

氏名(本籍)	弓削田 直子(埼玉県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第108号
学位授与年月日	平成18年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	Canine X-Linked Muscular Dystrophy in Japan (CXMD _J)における心機能障害の病態に関する研究
論文審査委員	(主査) 若尾 義人 (副査) 菅沼 常德 代田 欣二 武田 伸一(国立精神神経センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部部長)

論文内容の要旨

ヒトにおける Duchenne muscular dystrophy (DMD) は、進行性の筋肉変性、壊死を主病変とし、臨床的には進行性の筋萎縮および筋力低下を生じる遺伝性の疾患である。DMDは、ジストロフィン遺伝子の異常により細胞骨格蛋白質であるジストロフィンに異常をきたすために生じる。ジストロフィンは DGC (dystrophin-glicoprotein-complex) の主要な構成成分であり、ジストロフィンの異常は、筋線維鞘 (sarcolemma) の DGC 消失につながる。すなわち筋収縮に際し、細胞膜の損傷を招来し細胞破壊が生じる結果、骨格筋および心筋において脂肪浸潤および結合組織置換などの進行性変性が生じる。臨床的には、筋力低下および萎縮に伴う歩様異常、歩行困難ならびに呼吸機能低下、さらに心機能低下などが認められ、それらは次第に進行し、ほとんどの患者が呼吸不全、肺炎、慢性心不全あるいは突然死により若齢で死亡する。近年、医療の進歩により呼吸不全による死亡のリスクが減少し、ライフスパンが長くなっている一方で、心不全においては保存的治療を余儀なくされ、DMDにおける死因の重要な原因になっている。よりよいDMDモデル動物を確立し、その心機能障害を解明することは、DMDにおける心不全に対する病態の解明ならびに治療法開発に大きく貢献すると考えられる。さらに将来的に伴侶動物の医療における筋ジストロフィー動物の治療にも貢献するものと思われる。これまでにゴールデン・レトリバーX連鎖性筋ジストロフィー (GRMD) がモデル動物として用いられているが、大型であることから飼育管理が難しく、形質の維持に大きな労力を費やすなどの問題もあり、より優れたモデル動物の導入が必要とされてる。以上のことから本研究は、DMDと同様の遺伝異常を持つ Canine X-Linked Muscular dystrophy in Japan (CXMD_J)における心機能障害の病態について検討を行った。

CXMD_Jは、DMDと遺伝的背景は同様であるが、心機能障害についての詳細な検討はなされていない。第2章ではCXMD_Jにおける臨床徴候、および心機能について評価を行った。さらに、CXMD_Jにおける詳細なる心機能障害を把握するため、第3章では、出生時より生後21ヵ月齢まで経時的に検査を行いその動向について検討を加えた。第4章では、第2章および第3章において得られた成績についてさらに電気生理学および病理組織学的検討を加え、心筋障害の病態について検討した。これらの結果からCXMD_Jにおける心筋障害のメカニズムを解明する手がかりが得られ、ならびにCXMD_JのDMDモデル動物としての有用性が示唆された。

【第2章】CXMD_Jにおける臨床徴候および心機能の評価。

DMD患者は、2歳で臨床徴候が認められ、5歳までに診断される。骨格筋病変として腰帯筋、大腿四頭筋の筋力低下および萎縮に始まり、ついで肩甲骨、四肢近位部に波及し、腓腹筋の仮性肥大を伴う。しばしば巨舌などを生じ、さらに胸郭変形および呼吸筋、心筋障害を発現し、10歳前後で歩行不能となる。心電図上の所見としてI、aVL、V5ならびにV6誘導あるいは、II、III、aVF誘導における深く幅の狭いQ波の出現、洞性頻脈等の異常がみられる。心エコー上左心室後壁に高信号所見を認める例もみられる。CXMD_Jにおいて生後5ヶ月齢、7ヶ月齢、および10ヶ月齢時に身体検査、心電図検査ならびに心エコー検査を実施した。その結果、生後5ヶ月齢時、既に巨舌、流涎および側頭筋の萎縮が認められ、生後7ヶ月齢時では、異常発声ならびに体幹近位部における四肢筋肉の硬縮が認められた。その後は臨床徴候の悪化は認められなかった。生後5ヶ月齢ですでにQ波振幅の増大、Q/R比の増大がII、IIIおよびaVF誘導において認められた。心エコー検査においては、1例にのみ左心室乳頭筋領域に高エコー所見が認められた。以上のことから、CXMD_JはGRMDと酷似していることが確認された。

【第3章】CXMD_Jにおける臨床徴候および心機能障害出現時期と経時的变化について

第2章においてCXMD_Jにおける臨床所見、心電図ならびに心エコー所見での概要が確認され、GRMDの所見と類似することが確認された。そこで本章では、その詳細についてさらに若齢期から経時的観察を実施し検討を加えた。その結果、CXMD_Jにおいて臨床徴候は生後3ヶ月齢より発現して、生後6ヶ月齢ころまで進行し、その後は小康状態で推移することが判明した。心電図検査においては、生後7週齢よりII、III、AVF誘導においてQ波振幅の増大およびQ/R比の増大が認められた。心エコー上、生後21ヶ月齢の時点では、心機能低下および形態学的な異常は認められなかった。生後5ヶ月齢、8ヶ月齢、12ヶ月齢および17ヶ月齢における24時間心電図による心拍変動解析の結果、CXMD_Jは対照犬と比較し、心拍数は一貫して高く保時され、また心室性不整脈の発現数が多い傾向が認められた。さらにCXMD_JはHF powerの日内変動が小さくLF/HFは日中低下し、夜間上昇する結果となった。すなわちDMD患者と同様の傾向を示し、自律神経機能に変化が生じていることが示唆された。

これらの結果よりCXMD_Jでは生後3ヶ月齢より臨床徴候および心電図において異常を呈することが明らかとなった。さらに、心拍変動解析では自律神経機能に変化を来しており、不整脈の出現状況においても異常が認められたことから、顕性化する以前における心機能の異常をdetectしていること

が示唆された。

【第4章】CXMD_JにおけるCARTOシステムによる心室興奮伝播様式の検討

第2章および第3章の成績より、CXMD_J犬における臨床徴候、および心電図異常の発現時期が明らかとなり、さらにこれまで知られていなかった不整脈の出現および、自律神経機能に変化を生じていることなどの所見が得られた。しかしながら心電図の異常所見と心筋障害との関係は明らかにされておらず、心電図異常の成因は不明のままである。第4章では、心電図異常の成因を解明する目的でCARTOシステムを用いた電気生理学的検討を行うと同時に、病理解剖を実施し、病理組織学的検討を行った。CARTOシステムによる解析は、生後5ヶ月齢、9ヶ月齢および21ヶ月齢の対照犬およびCXMD_J犬について実施した。その結果、対照犬とCXMD_J犬では心室の興奮伝播様式に相違のあることが判明した。すなわち生後5ヶ月齢および9ヶ月齢の対照犬では、電氣的興奮刺激が心室中隔から開始されついで左心室自由壁側、心尖部さらに右心室方向へと伝播し、最終的に心基部に向かい終息する様式をとり、正常犬の心電図興奮伝播における概念と一致した所見が得られた。しかしながら、同時期のCXMD_J犬においては、心室の興奮開始部位は心室中隔ではなく、左心室自由壁上方であることが確認された。さらに興奮刺激は、左心室自由壁を心尖部方向へ向かうと同時に、心室中隔に向かって伝播する現象が捉えられ、対照犬と異なる電氣的興奮伝播様式をとることが確認された。生後21ヶ月齢においても対照犬は、上記の対照犬と同様の心室興奮伝播様式をとることが確認された。生後21ヶ月齢のCXMD_Jにおいては、左心室自由壁の側壁に島状に興奮伝播の遅延する領域が認められ、生後5ヶ月齢および9ヶ月齢のCXMD_Jにおける伝播様式とは異なる様相を呈した。CXMD_J犬では、左心室自由壁から心室中隔に興奮が伝播することから、心電図Q波として表現される可能性があるものと推察された。

病理組織検査においては、個体差はあるものの若齢では固有心筋線維に変性を生じず、生後15ヶ月齢以上では固有心筋線維に変性が生じることが判明した。さらに特殊心筋線維（プルキンエ線維）においては生後5ヶ月齢で、すでに変性を生じることが確認された。生後21ヶ月齢におけるCXMD_J犬において心室の興奮伝播に遅延部位を認めた原因として、病理組織検査成績を考え合わせると、固有心筋および特殊心筋の変性がベクトル電位に変化をきたしたものと推察された。

【総括】

以上本研究において、CXMD_JがGRMDの臨床所見および心電図異常所見と酷似していることが確認された。さらに、若齢期におけるCXMD_J犬の心電図異常、ならびに自律神経機能の変化、さらに心室興奮伝播様式の変化が確認され、さらに病理組織検査においてもプルキンエ線維の変性などの所見が認められた。これらの所見はこれまでのDMD、GRMDおよびCXMDにおける報告では言及されていない新たな所見であり、今回用いたCXMD_J犬はDMDの病態解明、特に重要な心機能障害の解明に非常に有用なモデル動物であることが確認されたと同時に、獣医学臨床上筋ジストロフィーを呈する動物に対して、病態解明の糸口を示すものと思われた。

論文審査の結果の要旨

Duchenne muscular dystrophy (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の異常により細胞骨格蛋白質であるジストロフィンに異常をきたすために生ずる遺伝子疾患である。ジストロフィンは DGC (dystrophin-glicoprotein-complex) の主要な構成成分であり、ジストロフィンの異常は、筋線維鞘の DGC 消失につながり、臨床的には、筋力低下および萎縮に伴う歩様異常、歩行困難ならびに呼吸機能低下、さらに心機能低下などが認められ、多くの患者が呼吸不全、肺炎、慢性心不全あるいは突然死により若齢で死亡する。最近では、呼吸管理法の進歩により呼吸不全による死亡のリスクは減少しているものの、心不全に関しては治療法が開発されておらず若齢で死亡することから、その病態究明と開発が急務となっている。この為には、より高度な DMD モデル動物の開発が必要とされ、これまで、ゴールデン・レトリバー X 連鎖性筋ジストロフィー (GRMD) がモデル動物として用いられているものの、大型犬に伴う飼育管理の困難難さ、および形質維持に大きな労力を費やすなどの問題もあり、より優れたモデル動物の導入が必要とされている。

そこで筆者は、GRMD から遺伝情報が移入され DMD と同様の遺伝子異常を持つモデル犬、Canine X-Linked Muscular dystrophy in Japan (CXMD_J) を用いて、現在最も問題とされている心機能障害の病態について経時的な観察を行うと同時に、発現した心機能の変化に関して電気生理学的な検討を行った結果、CXMD_J における心機能障害のメカニズムの一部をを解明したと同時に、CXMD_J の DMD モデル動物としての有用性を確認した。

I. CXMD_J における臨床徴候および心機能の評価 (第 2 章)

ヒトにおける DMD は、5 歳前後と比較的早期に診断され、その主な病変は、骨格筋としては腰帯筋、大腿四頭筋の筋力低下および萎縮に始まり、ついで肩甲骨、四肢近位部に波及し、腓腹筋の仮性肥大を伴うと言われる。また、しばしば舌の巨大化 (巨舌) などを生じ、さらに胸郭変形および呼吸筋、心筋障害を発現し、10 歳前後で歩行不能となると報告されている。また心電図上の所見としては、深く幅の狭い Q 波の出現、あるいは洞性頻脈などの異常がみられると報告されている。さらに心エコー上では、左心室後壁に高信号所見を認める例も多いとされている。

そこで筆者は、まず、GRMD と今回用いた CXMD_J の生後 5 ヶ月齢、7 ヶ月齢、10 ヶ月齢および 13 ヶ月齢時の臨床所見、心電図ならびに心エコー検査所見に相違が認められるか否かを比較し検討した。その結果、CXMD_J では生後 5 ヶ月齢時、既に巨舌、流涎および側頭筋の萎縮が認められ、生後 7 ヶ月齢時では、異常発声ならびに体幹近位部における四肢筋肉の硬縮が発現することを観察した。しかしながら、その後については臨床徴候の悪化は認められず、一次的に臨床徴候が軽減する傾向を認めた。一方、心電図検査では、生後 5 ヶ月齢時にすでに Q 波振幅の増大および Q/R 比の増大が観察され、心エコー検査では、1 例のみに左心室乳頭筋領域に高信号所見を認めた。

これらの所見から筆者は、CXMD_J では臨床徴候および心電図検査には、GRMD と酷似した所見が観察されたものの、心エコー検査における高信号所見は一例のみであり、これまでの報告と異なること

を確認した。

II. CXMD_Jにおける臨床徴候および心機能障害出現時期と経時的变化について（第3章）

前章においてCXMD_Jにおける臨床所見、心電図ならびに心エコー所見の概要が確認され、GRMDの所見と類似することを確認したことから筆者は、これまで全く報告されていない、誕生間もない幼齢期から若齢期に至る期間のこれらの所見を経時的に観察すると同時に心拍変動解析を行い、心機能障害の出現時期について検討を加えた。

その結果、CXMD_Jの臨床徴候は生後3ヶ月齢より発現して、生後6ヶ月齢ころまで進行し、その後は小康状態で推移することを確認した。また、心電図検査では、生後7週齢よりQ波の振幅およびQ/R比の増大を認めたものの、生後21ヶ月齢の時点では、心エコー上、心機能低下および形態学的な異常は認められなかったことを確認した。さらに、生後5ヶ月齢、8ヶ月齢、12ヶ月齢および17ヶ月齢時における24時間心電図を用いた心拍変動解析の結果、CXMD_Jは対照犬と比較し、心拍数は一貫して高く保たれ、副交感神経機能の日内変動は小さく、交感神経機能は日中低下し、夜間上昇する傾向を示すことを観察した。これらの変化はDMD患者と同様の傾向を示し、CXMD_Jでは、生後まもなく自律神経機能に変化が生じることを示唆したと同時に、突然死に関係する心室性不整脈の発現数が多い傾向にあることを確認した。

III. CXMD_JにおけるCARTOシステムによる心室興奮伝播様式の検討（第4章）

IおよびIIの成績より筆者は、CXMD_Jにおける臨床徴候、および心電図異常の発現時期を明らかにし、さらにこれまで知られていなかった不整脈の出現および、生後まもなく自律神経機能に変化を生じていること、などを確認した。

しかしながら心電図の異常所見と心機能障害との関係、および心電図異常の成因は不明のままであることから、筆者は、心電図異常の成因を解明する目的で、CARTOシステムを用いた電気生理学的検討を行うと同時に、病理組織学的検討を行った。

その結果、対照犬とCXMD_Jでは心室の興奮伝播様式に相違のあることを突き止め、対照犬では、正常犬の心電図興奮伝播と一致した所見、すなわち電氣的興奮刺激が心室中隔から開始され、ついで左室自由壁側、心尖部さらに右室方向へと伝播し、最終的に心基部に向かい終息する伝播様式をとったのに対し、同時期のCXMD_Jにおいては、心室の興奮開始部位は心室中隔ではなく、左室自由壁上方であることを確認した。さらに、この興奮刺激は、左室自由壁を心尖部方向へ向かうと同時に、心室中隔に向かって伝播し、対照犬と異なる電氣的興奮伝播様式をとることを確認した。一方、生後21ヶ月齢のCXMD_Jでは、左室自由壁の側壁に島状に興奮伝播が遅延する領域を認め、生後5ヶ月齢および9ヶ月齢のCXMD_Jにおける伝播様式とは異なることを確認した。

これらの成績から筆者は、CXMD_Jにおける、左室自由壁から心室中隔に向かう興奮伝播様式が心電図Q波として表現される可能性があることを考察した。また、病理組織検査において、個体差はある

ものの若齢では固有心筋線維に変性を生じておらず、生後21ヶ月齢以上では固有心筋線維に変性が生じることを確認したと同時に、特殊心筋線維（プルキンエ線維）においては、生後5ヶ月齢で、すでに広範囲に変性が生じていることを確認した。

以上のごとく、本研究で筆者は、CXMD₁がGRMDの臨床所見および心電図異常所見と酷似していること、生後間もない若齢期においてすでにQ波を主とする心電図異常が認められること、および自律神経機能に変化が生じていること、また心室興奮伝播様式に変化を来しており、その変化がQ波異常と強く関係すること、さらにCXMD₁では若齢期から病理組織検査上、プルキンエ線維に広範囲な変性が生じていること、など、これまで知られていなかった多くの新しい所見を確認し提示した。これらの所見は、CXMD₁がヒトにおけるDMDの病態解明、特に重要な心機能障害の解明に非常に有用なモデル動物であることを示唆したと同時に、獣医学臨床上同様な筋ジストロフィーを呈する動物に対して、病態解明の糸口を示すものと思われ、今後における獣医臨床分野への貢献は極めて大きく、博士（獣医学）の学位を授与するに相応しい業績であると判定した。