

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461057

研究課題名(和文) 拡張不全に対する新たな治療の開発 - ノックアウトマウスを用いた検討 -

研究課題名(英文) New treatment for left ventricular diastolic failure

研究代表者

荻野 和秀 (Ogino, Kazuhide)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70294311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心不全に対する薬物療法によって、インスリン抵抗性やプリン・尿酸代謝がどのような影響を受けるかを明らかにして、インスリン抵抗性やプリン・尿酸代謝をターゲットとした新たな心不全治療方法の可能性を検討した。

AMP deaminase ノックアウトマウスを用いて虚血再還流傷害を引き起こし、その機序を検討した。また、アルドステロン拮抗薬およびループ利尿薬の心不全におけるインスリン抵抗性および心機能への影響を心筋線維化マーカーおよび炎症マーカーと併せて検討した。

これらの検討により、プリン・尿酸代謝やインスリン抵抗性が心不全の病態に関わり、新たな治療法に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of drug therapy on insulin resistance and purine-uric acid metabolism in heart failure, and discussed the possibility of new treatment of heart failure. We induced ischemia-reperfusion injury using AMP deaminase deficient mouse and evaluated the mechanism and the relationship between heart failure and purine-uric acid metabolism. In addition, we evaluated the effects of an aldosterone antagonist and a loop diuretic on insulin resistance and cardiac function as well as fibrosis markers and inflammation markers in patients with heart failure.

From these studies, purine-uric metabolism and insulin resistance might be targets for new treatments of heart failure.

研究分野：医歯薬学(循環器内科)

キーワード：心不全 拡張不全 インスリン抵抗性 アルドステロン 高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

心不全には糖代謝異常がしばしば合併し、インスリン抵抗性は心不全の新規発症予測因子および予後予測因子である。一方、収縮不全による心不全治療はACE阻害薬、アンジオテンシン受容体遮断薬、アルドステロン拮抗薬や受容体遮断薬といった薬物が有用である。しかしながら、拡張不全は高齢者に多く、有効な薬物治療は未だ確立されておらず、今後の超高齢化社会を向かえることを考えると新たな治療法の開発は急務である。

最近、糖代謝異常により拡張障害が引き起こされることが明らかになった。さらに、拡張障害の原因のひとつである心筋線維化の指標である matrix metalloproteinase (MMP) がインスリンレセプターと関連することも報告されている。そこで、インスリン抵抗性が心筋線維化と関連して拡張不全の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

アデノシン三リン酸 (AMP) キナーゼ (AMPK) はAMP で活性化されるリン酸化酵素で、細胞内のエネルギーが欠乏しアデノシン三リン酸 (ATP) が分解し、AMP/ATP が高まると活性化される。活性化されたAMPK は糖や脂質の燃焼を増加させるため、糖尿病に対してはAMPK の活性化が有用であると考えられている。AMPDKO マウスではAMPの分解が阻害されるため、AMP/ATP 比が高まりAMPK が常に活性化されている状態であり、糖代謝に対してよい影響があると考えられる。

今回、インスリン抵抗性および心筋線維化をターゲットとした拡張障害による心不全の新たな治療方法を検討する。

## 2. 研究の目的

(1) AMPDKO マウスを用いたインスリン抵抗性・アルドステロン拮抗薬の効果の検討

今回はAMPD3 のノックアウト(KO)マウスを用いる。AMPD3KO マウスについては、以前より共同研究を行っている国立循環器病センター・バイオサイエンス部より供給を受ける。wild type およびAMPDKO マウスに対して、コントロール群、薬物治療群 (ピオグリタゾンまたはエプレレノン投与) の3 群に分けて検討する。拡張不全の評価は心エコーによって評価する。また、心筋および骨格筋の生化学的・分子生物学的解析によって、AMP、IMP、adenosine、AMPK、AMPD1 およびAMPD3 の解析を行う。この検討によって拡張不全におけるAMP とインスリン抵抗性の意義が明らかになる。さらにAMPK 亢進状態での拡張不全に対する運動療法、薬物療法の有効性が明らかになる。

(2) インスリン抵抗性を有する拡張障害心不全患者におけるアルドステロン拮抗薬の効果の検討

アルドステロン拮抗薬の拡張障害による心不全への作用を検討するために、心不全患者を対象に、エプレレノン治療を行う。16 週間の治療の後、糖代謝に関してはブドウ糖負荷試験による血糖およびインスリンの反応を検討するとともに、終末糖化産物 (AGE) を測定する。左室拡張機能に関しては心エコーの組織ドプラーによる評価を行う。さらに、線維化と炎症の指標としてMMP1、MMP2、MMP3、MMP9、TIMP1、TIMP2、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 も同時に測定する。本研究によって、アルドステロン拮抗薬が左室拡張能にどのような影響を及ぼしているかが明らかになる。

## 3. 研究の方法

(1) AMPD KO マウスに対するインスリン抵抗性改善薬およびアルドステロン拮抗薬の効果の検討

AMPD3KO マウスおよびWild

type マウス (コントロール) に高フルクトース食を4 週間で与え、腹部大動脈縮窄によって左室拡張障害を作成する。これらのマウスに対して、エプレレノン (100mg/kg/日) を16週間経口投与し、前後で評価を行う。

#### 糖代謝の検討

血液を採取して糖、インスリン、AGE を測定。

#### 心機能の評価

心エコー：左室駆出率および左室流入血流を測定。

#### 心筋および骨格筋の検討

AMP、IMP、adenosine の測定 (HPLC)。AMPK とAMP deaminase 蛋白量およびその活性の測定。MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、TIMP1、TIMP2、MCP1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の測定 (ELISA)。

#### (2) インスリン抵抗性を有する拡張障害心不全患者におけるアルドステロン拮抗薬の効果の検討

高血圧性心肥大を伴う拡張障害心不全患者40例を対象とする。収縮障害 (左室駆出率50%未満) を合併している患者は除外する。16週間の治療 (フロセミド群20 例、エプレレノン群20 例) を行い、前後で以下の検討を行う。

#### 糖代謝の検討

75g ブドウ糖負荷試験を行い、糖、インスリン、AGE を測定。MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、TIMP1、TIMP2、hs-CRP、MCP1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の測定 (ELISA)。

#### 心機能の評価

心エコー：左室流入血流の評価。  
組織ドプラー：左室拡張能の評

価。

#### 4. 研究成果

(1) 圧負荷高血圧モデルによる拡張不全ラットに対して、高フルクトース食飼育を行い、インスリン抵抗性を惹起させた。コントロール群、薬物治療群 (ピオグリタゾンまたはスピロノラクトン投与) の3群に分けて、心エコーで拡張機能の評価した。さらに、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 も測定した。以上の検討により、インスリン抵抗性およびアルドステロンの拡張不全に対する影響が明らかになりつつある。現在研究を継続中であるが、本研究と関連のある研究報告を行った。(BBRC 2013;434:131-136, Biomed Res. 2015;36:11-9, Drug Res. 2016;66:270-4)

(2) 臨床研究に関しては、アルドステロン拮抗薬の心不全におけるインスリン抵抗性への作用を検討するために、心不全患者16例を対象に、ピオグリタゾン、スピロノラクトン、フロセミド治療を16 週間行った。空腹時血糖およびインスリンを測定し、左室拡張機能に関しては心エコーによる評価を行った。さらに、線維化と炎症の指標としてMMP1、MMP2、MMP3、MMP9、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 も測定した。スピロノラクトンはインスリン抵抗性を改善した。その改善に炎症性サイトカインやMMPの関与の可能性が示唆された。以上検討により、未だ有効な薬物治療が確立していない拡張不全の新たな治療法に繋がると考えられる。現在、研究を継続中であるが、データの一部及び関連性のある研究を報告した (Int J Cardiol

2014;171:398-403, *Circ J*.  
2015;79(5):1125-32, *Drug Res*.  
2016;66:628-632)。さらに酸化ス  
トレスの影響を検討するために、キ  
サンチンオキシダーゼ阻害薬の拡  
張障害に対する効果も検討中であ  
る。

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)

Effect of Antihypertensive Drugs on  
Uric Acid Metabolism in Patients with  
Hypertension: Cross-Sectional Cohort  
Study. Ueno S, Hamada T, Taniguchi S,  
Ohtani N, Miyazaki S, Mizuta E,  
Ohtahara A, Ogino K, Yoshida A,  
Kuwabara M, Yoshida K, Ninomiya H,  
Kotake H, Taufiq F, Yamamoto  
K, Hisatome I. *Drug Res (Stuttg)*. 査  
読有 2016 Dec;66(12):628-632.

doi: 10.1055/s-0042-113183

Effects of Uric Acid on the NO  
Production of HUVECs and its  
Restoration by Urate Lowering Agents.  
Mishima M, Hamada T, Maharani N, Ikeda  
N, Onohara T, Notsu T, Ninomiya H,  
Miyazaki S, Mizuta E, Sugihara S, Kato  
M, Ogino K, Kuwabara M, Hirota Y,  
Yoshida A, Otani N, Anzai N,  
Hisatome I. *Drug Res (Stuttg)*. 査読  
有 2016 May;66(5):270-4.  
doi:10.1055/s-0035-1569405.

Adipose stem cell sheets improved  
cardiac function in the rat myocardial  
infarction, but did not alter cardiac  
contractile responses to  
adrenergic stimulation. Otsuki Y,  
Nakamura Y, Harada S, Yamamoto

Y, Ogino K, Morikawa K, Ninomiya H,  
Miyagawa S, Sawa Y, Hisatome I,  
Nishimura M. *Biomed Res*. 査読有  
2015;36(1):11-9.

doi: 10.2220/biomedres.36.11.

Depletion of Uric Acid Due to SLC22A12  
(URAT1) Loss-of-Function Mutation  
Causes Endothelial Dysfunction in  
Hypouricemia. Sugihara S, Hisatome I,  
Kuwabara M, Niwa K, Maharani N, Kato  
M, Ogino K, Hamada T, Ninomiya H,  
Higashi Y, Ichida K, Yamamoto K. *Circ  
J*. 査読有 2015;79(5):1125-32.

doi: 10.1253/circj.CJ-14-1267.

Spirolactone, not furosemide,  
improved insulin resistance in  
patients with chronic heart failure.  
Ogino K, Kinugasa Y, Kato M, Yamamoto  
K, Hisatome I, Anker SD, Doehner W.  
*Int J Cardiol*. 査読有 2014 Feb  
15;171(3): 398-403.

doi:10.1016/j.ijcard.2013.12.039.

AMP deaminase 3 plays a critical role  
in remote reperfusion lung injury. Li  
P, Ogino K, Hoshikawa Y, Morisaki H,  
Toyama K, Morisaki T, Morikawa K,  
Ninomiya H, Yoshida A, Hashimoto K,  
Shirayoshi Y, Hisatome I. *Biochem  
Biophys Res Commun*. 査読有 2013 Apr  
26;434(1):131-6.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.056.

〔学会発表〕(計4件)

Ogino K, Kinugasa Y, Kato M, Hisatome  
I, Yamamoto K. Losartan/  
hydrochlorothiazide combination  
therapy improved left ventricular  
diastolic dysfunction in patients  
with hypertension in comparison with  
a high-dose therapy of losartan.  
*American Society of Hypertension* 2016.

2016年5月16日. New York (USA).

荻野和秀、衣笠良治、加藤雅彦、浜田紀宏、山本一博、久留一郎. 左室拡張機能障害に対する高尿酸血症治療の効果. 第49回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2016年2月18日. 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市).

Ogino K. Uric acid-lowering treatment in patients with left ventricular diastolic dysfunction. 第79回日本循環器学会学術集会. 2015年4月24日. 大阪国際会議場 (大阪府・北区).

荻野和秀. フェブキソスタット・トピロキソスタット: 最近の話題. 第78回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2014年2月21日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荻野 和秀 (OGINO, Kazuhide)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70294311

### (2) 連携研究者

久留 一郎 (HISATOME, Ichiro)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 60211504