

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590770
研究課題名（和文）	PPARアゴニストが高血圧・糖尿病動物モデルの心脂質量・心機能に与える影響の検討
研究課題名（英文）	Effects of PPAR-gamma agonist on lipid contents in the heart and kidney and cardiac function in hypertension/diabetes animal models
研究代表者	
	石坂 信和 (Ishizaka Nobukazu)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	20270879

研究成果の概要（和文）：アンジオテンシン II 投与ラットに PPAR- γ アゴニスト(ピオグリタゾン)を経口投与し、その効果を解析した。ピオグリタゾンは血中・心組織中の脂質量を低下した。ピオグリタゾンは虚血再灌流後の心収縮能・拡張能の低下を抑制することをランゲンドルフ体外灌流で示した。また、ピオグリタゾンは心臓維化を抑制した。ピオグリタゾンは、脂質プロファイルの改善などを介してアンジオテンシン II による心障害を緩和する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Effects of pioglitazone, a PPAR- γ agonist, in angiotensin II-infused rat were examined. Angiotensin II increased the serum levels and cardiac concentration of triglycerides, both of which were inhibited by pioglitazone. Cardiac function that was assessed by ex vivo Langendorff cardiac perfusion system showed that pioglitazone improved both systolic and diastolic cardiac function after transient global ischemia and reperfusion. Pioglitazone ameliorates histologic and functional cardiac damage induced by angiotensin II.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、アンジオテンシン II のラットへの持続投与が NADPH オキシダーゼの活性化を介して、心臓を含む臓器における酸化ストレスの亢進に働くことを報告してきた。
 (2) また、アンジオテンシン II の投与により、心臓、および腎尿細管に中性脂肪の脂肪滴が集積すること、同部位にスーパーオキサ

イドの過剰産生が認められることを見いだした。これらのことは、アンジオテンシン II による脂質動態の異常と酸化ストレスによる組織障害との間に関連があることを示唆している。
 (3) アンジオテンシン II による心・腎への脂質過剰集積は、血管拡張薬による降圧では部分的にしか抑制されず、AT1 受容体拮抗薬に

より完全に抑制されることから、血圧上昇に完全には依存していない現象である。

(4) 他のグループからの報告で酸化ストレスの亢進は、心筋や、血管のリモデリングを介して、心機能障害の促進因子として働くことが示されている。

(5) また、PPAR- γ の心臓における遺伝子過剰発現は、心臓の脂質含量の増加、心機能障害につながる可能性が示されている。

(6) 申請者らも、アンジオテンシン II の投与が心臓における PPAR- γ mRNA の発現を増加することを報告している。(Eur J Pharmacol. 2009 Feb14;604(1-3):87-92)

(7) PPAR- γ の投与は、血中の脂質プロファイルの改善から、心臓の脂質量を変える可能性があり、また、それゆえ PPAR- γ の心臓局所での高発現とは、異なる影響をあたえる可能性がある。

(8) 現在までに、アンジオテンシン II 投与動物モデルにみとめられる心障害に対する PPAR- γ アゴニスト投与の効果を検討した報告はない。

2. 研究の目的

(1) アンジオテンシン II のラットへの持続投与モデルを作成し PPAR- γ アゴニスト、ピオグリタゾンの経口投与を合わせて行う。

(2) ピオグリタゾンが心機能に与える影響を、循環血漿量などの影響を排除するために、体外灌流モデル(ランゲンドルフシステム)で解析を行う。

(3) ピオグリタゾンが心臓の線維化などの形態的变化に与える影響を検討する。

(4) ピオグリタゾンが心臓の脂質集積に与える影響を検討し、脂質代謝に関連している遺伝子発現についても並行して検討する。

(5) 同様のモデルを用いて、腎臓の脂質動態についても併せて解析を行う。

3. 研究の方法

(1) アンジオテンシン II 投与は、アンジオテンシン II 溶液をいれた浸透圧ミニポンプを皮下に埋め込んで作成する。アンジオテンシン II の投与期間は、1 週間、または 2 週間とする。

(2) PPAR γ アゴニストはピオグリタゾン(武田製薬より供与)を用い、経口で投与する。ラットへは、2.5 mg/kg/d の投与量を用いる。ピオグリタゾン投与は、アンジオテンシン II が投与されている期間に行う。

(3) 心臓脂質定量は、心臓をホモジェナイズし、有機溶媒で脂質を抽出したのち、WAKO E-test(Wako Chemical)で定量する。また、非固定心臓凍結切片への、オイルレッド O 染色により、脂質滴集積の局在と、その領域の半定量を行う。

(4) 脂質代謝(脂質合成、輸送、燃焼)に関連した遺伝子の発現について、mRNA、タンパクレベルで検討する。mRNA は定量 PCR 法、タンパク量は、Western ブロット法にて定量する。

(5) スーパーオキシドの産生
非固定凍結切片にをもちいて、DHE 染色により、スーパーオキシド産生の半定量を行うと同時に、その局在について検討する。

(6) 心機能の解析は、ランゲンドルフシステムを用いて、体外灌流の条件下で行う。心拍数を安定させたのち、心室内に挿入したバルンを圧トランスデューサーに接続し

PowerLab 解析システム(ADInstruments)にて、心腔内圧、+dp/dt、-dp/dt、灌流圧などをモニターする。また虚血再灌流に対する心機能の予備力を調べるため、30 分間の灌流中止の後に再灌流を行い、ストレス下でのこれらのパラメータを計測する。

4. 研究成果

■心臓の形態・機能障害に対するピオグリタゾンの効果

(1) 血圧・体重・血液データ

アンジオテンシン II の投与により、ラットの血圧は有意に上昇し、また、血中の中性脂肪は増加した(表 1)。ピオグリタゾンの共投与は、中性脂肪値をコントロールと同レベルに低下したが、血圧上昇は抑制しなかった。

Variables	Control	Pio	Ang II	Ang II + Pio
Weight	328 ± 3	326 ± 2	265 ± 4 [*]	255 ± 5 [*]
Systolic BP (mmHg)	112 ± 5	117 ± 2	202 ± 7 [*]	194 ± 7 [*]
Total cholesterol (mg/dL)	52 ± 2	48 ± 3	62 ± 4 [*]	54 ± 4
Triglycerides (mg/dL)	25 ± 2.3	19 ± 2 [*]	31 ± 3 [*]	25 ± 2
Free fatty acids (μ Eq/L)	484 ± 29	452 ± 24	593 ± 39	595 ± 38 [*]
Plasma fasting glucose (mg/dL)	146 ± 5	139 ± 7	185 ± 9 [*]	165 ± 8 [*]
Serum fasting insulin (mg/dL)	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.4

表1. アンジオテンシンII(Ang II)、ピオグリタゾン(pio)単独・共投与群の血圧と血中の脂質濃度

(2) 心臓組織中の脂質量

摘出心臓サンプルをホモジェナイズし、脂質分画を抽出し、組織脂質濃度を測定した。ピオグリタゾンの単独投与は、心臓組織の中性脂肪、総コレステロール含量に影響を与えなかった。アンジオテンシン II 投与は、組織中の中性脂肪、総コレステロール値を増加したが、ピオグリタゾンの共投与はこの現象を抑制した。

(3) 心臓への脂質滴集積

オイルレッド O 染色にて、非固定凍結心臓切片の脂質染色を行った。ピオグリタゾンの単独投与は、心臓への脂質滴の集積を惹起しなかった。アンジオテンシン II 投与により、心筋への脂質滴が増加したが、ピオグリタゾンの共投与はこの現象を抑制した(図 1)。

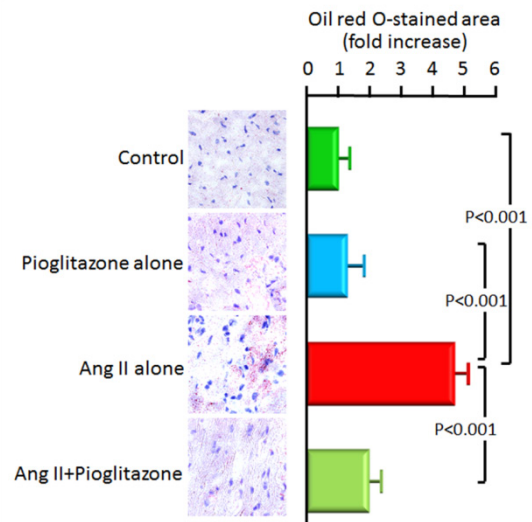


図1. 心臓におけるオイルレッドOの染色領域の比較

(4) 脂質代謝関連遺伝子の発現調節

アンジオテンシン II によって、発現の増加した、FAS や SREBP-1 などの脂質合成系の遺伝子の mRNA は、ピオグリタゾンの投与では抑制されなかった。また、脂質燃焼系に関連する、リン酸化フォームの AMPK や ACC はアンジオテンシン II で増加するが、ピオグリ

タゾンの投与は、この現象を抑制した(図2)。(5) スーパーオキシド産生
今回のシリーズでも、アンジオテンシン II 投与が心臓のスーパーオキシド産生を亢進し、その部位の一部は、脂質集積部と一致することを確認した。ピオグリタゾンの共投与は、スーパーオキシドの産生も抑制した(図3)。

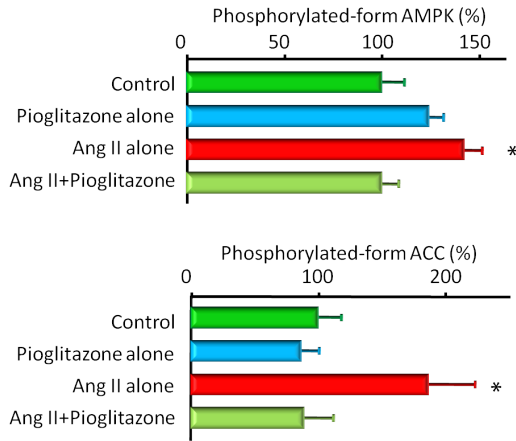


図2. リン酸化AMPK、ACCのタンパク発現

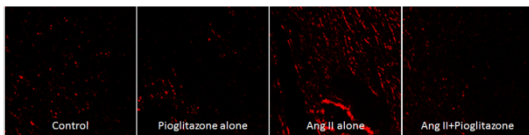


図3. DHE染色によるスーパーオキシドの産生の評価

(6) 体外灌流による心機能アセスメント
アンジオテンシン II を2週間持続で投与したのち本検討を行った。収縮能(+dp/dt)、拡張能(-dp/dt)、および、左室圧(LVDP)は、コントロール、アンジオテンシン II のみの投与、アンジオテンシン II とピオグリタゾンの共投与のいずれの群でも大きな差を認めなかった(図4)。そのため、引き続き、30分

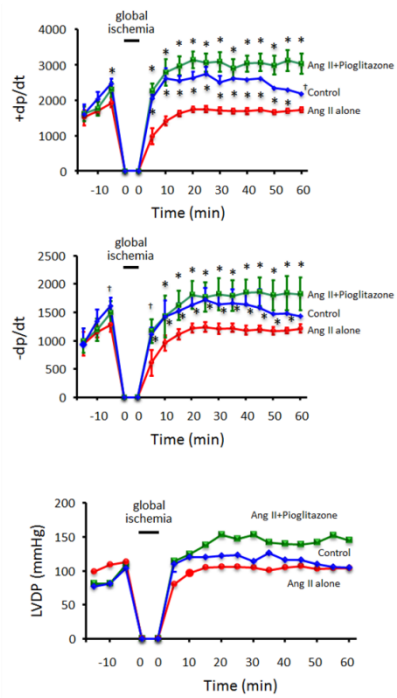


図4. ラングENDORF体外灌流による心機能評価

間の灌流中断による global ischemia により低酸素ストレスを与えたのち、再灌流を行い、これらのパラメータを比較した。その結果、アンジオテンシン II 投与群の心臓では、収縮能、拡張能が低下しているが、アンジオテンシン II・ピオグリタゾンの共投与により、

これらのパラメータは改善し、コントロール(=アンジオテンシン II の非投与)群より、むしろ良好な結果であった。また、左室圧については、アンジオテンシン II 投与のみでは、コントロール群とは有意な差を認めなかったが、ピオグリタゾンの共投与により、コントロール群を上回る値となった。

(7) 心臓線維化

アンジオテンシン II 投与は、右室、左室ともにマロリー・アザン染色により、線維化が促進されていたが、ピオグリタゾンの共投与は、線維化領域の縮小に働いた。

■腎臓の機能障害に対するピオグリタゾンの効果

アンジオテンシン II 投与は、腎臓においても、脂質集積や、タンパク尿増加、糸球体ろ過率の低下などの影響を与えることを報告している。ピオグリタゾンを共投与する、という今回のモデルにおいて、腎臓に与える影響についても、若干の検討を行った。

(1) 腎臓への脂質滴集積

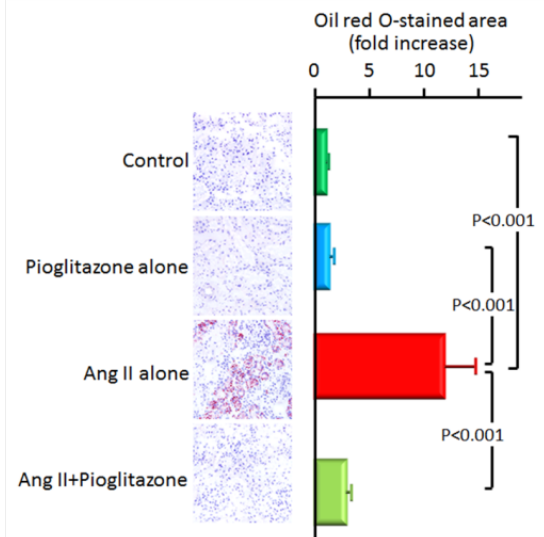


図5. 腎臓におけるオイルレッドOの染色領域の比較
ピオグリタゾンの単独投与は脂質滴の集積を惹起しなかった。アンジオテンシン II 投与により、腎尿細管への脂質滴が増加したが、ピオグリタゾンの共投与はこの象を抑制した(図5)。

(2) タンパク尿に対する影響

アンジオテンシン II の単独投与は、タンパ

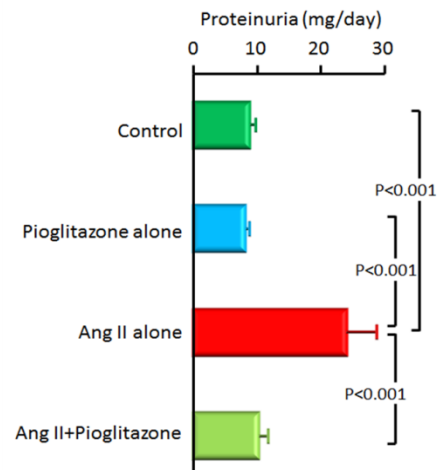


図6. 各群のタンパク尿量の比較

尿管を増加したが、ピオグリタゾンの共投与は、この現象を抑制した(図6)。一方、ピオグリタゾンはアンジオテンシン II による糸球体ろ過率の低下をリバースしなかった。

(3) 腎臓におけるヘムオキシゲナーゼ-1の発現

ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は32kDaのヒートショックタンパクであり、その誘導は組織保護的に働くと考えられている。アンジオテンシン II の投与は、腎臓におけるHO-1の発現を増加させるが、ピオグリタゾンの共投与によっても、上昇したHO-1のレベルは維持されており、このことはフェリチンの動態とは異なる(図7)。

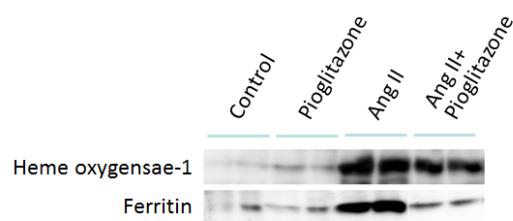


図7. 腎におけるヘムオキシゲナーゼ-1とフェリチンの発現

■結果の総括

アンジオテンシン II 投与モデルへの、ピオグリタゾンの共投与は、血圧には影響を与えなかったが、血中の中性脂肪値を低下させた。また、ピオグリタゾンは、アンジオテンシン II による心臓組織内の脂質含量を低下することに並行して、心機能(収縮能・拡張能)の低下、および、心臓線維化を抑制した。一方、心臓における遺伝子発現調節を調べたところ、ピオグリタゾンはアンジオテンシン II によって発現が亢進した脂質合成系の遺伝子の発現に影響を与えていなかったが、脂肪酸系のタンパクが低下していた。このことから、ピオグリタゾンの、心臓脂質量への影響は、心臓局所における合成系の modulationではなく、血清脂質の低下など systemic な影響を介した二次的なものの可能性が高いのではないかと考えている。

また、ピオグリタゾンによる、組織中の脂質低下は、腎臓においても認められ、この現象はタンパク尿の減少とパラレルであったが、糸球体ろ過率の低下とは、リンクしていなかった。このことより、アンジオテンシン II による糸球体ろ過率の低下は、腎における脂質集積とは独立した現象であることが推察された。

■今後の検討課題

以上、今回の研究を通して、われわれは、アンジオテンシン II が持続的に投与された高血圧発症ラットに対するピオグリタゾンの投与が、血中の中性脂肪を低下するのみならず、心臓、腎臓における脂質集積を抑制すること、また、これらの臓器におけるスーパーオキシドの産生を抑制することを見いだした。また、心臓においては、線維化・心筋壊死などの形態的な障害、収縮能・拡張能の低下などの機能的な障害を緩和することを見出した(図8)

PPAR- γ アゴニストが心臓に与える影響については、われわれの今回の知見以外にも、いくつかの報告がなされている。PPAR- γ アゴニ

ストが、心不全を増悪する方向に働く懸念がある、とされているが(Lincoff AM. JAMA, 298;1180-1188, 2007)、これは、直接的な心筋障害というより、循環血漿量の増加を介したものである可能性が指摘されている(Singh S. JAMA, 298;1189-1195, 2007)。

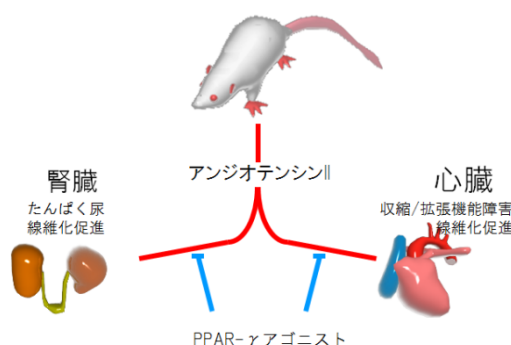


図8. アンジオテンシンII投与ラットへのピオグリタゾンの作用のまとめ

マウスモデルにおいては、PPAR- γ の心筋特異的な遺伝子導入は心筋への脂質集積と心機能障害を惹起することも示されている(Son NH. J Clin Invest. 117(10):2791-801, 2007)。一方、ピオグリタゾンの投与が糖尿病患者の心臓拡張能を改善した(Hughes AD. Int J Cardiol. In press)という報告もある。今回の検討から、われわれは、ピオグリタゾンによる心筋への脂質集積は、心筋での脂質合成系の直接の抑制ではなく、血中の脂質プロファイルの改善によるものであると考えている。とすると、以下のようなさまざまなパラメータの違いで、PPAR- γ アゴニストによる心臓保護作用にも差異が生じる可能性がある。

- 対象となる疾患：脂質異常症の有無、RASの活性化の有無
 - 使用する PPAR- γ アゴニストの種類：ピオグリタゾン、ロシグリタゾン(Kikuchi M, Curr Med Res Opin. 28(6):1007-16, 2012)、あるいは、PPAR- γ/α アゴニストや他の modulator(Kung J. Expert Opin Drug Saf. 11(4):565-79, 2012)
 - (スピロノラクトン・トリウムテレンなどによる)利尿薬による、循環血漿量の適切なコントロール下における PPAR- γ アゴニストへの使用(Karalliedde J. J Am Soc Nephrol 17:3482-3490, 2006)。
- げっ歯類と哺乳類の間には、当然のことながら大きな差異があり、また、ヒトのケースでは、当然(循環血漿量の影響を受けない)体外灌流モデルでの検討ができない。糖・脂質代謝異常が、代償された心不全に合併することも、少なからず存在することも、決して稀ではない。予期せぬ心不全を予防するためにも、これらの点について、血中のBNP値や、心エコーにおける肺動脈圧などの値を基に、安全性や、対処法、あるいは、長期予後に与える影響についてした臨床的なデータを蓄積していく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

①Shuichi Fujita, Nobukazu Ishizaka (12番目), Kyoko Imanaka-Yoshida (他10名), Atrial natriuretic peptide exerts protective action against angiotensin II-induced cardiac remodeling by attenuating inflammation via endothelin-1/endothelin receptor A cascade, 査読有, Heart Vessels 2013 [Epub ahead of print]

DOI:10.1007/s00380-012-0311-0

②Fumio Terasaki, Nobukazu Ishizaka (最後) (他 11 名), Familial hypercholesterolemia with multiple large tendinous xanthomas and advanced coronary artery atherosclerosis., 査読あり, Internal Medicine 2013;52(5):577-81
https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/52/5/52_52.8522/_pdf

③Tomohiro Fujisaka, Toshiaki Hanafusa, Nobukazu Ishizaka (最後) (他 5 名), Angiotensin II promotes aortic valve thickening independent of elevated blood pressure in apolipoprotein-E deficient mice, 査読有, Atherosclerosis, 2013 Jan;226(1):82-7

DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.055

④Aiko Sakamoto, Nobukazu Ishizaka (最後) (他 4 名), Comparison of the impact of changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum gamma-glutamyltransferase levels, 査読有, J Atheroscler Thromb 2013 Feb 22;20(2):142-51

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/20/2/20_14415/_pdf

⑤Aiko Sakamoto, Ryoza Nagai, Nobukazu Ishizaka (最後) (他 2 名), Reduction of renal lipid content and proteinuria by a PPAR- γ agonist in rat model of angiotensin II-induced hypertension, 査読有, Eur J Pharmacol 2012 May 5;682(1-3):131-6

DOI:10.1016/j.ejphar.2012.02.027

⑥Aiko Sakamoto, Ryoza Nagai, Nobukazu Ishizaka (最後) (他 3 名), Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotensin II-induced hypertension, 査読有, Int J Cardiology 2012 [Epub ahead of print].

DOI:10.1016/j.ijcard.2012.01.007

⑦Nobuakazu Ishizaka, Kazuhiko Koike (他 4 名), Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II, 査読有, J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2011 Dec;12(4):462-8

DOI: 10.1177/1470320311415887

⑧Makoto Kurano, Nobukazu Ishizaka (4 番目), (他 5 名)

LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL, Lipids Health Dis 10(1):134, 2011

DOI: 10.1186/1476-511X-10-134

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石坂 信和 (Ishizaka Nobukazu)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20270879

(2) 研究分担者

齊藤 幹 (Saito Kan)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60422292

塚本 和久 (Tsukamoto Kazuhisa)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20251233

関 常司 (Seki George)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 30206619