

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591036

研究課題名(和文) 心筋における細胞内レニンと(プロ)レニン受容体の役割

研究課題名(英文) Role of intracellular renin and (pro)renin receptor in cardiac myocytes

研究代表者

加藤 秀樹 (Kato, Hideki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80314029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS系)は、高血圧や心肥大の病態に関与している。RAAS系の酵素であるレニンは、腎臓で産生され血漿中に分泌されるが、心筋では非分泌型レニンのみが産生される。我々は、糖尿病心筋では、虚血時に細胞質とミトコンドリアで細胞内レニンの発現が増加していること、この細胞内レニンはミトコンドリアの機能を保つように働くことで、心筋を保護する役割を果たすことを示した。これらの結果は、従来のRAAS系を介した経路とは異なる、細胞内レニンの新しい作用機構を明らかにするとともに、心筋虚血に対する新しい治療法の確立にも役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that expression of intracellular renin increased both in cytosol and mitochondria during ischemia in diabetic heart, and that increased renin protects cardiomyocytes from ischemic injury. This protective effect of renin is due to the reduction of UCP and acceleration of electron transport chain, which resulted in the prevention of mitochondrial depolarization and preservation of ATP production under ischemic stress. The cardioprotective effect of renin is independent from subsequent intracellular angiotensin II production.

These results indicated that in contrast to previously reported adverse effects of circulating RAS, cytosolic renin plays an important role to protect myocytes from ischemic stress in diabetic heart.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：循環器内科

キーワード：レニン 糖尿病 ミトコンドリア 心筋虚血

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS系)は、高血圧や心肥大に関与しており、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシンII受容体ブロッカー、直接的レニン阻害剤は、高血圧や心不全の治療に用いられる。

血液中を循環するRAAS系に対して、細胞周囲の限局した範囲でRAAS系が活性化される組織RAAS系の重要性が明らかとなり、さらに細胞内でのRAAS系の蛋白質の役割についても新たに注目されている。

我々は、RAAS系の中でレニン・プロレニンに注目した。レニン・プロレニンは、腎臓の傍糸球体細胞で産生され、血漿中に分泌される(分泌型レニン)。近年、他の細胞においてもレニン・プロレニンが発現し、一部は分泌されずに細胞内に留まる(非分泌型レニン)ことが明らかになってきた。心筋細胞は非分泌型レニンのみを産生し、非分泌型レニンの多くがミトコンドリアに局在するとの報告がある。しかし、その生理的、病態生理的な意義については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞において、細胞内RAAS系の発現と細胞内局在を検討し、糖尿病ラットの虚血・再灌流モデルにおいて、細胞内細胞RAAS系の病態への関与を明らかにする。これにより、細胞内RAAS系による新しい病態機構を解析し、新たな心疾患の治療法の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)糖尿病ラットの摘出灌流心において、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成する。虚血時の心機能を測定した後に、組織免疫法やウェスタンブロット法を用いてRAAS系タンパク質の発現について確認する。

(2)ラット心筋細胞を酵素法を用いて単離し、細胞内のRAAS系タンパク質の発現と局在を検討する。

(3)心筋内のミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア膜電位をATP産生について検討する。

4. 研究成果

(1)摘出灌流心の虚血モデルにおいて、糖尿病では非糖尿病心と比較して、90分虚血後の左室拡張末期圧(LVEDP)は有意に低値を示し、左室発生圧(LVDP)は保たれていた。また、灌流心における心筋壊死範囲を解析すると、糖尿病心では非糖尿病心と比べて、心筋壊死の範囲が少ないことが判明した。すなわち糖尿病心では非糖尿病心に比べて、虚血による心筋障害が少ないこと(虚血耐性を有する)を示唆している。

(2)組織免疫法により、虚血心筋では、心筋梗塞部位においてレニンとアンジオテンシンIIの発現が亢進しており、特に糖尿病心筋ではその発現が優位に増加していた。

(3)虚血後の心筋を梗塞部位と非梗塞部位に

分離した後に、ウェスタンブロット法を用いて解析すると、非糖尿病心に比べて糖尿病心ではレニンとアンジオテンシンIIの発現が有意に増加しており、特に梗塞部位において顕著であった。(4)糖尿病灌流心の虚血耐性におけるレニンとアンジオテンシンIIの関与を検討するために、灌流心にアンジオテンシンII受容体阻害剤(ARB)レニン阻害剤(DRI)を投与した状態で虚血を作製した。DRIにより糖尿病心の虚血耐性はキャンセルされたが、ARBでは虚血耐性に変化は認めなかった。心筋内のレニン発現もDRIにより抑制された。以上の結果より、糖尿病心の期虚血耐性には心筋内に発現したレニンが重要であることが示された。

(5)細胞内レニンによる心筋保護効果の発現機構について検討するために、細胞膜をサポニンで処理した細胞膜除去単離心筋細胞を作製し、ミトコンドリア膜電位を測定した。膜除去心筋細胞にレニンを投与すると、ミトコンドリア膜電位は過分極し、この効果はDRIにより抑制された。

(6)糖尿病ラットの心筋細胞から単離したミトコンドリアにレニンを投与すると、心筋細胞と同様に過分極をきたし、この効果はDRIにより抑制された。また、ミトコンドリア膜電位の脱分極をきたすミトコンドリア/脱共役タンパク質(UCP11)の発現はレニンにより抑制された。一方ミトコンドリア膜電位を過分極させる電子伝達系についてNAD/NADH比を用いて検討すると、レニンはNAD/NADH比を有意に増加させ、電子伝達系を活性化させることが明らかとなった。

(7)以上の結果より、糖尿病心筋では、細胞内レニンはミトコンドリアの電子伝達系の活性化とUCP11の発現低下を介して、膜電位の過分極を抑制し、虚血時の心筋を保護する効果を有することが明らかとなった。

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6件)

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. 査読有 Vol. 26, 2012, pp.95-101,.

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 and Vessels 査読有、Vol. 26, 2011, pp 465-472.

Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Funaki

M, Hayashi H: Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes: a novel ex vivo myocardial insulin-resistance model. *Exp Cell Res*. 査読有、 Vol. 319, 2013, pp 955-966.

Saitoh T, Satoh H, Kumazawa A, Nobuhara M, Machii M, Tanaka T, Shiraki K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H. Ultrasound analysis of the relationship between right internal jugular vein and common carotid artery in the left head rotation and head flexion position. *Heart Vessels* 査読有、 Vol. 28, 2013, pp 620-625.

Machii M, Satoh H, Shiraki K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Takehara Y, Sakahara H, Ohtani H, Wakabayashi Y, Ukigai H, Twarahara K, Hayashi H: Distribution of late gadolinium enhancement in end-stage hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy: Differential diagnosis and prediction of cardiac outcome. *Magnetic Resonance Imaging* 査読有、 Vol. 32, 2014, pp 118-124.

Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Watanabe T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Microtubule Disorganization Affects the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Cardiac Myocytes. *Circ J* 査読有、 Vol. 78, 2014, pp1206-1215.

〔学会発表〕(計 7 件)

Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Microtubule stability is related to mitochondrial function in rat ventricular myocytes. *American Heart Association Scientific Sessions*, Orlando, USA, 2011. 11. 9

Kumazawa A, Katoh H, Nonaka D, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Local Ca²⁺ Releases from the sarcoplasmic reticulum are required for microtubule-related mitochondrial dysfunction in rat ventricular myocytes. 第 76 回日本循環器学会学術集会. 2012. 3. 21

Kumazawa A, Katoh H, Hayashi H: Microtubules are related to the regulation of mitochondrial permeability transition pore in rat

cardiac myocytes. 第 35 回心筋代謝研究会. 2012. 6. 22

Nobuhara M, Saotome M, Watanabe T, Nonaka D, Kumazawa A, Machii M, Tanaka T, Shiraki K, 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. *Annual Biophysical Meeting*, Baltimore, USA, 2011. 3. 14

Nonaka D, Katoh H, Kumazawa A, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Non-secretory renin prevents ischemic injury by modulating mitochondrial function in diabetic heart. *World congress of International Society of Heart Research*, Sandiego USA, 2013. 6. 22.

Nonaka D, Katoh H, Kumazawa A, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Non-secretory renin prevents ischemic injury by modulating mitochondrial function in diabetic heart. *European Society of Cardiology Congress*, Amsterdam, Nederland, 2013. 9. 4

Nonaka D, Katoh H, Kumazawa A, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H: Intracellular renin prevents ischemic injury by modulating mitochondrial function in diabetic heart. *American Heart Association*, Dallas, USA, 2013. 11. 4.

〔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 なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

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