

## 主論文の要旨

### **Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes**

Glucagon-like peptide-1 受容体活性は、2型糖尿病において心筋中の異常脂肪蓄積と酸化ストレスを正常化することによって、心臓リモデリングを可逆的に改善させる

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明教授)

文字 昭雄

## 【緒言】

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬である exendin-4 (Ex-4)は2型糖尿病 (T2DM) 治療薬である。過去の論文報告で、Ex-4 は心筋梗塞後の心機能傷害を改善することや、動脈硬化モデルにおいて抗酸化、抗炎症作用を示すことが報告されている<sup>(1,2,3)</sup>一方、糖尿病性心筋障害に対し Ex-4 が心保護効果を示す否かについては不明である。そこで本研究では、先天的 T2DM マウスモデル (KK) と、高脂肪食負荷による後天的 T2DM マウスモデル (DIO) に対する Ex-4 の心保護効果を検証した。

## 【実験方法】

各 T2DM マウス (雄 11 週齢) を、Ex-4 持続皮下投与 (24nmol/kg/day) 群と、コントロール群 (溶媒単独) の 2 群にわけ、各々 16-17 週齢時に解析を行った (Fig.1)。全身のインスリン抵抗性は経口ブドウ糖負荷試験を行い評価し、心筋組織のインスリン抵抗性は心筋組織抽出液のインスリン受容体サブユニット-1 (IRS-1) のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で評価した。心機能は心臓超音波法を用いて評価した。心筋リモデリングは、心筋組織の免疫学的染色法で、心筋肥大、間質線維化、心筋細胞中の脂肪蓄積 (cardiac steatosis) を評価した。心筋ミトコンドリアの形態的変化は電子顕微鏡で評価した。また、Mitotracker Red 染色による心筋ミトコンドリア膜電位変化及び心筋組織ミトコンドリア分画中の傷害ミトコンドリアマーカー発現をウェスタンブロット法で評価した。心筋組織の酸化ストレス変化は、組織酸化ストレス検出試薬である dihydroethidium (DHE) 染色と、各組織抽出液中の酸化ストレス関連分子発現変化をウェスタンブロット法で評価した。また流血中の炎症性サイトカイン変化をサイトカインアレイを用いて評価した。

## 【結果】

### ① Ex-4 は、T2DM モデルマウスのインスリン抵抗性と心機能障害を改善する

Ex-4 投与は、両 T2DM モデルで、食事摂取量、体重、随時血糖に影響せずに、血漿インスリン濃度及び耐糖能異常を改善した。また Ex-4 群では心重量が低下しており、心筋組織のインスリン抵抗性は改善していた (Table 1. & Fig.2.A-F)。Ex-4 群の心筋では、GLP-1 受容体シグナルのセカンドメッセンジャーである cyclic AMP 濃度の上昇 (KK) 及び、cyclic AMP 依存性キナーゼ (PKA) 活性が上昇していた (Fig.2.G-I)。心臓超音波検査により評価した心機能では、Ex-4 は、両 T2DM で観察される左室壁厚の増大、左室拡張能低下を改善することが明らかとなった。左室収縮能に関しては、DIO では Ex-4 群で有意に改善したが、KK では Ex-4 の影響は認めなかった (Table 2.)。

### ② Ex-4 は、糖尿病性心筋リモデリングを改善する

病理組織解析を行い、Ex-4 は、T2DM で観察される心筋断面積増大及び心筋間質線維化増加を改善した (Fig.3.A-D)。

### ③ Ex-4 は、糖尿病性心筋ミトコンドリア傷害を改善する

電顕解析の結果、Ex-4 は、T2DM で観察される心筋ミトコンドリアの異常な配列、

形態を改善した (Fig.3.E-H)。Mitotracker Red 染色の結果、Ex-4 は、T2DM で観察されるミトコンドリア膜電位傷害を改善した (Fig.4.A-C)。またミトコンドリア傷害関連タンパクとして知られる Mnf1、PINK-1、PARKIN の発現レベルも、Ex-4 群で低下していた (Fig.4.D-G)。

#### ④ Ex-4 は、糖尿病性脂質代謝異常及び炎症性サイトカインレベルを改善する

Ex-4 は、T2DM において、血漿中の総コレステロール、中性脂肪濃度を低下した (Fig.5.A-B)。セラミド沈着で評価した T2DM における心臓組織への脂質集積は、Ex-4 により改善していた (Fig.5.C-F)。炎症性サイトカインアレイでの解析により、Ex-4 は、T2DM における流血中の ICAM-1 と macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)を低下することが明らかとなった (Fig.5.G-H)。

#### ⑤ Ex-4 は、糖尿病性心臓組織酸化ストレスを抑制する

Ex-4 は、心筋 DHE 染色を用いて評価した T2DM における心臓組織での酸化ストレスを低下した (Fig.5.A-B)。Ex-4 群の心筋組織液では、酸化ストレス分子の中で Nox4 発現の低下 (KK 及び DIO)及び、抗酸化ストレス分子である SOD-1、glutathione peroxidase、thioredoxin の発現増加 (DIO のみ)を認めた (Fig.6.C-D)。

### 【考察】

本研究により、Ex-4 による GLP-1 受容体活性化は、T2DM で観察されるインスリン抵抗性増加、脂質代謝異常、酸化ストレス、炎症反応を改善し、心筋組織傷害、心機能を改善することを明らかにした。その具体的な作用メカニズムとして、Ex-4 は、循環血液中の炎症性サイトカイン (ICAM-1、M-CSF)レベルを低下する間接的な抗炎症作用及び、心筋組織への直接的な作用として cardiac steatosis から生じる脂肪毒性の改善効果が挙げられる (Fig.7.)。これは、過去の論文報告にもあるように、脂肪毒性が炎症及び酸化ストレスを亢進するという知見、心筋インスリン抵抗性の増加が酸化ストレス亢進とミトコンドリア障害を促進するという知見、Ex-4 が抗炎症作用及び脂肪肝改善作用を有するという知見<sup>(2,3,4)</sup>とも合致する所見である。しかしながら、今後、本研究での成果を各標的分子の遺伝子改変を用いた介入実験による検証が必要であると考えられた。

### 【結論】

T2DM において認められる心臓リモデリングと心機能障害は、GLP-1 受容体活性化によって、心筋中の脂質の異常な蓄積と、それによって生じる炎症/酸化ストレスを正常化させることによって改善されることが示唆された。