

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590831

研究課題名（和文）糖尿病心の虚血・再灌流障害に対するインスリン様成長因子 I の効果

研究課題名（英文）Effect of Insulin-like Growth Factor I on Ischemia Reperfusion Injury in Diabetic Heart

研究代表者

高橋 寿由樹 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20286470

研究成果の概要：非糖尿病マウスと比べ糖尿病マウスでは急性期死亡率が高く、再灌流 24 時間後の梗塞サイズは有意に大きかった。組織学的検討では糖尿病マウスにおいて左室灌流域のアポトーシスがより高率に見られた。虚血後（再灌流前）にヒトインスリン様成長因子 I (IGF-I) を投与したところ、糖尿病マウスの急性期死亡率は改善し、IGF-I 非投与群に比較して梗塞サイズの縮小およびアポトーシスの抑制が確認された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：糖尿病、マウス、虚血・再灌流障害、インスリン様成長因子 I、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン様成長因子 (IGF-I) は心筋収縮性亢進、血管新生促進、抗アポトーシス作用、心筋肥大・再生促進など多面的作用を有することが知られ、臨床的な有用性はまだ確立していないものの、IGF-I の血管内投与や局所的な遺伝子発現が心筋虚血や心不全の病態に対し治療効果をもたらすことが期待される。

(2) 非糖尿病の実験動物モデルにおいて IGF-I は心筋虚血・再灌流障害に対して保護

効果を発揮することが報告されているが、糖尿病心、特に肥満型 (型) 糖尿病の心臓において同等の効果があるかどうかはいまだ不明である。

2. 研究の目的

(1) 型糖尿病モデルマウスを用いて、糖尿病心の虚血・再灌流障害における病態生理を解明する。

(2) 糖尿病心の虚血・再灌流障害において

IGF-I の前投与が治療効果をもたらすかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：肥満糖尿病モデルとして db/db マウス（オス、10 週齢）コントロールとして同胞の db/m+ マウスを用いる。



(2) 虚血・再灌流実験プロトコール：全身麻酔、人工呼吸器装着下で開胸し、左冠動脈近位部を結紮する。30 分間虚血後に結紮を解除し再灌流させる。両群とも IGF-I 治療群と非治療群に分け、治療群でヒト IGF-I を、非治療群で同量の生理食塩水（生食）を再灌流前に投与する。

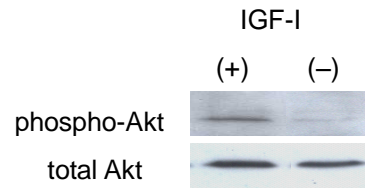
(3) 梗塞サイズ：再灌流 24 時間後に各群で 1% Evans Blue の注入により左室灌流域を染色し、心臓を摘出。1mm スライスで横断面で切り、1% TTC で染色する。10%ホルマリンで固定後に左室灌流域、生存心筋領域、梗塞領域を評価する。

(4) アポトーシス：再灌流 24 時間後に心臓を摘出し、ホルマリン固定後に TUNEL 染色を行う。また、凍結心筋から mRNA を抽出し、real time RT-PCR 法によって Bcl-2, Bax, BAD などのアポトーシス関連遺伝子の発現を解析する。

(5) 炎症反応、血管新生、線維化：H-E 染色標本を作り、組織学的に好中球、マクロファージ、リンパ球など炎症細胞浸潤や血管新生を評価する。Masson-Trichrome 染色で線維化も評価する。凍結心筋から mRNA を抽出し、real time RT-PCR 法で TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, MPO, ICAM-1, LIX などの炎症性サイトカイン、VEGF, FGF-2, HGF, Angiopoietin-1,2 などの血管増殖因子、TGF- β , type 1 collagen, MMP-2, 9, TIMP-1, 2, 3, 4 などの線維化・細胞外マトリックス関連遺伝子の発現を解析する。

(6) IGF-1R/PI3K/Akt シグナリング

心臓摘出後、IGF-1R シグナリングの下流にある Akt および phospho-Akt の蛋白発現をイムノブロット法で検討する。

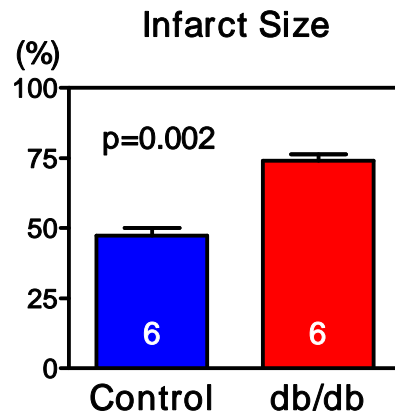


4. 研究成果

(1) 非糖尿病マウスと比べ糖尿病マウスでは急性期死亡率が高かった [Control, 10% (n=2/20) vs db/db, 56% (n=14/24), p=0.001].

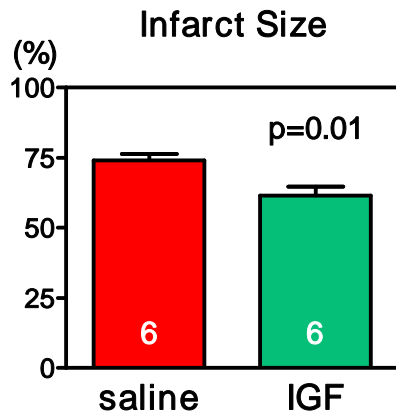
(2) 非糖尿病マウスと比べ糖尿病 (db/db) マウスでは、再灌流 24 時間後の梗塞サイズは有意に大きかった。

Evans Blue+TTC 染色(db/db マウス群)



(3) IGF-I 投与により十分な血中濃度が得られ、血行動態に影響を及ぼさないことを確認し、虚血後（再灌流前）にヒト IGF-I を投与したところ、db/db マウスの急性期死亡率は 25% (n=3/12) まで減少した。

(4) db/db マウスにおいて、IGF-I 投与群では IGF-I 非投与群に比較して 24 時間後の梗塞サイズが縮小した。



(5) 心臓の組織学的検討(TUNEL染色)では、非糖尿病マウスと比べ糖尿病マウスにおいて、左室灌流域のアポトーシスがより高率に見られた。

(6) 糖尿病マウスにおける虚血再灌流後のアポトーシスは、IGF-I非投与群に比較してIGF-I投与群で抑制された。

(7) 糖尿病患者が心筋梗塞になった場合には予後不良であり、IGF-Iの心筋保護効果が確認できれば、急性期に経皮的冠動脈形成術を施行した際に冠動脈内にIGF-Iを注入するという臨床応用に展開する可能性がある。今後は糖尿病心におけるIGF-Iの保護効果に関する分子的機序について、さらなる検討を追加していく予定である。

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 12件)

Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ishizaka A, Ogawa S. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res* 81: 565-573, 2009.

Lai NC, Tang T, Gao MH, Saito M, Takahashi T, Roth DM, Hammond HK. Activation of cardiac adenylyl cyclase expression increases function of the failing ischemic heart in mice. *J Am Coll Cardiol* 51: 1490-1497, 2008.

Tang T, Gao MH, Lai NC, Firth AL, Takahashi T, Guo T, Yuan JX, Roth DM, Hammond HK. Adenylyl cyclase type 6 deletion decreases left ventricular

function via impaired calcium handling. *Circulation* 117: 61-69, 2008.

Kohno T, Anzai T, Naito K, Sugano Y, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S. Angiotensin-receptor blockade reduces border zone myocardial monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in post-infarction ventricular remodeling. *Circ J* 72: 1685-1692, 2008.

Naito K, Anzai T, Yoshikawa T, Anzai A, Kaneko H, Kohno T, Takahashi T, Kawamura A, Ogawa S. Impact of chronic kidney disease on postinfarction inflammation, oxidative stress, and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 14: 831-838, 2008.

Jo Y, Anzai T, Ueno K, Kohno T, Sugano Y, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S. Re-elevation of d-dimer as a predictor of re-dissection or venous thromboembolism during management of stanford type b acute aortic dissection. *Eur Heart J* 29(Suppl):90, 2008.

Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Anzai A, Mano Y, Maekawa Y, Ogawa S, Yoshikawa T. Increased expression of human C-reactive protein aggravates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Eur Heart J* 29(Suppl):131, 2008.

Takahashi T, Anzai T, Kaneko H, Anzai A, Mano Y, Maekawa Y, Ogawa S, Yoshikawa T. Increased C-reactive protein expression exacerbates left ventricular function and remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 118:S-541, 2008.

Jo Y, Anzai T, Sugano Y, Kaneko H, Naito K, Ueno K, Kohno K, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S. Early use of beta-blockers attenuates systemic inflammatory response and lung oxygenation impairment after distal type acute aortic dissection. *Circulation* 116(Suppl):II-745, 2007.

Kaneko H, Anzai T, Naito K, Ueno K, Jo Y, Takahashi T, Kawamura A, Yoshikawa T, Ogawa S. Role of ischemic preconditioning and inflammatory response in the development of malignant ventricular arrhythmias after reperfused acute myocardial infarction. *Circulation*

116(Suppl):11-721, 2007.
Ueno K, Anzai T, Jo Y, Naito K, Kohno T, Takahashi T, Yoshikawa T, Ogawa S. Intravenous administration of immunoglobulin attenuates myocardial reperfusion injury and improves left ventricular remodeling. Circulation 116(Suppl):11-99, 2007.
Naito K, Anzai T, Yoshikawa T, Kaneko H, Jo Y, Ueno K, Kohno T, Takahashi T, Kawamura A, Ogawa S. Presence of chronic kidney disease is associated with enhanced inflammatory response, oxidative stress and adverse left ventricular remodeling after reperfused acute myocardial infarction. Circulation 116(Suppl):11-316, 2007.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 寿由樹 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20286470

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

その他

研究協力者

金子 英弘(KANEKO HIDEHIRO)

慶應義塾大学・医学部・大学院生

海外研究協力者

H. Kirk Hammond

University of California, San Diego

Professor of Medicine