

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790307

研究課題名（和文） オートファジーによる糖尿病性心筋症の新たな治療メカニズムの解明

研究課題名（英文） Autophagy is a candidate process of the endogenous cardioprotective function in the diabetic cardiomyopathy

## 研究代表者

宮田 茂雄（MIYATA SHIGEO）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40366836

## 研究成果の概要（和文）：

2型糖尿病モデルである TSOD マウスの有する内因性の心筋保護機能におけるオートファジーの関与について評価した。TSOD マウスの心筋組織ではオートファジー関連タンパク発現量が明らかに増加していた。糖尿病発症前の TSOD マウスの心筋ではこのような変化は認められなかった。このことから、TSOD マウスの心筋では2型糖尿病の進行に伴ってオートファジー活性が高まることが明らかとなり、糖尿病により産生される不完全タンパクを効率良く除去していることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We evaluated the autophagic activity in the heart of TSOD mice. The expression levels of autophagy-related proteins (Atg5-Atg12 conjugate and K<sup>63</sup>-linked polyubiquitinated proteins) were higher in the heart of TSOD mice than the non-diabetic control. However, pre-diabetic TSOD mice did not show any change in the heart. We suggest that autophagy is a candidate process of the endogenous cardioprotective function in TSOD mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環器薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環器、高血圧、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

心臓は糖尿病の発症によりその機能が障

害される臓器として知られており、糖尿病患者の心不全による死亡率は健常者と比べて

高い (Kannel et al., 1974)。しかし、糖尿病による心機能障害に対して有効な治療法はなく、その解明が求められている。

Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD)マウスは ddY 系マウスのうち肥満と尿糖を呈する個体同士を繰り返し交配させることで近交系化した自然発症型 2 型糖尿病モデルマウスであり、従来の糖尿病モデル動物とは異なって複数の遺伝的要因が病態発症に関わること、生後 1 年以上に亘り高血糖と高インスリン血症を呈すること、およびヒトの糖尿病病理所見と酷似した膵臓、肝臓、腎臓の病変を示すことが特徴的である (Suzuki et al., 1999)。申請者らは最近、TSOD マウスの心機能を評価したが、申請者らの予想に反して TSOD マウスの心機能は低下しておらず、心臓病理所見にも異常は認められなかった (Kawada et al., 2010)。従来の 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウス (Yue et al., 2007) や ob/ob マウス (Christoffersen et al., 2003) は心機能低下と心筋細胞死を呈することから、TSOD マウスは糖尿病により誘発される心機能障害に対して、内因性の防御機構を有していると推察した。この内因性の防御機構を解明することで、糖尿病による心機能障害に対して新たな治療メカニズムを提言できると考えた。

オートファジーとは、細胞内に産生された不完全タンパクや機能低下したミトコンドリアなどのオルガネラを分解、除去するための生理的なシステムである。遺伝子改変により心臓特異的にオートファジーを不能にしたマウスでは、心機能不全を呈することが報告されている (Nakai et al., 2007)。このことから、オートファジーは心筋細胞において心機能保護的に機能しているシステムであることが知られている。また、タンパク質のポリユビキチン化は、様々な生体シグナルとし

て機能していることが知られているが、タンパク質の K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン化の一部はオートファジーの誘導シグナルとして機能していることが明らかにされている (Olzmann and Chin, 2008)。このことから、TSOD マウスの心筋では、糖尿病により障害を受けたタンパクやオルガネラが積極的に K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン化され、オートファジーを誘導することで速やかに分解、除去されている可能性が推測される。

## 2. 研究の目的

本研究では、顕著な 2 型糖尿病所見を呈する 7 ヶ月齢の TSOD マウスを使用し、その心筋におけるオートファジー関連タンパクの発現量と局在性の変化について対照動物である Tsumura Suzuki Non Obesity (TSNO) マウスと比較検討した。また、糖尿病発症前である 1 ヶ月齢の TSOD マウスを使用して同様の解析を行うことで、TSOD マウスにおいて 2 型糖尿病の発症と心筋におけるオートファジー活性化との関連性についても併せて評価した。さらに、遺伝的背景の異なる 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを使用し、心筋におけるオートファジー活性の評価を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

1 ヶ月齢および 7 ヶ月齢の雄性 TSOD マウスおよび同月齢の雄性 TSNO マウスを使用した。また、レプチン受容体欠損型 2 型糖尿病モデルである雄性 db/db マウスおよびその対照群として db/+マウスを使用した。

### (2) 血中生化学的検査

マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開腹し、腹部大静脈から血液を採取した。定法に従い、血漿サンプルを得

た。この血漿サンプルを使用して、血中のグルコース、トリグリセリド、総コレステロール、インスリンおよびレプチン値を測定した。なお、濃度測定には市販の専用キットを使用した。

### (3) Western blot 法

摘出した心筋を可溶化緩衝液中でホモジナイズし、遠心分離 (20,000×g、4℃、10 分間) 後の上清をタンパク溶解液とした。タンパク発現量は western blot 法により解析した。

### (4) 免疫組織学的染色法

マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔し、脱血致死後に 4%パラホルムアルデヒド液を灌流して組織を固定した。心臓を摘出してホルマリン液で追加固定し、その心臓組織をパラフィン包埋した。病理切片はマイクロトームで薄切して作製した。

### (5) 微細構造解析

TSOD マウスおよび TSNO マウスの左心室筋の超薄切片を透過型電子顕微鏡により検鏡し、オートファゴソームの形態について評価した。

### (6) 統計解析

データは全て平均値±標準誤差として表した。2 群間の比較では、F 検定によりデータの分散性を解析した後、等分散の場合は Student の t 検定により、また、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により統計学的な有意差の評価を行った。なお、危険率 5%未満の場合に有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

7ヶ月齢の TSOD マウスは顕著な高血糖、高脂血症、高インスリン血症、高レプチン血

症を呈することを確認した。TSOD マウスの心筋において、オートファジー誘導タンパクである Atg5-Atg12 複合体発現量は、TSNO マウスと比べて有意に増加していた。一方、その他のオートファジー関連タンパクである Atg16 および p62 発現量は、TSOD マウスと TSNO マウスとの間に有意な差は認められなかった。免疫組織学的染色によりオートファゴソーム膜タンパクである LC3 の細胞内局在性解析を行った結果、TSOD マウスの左心室筋では LC3 が核周囲に凝集していた。一方、TSNO マウスの左心室筋では同様の変化は認められなかった。透過型電子顕微鏡により微細構造解析した結果、7ヶ月齢の TSOD マウスの左心室筋のうち核周辺領域において多数のオートリソソームが認められた。また、障害されたミトコンドリアも散見され、その一部はオートファゴソームに取り囲まれる形で存在していた。このことから、TSOD マウスの左心室筋においてオートファジーが活性化しており、その一部は障害されたミトコンドリアを除去するマイトファジーであることが明らかとなった。

7ヶ月齢の TSOD マウス心筋において、K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン化タンパク発現量は同月齢の TSNO マウスと比べて有意に増加していた。一方、K<sup>48</sup> 結合型ポリ指既知タンパク発現量は両群間で有意な差は認められなかった。K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン化タンパクの組織局在性についてオートファゴソーム膜タンパクである LC3 と蛍光二重免疫染色を行った結果、TSOD マウスの左心室筋では K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン化タンパクと LC3 が各周辺部で一部共局在していた。これらのことから、2型糖尿病病態下の TSOD マウス心筋では不良タンパクや障害ミトコンドリアなどを積極的に K<sup>63</sup> 結合型ポリユビキチン鎖付加することでオートファジーによ

る分解、除去を促進している可能性が示唆された。一方、 $K^{48}$  結合型ポリユビキチン化タンパク発現量は TSOD マウスと TSNO マウスとの間に有意な差は認められなかったことから、不良タンパクの処理は、ユビキチン・プロテアソーム経路ではなく、主にオートファジー・リソソーム経路により行われていると推測される。

糖尿病発症前である 1 ヶ月齢の TSOD マウスの心筋におけるオートファジーの活性について評価した。その結果、1 ヶ月齢の TSOD マウスの左心室筋では  $K^{63}$  結合型ポリユビキチン化タンパク発現量は同月齢の TSNO マウスと比べて有意な差は認められなかった。また、LC3 の免疫組織学的染色を行った結果、1 ヶ月齢の TSOD マウスの左心室筋では LC3 の凝集はわずかであった。したがって、TSOD マウスの心筋において認められたオートファジー活性は、2 型糖尿病所見の発症に伴って亢進するものと考えられる。

db/db マウスは顕著な高血糖、高脂血症、高インスリン血症、高レプチン血症を呈し、7 ヶ月齢の TSOD マウスと同等の 2 型糖尿病重症度を呈した。しかし、db/db マウスの心筋において、オートファジー関連タンパク発現量ならびに組織局在性に関して明確な変化は認められなかった。したがって、心筋におけるオートファジー活性化は、TSOD マウス特有の変化である可能性が考えられる。

以上のことから、TSOD マウスの心筋では、2 型糖尿病の発症により産生される不良タンパクや障害ミトコンドリアに対して積極的に  $K^{63}$  結合型ポリユビキチン鎖付加を行われ、オートファジー・リソソーム経路を介して速やかに分解、除去されていることが明らかとなった。このメカニズムは、TSOD マウスが顕著な 2 型糖尿病所見を呈するにも関わらず心機能障害に至らない要因の 1 つで

あると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等 [学会発表] (計 6 件)

- ① 宮田茂雄、八木美幸、仲澤幹雄、河田登美枝 Tsumura Suzuki Obese Diabetes マウスおよび db/db マウスの心筋におけるオートファジー活性の評価 第 85 回日本薬理学会年回 京都 (2012)
- ② 宮田茂雄、八木美幸、仲澤幹雄、河田登美枝 Autophagy is a candidate process of the endogenous cardioprotective function in Tsumura Suzuki Obese Diabetes mice. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (誌上開催) (2011)
- ③ 八木美幸、宮田茂雄、仲澤幹雄、河田登美枝 Tsumura Suzuki Obese Diabetes マウスの心機能保護機構におけるオートファジーの関与 日本薬学会第 131 年会 静岡 (誌上開催) (2011)
- ④ 宮田茂雄、八木美幸、仲澤幹雄、河田登美枝 Tsumura Suzuki Obese Diabetes マウスの心機能保護機構におけるオートファジーの関与 第 54 回日本糖尿病学会年次集会 札幌 (2011)
- ⑤ Miyata S, Nakazawa M, Kawada T Autophagy-mediated cardioprotective function in Tsumura Suzuki Obese Diabetes mice 第 34 回心筋代謝研究会 東京 (2011)
- ⑥ 八木美幸、宮田茂雄、仲澤幹雄、河田登美枝 Tsumura Suzuki Obese Diabetes マウスにおけるオートファジーを介した

心機能保護機構の解明 第 55 回日本薬  
学会関東支部大会 千葉 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 茂雄 (MIYATA SHIGEO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40366836