色の結果から、H-PGDS は病態心筋組織において心筋細胞というよりは壊れた細胞や炎症細胞の浸潤部位に局在すること、H-PGDS の集積箇所と肥満細胞のマーカーが一致したこ

とより H-PGDS は肥満細胞に多く存在していることが判明した。これらの知見は、心筋症病態の進行に伴い、尿中 tetranor-PGDM 量が高値を示したことと一致していた。また心筋症及び心筋変性モデル動物において H-PGDS 阻害薬を投与すると、心筋組織の H-PGDS 蛋白質含量の減少と尿中 tetranor-PGDM の減少に伴い、心機能の改善と心筋組織の繊維化の減少が観察された。

D. 考察

拡張型心筋症は、その発症機序が不明であり予後も不良であることから、新たな治療法の確立が求められている。3年間で明らかになった心筋症・変性心筋の病態進行に伴う H-PGDS 増加、特に心筋間質に存在する肥満細胞への集積、H-PGDS 阻害薬の心筋病態改善効果などの結果より、H-PGDS を標的にした新規治療法開発の可能性が示唆された。また、治療対象の決定や薬剤効果を

評価できるマーカーが必要であるが、尿中の安定代謝物である tetranor-PGD₂ がその候補として期待される。

E. 結論

変性心筋組織においても変性骨格筋同様に、筋壊死に伴う病態進行と PGD₂ 産生の亢進が関連していることが示され、H-PGDS 阻害薬が筋ジストロフィー等の筋変性疾患だけでなく心筋症、心筋変性の病態進行を抑制できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata Y, Suzuki O, Wakabayashi S. Decreased surface sialic acid content is a sensitive indicator for muscle damage. **Muscle & Nerve**, 47:372-378, 2013
- 2) Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y. Global metabolic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 59: 76-85, 2013
- 3) Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S. Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. **Cardiovas. Res.**, 99: 760-768, 2013

2. 学会発表

- 1) 第9回日仏国際シンポジウム(2012年9月7-8

日、東京) 岩田 裕子 「Inhibition of Ca²⁺-permeable channel TRPV2 provides the beneficial effects on cardiomyopathy」

- 2) 第86回日本薬理学会年会(2013年3月21-23日、福岡) 岩田 裕子、若林繁夫「筋細胞膜の低下したシアール酸含量は筋変性疾患における傷害の高感度マーカーである」

- 3) 第86回日本薬理学会年会(2013年3月21-23日、福岡) 鎌内慎也、岩田裕子、若林繁夫「拡張型心筋症モデル動物におけるプロスタグランジン D₂ 尿中代謝物の増加」

- 4) 第86回日本生化学会大会(2013年9月11-13日、横浜) 鎌内慎也、岩田裕子、若林繁夫「Prostaglandin D₂ metabolites are elevated in the urine of animal models of dilated cardiomyopathy」

- 5) 第87回日本薬理学会年会(2014年3月20日、仙台国際センター) 鎌内慎也、岩田裕子、Cheng-Kun Du、Dong-Yun Zhan、森本幸生、白井幹康、若林繁夫：TRPV2 N 末ドメインの高発現は、トロポニン T 変異を持つ拡張型心筋症モデルマウスの症状を改善する

- 6) 第87回日本薬理学会年会(2014年3月21日、仙台国際センター) 岩田裕子、大武仁美、鎌内慎也、若林繁夫：Ca²⁺透過チャネル TRPV2 の細胞膜局在の阻害により拡張型心筋症モデル動物の病態進行が抑制された。

- 7) 第62回日本心臓病学会学術集会(2014年9月26日仙台市民会館) 駒村和雄、岩田裕子：拡張型心筋症の新規治療薬の開発：伸展感受性 Ca 透過型陽イオンチャネル TRPV2 の阻害薬の可能性

- 8) 第86回日本生化学会大会(2014年10月18

日 国立京都国際会館) 岩田裕子、大武仁美：
TRPV2 阻害剤によりマウス重症心筋症の進行が
抑制される。

9) AHA Scientific Sessions 2014 (2014 年 11 月
16 日 McCormick Place Chicago /USA) Iwata,
Y., Komamura, K.: Tranilast, Transient Receptor
Potential Vanilloid 2 Antagonist, Ameliorates
End-Stage Heart Failure of Mice With Dilated
Cardiomyopathy.

G. 知的財産権の出願・登録条件

1. 特許取得

1) 特許第 4997441 号 (登録日 平成 24 年 5 月
25 日) 筋傷害の簡便検査方法及び筋傷害検

査用キット 鈴木 治 岩田 裕子

2) 特許第 5644026 号 (登録日 平成 26 年 1
月 14 日) TRPV2 の部分ペプチド 岩田 裕
子 若林 繁夫

3) 特許第 5667223 号 (登録日 平成 26 年 12
月 19 日) TRPV2 阻害剤、疾患の予防又は治
療剤、薬剤探索用リード化合物、及び薬剤探
索方法 岩田 裕子 若林 繁夫

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし