

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23602012

研究課題名(和文) 糖尿病性臓器障害のエネルギー - 変化と遺伝子異常

研究課題名(英文) Abnormal energy and genes in diabetic cardiomyopathy and nephropathy

研究代表者

渡邊 賢一 (WATANABE, KENICHI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症・心筋症や不全心筋のエネルギー - 変化を画像化することを目的とした。脂肪酸代謝機能を評価する標識薬剤として [I-131]9MPA を、糖代謝機能を評価する薬剤として [C-14]2DG を、交感神経機能として [I-125]MIBG をそれぞれ用いた。心不全モデルラット・糖尿病モデル DN14 - 3 - 3 トランスジェニックマウスを作成し、代謝異常と遺伝子異常を検討中した。
その結果、糖尿病性腎症では酸化ストレスが亢進し、クルクミンなどの機能性食品投与でそれらが改善した。

研究成果の概要(英文)：A majority of hospitalizations for complications of diabetes are linked to nephrotic diseases (Diabetic Nephropathy) and cardiovascular diseases (Diabetic Cardiomyopathy, Myocardial Infarction etc.). We determined cardiac function, left ventricular remodeling, and cardiac sympathetic nerve function with iodine-125 labeled metaiodobenzylguanidine. Long-chain fatty acids are major cardiac energy substrates, and decreased myocardial fatty acid metabolism using I-labeled 9-pentadecanoic acid has been demonstrated in diabetic cardiomyopathy and failing heart. Long-term drug treatment not only prevented left ventricular remodeling and improved cardiac function in rat with diabetic and dilated cardiomyopathy, but also restored cardiac sympathetic tone to hold norepinephrine in the heart. It is important that protective food function as underpinning strategy for disease prevention.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：標識脂肪酸 医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性臓器障害の中でも糖尿病性腎症が増加し、透析患者の多くを占める。糖尿病は心血管系の重要なリスクファクターでもあり、非糖尿病患者に比べて糖尿病患者では心血管死亡発生率が約7倍高い。糖尿病患者に見られる、血糖・インスリン・脂質の高値は腎臓・血管だけでなく心筋にも障害を与える。冠動脈に異常が見られない拡張型心筋症の多くに耐糖能異常が見られることや、心筋障害・線維化は活性酸素やアポトーシスが関係することが報告されているが、このメカニズムは不明点が多く解明が待たれている。

臨床現場では病態解明や心臓障害の程度を心臓血流量・エネルギー獲得機能・心臓交感神経機能等の複数の機能検査を行うことにより診断が行われている。基礎研究(動物実験)では、これら複数の機能をRIを用いて単独/同時に評価する試みが検討されている。

2. 研究の目的

糖尿病モデルの腎臓・心筋組織における14-3-3蛋白・MAPK(P38, JNK, ERK)・活性酸素(GSHP x、Protein Carbonylなど)・アポトーシスと心筋脂肪酸代謝・糖代謝・交感神経機能の関係とRIの有用性を明らかにする。更に、治療による変化を検討することにより高血糖の心臓障害のメカニズムも明らかにする。

3. 研究の方法

心臓のエネルギー獲得機能を評価する薬剤としてβ酸化が阻害されるように分子設計された標識脂肪酸[I-131]9MPA

(15-(p-[I-131]Iodophenyl)-9-methyl pentadecanoic Acid)・糖代謝の途中で反応が阻害されるように分子設計された標識糖[C-14]2DG

(2-Deoxy-D-(1-[C-14])glucose)・交感神経機能として[I-125]MIBG (metaiodobenzylguanidine)を用いる。9MPAは途中でβ酸化が阻害されるようにドラッグデザインされた標識脂肪酸で、3回β酸化を受けた後の中間代謝物

9-(p-Iodophenyl)-3-methyl nonanoic Acid (3MNA)とα酸化後に再度β酸化を受けて最終代

謝物となったp-iodophenylacetic Acid (PIPA)が検出可能である。2DGはグルコースの2位の炭素原子が脱酸素化した化学構造を持ち、グルコースと同一機序で挙動するが、途中の段階

(2-Deoxy-D-(1-[C-14])glucose-6-phosphate (DG-6-P))で代謝が停止しそれ以降の代謝が進行しない標識糖である。これら2種の標識薬剤を用いて心臓の a) 集積性の経時変化実験、b) 代謝物分析実験、c) オートラジオグラフの作製、および d) 組織病理標本の作製等を行う。これらより得られる各標識薬剤の集積性、局所集積の画像および組織学的所見等より様々な状態にある心臓機能をエネルギー獲得系から数値化していく。更にMIBGを加えた各種薬剤を混合し同時投与する実験も行い、同一個体による脂肪酸代謝機能・糖代謝機能・交感神経機能の数値化も併せて検討していく。さらに腎臓や他臓器でも検討する。

以上を総合的に検討し、糖尿病モデルの腎臓・心筋組織における14-3-3蛋白・MAPK(P38, JNK, ERK)・活性酸素(GSHP x、Protein Carbonylなど)・アポトーシスと心筋脂肪酸代謝・糖代謝・交感神経機能の関係とRIの有用性を明らかにする。更に、治療による変化を検討することにより高血糖の臓器障害のメカニズムも明らかにする。

4. 研究成果

(1) 自己免疫性心筋炎後心不全モデルラット・糖尿病モデル・ドミナントネガティブ(DN)14-3-3トランスジェニックマウスを作成した。8週齢Lewisラットに精製したブタの心筋ミオシンを後足の皮下に注射し、感作すると自己免疫性心筋炎が発症する。我々の方法では疾患発症率が100%である。炎症により傷害され脱落した心筋組織は線維組織で置換され、慢性期には心室拡張と心機能低下により拡張型心筋症類似の病態となる。DN14-3-3トランスジェニックマウスにストレプトゾトシンを投与し糖尿病マウスを作成した。血糖値が正常マウス100mg/dlから約300-500mg/dlに上昇した。

(2) 血行動態を測定・心エコー検査を行った。

心不全ラットでは、吸入麻酔下に各群ラットの外頸静脈と大腿からカニューレを挿入し、血行動態測定装置でそれぞれの心拍数・血圧・中心静脈圧・左室収縮圧・左室拡張末圧・心筋収縮力を測定すると、明らかに病態モデルと正常モデルで差がみられた。各群ラットの心エコー検査を行い、心室壁厚・心室内径・心筋の収縮力測定による心機能評価も同様であった。

(3) モデル動物に、[I-131]9MPA・[C-14]2DG・[I-125]MIBGを投与し、画像化(TLC像・BAS5000画像・病理組織像など)した。不全心筋では、9MPA・MIBGの取り込みが低下し2DGの増加が見られた。

(4) 糖尿病性腎症では酸化ストレスが亢進し、クルクミンなどの機能性食品投与でそれらが改善した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Vengadeshprabhu Karuppa Gounder, Watanabe K et al. Olmesartan protects against oxidative stress possibly through the Nrf2 signaling pathway and inhibits inflammation in daunorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *International Immunopharmacology*. 2014;18:282-289
2. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK-SREBP signaling. *J Nutrit Biochem*. 2013;24:796-802.
3. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Molecular understanding of curcumin in diabetic nephropathy. *Drug Discovery Today*. 2013;18:756-763..
4. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap 1 pathway. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57:1649-1659.
5. Arun P L, Watanabe K et al. The hyperglycemia stimulated myocardial

endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: A differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Bioch Cell Bio*. 2013;45:438-447.

6. Somasundaram Arumugam, Watanabe K et al. Mulberry leaf diet protects against progression of experimental autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy via modulation of oxidative stress and MAPK mediated apoptosis. *Cardiovascular Therapeutics*. 2013; 31: 352-362.

7. Fujii M, Watanabe K et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2013; DOI 10.1007/s00795-013-0016-1

8. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Role of protein kinase C-MAPK, oxidative stress and inflammation pathways in diabetic nephropathy. *Nephrology & Therapeutics*. 2012; S2: 1-9.

9. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Curcumin Prevents Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Possible Involvement of PKC-MAPK Signaling Pathway. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47: 604-614.

10. Arumugam S, Thandavarayan RA, Watanabe K et al. Involvement of AMPK and MAPK signaling during the progression of experimental autoimmune myocarditis in rats and its blockade using a novel antioxidant. *Experimental and Molecular Pathology*. 2012; 93: 183-189.

11. Vijayakumar S, Watanabe K et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/masR in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sciences*. 2012; 90: 289-300.

12. Vijayakumar Sukumaran, Watanabe K

et al. Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 351:208-219.

13. Vigneshwaran Pitchaimani, Watanabe K et al. Nootropic activity of acetaminophen against colchicines induced cognitive impairment in rats. *J Clin Biochem Nutri*. 2012; 50: 241-244..

14. Arumugam S, Watanabe K et al. Candesartan cilexetil protects from cardiac myosin induced cardiotoxicity via reduction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rats: Involvement of ACE2-Ang (1-7)-mas axis. *Toxicology*. 2012; 291: 139-145.

15. Arumugam S, Watanabe K et al. Quercetin offers cardioprotection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin-1/MAPK signaling. *Free Radic Res*. 2012;46,154-163.

16. Arun Prasath Lakshmanan, Watanabe K et al. Modulation of AT-1R/MAPK cascade by an olmesartan treatment attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 348: 104-111.

17. Somasundaram Arumugam, Watanabe K et al. Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012; 16; 2176-2185.

18. Somasundaram Arumugam, Watanabe K et al. Modulation of endoplasmic reticulum stress and cardiomyocyte apoptosis by mulberry leaf diet in Experimental Autoimmune Myocarditis rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;50:139-144.

19. Arun P L, Watanabe K et al. Modulation of AT-1R/AMPK-MAPK cascade plays crucial role for the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy

in transgenic type 2 diabetic (Spontaneous Diabetic Torii) rats. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 83: 653-660.

[学会発表] (計 16 件)

1. Arumugam S, Watanabe K et al. Dominant Negative Mutation of Myocardial 14-3-3eta Protein and Its Effect on LAD ligation induced Acute Myocardial Infarction in mice. 第 77 回日本循環器学会。2013 年 3 月 15 日～17 日、東京横浜
2. Vigneshwaran Pitchaimani, Watanabe K et al. Fasting mediated predisposition of insulin induced hypoglycemic seizures is independent of hippocampal signaling of insulin. Colloquium on Drug Resistant Epilepsy. August 16-18, 2013, in India
3. Vigneshwaran Pitchaimani, Watanabe K et al. Fasting mediated predisposition of insulin induced hypoglycemic seizures is independent of central hippocampus insulin signaling mechanism. The 36th Naito Conference Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior. September 10-13, 2013, in SAPPORO, Japan
4. Vengadeshprabhu KaruppaGounder, Watanabe K et al. Modulation of HMGB1/RAGE-NFκB cascade plays crucial role for the pathogenesis of atopic dermatitis in transgenic NC/Nga mice. The 3rd International Science Congress, December 8-9, 2013, India.
5. Flori Ratna Sari, Watanabe K: Exacerbation of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Maladaptive Cardiac Remodeling in Pressure-Overloaded Dominant Negative 14-3-3eta Mice. 第 76 回日本循環器学会。2012 年 3 月 16 日～18 日、福岡
6. Vijayakumar Sukumaran, Watanabe K et al.

- Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. 第76回日本循環器学会。2012年3月16日～18日、福岡
7. Arun Prasath Lakshmanan, Watanabe K et al. The PERK-CHOP/GADD153 axis is the major determinant rather than the IRE-1 α -JNK for the ER stress-induced myocardial apoptosis in transgenic type 2 diabetic (Spontaneous Diabetic Torii) rats. SINGAPORE CARDIAC SOCIETY 24TH ANNUAL MEETING (28- 29 APRIL) 2012. In Singapore.
 8. Somasundaram A, Watanabe K et al. ROLE OF 14-3-3 PROTEIN AGAINST ISCHEMIC INSULT IN THE MICE HEART SUBJECTED TO MYOCARDIAL INFARCTION. EUROPEAN CARDIOLOGICAL SOCIETY – HEART FAILURE. 19-22, 2012. In Serbia.
 9. Vivian Soetikno, Watanabe K et al. Amelioration of Liver Injury by Curcumin in Streptozotocin Induced-Diabetic Rats. Internation Confernce on Medical and Pharmaceutical Sciences (ICMPS'2012). 16-17, 2012. In Bangkok (Thailand).
 10. Vijyaakumar Sukumaran, Watanabe K et al. Olmesartan, an AT1 antagonist, attenuates cardiac oxidative induced by experimental autoimmune myocarditis. 75th Annual Scientific meeting of the Japanese Circulation Society (JCS2011). 2011.8.3–4. 横浜.
 11. Wawaimuli Arozal, Watanabe K et al. Telmisartan Inhibits the Progression of Cardiomyopathy in Daunorubicin Rats with the Alteration of Advance Glycation End Products. 75th Annual Scientific meeting of the Japanese Circulation Society (JCS2011). 2011.8.3–4.横浜.
 12. Flori Sari, Watanabe K: Endoplasmic reticulum stress in cardiac hypertrophy; role of 14-3-3 protein and p38 MAPK pathway. 第51回新潟心不全研究会. 2011.6.16.新潟.
 13. Somasundaram ARUMUGAM, Watanabe K et al. Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress And Cardiomyocyte Apoptosis By Mulberry Leaf Diet In Experimental Autoimmune Myocarditis Rats. 6th ICCD, 2011.9.8–21. NewDelhi. India.
 14. Flori R. Sari, Watanabe K et al. Protective roles of 14-3-3 protein against endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in diabetic heart. 10th Diabetes Asia October 5th–9th 2011, Kuala Lumpur, Malaysia.
 15. Flori R. Sari, Watanabe K et al. Free radical scavenger protects against complications in heart and kidney by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress in diabetic mice. 10th Diabetes Asia October 5th–9th 2011, Kuala Lumpur, Malaysia.
 16. Flori R. Sari, Watanabe K et al. Endoplasmic reticulum stress induces cardiomyocyte apoptosis during pathological cardiac hypertrophy through the p38 MAPK pathway. 28th ISHR. December 2–3, 2011. Tokyo
- [図書] (計5件)
1. Somasundaram Arumugam, Watanabe K et al. Diabetic cardiomyopathy and oxidative stress. *Diabetes -Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Editor: Victor R Preedy.Elsevier. 2013. Chapter 3, PP25-32.
 2. K Suzuki, K Watanabe, et al. Vimentin-positive profibrogenic mesenchynal cells in intestine: Promising therapeutic targets for intestinal fibrosis. *In Vimentin*

Concepts and Molecular Mechanisms.

Editor: Ramon Andrade de Mello. Nova

Science Publishers Inc. 2013: PP27-36.

ISBN:978-1-62417-359-2.

3. Watanabe K et al. Histopathology of experimental autoimmune myocarditis. ***Advances in Medicine and Biology.*** Editor: Leon V Berhardt. Nova Science Pub Inc. 2012. Vol 37, Chapter-3, P69-86.
4. Watanabe K et al. Diabetic cardiomyopathy: Role of renin angiotensin system, ***Angiotensin New Research,*** Nova Science Publishers Inc. Editors: S Harada and I Moi. 2012, pp 205-213.
5. Watanabe K et al. Aldosterone antagonist and diuretics for heart failure. ***Advances in Medicine and Biology.*** Vol29. P223-241. Editor: Leon V Berhardt. Science Publishers Inc. 2012.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 賢一 (WATANABE KENICHI)

研究者番号 : 70175090