

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590926

研究課題名（和文） インスリン抵抗性心筋細胞における基質代謝変化とトランスポーターの働き

研究課題名（英文） Alteration in cellular metabolism and substrate transporters in insulin resistant cardiac myocytes

研究代表者

早乙女 雅夫 (SAOTOME MASAO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70509512

研究成果の概要（和文）：

心不全において心筋細胞はインスリン抵抗性を呈しており、エネルギー基質代謝を脂肪酸に依存し、心筋細胞のエネルギー利用効率低下や心筋細胞の機能不全をさらに起こしてしまう（すなわち代謝的悪循環）。そのため、この心不全時のエネルギー基質代謝障害を改善させる心筋代謝改善薬の開発が急がれている。

本研究では *ex vivo* インスリン抵抗性心筋細胞モデルを確立し、基質トランスポーター（GLUT4, FAT/CD36）働きに注目し、心筋代謝改善薬剤のインスリン抵抗性に対する効果を検討した。*ex vivo* インスリン抵抗性心筋細胞はラット由来の H9c2 細胞（心筋芽細胞）を心筋細胞へ分化させ、心不全の際に起こる血中遊離飽和脂肪酸の上昇（palmitate, 0.2 mM）を疑似した環境で培養することによって作成した。インスリン抵抗性心筋細胞では 2-deoxy-D-glucose 取り込みやインスリンシグナルのリン酸化が抑制されなかった。また、インスリン抵抗性細胞では、GLUT4（糖質トランスポーター）はインスリン刺激でも細胞膜への translocation が認められなかったが、FAT/CD36（脂肪酸トランスポーター）は細胞膜上に分布していた。

心筋代謝改善薬剤のインスリン抵抗性に対する効果検討では、部分的にはあるが心筋細胞に CPT-1 inhibitor（perhexiline；ミトコンドリア脂質取り込み阻害剤）を前負荷した時、palmitate 誘発性のインスリン抵抗性が抑制された。さらに、perhexiline は palmitate 誘発性のミトコンドリア障害からミトコンドリアを保護していた。以上の結果からインスリン抵抗性の改善にはミトコンドリア保護が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In failing hearts, cardiac myocytes mainly depend on fatty acids as an energy substrate because of myocardial insulin resistance, and result in further myocardial energy deficiencies and myocardial dysfunction, namely metabolic vicious cycle. Thus, recent investigations have focused on new agents to modulate the myocardial metabolic deficiency in heart failure.

We in this study have established a novel *ex vivo* cardiac insulin-resistant model, focused on substrate transporters (GLUT4 and FAT/CD36), and assessed the effects of several metabolic modulators on myocardial insulin resistance. The *ex vivo* insulin-resistant myocytes (insulin-resistant myocytes) were produced by inducing rat H9c2 myoblasts to differentiated myocytes and culturing myocytes with saturated fatty acids (palmitate, 0.2 mM), which mimics the increased serum fatty acid levels during heart failure. The insulin-resistant myocytes exhibited an attenuated 2-deoxy-D-glucose uptake and suppressed insulin-signaling. Also, in the insulin-resistant myocytes, GLUT4 (a glucose transporter) was inhibited the

insulin-mediated translocation to plasma membrane, whereas FAT/CD36 (a fatty acid transporter) was relocated in plasma membrane.

Our investigations concerning metabolic modulators revealed that the pretreatment myocytes with a CPT-1 inhibitor (perhexiline), which is an inhibitor of mitochondrial fatty acid uptake, partially restored palmitate-induced insulin-resistance. Furthermore, perhexiline protected myocytes from palmitate-induced mitochondrial dysfunction. From these results, the mitochondrial protection may be a key factor for the prevention against myocardial insulin resistance.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2011年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：循環器

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：循環器、高血圧、糖尿病

#### 1. 研究開始当初の背景

生理的条件下において心筋細胞は脂肪酸、糖質、乳酸をバランスよく利用しているが、心不全による慢性的カテコラミン刺激と高脂質血症が生じると、心筋細胞はインスリン抵抗性を呈する。インスリン抵抗性によって心筋細胞はエネルギー基質代謝のほとんどを脂肪酸に依存し、エネルギー効率を低下させ、さらに心不全を悪化させる (metabolic vicious cycle) ことが知られている。この心不全時のエネルギー基質代謝障害を改善させる心筋代謝改善薬の開発が急がれている。

#### 2. 研究の目的

本研究では心不全時の心筋インスリン抵抗性を再現する ex vivo インスリン抵抗性心筋細胞モデルを確立し、その基質トランスポーター (GLUT4, FAT/CD36) 働きに注目し、基質代謝のバランスを改善させる治療的戦略の検討を行った。

#### 3. 研究の方法

インスリン抵抗性 ex vivo 心筋細胞モデルの作成：ラット由来の培養心筋細胞 (H9c2 rat cardiac myoblast) を分化させて、心不全の際に起こる血中遊離飽和脂肪酸

(palmitate, 0.2 mM)の上昇を疑似した環境で培養することによって、心不全時のインスリン抵抗性心筋細胞を再現した ex vivo 実験モデルを確立した。インスリン抵抗性は 2-deoxy-D-glucose (2-DG)取り込みやインスリンシグナルのリン酸化を評価した。またトランスポーター (GLUT4, FAT/CD36) の細胞内分布も観察し、それぞれのトランスポーターの役割について検討した。

インスリン抵抗性改善薬の検討：当該研究の実験モデルを用いてインスリン抵抗性を改善させる可能性のある薬剤 (ROS scavenger, CPT-1 inhibitor など)の効果を検討した。

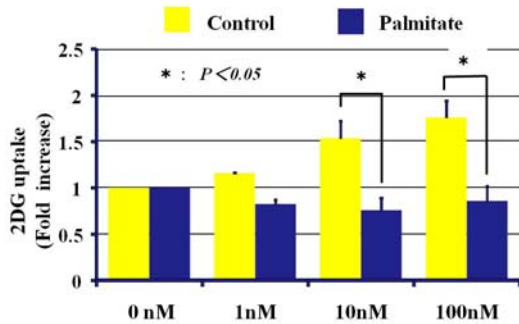
ミトコンドリア機能の検討：当該研究の実験モデルを用いて、心筋代謝改善薬を用いた時のミトコンドリア機能をミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) や活性酸素濃度 (ROS) を測定し評価した。

#### 4. 研究成果

当該研究ではラット由来の培養心筋細胞 (H9c2 cardiac myoblasts) を分化させ、飽和脂肪酸 (palmitate) を負荷することによって、心不全時の心筋インスリン抵抗性 (図1) を再現する ex vivo 実験モデルを確立し

た (特願 2011-155940)。

図1: パルミチン酸負荷した心筋細胞はインスリン抵抗性を示した



この時の糖質トランスポーター (GLUT4) はインスリン刺激で細胞膜への translocation が認められず、脂質トランスポーター (FAT/CD36) は常に細胞膜上に分布していた。この実験モデルによって性のある薬剤についてスクリーニングインスリン抵抗性を改善させる可能を行ったところ、ミトコンドリアへ脂質取り込みを阻害する CPT-1 inhibitor (perhexiline) で心筋細胞のインスリン抵抗性に対する抑制効果が認められた (図 2・3)。

図2: Perhexiline はインスリン抵抗性を改善した

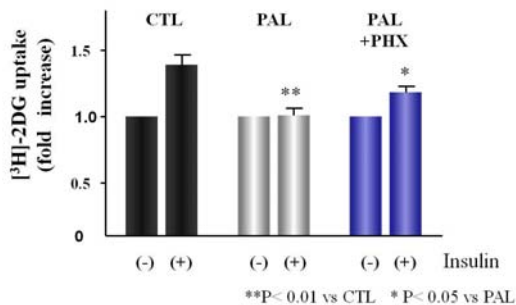
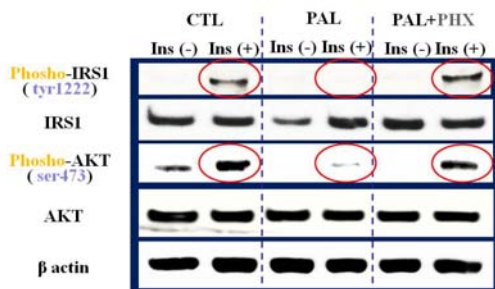


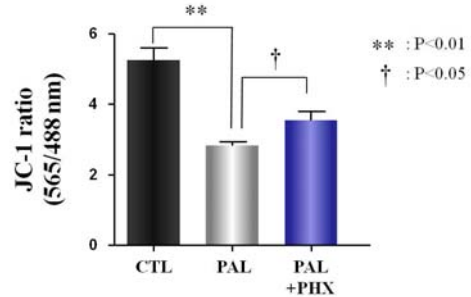
図3: Perhexilineはインスリンシグナルを改善した



同時に CPT-1 inhibitor (perhexiline) はミトコンドリアの保護効果を有することが示され

た (図 4)。

図4: Perhexilineはミトコンドリア膜電位も改善させた



以上の結果からインスリン抵抗性の改善にはミトコンドリア保護が肝要である可能性が示唆された。

(図は perhexiline がインスリンシグナル伝達を濃度依存性に改善したことを示す。)

#### 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 7 件)

1. Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H: Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated  $Ca^{2+}$  entry via non-selective cation channels. *Cardiovasc. Res.* 83: 97-105, 2009. (査読あり)
2. Kawashima H, Satoh H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the  $Ca^{2+}$  loading of the sarcoplasmic reticulum without changing its  $Ca^{2+}$  release. *Circ. J.* 73: 1133-1140, 2009. (査読あり)
3. Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296: H1125-H1132, 2009. (査読あり)
4. Satoh H, Matoh F, Shiraki K, Saitoh T, Odagiri K, Saotome M, Usushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H: Delayed enhancement on cardiac magnetic resonance and clinical, morphological and electrocardiographical features in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Cardiac. Fail.* 15: 419-427, 2009. (査読あり)

5. Odagiri K, Katoh H, Kawashima H, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes: *J Mol Cell Cardiol*. Jun 46 (6):989-97, 2009. (査読あり)
6. Saitoh T, Satoh H, Nobuhara M, Machii M, Tanaka T, Ohtani H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Intravenous glutathione prevents renal oxidative stress after coronary angiography more effectively than oral N-acetylcysteine.: *Heart Vessels*. Sep 26(5):465-72, 2011. (査読あり)
7. Ohtani H, Katoh H, Tanaka T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes: *Nitric Oxide*. Feb 15;26(2):95-101, 2012. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. Saotome M, Hayashi H, Hajnoczky G: Reactive Oxygen Species (ROS) control mitochondrial motility: ESC congress 2009. 8, Barcelona
2. Satoh H, Matoh F, Shiraki K, Saitoh T, Odagiri K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Delayed Enhancement on Cardiac Magnetic Resonance and Clinical, Morphological and ECG Features in Hypertrophic Cardiomyopathy. 17<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Cardiology. 2009.5. Kyoto.
3. Satoh H, Kawashima H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Protein Phosphatase Inhibitor-1 can Augment a Protein Kinase A-dependent Increase in the SR Ca<sup>2+</sup> Loading Without Changing the SR Ca<sup>2+</sup> Release. The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the ISHR, 2009.12, Sapporo.
4. Satoh H, Kawashima H, Saotome M, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor-1 can augment a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca<sup>2+</sup> loading without changing the SR Ca<sup>2+</sup> release. XX World Congress of the International Society for Heart Research, 2010.5. Kyoto.
5. Saotome M, Katoh H, Tanaka T, Nobuhara M, Saito T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Transient mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening by hydrogen peroxide affords cardiac protection from reperfusion injury, 20<sup>th</sup>

- world congress of ISHR, 2010 May, Kyoto
6. Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: A novel ex vivo model to investigate metabolic deficiency in cardiac myocytes--differentiated H9c2 cells to assess the insulin-resistant heart. 55<sup>th</sup> annual Biophysical Meeting, 2011.3 Baltimore, USA.
7. Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: Saturated fatty acid impairs glucose uptakes and accelerates FAT/CD36 retention at plasma membrane in differentiated H9c2 Cardiomyocytes: 日本循環器学会総会, 2011. 8 横浜
8. Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H: A Novel *ex vivo* Cardiac Insulin Resistance Model Using Differentiated H9c2 Cell and Saturated Fatty Acids: 第28回国際心臓研究学会日本部会, 2011.12, 東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 心不全の心筋インスリン抵抗性を再現した *ex vivo* 心筋細胞、その作製方法および該心筋細胞を用いたスクリーニング方法

発明者: 早乙女雅夫、林 秀晴

権利者: 浜松医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-155940

出願年月日: 平成 23 年 7 月 14 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早乙女 雅夫 (SAOTOME MASAO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 7 0 5 0 9 5 1 2

(2) 研究分担者

加藤 秀樹 (KATOH HIDEKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 8 0 3 1 4 0 2 9

佐藤 洋 (SATOHI HIROSHI)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30293632

林 秀晴 (HAYASHI HIDEHARU)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50135258

漆田 毅 (URUSHIDA TSUYOSHI)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20334980

(3)連携研究者

船木 真理 (FUNAKI MAKOTO)  
徳島大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：10467821