

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09143

研究課題名(和文) 糖尿病を合併した虚血性心不全に対する治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for ischemic heart failure with diabetes mellitus

研究代表者

竹石 恭知 (Yasuchika, Takeishi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40272067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病では、冠動脈結紮後の血中 EPC 数、梗塞周囲の capillary density、骨髄由来血管内皮細胞数、心筋梗塞サイズに HMGB1-TG マウスと WT マウスで差を認めなかった。糖尿病マウスで DPP4 活性が上昇しており、心筋梗塞後の HMGB1 濃度の上昇は見られなかった。DPP4 阻害薬を投与した糖尿病 HMGB1-TG マウスでは、投与しない糖尿病 HMGB1-TG マウスに比し、血管新生と VEGF 発現の増加が認められた。DPP4 阻害薬投与により HMGB1 による骨髄からの EPC の虚血部位への誘導と血管新生が心筋梗塞サイズの縮小に関与したと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In transgenic mice with cardiac-specific overexpression of HMGB1 (TG) and wild type mice (WT), a diabetic state was induced by streptozotocin, and myocardial infarction was created by ligation of the left anterior descending coronary artery. A dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibition increased HMGB1 plasma levels in the diabetic TG mice. The infarct area was significantly larger in the diabetic TG than in the non-diabetic TG mice, and was reduced by DPP4 inhibition. Cardiac function, angiogenesis, and VEGF expression were impaired in the diabetic TG mice, but ameliorated by the DPP4 inhibition to levels similar to those found in the non-diabetic TG mice. The DPP4 inhibitor ameliorated cardiac function by inhibiting the inactivation of HMGB1 in diabetic mice after myocardial infarction.

研究分野：循環器内科学

キーワード：Myocardial infarction Heart failure Diabetes mellitus HMGB1 DPP4

1. 研究開始当初の背景

心不全で入退院を繰り返す症例が急増している。未曾有の高齢化社会を迎えつつある我が国では、心不全症例数は今後さらに増加すると予想されている。心不全は予後が悪い疾患であり、様々な心疾患に共通の終末像であるため、その発症機序を解明し、予防法と治療法を確立することは重要な意義を持つ。

一方、糖尿病患者数が大きく増加し、2012年の国民健康・栄養調査では我が国に2,050万人の糖尿病と糖尿病予備群がいると報告された。心不全患者で糖尿病を合併している場合、虚血性心不全が多く、腎機能低下や全身の動脈硬化性病変を伴っており、予後は極めて悪い。そのため、糖尿病合併心不全に対する新しい治療戦略の確立が希求されている。

High mobility group box 1 (HMGB1) は非ヒストン核蛋白の主要成分で、核内でヒストン H1 と置換してヌクレオソーム構造を弛緩させ、転写反応に最適な構造を構築させる。HMGB1 は転写因子などの宿主因子 (p53, Pou, Oct など) と結合することにより、それら因子の DNA への結合を促進する。また、DNA に直接働いて DNA の高次構造を転写反応の最適構造に変化させる。HMGB1 は p53 と結合し、Cyclin G1 や p21^{waf1} の転写活性調節を行うことが報告されており、心筋細胞を含む多くの全身の臓器に発現している。一方、HMGB1 は核内だけでなく細胞外においても重要な機能を果たしていることが明らかになった。核蛋白 HMGB1 が細胞外に分泌されて、種々の機能を営むサイトカインとしての働きを有している。細胞外へ分泌された HMGB1 はマクロファージ、内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞などに存在する receptor for advanced glycation end products (RAGE)、Toll-like receptor といった受容体に結合し、炎症性サイトカインの産生、免疫と感染防御、

細胞の遊走・増殖、損傷組織の修復、細胞の生存維持等多彩な作用を発揮する。高濃度の HMGB1 は炎症を惹起し生体に deleterious に働くが (Science 1999; 285: 248)、低濃度では組織修復など beneficial な 2 面性の作用を有することが指摘されている (Cardiovasc Res 2009; 81: 565)。申請者は、これまで RAGE や Toll-like receptor を介するシグナル伝達に関して、基礎的な研究に取り組んできた。また、申請者は心筋にのみ選択的に HMGB1 遺伝子を高発現したトランスジェニックマウス (HMGB1-TG) を作成し、冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成したところ、HMGB1-TG マウスでは野生型 (WT) マウスよりも梗塞周囲の capillary density が高く、心筋梗塞サイズが縮小したことを報告した。次いで、心筋梗塞巣へ骨髄由来の細胞が誘導され発現しているかを検討するため、HMGB1-TG マウスに放射線照射を行い骨髄細胞を死滅させたのち、green fluorescence protein (GFP) マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を尾静脈より移植した。骨髄移植後、HMGB1-TG マウスの冠動脈を結紮した。心筋梗塞作成後、HMGB1-TG マウスの血液を採取し、末梢血中の細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、WT マウスに比し GFP 陽性の骨髄由来血管内皮前駆細胞 (EPC) が増加していた。また、心筋梗塞周囲 (border zone) には GFP 陽性血管内皮細胞が増加し、HMGB1 により骨髄由来の EPC が虚血部位へ誘導され血管新生が促進されたことが示唆された

2. 研究の目的

HMGB1-TG マウスを用いて高血糖状態を作成し、心筋梗塞後の血中骨髄由来 EPC 数、心機能、心筋梗塞サイズ、梗塞周囲部の capillary density、骨髄由来血管内皮細胞数を検討する。そして、糖尿病合併虚血性心不全の機序を解明し、新しい薬物療法の可能性

を検討する。

3 . 研究の方法

HMGB1-TG マウスと WT マウスにストレプトゾトシンを投与し、高血糖状態を作成した。その後、冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成し、心筋梗塞後の血中骨髄由来 EPC 数、心機能、心筋梗塞サイズ、梗塞周囲部の capillary density、骨髄由来血管内皮細胞数を HMGB1-TG マウスと WT マウスで比較検討した。

糖尿病マウスでは dipeptidyl peptidase-IV (DPP4) 活性が上昇していたため、DPP4 阻害薬を投与し、同様の実験を行った。

4 . 研究成果

ストレプトゾトシンを腹腔内投与し 2 週後に血糖値を測定したところ、400 ~ 500 mg/dL を越え、糖尿病を発症していることを確認した。糖尿病では、非糖尿病状態とは異なり、冠動脈結紮後の末梢血中の GFP 陽性の骨髄由来 EPC 数、心重量、肺重量、心筋梗塞サイズ、梗塞周囲部 (border zone) の capillary density、GFP 陽性の骨髄由来血管内皮細胞数に HMGB1-TG マウスと WT マウスで差を認めなかった。

血中の DPP4 活性と HMGB1 濃度を測定したところ、糖尿病マウスで DPP4 活性が上昇しており、心筋梗塞後の HMGB1 濃度の上昇は見られなかった。

そこで糖尿病マウスに DPP4 阻害薬を投与した。ストレプトゾトシン投与は 1 型糖尿病モデルのため血糖の低下は見られなかったが、DPP4 活性は十分に抑制されたことを確認した。冠動脈を結紮したのち、心筋梗塞後の血中 HMGB1 濃度の上昇が認められた。この結果から HMGB1 が DPP4 の基質のひとつである可能性が示唆された。

DPP4 阻害薬を投与した HMGB1-TG マウスでは、DPP4 阻害薬を投与しない

HMGB1-TG マウスに比し、冠動脈結紮後の血中の骨髄由来 EPC 数の増加、梗塞周囲の capillary density の増加、骨髄由来血管内皮細胞数の増加、vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現の増加が認められた。糖尿病では活性化した DPP4 により HMGB1 が分解され、その作用が減弱していたが、DPP4 阻害薬投与により HMGB1 による骨髄からの EPC の虚血部位への誘導と集積、血管新生効果が心筋梗塞サイズの縮小に関与したと考えられた。

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 12 件)

1. Narumi T, Shishido T, Otaki Y, Kadowaki S, Honda Y, Funayama A, Honda S, Hasegawa H, Kinoshita D, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe JI, Takeishi Y, Kubota I: High-mobility group box 1-mediated heat shock protein beta 1 expression attenuates mitochondrial dysfunction and apoptosis. *J Moll Cell Cardiol* 82: 1-12, 2015
2. Nakamura Y, Suzuki S, Shimizu T, Miyata M, Shishido T, Ikeda K, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y: High mobility group box 1 promotes angiogenesis from bone marrow-derived endothelial progenitor cells after myocardial infarction. *J Atheroscler Thromb* 22: 570-581, 2015
3. Furukawa M, Ikeda K, Ohkawara H, Saito S, Takahashi H, Ueda K, Matsumoto H, Hashimoto Y, Ohto H, Ogawa K, Takeishi Y: Persistent complete remission of acute leukemic-phase CCR4-positive gamma-delta peripheral T-cell lymphoma by autologous stem cell transplantation with

- mogamulizumab. *Int J Hematol* 102: 498-505, 2015
4. Shimizu T, Suzuki S, Sato A, Nakamura Y, Ikeda K, Saitoh S, Misaka S, Shishido T, Kubota I, Takeishi Y: Cardio-protective effects of pentraxin 3 produced from bone marrow-derived cells against ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 89: 306-313, 2015
 5. Suzuki S, Nakazato K, Sugimoto K, Yoshihisa A, Yamaki T, Kunii H, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Plasma levels of receptor for advanced glycation end-products and high-mobility group box 1 in patients with pulmonary hypertension. *Int Heart J* 57: 230-240, 2016
 6. Honda Y, Shishido T, Netsu S, Kadowaki S, Narumi T, Takahashi T, Kinoshita D, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Watanabe T, Kishida S, Kadomastu K, Takeishi Y, Kubota I: Midkine deteriorates cardiac remodeling via epidermal growth factor receptor signaling in chronic kidney disease. *Hypertension* 67: 857-865, 2016
 7. Furukawa M, Ohkawara H, Ogawa K, Ikeda K, Ueda K, Shichishima-Nakamura A, Ito E, Imai J, Yanagisawa Y, Honma R, Watanabe S, Waguri S, Ikezoe T, Takeishi Y: Autocrine and paracrine interactions between multiple myeloma cells and bone marrow stromal cells by gth arrest-specific gene 6 cross-talk with interleukin-6. *J Biol Chem* 292: 4280-4292, 2017
 8. Yoshihisa A, Takiguchi M, Kanno Y, Sato A, Yokokawa T, Miura S, Abe S, Misaka T, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Associations of acid suppressive therapy with cardiac mortality in heart failure patients. *J Am Heart Assoc* 6: e005110, 2017
 9. Miura S, Saitoh S, Kokubun T, Owada T, Yamauchi H, Machii H, Takeishi Y: Mitochondrial-targeted antioxidant maintains blood flow, mitochondrial function, and redox balance in old mice following prolonged limb ischemia. *Int J Mol Sci* 18: e1897, 2017
 10. Cao M, Shikama Y, Kimura H, Noji H, Ikeda K, Ono T, Ogawa K, Takeishi Y, Kimura J: Mechanisms of impaired neutrophil migration by microRNAs in myelodysplastic syndromes. *J Immunol* 198: 1887-1899, 2017
 11. Sato A, Suzuki S, Watanabe S, Shimizu T, Nakamura Y, Misaka T, Yokokawa T, Shishido T, Saitoh S, Ishida T, Kubota I, Takeishi Y: DPP4 inhibition ameliorates cardiac function by blocking the cleavage of HMGB1 in diabetic mice after myocardial infarction. *Int Heart J* 58: 778-786, 2017
 12. Yoshihisa A, Kimishima Y, Kiko T, Sato Y, Watanabe S, Kanno Y, Abe S, Miyata M, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y: Usefulness of urinary N-terminal fragment of titin to predict mortality in dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* (in press)
- [学会発表](計10件)
1. Sato A, Yoshihisa A, Kanno Y, Takiguchi M, Miura S, Shimizu T, Nakamura Y, Yamauchi H, Owada T, Abe S, Suzuki S, Oikawa M, Sakamoto N, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Beneficial impact of dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors on Mortality of patients with hospitalized heart failure patients with diabetes mellitus. *Scientific*

- Sessions of American Heart Association 2015, Orland, USA, November 2015
2. Suzuki S, Nakazato K, Sugimoto K, Yoshihisa A, Yamaki T, Kunii H, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: The impact of anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor a in patients with pulmonary hypertension. Scientific Sessions of American Heart Association 2015, Orland, November 2015
 3. Shimizu T, Suzuki S, Sato A, Nakamura Y, Saitoh S, Mantovani A, Shishido T, Kubota I, Takeishi Y: Cardio-protective effects of pentraxin 3 produced from bone marrow-derived cells against ischemia/reperfusion injury. Scientific Sessions of American Heart Association 2015, Orlando, November 2015
 4. Owada T, Saitoh S, Yamauchi H, Miura S, Machii H, Takeishi Y: The mitochondria-targeted antioxidant therapy improves age-related cardiovascular dysfunction. Scientific Sessions of American Heart Association 2015, Orlando, November 2015
 5. Miura S, Kokubun T, Saitoh S, Takeishi Y: Mitochondria-targeted antioxidant therapy improves age-related collateral development with ischemia through p53 and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α). Scientific Sessions of American Heart Association 2016, New Orleans, November 2016
 6. Sugimoto K, Sato A, Watanabe S, Suzuki S, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Pulmonary hypertension with thickening of adventitial area due to decreased eNOS bioavailability in senescence marker protein-30 knock-out mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2016, New Orleans, November 2016
 7. Sugimoto K, Sato A, Watanabe S, Suzuki S, Machida T, Saitoh S, Sekine H, Takeishi Y: Pulmonary hypertension with altered eNOS and ALK-1 signaling in the autoimmune-disease mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2016, New Orleans, November 2016
 8. Saitoh S, Yamauchi H, Owada T, Miura S, Kokubun T, Takeishi Y: Decrease of senescence marker protein-30 in aging impairs collateral growth under ischemia. Scientific Sessions of American Heart Association 2016, New Orleans, November 2016
 9. Sato Y, Yoshihisa A, Kiko T, Kimishima Y, Watanabe S, Kanno Y, Tatsumi M, Abe S, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Saitoh S, Ishida T, Takeishi Y: Urinary N-terminal fragment of titin predicts mortality in dilated cardiomyopathy. Scientific Sessions of American Heart Association 2017, Anaheim, November 2017
 10. Sato Y, Yoshihisa A, Kiko T, Kimishima Y, Watanabe S, Kanno Y, Tatsumi M, Abe S, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Saitoh S, Ishida T, Takeishi Y: Subclinical hypothyroidism is associated with impaired exercise capacity and adverse prognosis in heart failure patients. Scientific Sessions of American Heart Association 2017, Anaheim, November 2017
- [図書](計 3件)
1. Yoshihisa A, Takeishi Y: Heart disease and the liver: interactions between the heart and the liver. In: The Liver in Systemic Diseases. (Ohira H, eds.), Springer Japan, Tokyo, 179-202, 2016
 2. 竹石恭知: 7 循環器系の疾患 7-5 検査法

- 5) 核医学検査. 内科学 第 11 版:
452-458, 2017
3. 竹石恭知: 6. 循環器疾患 心臓腫瘍.
今日の治療指針 2017 年版: 412-413,
2017

〔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

竹石恭知 (TAKEISHI Yasuchika)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40272067

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鈴木 聡 (SUZUKI Satoshi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60536944