

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591080

研究課題名(和文)心不全における新たな病態制御機構の解明：セリンプロテアーゼDPP4の役割

研究課題名(英文)Comprehensive And Therapeutic Strategy for Heart Failure Via Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) Axis.

研究代表者

坂東 泰子(暮石泰子)(Bando, Yasuko K.)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60452190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の合併は、心臓毛細血管にも機能不全をきたすことが知られているものの、その詳細な機序は不明であった。申請者らは、糖尿病合併症としての心不全に注目し心臓栄養血管である心臓毛細血管不全を仮説し、動物実験による検証を進めた。心臓毛細血管に発現するセリンプロテアーゼDPP4の活性異常が、糖尿病を原因とする心臓毛細血管傷害を発生せしめ、その結果として生じる心臓での局所虚血による心筋傷害が、拡張不全心発症の主因の一つであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Heart failure caused by diabetes has been designated as diabetic cardiomyopathy and the underlying pathophysiology remains uncertain. Our group has focused and clarified the molecular mechanisms underlying diabetic cardiomyopathy both in preclinical and clinical settings and has found the primary role of incretin, particularly glucagon-like peptide (GLP-1), and its proteolytic regulator dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) in pathogenesis of microvasculopathy and mitochondrial remodeling observed in diabetic cardiomyopathy. Moreover, we have recently obtained important clues implicating the potent role of incretin-insulin axis in diagnosis, therapeutic intervention, and prevention of heart failure. We thus aimed to establish the comprehensive system for managing heart failure via modulating incretin-insulin axis to reduce mortality and ameliorate quality of life.

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：分子心臓病理学 糖尿病性心筋症

1. 研究開始当初の背景

全身組織に広く分布する CD26 分子は 110kDa の膜蛋白であり、細胞外領域にセリンプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) 酵素活性部位を有する。CD26/DPP4 の発現は全身臓器に認められ、細胞膜上以外にも可溶性分泌型タンパク質として血液中にも存在しており、様々な種類の生理活性物質を分解することにより糖尿病、炎症、免疫機能など生体機能の調節に深く関与することが知られる。実際、現在 DPP4 阻害薬は、糖尿病治療薬として臨床の場で実用されているが、セリンプロテアーゼの一つである Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4) 阻害剤が急性心筋梗塞後の予後・心リモデリング改善作用を有することが報告されているが慢性心不全における病態意義は不明である。本研究は、心不全、なかでも、拡張不全心においてこの DPP4 及びその特異的基質 (血管新生ケモカイン SDF-1 α 及び血糖調節ペプチド GLP-1) が何らかの役割を有すると仮説し、これを心不全モデル動物および臨床検体をもちいて検証し、さらに、心不全患者血清における血中 DPP4 活性の病態モニタリング意義の有無を検証する。

2. 研究の目的

拡張不全心における DPP4 による病態制御機構を明らかにすることによって、糖尿病治療薬として臨床の場で実用されている DPP4 阻害剤が糖尿病を原因とする慢性心不全における治療薬として有用かどうかを検証すること、ひいては、糖尿病性心不全の臨床的特徴である拡張不全心の特異的治療薬として DPP4 阻害剤や GLP-1 受容体アゴニストの有効であるかどうか、同時に、拡張不全心における新規モニタリングマーカーとして

末梢血の DPP4 活性が有用かどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

すべての動物研究・臨床検体は名古屋大学倫理委員会の承認を得て実施された。雄 10 週令先天性 DPP4 活性欠損 Fisher ラットをストレプトゾトシン誘発により 9 週間高血糖暴露した群 [DP (-)/DM] 及び DPP4 活性正常の対照群 [DP4 (+)/DM]、またそれぞれに対する非糖尿病コントロール群 [DP (-)/c, DP (+)/c] の計 4 群において、また、Wistar ラットをストレプトゾトシン誘発により 9 週間高血糖暴露した偽薬投与群 (DM-CON) および DPP4 阻害剤ビルダグリプチンを投与した群 (DM-VIL) 及び、同一週令の非糖尿病化コントロール群 (nonDM-CON, nonDM-VIL) の計 4 群を作成し、各心筋組織標本に対して、(1) 抗 CD31 抗体及び抗 dystrophin 抗体を用いた免疫二重染色による心筋毛細血管密度・心筋細胞サイズ変化、(2) in situ および in vitro での心筋 DPP4 活性の検出 (3) 免疫蛍光染色による心筋 DPP4 の局所発現の共焦点顕微鏡による観察 (4) 左心臓カテーテル及び心エコーによる心機能解析を実施した。さらに、(5) 当施設の心不全患者検体データベースより、拡張不全を呈する患者計 30 例において、冠静脈洞血 (CS)・末梢静脈血 (PV) における DPP4 活性変化を測定するとともに、各種心不全指標との相関を解析した。

4. 研究成果

DP4 (+)/DM 群は心筋毛細血管密度低下・心筋細胞サイズの低下を認めたが、DP4 (-)/DM 群ではこれら心筋毛細血管密度低下・心筋細胞サイズの低下を認めなかった (図 1)。

DP4 (+)/DM 群では in situ および in vitro ともに心筋 DPP4 活性亢進を認めた (図 2)。

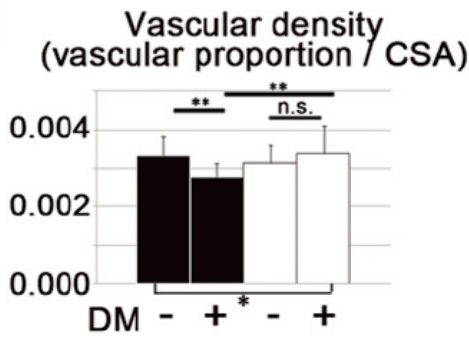


図1 糖尿病による心臓組織リモデリングはDPP4活性依存性に生じる。DP4(+)/DM群は心筋毛細血管密度低下を認めたが、DP4(-)/DM群ではこれら変化を認めなかった。

免疫蛍光染色により心筋組織におけるDPP4発現は心筋毛細血管内皮に局在した。DP4(+)/DM群心筋では、DP4(+)/c群と比し、心筋SDF-1 α 含有量が有意に低下していたが、DP4(-)/DM群では心筋SDF-1 α 含有量にはこの低下は認めなかった(図3)。左心臓カテーテル及び心エコーによる心機能解析により、DP4(+)/DM群で認められた拡張機能障害

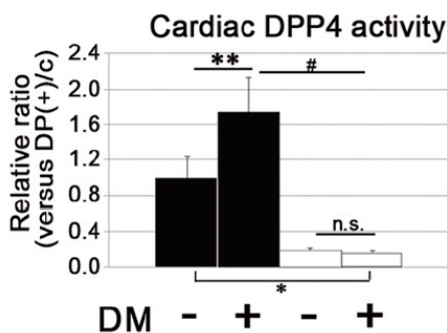
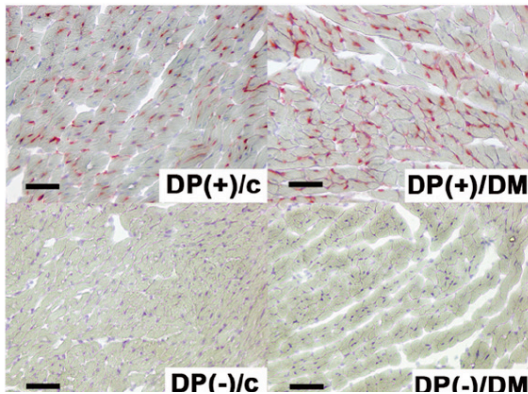


図2 糖尿病合併による心臓DPP4活性亢進。DP4(+)/DM群ではin situ(上図)およびin vitro(下図、scale bar: 100 μ m)ともに心筋DPP4活性亢進を認めた。

は、DP4(-)/DM群において改善していた。また、これらの効果が、DPP4活性阻害薬ビルダグリプチンによっても認められるかどうかを、Wistarラットをストレプトゾトシン誘発により9週間高血糖暴露した糖尿病動物モデルを用いて検証・確認した。DM-CON群は心筋毛細血管密度低下・心筋細胞サイズの低下、心筋間質線維化及び組織低酸素の増強を認めた。DM-VIL群ではこれら心筋毛細血管密度低下・心筋細胞サイズの低下を認めなかった。DM-CON群ではin situおよびin vitroともに心筋DPP4活性亢進を認めた。DM-CON群心筋では、nonDM-CON群と比し、心筋SDF-1 α 含有量が有意に低下していたが、DM-VIL群では心筋SDF-1 α 含有量にはこの低下は認めなかった。左心臓カテーテル及び心エコーによ

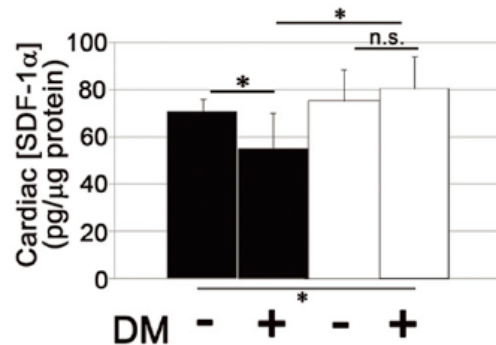


図3 糖尿病心筋における血管新生ケモカインSDF-1 α 含有量変化とDPP4活性の影響。DP4(+)/DM群心筋では、DP4(+)/c群と比し、心筋SDF-1 α 含有量が有意に低下していたが、DP4(-)/DM群では心筋SDF-1 α 含有量では認めなかった。

る心機能解析により、DM-CON群で認められた拡張機能障害は、DM-VIL群において改善していた。

拡張不全を呈する心不全患者のCS血DPP4活性はPV血DPP4活性と強い相関を有した[R=0.532 (P=0.003)]。糖尿病の合併は、CS血PV血中のDPP4活性を増加し、これら指標は、心拡張能の指標であるE/e'と正の相関を示した[R=0.39 (P=0.04)](図4)。

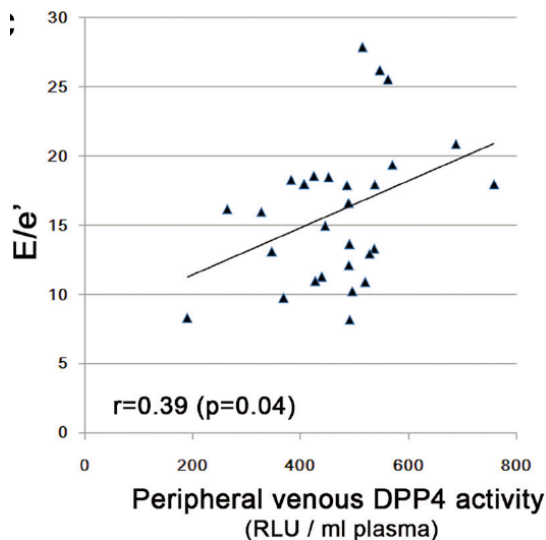


図4 拡張不全を呈する心不全患者の末梢血 DPP4 活性は、心拡張能の指標である E/e' と正の相関を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Bando YK (corresponding author, invited review) and Murohara T. Diabetes-Related Heart Failure - Does Diabetic Cardiomyopathy Exist? - *Circ J.* 2014;78(3):576-83 (査読有).
2. Shimizu A, Sakurai T, Mitsui T, Miyagi M, Nomoto K, Kokubo M, Bando YK, Murohara T, Toba K. Left ventricular diastolic dysfunction is associated with cerebral white matter lesions (leukoaraiosis) in elderly patients without ischemic heart disease and stroke. *Geriatr Gerontol Int.* 2014 Apr;14 Suppl2:71-6 (査読有).
3. Okamoto R, Hirashiki A, Cheng XW, Yamada T, Shimazu S, Shinoda N, Okumura T, Takeshita K, Bando YK, Kondo T, Murohara T. Usefulness of serum cardiac troponins T and I to predict cardiac molecular changes and cardiac damage in

patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int Heart J.* 2013;54(4):202-6(査読有).

4. Monji A, Mitsui T, Bando YK (corresponding author), Aoyama M, Shigeta T, Murohara T. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(3):H295-304(査読有).
5. Shigeta T, Aoyama M, Bando YK (corresponding author), Monji A, Mitsui T, Takatsu M, Cheng XW, Okumura T, Hirashiki A, Nagata K, Murohara T. Dipeptidyl Peptidase-4 Modulates Left Ventricular Dysfunction in Chronic Heart Failure via Angiogenesis-Dependent and-Independent Actions. *Circulation.* 2012;126(15):1838-51. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 青山盛彦 坂東泰子
Dipeptidylpeptidase-4 activation accelerates cardiac fibrosis via MMP2/TIMP2 axis in diabetic heart. 第 77 回日本循環器学会 Featured Research Session066 2013年3月16日(パシフィコ横浜、横浜)
2. 三井統子、坂東泰子 Circulating DPP4 activity presumably serves as a surrogate for systolic heart failure and diabetes. 第 77 回日本循環器学会一般口述 077 2013年3月16日(パシフィコ横浜、横浜)
3. 坂東泰子 新しい抗糖尿病薬は循環器疾患予防に貢献できるか? 第 77 回日本循

環器学会シンポジウム 19 2013 年 3 月
15 日(パシフィコ横浜、横浜)

4. 坂東泰子 糖尿病における心血管病の特徴と対策 第76回日本循環器学会シンポジウム 18:2012 年 3 月 17 日(福岡国際会議場、福岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂東 泰子 (暮石 泰子) (Bando K. Yasuko)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60452190

(2)研究分担者

室原 豊明 (Murohara Toyoaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90299503

平敷 安希博 (Hirashiki Akihiro)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：10418741

成 憲武 (Cheng Xianwu)
名古屋大学・医学系研究科・特任准教授
研究者番号：30378228