

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15908

研究課題名(和文) 糖尿病合併心不全における心筋のAktの役割の解明

研究課題名(英文) The role of cardiomyocyte Akt in diabetic cardiomyopathy

研究代表者

添田 光太郎 (Soeda, Kotaro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：20748347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：診療技術の進歩などにより糖尿病患者の死因として冠動脈疾患は減少したが、心不全は減少していない。このことは糖尿病患者の心筋で血液灌流以外に障害が存在することを示唆している。本研究ではその病態解明のため、糖尿病動物の心筋で観察されるAktの活性化障害に着目した。筋肉特異的Akt1/2欠損マウスは心筋重量の低下とミトコンドリアの異常を伴う重症心不全を発症し、さらにAktシグナルの下流を負に制御する因子であるTSC2およびFoxO1/4を追加して欠損させるとそれぞれ心不全の改善を認めた。これらのことから心筋においてAkt-TSC2およびAkt-FoxO1/4シグナルが重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来から糖尿病には狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患が合併することが知られていたが、それらの診療技術の進歩もあり、現在では大血管による血液灌流によらない糖尿病合併心不全の病態解明が求められている。また、古典的インスリン標的臓器のほかに心筋でもインスリン抵抗性が惹起されることが明らかになっており、本研究ではインスリンシグナルの中心的伝達因子と考えられているAktとその下流に着目し、心不全発症との関連性を分子生物学的手法で明らかにした。このことは、心筋におけるFoxOやTSC2-mTORC1シグナルへの介入が同病態への治療となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Because of development of diagnosis and treatments of coronary heart disease (CHD), the number of diabetes patients who die from CHD have decreased in recent years. However, the total number of diabetes patients who die from heart failure has not decreased yet in Japan. This epidemiology suggest some putative mechanisms of diabetic cardiomyopathy beyond inadequate perfusion by coronary artery stenosis. On the other hand, several research revealed that cardiomyocyte insulin resistance was found in diabetic model animals. Therefore, we ablated Akt in myocyte as an animal model of diabetic heart failure so that we found that muscle-specific Akt deficient mice exhibit severe heart failure with significant decreased mass of heart and mitochondrial dysfunction. Moreover, additive knock-down of TSC2 or FoxO1/4 ameliorated severity of heart dysfunction in vivo. These results suggest that cardiomyocyte Akt has a pivotal role in remaining normal heart function via TSC2 and FoxO1/4.

研究分野：糖尿病

キーワード：心不全 糖尿病 チロシンキナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病とはインスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とする代謝症候群であり、現代においては、重症の高血糖による口渴・多飲・多尿はもとより、むしろ慢性的な高血糖に伴う多種多様な合併症の発症を防ぐことが糖尿病治療の最も重要な目的であると広く認識されている。

糖尿病の合併症は、従来から関連が明らかとされていた神経障害、網膜症、腎症といった細小血管合併症に加え、大血管合併症や癌、認知症も糖尿病との関連が明らかになってきた。一般に大血管合併症とは冠動脈疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患であり、特に冠動脈疾患は致死性病態を含むものとして筆頭に挙げられることが多い。

実際、Finnish Study では、糖尿病患者の心筋梗塞初発率が心筋梗塞の既往を有する非糖尿病患者の再発率と同等であることが示され (Steven M. Haffner, et al. N Engl J Med 1998; 339:229-234)、糖尿病罹患と冠動脈疾患発症との濃厚な関連性が明らかになり、現在に至るまで冠動脈疾患の早期発見と適切な治療が重点的に進められてきた。

そのような取り組みの結果のひとつとして、本邦の糖尿病患者の死因調査においては冠動脈疾患で死亡する糖尿病患者は減少してきているが、惜しむべきこととして心不全全体の死亡者数は減少していない (Nakamura J, Ueki K, et al. J Diabetes Investig. 2017 May;8(3):397-410.)。このことは、本邦の糖尿病合併心不全の患者には冠動脈疾患のような血液灌流の障害以外に致死的状态に発展させるような病態が存在していることを示唆している。

そもそも糖尿病における心疾患は、上記のように大血管合併症としての冠動脈硬化、また高血圧・脂質異常・腎機能障害・肥満など動脈硬化危険因子の重積、糖尿病性神経障害に関連する無症候性心筋虚血などを特徴とするが、以前から心筋内エネルギー代謝障害および微小循環障害による収縮能、線維化を伴う拡張能の低下も関連していることが指摘されていた。このような病態として、動脈硬化や冠動脈狭窄を伴わない糖尿病合併心不全は従来から Diabetic cardiomyopathy (糖尿病性心筋症) として知られていた (Rubler, et al. Am J Cardiol, 30, 595-602) が、その重要性は冠動脈疾患の診療技術が進歩した現代においてさらに増していると考えられる。

## 2. 研究の目的

冠動脈疾患の診断・治療技術の進歩を糖尿病患者の心不全死の減少にまで結びつけるため、上記のような血液灌流を受ける心筋そのもののエネルギー代謝障害の病態解明が重要であると考え、糖尿病モデルマウスおよび下記に述べるように筋肉においてインスリンシグナル伝達因子 Akt を欠損したマウス (MCK-Cre; Akt1/2-floxed) の心臓に生じる障害とそのメカニズムを解明することを目標とした。

## 3. 研究の方法

まず、野生型マウス (C57B16) をインスリン分泌不足や高脂肪食により糖尿病モデル動物とし、超音波イメージングにより心機能の変化が生じるかを検討した。

次に以下のマウスを作製した。MCK-Cre; Akt1/2 floxed マウスは横紋筋特異的に発現する MCK (myosin creatinine kinase) プロモーター依存的に Akt1 と Akt2 を欠損するマウスであり、心筋・骨格筋特異的に Akt1、Akt2 の発現が著明に低下する。このマウスを以下に mDK (Akt1/2) と呼ぶ。

そして、Akt に制御される因子として TSC2, FoxO1/4 を追加して欠損させるべく、MCK プロモーター依存的 Cre を用いて flox を追加し、mTK (Akt1/2 TSC2)、mQK (Akt1/2 FoxO1/4) を作製し表現型を解析した。

さらに出生時から発現する MCK とは異なり、成獣から薬剤誘導性かつ心筋特異的に Cre を発現する aMHC-MerCre を用いて同様の遺伝子改変を行い、表現型解析を行った。

## 4. 研究成果

まず、野生型マウス (C57B16) をインスリン分泌不足や高脂肪食により糖尿病モデル動物とし、超音波イメージングにより心機能の変化が生じるかを検討した。

まず高用量ストレプトゾトシン (STZ) を投与してインスリン分泌不全型糖尿病を惹起すると、超音波イメージングで FS (Fractional shortening) が有意に低下した。このマウスでは血中インスリン濃度が低下し、血糖値が著明に上昇するが、心筋で主要なインスリンシグナル伝達因子である Akt のリン酸化も低下していた。

また、高脂肪食負荷と少量の STZ 投与を組み合わせると、普通食給餌マウスと血中インスリン濃度は同等であるにも関わらず、全身のインスリン抵抗性に伴い著明な高血糖を発症するマウスを作成できる。普通食コントロールマウス (NC-nonSTZ) と高脂肪食コントロールマウス (HFD-nonSTZ) および上記モデルマウス (HFD-STZ) を比較すると、NC-nonSTZ, HFD-nonSTZ においては FS が保たれていたが、HFD-STZ のみ FS が有意に低下した。そして興味深いことに心筋の Akt のリン酸化レベルも FS と同様のプロファイルをとっていた。

以上のことから心筋の Akt の活性化は心筋収縮能の維持に関連している可能性が示唆され、Cre-LoxP システムを用いて筋肉特異的 Akt 欠損マウスを作製した。

MCK-Cre; Akt1/2 floxed マウスは横紋筋特異的に発現する MCK (myosin creatinine kinase) プロモーター依存的に Akt1 と Akt2 を欠損するマウスであり、心筋・骨格筋特異的に Akt1、Akt2 の発現が著明に低下する。このマウスを以下に mDK (Akt1/2) と呼ぶ。

mDK (Akt1/2) は著明な FS の低下をきたし、多量の胸水を伴って 4-5 週令で死亡した。心筋重量

は有意に減少し、心筋壁は菲薄化しており、ANP、BNP、MHC の発現が著明に上昇していた。心臓の短軸断面で筋線維横断面 これらのことから mDK(Akt1/2)は重症の拡張型心筋症の表現形を有することが明らかになった。心筋組織サンプルを用いた RNA シーケンス解析では多くの OXPHOS 関連因子との関連が示唆され、ミトコンドリア DNA コピー数は低下していた。実際に心筋断面を透過型電子顕微鏡で観察するとミトコンドリアの密度の低下が明らかであったのに加え、クリステの浮腫など内部構造の異常も顕著に認められた。ミトコンドリア画分のウェスタンブロットングではシトクロム c の低下が認められ、Akt シグナルの低下によりミトコンドリアからのシトクロム c の放出が惹起されている可能性が示唆された。

以上のように Akt シグナルの下流には複数のシグナル伝達経路が存在することが知られているが、mDK(Akt1/2)マウスの心筋重量が顕著に減少することに着目し、TSC2-mTORC1 シグナルの低下を改善するため、Akt1、Akt2 に加えて TSC2 を欠損させることにした。TSC2 は mTORC1 シグナルを抑制する伝達因子であるので、追加して欠損することにより mTORC1 シグナルの低下が解除される。このマウスを MCK-Cre; Akt1/2 TSC2 triple floxed マウスとして作成した。これを以下に mTK(Akt1/2 TSC2)と呼ぶ。mTK(Akt1/2 TSC2)は心筋重量が正常レベルまで回復し、生存期間は中央値 1.5 年程度まで著明に延長した。超音波イメージングでは心室壁厚と FS が改善し、ミトコンドリア DNA コピー数の低下も改善を認めた。

以上のように mTK(Akt1/2 TSC2)は mDK(Akt1/2)で認められる mTORC1 シグナルの低下を改善し、組織重量とミトコンドリアの量的異常を代表とする多くの異常が改善するが、電子顕微鏡ではミトコンドリアの内部構造の異常の改善は十分でなかった。このことに注目し、FoxO シグナルに介入することにした。一般的に Akt-FoxO シグナルの担う効果にはシトクロム c 放出を經由するアポトーシスシグナルが含まれていると考えられており、ミトコンドリアの質的異常に関与する可能性が考えられた。FoxO 転写因子は Akt の活性化が不足すると核内にとどまり、ターゲット遺伝子の転写を促進するので、Akt1、Akt2 に加えて FoxO を欠損させると Akt-FoxO シグナルを回復することができる。これを MCK-Cre; Akt1/2 FoxO1/4 quadruple floxed マウスとして作成した。これを以下に mQK(Akt1/2 FoxO1/4)と表記する。mQK(Akt1/2FoxO1/4)は統計学的有意に FS の改善を認め生存期間は延長した。透過型電子顕微鏡ではミトコンドリアの形態異常の改善が認められ、ミトコンドリア画分のウェスタンブロットングではシトクロム c の減少が改善した。これらの変化は心筋重量の低下の改善やミトコンドリア DNA コピー数低下の改善よりも顕著であり、Akt-FoxO シグナルはミトコンドリアの質的制御により心機能を維持しているものと考えられた。

このような Akt1/2-TSC2/mTORC1 シグナル、または Akt1/2-FoxO1/4 シグナルによる心機能の制御は、薬剤誘導性・心筋特異的 Cre トランスジェニックマウス (amHC-MerCre) においても再現され、成獣における両シグナルの重要性が示唆された。

amHC-MerCre を用いた多重欠損動物については、amHC-MerCre;Akt1/2 flox (amDK(Akt1/2)), amHC-MerCre;Akt1/2 TSC2 flox(amTK(Akt1/2 TSC2)), amHC-MerCre;Akt1/2 FoxO1/4 flox (amQK(Akt1/2 FoxO1/4))の比較を行った。形態学的には amDK(Akt1/2)は mDK(Akt1/2)と同様に心筋壁の菲薄化と FS の低下を伴う拡張型心筋症様の表現型を呈した。また、amDK(Akt1/2)は透過型電子顕微鏡でミトコンドリアの内部構造の異常が顕著に認められた。そして、amTK(Akt1/2 TSC2)では amDK(Akt1/2)と比較して心筋壁厚減少の改善と FS 低下の改善を認めた一方で、amQK(Akt1/2 FoxO1/4)では心室壁厚の改善は明らかでなかったものの FS の改善を認めた。amQK(Akt1/2 FoxO1/4)は透過型電子顕微鏡でミトコンドリアの形態異常が顕著に改善しており、やはり mQK(Akt1/2 FoxO1/4)と mDK(Akt1/2)の比較で認められた通り、Akt1/2-FoxO1/4 シグナルで制御されているミトコンドリアの機能の改善によって収縮能が改善した可能性が示唆された。

以下、本研究で得られた結果を考察する上で、上述のように動脈硬化や冠動脈狭窄を伴わない糖尿病合併心不全を糖尿病性心筋症と呼ぶ。糖尿病性心筋症の主たる特徴は早期に心肥大や拡張機能障害が生じることであり、その後心室リモデリングを経て心不全に至るのが典型的とされているが、心不全症状のない糖尿病患者で収縮能障害の存在を示唆する報告もある (Diabetes Res Clin Pract, 101, 309-316., J Am Soc Echocardiogr, 23, 1266-1272. Am Coll Cardiol, 41, 611-617)。また、心室リモデリングによる線維化や肥大心筋といった形態的特徴は一般的に不可逆であることや、2 型糖尿病の自然史として発症早期はインスリン抵抗性による高インスリン血症を呈し、罹患歴が長期化するとインスリン分泌が低下すること、またアジア人は欧米人と比較してインスリン分泌の代償的亢進が少ないことなどを考慮すると、本研究で得られた成果のうち、少なくとも Akt による心筋のミトコンドリア機能の制御は糖尿病合併心不全の臨床における重要性を有する可能性が示唆されたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋におけるAktの役割の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋におけるAktの役割の解明
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋においてAktの果たす役割の解明
3. 学会等名 第33回日本糖尿病合併症学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋においてAktの果たす役割の解明
3. 学会等名 第69回日本体質医学界総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋においてAktの果たす役割の解明
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋におけるAktの役割の解明
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 添田光太郎、小林直樹、生島芳子、戸田郷太郎、笹子敬洋、中野美和、尾山千夏、野田哲生、門脇孝、植木浩二郎
2. 発表標題 心筋におけるAktの役割の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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