

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18972

研究課題名(和文) 糖尿病における血糖変動は、糖尿病性心筋症を促進するか

研究課題名(英文) Glucose Fluctuations aggravate diabetic cardiomyopathy

研究代表者

齋藤 聖多郎(Saito, Shotaro)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：60631380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Streptozotocin静注SDラットを用いた1型糖尿病モデルに対し、24時間の絶食にて低血糖を誘導し、その後自由摂食により血糖を上昇させ、血糖変動モデルとして解析した。絶食による血糖変動を4日間のうち2回施行した血糖変動ラットと、自由摂食を維持した糖尿病ラットおよび対照非糖尿病ラットによる3群間の比較を行った。摘出心灌流実験では、血糖変動群で最も有意に虚血再灌流障害が増悪していた。同群の心筋ではNADPH oxidaseの発現増加とROS増加を認め、ミトコンドリアのクリステ破壊がより顕著であった。同群の心筋ではmiRNA-200cおよびmiRNA-141の発現量が増加していた。

研究成果の概要(英文)：Male rats were randomly assigned to either a control, DM, and DM with GF group. DM was induced by an injection of streptozotocin, and glucose fluctuation was induced by starvation and insulin injection. One sequential program comprised 2 hypoglycemic episodes during 4 days. The isolated hearts were subjected to 20-min ischemia/30-min reperfusion. The infarct size was larger in hearts with GF than those with sustained hyperglycemia. Activities of catalase and superoxide dismutase were decreased, and expressions of NADPH oxidase and thioredoxin-interacting protein were upregulated by GF accompanied by an increase of reactive oxygen species (ROS). Swollen mitochondria with destroyed cristae were observed in diabetic hearts; they were further devastated by GF. Microarray analysis revealed that the expressions of miRNA-200c and miRNA-141 were abundant in those hearts with GF.

研究分野：循環器内科

キーワード：糖尿病 血糖変動 酸化ストレス 虚血再灌流障害

### 1. 研究開始当初の背景

大規模臨床試験 ACCORD では、厳格な血糖コントロールをおこなった群で有意に死亡率が高いという結果が示された。従来、糖尿病の血糖コントロール指標としてグリコヘモグロビン(HbA1c)が重視されていたが、近年持続血糖モニタリング (CGM)の利用により、無自覚の低血糖を繰り返している患者が多く存在することや、HbA1c が同程度の値でも血糖値の変動が大きい患者は、より血管内皮機能障害が強いことが示されてきた。このためわれわれは、血糖変動は血管内皮細胞のみならず、心筋細胞にも直接悪影響を与えるのではないかとこの仮説のもとに研究を進めてきた。これまでにわれわれは、糖尿病モデルラットに血糖変動負荷を3週間繰り返した結果、酸化ストレス、アポトーシスや炎症、心房筋の線維化が促進され、心房細動易誘発性となるというデータを得た(Saito et al. Cardiovasc Res, 2014)。血糖変動それ自体が心室筋においても酸化ストレスや炎症、アポトーシスの増加を介して心筋肥大や線維化を促進させ、糖尿病性心筋症を増悪させる可能性は十分に考えられ、当初は、血糖変動それ自体が、糖尿病性心筋症を増悪させるという仮説を検証することを目的とした。

### 2. 研究の目的

糖尿病における大きな血糖変動が、糖尿病による心筋障害をより増悪させるかについて、そのメカニズムについての検討を進める過程で、酸化ストレスの影響が大きいことが観察され、虚血再灌流の実験をもとに、血糖変動が ROS 産生を介して心筋障害を増悪させるメカニズムについて検討する方向に研究を修正し、「糖尿病における血糖変動は、安定持続高血糖よりも心筋虚血再灌流障害を増悪させる」という仮説を立てこれを検証した。

### 3. 研究の方法

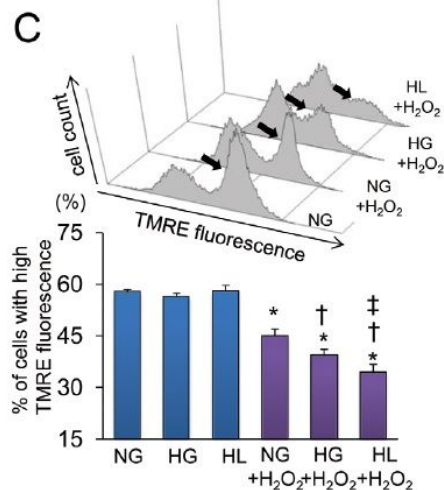
(1) 新生仔ラットの初代培養心筋細胞を用いた解析を行った。培養液中のグルコース濃度を 100mg/dl に保った Normal glucose(NG)群と、450mg/dl に保った High glucose(HG)群、および 450mg/dl と 30mg/dl のグルコース濃度を 24 時間毎に入れ替えた High-Low 群の3群に分けて各種アッセイを行った。各培養液中の浸透圧は D-glucose の光学異性体である L-glucose を添加して一定に揃えた。

(2) Streptozotocin 静注 SD ラットを用いた 1 型糖尿病モデルに対し、24 時間の絶食にて低血糖を誘導し、その後自由摂食により血糖を上昇させ、血糖変動モデルとして解析した。絶食による血糖変動を 4 日間のうち 2 回施行した血糖変動ラット(GF 群)と、自由摂食を維持した糖尿病ラット(DM 群)および対照

非糖尿病ラット(Veh 群)による 3 群間の比較を行った。血糖変動負荷期間終了後、ランゲンドルフ灌流装置を用いた摘出心灌流実験を行った。20 分間の全虚血を与えた後、30 分間の再灌流を行った。

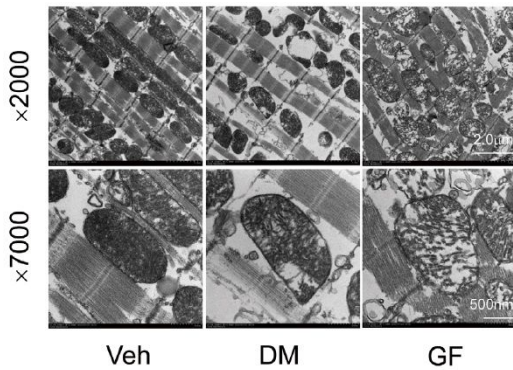
### 4. 研究成果

(1) 培養心筋細胞を用いた検討では、ROS indicator である DCF を用いたフローサイトメトリーでの評価では、HL 群では HG 群に比べさらに、ROS 産生量が増加していた。さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激によるミトコンドリア膜電位を TMRE 染色にて評価したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激の無い状況では各群に差は認められなかったが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激により酸化ストレスが与えられると、HL 群では HG 群よりもさらに強く障害され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激に対し脆弱となっていた。



(2) 動物実験における血糖変動負荷では、Veh 群はおおよそ血糖 100mg/dl 程度で推移しているのに対し、DM 群は血糖 500mg/dl 前後で推移し、GF 群では、絶食により血糖値が大きく変動していた。ランゲンドルフ灌流装置を用いた摘出心灌流実験における、虚血再灌流による心筋梗塞巣のサイズを TTC 染色で比較したところ、GF 群でもっとも有意に梗塞巣が増大していた。

(3) 血糖変動による心筋障害のメカニズムを検討するため、酸化ストレスに関わる因子の評価を行った。酸化ストレスマーカーである MDA のラット心筋での発現量を Western blot で評価したところ、GF 群で有意に高値であった。また、抗酸化酵素である SOD の、ミトコンドリアおよび細胞質での評価では、ともに GF 群で有意に低下していた。酸化ストレスに関わる NADPH oxidase と Txnlp (Thioredoxin binding protein) もそれぞれ、GF 群で有意に増加していた。さらに、ミトコンドリアの形態変化を透過型顕微鏡で観察したところ、GF 群ではより、ミトコンドリアが膨化し、クリステが破壊されている像が観察された。



(4) 糖尿病における血糖変動の心筋への影響に関わるマイクロ RNA の関与を検討するため、血糖変動負荷試験をおこなった 3 群間のラット心筋を用いてマイクロ RNA アレイを行った。各群間で有意に変化の大きかったマイクロ RNA を検討し、miR141 と miR200c の 2 つを抽出した。実際に 2 種類のマイクロ RNA の心筋での発現量を PCR で評価したところ、GF 群で有意に増加していた。

(5) そこで、培養心筋細胞を用いて、これらのマイクロ RNA の効果を検討した Pre-miR を用いてそれぞれのマイクロ RNA を過剰発現させ DCF 染色により酸化ストレスの評価をおこなったところ、コントロールに比べ、miR141、miR200c とともに過剰発現させると心筋細胞での ROS 産生が増加しており、MitoSOX Red を用いたミトコンドリア内の ROS 産生量の比較でも、過剰発現させた群でいずれも増加を認めた。ELISA による SOD やカタラーゼの発現量評価では、miR141・miR200c それぞれにおいて過剰発現させた群で、SOD・カタラーゼはより低下していた。

(6) さらに、研究の方法(1)で示した系において、あらかじめ Anti-miR を用いて、miR141、miR200c をノックダウンしておく、グルコース濃度変動を与えた心筋細胞において、DCF 染色による評価で ROS の産生量は有意に減少していた。

以上より、糖尿病における血糖値の大きな変動は、持続高血糖と比較して、より虚血再灌流障害を増悪させた。このメカニズムとして、ROS 産生増加および抗酸化酵素の減少が関与しており、miR141 や miR200c が影響している可能性が示唆された。

(7) さらに、血糖変動が不整脈増加に影響するかについて同様の血糖変動負荷を 4 週間与えた動物モデルで検討したところ、血糖変動群で有意に洞結節回復時間が延長した。同モデルの透過型電子顕微鏡による心筋の観察では、血糖変動群において有意に洞結節の構造的変化が認められた。

## 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 1 件)

1. Saito S, Thuc LC, Teshima Y, Nakada C, Nishio S, Kondo H, Fukui A, Abe I, Ebata Y, Saikawa T, Moriyama M, Takahashi N. Glucose Fluctuations Aggravate Susceptibility to Ischemia/Reperfusion Injury by Modulating MicroRNAs Expression. *Circ J.* 80:186-195. 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Saito S. Glucose Fluctuations Aggravate Cardiac Susceptibility to Ischemia/Reperfusion Injury by Modulation MicroRNAs Expression. 第 81 回日本循環器学会総会・学術集会 3.18, 2017 ホテル日航金沢(石川県金沢市)

2. Saito S, Teshima Y, Nishio S, Kondo H, Takahashi N. 糖尿病モデルラットにおける血糖変動が心筋線維化および心房細動誘発性へ及ぼす影響についての検討. 第 2 回日本心臓脳卒中学会学術集会 6.13, 2015 ホテルクレメント徳島(徳島県徳島市)

3. Saito S, Teshima Y, Nishio S, Ebata Y, Abe Ichitaro, Kondo H, Nakagawa M, Takahashi N. Glucose Fluctuations Aggravate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Type 2 Diabetic Rats. 第 79 回日本循環器学会総会・学術集会 4.25, 2015 グランキューブ大阪(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 聖多郎 (Shotaro Saito)  
大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断  
学講座・病院特任助教  
研究者番号：60631380

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )