

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 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590776

研究課題名（和文）糖尿病心におけるレニン-アンジオテンシン系の細胞内直接作用についての研究

研究課題名（英文）Study for intracellular direct effects of renin-angiotensin system in diabetic hearts

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

正常及び糖尿病(DM)ラットの灌流心における虚血障害および虚血領域の非分泌型レニン、プロレニン受容体の発現とミトコンドリア機能を検討した。結果、糖尿病心において非分泌型レニンが、虚血中にミトコンドリア内に発現し、膜電位の脱分極の予防により、虚血障害への耐性に関与することが明らかになった。さらに、冠動脈疾患を有する糖尿病症例における直接的レニン阻害薬の脂質代謝とサイトカインへの効果を検討した。血漿レニン活性と血圧は低下したが、脂質とサイトカインに変化はなく、糖尿病症例におけるレニン阻害薬の上乗せ効果は否定された。

研究成果の概要（英文）：

We studied the intracellular expression of non-secretary renin and (pro)renin receptor after ischemia, and the effects of renin on mitochondrial membrane potential in perfused hearts from diabetic (DM) and normal rats. In DM rats, non-secretary renin expressed at mitochondria could afford protective effects against ischemic damage by preventing depolarization of mitochondrial membrane potential.

We also examined additive effects of direct renin inhibitor (DRI) on lipid profiles and cytokines in diabetic patients with coronary arterial disease. The additional treatment with DRI decreased plasma renin activity and blood pressure, but did not provide any beneficial effects on lipid profiles or cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、レニン阻害薬、灌流心、糖尿病、虚血/再灌流

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞後の長期予後は、梗塞後リモデリング及び冠動脈病変の進行、粥腫の不安定化により決定される。リモデリング及び粥腫の形成には、renin-angiotensin-aldosterone系(RAAS)の活性化が他の内分泌系統とともに重要な働きを演じている。特に、糖尿病症例においては、RAASは非糖尿病症例と比較して有意に促進しており、糖尿病における予後不良の要因となっている。RAASの活性化は、血管収縮作用のみならず、末梢交感神経の活性化、間質の増加、炎症性cytokineの産生、apoptosisの促進をきたし、リモデリング及び粥腫の形成に関与する。ACEI及びARBは、これらの経路の抑制により心筋梗塞の予後を改善させる。

RAASには、細胞膜受容体を介する経路と細胞内直接作用があることが知られている。心臓においては、局所で産生されたangiotensin II(ATII)がautocrine, paracrine作用により心血管機能に影響を及ぼしている。ATIIは、膜輸送系、イオンチャンネル、構造蛋白、収縮蛋白、酵素などのリン酸化により細胞の代謝、蛋白合成、遺伝子発現に寄与する。これらの多面的作用は、PI3 kinase, MAP kinase, Rho A/Rho kinase, reactive oxygen species (ROS)などの細胞内信号伝達を介して行われる。最近の知見では、(pro) reninが、直接(pro) renin受容体を介して、細胞内伝達経路及び直接作用を持つことが示されている。また、ATII, aldosteroneについても細胞内直接作用が報告されている。RAASの阻害薬としては、これまでACEI, ARB, spironolacton (SPI)が使用されてきたが、最近、直接的(pro)renin阻害薬(DRI)が開発され、単独あるいはACEIやARBと併用することにより、RAASの効果をより強力に抑制することが期待されている。DRIは、現在、海外においてはすでに市販されており、高血圧、糖尿病腎症、心不全における効果が臨床的に実証されている。また、邦人においてもその安全性が報告されている。

2. 研究の目的

平成22~23年度は、基礎研究として、正常、糖尿病ラットの単離心室筋細胞(正常細胞及びスキンド細胞)において細胞内Ca²⁺代謝及びmitochondria機能に対するRAASの作用を、細胞膜受容体を介する経路と細胞内直接作用に分けてlaser顕微鏡(LSCM)により検討する。続いてLangendorff灌流心において発生圧と³¹P-NMR法により高エネルギー化合物を測定し、虚血/再灌流障害に対するDRI, ARB, SPIの保護効果を比較検討する。平成23~24年度は、臨床研究として(1)急性心筋梗

塞にて再灌流療法を行う患者を対象として、再灌流療法前からのDRIによる治療が、再灌流後の冠灌流、梗塞量に及ぼす効果、慢性期心機能(リモデリング)に及ぼす効果をARB又はACEI単独使用群と比較検討する。加えて、(2)冠動脈疾患を有する外来患者においてDRIが、冠動脈病変の進展と脂質系(特に過酸化脂質)、cytokineに及ぼす効果を、心臓MDCTの撮像およびマロンジアルデヒド-LDL(MDA-LDL)、adiponectin, IL-6などの計測により評価する。また、これらのDRIの臨床効果を糖尿病、非糖尿病患者に分けて検討する。

3. 研究の方法

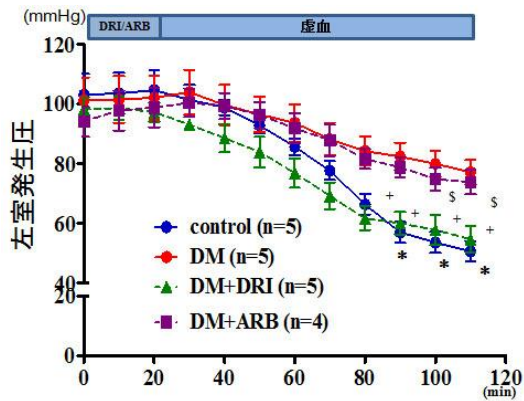
基礎研究：正常ラット、糖尿病モデルラットの灌流心におけるDRI, ARB, SPIの虚血/再灌流障害に対する保護効果を検討する。

臨床研究：動脈病変を有する症例におけるDRIの動脈硬化進展抑制効果を検討する。

4. 研究成果

1. 基礎研究：正常及び糖尿病ラットの灌流心における虚血障害と虚血領域のレニン、プロレニン受容体量、細胞内ミトコンドリア機能の検討

Wistar rat (非DM)及びGoto-Kakizaki rat (DM)より心臓を摘出し、Langendorff装置に装着して灌流する。250/分で電気刺激し左室発生圧と左室拡張終期圧を測定する。虚血は、摘出心の前下行枝の灌流を90分間完全に停止させて作成する。組織中のrenin, angiotensin II(ATII), prorenin, prorenin受容体は、免疫染色、Western blottingにて測定する。また、レニンを灌流した心筋の単離細胞と単離ミトコンドリアでミトコンドリア膜電位を測定する。虚血後の左室発生圧の低下と拡張終期圧の上昇は、DM群において非DM群より軽度であった。また、梗塞範囲もDM群で小さかった。Aliskirenは、DM群において心機能を低下させ、梗塞サイズを増大させた。一方、valsartanはこれらに影響しなかった(図)。



DM 群では、Western blotting と免疫染色の両方の評価で、虚血領域の renin 発現が増加していた。また、ATII の発現も軽度増加していた。非 DM 群ではこれらの増加はなかった。Prorenin 受容体の発現は両群で差はなかった。電子顕微鏡の検討では、renin の発現は、単離心筋細胞内に認められ、特にミトコンドリアに優位に存在した。スキンド細胞と単離ミトコンドリアを renin へ暴露すると、ミトコンドリア膜電位は脱分極し、この効果は aliskiren で消失した。以上より、糖尿病心においては、虚血中、心筋のミトコンドリアに優位に存在する非分泌性の renin が増加する。この renin は、ミトコンドリアの膜電位の脱分極を予防することにより、虚血障害への耐性に関与する。

2. 臨床研究：冠動脈病変を有する糖尿病症例における直接的 renin 阻害薬の脂質代謝およびサイトカインへの効果

外来通院中の安定した糖尿病を有する冠動脈疾患症例 30 例を対象とする。患者は全て angiotensin II 受容体拮抗薬(ARB)を服用しており renin 阻害薬の aliskiren(150 mg/日)の血圧、脂質、サイトカインに対する上乗せ効果を検討する。【結果】血漿 renin 活性は低下し、収縮期、拡張期血圧がともに有意に低下したが、心拍数は変化しなかった。LDL-c, HDL-c, TG, MDA-LDL コレステロール, Apo 蛋白など脂質に変化はなかった。また、adiponectine, hsCRP, MCP-1, p-selectin などサイトカインにも変化はなかった(表)。

	ARB	ARB+aliskiren	P		ARB	ARB+aliskiren	P
LDL-c (mg/dl)	96±21	92±23	NS	hsCRP (ng/ml)	213±155	181±119	NS
Apo-B (mg/dl)	93±18	89±17	NS	MCP-1 (pg/ml)	3553±2365	3452±2124	NS
MDA-LDL (IU/L)	115±42	119±36	NS	P-selectin (ng/ml)	107±46	98±35	NS
MDA-LDL/LDL-c	1.22±0.41	1.34±0.43	NS	Adiponectin (ng/ml)	46±16	49±17	NS

以上から、冠動脈病変を有する糖尿病症例において renin 阻害薬の上乗せ効果は認められず、ALLITUDE 試験の結果を裏づけするものであった。

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 7 件)

- ① 白木克典、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Comparison of global and regional abnormalities in ^{99m}Tc-sestamibi and cardiac magnetic resonance imaging in dilated cardiomyopathy. Journal of Cardiac Failure、査読有、74、2010、641-648.
- ② 大谷速人、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、The left ventricular pseudo-false aneurysm detected with ECG-gated multi-detector computed tomography and cardiac magnetic resonance imaging. Circulation Journal、査読有、74、2010、1986-1988.
- ③ 斎藤岳児、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Intravenous glutathione prevents renal oxidative stress after coronary angiography more effectively than oral N-acetylcysteine. Heart and Vessels、査読有、26、2011、465-472.
- ④ 大谷速人、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、佐藤 洋、林 秀晴、Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. Nitric Oxide. 査読有、26、2012、95-101.
- ⑤ 佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Pregnancy-related acute myocardial infarction in Japan: A review of epidemiology, etiology and treatment from case reports. Circulation Journal、査読有、73、2013、725-733.
- ⑥ 佐野 誠、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Pulmonary arterial hypertension caused by treatment with dasatinib for chronic myeloid leukemia -critical alert-. Internal Medicine. 査読有、51、2012、2337-2340.
- ⑦ 斎藤岳児、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Ultrasound analysis of the relationship between right internal jugular vein and common carotid artery in the left head-rotation and head-flexion position. Heart and Vessels、査読有、In press.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 白木克典、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Difference in the mechanism of left ventricular (LV) diastolic dysfunction between ischemic (ICM) and non-ischemic (DCM) dilated cardiomyopathy.

- The 75th Meeting of Japanese Circulation Society, 2011、横浜。
- ② 宣原 守、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、A novel ex vivo model to investigate metabolic deficiency in cardiac myocytes: Differentiated H9c2 cells to assess insulin resistant heart. Biophysical meeting, 2011、Baltimore、USA.
 - ③ 宣原 守、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Saturated fatty acid impairs glucose uptake and accelerated FAT/CD36 retention at plasma membrane in differentiated H9c2 cardiomyocytes. The 75th Meeting of Japanese Circulation Society、2011、横浜。
 - ④ 待井将志、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Clinical implications of the different patterns of late gadolinium enhancement (LGE) in cardiac magnetic resonance (CMR) in non-ischemic cardiomyopathy. The 75th Meeting of Japanese Circulation Society、2011、横浜。
 - ⑤ 熊沢あずみ、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Microtubule stability affects mitochondrial function in rat ventricular myocytes. The 75th Meeting of Japanese Circulation Society、2011、横浜。
 - ⑥ 熊沢あずみ、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Microtubule Stability Affects Mitochondrial Function in Rat Ventricular Myocytes. AHA meeting、2011、Orlando、USA。
 - ⑦ 佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Serum malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) level in diabetic patients with coronary artery disease (CAD). The 76th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2012、福岡。
 - ⑧ 佐野誠、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Characteristic patterns of late gadolinium enhancement (LGE) distribution in patients with cardiac sarcoidosis –comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy- ESC Congress 2012、Munich、Germany.
 - ⑨ 諏訪賢一郎、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Blood flow from pulmonary veins to left atrium and left ventricle using phase-resolved 3D cine phase contrast image MRI (4D-Flow). ACC'13、2013、San Francisco、USA.
 - ⑩ 諏訪賢一郎、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Vortex imaging in the left atrium generated by pulmonary venous inflow using phase-resolved 3D cine phase contrast image MRI (4D-Flow). ACC'13、2013、San Francisco、USA.
 - ⑪ 宣原 守、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Perhexiline restored myocardial insulin-resistance through mitochondrial protection from fatty acid (FA) overload in differentiated H9c2 myocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑫ 宣原 守、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Reactive oxygen species (ROS) from excessive mitochondrial fatty Acid (FA) oxidation attenuates myocardial insulin-signaling in differentiated H9c2 myocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑬ 渡辺知幸、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Alteration in mitochondrial morphology by dynamin-related protein 1 (DRP1) manipulates insulin-resistance in differentiated H9c2 cardiomyocytes. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑭ 佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Analysis of left ventricular late gadolinium enhancement distribution is valuable for differential diagnosis and prediction of reverse remodeling and outcome. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑮ 佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Pregnancy-related acute myocardial infarction in Japan: A review of epidemiology, etiology and treatment from case reports. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑯ 佐野誠、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Cardiac involvement in systemic sclerosis: Clinical features and findings by cardiac magnetic resonance. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑰ 諏訪賢一郎、佐藤 洋、加藤秀樹、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Functional, morphologic and electro- cardiographic abnormalities in patients with apical hypertrophy (APH) and apical aneurysm with cardiac magnetic resonance. The 77th Meeting of Japanese Circulation Society、2013、横浜。
 - ⑱ 野中大史、加藤秀樹、佐藤 洋、早乙女雅夫、漆田 毅、林 秀晴、Non-secretory renin prevents ischemic injury by modulating mitochondrial function in diabetic heart. ISHR meeting 2013、San Diego、USA.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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 0 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

佐藤 洋 (SATO HIROSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30293632

(2) 研究分担者

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

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

加藤 秀樹 (KATO HIDEKI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：80314029

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

(3) 連携研究者

なし