

論文の内容の要旨

論文題目 Functional Ischemia in Muscular Dystrophy

和訳 筋ジストロフィーにおける機能的虚血の研究

指導教員 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 : 浅井 章博

背景 : 加齢による筋力の低下は高齢者にとって大きな問題であり、その予防と治療法の確立が求められている。最近の研究では、加齢にともなう骨格筋における血流調節機構の減衰が報告されている。骨格筋組織における、細動脈と微小循環系脈管の血管拡張因子や収縮因子の低下が原因だと言われている。この血流調節の変調により、筋肉の収縮時に十分な血流を循環させることが困難になり、筋組織は相対的に虚血状態にさらされることになる。この相対的虚血状態を「Functional Ischemia (機能的虚血)」と呼ぶ。Functional Ischemia の原因因子は、EDRF (endothelium-derived relaxing factor ; 現在では一酸化窒素であることが分かっている) と、EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor)であることが予想されている。EDHF はその実体が未解明であるが、過酸化水素(H₂O₂)が有力な候補として研究されている。加齢によって起こる Functional Ischemia の実態と、筋組織障害そして筋力低下に至るまでの病態生理は未だ解明されていない。

今回、我々はこの疑問点を解明するために、Duchenne 型筋ジストロフィー(Duchenne Muscular Dystrophy; DMD)に着目した。筋組織傷害が著明な変性疾患のうち、筋ジストロフィーは最も古くから研究され、その病態生理の解明が進められている。なかでも DMD は、3500 人の男児に一人の割合で発見される非常に頻度の高い遺伝病である。

DMD は Dystrophin というタンパク質の欠損により起こる疾患で、患者の骨格筋は学童期から徐々に破壊され成人までに自立歩行が困難になるほど進行する。Dystrophin 欠如による、筋細胞の細胞膜の脆弱性が筋組織傷害を進行させている一因であるということのほかは、詳細な病態生理は解明されていない。

これまでの研究により、DMD は筋収縮の後に Functional Ischemia が起こる特徴があるとされている。さらに、DMD の研究においては *mdx* というノックアウトマウス系統が確立し

ており、実験方法の面から今回の研究モデルとして適すると考えられた。我々はこの *mdx* マウスを使い、DMD の Functional Ischemia の原因因子といわれている一酸化窒素(Nitric Oxide; NO)と H₂O₂の筋組織内での動態、Functional Ischemia と筋組織傷害の因果関係、そして Functional Ischemia を改善させる薬物による治療効果を研究した。

方法 : この研究において、我々は生体顕微鏡を用いた。生体顕微鏡は外科的に露出させたマウスの骨格筋を生理的環境下で、筋細胞レベルまで詳細に、*in vivo* 観察を可能にする装置である。われわれはこの装置をもちいて、筋組織内の細動脈を流れる赤血球量の定量、筋細胞から産生される NO と H₂O₂の定量、そして様々な条件下における筋収縮後の筋細胞損傷の測定を行った。

mdx マウスの Functional Ischemia に対する薬理介入には、長時間作用型 Phosphodiesterase-5 Inhibitor である Tadalafil を経口投与した。薬物治療に対する評価は、Evans Blue アッセイと組織学的手法を用い、筋組織損傷の進行を測定した。

結果と考察 : 生体顕微鏡を用いて筋組織内の細動脈における赤血球流束を測定し、*mdx* マウスの筋組織は、筋収縮後、Functional Ischemia の状態にあることが確認された。そして、この Functional Ischemia は、NO ドナーである SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) 投与によって克服された。さらに、細胞透過性 cGMP アナログである、8-(4-Chlorophenylthio)-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-CPT cGMP) の投与により同様に血流が増加することが測定された。つまり *mdx* マウスの筋組織中の細動脈は NO に対する反応性を保持していることが分かった。同様に、β 2 アゴニストである Clenbuterol によっても血流が増加したことから、*mdx* マウスの細動脈は血管拡張因子に対して反応性を保持していることが示された。

また *mdx* マウスの筋細胞は、収縮後の NO と H₂O₂の産生が、ワイルドタイプマウスに比べて低下していることが測定された。これにより、*mdx* マウスの Functional Ischemia は、収縮後の血管拡張因子の産生不全が原因の一つと考えられる。

そして次に、生体顕微鏡を用いて、筋細胞の形態学的変化を検知し、筋細胞のダメージを定量した。*mdx* マウスでは筋収縮後に、筋細胞傷害が時間とともに増加するが、SNAP の投与によりこの筋細胞傷害は軽減した。同様の結果が 8-CPT cGMP の投与でも観測された。血管収縮薬である Angiotensin-II を 8-CPT cGMP と同時に投与し、血流増加を阻害したところ、筋細胞傷害は軽減しなかったことから、この現象は Functional Ischemia 改善に特異的に起こっていると言える。Clenbuterol の投与でも同様に筋細胞ダメージは軽減した。

さらに、ワイルドタイプマウスで Functional Ischemia による筋細胞傷害の状態を再構成することを試みた。ワイルドタイプマウスに L-NAME (N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester、NO 産生阻害剤)、apamin と charybdotoxin(EDHF 阻害剤)を投与し、Functional Ischemia 状態にさせた上で、筋肉を収縮させた。収縮後、筋細胞のダメージは観測されなかった。上記の薬物にさらに vascular oppression をあたえ、高度虚血の状態にしたときのみ、筋細胞は傷害された。つまり Functional Ischemia のみでは正常筋細胞は破壊されない事になる。この結果

と *mdx* マウスの結果を比較すると、Functional Ischemia のみでは筋細胞傷害は起こっておらず、更にほかのストレスが関与していることが示唆された。

そしてさらに、Functional Ischemia に対する薬理介入として、血管拡張薬である Tadalafil を経口投与した。出生直後から投与し、生後 4 週まで治療した *mdx* マウスの横隔膜、Gluteus、Quadriceps、Gastrocnemius は、非治療群と比較して筋組織傷害が軽減した。これにより Functional Ischemia に対する治療は DMD の症状を軽減させる可能性があることが示された。

結論 : *mdx* マウスの筋組織において、収縮後の Functional Ischemia は筋細胞傷害を起こす主要な原因であることが判明した。さらに注目すべき事に、phosphodiesterase-5 inhibitor (Tadalafil) は *mdx* マウスの筋組織傷害を軽減することが判明し、DMD の治療薬になる可能性があることが分かった。