

## 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6月13日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：22790734

研究課題名（和文） 糖尿病合併心不全における12-リポキシゲナーゼの役割

研究課題名（英文） Role of 12-lipoxygenase in diabetic cardiomyopathy

研究代表者

坂本 昌也（SAKAMOTO MASAYA）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40419742

研究成果の概要（和文）：

【研究の学術的背景】我々は、以前に高血圧性心不全ラットにおいて、アラキドン酸カスケードの代謝酵素の一つである 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) が、不全心において炎症及び心臓線維化を惹起し、心不全増悪の一つであることを報告した (kayama, sakamoto et al J Exp Med. 2009)。しかし糖尿病における心臓における役割は報告されていない。

【目的】糖尿病性心筋症における 12/15-lipoxygenase の役割を検討する。

【方法】糖尿病性心筋症モデルとして、野生型マウスに streptozotocin (STZ) を投与した STZ 誘発糖尿病マウス (WT-STZ) を用い、その心臓における 12/15-LOX と炎症系サイトカインの発現、また酸化ストレスとの関係を検討。12/15-LOX KO マウスを用いて、STZ 誘発糖尿病マウス (KO-STZ) を作成し、WT-STZ との炎症系サイトカインや酸化ストレスの発現を比較検討。

【結果】WT-STZ の心臓において、12/15-LOX 及び炎症系サイトカイン (MCP-1、TNF $\alpha$ ) の発現の上昇及び酸化ストレス (4-hydroxy-2-nonenal ; 4-HNE) の亢進を認めた。WT-STZ 群は心エコー上、徐々に心機能の低下を認めた。KO-STZ の心臓では、炎症系サイトカインの発現の低下と共に、酸化ストレスの産生も低下しており、それに伴って心機能の低下も軽減された。これらの結果より、STZ 誘発の高血糖下において 12/15-LOX は、心臓の炎症及び酸化ストレスの産生を促進する増悪因子であると考えられた。in vitro における培養心筋細胞を用いた検討では、高血糖刺激において 12/15-lipoxygenase 及び炎症系サイトカインの発現の上昇を認めた。また酸化ストレスの産生も上昇しており、N-Acetyl-cystein (NAC) により酸化ストレスを抑制したところ、心筋における炎症系サイトカインの発現の低下を認めた。

【結論】12/15-LOX は糖尿病心筋症の発症・進展に酸化ストレスを介した炎症系サイトカインの発現に関与しており、12/15-LOX の抑制は心臓におけるそれらの改善に寄与しており、糖尿病性心筋症の新たな治療につながる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy, we created a diabetic cardiomyopathy model (streptozotocin (STZ) injection rat) and performed microarray analysis. Echocardiography showed that STZ injection rat developed diastolic and systolic dysfunction and cardiac fibrosis was increased in STZ injection rat. Among the genes analyzed, arachidonic 12-lipoxygenase (12-LOX) was upregulated in the heart of STZ rat. mRNA level of 12-LOX and production of 12(s)-HETE, a major metabolite of 12-LOX, were upregulated in the heart of STZ rat. To determine the role of 12-LOX in STZ injection heart, we created STZ injection mice (WT-STZ) and compared to those of 12-LOX KO (KO-STZ) mice. Disruption of 12-LOX significantly reduced cardiac fibrosis and improving diastolic

and systolic dysfunction. Moreover the expression of inflammatory cytokine genes such as TNF- $\alpha$  and STZ-induced reactive oxygen species were significantly inhibited by disruption of 12-LOX. In vitro experiment reveal that hyperglycemia induced expression of 12-LOX as well as TNF- $\alpha$  by neonatal cardiomyocyte. Treatment with Cinnamyl-3,4-dihydroxy- $\alpha$ -cyanocinnamate (CDC), a inhibitor of 12-LOX, decreased the expression of TNF- $\alpha$  by cardiomyocyte under high glucose stimulation. Our results suggest that cardiac 12-LOX-induced inflammation is involved in the development of diabetic cardiomyopathy and that inhibition of 12-LOX could be a novel treatment for this condition.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：糖尿病性心筋症、12-リポキシゲナーゼ、12-HETE、TNF- $\alpha$

#### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は心筋梗塞合併により容易に心不全に至ることがある。また心不全患者に糖尿病が合併すると予後が著しく低下することも報告されているが、それらの詳細なメカニズムは不明である。また最近、糖尿病大血管障害の発症・進展予防には血糖・血圧・脂質異常の全てが長期に渡りコントロールされている必要性が判明し今後の医療費の高騰が懸念されている。我々は糖尿病大血管合併症を炎症と捉え、アラキドン酸カスケードの1つである12-LOの代謝産物12-HETEがその発症・進展に関与すると考えている。今後12-HETE inhibitorを既存の薬にない新規の心不全を含めた抗糖尿病大血管予防薬として臨床応用することが可能と考え、研究を進める。

#### 2. 研究の目的

糖尿病合併心不全の心臓における12-LOの産生をin vitro及びin vivoにて再度確認する。さらに生体内で機能しているレベルであ

るかを心筋内及び血漿での蛋白発現レベルを測定する。また心毒性に働いていることを炎症性因子及びアポトーシス関連因子等を用いて確認する。In vitroの系においては心筋細胞を用いて確認する。

糖尿病合併心不全における12-LOの心毒性を検証する。遺伝子改変マウス(12-LOノックアウトマウス：12-LOKO)を用いて心不全発症・進展の効果を明らかにする。さらに臨床応用への前段階の研究として12-HETE inhibitorであるバイカレインを用いて糖尿病合併心不全の発症・進展を予防することを目的とする。最終的には12-LO遺伝子の上流・下流に位置する未知の心毒性関連因子の同定または既知シグナル伝達系の経路との関連も明らかにする。

#### 3. 研究の方法

・糖尿病合併心不全および高血圧性心不全における12-LOの発現の増加の確認

(1)ラット培養心筋細胞及び心筋線維芽細胞を高血糖下のもと、12-LOのmRNAの測定

(RT-PCR) 及びその代謝産物である 12-HETE を測定 (ELIZA kit) しその経時的変化を測定 (in vitro)。

(2)糖尿病マウス(STZ皮下注射によるインスリン依存型糖尿病マウスモデル:STZマウス)及びラット(OLETFインスリン非依存型糖尿病ラット:OLETFラット)における12-LOのmRNA(心臓)の測定(RT-PCR)及びその代謝産物である12-HETEを心臓、血漿から経時的に測定(in vivo)。

(3)高血圧性心肥大及び心不全モデルマウス及びラットを作成し、12-LOのmRNA(心臓)及び12-HETE(心臓及び血漿)を測定し(in vivo)、糖尿病ラットとの発現量の比較。

(4)STZマウス及びOLETFラットより心臓を摘出し、心臓の繊維化をmasson染色にてまた各種炎症系・アポトーシス関連の染色をdapi染色または蛍光抗体を使用して野生型と比較(in vivo)。

・12-LO欠損による糖尿病合併心不全の改善検証: 12-LOKOマウスに対しSTZを注射し、

(4)糖尿病合併心不全の発症の程度及び糖尿病合併心不全の進展の程度を心臓超音波及び心臓カテーテル検査を経時的に行い心機能測定(LVEDP, LV dp/dt, Ejection Fraction)を実施。

(5)心不全マーカー(ANP, BNP)の確認をし野生型と比較して改善を認めているか否かを検証。

12-LOKOマウス(STZ負荷前及び心不全期)より心臓を摘出し、繊維化をmasson染色また各種炎症系・アポトーシス関連の染色をdapi染色または蛍光抗体を使用して野生型と比較(in vivo)。

#### 4. 研究成果

WT-STZの心臓において、12/15-LOX及び炎症系サイトカイン(MCP-1、TNF $\alpha$ )の発現の上昇及び酸化ストレス(4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE)の亢進を認めた。それと共にWT-STZ群は心エコー上、徐々に心機能の低下を認めた。その一方、KO-STZの心臓では、炎症系サイトカインの発現の低下と共に、酸化ストレスの産生も低下しており、それに伴って心機能の低下も軽減された。これらの結果より、STZ誘発の高血糖下において12/15-LOXは、心臓の炎症及び酸化ストレスの産生を促進する増悪因子であると考えられた。また、in vitroにおける培養心筋細胞を用いた検討では、高血糖刺激において12/15-lipoxygenase及び炎症系サイトカインの発現の上昇を認めた。また酸化ストレスの産生も上昇しており、N-Acetyl-cystein (NAC)により酸化ストレスを抑制したところ、心筋における炎症系サ

イトカインの発現の低下を認めた。

12/15-LOXは糖尿病心筋症の発症・進展に酸化ストレスを介した炎症系サイトカインの発現に関与しており、12/15-LOXの抑制は心臓におけるそれらの改善に寄与しており、糖尿病性心筋症の新たな治療につながることを示唆された。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

① 鈴木博史、Arachidonic 12-lipoxygenase-induced Oxidative Stress and Inflammation Promotes The Development Of Diabetic Cardiomyopathy、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日、横浜

② 坂本昌也、Arachidonic 12-lipoxygenase-induced Oxidative Stress and Inflammation Promotes The Development Of Diabetic Cardiomyopathy、第72回アメリカ糖尿病学会、2012年6月8日、フィラデルフィア

[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

坂本 昌也 (SAKAMOTO MASAYA)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40419742

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者