

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460239

研究課題名(和文)臓器障害進行過程における遺伝子及びエネルギー - 獲得機能の変化

研究課題名(英文)Change of pathways in organ damage

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：臓器障害では酸化ストレスが関係することが明らかになりつつある。一方、小胞体ストレスおよび小胞体を介するアポトーシスも注目されつつある。モデル動物を用い各組織における酸化ストレス・小胞体ストレスをウエスタンブロット・免疫染色などで検討した。脂肪酸代謝機能を評価する標識薬剤として [1-¹³¹I]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 を用いた。その結果、各疾患で酸化ストレスが亢進し、各治療薬のみならず機能性食品投与でもそれらが改善した。酸化ストレスや小胞体ストレスを抑制することは、合併症治療等に効果的であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is important in many diseases. 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

キーワード：医療薬剤学 標識脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスが各病態や老化に関与する。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

各疾患モデルの腎臓・心筋組織における 14-3-3 蛋白・MAPK(P38,JNK,ERK)・活性酸素(GSHPx, 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、心疾患・糖尿病などの各疾患モデルの腎臓・心筋組織における 14-3-3 蛋白・MAPK(P38,JNK,ERK)・活性酸素(GSHPx, 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。

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 DN14-3-3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チン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、各治療薬のみならず機能性食品投与でそれらが改善した。

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 21 件) 全て査読有

1. Sreedhar R, Arumugam S, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Watanabe K. Curcumin as a therapeutic agent in the chemoprevention of inflammatory bowel disease. Drug Discov Today. 2016 May;21(5):843-9.
2. Sreedhar R, Arumugam S, Thandavarayan RA, Giridharan VV, Karuppagounder V, Pitchaimani V, Afrin R,

- Harima M, Nakamura M, Suzuki K, Gurusamy N, Krishnamurthy P, Watanabe K. Depletion of cardiac 14-3-3 η protein adversely influences pathologic cardiac remodeling during myocardial infarction after coronary artery ligation in mice. *Int J Cardiol*. 2016;202:146-53.
3. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Sreedhar R, Giridharan VV, Afrin R, Harima M, Miyashita S, Hara M, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Curcumin alleviates renal dysfunction and suppresses inflammation by shifting from M1 to M2 macrophage polarization in daunorubicin induced nephrotoxicity in rats. *Cytokine*. 2016 Aug;84:1-9.
4. Afrin R, Arumugam S, Wahed MI, Pitchaimani V, Karuppagounder V, Sreedhar R, Harima M, Suzuki H, Miyashita S, Nakamura T, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Liver Damage by Mulberry Leaf Diet in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Am J Chin Med*. 2016;44:87-101.
5. Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Watanabe K. Targeting fatty acid metabolism in heart failure: is it a suitable therapeutic approach? *Drug Discov Today*. 2016 Jun;21(6):1003-8.
6. Pitchaimani V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Afrin MR, Sreedhar R, Harima M, Suzuki H, Miyashita S, Nakamura T, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Fasting time duration modulates the onset of insulin-induced hypoglycemic seizures in mice. *Epilepsy Res*. 2016 Sep;125:47-51.
7. Arumugam S, Sreedhar R, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Krishnamurthy P, Suzuki K, Nakamura M, Watanabe K. Angiotensin receptor blockers: Focus on cardiac and renal injury. *Trends Cardiovasc Med*. 2016 Apr;26:221-8.
8. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Sreedhar R, Giridharan VV, Watanabe K. Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis. *Drug Discov Today*. 2016 Apr;21(4):632-9.
9. Sreedhar R, Giridharan VV, Arumugam S, Karuppagounder V, Palaniyandi SS, Krishnamurthy P, Quevedo J, Watanabe K, Konishi T, Thandavarayan RA. Role of MAPK-mediated endoplasmic reticulum stress signaling in the heart during aging in senescence-accelerated prone mice. *Biofactors*. 2016 Jul 8;42(4):368-75.
10. Pitchaimani V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Karuppagounder V, Afrin MR, Sreedhar R, Harima M, Suzuki H, Miyashita S, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Hypothalamic glucagon signaling in fasting hypoglycemia. *Life Sci*. 2016 May 15;153:118-23.
11. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Sreedhar R, Giridharan VV, Pitchaimani V, Afrin R, Harima M, Krishnamurthy P, Suzuki K, Nakamura M, Ueno K, Watanabe K. Naringenin ameliorates skin inflammation and accelerates phenotypic reprogramming from M1 to M2 macrophage polarization in atopic dermatitis NC/Nga mouse model. *Exp Dermatol*. 2016 May;25(5):404-7.
12. Suzuki K, Arumugam S, Yokoyama J, Kawauchi Y, Honda Y, Sato H, Aoyagi Y, Terai S, Okazaki K, Suzuki Y, Mizumoto S, Sugahara K, Atreya R, Neurath MF, Watanabe K, Hashiguchi T, Yoneyama H, Asakura H. Pivotal Role of Carbohydrate Sulfotransferase 15 in Fibrosis and Mucosal Healing in Mouse Colitis. *PLoS One*. 2016 Jul 13;11(7):e0158967.
13. Remya S, Somasundaram A, Vengadeshprabhu K, Rajarajan A. T, Vijayasree V G, Vigneshwaran P, Mst. Rejina A, M Harima, T Nakamura, M Nakamura, K Suzuki, K Watanabe. Jumihaidokuto effectively inhibits colon inflammation and apoptosis in mice with acute colitis. *International Immunopharmacology*. 2015; 29: 957-963.
14. Vijayasree V. Giridharan, R A. Thandavarayan, S Arumugam, M Mizuno, H Nawa, K Suzuki, Kam M. Ko, P Krishnamurthy, K Watanabe, T Konish. Schisandrin B Ameliorates ICV-Infused Amyloid β Induced Oxidative stress and Neuronal Dysfunction through Inhibiting RAGE/NF- κ B/MAPK and Up-regulating HSP/beclin Expression. *Pros One* 2015;Nov 10, 1-17. DOI:10.1371/journal.pone.0142483.
16. Remya S, Somasundaram A, Vengadeshprabhu K, Rajarajan A. T, Vijayasree V G, Vigneshwaran P, Mst. Rejina A, M Harima, T Nakamura, K Ueno, M Nakamura, K Suzuki, K Watanabe. Toki-shakuyaku-san, a Japanese kampo medicine, reduces colon inflammation in a mouse model of acute colitis. *International Immunopharmacology*. 2015; 29: 869-875.
17. V Karuppagounder; S Arumugam; R A Thandavarayan; V Pitchaimani; R Sreedhar; R Afrin; M Harima; H Suzuki; M Nomoto; S Miyashita; K Suzuki; M Nakamura; K Ueno, Watanabe K.

Tannic acid modulates NF- κ B signaling pathway and skin inflammation in NC/Nga transgenic mice through PPAR- γ expression. *Cytokine*. 2015; 76: 206-213.

18. Harima M, Somasundaram A, Wen J, Vengadeshprabhu K, Rajarajan A T, Vigneshwaran P, Remya S, Rejina A, Watanabe K. Effect of carvedilol against myocardial injury due to ischemia-reperfusion of the brain in rats. *Exp Molec Path*. 2015; 98: 558-562.

19. S Arumugam; R Sreedhar; R A Thandavarayan; V V Giridharan; V Karuppagounder; V Pitchaimani; M R Afrin; S Miyashita; M Nomoto; M Harima; H Suzuki; T Nakamura; M Nakamura; K Suzuki. Watanabe K. Telmisartan treatment targets inflammatory cytokines to suppress the pathogenesis of acute colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Cytokine*. 2015; 74: 305-312.

20. Rajarajan A. Thandavarayan, Vijayasree V. Giridharan, Somasundaram Arumugam, Kenji Suzuki, Kam Ming Ko, Prasanna Krishnamurthy, K Watanabe, T Konishi. Schisandrin B Prevents Doxorubicin Induced Cardiac Dysfunction by Modulation of DNA Damage, Oxidative Stress and Inflammation through Inhibition of MAPK/p53 Signaling. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0119214 March 5, 2015.P1-P18.

21. Watanabe K, Vengadeshprabhu K, Somasundaram A, Rajarajan A T, Vigneshwaran P, Remya S, Rejina A, Harima M, Suzuki H, Suzuki K, Nomoto M, Miyashita S, Fukumoto K, Ueno K. Pruni cortex ameliorates skin inflammation possibly through HMGB1-NF κ B pathway in house dust mite induced atopic dermatitis NC/Nga transgenic mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2015; 56:186-194.

[学会発表] (計 12 件)

1.Rejina A, Watanabe K et al. Oral presentation entitled “Curcumin Effectively Inhibits CXCL10 Associated Pathogenesis in the Liver of NASH-HCC Mice Model” in the 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Tokyo, Japan, February 20-24, 2016

2.Arumugam S, Watanabe K et al. Attended 80th Japanese Circulation Society meeting at Sendai, Japan – 18-20 March 2016.

3.Arumugam S, Watanabe K et al. Presented poster entitled “Antioxidant therapy against dilated cardiomyopathy following experimental autoimmune myocarditis in rats” in the 1st Annual

International Heart Failure Conference, Abu Dhabi, UAE. 26-27 May 2015.

4. Arumugam S, Watanabe K et al. Presented poster entitled “Naringenin ameliorates skin inflammation and promotes polarization towards M1 like macrophages in atopic dermatitis NC/Nga mouse model” in the 5th Euro-India International Conference on Holistic Medicine (ICHM-2015), Kerala, India – 11-13 September 2015.

5. Remya S, Watanabe K et al. “Cardiac 14-3-3 η protein adversely influences pathologic cardiac remodeling during myocardial infarction after coronary artery ligation in mice” in the 1st Annual International Heart Failure Conference, Abu Dhabi, UAE. 26-27 May 2015.

6.Arumugam S, Watanabe K et al. Depletion of cardiac 14-3-3 η protein adversely influences pathologic cardiac remodeling via exacerbation of inflammation, endoplasmic reticulum stress, and suppression of regeneration after coronary artery ligation in mice. 第78回日本循環器学会。2014年3月20日～22日、東京。

7.R Sreedhar, Watanabe K et al. Dietary Petitvert supplementation protects against acute colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. KMCH College of Pharmacy, Coimbatore, India. September 5 – 7, 2014.

8.Arumugam S, Watanabe K et al. Dominant Negative Mutation of Myocardial 14-3-3 β Protein and Its Effect on LAD ligation induced Acute Myocardial Infarction in mice. KMCH College of Pharmacy, Coimbatore, India. September 5 – 7, 2014.

9.V KaruppaGounder, Watanabe K et al. Modulation of HMGB1 translocation and RAGE/NF κ B cascade by quercetin treatment mitigates skin inflammation in house dust mite-induced atopic dermatitis in NC/Nga transgenic mice. KMCH College of Pharmacy, Coimbatore, India. September 5 – 7, 2014.

10.Rajarajan A T, Watanabe K et al. Dominant Negative 14-3-3 Protein Exacerbates Cardiac Dysfunction by Suppressing Cardiac Regeneration After Coronary Artery ligation in mice. American heart Association. Chicago. USA. November 15-19, 2014.

11.V Pitchaimani, Watanabe K et al. Glucose transporter expression in cortex and hippocampus of fasting, moderate and severe hypoglycemia of mice. DIABETIC

AND METABOLIC SYNDROME
Networks, Crosstalk's, and Interventions,
Gurgoan 122060, Haryana, India.
November 24-29, 2014.

12.M R Afrin, Watanabe K et al. Curcumin
Ameliorates Liver Injury by Attenuation of
Endoplasmic Reticulum Stress Mediated
Apoptosis in Streptozotocin Induced
Diabetic Rats. 3rd Ayuns International
Ayurvedic Conference. Senate Bhaban,
Dhaka University. ダッカ(バングラデシュ).
29 Nov 2014.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

渡辺 賢一(WATANABE KENICHI)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号:70175090

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：

(4) 研究協力者

(0)