

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15452

研究課題名(和文) 初期2型糖尿病ラットでの拡張期末の心筋収縮タンパク質分子動態異常の放射光解析

研究課題名(英文) Synchrotron radiation investigation of cardiac contractile protein dynamics at end diastole in a type 2 prediabetes model rat

研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI, Mikiyasu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：70162758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：独自の放射光X線心筋回折法の2型前糖尿病モデルGoto-Kakizaki(GK)ラットの拍動左心室への応用で心内膜下層に限局性の心筋収縮タンパク質動態異常を認め、同時に心臓拡張機能異常も認めた。GK心筋タンパク質のリン酸化は、myofilament proteinsには異常なく、タイチンに有意な減少を認めた。心筋組織のsoluble guanylate cyclase(sGC)発現とPKG活性の低下を認め、リン酸化減少にsGC-PKGシグナル低下の関与が推定された。放射光での冠動脈可視化から、GKの内皮依存性拡張機能に異常なく、従来説の内皮由来一酸化窒素低下によるシグナル低下は否定的であった。

研究成果の概要(英文)：Applying our synchrotron radiation X-ray diffraction approach to the beating heart of the type 2 prediabetes Goto-Kakizaki (GK) rat, we found abnormal cardiac contractile protein dynamics in the subendocardium was associated with left ventricular diastolic dysfunction. GK rat hearts did not show altered phosphorylation state of the small myofilament proteins, but showed hypophosphorylation of titin. Myocardial soluble guanylate cyclase (sGC) protein expression and PKG activity were significantly depressed, and hypophosphorylation of titin correlated with depressed sGC-PKG activation. Synchrotron radiation microangiography enabled us to visualize the coronary circulation, which suggested that the GK rat does not have coronary endothelial dysfunction at this age, and therefore the previously hypothesised role of depressed endothelium dependent nitric oxide signaling driving diastolic dysfunction is not supported.

研究分野：循環生理学

キーワード：循環器・高血圧 糖尿病 心臓拡張機能障害 心筋収縮タンパク質 放射光X線回折法

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は Heart Failure with preserved Ejection Fraction(HFpEF)の重要な誘因であるが、心臓拡張機能低下の根本病態は未解明である(World J Diabetes. 2015; 6(7): 943-60)。また、発症主因が虚血性心疾患である Heart Failure with reduced Ejection Fraction(HFrEF)に有効とされる renin angiotensin system(RAS)系抑制剤や アドレナリン受容体遮断剤は HFpEF に対して有効性がないという報告もあり(N Engl J Med. 2008;359(23):2456-67)、HFpEF の確立された治療・予防法はないのが現状である。

私共は、糖尿病による HFpEF の分子病態の解明を目指して、独自の in vivo 放射光 X 線心筋回折法(Circ Res. 2013;112(1): 209-21)を 1 型糖尿病ラットの左心室に応用し、ミオシン頭部のアクチンへの結合・解離を解析した。その結果、拡張期末でのミオシン頭部のアクチンからの解離数が有意に増大しており、この解離数の増大と心臓拡張能(dP/dt_{min})の低下は正の相関を示すことを明らかにした(Biophys J. 2013;104(5):1065-72.)。さらに、この異常解離は Rho-kinase 遮断薬の慢性投与で大きく改善することから、この酵素による myofilament タンパク質や titin のリン酸化状態の変化が解離数増大に関与する可能性を考えた(Cardiovasc Diabetol. 2015;14:92)。他研究により、冠微小血管内皮細胞の炎症とそれに伴う一酸化窒素(NO)-cGMP-タンパクキナーゼ G (PKG) シグナル伝達の抑制が心室拡張機能障害の引き金になると示唆されている(J Am Coll Cardiol. 2013 Jul 23;62(4):263-71)。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病の約 95%を占める 2 型糖尿病に焦点を当て、従来の心エコー法では捉えることができなかった HFpEF 発症時の超初期の分子病態の解明を目指した。目的達成のため、2 型前糖尿病ラットモデル、若年 Goto-Kakizaki (GK)ラットを用い、放射光 X 線回折法で心筋収縮タンパク質の分子動態異常の局在を見出すことを考えた。即ち、1) GK ラット心室壁の外、中、内層に放射光ビーム(0.2×0.2 mm 径)をピンポイントで照射し、ミオシン頭部とアクチン間の結合・解離の動態を解析した。次に 2) 見出された分子動態異常と心筋の酸化ストレス増大、soluble guanylate cyclase(sGC)-PKG シグナル抑制、心筋タンパク質リン酸化抑制との関連を調べた。最後に 3) 冠微小動脈の血管内皮依存性拡張機能(NO 依存性)の異常が同時に存在するかどうかを調べた。

3. 研究の方法

麻酔下 GK ラット(10-12 週齢、雄)に放射

光 X 線回折法を応用して、拍動左心室の異なる心筋部位で心筋収縮タンパク質分子の動態を調べ、分子動態異常の心室壁内分布を解析した。左心室圧-容積関係も同時に記録した。対照には同週齢 Wistar ラットを用いた。

(1) SPring-8 での in vivo 実験

準単色放射光ビーム(波長:0.08nm、幅:0.2×0.2 mm、X 線エネルギー:15keV)を左心室に当て、心筋の小角散乱を X 線イメージングテンシファイアと組み合わせた高速 CCD カメラで記録した。カメラ長は 3 m とした(Circ Res. 2013;112(1): 209-21)。

麻酔下、人工呼吸下で、胸壁を部分的に取り去り、左心室圧-容量関係測定用カテーテルを右頸動脈から左室に挿入した。左心室の異なる心筋層(epicardium、subepicardium、subendocardium)に放射光ビームを照射するため、動物を設置したテーブルを X、Y、Z 方向に 0.1 mm 単位で遠隔操作した。一回の照射時間は 1-2 秒程度とし、その間呼吸器は終末呼気位で停止した。

記録したデータについて、X 線回折イメージのラインプロファイルで、ミオシン・フィラメントのみが規則正しく配列する格子面に由来する回折ピーク、(1,0)反射とミオシンとアクチン・フィラメントが規則正しく配列する格子面に由来する回折ピーク、(1,1)反射を検出し、両者の強度比からミオシン頭部のアクチンへの結合数(myosin mass transfer)を解析した。回折実験後に KCL 投与による脱分極性心筋弛緩を起こした時と心筋硬直を起こした時の強度比から end diastole 時の absolute myosin mass transfer (MMT)を算出した。

冠動脈の血管内皮依存性拡張機能を調べるため、独自の放射光高解像度微小血管造影法(Circ Res. 2013;112(1): 209-21)で冠動脈造影を行い、冠循環を可視化した。

(2) 国立循環器病研究センターでの in vitro 実験

in vivo 実験終了後、心臓を摘出して、4% パラホルマリン固定、パラフィン包埋した。あるいは OCT コンパウンドを使用して凍結心筋とした。

分子生物学的手法(免疫組織化学法、ウェスタンブロット法、心筋フィラメントリン酸化プロテオミクス法、ELISA 法)を摘出心筋に応用して、心筋収縮タンパク質動態異常に関与し得る分子機序を探った。

4. 研究成果

(1) 動物特性

GK ラットおよび Wistar ラットの血糖レベル、体重、心臓重量、心臓重量/体重を比較した結果、下図のように血糖、体重、心臓重量は GK ラットの方が有意に大きかった。また、GK ラットの血糖値は前糖尿病レベル(<15mmol/L)であった。

	Wistar (n=9)	GK (n=7)
Blood Glucose (mmol/L)	6.6 ± 0.5	10.0 ± 0.9**
Body Weight (g)	269 ± 7	298 ± 11*
Heart Weight (mg)	0.73 ± 0.02	0.87 ± 0.02#
Heart Weight: Body Weight (mg/g)	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.02

(2) 左心室の拡張機能

active relaxation の指標として dP/dt_{minimum} (mmHg/s) および Tau Weiss (ms) を用いた。GK ラットと Wistar ラットの dP/dt_{minimum} は $-8,845 \pm 1,084$ および $-11,428 \pm 1,938$ mmHg/s、Tau は 12 ± 1 および 9 ± 1 ms で、いずれも GK ラットの方が有意に大きかった。passive stiffness の指標として end diastolic pressure (EDP, mmHg) および end diastolic pressure volume relationship (EDPVR) slope を用いた。GK ラットと Wistar ラットの EDP は 11.9 ± 2.2 および 8.3 ± 1.2 mmHg で GK の方が有意に高く、EDPVR slope は 0.007 ± 0.001 および 0.014 ± 0.002 で GK の方が有意に小さかった。以上の結果から、今回用いた前糖尿病モデル GK ラットにおいて、すでに拡張機能障害が進展し始めていることが分かった。なお、心拍数、体血圧、 dP/dt_{maximum} 、end systolic pressure は両ラット間で有意差がなかった。

(3) 心筋収縮タンパク質の分子動態

end diastole での MMT (心筋硬直時の crossbridge 数を 100% として算出) を心室壁の外、中、内層で求め、GK と Wistar ラットで比較した。epicardium の GK と Wistar ラットの MMT は $32.3 \pm 44.3\%$ および $46.6 \pm 16.4\%$ 、subepicardium では $19.3 \pm 52\%$ および $7.3 \pm 39.2\%$ で、両ラット間で有意差はなかった。しかし、より内層の subendocardium では $53.7 \pm 10.8\%$ および $45.3 \pm 19.6\%$ で、有意に GK ラットの方が低値であった。注目すべきは、内層では、GK ラットの end diastole 時の MMT 値は KCL で心筋弛緩した時の MMT 値より小さくなったことである。

以上から、前糖尿病モデル GK ラットでは、心室壁内層側の subendocardium に局所的なミオシン頭部のアクチンからの異常な解離現象 (cross-bridge 数の減少) が起こっていることが明らかとなった。

(4) 心筋の酸化ストレスとコラーゲン線維量

酸化ストレスは nitrotyrosine の免疫組織染色で、コラーゲン線維量は、ピクロシリウスレッド染色で評価した。定量解析は、標本を Aperio ScanScope XT Slide Scanner で画像化し、Aperio ImageScope software (Positive Pixel Count algorithm) を用いて、陽性染色部分の proportional area で行ったが、

両染色ともに GK および Wistar ラット間で有意差はなかった。また念のため、全身の酸化ストレス状態の指標である尿中の 8-hydroxyl deoxyguanosine を計測したが、やはり GK および Wistar ラット間で有意差はなかった。

(5) 心筋 sGC 発現と PKG 活性

心筋組織の sGC:Actin (A.U.) をウエスタンブロット法により解析した。GK と Wistar ラットで 0.03 ± 0.02 および 0.09 ± 0.03 で、GK ラットの方が有意に低値であった。また、PKG 活性 (pmol/min/mg protein) を ELISA 法で計測した。GK と Wistar ラットで 6.7 ± 1.1 および 8.1 ± 1.0 で、GK ラットの方が有意に低値であった。なお、PKA 活性についても計測したが、両ラット間で有意差はなかった。

(6) 心筋タンパク質のリン酸化状態

myofilament proteins である myosin-binding protein C (MyBp-C), troponin I (TnI), myosin regulatory light chain (MLC-2) の相対的リン酸化状態をウエスタンブロット法で解析した。その結果、 $p\text{MyBP-C}^{\text{Ser282}}:\text{Total MyBP-C}$ 、 $p\text{TnI}^{\text{Ser23/24}}:\text{Total cTnI}$ 、 $p\text{MLC-2}^{\text{Ser19}}:\text{Total MLC-2}$ は両ラット間で有意差がなかった。

そこで、心筋細胞の構造タンパク質であるタイチン (ミオシンの位置の安定性や弾力性・伸展性を調節する) のリン酸化状態をウエスタンブロット法で解析した。まず、Overall Titin Phosphorylation の指標である $p\text{-Ser/Thr Titin:PVDF}$ (A.U.) は、GK と Wistar ラットで、 0.41 ± 0.42 および 1.0 ± 0.49 で、GK ラットの方が有意に低値であった。次に N2Bus-PKG specific のリン酸化指標である $p\text{-N2Bus S4080:PVDF}$ (A.U.) は、GK と Wistar ラットで、 0.37 ± 0.37 および 1.00 ± 0.65 で、GK ラットの方が有意に低値であった。最後に N2Bus-PKA Specific のリン酸化指標である $p\text{-N2Bus S3991:PVDF}$ (A.U.) は GK と Wistar ラットで、 0.68 ± 0.49 および 1.00 ± 0.33 で、有意差はなかった。

(7) 冠動脈の血管内皮機能

微小血管造影法で、冠動脈の本管から第 4 分岐まで (血管内径約 200 ~ 50 μm) を可視化し、アセチルコリン (内皮依存性拡張薬) と ニトロプルシド (内皮非依存性拡張薬、NO-donor) に対する血管応答を調べた。GK と Wistar ラット間で、baseline の血管内径には有意差がなかった。薬剤に対する応答も両ラット間で有意差はなく、GK ラットの内皮依存性 (特に NO 依存性) 拡張機能は太い伝導血管から小さな抵抗血管まで正常に維持されていることが示唆された。

(8) まとめ

以上の結果から、前糖尿病モデル GK ラットでは、心室壁の内層側から、拡張期末のミオシン頭部のアクチンからの異常解離が生

じ、心臓拡張機能障害の発症につながると考えられた。この心筋タンパク質の分子動態異常の分子機序として、心筋細胞内のsGC-cGMP-PKGシグナルの機能低下を介したタイチンリン酸化低下が示唆された。このシグナル機能低下を引き起こすメカニズムは不明であるが、冠微小血管の血管内皮からのNO放出低下によるとする従来説は可能性が低いと考えられた。さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Katara R, Pearson JT, Lew JK, Wei M, Tsuchimochi H, Du CK, Zhan DY, Umetani K, Shirai M, Schwenke DO. Progressive decrease in coronary vascular function associated with type 2 diabetic heart disease. *Front Physiol*. 2018;9:696. 査読あり. DOI: 10.3389/fphys.2018.00696.

Pearson JT, Collie N, Lamberts RR, Inagaki T, Yoshimoto M, Umetani K, Davis P, Wilkins G, Jones PP, Shirai M, Schwenke DO. Ghrelin preserves ischemia-induced vasodilation of male rat coronary vessels following β -adrenergic receptor blockade. *Endocrinology*. 2018;159(4):1763-1773. 査読あり. DOI:10.1210/en.2017-03070.

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Fujii Y, Hosoda H, Kangawa K, Akiyama T, Shirai M, Tatsumi E, Pearson JT. Ghrelin pre-treatment attenuates local oxidative stress and end organ damage during cardiopulmonary bypass in anesthetized rats. *Front Physiol*. 2018;9:196. 査読あり. DOI:10.3389/fphys.2018.00196.

Pearson JT, Yoshimoto M, Chen YC, Sultani R, Edgley AJ, Nakaoka H, Nishida M, Umetani K, Waddingham MT, Jin HL, Zhang Y, Kelly DJ, Schwenke DO, Inagaki T, Tsuchimochi H, Komuro I, Yamashita S, Shirai M. Widespread coronary dysfunction in the absence of HDL receptor SR-B1 in an ischemic cardiomyopathy mouse model. *Sci Rep* 2017;7(1):18108. 査読あり. DOI:10.1038/s41598-017-18485-6.

Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Pearson JT, Saito A, Harada A, Toda K, Shirai M, Sawa Y. Influence of coronary architecture on the variability in myocardial infarction induced by coronary ligation in rats.

PLoS One 2017;12(8):e0183323. 査読あり. DOI:10.1371/journal.pone.0183323.

Torii M, Fukui T, Inoue M, Kanao S, Umetani K, Shirai M, Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Toi M. Analysis of the microvascular morphology and hemodynamics of breast cancer in mice using SPring-8 synchrotron radiation microangiography. *J Synchrotron Radiat* 2017; 24(Pt 5):1039-1047. 査読あり. DOI:10.1107/S1600577517008372.

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Azilsartan ameliorates diabetic cardiomyopathy in young db/db mice through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/Mas receptor cascade. *Biochem Pharmacol* 2017;144:90-99. 査読あり. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.07.022.

Chen YC, Inagaki T, Fujii Y, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Umetani K, Zhang Y, Kelly DJ, Yoshimoto M, Nagai H, Evans RG, Kuwahira I, Shirai M, Pearson JT. Chronic intermittent hypoxia accelerates coronary microcirculatory dysfunction in insulin-resistant Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016; 311(2): R426-439. 査読あり. DOI:10.1152/ajpregu.00112.2016.

Shirai M, Yagi N, Umetani K. SPring-8 synchrotron radiation imaging for analyzing cardiovascular function in anesthetized small animals. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2016;148(2):92-99. 査読あり. DOI: 10.1254/fpj.148.92.

Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, Shirai M. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;312(1):H60-H67. 査読あり. DOI:10.1152/ajpheart.00471.2016

Lang JA, Pearson JT, Binder-Heschl C, Wallace MJ, Siew ML, Kitchen MJ, Te Pas AB, Lewis RA, Polglase GR, Shirai M, Hooper SB. Vagal denervation inhibits the increase in pulmonary blood flow during partial lung aeration at birth. *J Physiol*. 2017;595(5):1593-1606. 査読あり. DOI:10.1113/JP273682.

〔学会発表〕(計 8 件)

Waddingham M, Hamdani N, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Sonobe T, Kelly DJ, Yagi N, Paulus WJ, Shirai M, Pearson JT. Changes in titin phosphorylation and PKG activity underlie diastolic dysfunction at the cross-bridge level in the early stages of type 2 diabetes. European Society of Cardiology Heart Failure 2018 Meeting, Vienna, 2018.

Pearson JT, Tsuchimochi H, Schwenke DO, Sonobe T, Huiling J, Shirai M. Effects of hypoxia on circulatory function. Symposium 35 Protective mechanisms against hypoxia: from molecules to whole body. 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu, 2018

杜成坤、戦冬雲、森本幸生、白井幹康、ピアソン ジェームズ、肥大型心筋症モデルマウスにおける呼吸と代謝の異常、第 95 回日本生理学会、高松、2018

若林繁夫、金美花、古林創史、土持裕胤、曾野部崇、ピアソン ジェームズ、白井幹康、大郷剛、CHP3 遺伝子の欠損は慢性低酸素刺激によるマウスの心肥大を促進する、第 95 回日本生理学会、高松、2018

Pearson JT, Shirai M. Investigating in vivo myocardial and coronary molecular pathophysiology in mice with X-ray radiation imaging approaches. The 12th Uehara International Symposium 2017 「Make Life Visible」, Tokyo, 2017

Tsuchimochi H, Thambyah H, Edgley AJ, Inagaki T, Waddingham MT, Chen YC, Du CK, Zhan DY, Sukumaran V, Sonobe T, Umetani K, Shirai M, Pearson JT. Beta-blockade prevents coronary microvascular endothelial dysfunction in nonobese salt-sensitive insulin resistant rats on a high salt diet. ESC Congress 2017, Barcelona, 2017

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Bolus ghrelin administration ameliorates inflammatory response and oxidative stress during percutaneous cardiopulmonary support in a rat model. Experimental Biology meeting 2017, 2017

ピアソン ジェームズ、土持裕胤、八木直人、白井幹康、ローキナーゼ及び酸化ストレスによる心筋サルコメア機能の調節作用、第 94 回日本生理学会大会、浜松、2017

〔図書〕(計 1 件)

Pearson JT, Tsuchimochi H, Shirai M. Investigating in vivo myocardial and coronary molecular pathophysiology in mice with X-ray radiation imaging approaches. Make Life Visible. Springer Nature Singapore (Ed. Y. Toyama, A. Miyawaki and M. Jinzaki). In press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI, Mikiyasu)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員
研究者番号：70162758

(2) 研究分担者

ピアソン ジェームズ (PEARSON, James)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：30261390

土持 裕胤 (TSUCHIMOCHI, Hirotsugu)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：60379948

(3) 連携研究者

杜 成坤 (TO, Seikon)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号：90590646

金 美花 (KIN, Mika)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員
研究者番号：40746773

戦 冬雲 (SEN, Toun)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・派遣研究員
研究者番号：30616941

稲垣 薫克 (INAGAKI, Tadakatsu)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号：20638366

(4) 研究協力者

八木 直人 (YAGI, Naoto)