

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590209

研究課題名（和文） 糖尿病モデル動物における反復性低血糖発作が心筋へ及ぼす影響と病態の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the effect and mechanism of repeated hypoglycemia on cardiomyocytes in an animal model of diabetes mellitus

研究代表者

手嶋 泰之 (TESHIMA YASUSHI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10457608

研究成果の概要（和文）：今回の研究では血糖値変動が心筋に直接影響し、虚血再灌流障害に対してより脆弱になるか検討した。高グルコース濃度の培養液に暴露した心筋細胞では正常グルコース濃度にて培養した細胞より心筋細胞内の活性酸素種量が有意に増加し、培養液グルコース濃度を変動させた細胞ではさらに活性酸素種量が増加した。また酸化ストレスに対する脆弱性を調べるため過酸化水素水にて細胞障害を誘導した結果、各群のミトコンドリア膜電位が有意に低下したが、持続高グルコース暴露細胞は正常グルコース細胞に比し細胞障害が大きく、グルコース変動心筋細胞は持続高グルコースに比べさらに細胞障害が大きくなった。動物モデルを用いた実験では、摘出心臓をランゲンドルフ心臓灌流装置にて 20 分間灌流停止と 30 分間再灌流を行ない、梗塞サイズを評価した。糖尿病群では正常血糖群に比し梗塞サイズが有意に大きく、さらに血糖変動群では糖尿病群よりも有意に拡大した。ミトコンドリアの形態変化を電子顕微鏡にて観察した結果、糖尿病群と血糖変動群では正常血糖群に比べミトコンドリアが有意に膨化しており、顕著なクリステ構造の破壊が認められた。次にこれまでに認められた結果の機序を探るため心筋内の活性酸素種量と内在性抗酸化酵素活性について検討した。活性酸素種の指標である心筋内 malondialdehyde (MDA) は正常血糖群よりも糖尿病群、糖尿病群よりも血糖変動群で有意に増加していた。それとは逆に抗酸化酵素である catalase と superoxide dismutase (SOD) の活性は正常血糖群よりも糖尿病群、糖尿病群よりも血糖変動群で有意に低下していた。マイクロ RNA の発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、低血糖発作を繰り返させることにより 2 種類の microRNA の発現が有意に増加しており、この発現変化が細胞内抗酸化システムの減弱を誘導し、虚血耐性の低下につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether frequent hypoglycemic episodes increase susceptibility to ischemia/reperfusion in diabetic rat heart and involvement of microRNA (miRNA). Cultured cardiomyocytes were alternately exposed to high (450mg/dL) or low (30mg/dL) glucose concentrations for 5 days. Glucose fluctuations increased levels of reactive oxygen species (ROS) and rendered cardiomyocytes more vulnerable to oxidative stress. For the study *in vivo*, diabetes mellitus was induced by intravenous injection of streptozotocin and glucose fluctuation was induced by 24-h- fast and insulin injection. Isolated hearts were exposed to 20-min global ischemia/30-min reperfusion. The infarcts were larger in the hearts with glucose fluctuations. Electron microscopy revealed swollen mitochondria with destroyed cristae in diabetic heart, and glucose fluctuations aggravated these changes. Levels of ROS were also increased, and catalase and superoxide dismutase activities were down-regulated by glucose fluctuations. We explored the expression profiles of miRNAs using microarray analysis. The expressions of two miRNAs were more abundant in the hearts exposed to glucose fluctuations. These miRNAs appeared to contribute to decreased activities of antioxidant enzymes and subsequent ROS increase. Fluctuating glucose levels increased ROS generation and enhanced ischemia/reperfusion injury in the diabetic heart. Up-regulated miRNAs might account for the increased ROS by suppressing antioxidant enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	800,000	240,000	1,040,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：病態生理

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は全身の代謝異常であり冠状動脈における動脈硬化を促進し心機能障害をもたらす。一方、血管のみではなく心筋細胞に対して直接影響を及ぼし、細胞内エネルギー代謝異常により心機能障害が誘発されることも知られている。我々はこれまで糖尿病性心機能障害のメカニズムとして細胞内 Ca<sup>2+</sup>代謝異常を報告し(Teshima et al, J Mol Cell Cardiol, 2000)、さらに薬物や熱ストレスによる虚血再灌流障害の軽減効果が糖尿病モデル動物において減弱することを報告している(Shinohara et al, Diabetes, 2006; Taniguchi et al, Diabetes, 2001)。大規模臨床研究である NICE-SUGAR study (N Engl J Med, 2009)では ICU 入院患者のうち強化血糖コントロール群で有意に死亡率が高かった。この結果は低血糖発作の有無が予後に重大な影響を与える可能性を示唆している。現在、糖尿病の血糖コントロールの指標としてグリコヘモグロビン (HbA1c) が用いられているが高血糖から低血糖への血糖値の変動の大きさは数値として反映されていない。糖尿病患者ではインスリンや経口血糖降下剤の使用によりしばしば医原性低血糖を生じるが、自覚症状として現われない場合も多いと推測される。これまで反復する高血糖⇒低血糖⇒高血糖の血糖変動が心筋細胞へ及ぼす影響についての報告はなく本課題の着想に至った。予備実験として、初代培養心筋細胞を用い、高グルコース⇒低グルコース⇒高グルコー

スと培地中のグルコース濃度を変化させたところ、高グルコースのみで培養した細胞よりも多くの活性酸素が認められた。この結果は血糖変動による心筋への直接作用を強く示唆している。また糖尿病の発症や合併症の進行への microRNA の関与が多くの論文で示唆されている。心臓については、糖尿病モデル動物の心筋細胞において microRNA-133 の発現が増加し心筋イオンチャネルの発現を変化させるとの報告(J Biol Chem, 2007)があり、microRNA-133 が心機能に何らかの影響を与える可能性が示されている。我々はマイクロアレイを用いて網羅的に microRNA の発現を解析し、活性酸素産生との関係について検討する。

2. 研究の目的

「糖尿病患者における低血糖発作」のような大きな血糖変動が心筋細胞における活性酸素種の発生を促進し短期間の暴露でも心機能へ悪影響をあたえ、さらに虚血や虚血再灌流障害に対しより脆弱になるのではないかと仮説について精査する。

3. 研究の方法

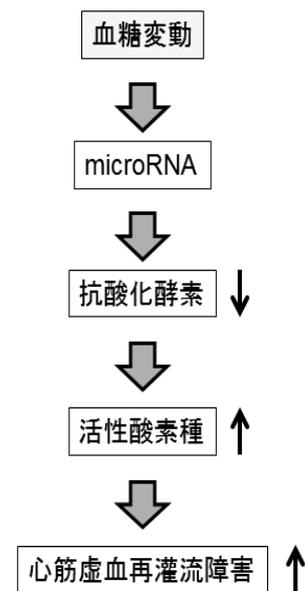
ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルラットを用いて反復性低血糖発作が心機能、虚血耐性にどのように影響するか調べる。続いて

初代培養心筋細胞を用いた実験にて活性酸素種 (ROS) の増加とそのメカニズムについて調べた。さらに網羅的に microRNA の発現を解析し反復性低血糖発作による発現変化を調べた。また培養細胞にてノックダウンしその機能と発現変化の意義を明らかにする。培養心筋細胞を用いた実験では、新生仔ラットの心筋細胞を初代培養し、正常グルコース濃度 (1000mg/L)、高グルコース濃度 (4500mg/L) の培養液にて持続培養する細胞と、24 時間毎に高グルコース培養液と低グルコース培養液 (300mg/L) に交互に曝露する細胞に割り付けた。心筋細胞内の活性酸素量を CM-H2DCFDA (2 $\mu$ mol/L) にて測定し、また心筋細胞障害を過酸化水素水 (100 $\mu$ mol/L) にて誘導し、障害の程度はミトコンドリア膜電位の指示薬である TMRE (100nmol/L) にて定量した。動物モデルを用いた実験では、① 正常血糖群 ② 糖尿病群 ③ 血糖変動群に分け、糖尿病群と血糖変動群にはストレプトゾトシン静注により糖尿病を誘導し、正常血糖群には溶媒のみを静注した。血糖値の上昇を確認後、血糖変動群に対しては 24 時間絶食とインスリン注射にて血糖低下を誘導し、次の 24 時間は自由摂食にて再び血糖を上昇させた。これを 1 クールとし 2 回繰り返した。

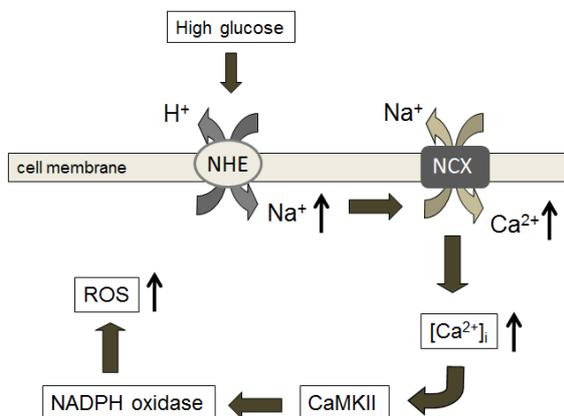
#### 4. 研究成果

【結果】高グルコース濃度の培養液に暴露した心筋細胞では正常グルコース濃度にて培養した細胞より心筋細胞内の活性酸素種量が有意に増加し、培養液グルコース濃度を変動させた細胞ではさらに活性酸素種量が増加した。また酸化ストレスに対する脆弱性を調べるため過酸化水素水にて細胞障害を誘導した結果、各群のミトコンドリア膜電位が有意に低下したが、持続高グルコース暴露細胞は正常グルコース細胞に比し細胞障害が大きく、グルコース変動心筋細胞は持続高グルコースに比べさらに細胞障害が大きくなった。動物モデルを用いた実験では、摘出心臓をランゲンドルフ心臓灌流装置にて 20 分間灌流停止と 30 分間再灌流を行ない、梗塞サイズを TTC 染色にて評価した。糖尿病群では正常血糖群に比し梗塞サイズが有意に大きく、さらに血糖変動群では糖尿病群よりも有意に拡大した。ミトコンドリアの形態変化

を電子顕微鏡にて観察した結果、糖尿病群と血糖変動群では正常血糖群に比べミトコンドリアが有意に膨化していた。糖尿病群と血糖変動群の間にはミトコンドリアのサイズに有意差は認めなかった。さらに糖尿病群では正常血糖群よりもクリステ構造の破壊が認められたが、破壊像は血糖変動群でさらに顕著であった。次にこれまでに認められた結果の機序を探るため心筋内の活性酸素種量と内在性抗酸化酵素活性について検討した。活性酸素種の指標である心筋内 malondialdehyde (MDA) は正常血糖群よりも糖尿病群、糖尿病群よりも血糖変動群で有意に増加していた。それとは逆に抗酸化酵素である catalase と superoxide dismutase (SOD) の活性は正常血糖群よりも糖尿病群、糖尿病群よりも血糖変動群で有意に低下していた。さらにマイクロ RNA の発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、2つのマイクロ RNA の発現が血糖変動群で上昇していることが判明した。これらのマイクロ RNA を培養細胞に導入した結果、catalase と SOD 活性が低下し、活性酸素種の増加を認めた。以上の結果より、高血糖からの大幅な血糖値の変動は持続する高血糖よりも酸化ストレスに対してより脆弱となり虚血再灌流障害を増悪させた。この機序としてマイクロ RNA 発現変化による内在性抗酸化酵素活性の低下とそれに伴う活性酸素種量の増加が関与すると考えられる。



以上の研究と関連して、我々は高グルコース曝露による活性酸素種の増加の機序についても検討した。第一に、高グルコースにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、ROS 増加は  $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤や  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) 阻害薬により減弱することを見出した。この結果により、NCX による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加が高グルコース曝露による ROS 増加に関与することが示唆された。また、NCX 活性化の機序として高グルコースに曝露された心筋細胞では NHE の発現増加と活性化が認められた。一方、高グルコース曝露した細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度は正常細胞と比較して有意な増加は認められなかったが、NCX 阻害薬を添加したところ有意に増加した。つまり、高グルコース曝露による NHE を介した細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇は NCX により代償され細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することが推測される。次に STZ 誘発糖尿病モデルラットを用いて in vivo においても同様の所見を認めるか検討した。STZ 誘発糖尿病ラットにおいて ROS の指標である 8-OHdG が血中および心筋組織中にて増加しており、NADPH oxidase 阻害薬や CaMKII 阻害薬により増加が抑制された。また糖尿病ラットの心筋細胞ではミトコンドリアの膨化とクリステの破壊像を認め、この変化は NADPH oxidase 阻害薬や CaMKII 阻害薬により抑制された。以上の結果より、糖尿病の心臓では NHE、NCX を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加を生じ、CaMKII が活性化され ROS が増加すると考えられる。ROS 産生部位として NADPH oxidase とミトコンドリアの両方の関与が示唆された。



## 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 2 件)

### 1. 手嶋泰之

血糖変動と心疾患

月刊糖尿病, Vol. 5, No2 76-81, 2013.

2. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Fukunaga N, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T  
Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 52: 1103-1111, 2012.

[学会発表] (計 12 件)

1. Teshima Y, Takahashi N, Saito S, Kondo K, Fukui A, Nishio S, Nakagawa M, Saikawa T  
Glucose Fluctuations Aggravate the Vulnerability of the Heart Against Ischemia/reperfusion Injury in Diabetic Rat. 第 77 回日本循環器学会総会学術集会 2013. 3. 15-17 横浜
2. Saito S, Teshima Y, Takahashi N, Kondo K, Fukui A, Nishio S, Nakagawa M, Saikawa T  
Glucose Fluctuations in Diabetic Rats Aggravate Cardiac Fibrosis Resulting in Worse Outcomes Including Atrial Fibrillation. 第 77 回日本循環器学会総会学術集会 2013. 3. 15-17 横浜
3. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Saito S, Kondo K, Fukui A, Nakagawa M, Saikawa T  
Calcineurin plays a key role in diabetes mellitus-induced cardiac fibrosis. 第 77 回日本循環器学会総会学術集会 2013. 3. 15-17 横浜
4. 手嶋泰之、高橋尚彦、西尾諭、江崎かおり、宮崎寛子、中川幹子、犀川哲典  
血糖値変動が心筋虚血耐性に及ぼす影響について、第 58 回日本臨床検査医学会学

術集会 2012.11.29-12.2 京都

5. Teshima Y, Takahashi N, Saito S, Kondo K, Fukui A, Nishio S, Nakagawa M, Saikawa T  
Glucose Fluctuations Aggravate the Vulnerability of the Heart Against Ischemia/reperfusion Injury in Diabetic Rat. 9th IDF-WPR Congress 2012, 2012.11.24-27 Kyoto
6. Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Nishio S, Saito S, Fukui A, Kume O, Nakagawa M, Saikawa T  
Glucose Fluctuations Aggravate the Vulnerability of Diabetic Heart Against Ischemia/reperfusion mediated via microRNAs modulation. American Heart Association Scientific Sessions 2012, 2012.11.3-7 Los Angeles, USA
7. Saito S, Teshima Y, Takahashi N, Fukui A, Kondo K, Nishio S, Nakagawa M, Saikawa T  
Glucose fluctuations in diabetic rats aggravate cardiac fibrosis resulting in worse outcomes including atrial fibrillation. 第29回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 2012.10.26-27 福岡
8. 西尾諭、手嶋泰之、高橋尚彦、中川幹子、犀川哲典  
糖尿病心筋における活性酸素種増加の機序について、第52回日本臨床化学会学術集会 2012.9.6-8 盛岡
9. Saikawa T, Nishio S, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Yufu K, Hara M, Nakagawa M, Teshima Y  
Calmodulin kinase II induces mitochondrial dysfunction by increasing ROS production in STZ-induced diabetic rat heart. ESC Congress 2012, 2012.8.25-29 Munich, Germany
10. 西尾諭、手嶋泰之、高橋尚彦、中川幹子、犀川哲典  
糖尿病心臓におけるカルモジュリンキナーゼを介した活性酸素種増加の機序につ

いて、第22回日本病態生理学会 2012.8.4-5 大分

11. Thuc LC, Teshima Y, Nishio S, Fukui A, Kume O, Nakagawa M, Takahashi N, Saikawa T  
Repeated hypoglycemia increases the vulnerability of diabetic heart against ischemia/reperfusion. 第76回日本循環器学会総会学術集会 2012.3.16-18 福岡
12. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Nakagawa M, Saikawa T  
Activation of calmodulin kinase II increases reactive oxygen species in STZ-induced diabetic rat heart. 第76回日本循環器学会総会学術集会 2012.3.16-18 福岡

[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]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

手嶋 泰之 (TESHIMA YASUSHI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：10457608

##### (2) 研究分担者

犀川 哲典 (SAIKAWA TETSUNORI)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：60145365