

学 位 論 文 題 名

Studies on the Role of Prorenin-(Pro)renin Receptor System on Insulin Resistance and Insulin Signaling in the Skeletal Muscle from Experimental Heart Failure after Myocardial Infarction

（心筋梗塞後心不全のインスリン抵抗性および骨格筋インスリンシグナルにおけるプロレニン-（プロ）レニン受容体の役割に関する基礎的研究）

学位論文内容の要旨

【背景と目的】糖尿病・インスリン抵抗性は主要な生活習慣病の一つであるとともに、心不全の発症・進展に密接に関与することが知られている。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。インスリン抵抗性の病態の一部には、レニン・アンジオテンシン系（RAS）や酸化ストレスなどの神経体液性因子の活性亢進が関与すると考えられる。RASには血圧と体液量の恒常性を担う古典的な全身性RASと、主として末梢組織で機能する組織RASに大別される。近年、レニンやその非活性前駆体であるプロレニンと結合して酵素活性を発揮させる（プロ）レニン受容体（P)RR）が組織RASの調節因子として同定され、高血圧、糖尿病、心血管疾患の病態に重要な役割を果たしている可能性が報告された。梗塞後心不全のインスリン抵抗性においてもプロレニン-(P)RRが関与している可能性があるが、これまでに報告はない。本研究ではプロレニンと(P)RRとの結合を選択的に阻害するデコイペプチド（Handle region peptide, HRP）を使用した。また、直接的レニン阻害薬であるAliskirenはレニンへの強力な阻害作用だけでなく、(P)RRと結合し活性化したプロレニンにも同様に阻害作用を発揮するため、本研究に用いた。

【材料と方法】雄9-10週齢C57BL/6Jマウス（体重20-21 g）の左冠動脈を結紮した心筋梗塞（MI）作製術、もしくは偽手術（Sham）を行い、術翌日より浸透圧ポンプを用いてAliskiren（10 mg/kg/日）、もしくはHRP（0.1 mg/kg/日）を4週間持続投与した。実験は以下の4セクションに分けて行った。1) Sham群（n=10）、Sham+Aliskiren群（n=10）、MI群（n=11）、MI+Aliskiren群（n=11）の4群で糖負荷、インスリン負荷試験によるインスリン抵抗性の評価、心エコー、およびカテーテルによる血行動態測定、各種組織重量測定、心筋の組織学的解析を行った。骨格筋におけるインスリンシグナルを免疫プロットで定量し、酸化ストレス（NAD(P)H oxidase活性、スーパーオキシド産生（ O_2^- ））を化学発光法で評価した。2) Sham群、Sham+HRP群、MI群、MI+HRP群（各群n=10）の4群で、1)と同様の項目を評価した。3) Sham群、MI群、MI+Aliskiren群、MI+HRP群（各群n=10）の4群で、循環RASの各要素を血液のELISA法で定量し、骨格筋組織における局所のRASおよび(P)RRの発現をRT-PCR法、免疫プロット法で評価した。4) 培養骨格筋細胞にプロレニン（0-1000 U/L）を24時間暴露し、HRP（1.0 μ mol/L）の添加の有無でインスリンシグナルおよび酸化ストレスをそれぞれ免疫プロット法、化学発光法にて評価した。

【結果】心筋梗塞マウスは左室拡大と収縮障害を呈し、左室拡張末期圧、肺体重比、心筋横断面積、および間質線維化が増加したが、Aliskiren および HRP いずれの投与もこれらの指標に影響しなかった。空腹時血糖は各群間で有意な差はなかったが、空腹時インスリン値および HOMA index が MI 群で上昇し、Aliskiren, HRP の投与でそれぞれ低下した。またインスリン負荷試験において、インスリン投与後の血糖降下反応が MI 群で抑制され ($63 \pm 7\%$, $P < 0.05$), Aliskiren, HRP の投与で改善した ($105 \pm 9\%$, $99 \pm 7\%$, $P < 0.05$)。骨格筋における Akt セリンリン酸化は MI 群で低下し (57% , $P < 0.05$), Aliskiren, HRP の投与で改善した (86% , 94% , $P < 0.05$)。GLUT4 の細胞膜移行率は MI 群で低下し (69% , $P < 0.05$), Aliskiren, HRP の投与で改善した (93% , 102% , $P < 0.05$)。骨格筋の O_2 産生, NAD(P)H oxidase 活性は MI 群で上昇し, Aliskiren, HRP の投与で抑制された。MI 群では血漿レニン活性, 血漿総レニン-プロレニン濃度, 血漿アンジオテンシン II (Ang II) 濃度が有意に高値で, MI+Aliskiren 群では血漿レニン活性, Ang II 濃度が有意に低下したが, MI+HRP 群では変化がなかった。骨格筋局所における古典的 RAS の遺伝子発現は各群間で変化はなかったが, MI 群の骨格筋では (P)RR の蛋白発現が有意に増加した。一方, Aliskiren, HRP ともにこの発現に影響しなかった。骨格筋の Ang II 濃度は MI 群で増加し, MI+Aliskiren 群, MI+HRP 群で有意に低下した。さらに培養骨格筋細胞へのプロレニンの暴露によって, 濃度依存性に培養細胞の Akt セリンリン酸化が障害され, NAD(P)H oxidase 活性が上昇したが, HRP の添加によりいずれも有意に抑制された。

【考察】本研究では Aliskiren, HRP の慢性投与は梗塞後心筋リモデリングには影響せず, 梗塞後心不全で認めたインスリン抵抗性, および骨格筋におけるインスリンシグナル障害を改善することが示され, その効果は骨格筋での NAD(P)H oxidase 由来の O_2 産生の抑制を介して, Akt のセリンリン酸化, GLUT4 の細胞膜移行を正常化することを伴っていた。さらに, 梗塞後心不全マウスの骨格筋において (P)RR の発現が亢進しており, それが骨格筋局所の Ang II の増加を引き起こし, 結果として組織での NAD(P)H oxidase の活性化, O_2 産生を引き起こした。一方で, 骨格筋局所における古典的 RAS には変化がなく, 本病態における組織 RAS 活性化は (P)RR を介した機序であると考えられた。また, RAS の律速酵素であるレニンを直接阻害することで循環および組織 RAS の双方を抑制し得る Aliskiren と, プロレニン-(P)RR を介した組織 RAS のみを選択的に抑制し得る HRP で, 同様のインスリン抵抗性改善効果を認めたことから, 本病態の改善効果はプロレニン-(P)RR を介した組織 RAS の抑制の方が, 全身 RAS の抑制よりも重要であることが示唆された。さらに培養骨格筋細胞を用いた実験は, プロレニン-(P)RR が直接, 骨格筋の NAD(P)H oxidase を介した Akt セリンリン酸化障害を起こし得ることを示唆した。

【結論】直接的レニン阻害薬, Aliskiren および (P)RR 阻害薬, HRP は骨格筋における NAD(P)H oxidase 由来の O_2 産生抑制を介して, インスリンシグナルを改善させることで, 心不全に関連した全身のインスリン抵抗性を改善させた。さらに骨格筋における (P)RR の発現亢進がインスリン抵抗性の病態に関与していることを初めて示した。したがって, プロレニン-(P)RR は心不全に関連したインスリン抵抗性の進展を予防する新規の治療標的になり得ることが考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	丸藤	哲
副査	教授	筒井	裕之
副査	教授	畠山	鎮次
副査	教授	森本	裕二

学位論文題名

Studies on the Role of Prorenin-(Pro)renin Receptor System on Insulin Resistance and Insulin Signaling in the Skeletal Muscle from Experimental Heart Failure after Myocardial Infarction
(心筋梗塞後心不全のインスリン抵抗性および骨格筋インスリンシグナルにおけるプロレニン- (プロ) レニン受容体の役割に関する基礎的研究)

インスリン抵抗性は心不全の病態の進展・増悪に深く関与する。インスリン抵抗性の病態の一部には、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) が関与する。本研究では組織 RAS の調節因子である (プロ) レニン受容体 (P)RR に着目し、梗塞後心不全のインスリン抵抗性における役割を検討した。申請者は、①直接的レニン阻害薬、Aliskiren および (P)RR 拮抗薬、HRP は梗塞後心不全の心筋リモデリングに影響せずにインスリン抵抗性を改善し、それは障害された骨格筋インスリンシグナル (Akt, GLUT-4) の改善し、NAD(P)H oxidase 由来のスーパーオキシドの抑制を伴うこと、②梗塞後心不全の骨格筋では (P)RR の発現が亢進し、骨格筋組織のアンジオテンシン II (Ang II) の増加を引き起こすこと、③Aliskiren は全身性、古典的 RAS を抑制するが、HRP は全身もしくは骨格筋局所の古典的 RAS には影響せずに、(P)RR を介した骨格筋組織の Ang II を抑制すること、④培養骨格筋細胞ではプロレニン濃度依存性に NAD(P)H oxidase 活性が上昇し、Akt のセリンリン酸化が障害され、HRP の添加で改善すること。

以上より本研究によって梗塞後心不全のインスリン抵抗性において骨格筋 (P)RR を介した組織 RAS の活性化が重要であることが明らかとなり、(P)RR が心不全における新たな治療標的となり得ることが示唆された。

以上の研究内容について、主査および副査の教授より、1) 心不全の原因疾患や発症時期

によりインスリン抵抗性の分子機序が異なる可能性について、2) インスリンシグナルの上流ではなく、下流である Akt のレベルで障害される理由について、3) 他のインスリン感受性臓器、あるいはインスリン分泌臓器の関与について、4) 梗塞後心不全モデルマウスの validity について、5) 本病態における(P)RR を介した組織 RAS と全身 RAS との関与の割合について、6) 培養骨格筋細胞を用いた実験においてプロレニン刺激と NAD(P)H oxidase 活性の上昇、Akt のセリンリン酸化障害との関連性と、in vivo の結果との整合性について、7) Ang II 非依存性細胞内伝達経路について、8) 血圧を下げない低用量の Aliskiren を選択した根拠について、9) (P)RR の制御メカニズムを解明するための今後の研究展開について質問を受けた。

申請者はそれぞれの質問に対して、1) 心不全の原因疾患による違いは臨床研究では明らかにすることは困難であり、今後基礎研究で異なる心不全モデルを用いて明らかにする必要があること、2) 今回の検討より早期に解析した場合、Akt より上流の IR- β 、IRS-1 の障害を捉えることが可能かもしれないこと、3) 他のインスリン分泌臓器、感受性臓器の関与については不明であり、今回のモデルでの検討が必要であること、4) マウスを用いての梗塞後心不全モデルは既に過去の研究で確立されていること、5) 本病態では全身、組織いずれの RAS も活性化しているため、その関与の割合については評価が困難であること、6) 本来であれば(P)RR を過剰発現した培養骨格筋細胞を用いた実験が in vivo を模擬することになるが、それが困難であった。今回はプロレニンを直接暴露することで培養上清中の Ang I が増加し、それ以降のシグナルは in vivo と同様の結果を確認できたこと、8) 一般的に慢性心不全患者は既に十分量の β 遮断薬や ACE 阻害薬が導入されており、血圧はむしろ低値であることも多く、血圧に影響しない低用量での有効性も臨床的意義があること、9) (P)RR は単にプロレニンと結合しレニンと同様の酵素活性をもたせる組織 RAS の調節因子としてだけでなく、細胞内酸性環境を維持する V-ATPase のアクセサリ蛋白としての機能や Wnt- β カテニンの制御など、オートファジーや神経細胞の発達に必須の機能を有することから、その制御メカニズムはより複雑なものと考えられ、(P)RR の遺伝子操作を含めたより詳細な検討が必要と考えられた。

以上のように申請者はいずれの質問に対しても、自己の実験データや文献的考察に基づいて概ね適切な回答をなし得た。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。