

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08120

研究課題名(和文) C-peptideのシグナリング解明と心血管病態治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of signaling by C-peptide and application for cardiovascular disease

研究代表者

井戸 康夫 (Ido, Yasuo)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教)

研究者番号：50814133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、C-peptideの細胞内シグナル伝達機構の同定、2型糖尿病マウスとドキシソルビシンの心臓障害抑制効果についての評価をおこなった。細胞培養系は、C-peptideはオートファジーの亢進(selective autophagy)を引き起こし、Nrf2の核内集積、Nrf2のターゲットであるgenesのmRNAの増加が認められた。ラット、マウスではC-peptideはNrf2の下流遺伝子特にPdg, IDH1, NQO1, SXN1 の発現の増加が顕著であった。C-peptideは、ドキシソルビシン投与による心壊死の予防を生じた。しかし、2型糖尿病モデルでは効果を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はインスリンと共に分泌されるペプチドの活性と病気への応用について研究したものである。研究結果としてはペプチドはオートファジーと呼ばれる系を活性化することにより、ストレス耐性を増加させることがわかった。実際、抗癌剤による心臓障害の副作用マウスモデルでは、このペプチドにより心筋細胞のダメージが軽減されることがわかった。2型糖尿病への効果を検討してみたが、このモデルでは期待できる効果は得られなかった。この研究はこのペプチドの効果機序を解明したことともに、疾病への応用への道が一つ明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to elucidate the signal transduction by C-peptide and the effects on type 2 diabetes model and Doxorubicin cardiopathy. In cell culture study, C-peptide elicited selective autophagy and accumulation of Nrf2 in nucleus, and subsequent increase in Nrf2 target gene expression. In the rat and mouse, administration of C-peptide caused increases in Nrf2 induced genes such as Pdg, IDH1, NQO1 and SXN1. C-peptide also prevented Doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. However, the effects on type 2 diabetes model was not observed.

研究分野：分子病理学

キーワード：C-peptide Doxorubicin Autophagy Nrf2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Human C-peptide は膵細胞で proinsulin から Insulin とともに作られ、分泌される 31 amino acids の peptide である。その生理活性は長い間不明であったが、われわれは 1 型糖尿病動物モデル (Streptozotocin diabetic rat) や高血糖で見られる血管透過性亢進、血流の異常などの血管内皮機能障害を改善する効果がある事を示した (Ido et al. Science 1997)。他の研究者 (Wahren J 等は) はこういった作用が C-peptide が不足する 1 型糖尿病にのみ有効と考えているが、われわれは 2 型糖尿病でも糖尿病合併症改善効果が期待できる事を示唆する結果を得ている。C-peptide の細胞内シグナル伝達機構については、リセプターが不明であり、糖尿病合併症治療に有用な機序がはっきりとは示されていない C-peptide 研究が長年停滞している第一の理由は、その効果を証明するレセプターが見つかっていないことである。近年、セントルイス大学のグループが the deductive ligand-receptor matching strategy 法を用い、C-peptide は Orphan receptor である GPR146 の ligand となり得ることを示した。しかしながら GPR146 のシグナル伝達機構がこういった機序で糖尿病合併症治療に、結びつくのかについては未だ想像の域を出ていない。

2. 研究の目的

本研究では、1) GPR146 を介した C-peptide の細胞内シグナル伝達機構の同定、2) 2 型糖尿病マウスを用いた C-peptide の血管・心肺運動機能への効果、そして 3) 糖尿病以外の臨床的応用としてドキシソルピシンの心臓障害抑制効果についての評価をおこなう。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト内皮細胞を主に使って C-peptide-GPR146 のシグナル伝達機構と細胞生物学的効果を明らかにする。また、in vivo で 2 型糖尿病マウスに C-peptide を投与して血管・心肺運動機能への効果を観察する。また心臓への効果について、ドキシソルピシン心筋症モデルを用いて検証する。これは AMPK 活性化がドキシソルピシンの心毒性を軽減することがすでに知られており、GPR146 発現が心臓で高いことから治療効果が期待できるからである。

4. 研究成果

平成 30 年度

実験計画では、今期は細胞培養系で C-peptide のシグナリングを解明する予定であった。まず、C-peptide はオートファジーの亢進を引き起こすことが確認された。この C-peptide によるオートファジーの亢進は、飢餓による pan-autophagy と様相が異なり、selective autophagy と考えられた。Selective autophagy による p62 の減少は

Nrf2の活性化が知られているので、この系を探索、研究した。オートファジーによるファゴソームの形成後、Nrf2の核内集積が免疫染色で認められ、その後、Nrf2のターゲットであるgenesのmRNAの増加が認められた。

令和1-2年度

前年度はC-peptideがAutophagyの亢進を引き起こしNrf2を活性化することにより種々のストレスに対する適応を起こすことを細胞培養実験で確かめた。この結果をまとめた抄録はアメリカ糖尿病学会の年次科学ミーティングに採択された。その結果を受けマウスでC-peptideが同様のNrf2の活性化を生じるかについて検討を行った。以前行った検討ではC-peptideは400 microg/kg body weightを1日2回、2日間連続で投与することにより、高血糖による血管機能異常が抑制されることが示されたので、同様の投与方法で、ラット、マウスでNrf2の下流遺伝子(Pdg, Idh1, SLC7A11, NQO1, GSTA3, Hmox1, Aldh3a1, Srxn1)の発現を測定した。大動脈、網膜、坐骨神経、心臓などを麻酔下で採取、RT-real time PCRを行った。C-peptideはこれらの組織で3-4つの下流遺伝子の発現を有意に増加させることがわかった。特にPdg, IDH1, NQO1, SXN1の発現の増加が顕著であった。

この実験結果を踏まえ、マウスを使った実験を研究計画に従って行った。

最初の実験モデルはアドリアマイシン(ドキシソルビシン)による心毒性モデルである。アドリアマイシンは抗がん剤として固形腫瘍などの各種悪性腫瘍に有効であり、臨床において使われるが、一定量以上になると心毒性を生じることが知られている。マウスを使ったモデルでは心重量の減少がみられ、アポトーシスによる心筋死と考えられている。C-peptideは培養細胞とマウスを使った実験で、Nrf2を活性化し細胞のストレス耐性をあげることが期待された。そこでアドリアマイシンの投与で生じるアポトーシスを生じるストレスを軽減され、したがって心重量が保持されることが期待された。C-peptideを体重kgあたり400microgを一日二回皮下投与を3日間続けたのちアドリアマイシンを2mg腹腔内投与した。C-peptideを投与されたマウスの心臓はされない群と比較して平均して2g重く、これは統計的に優位であった。心臓の機能検査はこの時点で可能ではなかったが、現在マウス用の心エコーが導入されているので、機会があれば追加実験をしたいと思っている。

次に2型糖尿病マウスへのC-peptideの投与実験であるが、High fat High sucrose dietの実験モデルでは6週間の投与で、インスリン抵抗性、血糖値、さらに心臓、肝臓、腎臓での組織学的変化を認めなかった。従って、少なくともこのモデルではC-peptideの効果は確認されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fan Lan, Jose M Cacicedo, Yasuo Ido	4. 巻 11
2. 論文標題 Impaired nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) metabolism in diabetes and diabetic tissues: Implications for nicotinamide related compound treatment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Lan F, Lin Y, Gao Z, Cacicedo JM, Weikel K, Ido Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of LKB1 rescues 3T3-L1 adipocytes from senescence induced by Sirt1 knock-down: a pivotal role of LKB1 in cellular aging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 18942-18956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.104052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 FAN LAN, YAN LIN, ZHENFENG GAO, PAN ZHAO, XINGYU ZHANG, YASUNAGA SHIRAISHI and YASUO IDO	4. 巻 68
2. 論文標題 Proinsulin C-Peptide Attenuates Vascular Dysfunctions by Activating Nrf2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2491-2492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db19-2491-PUB	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 FAN LAN, YAN LIN, ZHENFENG GAO, PAN ZHAO, XINGYU ZHANG, YASUNAGA SHIRAISHI and YASUO IDO
2. 発表標題 Proinsulin C-Peptide Attenuates Vascular Dysfunctions by Activating Nrf2
3. 学会等名 American Diabetes Association Scientific
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	足立 健 (Adachi Takeshi) (50231931)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・教授 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------