

# 心不全における骨格筋酸化ストレスは インスリンシグナルを障害しインスリン抵抗性を引き起こす

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 糖尿病・インスリン抵抗性が心不全の発症・進展に密接に関与することはよく知られている。一方心不全自体がインスリン抵抗性を惹起し、そのインスリン抵抗性が心不全の病態の進展・増悪に深く関わっていることも報告されている。しかしながら、臨床研究では心不全自身がインスリン抵抗性を惹起しうるか、またそのメカニズムは何かを解明するのは困難である。

いくつかの基礎研究は心不全自体がインスリン抵抗性を引き起こし、心不全のさらなる進展に関わっていることを報告している。しかしながら、心不全においてインスリン抵抗性が惹起される機序は明らかではない。

心不全においては心筋局所でレニン-アンジオテンシン(RA)系や酸化ストレスなど神経体液性因子が活性化され、心筋リモデリングの形成・進展を引き起こし心不全の病態形成に密接に関与することはよく知られている。しかしながら今まで心不全で認められるインスリン抵抗性における骨格筋酸化ストレスの役割は検討されておらず不明である。

本研究の目的は梗塞後心不全モデルマウスを用いて、1)インスリン抵抗性が出現するか、2) 骨格筋のインスリンシグナルは障害されるか、3) 骨格筋においてROS産生が増加し、その抑制によってインスリン抵抗性が改善するかどうかを明らかにすることであった。

【材料と方法】 雄8~12週齢C57BL/6Jマウス(体重24~27g)の左冠動脈を結紮し心筋梗塞(MI)を作成した。手術を行ったマウスを2群に分けNAD(P)H oxidase活性の阻害薬であるアポサイニン溶液(10mmol/l)もしくは水を給水ボトルで投与し、4週間飼育した。一方、対照として冠動脈を結紮しない偽手術(Sham)マウスを作成した。実験は以上の3群(Sham群(n=14)、MI群(n=14)、MI+Apo群(n=14))で行った。

手術後4週間飼育したマウスを用いて糖負荷試験とインスリン負荷試験、心エコー、および血行力学的測定を行った。屠殺前に下大静脈より採血を行い各種血液生化学検査を行い、インスリンシグナル蛋白の評価のためそれぞれインスリン0.25IU/kgあるいは生理食塩水を下大静脈より投与したマウスの骨格筋を採取した。骨格筋組織より抽出した等量の蛋白を用いて、免疫沈降と免疫ブロットを行い定量し評価した。骨格筋組織における脂質過酸化物の形成をTBARSの生化学的分析によって測定し、化学発光法を用いてNAD(P)H oxidase活性を計算した。

【結果】 心筋梗塞マウスは左室の拡大と収縮障害を呈し、左室拡張末期径および肺体重比の上昇が認められた。心筋横断面積および間質線維化も増加したがアポサイニン投与はこれらの指標には影響を与えなかった。空腹時血糖は各群間に有意な差は生じなかったが、インスリン濃度の上昇がMI群で認められた。また糖負荷後の血糖値、血糖変化のいずれ

も MI 群で有意な差は認められなかったが、インスリン投与後の血糖降下反応が MI 群で抑制され、アポサイニン投与で有意に改善した。さらにインスリン刺激骨格筋において Akt のセリンリン酸化の障害と GLUT4 の細胞膜への移行率の低下が MI マウスで認められた。また骨格筋局所における酸化ストレスの増加も認められ、NAD(P)H oxidase 活性の阻害薬であるアポサイニン投与で左室機能およびリモデリングを改善することなく障害されたインスリンシグナル蛋白を改善した。

【考察】 今回の研究の最も重要な所見は、梗塞後心不全モデルマウスにおいて、インスリン抵抗性を認め、これは骨格筋におけるインスリンシグナルの障害、特に Akt セリンリン酸化と GLUT4 の細胞膜への移行の低下を伴った。臨床研究で、慢性心不全患者でインスリン抵抗性が生じることが報告されているが、合併する因子および遺伝的素因の影響を完全に除外することはできないため心不全とインスリン抵抗性の因果関係を明確にすることはできない。しかし、今回の心不全モデル動物の結果は、心不全自体が独立してインスリン抵抗性を引き起こすことを明確に示した。

今回の研究のもう一つの重要な点は、心不全モデルマウスのインスリン抵抗性および骨格筋インスリンシグナル障害に骨格筋における NAD(P)H oxidase 由来の酸化ストレス亢進が関わっていることを明らかにしたことである。アポサイニンを慢性投与した MI マウスの骨格筋で TBARS 形成および NAD(P)H oxidase 活性が完全に抑制され、インスリン負荷後の減弱した血糖低下反応およびインスリンシグナル障害が改善した。アポサイニン自体にインスリンの反応性を亢進させる効果はなく、NAD(P)H oxidase 活性を抑制する効果を介して、インスリン抵抗性を改善したと考えられる。これまで、心不全における骨格筋酸化ストレスおよび NAD(P)H oxidase 活性の役割は明らかでなかった。今回の研究ではじめて心不全モデルマウスの NAD(P)H oxidase 活性を介した骨格筋酸化ストレスがインスリンシグナルを障害し、インスリン抵抗性を導くことが示された。

心不全において惹起されるインスリン抵抗性は、さらに心不全を増悪させ悪循環を形成すると考えられる。実際に臨床研究において、インスリン抵抗性を含む糖代謝異常の存在によって、心不全が悪化する可能性が示唆されている。さらに基礎研究でも高血糖、糖尿病が心形態の変化および収縮・拡張機能を低下させることはよく知られているが、糖尿病のコントロールが心不全を改善させ得るかどうかについては十分には解明されていない。今回の研究では心筋梗塞後心不全マウスで出現したインスリン抵抗性をアポサイニンにより改善しても、心機能および心形態に変化はなかった。この結果は過去の報告とは合致しない。その理由は不明であるが、動物モデルや治療薬剤の違いなどが関与している可能性がある。さらに梗塞後心不全によって発症したインスリン抵抗性の改善が心機能を改善するには、より長期間を要する可能性もあり、さらなる検討が必要である。さらに NAD(P)H oxidase 由来の酸化ストレス亢進がインスリンシグナルを障害する機序は不明であり、今後の更なる研究が必要である。

【結論】 心筋梗塞後心不全モデルマウスでインスリン抵抗性が出現し、骨格筋におけるインスリンシグナル障害が起こっていること、さらに骨格筋における NAD(P)H oxidase 由来の酸化ストレス亢進がこれらの現象に関わっていることが明らかとなった。骨格筋酸化ストレスの制御は心不全におけるインスリン抵抗性の改善、さらにその結果として心不全の予後を改善する有効な治療法となり得ると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 松 居 喜 郎

副 査 教 授 小 池 隆 夫

## 学 位 論 文 題 名

### 心不全における骨格筋酸化ストレスは インスリンシグナルを障害しインスリン抵抗性を引き起こす

糖尿病・インスリン抵抗性が心不全の発症・進展に密接に関与することはよく知られている。一方心不全自体がインスリン抵抗性を惹起し、そのインスリン抵抗性が心不全の病態の進展・増悪に深く関わっていることも報告されている。しかしながら、心不全においてインスリン抵抗性が惹起される機序は明らかではない。

心不全においては心筋局所でレニン-アンジオテンシン系や酸化ストレスなど神経体液性因子が活性化され、心筋リモデリングの形成・進展を引き起こし心不全の病態形成に密接に関与することはよく知られている。しかしながら今まで心不全で認められるインスリン抵抗性における骨格筋酸化ストレスの役割は検討されておらず不明である。

本研究の目的は梗塞後心不全モデルマウスを用いてインスリン抵抗性の出現、骨格筋のインスリンシグナル障害、骨格筋において活性酸素種の産生が増加しその抑制によってインスリン抵抗性が改善するかどうかを評価することであった。

雄 8～12 週齢 C57BL/6J マウス（体重 24～27g）の左冠動脈を結紮し心筋梗塞（MI）を作成した。手術を行ったマウスを 2 群に分け NAD(P)H oxidase 活性の阻害薬であるアポサイニン溶液（10mmol/l）もしくは水を給水ボトルで投与し、4 週間飼育した。一方、対照として冠動脈を結紮しない偽手術マウスを作成した。実験は以上の 3 群で行った。

手術後 4 週間飼育したマウスを用いて糖負荷試験とインスリン負荷試験、血液生化学検査、心エコー、および血行力学的測定を行った。骨格筋インスリンシグナル蛋白の評価のため免疫沈降と免疫ブロットを行い定量し評価した。骨格筋組織における脂質過酸化物の形成を TBARS の生化学的分析によって測定し、化学発光法を用いて NAD(P)H oxidase 活性を計算した。

心筋梗塞マウスで心不全の出現が認められたがアポサイニン投与はこれを変化させなかった。空腹時血糖は各群間に有意な差は生じなかったが、インスリン濃度の上昇が MI 群で認められた。また糖負荷後の血糖値、血糖変化のいずれも MI 群で有意な差は認められなかったが、インスリン投与後の血糖降下反応が MI 群で抑制され、アポサイニン投与で有意に改善した。さらにインスリン刺激骨格筋において Akt のセリンリン酸化の障害と GLUT4 の細胞膜への移行率の低下が

MI マウスで認められた。また骨格筋局所における酸化ストレスの増加も認められ、NAD(P)H oxidase 活性の阻害薬であるアポサイニン投与で左室機能およびリモデリングを改善することなく障害されたインスリンシグナル蛋白を改善した。

以上の結果より梗塞後心不全モデルマウスにおいてインスリン抵抗性を認め、骨格筋におけるインスリンシグナルの障害を伴った。これによって心不全自体が独立してインスリン抵抗性を引き起こすことを明確に示した。

また今回初めて心不全モデルマウスの NAD(P)H oxidase 活性を介した骨格筋酸化ストレスがインスリンシグナルを障害し、インスリン抵抗性を導くことが示された。

心不全において惹起されるインスリン抵抗性は、さらに心不全を増悪させ悪循環を形成すると考えられる。骨格筋酸化ストレスの制御は心不全におけるインスリン抵抗性の改善を介して心不全の予後を改善する有効な治療法となり得る可能性があると考えられた。

口頭発表に際し、松居教授から実験モデルにおいて炎症の関与、結果と結論に解離があるのではないかと質問があった。次いで小池教授から他のモデルでの報告またインスリン抵抗性と心血管系に着目した研究の有無、臨床への応用に関しての質問がなされた。最後に主査より MI モデルの心臓で起こった変化について確認の質問があり、他のインスリン抵抗性のモデルで心機能がどうなっているかおよび他のインスリン感受性臓器についてはどうなっているかについての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果及び文献的知識により、適切な回答を行った。

この論文は、心不全で出現するインスリン抵抗性は NAD(P)H oxidase 活性を介した骨格筋酸化ストレスがインスリンシグナルを障害することによって起こることを示し、心不全の予後を改善する治療に繋がるものとして高く評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。