

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08032

研究課題名(和文)心腸連関に着目した心不全治療戦略 心筋オートファジーにおけるGLP-1の重要性

研究課題名(英文)The novel strategy for treating heart failure based on cardio-intestinal relationship; functional significance of endogenous GLP-1

研究代表者

金森 寛充 (Kanamori, Hiromitsu)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20456502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧心不全モデル動物では小腸由来の内因性GLP-1の血中濃度が上昇し、不全心筋ではGLP-1受容体(R)の発現が増加しその下流シグナル(PKA、CREB、DRP-1)のリン酸化が増強していた。miglitol投与により腸管からのGLP-1分泌を増加することで心筋のGLP-1Rの下流シグナルが増強しミトコンドリア融合が促進、ATP産生が増加し心機能は改善した。一方、GLP-1Rを阻害したところ下流シグナルは抑制されミトコンドリアサイズは小さくなりATP産生は減少し心機能は低下した。GLP-1分泌を介した心腸連関が存在しその抗心不全作用にミトコンドリアダイナミクスへの影響があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在心不全罹患者は急激に増加し心不全と他臓器との関連が注目されている。「心腸連関」は未だ確立されていないが、これまでに心不全動物モデルにおいてGLP-1の心保護作用に関する多くの報告があること、心筋にもGLP-1受容体の存在が証明されていることからGLP-1を軸として心臓と腸管に強い関連が想定される。GLP-1Rの下流には心筋エネルギー代謝に関わるシグナルがあるがここからつながるミトコンドリアダイナミクスやオートファジーとの関連は不明である。これらを明らかにすることは細胞生物学的に意義があると同時に新しい心不全治療法開発のブレイクスルーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Plasma GLP-1 levels was increased from intestinal response to heart failure.

The expression of myocardial GLP-1 receptor was augmented and its downstream signals such as PKA, CREB, DRP1) were phosphorylated in failing heart. Promotion of GLP-1 secretion by miglitol treatment augmented myocardial GLP-1R downstream signals, increased myocardial size by fusion and ATP production, and consequently, mitigated heart failure. On the other hand, GLP-1R with exendin (9-39) blockade brought about opposite results and aggravated cardiac dysfunction despite the increased GLP-1 synthesis. The present study suggests a concept, cardio-intestinal relationship; the intestine mediates a compensatory response to heart failure through GLP-1 synthesis and activation of its receptor system. It is important that enhancement endogenous GLP-1, which would augment mitochondrial fusion in cardiomyocytes via the PKA-DRP1 pathway, may be a novel therapeutic strategy for treating heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 ミトコンドリアダイナミクス オートファジー 高血圧 GLP-1 GLP1受容体

## 1. 研究開始当初の背景

GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は遠位小腸・近位大腸から分泌される消化管ホルモンの一つである。GLP-1 は膵細胞の GLP-1 受容体 (GLP-1R) に作用し血糖依存的にインスリン分泌を促進しグルカゴン分泌を抑制する効果があるので糖尿病治療薬として Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬や GLP-1 アナログが開発され臨床応用されている。一方で GLP-1R は膵細胞だけでなく、中枢神経、肺、腎臓、消化管、心血管系など多くの臓器に発現していることから GLP-1 の多彩な膵外作用が注目されている。特に心血管系では保護的役割を持つことが続々と報告されている。しかし基礎実験において GLP-1 の心疾患への有効性が示されているが、糖尿病患者を対象に行った DPP-4 阻害薬の大規模臨床試験ではむしろ心不全リスクを増加させる可能性があることが示唆されており (SAVOR-TIMI53 試験、EXAMINE 試験)、GLP-1/GLP-1R の心不全における意義は明らかでない。申請者らは以前に内因性の GLP-1 が心不全の病態に関与していると考え、心不全患者における血中 GLP-1 濃度と心筋の GLP-1R 発現を ELISA 法と心筋生検標本の免疫染色を用いて検討したところ、心不全患者では有意に血中 GLP-1 濃度が高く EF (心収縮能) と GLP-1 濃度は負の相関が得られ、BNP (心不全指標ペプチド) と GLP-1 濃度では正の相関が得られた。さらに心筋では GLP-1R の発現が心機能低下症例において有意に増強していることを見出した。これらのことは心不全において腸管と心臓の間に GLP-1 と GLP-1R を介したクロストーク、いわゆる“心腸連関”が存在することを示唆する。

上記の臨床研究から GLP-1R 刺激が心不全に保護的な役割を持つことが想定されるが詳しい機序は全く不明である。GLP-1R 刺激はセカンドメッセンジャーとして cAMP (cyclic adenosine 3' 5' -monophosphate) を介して PKA (protein kinase A) を活性化するが PKA は細胞内のエネルギーセンサーの一つなのでオートファジーとミトコンドリアの制御に関わると考えられる。オートファジーは細胞内のエネルギー状況に応答して発動する自己細胞内蛋白分解機構である。心筋内エネルギーの不足は心機能低下の原因の一つであり、オートファジーが不全心筋においてエネルギー不足に対する生理的な代償機構として働き心機能を維持することが報告されている。また PKA は dynamin-related protein 1 (DRP1) を調節してミトコンドリアダイナミクス (fusion/fission) を制御していることが報告されている。融合 (fusion) はミトコンドリアが融合しサイズを大きくし内部クリスタを増加することで ATP 産生効率を上げる。一方、分離 (fission) はミトコンドリアの傷んだ部位を分離してオートファジーで消化し残された健全なミトコンドリアエネルギーの産生効率を上げる。fusion、fission のいずれもミトコンドリアの質を改善する生理機構であるがその形態変化は正反対である。申請者は不全心筋での電子顕微鏡による超微形態の観察でオートファジー空胞の蓄積、ミトコンドリアの集簇や大小不同、クリスタの異常が見られることを以前から注目しているがそのメカニズムは不明である。不全心筋においてオートファジーやミトコンドリアダイナミクスの直接のトリガーや fusion と fission のどちらが有利であるかは不明であるが腸管からの GLP-1 分泌刺激がこの鍵を握ると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は腸管が心不全において GLP-1 分泌を介し心保護に働くことに注目する。外因性に GLP-1 を投与した場合の心保護作用を示した報告は多いが、心不全において直接に腸管からの内因性 GLP-1 分泌の意義を調べた報告はない。本研究の目的は心腎連関、心脳連関が確立した様に“心腸連関”を明らかにすることである。

既報の GLP-1 の心保護作用の機序でオートファジーやミトコンドリアダイナミクスに注目した研究はない。本研究のもうひとつの目的は GLP-1/GLP-1R 制御が心不全治療戦略になりうるか調べることである。

## 3. 研究の方法

臨床的に多い心不全を対象とするため高血圧心不全モデル動物、Dahl 食塩感受性ラット (DS ラット) を用いた。また非心不全コントロールとして Dahl 食塩抵抗性ラット (DR ラット) を使用した。これらの動物に腸管からの GLP-1 分泌促進薬として miglitol ( $\alpha$  グルコシダーゼ阻害剤、100mg/kg/day) と GLP-1R 阻害剤として exendin (9-39) (2.2 nmol/kg/day) をそれぞれ投与し、食塩負荷 6 週、11 週後に血圧評価、心エコー・心カテーテルによる心機能評価を行った。心機能計測後に血液・心筋組織、腸管組織を採取し、GLP-1、GLP-1R、オートファジー、ミトコンドリアダイナミクスに関する免疫染色・western blotting、PCR 法を行い、心筋・腸管の組織学的評価や細胞内シグナルについて解析を行った。オートファジー空胞、ミトコンドリアなど細胞内超微形態評価のため透過型電子顕微鏡観察を行った。さらに in vitro で GLP-1 の心筋細胞への直接作用を検討した。

#### 4. 研究成果

DS ラットは食塩負荷後速やかに著明な高血圧となり、6週で求心性肥大、11週で左室拡張末期径(LVDd)の拡大・左室駆出率(EF)の低下を認めた。心カテーテル法による心内圧測定では左室拡張末期圧(LVEDP)の上昇、収縮能・拡張能の低下を認めた。心重量、心・体重比は増加し、心筋組織では心筋細胞の肥大、線維化が見られた。DS ラットに miglitol を投与した群では LVDd の拡大、心収縮・拡張能の低下、LVEDP 上昇は軽減され、心肥大・心筋の線維化・心筋細胞肥大は抑制されていた。一方、exendin(9-39)投与群では LVDd の拡大、心機能の増悪、心肥大、心筋の線維化、心筋細胞肥大のさらなる増加を認めた。DS 心不全コントロールラットでは小腸由来 GLP-1 分泌の増加と血中 GLP-1 濃度の上昇を認めた。DS ラットへ miglitol と exendin(9-39)のいずれの投与でもこれらのさらなる増加・上昇を認めた。また DS ラットにおいて miglitol や exendin(9-39)による随時血糖値、HbA1c、随意時血中インスリン濃度に影響は認められなかった。なお DR ラットでは塩分負荷を行った後も高血圧・心機能の低下を呈することはなく、miglitol や exendin(9-39)投与による血圧・心機能への影響は認められなかった。また腸管の GLP-1 分泌や血中 GLP-1 濃度も変化しなかった。

心筋において DS 心不全ラットでは GLP-1R 発現の増加を認めた。そこで GLP-1R 下流シグナルであるプロテインキナーゼ A (PKA) の検討を行ったところ PKA 活性のマーカーである CREB、ATF-1 のリン酸化は DR ラットに比較し DS 心不全ラットでは増加していた。miglitol 投与群でさらなる上昇がみられたが exendin(9-39)投与群では低下を認めた。

電顕観察により心筋細胞のミトコンドリアに着目した。DR ラットに比較し DS 心不全ラットではミトコンドリアの平均サイズの拡大と単位面積あたりの数の減少が見られた。miglitol 投与群ではさらなるミトコンドリアサイズの拡大と数の減少が見られた。一方で exendin(9-39)投与群ではミトコンドリアのサイズは縮小し数の増加が見られた。ルシフェラーゼ活性測定による心筋内 ATP 含有量測定では DR ラットに比較し DS 心不全ラットでは減少していたが、miglitol 投与群では増加を、exendin(9-39)投与群では減少を認めた。心筋内 ATP 含有量と心機能は相関していたことからミトコンドリアの形態変化(ミトコンドリアダイナミクス)が心機能の変化に影響したと考えられた。そこでこれに関連した蛋白を Western blotting 法で検討したところ、DS 心不全ラット心筋では dynamin-related protein 1(DRP-1)の Ser637 のリン酸化、mitofusin-1、OPA-1 の発現増加が見られた。miglitol 投与群ではこれらの蛋白の発現やリン酸化増強を、exendin(9-39)投与群では減少を認めた。また心不全 DS ラットでは DR ラットと比較してミトコンドリアの定量マーカーである TOM20、ATPB、NDUFA9 が増加していたが miglitol と exendin(9-39)投与のいずれも不変でありミトコンドリアの量には GLP-1 刺激は影響しなかった。

オートファジーに関して LC3 と Cathepsin D の発現を免疫染色と Western blotting 調べたところ DS 心不全ラットではオートファゴゾームの増加とリソソームの増加が認められた。しかし miglitol と exendin(9-39)投与でいずれも変化がなく GLP-1 刺激はオートファジー活性へ影響しなかった。

GLP-1 が心筋細胞の GLP-1R を介して作用するかどうかを in vitro でラット幼若心筋細胞を用いて検討した。GLP-1 を投与した心筋細胞では DRP-1 のリン酸化、mitofusin-1 の発現および ATP 含有量の増加を認めた。また forskolin(PKA 刺激薬)でも同様の結果が得られた。一方、これらの効果は exendin(9-39)や H-89(PKA 阻害剤)を投与することで相殺された。これらの薬剤でオートファジーフラックスアッセイを行ったが不変であった。

以上よりラット高血圧心不全において内因性 GLP-1 の上昇は小腸の GLP-1 分泌増加によること、その意義は心機能低下への生理的な代償反応であることが示され「心腸連関」の存在が示された。GLP-1 の心保護作用の機序の一つに GLP-1R を介したミトコンドリアダイナミクスへの影響が考えられた。GLP-1R の下流シグナルへの刺激により心筋細胞ではミトコンドリアの発現蛋白量を変えずにミトコンドリアの形態に変化が見られた。しかしオートファジーの活性は不変であった。Vitro での直接的な GLP-1 刺激においても同様な結果が得られたことから不全心筋において GLP-1 は GLP-1R-PKA-DRP-1 経路を介し fission/オートファジーよりもミトコンドリアの融合(fusion)を誘導しミトコンドリアのサイズを大きくすることで機能の質を改善し ATP 産生を増加し心筋細胞内のエネルギー状態を維持し心機能改善に寄与したと考えられた。

本研究では心不全における内因性 GLP-1 の上昇は心機能低下への代償反応という「心腸連関」の一つであることが示された。心筋 GLP-1R 刺激はミトコンドリアダイナミクスに働きエネルギー状態を改善する新しい心不全治療戦略となりうることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Naruse Genki	4. 巻 115
2. 論文標題 The intestine responds to heart failure by enhanced mitochondrial fusion through glucagon-like peptide-1 signalling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1873-1885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvz002.	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 -

1. 著者名 Kanamori Hiromitsu	4. 巻 77
2. 論文標題 Morphological characteristics in diabetic cardiomyopathy associated with autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 30-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2020.05.009.	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	成瀬 元気 (Naruse Genki)	岐阜大学医学部附属病院・循環器内科・医員  (13701)	
研究協力者	吉田 明弘 (Yoshida Akihiro)	岐阜大学医学部附属病院・循環器内科・臨床講師  (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------