

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15032

研究課題名(和文)臓器連関を介した心機能制御：一酸化窒素を基軸とした糖尿病性心筋症の新たな治療戦略

研究課題名(英文) Regulation of cardiac function through inter-organ communication: Novel therapeutic strategy for diabetic cardiomyopathy through NO signaling

研究代表者

三上 義礼 (Mikami, Yoshinori)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80532671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性心筋症の早期に認められる拡張障害の原因である心筋細胞カルシウムシグナル制御破綻の分子機序解明を目的として、ストレプトゾトシン(STZ)誘導1型糖尿病モデルマウスの解析を行った。STZ投与後4週間では拡張能が低下し、心室ホスホランパン(PLN)、eNOSのリン酸化レベルが低下したものの、インスリン投与により血糖値によらず回復した。定常状態のPLNのリン酸化は、インスリン-NO-PKG経路によって維持されることを見出した。インスリン作用不足によるPLNリン酸化レベルの低下が、糖尿病性心筋症の発症と進展に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖尿病性心筋症早期にみられる拡張機能障害の発症に、インスリンシグナル下流NO/PKG経路の不全が寄与することを見出したものである。糖尿病性心筋症の早期ステージにおけるカルシウムシグナルの制御機構破綻の分子機序を明らかにしたという学術的意義がある。同時に、早期での治療介入の重要性、および、糖尿病性心筋症の新規治療標的としてのインスリン/NO/PKGシグナル経路を示した点において社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Diabetic cardiomyopathy (DMCM) is characterized by the left ventricular (LV) diastolic dysfunction in the early stage. We aimed to clarify the underlying mechanism of Ca²⁺ signaling defects in the early DMCM. In the diabetes mellitus model mice 4 weeks after intraperitoneal streptozotocin injection (STZ-4W), diastolic function was impaired without systolic dysfunction. In the ventricle of STZ-4W mice, the phosphorylation levels of phospholamban (p-PLN) and eNOS (p-eNOS) were significantly lower than that of control mice. The chronic insulin administration restored the ventricular p-PLN and p-eNOS levels and diastolic function in vivo. We further found that insulin/NO/PKG signaling is involved in maintaining the basal level of phosphorylated PLN. These effects were not correlated with blood glucose level. These results indicate that the reduction of p-PLN level caused by loss of insulin signaling is crucial for LV diastolic dysfunction in the early onset of DMCM.

研究分野：生理学・薬理学

キーワード：糖尿病性心筋症 拡張機能障害 一酸化窒素 インスリン カルシウム ホスホランパン 心腎連関
糖尿病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病と心不全は共に増加傾向にあり、大きな社会問題となっている。糖尿病は心不全の重要な危険因子であり、糖尿病治療の目標は血糖値の低下のみならず、心不全も含めた合併症の発症・進展を抑制し、健康な人と変わらない日常生活の質 (QOL) の維持、寿命の確保をすることである。しかし、近年まで、厳格な血糖管理による糖尿病患者での心血管イベント抑制や心不全発症抑制を示す明確なエビデンスは得られておらず、診断・治療法は確定していない。糖尿病の合併症は臓器連関による代謝恒常性システムの破綻によって起きることが明らかになってきており、臓器連関の観点から、糖尿病に起因する心不全の発症機序の解明と治療戦略の創出が重要となっていた。

(2) 「糖尿病性心筋症」は冠動脈硬化の合併を認めない、糖尿病に起因する心機能障害と定義される。病態の特徴として、早期に左室拡張機能障害が認められ、代償機構を通じて心室性不整脈や心房細動のリスクが増加し心不全に至る臨床経過をたどる。糖尿病性心筋症の病態は、 Ca^{2+} 制御の破綻、心筋の線維化、ギャップ結合の異常により拡張障害や興奮伝導障害が起こることが報告されている。左室拡張不全は心筋細胞内 Ca^{2+} シグナル制御の破綻に起因すると指摘されているが、発症メカニズムは不明な点が多く、治療法も確立していない。研究代表者は、研究開始当初、インスリンシグナルの破綻から一酸化窒素 (NO) シグナルを介して、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みを抑制する機序が関与する現象を見出した。そこで、「糖尿病性心筋症は、臓器連関を介した NO シグナルによる心機能制御の破綻により発症する」との仮説を検証するために研究計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、糖尿病性心筋症早期ステージにみられる拡張機能障害の原因と考えられる Ca^{2+} シグナル制御破綻の機序解明を目的とする。 Ca^{2+} シグナル制御蛋白、NO シグナルを介した分子機序に着目し、糖尿病性心筋症発症の分子機序解明をめざす。さらに、NO シグナルを標的とした糖尿病性心筋症の新しい治療標的の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本実験は、東邦大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した。マウス C57BL/6J オス 8 週齢 (日本クレア) にストレプトゾトシン (STZ) を 180 mg/g 体重にて腹腔内投与し、1 型糖尿病モデルマウスを作成した。体重・血糖値を測定し、STZ 投与 1 週間後に血糖値が 400 mg/dL を超えた個体について糖尿病モデルとして解析に用いた。なお、コントロール個体は、溶媒である 0.1% クエン酸バッファー pH5.0 / 生理食塩水のみを投与した同性・同週齢の個体を用いた。STZ 投与 4 週後、8 週後で解析を実施している。

(2) 心機能について超音波診断装置 (Sonoscape) を用いて心エコーを測定し、M モード、パルスドプラ法により拡張・収縮機能を定量した。組織学的解析については、マウスを 4% paraformaldehyde/PBS で灌流固定したのち心室を摘出し、後固定・スクロース置換を行ったあと樹脂に包埋し、凍結切片を作製した。形態はヘマトキシリン・エオジン染色で、線維化は Masson's trichrome 染色で評価した。生化学的解析については、mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で、蛋白の発現を Western blotting 法でそれぞれ定量を行った。マウスへのインスリン投与は、徐放性インスリンペレット (Linbit) をマウス皮下に留置することで実施した。

(3) マウス新生仔初代培養心室筋細胞については、生後 1~3 日のマウスから心室を摘出し、コラゲナーゼ処理で分散してから培養を実施した。

4. 研究成果

(1) 1 型糖尿病モデルマウスにおける糖尿病性心筋症の進展を心機能の観点から確認するために、心エコーを用いて評価を行った。STZ 投与後 4 週間のマウス (STZ-4W) では、左室駆出率はコントロール群と有意な差を認めなかったものの、左室拡張機能が低下するという糖尿病性心筋症早期にみられる表現型が認められた (図 1)。線維化の進展を確認するために Masson's trichrome 染色を行ったところ、このステージでは心室筋の線維化は認められなかった。STZ-

4W マウス摘出心室筋を用いて収縮・弛緩を検証したところ、コントロール群に比べて弛緩時間の延長が確認された。さらに、心筋細胞内 Ca^{2+} トランジェントを測定したところ、ピーク値の低下、ベース値の上昇、および、減衰速度の低下が認められた。以上の結果から、STZ-4W の段階では、収縮機能は保たれているものの、拡張機能障害を呈している、糖尿病性心筋症早期のステージに類似した表現型がみられることが明らかとなった。一方、STZ 投与 8 週間後 (STZ-8W) のマウスは、左室駆出率・拡張機能が共に低下していた。心室では線維化が認められ、摘出心室筋の収縮張力低下・弛緩時間延長、心筋細胞内 Ca^{2+} トランジェントのピーク値の低下、ベース値の上昇、減衰速度の低下が認められた。STZ-8W の段階では、糖尿病性心筋症ステージがさらに進展し、拡張不全に加えて収縮不全も起こっていることが示された。

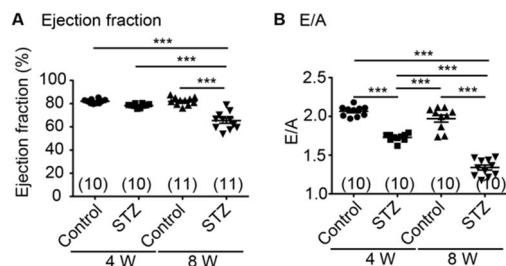


図1 心エコーによる心機能の解析 A. 左室駆出率、B. ドブラ法による拡張機能の解析

(2) 糖尿病性心筋症早期ステージにおける Ca^{2+} シグナル制御の破綻の分子機序を明らかにするために、 Ca^{2+} シグナル関連蛋白の蛋白発現量を定量したところ、筋小胞体の Ca^{2+} 再取り込みを担う SERCA の活性調節蛋白質であるホスホランパン (PLN) Ser¹⁶ の基底状態におけるリン酸化レベルが有意に低下していた (図2)。糖尿病性心筋症早期ステージで見られる拡張機能障害は、PLN-Ser¹⁶ リン酸化レベル減少に伴う SERCA 活性低下が原因となり、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込み能が低下することで引き起こされることが示唆された。

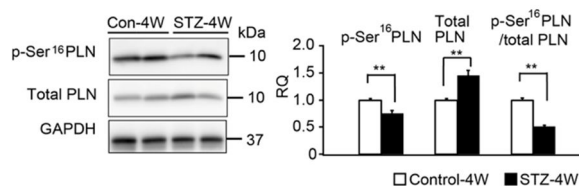


図2 Western blotting 法による phospholamban のリン酸化レベル定量

(3) 1 型糖尿病モデルマウスでは、膵臓からのインスリン分泌が起こらない。そこで、インスリン徐放性のペレットをマウス皮下に投与し、インスリンを外因性に補った際に心機能が回復するかを確認した。インスリンの投与により、STZ-4W マウスの血糖値は低下したが、一部で血糖値が高いままの個体もみられた。拡張機能の回復について心エコーで解析したところ、インスリン投与により血糖値が低下した個体で、拡張の回復がみられた。さらに興味深いことに、血糖値が下がらなかった群でも拡張機能が回復していた。さらに、インスリン持続投与により PLN リン酸化レベルも回復した (図3)。糖尿病性心筋症早期において、膵インスリン分泌不全によって起こる基底状態の PLN リン酸化レベル低下が拡張機能障害の引き金となることが示唆された。

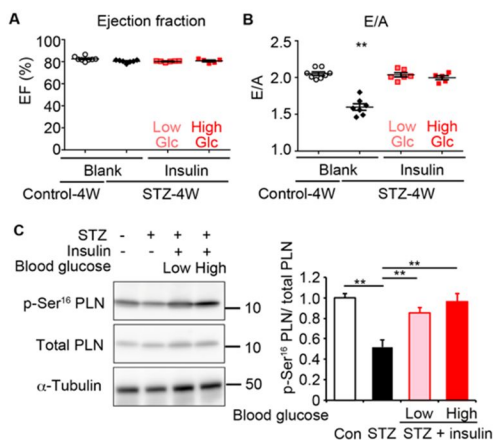


図3 インスリン投与による心機能 (A)・PLN-Ser¹⁶ リン酸化レベルの回復 (B)

(4) 拡張機能障害を引き起こすシグナル経路をより詳細に検証するために、マウス新生仔初代培養心室筋細胞を用いて PLN のリン酸化レベルを定量した。NO ドナー化合物 NOC7 存在下ではリン酸化レベルが上昇し、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME、および、PKG 阻害薬 KT5823 存在下でそれぞれ PLN のリン酸化レベルの低下が認められた。さらにインスリン受容体下流のシグナルとして内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) - Ser¹¹⁷⁷ のリン酸化レベルを解析したところ、STZ-4W マウス心室ではコントロールマウス心室に比べて有意に低下しており、インスリン投与により回復が見られた (図4)。以上の結果から、インスリンは、eNOS の活性化を介して惹起される NO/sGC/PKG 経路によって PLN リン酸化を基底状態レベルに維持することで拡張能を回復させたことが示唆された。

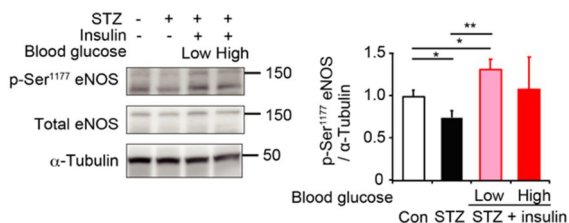


図4 糖尿病モデルマウス心室における eNOS-Ser¹¹⁷⁷ のリン酸化レベルの低下とインスリン投与による回復

(5) これまでの結果をまとめると、非糖尿病心では定常状態のインスリンが NO/PKG 経路を介して PLN-Ser¹⁶ リン酸化レベルを維持しており、正常な Ca²⁺シグナルが保たれると考えられる (図 5 左)。一方、1 型糖尿病に起因した糖尿病心筋症の早期ステージでは、インスリン作用不足による NO/PKG シグナルの低下、PLN-Ser¹⁶ リン酸化レベルの減少が起こり、Ca²⁺ポンプ SERCA2 を介した Ca²⁺取り込み能が低下している。その結果左室拡張機能不全が引き起こされることが示唆された (図 5 右)。インスリン作用不足に起因した PLN-Ser¹⁶ リン酸化レベル低下が、糖尿病性心筋症の発症と進展のキーステップであると考えられる。

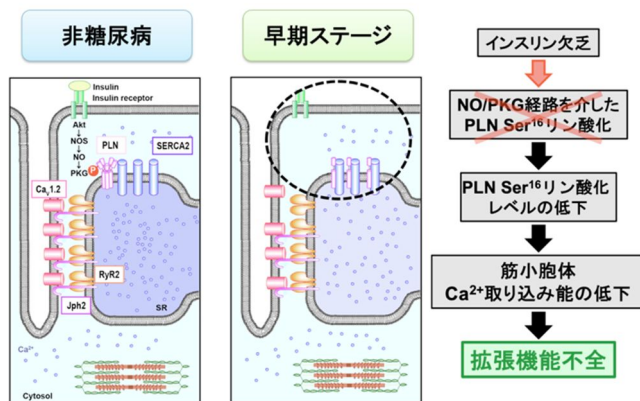


図 5 糖尿病性心筋症の進展メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大島大輔、三上義礼、赤羽悟美	4. 巻 52
2. 論文標題 インスリン分泌制御における脂質代謝 - 細胞内カルシウムシグナル関連機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 386-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三上義礼	4. 巻 152
2. 論文標題 神経細胞の生死を司るガスメディエーターの病態生理学的役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 233-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.152.233	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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 三上義礼、伊藤雅方、富田太郎、大島大輔、赤羽悟美
2. 発表標題 糖尿病性心筋症早期ステージにおける左室拡張機能障害と心腎関連機構
3. 学会等名 第30回 日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Tomida T, Ohshima D, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Cardioprotective effect of insulin on left ventricular diastolic dysfunction of diabetic cardiomyopathy through direct and indirect pathways
3. 学会等名 National Institute for Physiological Sciences International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三上義礼、赤羽悟美
2. 発表標題 心 - 腎連関を介した心機能の恒常性維持機構
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Tomida T, Ohshima D, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Mislocalization of junctophilin2 in the ventricular cardiomyocytes of diabetic cardiomyopathy model mice
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikami Y, Hamaguchi S, Ito M, Murakami S, Namekata I, Tomida T, Ohshima D, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Impaired insulin signaling is responsible for left ventricular diastolic dysfunction in the early stage of diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三上義礼、瀧口正悟、伊藤雅方、村上慎吾、行方衣由紀、富田太郎、大島大輔、田中光、赤羽悟美
2. 発表標題 糖尿病性心筋症の発症・進展に関わる因子 - Ca ²⁺ シグナル制御の破綻とその分子機序
3. 学会等名 第141回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三上義礼、瀧口正悟、伊藤雅方、村上慎吾、行方衣由紀、富田太郎、大島大輔、田中光、赤羽悟美
2. 発表標題 インスリンシグナル破綻に伴う1型糖尿病に合併した心筋症発症の分子機序
3. 学会等名 第29回 日本循環薬理学会・第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikami Y, Hamaguchi S, Ito M, Murakami S, Namekata I, Tomida T, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Loss of insulin signaling gives rise to diastolic dysfunction in the early stage of diabetic cardiomyopathy in T1DM model mice
3. 学会等名 Cardiovascular and Metabolic Week 2019 (CVMW2019); The 36th Annual Meeting of the Japanese Section (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Tomida T, Ohshima D, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 The molecular mechanism of the Ca ²⁺ signaling defects underlying ventricular diastolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Tomida T, Ohshima D, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Contribution of the loss of insulin signaling to diastolic dysfunction in the early onset of diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Hamaguchi S, Murakami S, Tomida T, Namekata I, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Defective Ca ²⁺ signaling contributes to diastolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上義礼
2. 発表標題 糖尿病に合併する心筋症 — 糖尿病性心筋症の病態生理 —
3. 学会等名 第36回 内分泌代謝学サマーセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Hamaguchi S, Murakami S, Tomida T, Namekata I, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Mechanisms for Ca ²⁺ signaling defects underlying diastolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikami Y, Yamazawa, T
2. 発表標題 Coffee polyphenol chlorogenic acid protects neurons against glutamate neurotoxicity
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Hamaguchi S, Murakami S, Tomida T, Namekata I, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Molecular mechanism of diastolic dysfunction in the early stage of diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上義礼, 伊藤雅方, 瀧口正悟, 村上慎吾, 富田太一郎, 大島大輔, 行方衣由紀, 田中光, 赤羽悟美
2. 発表標題 糖尿病性心筋症早期ステージにおけるHFpEFの分子機序
3. 学会等名 平成30年度生理学研究所研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上義礼, 伊藤雅方, 瀧口正悟, 村上慎吾, 富田太一郎, 大島大輔, 行方衣由紀, 田中光, 赤羽悟美
2. 発表標題 糖尿病性心筋症の病態進展に寄与するCa ²⁺ シグナル制御破綻の分子機序
3. 学会等名 第28回 日本循環薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikami Y, Ito M, Hamaguchi S, Murakami S, Tomida T, Namekata I, Tanaka H, Adachi-Akahane S
2. 発表標題 Insulin signaling deficiency is responsible for diastolic dysfunction of diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三上義礼, 伊藤雅方, 瀧口正悟, 村上慎吾, 富田太一郎, 大島大輔, 行方衣由紀, 田中光, 赤羽悟美
2. 発表標題 糖尿病に起因した心室拡張障害の分子機序
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東邦大学医学部生理学講座統合生理学分野ホームページ https://www.toho-u.ac.jp/med/lab/lab_uniphysio.html 東邦大学教育・研究業績データベース https://gyoseki.toho-u.ac.jp/</p>

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

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
---------	---------