

糖尿病における心血管合併症の研究

1. 目的

わが国の食生活および生活習慣が欧米型に近づくにしたいが、糖尿病の発症率が近年急速に増加している。糖尿病は糖代謝、脂質代謝および蛋白代謝すべてに破綻が生じ、心臓・血管系および神経系など多岐にわたる組織に障害が生じることが指摘されている。特に、心臓・血管系の障害は、心筋梗塞、脳内出血、眼底出血、など重要臓器に致命的疾患を招来する要因となる。本研究事業では、ストレプトゾトシンを用いて実験的に動物に糖尿病を発症させたり、あるいは遺伝的に高血糖をきたす動物モデルの心筋を用いて、糖尿病が発症したときの心筋の機能異常の病態を解明することを研究の主な目的としている。また、糖尿病による心筋障害とミトコンドリアの DNA 異常との関係についても PCR 法を用いて研究をすすめる。

2. 組織

栗原 敏（東京慈恵会医科大学第二生理学教室）（代表者）

有田 真（大分医科大学第二生理学教室）

小林 明（浜松医科大学第三内科学教室）

武田信彬（東京慈恵会医科大学青戸病院内科学教室）

3. 計画及び材料と方法

ストレプトゾトシン (65mg/kg) をラットの尾静脈より注射して、糖尿病を発症させた。その糖尿病ラットの心臓をランゲンドルフ法により灌流して単一心筋細胞を単離した。パッチクランプ法を得られた単一心筋細胞に適用して細胞膜全体の膜電位固定を行い、各種イオンチャンネルの異常の解明を試みた。また、先天的に高血糖をきたす Zucker rat の心筋を用いて、細胞内電極法により活動電位を記録し、活動電位波形から活動電位異常の背景にあるチャンネル異常のメカニズムを解明した（有田）。

糖尿病が進行すると細胞内アシドーシスが招来されるので、アシドーシス時の細胞内 Ca 動態と、それに最も関係の深い筋小胞体からの Ca 放出の変化を乳頭筋とスキンド標本を用いて解明した。フェレットの右室乳頭筋の表層細胞内に、Ca 感受性発光蛋白エクオリンを圧注入して、Ca イオン濃度の増加・減少により生じる光信号と張力を同時測定した。また、フェレットの右室乳頭筋を弛緩液の中で、直径 200-250 μm の細い標本にし、これを直径 400 μm のガラス毛細管の中に入れた。この毛細管を倒立顕微鏡のステージ上に置いた。毛細管の中に ATP を含有する Ca 溶液を導入して筋小胞体に Ca イオンを取り込ませ、その後、50mM カフェインで小胞体内の Ca イオンを全て放出させ Ca イオンを蛍光色素 fluo-3 に全て結合させて定量した。Ca 取り込みをおこさせる時、あるいは Ca を筋小胞体に取り込ませた後に、Ca イオンによる Ca 放出をおこさせる時に pH を低下させた液を小胞体に与えることにより、Ca 取り込みと Ca 放出に対する pH の影響を検討した（栗原）。

ストレプトゾトシン (45mg/kg) 処理ラット心筋から得た単一心筋細胞に indo-1AM を負荷した。この細胞を倒立蛍光顕微鏡上に置いた浴槽に入れ、Ca イオン濃度のイメージを

経時的に記録し、糖尿病心筋の細胞内 Ca 代謝異常(静止時細胞内 Ca 濃度をと Ca transient の低下) のメカニズムを単一細胞レベルで解明した。また、Na イオンの指示薬 SBFI を細胞内に負荷して、細胞内 Na イオン濃度を経時的に測定して、細胞内 Ca イオン代謝異常との関係を調べた。(小林)。

ストレプトゾトシン処理ラットから乳頭筋を摘出して、収縮の時間経過を測定した。また、その心筋を電気泳動にかけ、ミオシンのアイソザイムの変化を調べ、収縮のパラメーターとの対応を検討した。また、糖尿病ラットから得られた心肺標本を Neely の灌流装置に取り付け、刺激頻度を変えたときの心機能を測定し、正常ラットの心肺標本のそれと比較検討した。更に、糖尿病患者の剖検心筋を用いてミトコンドリア DNA 異常の有無を PCR 法を用いて調べた(武田)。

4. 成果

ストレプトゾトシン糖尿病ラットを作成し、それより摘出した乳頭筋、および単一心筋細胞を用いて以下の点が明らかになった。糖尿病心筋の活動電位持続時間は正常ラットの心筋よりも延長しており、特に早期再分極相において延長が顕著に見られた。この再分極相の延長は刺激頻度依存性を示し、4-aminopyridine (4AP) により抑制されたので、4AP 感受性の一過性外向き電流の減少によることが明らかになった。また、後期脱分極相においても活動電位の延長が観察され、これは Ca 電流が増加しているために生じているものと考えられた。Zucker rat の心筋細胞でも、ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋細胞と同様の活動電位の延長が確認された。Zucker rat では特に早期再分極相の延長が見られ、後期再分極相にはコントロールの心筋と有意な差はなかった。Zucker rat でもストレプトゾトシン糖尿病の心筋細胞と同じ電流の異常が生じていることが考えられる。

ストレプトゾトシン糖尿病ラット心臓の単一心筋細胞を用いて細胞内 Ca イオン濃度を測定したところ、拡張期および収縮期の細胞内 Ca イオン濃度の減少が観察された。このような細胞内 Ca イオン濃度調節機構の障害が、糖尿病心筋の張力低下の原因であると考えられた。更に、細胞内 Na イオン濃度を測定すると、糖尿病心筋では細胞内 Na イオン濃度の減少が認められた。アミロライドを作用させると、糖尿病心筋細胞および、コントロールの心筋細胞で、ともに細胞内 Na イオン濃度が減少したが、両者の間に有意差は認められなかった。糖尿病心筋細胞では Na/H 交換機序が障害されているので、細胞内 Na イオン濃度が低いものと考えられた。

重炭酸イオンを減少させ細胞内アシドーシスを誘起すると、Ca transient ピークが増加した。同時に、Ca 信号の減衰相の時間経過が延長した。また、頻回刺激により強縮をおこさせ細胞内 Ca イオン濃度-張力関係を調べると、細胞内アシドーシスではこの関係が右方移動しており、収縮蛋白系の Ca 感受性の低下が認められた。また、Ba 拘縮中に正弦波の長さ変化をあたえて、dynamic stiffness を測定すると、クロスブリッジの回転速度がわかるが、アシドーシスではクロスブリッジの回転速度は変化しなかった。スキンド標本の Ca 放出は H イオンで抑制された。従って、収縮蛋白系の Ca 感受性が低下した結果、収縮時の細胞内 Ca イオン濃度 (Ca transient) が高くなることが明らかになった。

糖尿病心筋では収縮の時間経過 (time to peak tension, 弛緩時間) が延長していた。ミオシンアイソザイムを調べるとミオシンアイソザイムのうち V1 が減少し V3 が増加して

いた。ミオシンの変化が収縮時間延長に深く関与していることがわかった。また、心肺標本に刺激をあたえ、刺激頻度を増すと、糖尿病ラットの心臓では心機能の低下がみられた。高頻度刺激時の心機能低下の一因は、ミオシンアイズァイムが V3 に変化したためと考えられた。糖尿病の人の心筋ではミトコンドリアの DNA 欠失があり、これは長期にわたる代謝異常により生じたものと推測された。

5. 考察

糖尿病心筋では以下の異常が観察された。(1)細胞膜のイオンチャネルが障害されている。特に一過性外向き電流と Ca 電流系にその障害がみられる。これが Q-T 時間延長の原因と考えられる。(2)細胞内 Ca イオン調節機構が障害されている。特に、筋小胞体の Ca イオン取り込み速度、Na/Ca 交換系および、Na/H 交換系の障害が見られる。このため、収縮が障害されている。(3)アシドーシスが進行すると収縮蛋白系の Ca 感受性が低下して、収縮力が低下する一因となる。(4)ミオシンアイズァイムの V3 が増加して、収縮の時間経過が遅延する原因となる。かつ、高頻度で収縮するとき心機能が低下する。(5)長い期間糖尿病が持続すると、ミトコンドリアの DNA に障害が見られる。

6. 発表

1. Hongo K., Tanaka E., Kurihara S.: Alterations in contractile properties and transients by beta- and muscarinic receptor stimulation in ferret myocardium. J. physiol., 1993, 461: 167-184
2. Hongo K., Tanaka E., Kurihara S.: Mechanism of the effects of acetylcholine on the contractile properties and Ca transients in ferret ventricular muscles. J. Physiol., 1993, 461: 185-199
3. Saeki Y., Kurihara S., Hongo K., Tanaka E.: Alterations in intracellular calcium and tension of activated ferret papillary muscle in response to step length changes. J. Physiol., 463: 291-306
4. Konishi M., Kurihara S.: Radial spread of aequorin Ca²⁺ signal in single frog skeletal muscle fibers. Mol. Cell. Biochem., 1983, 119: 59-66
5. Kurihara S., Tanaka E., Hongo K., Suda N., Okazaki O., saeki Y.: Effects of intracellular acidification on Ca transients and contraction in mammalian cardiac muscles. The Diabetic Heart, ed. By M. Nagano, N. S. Dhalla, Raven Press, N. Y., 1991, pp515-522.
6. Sato T., Wu B., Nakamura S., Kiyosue T., Arita M.: Cibenzoline inhibits diazoxide-

- and 2, 4-dinitrophenol- activated ATP-sensitive K⁺ channels in guinea-pig ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.*, 1983, 108: 549-556
7. Saikawa T., Ito M., Nakagawa M., Shimoyama N., Hara M., Yonemochi H., Maeda T., Inoue T., Takai R., Arita M. : Suppression of ventricular premature contractions continues after the washout of antiarrhythmic drugs. *Jpn. Cir. J.*, 1993, 57: 55-62
 8. Sato T., Imanishi S., Arita M., Shimada T. : Effects of elastase on contractility and morphology of elastic tissue in isolated guinea pig papillary muscles. *Heart Vessels*, 1993, 8: 71-78
 9. Kajita J., Imanishi S., Sako H., Arita M., Hadama T. : Intracellular Na⁺ activity of "diseased" human atrial muscles and its modifications by dihydroouabain. *Jpn. J. Physiol.*, 1993, 43: 403-408
 10. Koumatsu K., Ito M., Fujino T., Saikawa T., Arita M. : Cumulative effects of heart beat on ventricular premature contractions suggesting possible involvement of triggered activity. *Jpn. Cir. J.*, 1993, 57: 503-511
 11. Sato T., Arita M., Kiyosue T. : Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectified K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc. Drugs Therap.*, 1983, 7: 575-584
 12. Tatsukawa T., Arita M., Kiyosue T., Mikuria Y., Nasu M. : A comparative study of effects of isoproterenol and dihydroouabain on calcium transients and contraction in cultured rat ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1993, 25: 707-720
 13. Kiyosue T., Arita M., Muramatsu H., Spinder A. J., Noble D. : Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperature in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 1993, 468: 85-106
 14. Hayashi H., Miyata H., Terada H., Noda N., Sato H., Kobayashi A., Yamazaki N. : Effects of phospholipase C on action potentials and intracellular ca²⁺ concentration in guinea pig heart. *Jpn. Cir. J.*, 1993, 57: 344-352

15. Noda N., Hayashi H., Sato H., Terada H., Hirano M., Kobayashi A., Yamazaki N. : Ca^{2+} transients and cell shortening in diabetic rat ventricular myocytes. *Jpn. Cir. J.*, 1993, 57: 449-457
16. Kobayashi A., Nishiyama T., Ikegaya T., Kaneko M., Yamazaki N. : Verapamil induced of the myocardial β -adrenoceptor density in BIO 14.6 cardiomyopathic Syrian hamsters. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, 121: 59-65
17. Kobayashi A., Okayama Y., Yamazaki N. : ^{31}P -NMR magnetization transfer study of reperfused rat heart. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, 119: 121-127
18. 佐藤洋、林秀晴、野田直久、寺田肇、平野雅彦、山下豊、小林明、山崎昇：蛍光色素法による心筋細胞内ナトリウム濃度の測定—SBFIを用いた検討—、心筋の構造と代謝, 1992, 14: 127-132
19. Yuan G., Kaneko M., Masuda N., Hong RB., Kobayashi A., Yamazaki N. : Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1140: 78-84
20. Tawarahara K., Kurata C., Taguchi T., Kobayashi A., Yamazaki N. : Augmentation of β adrenergic receptor in cardiomyopathic hamster (BIO 14.6)with heart failure. *Cardiovas. Res.*, 1992, 26: 526-533
21. Hayashi H., Miyata H., Noda N., Kobayashi A., Yamazaki N. : Intracellular Ca^{2+} concentration and pH_i during metabolic inhibition. *Am. J. Physiol.*, 1992, 262: C628-C634
22. Noda N., Hayashi H., Miyata H., Suzuki S., Kobayashi A., Yamazaki N. : Cytosolic Ca^{2+} concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1992, 24: 435-446
23. Sato H., Hayashi H., Noda N., Terada H., Kobayashi A., Yamashita Y., Kawai T., Hirano M., Yamazaki N. : Quantification of intracellular free sodium ions by using a new fluorescent indicator, sodium-binding benzofuran isophthalate in guinea pig myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1991, 175: 611-616

24. Kato M., Yang J., Iwai T., Tanamura A., Arino T., Kawashima O., Takeda N. : Abnormalities of ADP/ATP carrier protein in J-2-N cardiomyopathic hamsters. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, 119: 89-94
25. Takeda N., Tanamura A., Iwai T., Nakamura I., Kato M., Ohkubo T., Noma K. : Mitochondrial DNA deletion in human myocardium. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, 119: 105-108
26. Tanamura A., Takeda N., Iwai T., Tuchiya M., Arino T., Nagano M. : Myocardial contractility and ventricular myosin isoenzymes as influenced by cardiac hypertrophy and its regression. *Basic Res. Cardiol.*, 1993, 88: 72-79
27. Iwai T., Takeda N., Tuchiya M., Arino T., Tanamura A., Nagano M. : Effects of regression of cardiac hypertrophy on myocardial contractility and ventricular myosin isoenzymes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, 118: 99-103
28. Suzuki H., Takeda N., Kawamura M. : Effects of myoinositol on experimental diabetic heart. *Jikeikai Med. J.*, 1992, 39: 219-231
29. Kato M., Takeda N., Yang J., Nagano M. : The effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and the role of renin-angiotensin-aldosterone system in J-2-N cardiomyopathic hamsters. *Jpn. Cir. J.*, 1992, 56: 46-51
30. Obayashi T., Hattori K., Sugiyama S., Tanaka M., Tanaka T., Itoyama S., Deguchi H., Kawamura K., Koga Y., Toshima H., Takeda N., Nagano M., Ito T., Ozawa T. : Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart J.*, 1992, 124: 1263-1369
31. Takeda N., Nakamura I., Ohkubo T., Tanamura A., Iwai T., Kato M., Noma K., Nagano M. : The influence of diabetes on myocardial contractility and energetics in spontaneously hypertensive rats. In: *Cardiovascular Disease in Diabetes*. (eds) Nagano M., Mochizuki S., Dhalla NS., Kluwer Academic Publ., Boston, 1992, pp. 77-84
32. Kurihara S., Hongo K., Tanaka T., Tanaka E. : Effects of a newly synthesized dihydropyridine, NZ-105, on intracellular Ca transients and tension in ferret

ventricular muscles.

in preparation.

33. Tanaka T., Kawai M., Kurihara S. : Effects of a new inotropic drug (DN-9693) on Ca transients and contraction in ferret ventricular muscles. in preparation.
34. Hongo K., Konishi N., Kurihara, S. : Cytoplasmic free Mg^{2+} in single ventricular myocytes of rat studied with the fluorescent indicator furaptra. in preparation.
35. Takeda N., Tanamura A., Iwai T., Kato M., Noma K., Nagano M. : Pharmacological modulation of cardiac hypertrophy in hypertensive patients. In: The Adaptive Heart (eds) Nagano M., Takeda N., Dhalla, N.S., Raven Press, New York, in press.
36. Takeda N., Tanamura A., Iwai T., Kato M., Noma K., Nagano M. : Beneficial effect of ACE inhibitor in congestive heart failure. Mol. Cell. Biochem. in press.
37. Takeda N., Iwai T., Tanamura A., Nakamura I., Ohkubo T., Nagano M. : Myocardial contractility and energetics in cardiac hypertrophy and its regression. Mol. Cell. Biochem. in press.
38. Yang J., Kato M., Takeda N., Nagano M., Yang T.-S. : Cardiac enzymatic alterations in Keshan disease model and cardiomyopathic hamster J-2-N. In: The Cardiomyopathic Heart (eds) Nagano M., Takeda N., Dhalla N.S., Raven Press, New York, in press.
39. Kato M., Yang J., Takeda N., Nagano M. : Effect of cardioprotective drugs on cardiomyopathic hamster J-2-N. In: The Cardiomyopathic Heart (eds) Nagano M., Takeda N., Dhalla N.S., Raven Press, New York, in press.