

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590161

研究課題名（和文） 標識脂肪酸及び糖を用いた糖尿病性心筋症と不全心筋のエネルギー変化  
研究課題名（英文） Fatty acid metabolism of diabetic cardiomyopathy and failing heart

研究代表者

渡辺 賢一（WATANABE KENICHI）

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175090

研究成果の概要（和文）：

糖尿病性心筋症や不全心筋のエネルギー変化を画像化することを目的とした。脂肪酸代謝機能を評価する標識薬剤として [I-131]9MPA を、糖代謝機能を評価する薬剤として [C-14]2DG を、交感神経機能として [I-125]MIBG をそれぞれ用いた。心不全モデルラット・糖尿病モデル DN14-3-3 トランスジェニックマウスを作成し、代謝異常と遺伝子異常を検討中した。

（1）自己免疫性心筋炎後心不全モデルラット・糖尿病モデル DN14-3-3 トランスジェニックマウスを作成した。8週齢 Lewis ラットに精製したブタの心筋ミオシンを後足の皮下に注射し、感作すると自己免疫性心筋炎が発症する。我々の方法では疾患発症率が100%である。炎症により傷害され脱落した心筋組織は線維組織で置換され、慢性期には心室拡張と心機能低下により拡張型心筋症類似の病態となる。DN14-3-3 トランスジェニックマウスにストレプトゾトシンを投与し糖尿病マウスを作成した。血糖値が正常マウス 100mg/dl から約 300-500mg/dl に上昇した。

（2）血行動態を測定・心エコー検査を行った。心不全ラットでは、吸入麻酔下に各群ラットの頸静脈と大腿からカニューレを挿入し、血行動態測定装置でそれぞれの心拍数・血圧・中心静脈圧・左室収縮圧・左室拡張末圧・心筋収縮力を測定すると、明らかに病態モデルと正常モデルで差がみられた。各群ラットの心エコー検査を行い、心室壁厚・心室内径・心筋の収縮力測定による心機能評価も同様であった。

（3）モデル動物に、[I-131]9MPA・[C-14]2DG・[I-125]MIBGを投与し、画像化（TLC像・BAS5000画像・病理組織像など）した。不全心筋では、9MPA・MIBGの取り込みが低下し2DGの増加が見られた。

研究成果の概要（英文）：

It is unclear how drug therapy exerts its effects on left ventricular remodeling and cardiac sympathetic nerve function in diabetic cardiomyopathy and failing heart. We determined cardiac function, left ventricular remodeling, and cardiac sympathetic nerve function with iodine-125-labeled metaiodobenzylguanidine. Diabetic or myocarditis animals showed increased left ventricular pressure, central venous pressure, and decreased rate of isovolumetric contraction. Long-chain fatty acids are major cardiac energy

substrates, and decreased myocardial fatty acid metabolism using I-labeled 9-pentadecanoic acid has been demonstrated in diabetic cardiomyopathy and failing heart. Long-term drug treatment not only prevented left ventricular remodeling and improved cardiac function in rat with diabetic and dilated cardiomyopathy, but also restored cardiac sympathetic tone to hold norepinephrine in the heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学、標識脂肪酸

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は心血管系の重要なリスクファクターであり、非糖尿病患者に比べて糖尿病患者では心血管死亡発生率が約7倍高い。糖尿病患者に見られる、血糖・インスリン・脂質の高値は血管だけでなく心筋にも障害を与える。冠動脈に異常が見られない拡張型心筋症の多くに耐糖能異常が見られることや、心筋障害・線維化は活性酸素やアポトーシスが関係することが報告されているが、このメカニズムは不明点が多く解明が待たれている。14-3-3蛋白は、多くの蛋白結合が知られているにもかかわらず生物学的作用はまだ解明されていない。プロテインキナーゼ活性化分裂誘発物質(MAPK)群のP38 MAPK・c-jun NH2末端キナーゼ(JNK)・Kinase 1/2調節細胞外シグナル(ERK1/2)は、細胞の寿命決定において重要な役割を果たしており、様々なストレスに対する反応において心筋細胞での生存シ

グナルと関係する。

一方、臨床現場では病態解明や心臓障害の程度を心臓血流量・エネルギー獲得機能・心臓交感神経機能等の複数の機能検査を行うことにより診断が行われている。基礎研究(動物実験)では、これら複数の機能をRIを用いて単独/同時に評価する試みが検討されている。

### 2. 研究の目的

糖尿病モデルの心筋組織における14-3-3蛋白・MAPK(P38, JNK, ERK)・活性酸素(GSHP x、Protein Carbonylなど)・アポトーシスと心筋脂肪酸代謝・糖代謝・交感神経機能の関係とRIの有用性を明らかにする。更に、治療による変化を検討することにより高血糖の心臓障害のメカニズムも明らかにする。

### 3. 研究の方法

心臓のエネルギー獲得機能を評価する薬剤としてβ酸化が阻害されるように分子設計

された標識脂肪酸[I-131]9MPA

(15-(p-[I-131]Iodophenyl)-9-methylpentadecanoic Acid)・糖代謝の途中で反応が阻害されるように分子設計された標識糖 [C-14]2DG

(2-Deoxy-D-(1-[C-14])glucose)・交感神経機能として[I-125]MIBG

(metaiodobenzylguanidine)を用いる。

9MPA は途中で  $\beta$  酸化が阻害されるようにドラッグデザインされた標識脂肪酸で、3回 $\beta$ 酸化を受けた後の中間代謝物

9-(p-Iodophenyl)-3-methylnonanoic Acid (3MNA) と $\alpha$ 酸化後に再度 $\beta$ 酸化を受けて最終代謝物となった p-iodophenylacetic

Acid(PIPA)が検出可能である。2DG はグルコースの2位の炭素原子が脱酸素化した化学構造を持ち、グルコースと同一機序で挙動するが、途中の段階

(2-Deoxy-D-(1-[C-14])glucose-6-phosphate(DG-6-P))で代謝が停止しそれ以降の代謝が進行しない標識糖である。これら2種の標識薬剤を用いて心臓の a) 集積性の経時変化実験、b) 代謝物分析実験、c) オートラジオグラフの作製、および d) 組織病理標本の作製等を行う。これらより得られる各標識薬剤の集積性、局所集積の画像および組織学的所見等より様々な状態にある心臓機能をエネルギー獲得系から数値化していく。更にMIBGを加えた各種薬剤を混合し同時投与する実験も行い、同一個体による脂肪酸代謝機能・糖代謝機能・交感神経機能の数値化も併せて検討していく。

以上を総合的に検討し、糖尿病モデルの心筋組織における 14-3-3 蛋白・

MAPK (P38, JNK, ERK)・活性酸素 (GSHPx、Protein Carbonyl など)・アポトーシスと心筋脂肪酸代謝・糖代謝・交感神経機能の関係と RI の有用性を明らかにする。更に、治

療による変化を検討することにより高血糖の心臓障害のメカニズムも明らかにする。

#### 4. 研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(1) 自己免疫性心筋炎後心不全モデルラット・糖尿病モデル DN14-3-3 トランスジェニックマウスを作成した。8週齢 Lewis ラットに精製したブタの心筋ミオシンを後足の皮下に注射し、感作すると自己免疫性心筋炎が発症する。我々の方法では疾患発症率が100%である。炎症により傷害され脱落した心筋組織は線維組織で置換され、慢性期には心室拡張と心機能低下により拡張型心筋症類似の病態となる。DN14-3-3 トランスジェニックマウスにストレプトゾトシンを投与し糖尿病マウスを作成した。血糖値が正常マウス 100mg/dl から約 300-500mg/dl に上昇した。

(2) 血行動態を測定・心エコー検査を行った。心不全ラットでは、吸入麻酔下に各群ラットの外頸静脈と大腿からカニューレを挿入し、血行動態測定装置でそれぞれの心拍数・血圧・中心静脈圧・左室収縮圧・左室拡張末圧・心筋収縮力を測定すると、明らかに病態モデルと正常モデルで差がみられた。各群ラットの心エコー検査を行い、心室壁厚・心室内径・心筋の収縮力測定による心機能評価も同様であった。

(3) モデル動物に、[I-131]9MPA・[C-14]2DG・[I-125]MIBG を投与し、画像化 (TLC 像・BAS5000 画像・病理組織像など) した。不全心筋では、9MPA・MIBG の取り込みが低下し 2DG の増加が見られた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Wawaimuli A, K Watanabe, et al. Carvedilol-afforded protection against daunorubicin-induced cardiomyopathic rats in vivo: effects on cardiac fibrosis and

- hypertrophy. ISRN Pharmacology. 2011 (in press).
2. S Mito, K Watanabe, et al. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. Biol. Pharm. Bull. 2011 (in press)
  3. Flori R. S, K Watanabe, et al. M Harima, Carvedilol attenuates inflammatory-mediated cardiotoxicity in daunorubicin-induced rats. Pharmaceuticals. 2011; 4:551-566..
  4. Rajarajan AT, K Watanabe, et al. Role of 14-3-3 protein mediated nuclear factor- $\kappa$ B signaling in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. Free Radical Research. 2011 (in press).
  5. Vijayakumar S, K Watanabe, et al. Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and cardiac inflammatory mediators in rats with heart failure induced by experimental autoimmune myocarditis. International Journal of Biological Sciences. 2011;7:154-167.
  6. Wawaimuli A, K Watanabe, et al. Telmisartan prevents the progression of renal injury in daunorubicin rats with the alteration of angiotensin II and endothelin-1 receptor expression associated with its PPAR  $\gamma$  agonist actions. Toxicology. 2011;279,91-99.
  7. Suzuki K, Watanabe K, et al. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. Pathology International. 2011 (in press).
  8. Lakshmanan AP, Watanabe K, et al. Telmisartan attenuates oxidative stress and renal fibrosis in streptozotocin induced diabetic mice with the alteration of angiotensin-(1-7) mas receptor expression associated with its PPAR- $\gamma$  agonist action. Free Radical Research. 2011 (in press).
  9. Suzuki K, Watanabe K, et al. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. Pathology International. 2011; 10: 1440-1450.
  10. Vijayakumar S, K Watanabe, et al. Telmisartan ameliorates experimental autoimmune myocarditis associated with inhibition of inflammation and oxidative stress. European Journal of Pharmacology. 652:126-135 (2011).
  11. Rajarajan A, T, K Watanabe, et al. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in dominant negative p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase mice. Free Radical Biology and Medicine. 2010; 49: 1422-1431
  12. K Watanabe, et al. Role of Differential Signaling Pathways and Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy. Current Cardiology Reviews. 2010; 6: 280-290.
  13. Flori R Sari, Watanabe K et al. 14-3-3 Protein Protects Against Cardiac Endoplasmic Reticulum Stress (ERS) and ERS-Initiated Apoptosis in Experimental Diabetes. J Pharmacol Sci. 2010; 113: 325-334.
  14. Punniyakoti T V, K Watanabe, et al. Arginine vasopressin receptor antagonists 'vaptans': pharmacological tools and potential therapeutic agents. Drug Discovery Today. 2010;15: 826-841.
  15. Flori R Sari, Watanabe K, et al. Partial inactivation of cardiac 14-3-3 protein in vivo elicits endoplasmic reticulum stress (ERS) and activated ERS-initiated apoptosis in

- ERS-induced mice. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26:167-178.
16. Vijayakumar S, Watanabe K, et al. Beneficial effects of olmesartan, an angiotensin II receptor type 1 antagonist, in rats with dilated cardiomyopathy. *Experi Biol Med.* 2011 (in press)
17. Shimazaki H, Watanabe K, et al. The antioxidant edaravone attenuates ER-stress-mediated cardiac apoptosis and dysfunction in rats with autoimmune myocarditis. *Free Radical Research.* 2010;44:1082-1090.
18. Wawaimuli A, Watanabe K, et al. Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology.* 2010; 274: 18-26.
19. Vijayakumar S, Watanabe K, et al. Telmisartan, an angiotensin-II receptor blocker ameliorate cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Hypertension Res.* 2011 (in press).
20. Fadia AK, Watanabe K, et al. A novel phenylpyridazinone, T-3999, reduces the progression of autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Heart and Vessels.* 2011 (in press).
21. Sun X, Watanabe K, et al. Rectal administration of tranilast ameliorated acute colitis in mice through increased expression of heme oxygenase-1. *J Pathology.* 2010; 60: 93-101.
22. Wawaimuli A, WATANABE K, et al. Beneficial effects of angiotensin II receptor blocker, olmesartan, in limiting the cardiotoxic effect of daunorubicin in rats. *Free Radical Research*, 2010; Early Online, 1-9.
23. Watanabe K, et al. Role of 14-3-3 protein and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Acta Physiologica Hungarica.* 2009;96:277-287.
24. Eiji Oda, Watanabe K, et al. LDL Cholesterol is More Strongly Associated with Metabolic Syndrome in Japanese Women than in Men. *Inter Med.* 48: 1607-1614, 2009.
25. Rajarajan A, T, Watanabe K, et al. Dominant-negative p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H911-919.
26. E Oda, Watanabe K, et al., Prevalence of Metabolic Syndrome Increases with the Increase in Blood Levels of Gamma Glutamyltransferase and Alanine Aminotransferase in Japanese Men and Women. *Inter Med.* 2009; 48: 1343-1350.
27. Wawaimuli A, Watanabe K, et al. Effects of angiotensin receptor blocker on oxidative stress and cardio-renal function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 1411-1416.
28. K Tanaka, Watanabe K, et al. Long-term Carperitide Treatment Attenuates Left Ventricular Remodeling in Rats with Heart Failure after Autoimmune Myocarditis. *J Cardiovascul Pharmacol.* 2009; 54: 232-239.
29. H Tanaka, Watanabe K, et al. The effects of r-aminobutyric acid, vinegar, and dried bonito on blood pressure in normotensive and mildly or moderately hypertensive volunteers. *J Clin Biochem Nutr.* 2009; 45; 93-100.
30. Watanabe K, et al. Beneficial Effect of Food Substitute Containing L-arginine,

&Omega3-poly Unsaturated Fatty Acid, and Ribonucleic Acid in Preventing or Improving Metabolic Syndrome: A Study in 15 Overweight Patients and a Study of Fatty Acid Metabolism in Animals. J Clin Biochem Nutr. 2009; 44: 266-274.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 賢一 (WATANABE KENICHI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175090

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

馬 梅蕾 (MA MEIREI)

新潟薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20333536