
研究助成業績報告集

第30回（2022年度）バイエル循環器病研究助成
『糖尿病と循環器疾患』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	エネルギー代謝障害に着目した糖尿病性心腎連関の新規病態解明 および新規治療法探索	小豆島 健護	1
2	糖尿病性心筋症における心筋変性機構の解明	寺本 了太	4
3	糖尿病合併 HFpEF での O-結合型グリコシル化に着目した HFpEF 治療の新展開	天満 太郎	9
4	脂肪由来アディポネクチンと肝由来 XOR の糖尿病・代謝性 血管障害における意義の解明	藤島 裕也	12

エネルギー代謝障害に着目した糖尿病性心腎連関の新規病態解明および新規治療法探索

—糖尿病性心腎連関におけるエネルギー代謝障害の意義—

横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学 助教
小豆島 健護

I. 緒言

糖尿病患者は世界で4億2千万人に達し、増加の一途を辿っている。糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease; DKD) は重大な糖尿病合併症であり、末期腎不全および透析導入の原疾患として最も多いが、その過程で心血管疾患 (Cardio-Vascular Disease; CVD) を高頻度に合併することから、病態の背景に心腎連関 (Cardio-Renal Syndrome; CRS) が大きく関わっていると考えられている。現在、糖尿病治療において血圧・糖代謝・脂質代謝などへの包括的介入が積極的に行われるようになってきているが、糖尿病患者における腎障害進行およびCVD発症のリスクは依然として極めて高く、それに対する効率的なリスク低減治療も困難な状況にある。その原因として、糖尿病におけるCRSの病態生理はいまだに未解明の部分が多く、その発症・進展を抑制する治療法も極めて限られている現状が挙げられる¹。

近年、心臓・腎臓におけるエネルギー代謝障害、特に脂肪酸酸化 (Fatty Acid Oxidation; FAO) 障害が、慢性心不全 (Chronic Heart Failure; CHF) および慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) の発症・進展を促進させることが明らかになってきた^{2,3}。心臓・腎臓は人体でも第一・第二にエネルギー消費が活発な臓器であり、どちらの臓器でも主に脂肪酸をエネルギー源としてその生理的機能 (心収縮や体液・電解質バランスの調整など) を果たしていることから⁴、生理学的観点からもCHF・CKDの発症・進展におけるFAO障害は注目されている。しかしながら、これまで糖尿病性CRSにおけるエネルギー代謝の意義を検討した報告は非常に少ない。

II. 対象・方法

これまでの糖尿病モデルマウスは、腎機能低下を認

めず、DKDの早期特徴しか再現できなかったため⁵、適切な糖尿病性CRSモデルが存在しない状況であった。申請者は、レニン-アンジオテンシン系 (RAS) および遺伝背景に着目することによって、糖尿病性CRSモデルマウスの開発に成功した⁶。C57BL/6を遺伝背景とする1型糖尿病モデルAkitaマウスのRASを活性化 (肝特異的Renin高発現) するだけでは糖尿病性CRS病態を再現できなかったが (C57BL/6-Akita-ReninTGマウス; B6AR (非CRSモデル), 図1), 同マウスの遺伝背景を129/Svへ操作することにより劇的なアルブミン尿の増加と腎組織像増悪および顕著な心肥大を認めた (129/Sv-Akita-ReninTGマウス; 129AR (CRSモデル), 図1)。

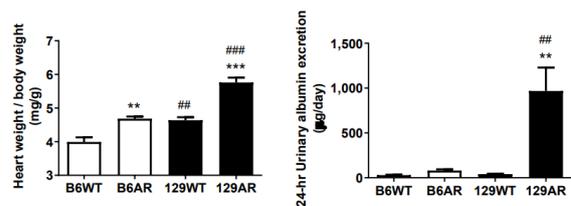


図1 左: C57BL/6-Akita-ReninTGマウス (B6AR, 非CRSモデル) と比較し, 129-Akita-ReninTGマウス (129AR, CRSモデル) では心肥大が増悪する。右: B6AR (非CRSモデル) と比較し, 129AR (CRSモデル) ではアルブミン尿が著増する。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT within the same strain, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs B6 within the same genotype. $n = 5-10$. WT, wild type.

本研究では、上記のモデルマウスを用いて、①糖尿病性CRSにおけるエネルギー代謝変化の検討、および②エネルギー代謝に着目した糖尿病性CRSに対する治療法の探索を行った。

①糖尿病性 CRS 進展におけるエネルギー代謝変化の検討

CRS および非 CRS モデルマウス (129AR および B6AR), そして各々の野生型対照マウス (C57BL/6 (B6WT) および 129/Sv マウス (129WT)) を 24 週齢の時点で解剖し, 血液におけるエネルギー代謝を FAO 障害に着目してメタボローム解析により評価した。

②エネルギー代謝に着目した糖尿病性 CRS に対する治療法の探索

12 週齢の CRS モデルマウス (129AR) およびその野生型対照マウス (129WT) に対して, ARB (ロサルタン 10 mg/kg/day) を 12 週間投与し, 代謝ケージを用いて 24 時間尿中アルブミン排泄量 (Urinary Albumin Excretion; UAE) を測定した後に解剖し, 血液におけるエネルギー代謝を FAO 障害に着目して評価した。

III. 結果

①糖尿病性 CRS 進展におけるエネルギー代謝変化の検討

糖尿病性 CRS モデルマウス (129AR) では, 血液中の偶数鎖アシルカルニチン (FAO 機能の指標) が野生型対照マウス (129WT) と比較して著明に増加している一方で, 非糖尿病性 CRS モデルマウス (B6AR) ではこの変化が認められなかった (図 2)。これらの結果は, 糖尿病性 CRS において FAO 障害が背景に存在していることを示唆している。

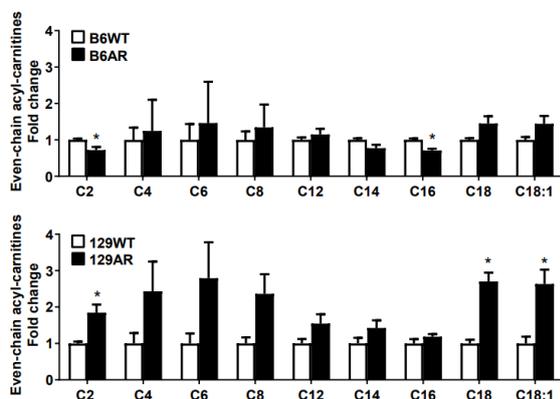


図 2 上: C57BL/6-Akita-ReninTG マウス (B6AR, 非 CRS モデル) では, C57BL/6 マウス (B6WT, 野生型対象マウス) と比較して血液中の偶数鎖アシルカルニチンの増加を認めない。下: 129-

Akita-ReninTG マウス (129AR, CRS モデル) では, 129/Sv マウス (129WT, 野生型対照マウス) と比較して血液中の偶数鎖アシルカルニチンが増加している。* $P < 0.05$ vs WT within the same strain. WT. n = 5-10.

②エネルギー代謝に着目した糖尿病性 CRS に対する治療法の探索

12 週間の ARB 投与により, 糖尿病性 CRS モデルマウス (129AR) における UAE 増加と心肥大は著明に抑制された (図 3)。

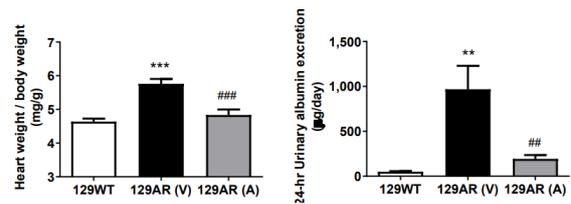


図 3 左: ARB は 129-Akita-ReninTG マウス (129AR, CRS モデル) における心肥大を改善する。右: ARB は 129AR (CRS モデル) におけるアルブミン尿増加を抑制する。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs WT, # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 129AR treated with vehicle. n = 6-10. WT, wild type; (V), vehicle; (A), ARB.

また, 血液中の偶数鎖アシルカルニチン (FAO 機能の指標) の増加も ARB により抑制傾向にあった (図 4)。

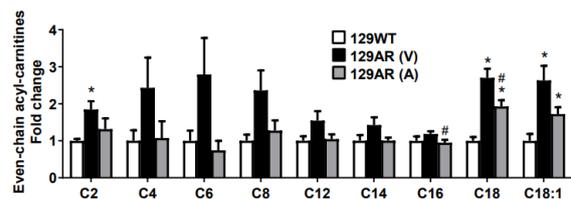


図 4 ARB は 129-Akita-ReninTG マウス (129AR, CRS モデル) における血液中の偶数鎖アシルカルニチン増加を抑制する傾向がある。* $P < 0.05$ vs WT, # $P < 0.05$ vs 129AR treated with vehicle. n = 6-10. WT, wild type; (V), vehicle; (A), ARB.

IV. 考察

糖尿病性 CRS モデルマウスでは, ミトコンドリアにおける FAO 機能を反映している可能性がある, 血液中の偶数鎖アシルカルニチンの幅広い増加が見られた。特筆すべきは, これらの変化は 129/Sv バックグラウンドの CRS モデルでのみ認め, C57BL/6 バックグラウンドの非 CRS モデルでは認められなかつ

た。また、ARBの投与により、糖尿病性CRSモデルマウスにおけるUAE増加と心肥大は著明に抑制されるだけでなく、血液中の偶数鎖アシルカルニチン増加も抑制傾向にあった。本研究結果は、FAO機能障害が糖尿病におけるCRSの進展に関連していることを示唆している。

V. 結論

エネルギー代謝、特にFAOへの介入は、糖尿病におけるCRSに対する新しい治療候補となり得るため、今後さらなる研究が必要である。

VI. 研究協力者

涌井 広道・横浜市立大学医学部・准教授

山地 孝拡・Duke-NUS Medical School・研究員

Thomas Coffman・Duke-NUS Medical School・教授

VII. 参考文献

- 1) Zannad F, Rossignol P. Cardiorenal Syndrome Revisited. *Circulation* 2018; 138: 929-944.
- 2) Kang HM, Ahn SH, Choi P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 2015; 21: 37-46.
- 3) Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, et al. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ Res* 2021; 128: 1487-1513.
- 4) Gewin LS. Sugar or Fat? Renal Tubular Metabolism Reviewed in Health and Disease. *Nutrients* 2021; 13: 1580.
- 5) Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14: 48-56.
- 6) Gurley SB, Ghosh S, Johnson SA, et al. Inflammation and Immunity Pathways Regulate Genetic Susceptibility to Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2018; 67: 2096-2106.

糖尿病性心筋症における心筋変性機構の解明

国立研究開発法人理化学研究所・基礎科学特別研究員
寺本了太

I. 緒言

糖尿病と心不全は互いに増悪因子となり、心血管死亡率を高めることは古くから知られてきた。中でも 1970 年代に提唱された明らかな冠動脈疾患を有しない糖尿病合併心機能低下例である“糖尿病性心筋症”は特に予後が悪く、心不全罹患者の爆発的増加や予備群を含めた糖尿病人口の増加と相まって喫緊の解決課題となっている。

糖尿病性心筋症における心機能低下の病理学的本態は心筋の線維化とされるが、カルシウムイオン (Ca^{2+}) を始めとする心筋収縮サイクルに関わる分子シグナル恒常性の破綻、さらに心筋に豊富に存在するミトコンドリアの代謝異常が深く関わるとされ、その分子病態は多層的である¹。糖尿病が引き起こす高血糖・糖代謝ホルモン異常・インスリン抵抗性とその相互作用の中で様々な二次的な病態を引き起こし、心臓リモデリングおよび心収縮・拡張障害を主体とした心機能低下に帰結すると考えられる。その鍵となる病態として、**分子シグナリング異常**、**酸化ストレス**、**ミトコンドリア障害**などが推測されている (図 1)。

近年、グルコースを起点としたアミノカルボニル反応の生成物である **advanced glycation end products (AGEs)**、**終末糖化産物**が、活性酸素の生成を通じて老化、糖尿病、アルツハイマー病等の疾病の進行に関与することが示唆されている。アミノカルボニル反応とは食品における褐色物質を生成する非酵素的反応であり、特に焼く・揚げるなど高温で調理する際により AGEs は多く生成される。AGEs は血管内皮細胞の分子経路に作用し、細胞外基質を増大させ、血管の剛性を高めていることが明らかにされており²、高血糖を起点として、AGEs とその受容体 (RAGE) の活性化が心筋組織内におけるシグナル異常および心筋細胞内の Ca^{2+} イオン恒常性を破綻させていることが考えられる。

しかしながら、AGEs を含む糖尿病関連病態がど

のような分子病態を経て心血管合併症を引き起こすのかは未解明の部分が多く、病態特異的な治療法は存在しない。



図 1 糖尿病性心筋症の概念

これを解明するため本研究課題では、**光学マッピング法**を用いた**空間的心臓電気生理学的解析**および**心臓トランスクリプトーム解析**を展開する。糖尿病は心房細動における血栓塞栓症の明らかなリスク因子であることから、高血糖・糖代謝ホルモン異常・インスリン抵抗性の相互作用の結果生じる組織レベルでの変化が心臓内の部位特異的に生じている可能性が高い。光学マッピング技術は分子特異的に結合する蛍光プローブを用いて、組織の活動電位および Ca^{2+} 動態を可視化し、空間的に精緻な解析を行うことが可能なツールである。

心筋線維化を惹起するメカニズムとしてサイトカイン産生異常、電子伝達系制御異常による酸化ストレス増加などが想定されるため、免疫系細胞を包括した心筋における多様な転写プロファイルの解明を心筋 RNA シーケンスを用いて行う。

II. 対象・方法

① 糖尿病モデルゼブラフィッシュの作成

モデル生物としてのゼブラフィッシュの特徴は短い世代交代期間 (約 3 ヶ月) と多産 (100~200 受精卵回) にあり、比較的短期間に多数のデータが得

ることが可能である。食欲旺盛であるため過剰給餌により肥満・高血糖を呈する2型糖尿病モデルが約6週間で比較的容易に作製可能である³⁾。

生後3ヶ月齢のRW (RIKEN wild-type) 系統の個体を使用し、給餌する粉末人工飼料はひかりラボ450 (キョーリン社) [粗タンパク質: 45%以上、粗脂肪: 11%以上、粗繊維: 3.0%以上、粗灰分: 14%以下、りん: 1.2%以上、水分: 10%以下、他: 15.8%] を用いた。2L水槽に10匹の密度とし、Control群へのエネルギー供給量として、1匹あたり68kcal/dayを1日2回に分けてを与え、Overfeeding群には1匹あたり408kcal/dayを1日6回に分けてを与え、6週間継続することで糖尿病モデルを作出した。

② ゼブラフィッシュ成魚における血糖測定

過食プロトコルにより作出したゼブラフィッシュ糖尿病モデルにおける空腹時血糖 (fasting blood glucose, mg/dL) を以下のプロトコルに則って測定し、モデルの妥当性を評価した⁴⁾。

- 1) 測定前日の給餌は午後5時までに実施する。
- 2) 測定当日、午前10時に給餌前のゼブラフィッシュ成魚を0.01% Tricaine 溶液に2分間浸し、麻酔を実施する。
- 3) 体表の水分を拭き取り、体重を測定する (mg)。体表的特徴から雌雄を記録する。
- 4) マイクロニードルおよび吸引チューブを用いて dorsal aorta を穿刺し採血する。
- 5) 血糖測定器 (ニプロスタットストリップ) で血糖を測定する。

③ 成魚心臓における光学マッピングを用いた心筋電気生理学的機能解析

光学マッピング技術を用いた生理学的機能解析法を用いて^{5,6)}、糖尿病モデル心臓における興奮伝導および活動電位の形態変化を空間的に把握することで糖尿病と心機能低下の関連を機能面で明らかにする。

A: イメージングシステム

高解像度 CMOS カメラシステムとして MiCAM05-N256 (ブレインビジョン社) を用い、空間解像度は毎秒 500-1000 フレームの撮影時で 256 x 256 画素とした。撮像開始前の任意の先行時間で LED 光源を点灯させ、撮像の終了と共に消灯させ光源の同期制御が可能な基盤プロセッサを搭載している。マクロ蛍光顕微鏡は、50mm 径の光学フ

ィルターと 50mm x 70mm のダイクロイックミラーを使用する 50mm 径の光路を基本にして設計されている。また、LED 光源から出力した光をストレートライトガイドを介して投光することが可能である。

B: 光学マッピング

1) 心臓摘出および光学マッピング実験を通じて使用する TBH solution を作成する。Tyrode buffer (NaCl 138mM, KCl 2.9mM, HEPES 10mM, MgCl₂ 1mM, NaH₂PO₄ 0.36mM, NaHCO₃ 12mM, Glucose 5mM, CaCl₂ 1mM, pH 7.4) 40mL に BSA (ウシ血清アルブミン) 0.4g を加えて溶解させる。また、手技中に発生する血栓は画像データ上、アーチファクトとなるため Heparin (1mg/40mL) を使用する。

2) 摘出した心臓を TBH solution 内で10分間拍動を維持する。これにより心腔内に残存した赤血球が拍出され、最終的な画像データの S/N 比向上に寄与すると考えられる。

3) 電位感受性蛍光プローブである FluoVolt™ Membrane Potential Kit (Invitrogen 社) を用い、摘出心臓の染色を行う。FluoVolt™膜電位色素は電位依存的な蛍光反応を起こす高速反応プローブであり、興奮細胞の一過性の電位変化がミリ秒単位の時間分解能で検出される。プローブは 100 mV あたり 25% を超えるシグナル変化により反応し、心臓組織の電気的活動のイメージング・刺激に応答した膜電位変化の測定が可能となる。同キットに含まれる PowerLoad™ (非イオン性の界面活性剤) を使用し、蛍光プローブの組織浸透性を高めることが重要である。次に、染色に用いる Voltage dye solution (TBH solution 245μL + FluoVolt™ 5μL + PowerLoad™ 50μL) を作成し、暗所にて同 solution をシャーレ内に 20μL 滴下し、摘出心臓を移して 45 分間染色する。

4) Blebbistatin による心筋収縮抑制を行う。染色後の心臓を Blebbistatin 溶液 (10μM) に移し、5分毎に心拍動の推移を顕微鏡で観察する。心収縮が十分に抑制され、かつ電気的興奮が維持された状態で LED 投光に同期して 500fps のフレーム速度で撮像する。

④ 心筋 bulk-RNA シーケンス解析

高血糖および血糖調整ホルモン異常による心筋線維化カスケードの分子基盤を捉えるため、同モデ

ルにおける心筋 bulk-RNA シーケンスを実施する。

ゼブラフィッシュ成魚における心臓摘出は冷却による麻酔下で行う。Tricaine 等の麻酔薬は心臓トランスクリプトームに影響を与える可能性があるため避ける。氷上に設置した水槽タンクに飼育水を入れ、0~4°Cに調整し、対象の魚を約 20 分間冷却し安楽死させる。その後、実体顕微鏡観察下で内臓の損傷を避けるよう注意を払いながらマイクロ剪刀にて腹部を切開する。表層にはメスであれば卵巣（オスの精巣はやや背部に陥入しているため目立たない）が腹腔に充満している場合が多く、これを先端が鈍なピンセットで丁寧に除去する。腸管に被さるように肝臓が観察されるため、出血させないように丁寧に剥離する。これにより腸管の頭側に心臓が観察されるため、心臓のさらに頭側に位置する動脈球を同定する。動脈球の遠位端で切除し、心臓を摘出する（図 2）。

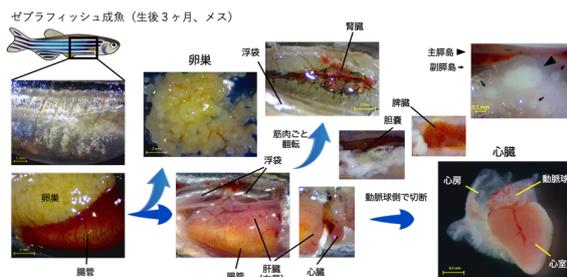


図 2 ゼブラフィッシュ成魚における心臓摘出

摘出した心臓は 1.5mL チューブを用いて TRIzol (Thermo Fisher Scientific 社) 100μL に漬け、ホモジェナイザーで破碎する。Total RNA 抽出キットのインストラクションに沿ってライブラリを作成し、Illumina HiSeq にて RNA シーケンスを実施する。

III. 結果

RW の掛け合わせから産まれた稚魚を通常の給餌方法にて 3 ヶ月齢まで育て、その後、Control 群および Overfeeding 群に分けて給餌を 6 週間行った。

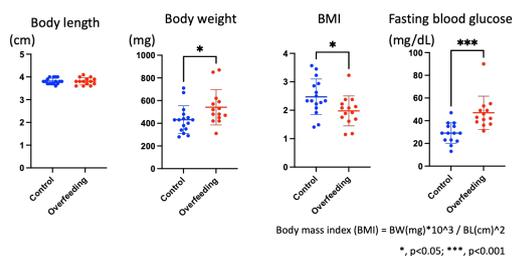


図 3 糖尿病モデルゼブラフィッシュにおける体格・血糖測定

プロトコール終了時の全長・体重・Body mass index (BMI)・空腹時血糖 (Fasting blood glucose) を測定した結果を図 3 に示す。全長に差は無く、Overfeeding 群で体重の増加と空腹時血糖の上昇を認めた。

光学マッピング法による心臓電気生理解析の結果を図 4 に示す。糖尿病モデルでは特に心房において興奮伝導速度の有意な低下が認められた (Control 54.72 mm/sec. vs DM model 25.92 mm/sec., $p < 0.0001$)。また、同部位の活動電位波形を詳細に解析したところ、心室では活動電位持続時間 (APD) が有意に延長していることが明らかとなった (Control 302.2 msec. vs DM model 367.9 msec., $p < 0.01$)。また、活動電位の立ち上がり速度を示す Vmax においては、糖尿病モデルの心房で有意に低下していた (Control 83.9. 1/sec.. vs DM model 57.4 1/sec., $p = 0.045$)。

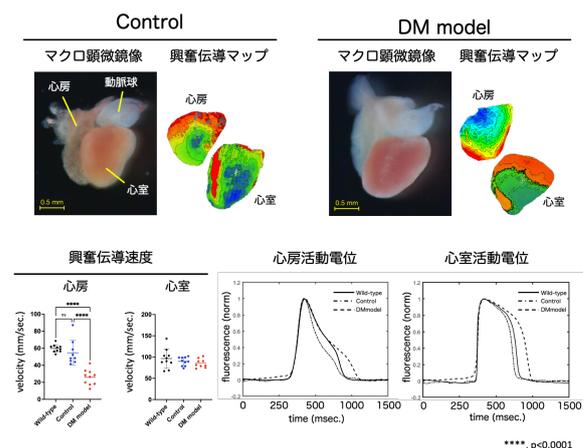
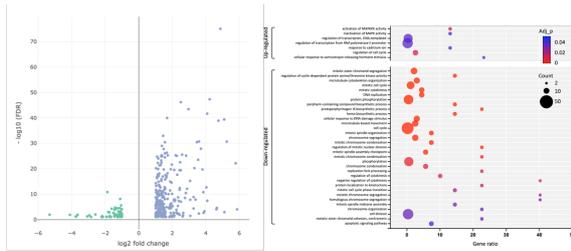


図 4 糖尿病モデル心筋における光学マッピング

次に、心筋 Bulk-RNA シーケンスの結果を図 5 に示す。糖尿病モデル心筋においてアップレギュレートされた遺伝子が 237 あり、ダウンレギュレートされた遺伝子が 87 であった。これらの発現量に差の見たれた遺伝子群について Gene ontology 解析を行ったところ、MAPK シグナリングパスウェイが有意に不活化されていた。さらに、KEGG パスウェイ解析においても MAPK および FoxO シグナリングパスウェイが負に制御されており、前者にクラスタリングされた遺伝子には nr4a1, dusp8a, gadd45bb といった MAPK 関連分子のみならず、fgf7, vegfaa といった線維化や血管新生に寄与するものが含まれていた。



Direction	adj.Pval	nGenes	Pathways	Genes
Down regulated	3.49357739296359E-06	20	MAPK signaling pathway	nr4a1 dusp8a ENSNDARG00000009299 gadd45bb mkkn2b mknk1 bdnf fit1 hsp70.3 gadd45ba hsp70.1 fosab fosaa hsp70l fgf7 ddit3 jund hsp70.2 dusp2 dusp1 ENSNDARG00000100515 vegfa ENSNDARG00000103542
Down regulated	6.07788181558015E-06	13	FoxO signaling pathway	sgk2b gadd45bb si:ch211- 195b13.1 ccng2 plk2b sgk1 gadd45ba foxg1b kif2b kif2a bcf6ab bcl6aa irs2b

図5 糖尿病モデル心におけるトランスクリプトーム解析

IV. 考察

本研究課題ではゼブラフィッシュ成魚を用いた過食プロトコールにより比較的簡便に体重増加・空腹時高血糖を示す2型糖尿病モデルを作出することに成功した(図3)。本モデルにおける高血糖を起因とした病態の把握には体格・血清生化学的プロファイルの比較のみでは不十分と考えられる。現在、図2に示す通り、各臓器の正確な摘出に成功しており、各臓器におけるプロテオーム解析を実施中である。

我々が行った成魚心臓における詳細な電気生理学的解析の結果、マクロでは糖尿病モデル心にサイズ等の差は見られないものの、電気生理学的特性には明らかな変化を認めた。すなわち、糖尿病モデルでは心房における興奮伝導性が有意に低下しており、同部位の変性が進んでいることが示唆された(図4)。さらに心筋では興奮伝導速度に変化はみられなかったものの、活動電位持続時間が糖尿病モデルでは延長し、活動電位の立ち上がり速度も同モデルで低下がみられた。これらの結果は、ヒトにおいて心房を基質とした心房細動・心房粗動等の不整脈は糖尿病の合併をもってその予後が悪化する背景には、発症早期から心筋筋に興奮伝導を低下させる病態が起こっていることを示唆する。また、心室においてもナトリウムチャネル、カルシウムチャネルを介したシグナル異常が発生していることが考えられた。現在、これら心筋の変性を病理学的に証明するため、同モデルにおける心筋細胞のサルコメア構造・核形態・細胞増殖能・線維化等の定量評価を免疫染色およびトランスジェニックラインにて実施中である。

心筋組織には心筋細胞とともに線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫系細胞などが混在し、個々の発現活性は心不全における炎症反応(細胞浸潤)・創傷治癒過程に合わせてダイナミックに変動することが知られている。その過程で一部の心筋細胞は肥大化し、主に線維芽細胞からのシグナルにより細胞外マトリックスが増殖の方向へ向かい、間質線維化が進行すると考えられる。糖尿病モデル心を対象に実施したbulk-RNAシーケンスでは、MAPKシグナリングパスウェイが抑制されていることが明らかとなった(図5)。同カスケードは最終的に核内の転写因子活性による種々の遺伝子の発現を制御するが、本モデルでは一方でfibroblast growth factorやfibroblast growth factor binding proteinなどの線維化を亢進する分子が有意に活性化していることが判明した。

近年の研究から終末糖化産物(AGEs)が糖尿病の発症・進行に深く関わっていることが明らかとなっているが²、AGEsは主なものとして、架橋性の基質であるpentosidine、methylglyoxal-lysine dimersなどである。生体内では血管壁等において、過剰なグルコースが停滞することにより遊離アミノ基と成分間反応を起こし、アマトリ化合物を経てAGEsが生成される。AGEsはその受容体(RAGE)を介し、細胞外基質を増大させるため、心筋の線維化を亢進させている可能性がある。従って、糖尿病性心筋症において糖尿病表現型と心筋変性に基づく機能低下が相互作用的に発生するキー分子となると考えられる。我々のRNAシーケンス解析ではRAGEのゼブラフィッシュホモログである*si:ch211-79k12.1*は有意に活性化されており、糖尿病性心筋症の病態形成にRAGEの過剰な発現が関与していると考えられた。

今後はより詳細な分子病態メカニズムの解明のため、同モデルへのCap analysis of gene expression (CAGE)法を用いたシングルセル解析を予定している。現在、既に細胞分離実験を終え、良好な生細胞率を得られている。これにより希少細胞種の発現解析を可能とする飛躍的なRNA検出感度の向上が見込まれ、細胞種毎の線維化基質形成に関わる転写およびシグナル伝達カスケードの解明に大きく寄与することが期待される。

V. 結論

糖尿病モデルゼブラフィッシュ心において、線維化カスケードの亢進を基盤とする心房・心室の部位

特異的な電気生理異常が認められ、糖尿病性心筋症の分子病態として終末糖化産物受容体活性の関与が示唆された。

VI. 研究協力者

後藤信一・Harvard Medical School・Research fellow

VII. 参考文献

1. Rydén L, Grant PJ, Anker SD, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J.* 2013;34:3035-3087.
2. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114:597-605.
3. Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep.* 2017;7:1461.
4. Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, et al. Repeated Blood Collection for Blood Tests in Adult Zebrafish. *J Vis Exp.* 2015:e53272.
5. Turan NN, Moshal KS, Roder K, et al. The endosomal trafficking regulator LITAF controls the cardiac Nav1.5 channel via the ubiquitin ligase NEDD4-2. *J Biol Chem.* 2020;295:18148-18159.
6. Hayashi K, Teramoto R, Nomura A, et al. Impact of functional studies on exome sequence variant interpretation in early-onset cardiac conduction system diseases. *Cardiovasc Res.* 2020;116:2116-2130.

糖尿病合併 HFpEF での O-結合型グリコシル化に着目した HFpEF 治療の新展開

北海道大学病院 循環器内科 助教
天 満 太 郎

I. 緒 言

高齢化を迎えるわが国においては、心不全患者の激増（心不全パンデミック）を迎えると考えられており、その半数が駆出率が保たれた心不全（Heart failure with preserved ejection fraction：HFpEF）患者と予想されている。ゆえに HFpEF 患者に対する詳細な理解や治療法の開発は、喫緊の課題である。

HFpEFの主な病態は、心筋の肥大や線維化、収縮関連の蛋白質発現の変化・機能異常が統一した機序とされる。一方で、糖尿病や高血圧、心房細動、加齢などの多様な併存疾患を有する HFpEFは、上記のシグナルを抑える画一的な薬物治療の有効性は認められず、多様な併存疾患に応じた HFpEF 治療が必要と考えられている。中でも、糖尿病は HFpEF の約半数に合併しており、糖尿病の有無による HFpEF の分子生物評価は、疫学的観点並びに分子標的治療薬開発の観点においても必須であるが、いまだ十分に理解されていない。

申請者らは、高血圧 HFpEF モデルにおいて、タンパク質の翻訳後修飾（Post-translational modification：PTM）が致死的不整脈の易誘発性をもたらすと報告し¹⁾、HFpEF における PTM の重要性に着目してきた。また近年、PTM の一つである O-結合型グリコシル化（O-GlcNAc）は2型糖尿病で亢進し、糖尿病性心筋症の病態に深く関連していることが報告されている²⁾。

以上より本研究では、糖尿病合併 HFpEF では、タンパク質の O-GlcNAc により心筋細胞内の恒常性変化および致死性不整脈が増悪するという仮説を検証することとした。

II. 対象・方法

糖尿病性心筋症モデルとして、16 週齢オスの遺伝的レプチン受容体欠損 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウス（C57BLKS/J-leprdb/db）、Control 群として同週齢のヘテロ接合体（C57BLKS/J-leprdb/+）を使用した。同モデルを使用し、下記実験方法を行った。

1 拡張障害評価

心エコー測定およびマイクロマノメーターチップカテーテルによる観血的左室圧測定で評価した。

2 不整脈誘発性評価

Langendorff 灌流心を作製し、薬剤負荷による不整脈誘発性を評価した。

3 細胞内カルシウムハンドリング評価

共焦点レーザー顕微鏡を用いてカルシウムハンドリング（ウェーブ・スパーク・小胞体カルシウム含有量）を評価した。0.5Hz で field stimulation をおこない定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像し、カルシウムトランジェントの評価を行った。

4 O-GlcNAc 評価

心室筋タンパク質の O-GlcNAc やカルシウム動態を制御するタンパク質の翻訳後修飾をウェスタンブロット法で評価した。

III. 結 果

1 拡張障害評価

16 週齢での心エコー評価では、左室壁厚、左室拡張・収縮末期径および左室内径短縮率に両群間で有意差は認めなかったが、観血的左室内圧測定では、左室内圧陰性最大変化率： $-dP/dt$ の絶対値および左室圧曲線の減衰時定数 τ は db/db 群で有意に低下、延長しており、16 週齢

の db/db マウスは拡張障害を呈していることが示された（表 1）。

表 1 16 週齢での血行動態指標

データは平均±標準誤差。* $p < 0.05$ vs control 群

	control 群 (n=5)	db/db 群 (n=5)
心拍数, 回/分	496 ± 36	434 ± 44*
左室収縮期圧, mmHg	104 ± 10	106 ± 12
左室拡張末期圧, mmHg	2.8 ± 0.9	4.0 ± 1.7
dP/dt , mmHg/sec	9687 ± 1252	9710 ± 1124
dP/dt , mmHg/sec	7609 ± 666	- 6512 ± 750*
Tau, msec	9.9 ± 0.77	13.5 ± 3.1*

2 不整脈誘発性評価

薬剤負荷：イソプロテレノール (1 μ M)
db/db 群では control 群と比較して有意に心室性期外収縮の発生数および Arrhythmia score³⁾が増加した (図 1)。

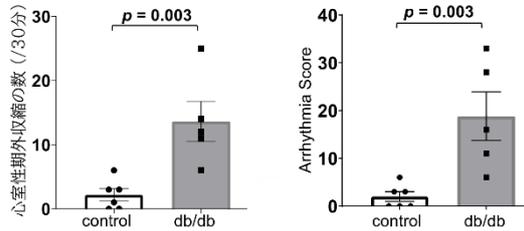


図 1 薬剤負荷による不整脈誘発性評価
30分間の薬剤負荷による心室性期外収縮の発生数 (左)
および Arrhythmia score (右)

3 細胞内カルシウムハンドリング評価

カルシウムウェーブおよびスパークの頻度は control 群と比較して db/db 群で有意に増加し (図 2)、db/db 群では小胞体カルシウム含有量の有意な低下を認めた (図 3)。また、カルシウムトランジェントの波高値、減衰時間の時定数 τ 、半減期は control 群と比較して db/db 群で有意に低下した (図 4)。

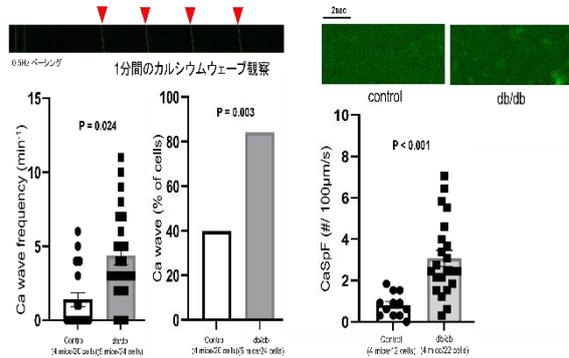


図 2 カルシウムウェーブおよびスパークの評価
1 分間当たりのカルシウムウェーブ頻度 (左) およびライ
ンスキャンモードに y ぼるカルシウムスパークの頻度
(右)

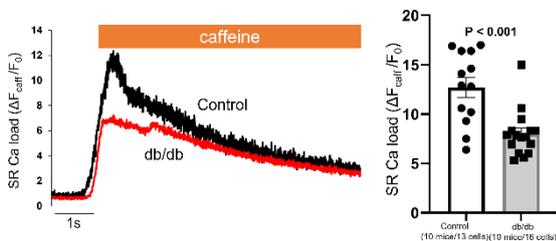


図 3 小胞体のカルシウム含有量の評価
各群の代表的な蛍光強度比のプロット (左) および小胞
体カルシウム含有量のグラフ (右)

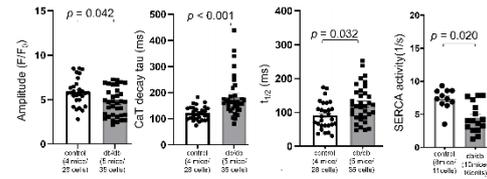


図 4 電気刺激によるカルシウムトランジェント
各群におけるカルシウムトランジェント (左から
Amplitude, CaT decay, T_{1/2}, SERCA activity)

4 O-GlcNAc 評価

db/db 群では心筋全体のタンパクの O-GlcNAc 付加が増加し (図 5)、CaMKII のリン酸化の増加および RyR の過リン酸化が増加していた (図 6)。

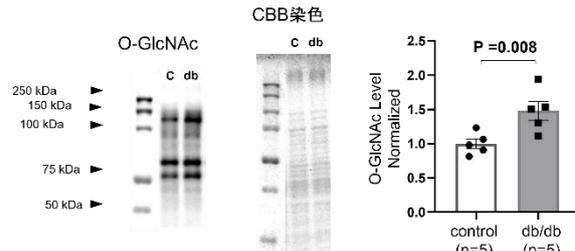


図 6 心室筋全体の O-GlcNAc の比較
各群の代表的な O-GlcNAc のプロット (左)、CBB 染色
のプロット (真中)、control 群のタンパク発現量を 1 と
して規格化したときのグラフ (右)。

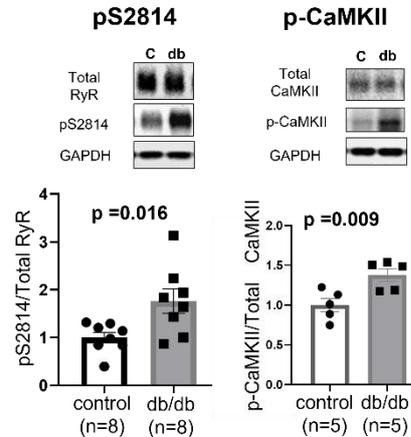


図 5 細胞内カルシウム制御タンパクの比較
各群における、リアノジン受容体およびそのリン酸化
(pSer2814) (左)、CaMKII およびそのリン酸化
(pThr286) (右) のグラフ。

IV. 考察

上記の検討により、糖尿病を合併した拡張障害心筋症においては、心室性不整脈の易誘発性および細胞内カルシウムハンドリング異常をきたしていることが証明された。またこの機序として、心室筋の O-GlcNAc による翻訳後修飾が関与している可能性が示された。心筋内カルシウムハンドリング異常は、不整脈の原因の一つである撃発活動、とくに、細胞内カルシウム過負荷をきたす状態における、ナトリウム-カルシウム交換輸送体を介した脱分極で、活動電位

再分極終了後の第 4 相に生じる遅延後脱分極をもたらすと報告されており、本実験の易不整脈の機序と考えられる。しかし、この細胞内カルシウムハンドリング異常は、催不整脈だけではなく、心筋細胞の機能障害を引き起こし、心筋肥大や繊維化および炎症をもたらし、心筋リモデリング亢進による HFpEF 進展を増悪させる可能性がある。本実験で示した、『糖尿病を併発した拡張障害心筋症における O-GlcNAc 付加による細胞内カルシウムハンドリング異常』が、易不整脈だけではなく、心筋リモデリングおよび HFpEF 進展に寄与するかについては、今後より詳細な検討を行う必要がある。

V. 結 論

糖尿病を併発した拡張障害心筋症では、タンパク質の O-GlcNAc による心筋細胞内のカルシウム制御異常および致死性不整脈の易不整脈性を認めた。

VI. 研究協力者

門坂崇秀・北海道大学大学院医学研究院・循環病態内科学教室・助教

渡邊昌也・北海道大学大学院医学研究院・循環病態内科学教室・客員研究員

安斉俊久・北海道大学大学院医学研究院・循環病態内科学教室・教授

VII. 参考文献

- 1) Tenma T, Mitsuyama H, Watanabe M, et al. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activation deteriorates hypoxic ventricular arrhythmias via CaMKII in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018, 1;315(2):H262-H272.
- 2) Banerjee, P.S., Lagerlof, O., and Hart, G.W. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med.* 2016, 51,1-15.
- 3) van der Werf, C., Kannankeril, P.J., Sacher, F, et al. Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol.* 2011,57, 2244-2254.

脂肪由来アディポネクチンと肝由来 XOR の 糖尿病・代謝性血管障害における意義の解明

大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

藤島 裕也

I. 緒言

健康寿命延伸の観点から動脈硬化性心血管疾患の予防は重要な課題である。特に内臓脂肪蓄積を病態基盤とするメタボリックシンドロームを背景とした、2型糖尿病や脂肪肝・非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に代表される全身の代謝異常は、動脈硬化症や血管障害と強く関連することが知られている。しかし、このような病態における動脈硬化症進展の分子メカニズムは完全には明らかとなっておらず、有効な予防法や治療法は確立されていない。

そこで、本研究では、(1) 内臓脂肪蓄積に伴い血中濃度が減少する脂肪細胞特異的蛋白・アディポネクチン (APN) と、(2) NAFLD 病態で著しく血中での活性が上昇するキサンチン酸化還元酵素 (XOR) に注目し、これらの因子が血管障害・動脈硬化症に及ぼす影響を明らかとすることで、心血管疾患に対する治療応用を目指すことを目的とした。

II. 対象・方法

(1) APN の糖尿病性細小血管障害への作用

雄の C57BL/6J・野生型 (WT) マウス、APN 欠損マウス (APN-KO) および T-cadherin 欠損マウス (Tcad-KO) を用いた。糖尿病モデルマウスは、streptozotocin (STZ) を、8 週齢のマウスに 60mg/kg で 5 日間腹腔内投与し作製した。ダ

パグリフロジンは 0.02 mg/mL に希釈し、高血糖確認後より飲水投与した。

網膜フラットマウントを用いた免疫染色より蛋白発現を評価し、血管内皮面積当たりの発現量を ImageJ により定量した。網膜血管透過性は Hoechst 3325 を左心室内投与し、その血管外への漏出を定量することで評価した。

(2) XOR の血管障害・動脈硬化症への関与

大阪大学医学部附属病院で腹腔鏡下スリーブ状胃切除術を施行した高度肥満症患者 12 名を対象に、術前・術後 1 週間・術後 1 年で採血を行い、血中 XOR 活性を測定した。XOR 活性および各種プリン代謝物 (ヒポキサンチン・キサンチン・尿酸) は、LC/TQMS 法により定量した。また、XOR の 2 つの酵素型 (XDH および XO) は、メチレンブルーの有無の条件下で、プテリンからイソキサントプテリンへの変換を HPLC-FLD 法により定量することで評価した。

細胞実験にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト大動脈血管平滑筋細 (HASMC) を使用し、肝由来 XOR のソースとしてヒト肝臓より抽出したマイクロソームとサイトゾルの混合物である S9 分画を用いた。

食餌誘導性 NAFLD モデルマウスは、8 週齢の WT マウスにコリン欠乏性メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を負荷し作製した。負荷 4 週後より XOR 阻害薬であるトピロキソスタット (TPX) を 1 mg/kg/day で混餌投与し上で、頸動脈結紮 3 週間後に新生内膜と中膜の面積を定量し、新生内膜増殖の評価を行った。

III. 結果

(1) APN の糖尿病性細小血管障害への作用

APN は、脂肪細胞から特異的に分泌される蛋白質であるにも関わらず、肥満・特に内臓脂肪蓄積に伴いその血中濃度が低下する。我々は、APN が GPI アンカー型の膜蛋白である T-cadherin に特異的かつ高親和性に結合することにより、大動脈血管内皮細胞や動脈硬化巣の増殖型平滑筋細胞、腎尿細管周囲の血管周皮細胞 (pericyte) に集積して存在し、動脈硬化症や虚血再灌流障害による腎尿細管障害などに対して保護作用を示すことを報告してきた^{1, 2}。しかし、網膜症を初めとした糖尿病細小血管合併の発症・進展に対する APN の生理的意義については明らかでない。

網膜血管における APN 蛋白の局在と、糖尿病病態での変化

WT マウスの網膜における APN の局在を、網膜フラットマウントを用いた免疫蛍光染色によって評価した。その結果、WT マウスでは主に網膜の細動脈に沿って APN シグナルが検出される (図 1 A)、血管平滑筋細胞マーカーである α SMA とはマージしなかったが、毛細血管の移行部にかけての血管内皮細胞マーカーである CD31 と共局在していた。一方で、Tcad-KO マウスでは、APN-KO マウスと同様に、このような網膜における APN のシグナルは完全に消失していたことから (図 1 A)、APN は T-cadherin 依存的に網膜の血管内皮に集積していることが示された。また、STZ 誘発糖尿病モデルマウスでは、このような網膜血管内皮に集積した APN は、糖尿病発

症後経時的に減少した (図 1B)。

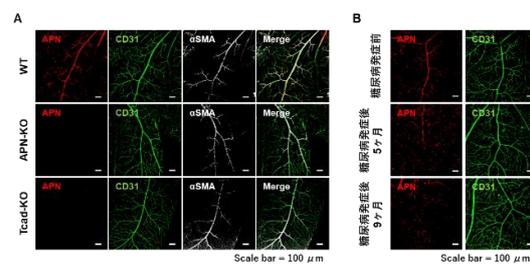


図 1. T-cadherin を介した網膜血管内皮へのアディポネクチン蛋白の集積と、その糖尿病病態における変化

APN 欠損マウスにおける網膜血管障害の進展

糖尿病網膜症の初期には網膜血管透過性の亢進が惹起され、網膜症進展に重要な役割を果たすことが報告されている。そこで、Hoechst (分子量 534 Da) を予め心室内投与し、網膜血管からの漏出を評価した。その結果、糖尿病発症後 6 週の時点で、主に細動脈の抹消の分岐部周辺で血管外の Hoechst 陽性領域が認められ、糖尿病発症後早期における血管透過性亢進が確認された。一方で、SGLT2 阻害薬であるダパグリフロジンによる糖尿病治療により、血管内皮の APN 集積の低下は回復し、網膜血管透過性の亢進も抑制された。最後に APN-KO マウスを用いて網膜症の発症・進展に対する APN の役割を検討した。STZ 負荷後血糖値の推移には WT と APN-KO マウスで差はみられなかったが、APN-KO マウスでは、糖尿病発症 4 週より早期の時点で、網膜血管内皮における VCAM-1 発現が有意な上昇と (図 2 A)、claudin-5 蛋白の減少が認められ (図 2 B)、血管内皮の tight-junction の破綻が示唆された。さらに、APN-KO マウスでは血管外への Hoechst 漏出の顕著な増加が認められ、血管透過性が著しく亢進していた (図 2 C)。以上の結果より、網膜における APN は、糖尿病網膜症の病態進展に対して保護的に作用することが明らかとなった。

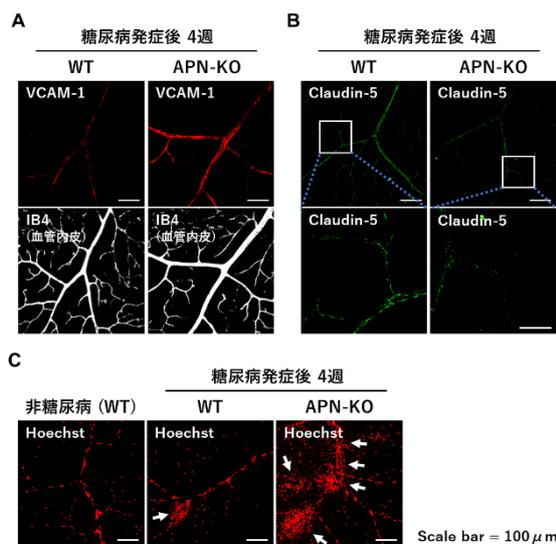


図2. アディポネクチンの欠損による糖尿病発症早期での網膜血管の変化

血管内皮特異的 T-cad 欠損マウスの樹立

T-cadherin flox マウスと、VE-cadherin Cre^{ERT2} マウスと交配させることによって、血管内皮特異的 T-cad 欠損マウスの樹立を行った。このマウスにタモキシフェン (200mg/kg) を5日間経口投与し Cre 発現を誘導し 6 週間後に解析したところ、有意な血中 APN 濃度の上昇が認められ、大動脈や腎臓、骨格筋の免疫染色では血管内皮の APN 集積が消失する結果が得られた。現在血管内皮の T-cadherin の消失に伴う APN の作用の変化について検討を進めている。

(2) XOR の血管障害、動脈硬化症への関与

XOR は、ヒポキサンチンおよびキサンチンから尿酸への変換を触媒する律速酵素であり、ヒトでは主に肝臓や小腸に高発現している。また、その酸化型酵素である XO は反応過程において活性酸素種 (ROS) を産生し、血管内皮に結合することが示されていることから³、血管内皮障害や動脈硬化症に関与することが示唆されてきた。近年、ヒト血漿中の XOR 活性の正確な測定が可能となったが、血中 XOR 活性上昇の病態学的意義は明らかでない。

血中 XOR 活性の規定因子

減量手術を施行した高度肥満症患者を対象に、血漿 XOR 活性の変化を評価したところ、術後 1 年の時点で有意な低下が認められ (図 3 A)、その術前後での変化は血中 AST・ALT といった肝逸脱酵素の変化と強い正相関を示した一方で (図 3 B)、BMI や血中尿酸値の変化とは関連しなかった。また、高 XOR 血症を呈する患者 (Patient) の血漿中に、XOR の基質であるヒポキサンチン (100 μM) を添加したところ、キサンチンの産生が観察されたが、このような反応は健常者 (Control) の血漿中では認められず、また XOR 阻害薬 (TPX) の添加 (10 μM) によりキャンセルされた (図 3 C, D)。これらの結果から、血中 XOR 活性は NAFLD に代表される肝障害に伴い上昇し、少なくともヒポキサンチンからキサンチンへのプリン異化代謝反応がヒト血中で惹起され得ることが示唆された。

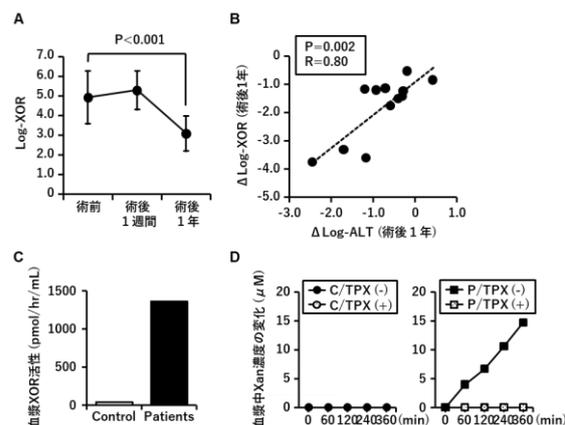


図3. 減量手術後の血中 XOR 活性の変化と、ヒト血漿中におけるプリン異化代謝反応

血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に対する肝由来 XOR の作用

高 XOR 血症を呈する患者血漿と同程度となるように 1% に希釈した肝 S9 分画を用いて、肝由来 XOR の血管構成細胞に対する作用を *in vitro* で検討した。ヒト血管内皮細胞では XOR 活性は検出されず、培養上清中への比較的高濃度のヒポキサンチン分泌が観察され、さらに肝由来 XOR の添加により、内皮細胞から分泌されたヒポキサンチンが上清中でキサンチンおよび尿酸に代謝された (図 4A)。またこの反応に伴い、上清中で ROS が産生され (図 4B)、VCAM-1 を初めとした接着分子の遺伝子発現が有意に上昇したが、これら変化は XOR 阻害薬 (TPX) (10 μ M) によって有意に抑制された。また、ヒト血管平滑筋細胞への肝由来 XOR の添加により、細胞増殖が亢進し SMC の脱分化が誘導されたが、いずれも TPX により抑制された (図 4C)。

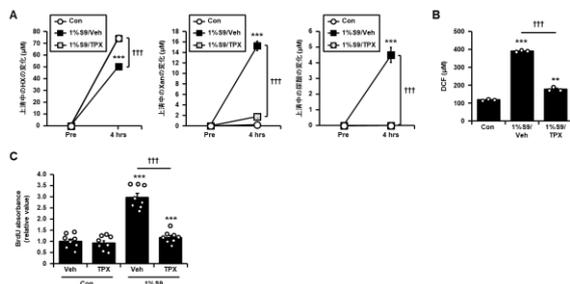


図 4. 肝由来 XOR のヒト血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に対する作用

NAFLD 病態マウスにおける血中 XOR 活性の上昇と XOR 阻害による血管新生内膜増殖の抑制

CDAHFD を負荷した食餌誘導性 NAFLD モデルマウスでは、負荷 1 週の早期より経時的な血中 ALT の上昇が確認された (図 5A)。そして、マウスにおいてもこのような NAFLD の病態進行に伴い、血中 XOR 活性の顕著な上昇が観察され、血中では ROS 産生に参与する XO の酵素型が大部分を占めていた (図 5B)。また、NAFLD 病態マウスでは、通常食群に比して、左頸動脈結紮による新生内膜増殖の有意な亢進を認めたが、XOR 阻害薬 (TPX) の投与により通常食群と同程度まで抑制された (図 5C)。

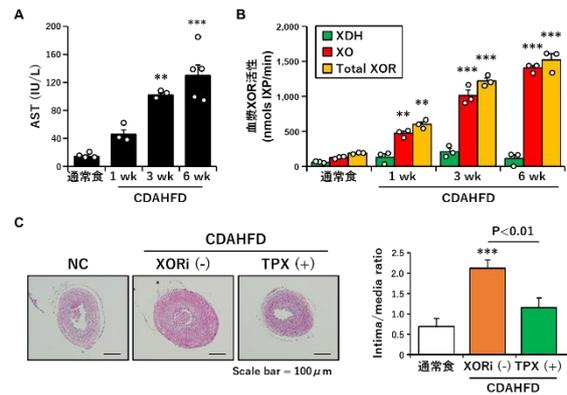


図 5. NAFLD 病態マウスの新生内膜形成に対する XOR 阻害薬の効果

肝障害合併・高尿酸血症患者に対する XOR 阻害薬の血管伸展性指標に対する効果

血中 XOR 活性高値が予想される肝障害合併症例に対する XOR 阻害薬の投与が、心血管リスク低下に寄与するかを確認する目的で、共同研究により既存の介入臨床研究 (BEYOND-UA study) ⁴ のサブ解析を行った。高血圧合併・高尿酸血症患者を対象として 24 週間の XOR 阻害薬・TPX の投与が行われたが、主要アウトカムの血管進展性の指標である CAVI に有意な変化は認められなかった。そこで、ベースラインの肝機能 (ALT 値) による層別解析を行ったところ、まず血中 XOR 活性は ALT 値が高値なるほど強い上昇を認めたが、TPX 投与後は顕著に抑制されていた

(図 6A-C)。さらに、このような血中 XOR 抑制に伴い、ALT ≥ 30 U/L および ≥ 40 U/L の群では、有意な CAVI の改善を認めた (図 6C-D)。

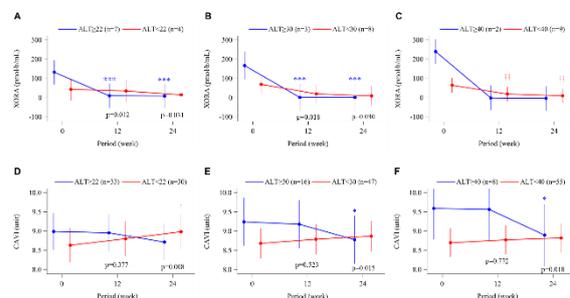


図 6. XOR 阻害薬の血管伸展性指標に対する効果

IV. 考察

本研究により APN は T-cadherin 依存的に網膜血管内皮に局在し、高血糖に伴う細小血管障

害に対して保護的な役割を担う可能性が初めて示された⁵。今回の検討では網膜での T-cadherin の免疫染色は困難であったが、糖尿病発症早期より網膜血管の APN 集積の減少が認められ、これは糖尿病状態における血管内皮の T-cadherin 発現の低下が関与していると考えている。このような APN 集積の減少は、糖尿病性細小血管障害の発症・進展と関連している可能性があり、血管内皮の T-cadherin 発現制御による治療応用も期待される。飽和セラミドの細胞内蓄積は、炎症や酸化ストレスなどの脂質毒性により、糖尿病性細小血管合併症の発症に関与することが指摘されているが⁶、APN は T-cadherin 依存的なエクソソーム産生を促進し、細胞外へのセラミド排出の促進を介して、血管内皮細胞のセラミド含量を減少させることを明らかにしている⁷。従って、このような APN/T-cadherin システムによるエクソソーム産生・分泌促進作用が、血管内皮障害に対する保護作用に貢献している可能性を想定している。以上より、血管内皮細胞への T-cadherin 依存的な APN の結合は、糖尿病による血管障害に対して重要な役割を担っていると考えられた。今後は今回樹立した血管内皮特異的な T-cadherin 欠損マウスを用いて、血管系組織および、全身臓器の APN の作用に対する血管内皮の T-cadherin の重要性について、より詳細に検討する予定である。

また、本研究では NAFLD 病態で上昇する血中 XOR が、血管新生内膜の増殖や血管内皮障害に直接的に関与し得ることが明らかとした^{8,9}。近年、いくつかの疫学研究により NAFLD の合併が古典的な心血管危険因子とは独立して、動脈硬化症や冠動脈疾患のリスクを上昇させることが明らかとなっている¹⁰。肝由来 XOR は ROS 産生を介して血管内皮細胞の接着分子を上昇させ、血管平滑筋細胞の増殖・脱分化を惹起させたことから、このような肝臓と血管との連関のメカニズムの一つとして、障害時に肝臓から血中に

過剰に放出される XOR の関与が示唆された。また、我々は XOR の基質であるヒポキサンチンがヒト脂肪細胞から分泌されていることを過去に報告しているが¹¹、加えてヒト血管内皮細胞内からも多量のヒポキサンチンが分泌されていることが明らかとなった。つまり、血中 XOR 活性の高い NAFLD 症例では、特異的に脂肪細胞や血管内皮細胞から分泌されたヒポキサンチンが血中あるいは血管局所で異化されることで、血管リモデリングを加速させることが想定された。XOR 阻害薬の動脈硬化症に対する臨床効果は依然議論の余地がある。今回の前向き研究のサブ解析の結果、肝障害を有する患者では XOR 阻害薬の投与により CAVI の改善がみられたことから、血中 XOR 活性の上昇が予想される NAFLD 患者ではその恩恵が最も期待されるが、エビデンスの構築には今後のより大規模な前向き研究が必要である。以上、本研究の成果は、「肝臓-血管の連関機構」における血中 XOR の動脈硬化症に対する役割について、新たな知見を加えるものである。また、阻害薬による血中 XOR の抑制は、メタボリックシンドロームと強く関連する NAFLD 患者の心血管疾患の進展を抑制する上での、重要な治療戦略となり得る可能性がある。

V. 結論

APN および XOR の糖尿病や NAFLD に関連する血管障害の発症・進展に対する重要性について明らかとした。

VI. 研究協力者

塩出 俊亮 大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 大学院生

坂上 貴章 大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 大学院生

川知 祐介 大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 医員

喜多 俊文 大阪大学大学院医学系研究科 肥満脂肪病態学寄付講座 講師

西澤 均 大阪大学大学院医学系研究科 内分
 泌・代謝内科学 講師
 前田 法一 大阪大学大学院医学系研究科 代謝
 血管学寄付講座 准教授
 星出 聡 自治医科大学内科学講座 循環器内科
 部門 教授
 荻尾 七臣 自治医科大学内科学講座 循環器内
 科部門 教授

VII. 参考文献

1. Fujishima Y, Maeda N, Matsuda K, et al. Masuda S, Mori T, et al. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. *FASEB J*. 2007;31:1571-1583.
2. Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Kita S, et al. Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021;320:E179-E190.
3. Houston M, Estevez A, Chumley P, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:4985-4994.
4. Kario K, Nishizawa M, Kiuchi M, et al. Comparative effects of topiroxostat and febuxostat on arterial properties in hypertensive patients with hyperuricemia. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2021;23:334-344.
5. Sakaue TA, Fujishima Y, Fukushima Y, et al. Adiponectin accumulation in the retinal vascular endothelium and its possible role in preventing early diabetic microvascular damage. *Sci Rep*. 2022;12:4159.
6. Mandal N, Gramberg R, Mondal K, et al. Role of ceramides in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *J Diabetes Complications*. 2021;35:107734.
7. Obata Y, Kita S, Koyama Y, et al. Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release. *JCI Insight*. 2018;3:99680.
8. Kawachi Y, Fujishima Y, Nishizawa H, et al. Increased plasma XOR activity induced by NAFLD/NASH and its possible involvement in vascular neointimal proliferation. *JCI Insight*. 2021;6:e144762.
9. Fujishima Y, Nishizawa H, Kawachi Y, et al. The Effects of Topiroxostat, a Selective Xanthine Oxidoreductase Inhibitor, on Arterial Stiffness in Hyperuricemic Patients with Liver Dysfunction: A Sub-Analysis of the BEYOND-UA Study. *Biomedicines*. 2023;11:674.
10. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol*. 2016;65:589-600.
11. Nagao H, Nishizawa H, Tanaka Y, et al. Hypoxanthine Secretion from Human Adipose Tissue and its Increase in Hypoxia. *Obesity (Silver Spring)*. 2018;26:1168-1178.