

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293194

研究課題名(和文) Insulin/IGFの協調作用を介した心機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Cooperative regulation of cardiac function by insulin and IGF

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン/Insulin-like growth factor (IGF)シグナルは糖代謝や細胞増殖など多彩な細胞機能調節作用を有することが知られている。心機能調節におけるインスリンとIGFの作用を明らかにするために、インスリン受容体 (IR)/IGF受容体 (IGFR)を個別に、もしくは両者同時に心筋特異的に欠損するマウスを作成し、心機能に及ぼす影響を検討したところ、IR/IGFRを個別にノックアウトしたマウスでは心機能に異常はなかったが、両者を同時に欠損するマウスでは著明な心機能低下がみられた。以上の結果はインスリンとIGFが協調的に心機能を調節していることを示すものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Insulin/Insulin-like growth factor (IGF) signaling regulates multiple cellular processes including glucose homeostasis and cell growth/proliferation. To investigate the role of insulin and IGF signaling in the regulation of contractile function, insulin receptor (IR) or IGF receptor (IGFR) was deleted in cardiac muscle cells either alone or in combination. Although contractile function was not affected by cardiac-specific IR deletion or IGFR deletion, simultaneous deletion of IR/IGFR in the heart resulted in a marked decline in contractility associated with left ventricular dilatation. Our results suggest the cooperative and redundant roles of cardiac insulin/IGF signaling in the regulation of contractile function.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心機能 インスリン IGF

1. 研究開始当初の背景

(1) Insulin/IGF による細胞機能調節

Insulin/insulin-like growth factor (IGF) シグナルは受容体型チロシンキナーゼである Insulin 受容体 (IR)/IGF 受容体 (IGFR) にリガンドが結合することにより活性化される。細胞内では 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、きわめて多彩な細胞機能調節作用を有することが知られている (文献 1) (図 1)。

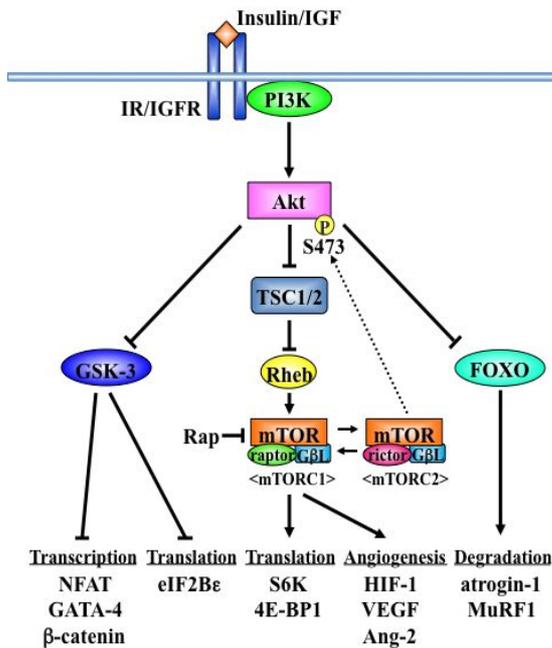


図1 Insulin/IGFによる細胞機能調節(文献1)

(2) Insulin シグナルによる生理的心肥大

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、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 IR をノックアウトすることにより、心筋における Insulin 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、心筋 Insulin 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 2)。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 Insulin シグナルが関与していることを見いだした (文献 3)。生理的心肥大においては心機能が維持されたまま肥大が生じることから、これらの結果は心筋 Insulin シグナルが直接的に心機能維持にも関与している可能性を強く示唆するものと考えられる。しかしながら、上述のように胎児期から心筋 Insulin 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 Insulin 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 IGF が Insulin シグナル欠損を代償している可能性を検討するために、IR と IGFR を個別に、もしくは両者を同時に心筋特異的に欠損するマウスを作成し、心機能に及ぼす影響を検討した。

(3) Insulin/IGF 協調作用による心機能調節

IR および IGFR の flox マウスと心筋特異的に Cre recombinase を発現する αMHC-Cre トランスジェニックマウスを交配して心筋特異的に IR もしくは IGFR が個別にノックアウトされたマウス (IRKO、IGFRKO) を作成したところ、IRKO において心重量/体重比の軽度の低下をみとめるものの、いずれのマウスにおいても左室収縮能の低下はみとめられなかった。しかしながら IR/IGFR の両者をノックアウトしたダブルノックアウトマウス (IR/IGFR DKO) では 6 週齢の時点で著明な心機能低下をきたし、マウスは生後半年以内に心不全で死亡した。

IR もしくは IGFR の単独遺伝子欠損では心機能が保持されているにもかかわらず、両者をノックアウトすると著明な心機能低下をきたすことから、Insulin シグナルと IGF シグナルは協調的に心機能を調節しているものと考えられた。また、糖尿病では心臓を含む多くの臓器でインスリン抵抗性が存在し、さらに我々は圧負荷による心肥大形成時にも心筋にインスリン抵抗性が認められることを過去に報告している (文献 5)。Insulin/IGF 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ことが予想された。

< 文献 >

1. Shiojima I and Walsh K. Genes Dev 2006;20:3347
2. Shiojima I et al. J Clin Invest 2005;115:2108
3. Shiojima I et al. J Biol Chem 2002;277:37670
4. Ikeda H, Shiojima I et al, J Mol Cell Cardiol 2009;47:664
5. Shimizu I, Shiojima I et al, J Clin Invest 2010;120:1506

## 2. 研究の目的

そこで本研究では心筋特異的 IR/IGFR DKO マウスを用いて以下の 3 点について検討することにより、Insulin/IGF の協調作用を介した心機能調節機構を解明し、新たな心不全治療法を確立することをその目的とした。

- (1) Insulin/IGF シグナルの心機能調節における相補性および相対的な重要度を明らかにする
- (2) IR/IGFR DKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を明らかにする
- (3) IR/IGFR DKO マウスの心筋内エネルギー産生系の変化を明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) Insulin/IGF シグナルの心機能調節における相補性および相対的な重要度を明らかにする：心機能調節において Insulin シグナルと IGF シグナルが相互に相補性を有することは予備実験の結果からも明らかであるが、IR と IGFR の相対的な重要度は必ずしも明確ではない。心筋細胞特異的な IRKO マウス、IGFRKO マウス、IR/IGFR DKO マウスにおける IR 遺伝子および IGFR 遺伝子欠損は以下のように示される。

	< IR >	< IGFR >
野生型マウス	+/+	+/+
IRKO マウス	-/-	+/+
IGFRKO マウス	+/+	-/-
DKO マウス	-/-	-/-

心機能調節における IR と IGFR の相対的な重要度を遺伝学的に解析するために、以下のように IRKO マウスのバックグラウンドで IGFR をヘテロで欠損したマウスと IGFRKO マウスのバックグラウンドで IR をヘテロで欠損したマウスを作成した。

	< IR >	< IGFR >
IRKO + IGFR hetero	-/-	+/-
IR hetero + IGFRKO	+/-	-/-

これら①～⑥のマウスにおいて心機能を比較することにより、心機能調節における IR と IGFR の相対的な重要度が明らかになることを試みた。

(2) IR/IGFR DKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を明らかにする：心筋細胞内シグナル伝達について、以下の 2 つの実験条件で Western blot 法を用いて検討した。

- (2)-1：自由摂食下
- (2)-2：overnight fast 後 Insulin/IGF 投与下

解析は 野生型マウス、IRKO マウス、IGFRKO マウス、IR/IGFR DKO マウスを用いて行い、Insulin/IGF システムにおけるリガンド-受容体の関係や、Insulin/IGF が協調的に心機能を制御するメカニズムを明らかにすることを試みた。

(3) IR/IGFR DKO マウスの心筋内エネルギー産生系の変化を明らかにする：IR/IGFR DKO マウスにおける心筋内エネルギー産生系について検討するために、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. 研究成果

(1) Insulin/IGF シグナルの心機能調節における相補性および相対的な重要度を明らかにする

IR と IGFR の相対的な重要度を遺伝学的に解析するために、心筋特異的に IR と IGFR を様々な組み合わせでノックアウトし、心機能を解析した。IR/IGFR DKO マウスでは著明な心機能低下をみとめたが、IRKO マウスおよび IRKO + IGFR hetero-KO マウスでは心機能は正常もしくはごく軽度の低下にとどまり、野生型マウス、IGFRKO マウス、IR hetero-KO + IGFRKO マウスでは正常であった。以上の結果は心機能調節において IR を介したシグナルが IGFR を介したシグナルよりも相対的に重要であることを示唆するものと考えられた。

IR/IGFR DKO マウスにおける組織学的検討では、心筋細胞 cross sectional area の著明な減少と間質の線維化がみられ、Insulin/IGF シグナルが心筋細胞サイズの維持に機能していることが明らかになった。さらに、間質に Mac3 陽性 Ly-6G 陰性の単核球の浸潤がみられ、マクロファージを介した炎症機構がこのような重篤な表現型に寄与していることが考えられた。

また、IR/IGFR DKO マウスは生直後から著明な心拡大と心機能低下をきたし、早期に死亡することから解析対象が若年マウスに限られてしまう。そこでタモキシフェン誘導型 Cre/loxP システムを用いて成体で IR/IGFR を誘導的にノックアウトすることを試みた。生後 12 週齢の誘導型 IR/IGFR DKO マウスにタモキシフェンを投与すると、投与 1 週間後には著明な心拡大・左室収縮能低下をきたし、組織学的には心筋の脱落・置換性線維化とマクロファージの浸潤がみられた。以上の結果は出生直後だけでなく成体の心臓においても Insulin/IGF シ

グナルは相補的かつ協調的に心機能を維持していることを示す結果と考えられた。

#### (2) IR/IGFR DKO マウスの心筋内シグナル伝達の変化を明らかにする

自由摂食下における心筋細胞内シグナル伝達を解析したところ、IR/IGFR の下流シグナル伝達経路のうち PI3K-Akt-mTOR 経路の活性が減少していることが示された。また、overnight fast 後の IGFRKO マウスにおいて IGF を静脈内投与後に、IR のチロシンリン酸化が著明に亢進していることが明らかになった。すなわち、Insulin シグナルと IGF シグナルの相補性はリガンドと受容体の相互作用においてもみられることが明らかになった。

#### (3) IR/IGFR DKO マウスの心筋内エネルギー産生系の変化を明らかにする

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遺伝子発現量を検討したところ、脂肪酸代謝に関与する酵素の発現が一部低下している可能性が示唆された。

#### (4) 研究成果のまとめ

本研究の結果から、心臓において Insulin シグナルと IGF シグナルが協調的に心機能を調節していること、Insulin シグナルのほうが IGF シグナルに比して相対的にその重要度が大きいこと、が明らかになった。Insulin/IGF シグナルが心機能を制御する分子機構についてはその全体像を明らかにするまでには至らなかったが、IR/IGFR 下流のシグナルのうち PI3K-Akt-mTOR 経路の down-regulation や脂肪酸代謝低下などがその機序として考えられた。

#### 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5件:すべて査読あり)

1. Higo T, Naito AT, Sumida T, Shibamoto M, Okada K, Nomura S, Nakagawa A, Yamaguchi T, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Ito M, Hikoso S, Akazawa H, Lee JK, Shiojima I, McKinnon PJ, Sakata Y, Komuro I. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun*. 2017;8:15104.

2. Nakagawa A, Naito AT, Sumida T, Nomura S, Shibamoto M, Higo T, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Oka T, Lee JK, Harada M, Ueda K, Shiojima I, Limbourg FP,

Adams RH, Noda T, Sakata Y, Akazawa H, Komuro I. Activation of endothelial  $\beta$ -catenin signaling induces heart failure. *Sci Rep*. 2016;6:25009.

3: Yoshioka K, Otani H, Shimazu T, Fujita M, Iwasaka T, Shiojima I. Sepiapterin prevents left ventricular hypertrophy and dilatory remodeling induced by pressure overload in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(10):H1782-91.

4: Okada K, Naito AT, Higo T, Nakagawa A, Shibamoto M, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Sumida T, Nomura S, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Morimoto S, Sakata Y, Shiojima I, Komuro I. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Contributes to Skeletal Myopathy in Heart Failure via Direct Interaction With Forkhead Box O. *Circ Heart Fail*. 2015;8(4):799-808.

5: Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of  $\beta$ -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun*. 2015;6:6241.

#### 6 . 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 連携研究者

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