

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390214

研究課題名(和文) インスリンシグナルによる心機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of cardiac function by insulin signaling

研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA, Ichiro)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90376377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは糖代謝のみならず転写調節・翻訳調節など多彩な細胞機能調節作用を有する。成体で心筋特異的にインスリン受容体をノックアウトすると心機能の低下がみられることがこれまでの予備実験により明らかになった。そこで本研究ではインスリンによる心機能制御のメカニズムを解明することを試みた。心筋特異的インスリン受容体ノックアウトマウスではインスリンシグナルの下流のうちAkt-mTOR経路が選択的に抑制されていた。また、mTORを選択的に活性化することにより心機能低下の改善がみられた。以上の結果は、心臓インスリンシグナルがAkt-mTOR経路を介して心機能を調節していることを示唆するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Insulin signaling regulates multiple cellular processes including glucose homeostasis and transcriptional/translational regulation. Our preliminary data showed that deletion of insulin receptor gene specifically in the adult heart results in impaired cardiac contractility. We therefore tried to explore the mechanistic basis for the regulation of cardiac function by insulin signaling. We found that Akt-mTOR pathway is specifically downregulated in the heart by insulin receptor gene deletion and activation of mTOR reverses the deleterious effect of insulin receptor knockout on contractile function. Our results suggest that insulin signaling in the heart regulates contractile function through Akt-mTOR branch.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・循環器内科学

キーワード：インスリン mTOR 心不全

1. 研究開始当初の背景

(1)インスリンシグナルによる細胞機能調節

インスリンシグナルは受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体にインスリンが結合することにより活性化される。インスリンシグナルは PI3-kinase や Akt などのシグナル分子によって伝達され、GSK-3 を介した転写調節・翻訳調節、mTOR を介した翻訳調節・血管新生、さらに FOXO ファミリーの転写因子を介した蛋白分解など、多彩な細胞機能調節作用を有する。また、GLUT4 の膜移行などの調節を介して、糖代謝にも関与している事が知られている (図1)(文献1)

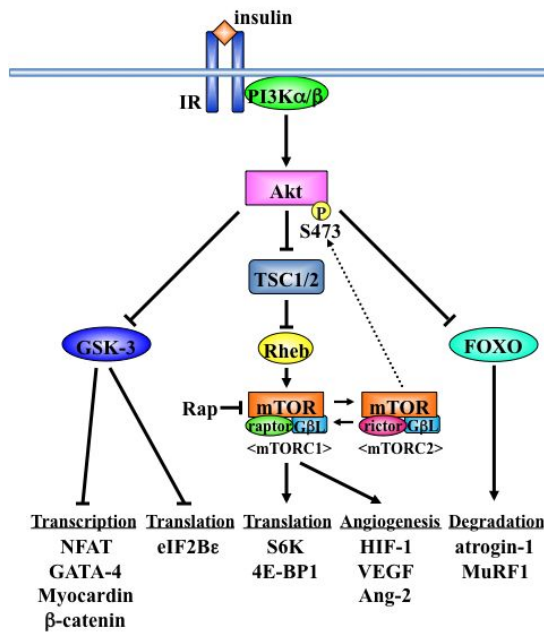


図1 インスリンシグナルによる細胞機能調節

(2)インスリンシグナルによる心肥大

我々は以前発現誘導型 Akt トランスジェニックマウスを用いて、インスリン/PI3-kinase/Akt シグナルが生理的心肥大を引き起こすことを報告した (文献2)。さらに、心筋細胞特異的にインスリン受容体をノックアウトすることにより、心筋におけるインスリンシグナルが胎児期から欠損したマウスでは、心機能は保たれているものの心臓サイズが小さくなっており、胎児期から成長期における心筋インスリンシグナルは正常な心臓の発育 (成長に伴う生理的心肥大) に必要であることを明らかにした (文献3)。また、同様な遺伝子改変マウスを用いて、運動に伴う生理的心肥大の形成にも心筋インスリンシグナルが関与していることを見いだした (文献4)。生理的心肥大においては心機能が維持されていることから、これらの結果は心筋インスリンシグナルが単に糖代謝を調節するだけでなく、直接的に心機能維持にも関与している可能性を示唆するものと考えられる。

しかしながら胎児期から心筋インスリンシグナルを欠損したマウスモデルでは心機能低下は認められず (文献3)。このモデルでは胎児期からの心筋インスリンシグナル欠損に対する代償機構が働いて心機能が保持されている可能性が考えられた。そこで我々は tamoxifen 誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損マウスを作成し、成長後に心筋インスリンシグナルが欠損するようなモデルマウスを作成し、心筋インスリンシグナルが心機能に及ぼす影響を検討した。

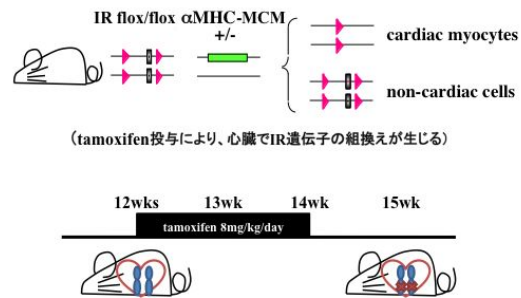


図2 心筋特異的誘導型IRノックアウトマウス(iCIRKO)の作成

インスリン受容体 (IR) 遺伝子の flox mice と心筋特異的に MerCreMer (MCM) を発現する aMHC-MCM トランスジェニックマウスを交配し、IR flox allele: homozygous、aMHC-MCM: hemizygous のマウスを得た。このマウスに生後 12 週から 2 週間 tamoxifen を投与すると (図2) 2 週間後にはインスリン受容体の発現レベルは著明に低下し、tamoxifen 誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損 (iCIRKO) マウスが得られたことを確認した。tamoxifen 投与開始後 3 週 (15 週齢) で表現型を解析すると、iCIRKO マウスでは心重量の減少と心機能の低下が認められた。胎児期から心筋インスリンシグナルを欠損したマウスモデルでは同程度の心重量減少があるにもかかわらず心機能は保持されており、心重量の減少が原因で心機能低下をきたしている可能性は低いものと思われた。以上の結果は成体の心臓におけるインスリンシグナルが心重量の維持だけでなく、心機能の維持に必須であることを示す結果であると考えられた。

<引用文献>

文献 1. Shiojima I and Walsh K. Genes Dev 2006;20:3347
 文献 2. Shiojima I et al. J Clin Invest 2005;115:2108
 文献 3. Shiojima I et al. J Biol Chem 2002;277:37670
 文献 4. Ikeda H, Shiojima I et al, J Mol Cell Cardiol 2009;47:664

2. 研究の目的

そこで本研究ではこのマウスモデルを用いて、以下の4点について検討し、インスリンシグナルによる心機能制御のメカニズムを解明し、新たな心不全治療法の確立することを試みた。

- (1) iCIRKO マウスの表現型を詳細に解析する
- (2) iCIRKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を検討する
- (3) iCIRKO マウスの心筋内エネルギー産生系について解析をおこなう
- (4) iCIRKO マウスの心機能低下における mTOR の関与を明らかにする

3. 研究の方法

(1) iCIRKO マウスの表現型を詳細に解析する：tamoxifen 誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損 (iCIRKO) マウスでは心重量の減少と心機能の低下が認められることが明らかになっていった。さらにその表現型を詳細に検討するために、以下のような解析を行った。

Masson trichrome 染色により心筋の線維化を評価する

個々の心筋細胞の cross sectional area を測定し、細胞肥大について評価する

TUNEL 染色により、心筋細胞の apoptosis について評価する

電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの形態や autophagy について評価する

(2) iCIRKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を検討する：tamoxifen 誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損 (iCIRKO) マウスでは心臓内のインスリン受容体の発現量が著明に低下していることが明らかにされていた。さらにその下流のシグナルの変化について検討した。具体的にはコントロールおよび iCIRKO マウスにインスリンを静注し、心筋内のインスリンシグナル伝達についておもに Western blot により解析をおこなった。

(3) iCIRKO マウスの心筋内エネルギー産生系について解析をおこなう：心筋内エネルギー産生系に対するインスリンシグナルの影響を検討するために、心筋内の主要な糖脂質代謝経路である、解糖系、脂肪酸酸化、TCA サイクル、ミトコンドリア電子伝達系について、各経路の主要な酵素の活性もしくは蛋白量、遺伝子発現量について検討した。

(4) iCIRKO マウスの心機能低下における mTOR の関与を明らかにする：Akt 下流のシグナル伝達系は複数存在するが、そのなかでも Akt-mTOR 経路は蛋白合成・オートファジー・血管新生など心臓肥大時の細胞反応を制御することが知られている。そこで Akt-mTOR

経路が心機能制御にも関与しているかを明らかにするために、以下の検討を行った。

mTOR を阻害し、心機能に対する影響を検討する：mTOR の特異的阻害薬である rapamycin を用いて mTOR の機能を阻害し、コントロールおよび iCIRKO マウスにおける心機能を評価した。

mTOR を活性化し、心機能に対する影響を検討する：アミノ酸は mTOR を活性化することが知られており、アミノ酸投与により mTOR を活性化し、コントロールおよび iCIRKO マウスにおける心機能を評価した。

4. 研究成果

(1) iCIRKO マウスの表現型を詳細に解析する

iCIRKO マウスでは心重量が減少次第に、心エコーでは収縮期左室内径の拡大と収縮能の低下が認められた。また、組織学的解析により、心筋細胞の萎縮と間質の線維化が見られることも明らかになった。明らかな apoptosis の増加はみられなかったが、心筋細胞 autophagy を示唆する所見がみとめられた。

(2) iCIRKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を検討する

iCIRKO マウス心臓では、インスリンシグナルの下流の中でも Akt-mTOR 経路が選択的に抑制されていることが明らかになった。その原因として AMPK の活性化により二次的に mTOR の活性化が抑制されることが考えられた。

(3) iCIRKO マウスの心筋内エネルギー産生系について解析をおこなう

iCIRKO マウスの心臓においてはミトコンドリアの電子伝達系や脂肪酸酸化経路の遺伝子発現が低下しており、iCIRKO マウスの心機能障害の原因が ATP 産生能低下である可能性を示唆する結果と考えられた。

(4) iCIRKO マウスの心機能低下における mTOR の関与を明らかにする

iCIRKO マウスにおいて Akt-mTOR が選択的に抑制されていることから、mTOR を活性化することによりその表現型が変化するかにについて検討した。分岐鎖アミノ酸を投与して mTOR を活性化すると、心重量の減少および左室収縮能の低下が改善した。また、アミノ酸による心重量減少抑制効果はラパマイシンを投与することにより認められなくなった。以上の結果は Akt-mTOR 経路がインスリンの下流で心重量及び心機能を調節していることを示唆するものと考えられた。

(5) 研究成果のまとめ

インスリンシグナルは糖尿病の分野では盛んに研究され、インスリンによる糖代謝調節や細胞増殖の分子機構についてこれまで多くの知見が明らかにされている。しかしながら、生理学的心肥大におけるインスリンシグナルの関与に関する報告以外には、心臓におけるインスリンシグナルの病態生理学的意義に関する報告はこれまでなされていなかった。本研究で明らかにされたインスリンシグナル伝達障害による心機能低下の分子機構は、糖尿病性心筋障害や高血圧性心筋障害など多くの病態における心機能低下の原因となっている可能性が考えられる。今後mTOR活性化を基盤とした心不全に対する新規治療法の開発が期待される。

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6件:すべて査読あり)

1. Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, Jenniches K, Kilic A, Izumiya Y, Shiojima I, Grosse Kreyborg K, Renz H, Walsh K, Braun T. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports* 2013;1:397-410. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.09.004
2. Zhu Y, Pereira RO, O'Neill BT, Riehle C, Ilkun O, Wende AR, Rawlings TA, Zhang YC, Zhang Q, Klip A, Shiojima I, Walsh K, Abel ED. Cardiac PI3K-Akt impairs insulin-stimulated glucose uptake independent of mTORC1 and GLUT4 translocation. *Mol Endocrinol* 2013;27:172-84. doi: 10.1210/me.2012-1210
3. Shiojima I, Schiekofer S, Schneider JG, Belisle K, Sato K, Andrassy M, Galasso G, Walsh K. Short-term akt activation in cardiac muscle cells improves contractile function in failing hearts. *Am J Pathol* 2012;181:1969-76. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.020
4. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell* 2012;149:1298-313. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047
5. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer M, Komuro I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. *Hypertension* 2012;59:627-33. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175208
6. Zou Y, Liang Y, Gong H, Zhou N, Ma H, Guan A, Sun A, Wang P, Niu Y, Jiang H, Takano H, Toko H, Yao A, Takeshima H, Akazawa H, Shiojima I, Wang Y, Komuro I, Ge J. Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2011;58:1099-110. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.173500

[学会発表](計1件)

1. 塩島一朗. 心臓インスリンシグナルによる心機能調節. 日本臨床分子医学会(2012年4月14日:京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩島 一朗 (SHIOJIMA, Ichiro)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90376377

(2)研究分担者

岩崎 真佳 (IWASAKI, Masayoshi)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30548706