

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 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590775

研究課題名（和文） 内因性 GLP-1 の虚血心筋保護作用の分子メカニズム解明とその臨床的重要性の研究

研究課題名（英文） Investigation on molecular mechanism for ischemic cardioprotective effect of endogenous GLP-1 and its clinical significance

研究代表者

服部 有博（HATTORI ARIHIRO）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20542418

研究成果の概要（和文）：動物実験では、日本白色種ウサギの30分虚血・48時間再灌流モデルを用いて、 α -グルコシダーゼ阻害薬の voglibose と miglitol の内服が、梗塞サイズを縮小することを確認した。その分子メカニズムとして、血漿GLP-1産生増加、PI3 kinase-Akt-NO pathwayの活性化、mitochondrial KATP channel開口が関与することを明らかにした。さらに、心臓病患者を対象とした臨床研究では、心機能障害患者においては、心機能正常者に比べて、血漿GLP-1濃度が有意に上昇していること、血漿GLP-1濃度と左室駆出率は逆相関することを明らかにした。以上の結果から、内因性のGLP-1は、虚血性心疾患や左室機能障害において心保護因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a rabbit model of myocardial infarction with 30 min coronary ischemia and 48 hours of reperfusion, we demonstrated that oral administration of α -glucosidase inhibitors voglibose and miglitol reduced the myocardial infarct size through production of plasma GLP-1, activation of PI3 kinase-Akt-NO pathway and opening of mitochondrial KATP channels. In a clinical study, we demonstrated that plasma GLP-1 level was significantly increased in patients with impaired cardiac function as compared with those with preserved cardiac function, and that plasma GLP-1 level was inversely correlated with left ventricular ejection fraction. These results suggest that endogenous GLP-1 is a cardioprotective agent for ischemic heart disease and left ventricular dysfunction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：GLP-1, 心筋梗塞、左室機能障害

1. 研究開始当初の背景

α -グルコシダーゼ 阻害薬のvogliboseとmiglitolは、経口投与により梗塞サイズを縮小することを確認している。しかし、そのメカニズムは明らかではなく、さらに、心疾患患者において血漿GLP-1濃度の動態はわかっていない。

2. 研究の目的

内因性GLP-1が虚血心筋保護作用を示すことを動物実験で示し、さらに、心臓疾患を有する患者を対象として血漿GLP-1濃度を測定し、心機能との関係を検討することにより、心疾患においてGLP-1が果たしている役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Vogliboseとmiglitolによる心筋梗塞サイズ縮小効果にGLP-1が関与することを明らかにする動物実験

①心筋梗塞モデルと梗塞サイズ

日本白色種ウサギを用いて、pentobarbital麻酔、人工呼吸下にて開胸し心臓露出、左冠動脈前側壁枝にoccluderを装着し虚血を生ぜしめる。30分虚血・48時間再灌流後に心臓を摘出し、Evans blue dyeにて虚血領域と非虚血領域を分離、TTC染色にて梗塞領域を決定し梗塞サイズを虚血領域に対する%にて求める。control群(n=10, 通常のウサギ用固形餌を1週間投与)、voglibose群(n=10, voglibose 8g/100gの餌を1週間投与)

②薬理的説明

voglibose群に対して、

- exendin(9-39) (GLP-1 blocker, 1 mg/kg, n=10),
- Wortmannin(PI3-kinase blocker, 0.6 mg/kg, n=10),

- L-NAME (NOS inhibitor, 10mg/kg, n=10)
- 5HD (mitochondrial KATP channel blocker, 5 mg/kg, n=10)を虚血5分前に静注投与して梗塞サイズを測定し、梗塞サイズ縮小効果に対する。GLP-1産生、PI3-kinase活性化、NO産生増大、mitochondrial KATP channel開口の関与について説明。

③ 生化学的説明

食前、食後1、2、3時間の血糖値、血漿GLP-1濃度を、control群、voglibose群について測定する。

④分子機構説明

Western blotting

- 1) 心筋組織におけるGLP-1受容体蛋白の同定
- 2) 心筋組織について、prosurvival signalのAkt、ERKの活性化の検討
- 3) 心筋組織について、eNOS蛋白、HSP27蛋白、BCL-2蛋白の発現について比較検討

Miglitol内服についても voglibose内服と同様な検討を行う。

(2) 心臓疾患(虚血性心疾患、心不全)を有する患者の心機能に内因性GLP-1が心臓保護的な役割を果たしていることを明らかにする臨床研究

①虚血性心疾患と血清GLP-1濃度の関係の検討

糖尿病患者では、食後の血清GLP-1濃度が低下していることが報告されている

(VilSBoll et al. Diabetes 2001;50:609)。

したがって、糖尿病患者で虚血性心疾患が多いのは、虚血心筋保護効果を有する血漿GLP-1濃度が低下していることが関連している可能性がある。そこで、心臓カテーテル検査にて冠動脈造影を行った患者を対象として、血漿GLP-1濃度をELISA法を用い

て測定する。糖尿病の有無、冠動脈狭窄の程度、HbA1cのレベル、血糖値、心筋シンチにおける虚血の程度と血漿GLP-1濃度との関係を検討する。

②心不全と血漿GLP-1濃度の関係の検討

心不全を有する患者を対象として、血漿GLP-1濃度をELISA法にて測定する。心不全のマーカーとしての血中BNP濃度、心エコーにて、EF、FF、E/A、LVDD、LVSDを測定し、血清GLP-1濃度との関係を検討する。糖尿病の有無、HbA1cのレベル、血糖値と血漿GLP-1濃度との関係を検討する。

4. 研究成果

Voglibose の影響

日本白色種ウサギを用いて、voglibose 内服投与前後の血糖値、血漿GLP-1濃度を測定したところ、voglibose 内服により、食後2時間、3時間の時点で血糖値が有意に低下していた。さらに、空腹時、食後1時間、2時間、3時間いずれの時点においてもvoglibose 投与群はコントロール群に比較して有意に上昇していた。さらに、voglibose を含有する餌、あるいは通常の餌を一週間自由に食させた後、冠動脈の30分間虚血・再灌流をおこない48時間後に心臓を摘出し、Evans blue 染色とTTC染色により梗塞サイズを計測した。その結果、梗塞サイズがコントロール群に比較して有意に縮小した。Voglibose は腸管から吸収されないため、この効果はvoglibose の直接作用である可能性はないことから、当初はこのメカニズムがよくわからなかった。しかし、梗塞作製前にGLP-1受容体遮断薬のexendin(9-39)の前投与により、voglibose の梗塞サイズ縮小効果は完全にブロックされた。さらに、PI3-kinase blocker のwortmannin、NOS阻害薬のL-NAME、

mitochondrial KATP channel blocker の5-HDの前投与により、voglibose の梗塞サイズ縮小効果はそれぞれ完全にブロックされた。これらの結果から、voglibose による梗塞サイズ縮小効果は、GLP-1受容体刺激、PI3 kinase 活性化、Akt 活性化、eNOS 活性化、mitochondrial KATP channel 開口によりもたらされていることが示された。Voglibose の投与により、梗塞サイズ縮小と同時に左室駆出率(EF)、 $\pm dP/dt$ が改善された。Western blot 解析を行ったところ、心筋梗塞2日後の虚血領域の心筋組織のGLP-1受容体の発現がシャム群に比較して有意に増大していた。すなわち、心筋梗塞により心筋組織GLP-1受容体のupregulation が認められた。Voglibose の投与により、梗塞心筋組織のリン酸化Aktとリン酸化eNOSが増大し、AktとeNOSの活性化が示された。

Miglitol の影響

日本白色種ウサギを用いて、miglitol 内服投与前後の血糖値、血漿GLP-1濃度を測定したところ、miglitol 内服により、血糖値は、食後1時間、2時間、3時間の時点で有意に低下していた。血漿GLP-1濃度は、空腹時、食後1時間、2時間、3時間いずれの時点においてもmiglitol 内服投与群はコントロール群に比較して有意に上昇していた。血漿インスリン濃度は、空腹時、食後1時間、2時間、3時間いずれの時点においても、miglitol 内服投与群とコントロール群の間で有意差は認めなかった。さらに、miglitol を含有する餌、あるいは通常の餌を一週間自由に食させた後、冠動脈の30分間虚血・再灌流をおこない48時間後に心臓を摘出し、Evans blue 染色とTTC染色により梗塞サイズを計測した。その結果、梗塞サイズはコントロール群に比較して有意に縮小した。Miglitol は腸

管から吸収されるため、miglitol の梗塞サイズ縮小効果は miglitol の直接作用と増加した GLP-1 を介する間接作用の両者からもたらされている。塞作製前に GLP-1 受容体遮断薬の exendin(9-39)の前投与により、miglitol 内服投与による梗塞サイズ縮小効果は部分的にブロックされ、梗塞サイズは miglitol を静注した際に認められる梗塞サイズ縮小のレベルと同等であった。Miglitol 静注による梗塞サイズ縮小効果は、
・-1,6-glucosidase 阻害による虚血中の glycogenolysis 抑制による glycogen 消費低下、lactate 産生低下が関与している。Miglitol の内服投与により、梗塞サイズ縮小と同時に左室駆出率 (EF)、 $\pm dp/dt$ が改善された。Western blot 解析を行ったところ、miglitol 内服により、梗塞心筋組織のリン酸化 PI3 kinase とリン酸化 Akt が有意に増大し、PI3 kinase と Akt の活性化が明らかとなった。すなわち、miglitol 内服により、血漿 GLP-1 濃度が上昇し、心筋 GLP-1 受容体を刺激し、PI3 kinase 活性化、Akt 活性化することにより、梗塞サイズが縮小していることが示された。

ヒト左室機能障害患者と血漿 GLP-1-心臓 GLP-1 受容体システム

心臓カテーテル検査を行った連続 102 症例の心臓病患者の早朝安静時血漿 GLP-1 濃度を測定した結果、早朝血漿 GLP-1 濃度が impaired LV function 群 (EF<55%) では preserved LV function 群 (EF>55%) に比較して有意に高値を示し、心不全のマーカーである血漿 BNP 濃度も impaired LV function 群 (EF<55%) では preserved LV function 群 (EF>55%) に比較して有意に高値を示した。さらに左室駆出率 (EF) が早朝安静時の血漿 GLP-1 濃度と負の相関を示した。これらは心

不全のマーカーあるいは心臓保護因子として確立されている血漿 BNP 濃度と同様の動態を示した。血漿 GLP-1 濃度は血漿インスリン濃度とは相関を認めなかった。さらに、心筋 biopsy sample を GLP-1 受容体の抗体で免疫染色してみたところ、impaired LV function 群では preserved LV function 群に比較して、染色の強度が強く染色されており、GLP-1 受容体が強発現されていることが明らかとなった。E/A と血漿 GLP-1 濃度の関係には相関は認められなかった。これらのことから、左室機能障害患者では内因性の血漿 GLP-1 濃度が増加し、強発現した心臓 GLP-1 受容体を強く刺激することにより、PI3K-Akt-eNOS pathway が活性化され、左室機能障害を改善する心臓保護因子として作用している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

① Hattori A, Kawamura I, Yamada Y, Kanamori H, Aoyama T, Ushikoshi H, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Minatoguchi S. Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors in patients with left ventricular dysfunction. BMJ Open(in press) 査読有

② Iwasa M, Yamada Y, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Sumi S, Shiraki T, Yamaki T, Ushikoshi H, Hattori A, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara H, Minatoguchi S. Both stimulation of GLP-1 receptors and inhibition of glycogenolysis additively contribute to a protective effect of oral miglitol against ischaemia-reperfusion injury in rabbits. Br J

Pharmacol 164: 119-131, 2011 査読有

③Iwasa M, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Sumi S, Yamada Y, Shiraki T, Yamaki T, Ushikoshi H, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara H, Fujiwara T, Minatoguchi S. Anti-diabetic drug voglibose is protective against ischemia-reperfusion injury via GLP-1 receptors and PI3 kinase-Akt-eNOS pathway in rabbits. J Cardiovasc Pharmacol 55: 625-34, 2010 査読有

〔学会発表〕(計2件)

①AHA2012 / Los Angels, 11.3 - 11.7.2012
Hattori A, Kawamura I, Yamada Y, Kanamori H, Aoyama T, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Minatoguchi S. Increased Level of Plasma GLP-1 in Patients with Left Ventricular Dysfunction may serve as a Compensatory Mechanism for Cardiac Function. (USA)

②第77回日本循環器学会学術集会 / 横浜
2012年3月16日
服部有博
Plasma GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) Level may be Essential Part in Patients with Left Ventricular Dysfunction.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 有博 (HATTORI ARIHIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20542418

(2) 研究分担者

湊口 信也 (MINATOGUCHI SHINYA)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20190697

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：