

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24年 5月 22日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790733

研究課題名（和文）心不全における炎症のメカニズム解明
（12リポキシゲナーゼとアルドステロンの検討）研究課題名（英文）Relationship between arachidonic 12-lipoxygenase and aldosterone
in the development of heart failure研究代表者 香山 洋介（KAYAMA YOSUKE）
東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40507232

研究成果の概要（和文）：

【目的】本研究は糖尿病性心筋症の発症メカニズムに関わるアラキドン酸12-リポキシゲナーゼ（12-LOX）の機能の解析を目的とした。

【結論】糖尿病性心筋症発症の進展にアラキドン酸12-リポキシゲナーゼの発現が関与しており、炎症系サイトカイン（TNF- α , MCP-1）や心筋酸化ストレスの発現を亢進させ、心筋症の発症、進展に関与することが分かった。今後新たな治療法の標的になりうると考えられた。研究成果の概要（英文）：To determine the role of 12-lipoxygenase (12-LOX) in diabetic cardiomyopathy, we created STZ-induced diabetic cardiomyopathy mice and compared to those of 12-LOX KO mice. Disruption of 12-LOX significantly reduced cardiac fibrosis and improving STZ-induced diastolic and systolic dysfunction. We examined the expression of inflammatory cytokine genes and collagen genes and found that cardiac expression of TNF- α , MCP-1 were significantly upregulated in STZ-induced diabetic heart. This increase was inhibited by disruption of 12-LOX. Moreover, disruption of 12-LOX decreases the production of STZ-induced cardiac oxidative species. Our results suggest that cardiac 12-LOX-induced inflammation is involved in the development of diabetic cardiomyopathy and that inhibition of 12-LOX could be a novel treatment for this condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：

科研費の分科・細目：分子血管病態学

キーワード：心不全・炎症・12-リポキシゲナーゼ（12-LOX）・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

心肥大や心不全の病態に炎症が深く関わっており、そこにレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAAS) 系の関与が重要である事が知られている。近年、抗アルドステロン薬の心不全改善効果を示す大規模臨床試験 (RALES、EPHESUS) が報告され、その機序の一つとして抗炎症効果が考えられている。最近我々は、アラキドンカスケードの代謝酵素の一つ、12-LOX が心臓において炎症、線維化を惹起し心不全を増悪させる事を報告した。アルドステロンも組織の炎症を惹起し、組織線維化を促すことが知られており、心不全における心臓の炎症との関与が示唆される。今回我々は、これらの分子をターゲットにし、心不全における炎症のメカニズムの解明を本研究の目的とする

2. 研究の目的

糖尿病は冠動脈疾患や高血圧の存在とは別に心不全発症の単独のリスク因子であり (1)、糖尿病自体が心筋の構造変化や心機能に関与する病態は糖尿病性心筋症として知られている (2)。その病態メカニズムについては未だ詳細な分子機序について解明されていない。我々は以前、高血圧心から心不全への発症進展にアラキドン酸 12-LOX が関与することを報告した (3)。今回我々は 12-LOX の糖尿病性心筋症に対する作用の解明を本研究の目的とし炎症系マーカーとの関連も検討した。

(Reference)

(1) The Framingham Study. JAMA, 1979;

241:2035

(2) Rubler S, Am J Cardiol 1972;30:595

(3) Kayama Y, J Exp Med 2009;206:1565

3. 研究の方法

＜アルドステロン-12-LOX との関係＞

① 心筋細胞及び線維芽細胞は新生児ラット初代培養心筋細胞及び線維芽細胞を使用。これらの細胞に 12(s)HETE (12-LOX 代謝産物) を投与し、アルドステロン合成 (CYP11B2) を RT-PCR で発現の程度を確認する。また同様にアンジオテンシン II やアルドステロン

を各種細胞に投与し、12-LOX の RNA 発現を RT-PCR で確認する。RNA level での上昇が確認されたら合わせて蛋白レベルの発現を確認する (western, ELISA)。

② 心臓特異的 12-LOX 高発現マウス (作成) やノックアウトマウス (購入) を使用し、それぞれの心臓におけるアルドステロン合成を確認する。我々は α -MHC プロモーターを使用し、心臓特異的に 12-LOX 高発現マウスを作成した。このマウスは加齢と共に心収縮力が低下し、間質の線維化と炎症細胞の浸潤 (マクロファージ) の増加を認めた。このマウスの心臓におけるアルドステロン合成 (CYP11B2) を RT-PCR で確認する。

＜糖尿病性心筋症と 12-LOX の関係＞

ストレプトゾトシン (STZ) を投与した持続的高血糖マウス (糖尿病性心筋症モデル) の作成及び野生型マウス (WT-STZ)、12-LOX ノックアウトマウス (KO-STZ) における機能及び発現分子の比較検討

① (in vivo) Vevo770 System (visual sonics) を用いて、コントロール群、WT-STZ 及び KO-STZ 間における経時的心機能評価を行う。それと同時に経時的血圧変化や血糖値の変動についても記録する (カテーテル検査及び血糖測定)。また STZ 投与 12~16 週後の心臓組織標本を各々作製し、各種免疫染色 (HE, Masson, TUNEL, mac3, 4HNE など) を行い、発現の程度や分布を調べる。

また、心臓組織内の 12-LOX の発現及び炎症系サイトカイン (MCP-1, TNF- α , IL-6)、酸化ストレス (4HNE) や線維化マーカーの発現を、RT-PCR 法もしくはウェスタンブロッティング法で確認する。

高血糖刺激に伴う心筋細胞や心筋線維芽細胞における 12-LOX、炎症系サイトカイン、線維化系マーカー、酸化ストレスの発現の確認。

② (in vitro) 培養新生児ラット心筋細胞・心筋線維芽細胞に高血糖刺激 (450mg/dl) を行い、12-LOX 及び炎症系サイトカインの発現を RT-PCR 法を用いて、コントロール群 (100mg/dl) と比較検討する。また蛋白に関

しては ELISA もしくはウエスタンブロッティング法で確認する。高血糖刺激で 12-LOX の発現の亢進が見られたら、12-LOX 酵素阻害薬 (CDC) を用いて 12-LOX 抑制する実験も検討する。また酸化ストレスの発現上昇が見られる場合は、抗酸化ストレス剤の投与を行い、各 12-LOX や炎症系サイトカインの発現の有無を確認する。

4. 研究成果

<アルドステロン-12-LOX との関係>

各種細胞に 12(s)HETE を濃度を振って CYP11B2 の発現を確認したが、各濃度においても有意な上昇認めなかった。同じくアンジオテンシン II を各種濃度に振って心筋における 12-LOX 及び CYP11B2 の発現を確認したが、これらも negative data であった。次に in vivo において、心臓特異的 12-LOX 高発現マウスの心臓における CYP11B⁺ の発現を RNA level で確認したが、こちらも有意な上昇認めず、心臓において 12-LOX-アルドステロン産生の関係は考えにくいという結論となった。

<糖尿病性心筋症と 12-LOX の関係>

野生型マウスの STZ を投与した群 (WT-STZ) では STZ 投与後 12 週令より徐々に心機能の低下見られ、16 週令で有意差持って心機能の低下認めた。一方 12-LOX ノックアウトマウスに STZ を投与した群 (KO-STZ) では心機能の低下は認めず、心機能は維持された。そこで、12-LOX 及び炎症系サイトカインの発現、酸化ストレスの発現を WT-STZ 及び KO-STZ でその発現を確認したところ、WT-STZ において STZ 投与後 12-LOX 及び MCP-1 及び TNF- α 及び心筋内 4-HNE の発現の上昇が見られ、KO-STZ ではそれらの発現の低下を認めた。次に高血糖状態での心筋細胞における各種分子の発現を調べるため、新生児ラット心筋細胞に持続的高血糖刺激を行い RT-PCR で確認したところ、12-LOX の発現の上昇ともに、TNF- α と MCP-1 の発現の上昇が確認された。次にこれら炎症系サイトカインと 12LOX の発現の関係を確認するため、心筋細胞に高血糖刺激を加え、さらに 12-LOX (CDC) を投与しその発現を確認したところ、MCP-1 及び TNF- α が優

位に発現の低下が見られた。次に酸化ストレスと 12-LOX の発現について検討するため、in vivo の系を使い、WT-STZ と KO-STZ にそれぞれ抗酸化剤 (NAC) を 4 週令まで投与し続け、その後の心機能解析したところ、NAC 投与群のマウスでは STZ 投与後も心機能低下認めず、心機能が維持された。今後 12-LOX と酸化ストレスの関係を同様の系で更に検討していく予定である。これらの結果より、高血糖誘導の糖尿病性心筋症発症の進展に 12-LOX 及び炎症系サイトカインの発現が関与していることが強く考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1. 香山 洋介、Arachidonic 12-lipoxygenase promotes the development of heart failure via induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1
I SHR 日本部会 2010, 5, 14 京都
2. 鈴木 博史、Arachidonic 12-lipoxygenase induced inflammation is involved in the development of diabetic cardiomyopathy、日本内分泌学会 2011, 4, 22 神戸
3. 香山 洋介、Arachidonic 12-lipoxygenase is involved in the development of diabetic cardiomyopathy、日本循環器学会 2011, 8, 3 横浜
4. 香山 洋介、Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure、日本心不全学会 2011, 10, 15 鹿児島
5. Yosuke Kayama、Arachidonic 12-lipoxygenase-induced inflammation promotes the development of diabetic

cardiomyopathy 、 American Heart Association 、 Orlando, Florida 、 14th November, 2011

5. 鈴木 博 史 、 Cardiac 12/15
lipoxygenase-induced inflammation is
involved in heart failure、
日本糖尿病学会 2012, 5, 18 横浜

〔図書〕 (計 3 件)

1. 心筋リモデリング予防のための ACE 阻害
薬 /ARB の 使 い 方 2010, 47, 1627
medicina 医学書院
2. ストレスと心不全との関連 (酸化ストレ
スと心不全) 心不全日常診療 Q & A
2011, 1, 70 南山堂
3. R A S 系作動薬と電解質異常 循環器内
科の知っておくべき電解質異常 2011,
1, 52 medical view

.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香山 洋介 (KAYAMA YOSUKE)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40507232