

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09584

研究課題名(和文) AMPデアミナーゼ活性修飾による糖尿病性心筋症に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approach for diabetic cardiomyopathy by modification of AMP deaminase activity.

研究代表者

丹野 雅也 (Tanno, Masaya)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00398322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性心筋症の心機能障害の機序におけるAMPデアミナーゼ(AMPD)の役割について解析した。AMPD活性は2型糖尿病ラット心筋で増加し、ATPの減少を介して、圧負荷で顕在化する左室拡張機能障害に寄与すること、その活性がmicroRNA-301bによる翻訳修飾で制御されることを見出した。さらにIMPを増加させることにより、プリン代謝経路の反応基質の増加、キサンチンオキシダーゼが産生する酸化ストレスの増加によりミトコンドリアのstate3の呼吸を抑制し、ATP産生の減少も惹起した。すなわちAMPDはATP分解の亢進および産生の低下を介して左室拡張機能障害に寄与していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者の急激な増加とともに糖尿病性心筋症は増加の一途を辿る。糖尿病患者の主要な死因の一つであるが、現時点では予後を改善する特異的な治療法は無く新規治療方法の開発が急務である。糖尿病性心筋症の典型的な臨床像としては潜在的な左室拡張機能障害を有し血圧上昇に伴い心不全が顕在化するが、これまでの研究では圧負荷により顕在化する心不全の機序についての検討はほとんど無い。また、現在の心不全治療は神経体液性因子の修飾としてレニン-アンジオテンシン-交感神経系の阻害のみである。心不全の発症進展への心筋代謝障害の寄与は多く報告されており、AMPDを標的とした心筋代謝制御は有望な新規治療と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The role of AMP deaminase (AMPD) in the left ventricular diastolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy has been examined. Activity of AMPD was upregulated in the myocardium of type 2-diabetic rats, contributing to the manifestation of latent diastolic dysfunction via depletion of adenosine nucleotide pool and ATP. Furthermore, we found that the activity of AMPD is regulated by microRNA 301b-mediated translational modification of its protein expression level. Finally, AMPD3 also elevated the level of IMP and its downstream purine metabolic pathway molecules, substrates of xanthine oxidase (XO), resulting in production of excess reactive oxygen species (ROS) via XO-mediated reaction. The increased ROS aggravated the state 3 respiration of the mitochondria and suppressed ATP production. These findings indicate that upregulation of AMPD induced left ventricular diastolic dysfunction of diabetic hearts through both excess ATP degradation and insufficient ATP production.

研究分野：心不全

キーワード：糖尿病性心筋症 心不全 AMPデアミナーゼ 拡張機能障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性心筋症は発症早期には左室拡張機能障害を呈し、左室収縮能の維持された心不全 (HFpEF) の主要な原因の一つである。糖尿病患者の急激な増加とともに本症も増加の一途を辿るが、現時点では予後を改善する特異的な治療法は無く、新規治療方法の開発が待望される。我々は、肥満 2 型糖尿病モデルラットの左室心筋を用いたメタボローム解析を行い、糖尿病合併心筋において、AMP デミナーゼ (AMPD) 活性亢進によるアデニンヌクレオチドプールおよび ATP レベルの低下が拡張機能障害に寄与すること、したがって AMPD 活性制御が糖尿病性心筋症の新たな治療標的になり得ることを報告した。AMPD が心不全の有望な治療標的である可能性は臨床的なデータからも支持される。ヒト心筋で発現するアイソフォームである AMPD1 の一塩基多型 C34T 変異は一般集団で 10-15% と高頻度に認め (J Med Genet 2005) AMPD 活性をおよそ 50% 減弱させる (Nucleosides nucleotides nucleic acids. 2005)。一方、心不全患者の生存率は C34T 変異例では野生型例と比較して有意に高いことが報告されており、AMPD 活性の低下が心不全の予後を改善することが示唆される。これらの成績から AMPD 活性が上昇している糖尿病性心筋症においてはその活性制御が新規かつ有望な治療標的である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

当教室でこれまで見出した知見に基づき、本研究では糖尿病合併心筋における AMPD 活性制御機構をさらに詳細に検討する。さらに AMPD 活性により誘導されるプリン代謝経路への介入が拡張機能障害を改善するかを in vivo で検討し、糖尿病性心筋症への治療応用の基礎となる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AMPD3 活性制御の機序としての AMPD3 蛋白発現の制御機構の検討

- ① 蛋白分解系: ラット心筋の主要アイソフォームである AMPD3 は全長型の 90-kDa と N 末端が切断された 78-kDa のいずれかで存在する。フェニレフリン持続静注による圧負荷 (200 mmHg) の前後で肥満 2 型糖尿病モデルラット OLETF または非糖尿病対照ラット LETO から左室心筋を採取する。抗 AMPD3 抗体による免疫沈降物を用い、ウェスタンブロッティング法により 90 kDa-および 78 kDa-AMPD3 のユビキチン化を定量評価する。また左室心筋可溶化液にプロテアソーム阻害薬である MG132 (50 μ mol/L) を添加後 6 時間の時点で、90 kDa-および 78 kDa-AMPD3 蛋白量を定量評価する。
- ② mRNA 発現量: 左室心筋における AMPD3 の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法により定量評価し、OLETF、LETO 間で差があるかを評価する。
- ③ micro RNA による翻訳制御: 予備実験で microRNA array 解析を行い OLETF で発現が 50% 以上減少している 21 の microRNA を見出した。予測アルゴリズムを用いて AMPD3-mRNA の 3'UTR と結合する可能性の高いものを絞り込み、候補となった microRNA inhibitor を順次、単離心筋細胞にトランスフェクションする。AMPD3 発現増加の有無を検討し OLETF で AMPD3 発現亢進に寄与する miRNA を同定する。

(2) AMPD 活性亢進によるプリン代謝経路への反応基質供給増加の影響の検討

糖尿病心臓で活性が亢進した AMPD は AMP \rightarrow IMP の反応を促進しアデニンヌクレオチドプー

ルの減少、ATP 産生の低下をもたらす。一方、糖尿病では xanthine oxidase (XO) 活性が亢進する。糖尿病心筋において、前述の AMPD 活性亢進により増加した AMP→IMP の反応はさらに下流の IMP→hypoxanthine→xanthine の反応基質を供給する。hypoxanthine および xanthine は XO により uric acid に変換され、この際に活性酸素種 (ROS) が産生される。さらに、ROS はミトコンドリア機能障害を惹起することで、ATP 産生の低下を介して左室機能障害を惹起する可能性がある。そこで次の実験を行なった。

① 25-30 週齢の OLETF に vehicle または選択的 XO 阻害薬である topiroxostat (0.1, 0.3 および 0.5 mg/kg/day) を餌に混じて 2 週間投与し、投与前後で血中および左室心筋組織の XO 活性を測定して topiroxostat が用量依存性に XO を阻害することを確認する。また、この時の左室心筋組織の O₂ の産生量についても同様に Total ROS/Superoxide Detection kit (Enzo Life Sciences) を用いて定量評価し (Tanno et al. *J Biol Chem* 2014;289:29285-29296) topiroxostat が左室心筋の酸化ストレスを軽減するか検討する。Topiroxostat が血行動態や血糖に影響を与えないことを確認するため、投与前後で血圧 (tail-cuff 法)、心拍数、体重、血糖、血清インスリン濃度も測定する。

② topiroxostat ((0.1, 0.3 および 0.5 mg/kg/day)) の投与が 2 型糖尿病モデルラットである OLETF と非糖尿病対照ラットである LETO において血清中の XO の活性、ならびに左室心筋 homogenate の XO 活性と XO タンパク発現量に影響するか LC-FTMS、ウェスタンブロット法を用いて定量評価する。さらに左室心筋細胞ミトコンドリア機能、ATP レベルに影響するかを左室心筋組織を用いて検討する。拡張機能、収縮機能に topiroxostat がおよぼす影響については左室内コンダクタンスカテーテルを用いた圧-容積曲線を用いて解析する。

4 . 研究成果

(1) ラット心筋の主要アイソフォームである AMPD3 は全長型の 90-kDa と N 末端が切断された 78-kDa のいずれかで存在し、両者ともに活性を持つことが知られる。フェニレフリン持続静注による圧負荷 (200 mmHg) の前後で採取した心筋組織を採取し AMPD3 抗体を用いて AMPD3 タンパク発現レベルを評価したところ、90kDa-AMPD3 は OLETF において LETO よりも有意に高く、78 kDa-AMPD3 の発現量は OLETF と LETO で同等であった。

① 90kDa-AMPD3 の発現量の OLETF における増加の機序を確認するため、心筋ホモジネートを AMPD3 抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物を用いてウェスタンブロット法によりユビキチン抗体で標識し 90 kDa-および 78 kDa-AMPD3 のユビキチン化を定量評価したところ、AMPD3 のユビキチン化は OLETF の心筋でむしろ亢進していることが示された。さらに、左室心筋可溶化液にプロテアソーム阻害薬である MG132 (50 μmol/L) を添加後 6 時間の時点で、90 kDa-および 78 kDa-AMPD3 蛋白量を定量評価したところ、MG132 による蛋白レベル上昇効果は OLETF よりも LETO で高かった。これらの成績から OLETF における 90kDa-AMPD3 の発現亢進の原因としてユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解作用が減弱している可能性は否定的であった。

② mRNA 発現量: 左室心筋における AMPD3 mRNA の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法により定量評価したところ、OLETF と LETO の間で差はなく、mRNA の発現亢進が OLETF における 90kDa-AMPD3 発現レベルの上昇に寄与している可能性も否定された。

③ micro RNA による翻訳制御: そこで、microRNA array 解析を行い OLETF で発現が減弱している microRNA を同定した。検出された 595 の microRNA のうち、OLETF において LETO と比較して 50% 以上減少している 21 の microRNA に着目した。この中から、予測アルゴリズムを

用いて AMPD3-mRNA の 3'UTR と結合する可能性の高い microRNA として miR-130b, miR-384, miR-494, let-7A, miR-301b を同定した。各々の microRNA に対する inhibitor, mimic を作成して単離心筋細胞にトランスフェクションして AMPD3 発現を検討したところ、miR-301b inhibitor により AMPD3 の発現が亢進した一方、miR-301b mimic により AMPD3 の発現が減少することが観察された。さらに野生型 AMPD3-3'UTR および変異 AMPD3-3'UTR を用いた luciferase reporter assay をおこない、miR-301b が野生型 AMPD3-3'UTR に結合をして luciferase 活性を上昇させることから、miR-301b が翻訳調整を介して OLETF における AMPD3 発現亢進に寄与することが示された。

(2) 25-30 週齢の OLETF を用いて実験をおこなった。

vehicle または選択的 XO 阻害薬である topiroxostat (0.1, 0.3 および 0.5 mg/kg/day) を餌に混じて 2 週間投与し、投与前後で血中、腎組織中および左室心筋組織の XO 活性を測定した。投与前において、XO 活性はいずれの組織でも OLETF において LETO よりも有意に高く、糖尿病において XO 活性が亢進することが示された。また、Topiroxostat の投与はいずれに組織においても用量依存性に XO を阻害することが確認された。最大の XO 活性阻害効果が得られた用量である 0.5 mg/kg/day を投与しても topiroxostat は OLETF および LETO のいずれにおいても血圧、心拍数、体重、血清インスリン濃度、血糖に影響を与えなかったため、本研究では、topiroxostat 0.5 mg/kg/day の用量で使用した。次に左室心筋における酸化ストレスの程度を 4-HNE 染色および MDA+4-HNE レベルを用いて評価したところ、OLETF では LETO と比較して有意に左室心筋酸化ストレスレベルが上昇していたが、topiroxostat の投与により LETO と同程度のレベルまで酸化ストレスが抑制された。

次に topiroxostat が圧負荷下での左室収縮機能、拡張機能におよぼす影響を OLETF および LETO を用いて検討した。左室内にコンダクタンスカテーテルを挿入して得られる圧-容積曲線を用いて拡張機能の指標として tau、LVEDP、収縮機能の使用として Ees、dP/dtmax を測定し解析した。圧負荷前のベースラインではいずれの指標も OLETF と LETO で差は認めなかった。また、全ての指標が OLETF および LETO のいずれにおいても圧負荷後には圧負荷前と比較して有意に上昇した。圧負荷後の tau および LVEDP は OLETF で LETO よりも有意に高値を示し、OLETF において拡張機能障害が顕在化したことが示された。また、Ees および dP/dtmax は圧負荷後も LETO と OLETF で同等であり左室収縮能は早期の糖尿病性心筋症ではストレス下においても維持されることがわかった。Topiroxostat は OLETF において tau および LVEDP の上昇を有意に抑制し、LETO と同程度まで改善した。したがって糖尿病性心筋症での圧負荷による拡張機能の低下には XO 活性が寄与しており、AMPD3 活性亢進による XO の反応基質の増加が一部関与している可能性が示唆された。次に OLETF と LETO においてプリン代謝経路の中間代謝産物レベルを圧負荷の前後で測定した。ベースラインの AMPD3 活性は OLETF において LETO よりも有意に高かったが、OLETF および LETO のいずれでも圧負荷による上昇は認めなかった。一方、XO 活性は OLETF および LETO のいずれにおいても圧負荷で上昇したが、圧負荷の有無にかかわらず OLETF で高値を示した。一方、キサンチンおよび尿酸はベースラインにおいては OLETF と LETO の間で差は認めなかった。圧負荷により OLETF および LETO のいずれにおいても有意に上昇したが、その上昇の程度は OLETF で有意に大きかった。

次に、圧負荷下で topiroxostat のプリン体代謝産物に対する効果を検討した。Topiroxostat の投与は AMPD 活性には影響を与えず、OLETF および LETO のいずれにおいても XOR 活性を同程度のレベルまで強力に抑制した。これを反映して、キサンチン、尿酸のいずれのレベルも

OLEF および LETO と同程度まで強力に抑制した。圧負荷下で観察される OLETF における左室心筋 ATP レベル低下も topixostat によって LETO と同レベルまで改善した。

XO 活性亢進の機序としては XO 蛋白の発現レベルが OLETF において LETO よりもわずかに高いことが示されたが、活性の亢進の程度と比較すると蛋白レベルの上昇の程度は軽度であった。したがって、蛋白レベルの変化のみでは活性の変化は説明ができず、アロステリックな活性調節機構の関与が想定された。過去の当教室の報告においておこなったメタボローム解析で OLETF において LETO よりも左室心筋の圧負荷下でのイノシンレベルの有意な上昇が観察されていた。これには、OLETF における AMPD3 の活性上昇による AMPD→IMP→イノシンの反応基質の増加が寄与していると考えられた。OLETF および LETO の左室心筋ホモジネートにイノシンを添加して XO 活性を測定したところ、XO 活性の上昇が観察されたため、糖尿病心筋での XO 活性の上昇にも AMPD3 活性亢進が間接的に寄与していることが示唆された。

最後に細胞外フラックスアナライザーを用いて OLETF および LETO の左室心筋から単離したミトコンドリアの呼吸能とそれに対する topiroxostat の影響を検討した。培養ミトコンドリアに ADP を添加した際の state3 呼吸および FCCP を加えた際の脱共役 state3 呼吸は OLETF において LETO と比較して有意に抑制されていたが、topiroxostat 投与により有意に改善し、LETO と同レベルまで回復した。一方、state4 呼吸は OLETF および LETO で差異はなかった。これらの成績から AMPD3 活性亢進に基づく XO 活性化はミトコンドリア呼吸鎖複合体機能を障害して ATP 産生を抑制することが示された。

結語：以上の結果を総合すると糖尿病心筋症では AMPD3 が miR-301b による翻訳調節を介してその発現の亢進に基づき活性が亢進しており、圧負荷などのストレスで左室心筋でのアデニンヌクレオチド代謝が亢進した際に AMP→IMP の反応を増加させることで ATP の分解、枯渇を誘導する。さらに、AMP 活性亢進により基質の供給が増加するプリン代謝経路における IMP の下流のイノシンは心筋 XO 活性を亢進させ、ミトコンドリア state3 呼吸の抑制を介して ATP の産生も抑制する。このように AMPD は 2 つの機序を介して左室心筋 ATP レベルを低下させ糖尿病性心筋症の病態に寄与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tatekoshi Y, Tanno M, Kouzu H, Abe K, Miki T, Kuno A, Yano T, Ishikawa S, Ohwada W, Sato T, Niinuma T, Suzuki H, Miura T.	4. 巻 119
2. 論文標題 Translational regulation by miR-301b upregulates AMP deaminase in diabetic hearts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 138-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2018.05.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丹野雅也
2. 発表標題 Novel microRNA-mediated regulation of AMP deaminase, a key player in diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatekoshi Y, Tanno M, Miki T, Kuno A, Yano T, Ono K, Ohwada W, Mizuno M, Nakata K, Abe K and Miura T
2. 発表標題 Upregulation of AMP deaminase in the vicinity of sarcoplasmic reticulum through miRNA mediated translational regulation : a novel mechanism of diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatekoshi Y, Tanno M, Miki T, Kuno A, Yano T, Ohwada W, Abe K, Igaki Y, Fujita Y and Miura T
2. 発表標題 Dysregulation of miR-301b contributes to diabetic cardiomyopathy via upregulation of AMP deaminase in the vicinity of the sarcoplasmic reticulum
3. 学会等名 American Heart Association 2017 . Anaheim, CA, U.S.A（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatekoshi Y, Tanno M, Miki T, Kuno A, Yano T, Ohwada W, Abe K, Igaki Y, Fujita Y, Miura T.
2. 発表標題 Upregulation of AMP deaminase in the vicinity of the SR via translational regulation by miR - 301b contributes to diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 舘越勇輝、丹野雅也	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢野 俊之 (yano toshiyuki) (40444913)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	三浦 哲嗣 (miura tetsuji) (90199951)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	