

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860611

研究課題名(和文)2型糖尿病による左室拡張機能障害の分子機序

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of left ventricular diastolic dysfunction in the type 2 diabetic heart

研究代表者

神津 英至(Kouzu, Hidemichi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60596609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病において、急性圧負荷が拡張期左室伸展性を低下させる機序を解析した。2型糖尿病心ではAMP deaminaseを介したアデニンヌクレオチドの分解が亢進しており急性圧負荷中に心筋ATP濃度が低下すること、心筋ATP濃度は左室等容弛緩時定数(tau)および左室拡張末期圧と負の相関を認めること、これらの左室拡張特性は間質の線維化や細胞骨格蛋白titinの変化が出現する前より認めることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine mechanisms by which type 2 diabetes (T2DM) augments ventricular diastolic stiffness in response to pressure overloading. We found that AMP deaminase activity was increased in T2DM hearts, resulting in excessive degradation of adenine nucleotides and ATP depletion during pressure overloading. ATP level was negatively correlated with tau of LV pressure and LVEDP. These diastolic properties were observed before development of extracellular matrix or titin remodeling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：拡張機能 糖尿病 心不全 AMP deaminase

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は冠動脈疾患の有無によらず、心不全の発症ならびに心予後悪化のリスク因子であることが知られている。糖尿病は心不全発症前から左室拡張機能障害を呈し、収縮能の保たれた心不全 (HFpEF) の主要なリスク因子の一つである。2 型糖尿病患者において、運動負荷にて顕在化する早期の左室拡張予備能低下も、心血管イベントの予測因子であることが報告されている。HFpEF の臨床的特徴として、急激な後負荷増大に対し代償不全を来しやすいことが知られているが、HFpEF では後負荷増大にて左室拡張期圧-容積関係が上方にシフトすることにより左室拡張末期圧が上昇することが観察されている。これらの結果から、2 型糖尿病の心不全発症および予後悪化に、左室拡張機能およびストレス下におけるその予備能低下が関与していることが推測される。

左室拡張能は拡張早期弛緩能および拡張後期伸展性に大別され、細胞外基質(コラーゲン線維)、細胞骨格、心筋フィラメントの cross-bridge 動態により規定される。糖尿病による左室メカニクス異常において、これら拡張能の規定因子の寄与度および、急性負荷時の変化は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、2 型糖尿病における左室メカニクスの変化を、急性圧負荷、急性容量負荷に対する左室拡張能の応答変化に注目して左室圧-容積関係 (pressure-volume relationship, PVR) から解析し、その分子機序を、細胞骨格蛋白 titin および心筋フィラメントの cross-bridge 動態の変化に焦点をあてて解析する。

## 3. 研究の方法

2 型糖尿病モデルラットである OLETF (30~35 週齢) および耐糖能正常対照ラット LETO を用いた。急性負荷に対する左室応答の変化は *in vivo* および摘出灌流心標本における *ex vivo* の PVR から解析した。分子機序の解明のため、収縮蛋白、収縮調節蛋白、細胞骨格蛋白 titin の発現ならびに修飾を解析した。蛋白発現の網羅的解析には主に DNA microarray を用い、翻訳後修飾は Western blotting、Pro-Q<sup>®</sup> ダイヤモンドリン酸化タンパク質ゲル染色、LC/MS analysis を用いた。Cross-bridge 動態の修飾因子として心筋代謝の変化に注目し、心筋メタボローム解析にて網羅的に解析した。これらの指標と、PVR 解析から得られる力学的指標との関連を検討した。

## 4. 研究成果

ベースラインの *in vivo* 血行動態は、OLETF にて有意に心拍数が低く、収縮性の指標である左室駆出率および左室収縮末期エラストランス (Ees) は有意に低下していた。拡張早期弛緩能を表す左室等容弛緩時定数 ( $\tau$ ) は OLETF にて有意に延長していたが、拡張末期圧-容積関係 (EDPVR) の指標および左室拡張末期圧 (LVEDP) は LETO と同等であった。OLETF では、フェニレフリンによる急性圧負荷時に拡張末期圧-容積関係 (EDPVR) の左上方へのシフトがおり、LETO に比べ有意に LVEDP が上昇した。心拍数および収縮性の指標は LETO と同程度まで上昇し、陽性変時作用及び収縮予備能は保たれていた。一方で、生理食塩水による急性容量負荷では両群で EDPVR は右方へシフトし、LVEDP の上昇は認めなかった。以上の結果より、OLETF が急性圧負荷に対して、臨床における HFpEF と同様の血行動態応答を呈するモデルであることが確認できた。

摘出灌流心標本における *ex vivo* 実験においても、OLETF にて後負荷に相当する灌流圧を上昇させるほど LVEDP が上昇することが観察された。しかし、心保護液にて心拍動を静止させると、圧-容積関係は LETO と同等となった。組織学的検討では、実験に用いた週齢においては、間質の線維化は両群で同等であり、type 1 および type 3 collagen や TGF  $\beta$  1 の mRNA 発現にも差は認めなかった。左室伸展性は細胞骨格蛋白 titin にも規定され、同蛋白の PKA および PKG によるリン酸化により増加し、PKG によるリン酸化にて低下することが報告されているが、titin の蛋白発現および総リン酸化の程度、および上流のキナーゼ活性は OLETF と LETO で同等であった。以上の結果から、OLETF でみられる急性圧負荷時の左室伸展性低下において、細胞外基質や titin の変化の関与は否定的であり、cross-bridge 動態の変化が関与していることが推測された。

次に、急性圧負荷が心筋代謝に及ぼす影響を、ベースラインおよびフェニレフリンによる急性圧負荷中の心筋より得たサンプルを用いて、メタボローム解析により網羅的に評価した。測定可能であったエネルギー、アミノ酸、核酸代謝を中心とした 96 代謝物の主成分解析により、糖尿病の有無および圧負荷の有無によって代謝物の変化が明確に区別されることがわかった (図 1)。糖尿病の有無を区別する第一主成分における各代謝物の因子負荷量をプロットすると、OLETF では ATP が減少している事がわかった (図 2)。ATP を含むアデニンヌクレオチド代謝物の変化において、OLETF では圧負荷中に ATP および総アデニンヌクレオチド量の低下とともに AMP の代謝物である inosine 5-monophosphate (IMP) が増加しており、一方でアデノシンは減少していた (図 3)。以上の結果より、OLETF 心筋にて AMP を IMP へ分解する酵素である AMP deaminase (AMPD) 活性が亢進している事が示唆された。心筋における主要アイソフォ

ームである AMPD3 の mRNA および蛋白発現は OLETF と LETO で同等であったが、in vitro assay にて OLETF 心筋の AMPD 活性は LETO と比べ約 2.5 倍増加していた。心筋 ATP 含量は、拡張能指標である tau および LVEDP と負の相関を認めた。以上の結果から、2 型糖尿病心筋では、急性圧負荷時に AMPD を介した過剰なアデニンヌクレオチド分解により ATP 供給が減少し、左室伸展性が低下することが示唆された。

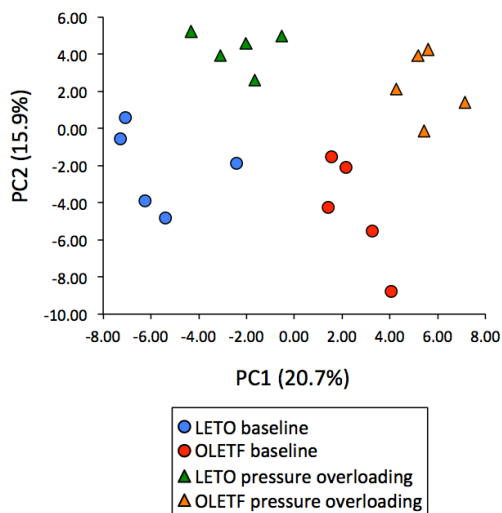


図 1 メタボローム主成分分析

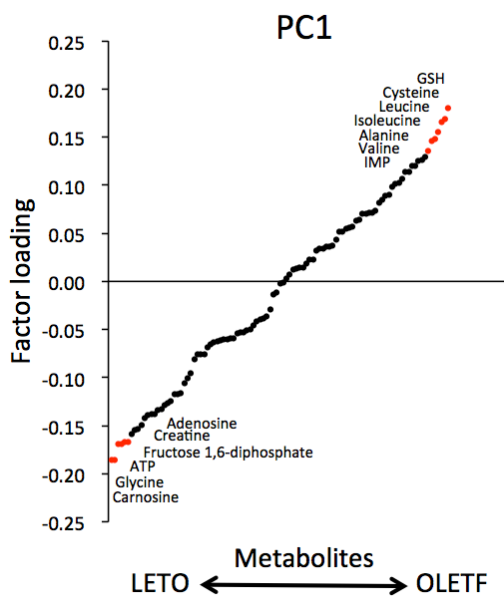


図 2 第一主成分における代謝物の因子負荷量

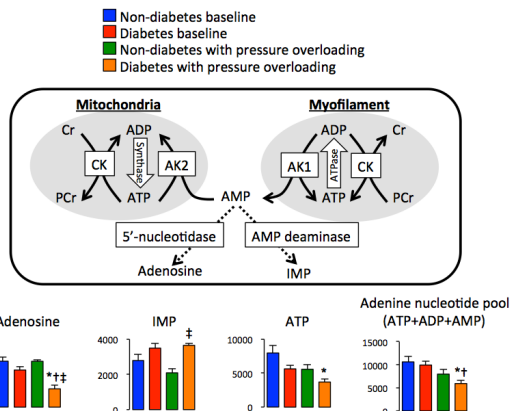


図 3 アデニンヌクレオチド代謝の変化

### 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 4 件)

- 1) Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Ishikawa S, Miura T. Excessive degradation of adenine nucleotides by up-regulated AMP deaminase underlies afterload-induced diastolic dysfunction in the type 2 diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;80:136-45. 査読あり  
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.004.
- 2) Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Kouzu H, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Horio Y, Miura T. Translocation of GSK-3 $\beta$ , a Trigger of Permeability Transition, Is Kinase Activity-dependent and Mediated by Interaction with VDAC2. *J Biol Chem.* 2014;289:29285-96. 査読有り  
DOI: 10.1074/jbc.M114.563924.
- 3) Sato T, Kobayashi T, Kuno A, Miki T, Tanno M, Kouzu H, Itoh T, Ishikawa S, Kojima T, Miura T, Tohse N. Type 2 diabetes induces subendocardium-predominant reduction in transient outward K $^{+}$  current with downregulation of Kv4.2 and KChIP2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306:H1054-65. 査読有り  
DOI: 10.1152/ajpheart.00414.2013.
- 4) Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev.* 2013;18:149-66. 査読あり  
DOI: 10.1007/s10741-012-9313-3.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Muratsubaki S, Miura T. Insufficient ATP supply due to excessive degradation of adenine nucleotides by AMP deaminase underlies afterload-induced diastolic dysfunction in the type 2 diabetic heart. The 36th Congress of the European Society of Cardiology. (Aug 30-Sep 3, 2014), Barcelona, Spain.
- 2) Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Miura T. Insufficient ATP supply due to excessive degradation of adenine nucleotides underlies afterload-induced diastolic dysfunction in type 2 diabetic heart. The 17th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society. (Nov 28-30, 2013), The Sonic City hall (Saitama), Japan.
- 3) Kouzu H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Changes in Titin-based Ventricular Stiffness May Underlie Diastolic Dysfunction Unmasked by Acute Systolic Pressure Overloading in Type 2 Diabetic Hearts. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (Mar 15-17, 2013), Pacifico Yokohama (Yokohama), Japan.

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神津 英至 (Kouzu Hidemichi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60596609