

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 福島 新

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)

【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 (O₂⁻)) 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 μmol/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。