

## 糖尿病心臓障害の分子生物学的検討

所属機関 東京慈恵会医科大学青戸病院内科  
研究者名 武田 信彬

## 《研究の概要》

糖尿病の合併症として心臓障害の重要性が増している。心臓障害につながる糖尿病の病態としては大血管症、細小血管症、自律神経異常、代謝異常があるが、いずれにしても心不全、不整脈といった生命の危機に直接つながるおそれがあり、その病態解明が必要である。従来からの研究方法だけでは問題の解決にはほど遠く、ここに新しく分子生物学的観点からアプローチを行う必要がある。遺伝子増幅装置 (PCR) の開発以来このような観点からの検討が容易になったが、本研究では主としてミトコンドリア遺伝子異常を検討することで糖尿病心臓障害の発生機序の解明、早期診断、治療法、予防法を開発していこうというの目標である。ミトコンドリア遺伝子異常はミトコンドリアミオパチーのひとつである MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) で 3243 番の点変異が発見され、その後心筋症、糖尿病との関わりがいられている。本研究では糖尿病患者におけるこの 3243 番の点変異の有無と心臓障害との関係、また、他の、点変異や欠失との関係を中心に、このようなミトコンドリア遺伝子異常が存在した場合の心機能、不整脈などへの影響を検討し、白血球のミトコンドリア遺伝子異常を検出することによる早期診断方法を可能にした。

## 研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
武田信彬	東京慈恵会医科大学 青戸病院内科助教授	ミトコンドリア遺伝子異常と心臓障害
門脇 孝	東京大学医学部 第三内科講師	ミトコンドリア遺伝子異常と糖尿病
杉山 理	(財)応用生化学 研究所部長	ミトコンドリア遺伝子異常と機能障害
豊田隆謙	東北大学医学部 第三内科教授	ミトコンドリア遺伝子異常と薬物治療

## 研究報告

### I 研究目的

本研究の目的は糖尿病による心臓障害を分子生物学的アプローチを中心に検討することである。わが国の糖尿病患者はすでに600万人を越そうとしているが、最近、糖尿病性心臓障害が心筋梗塞や心不全の原因の一つとして注目されている。しかし、これまで生理学や生化学の面からいろいろ検討されてきたにもかかわらず、その病態の解明にはほど遠いといわざるを得ない。この状態を打開するためには、一つには、最近急速に進歩している分子生物学の面からのアプローチ、もう一つには心臓だけでなく、血管や腎臓も含めた循環器、さらには糖尿病の成因そのものについて広い視野で考えていく必要があると思われる。このような観点から、本研究では糖尿病性心臓障害をヒト及び動物において分子生物学的手法を用いて検討する。

### II 研究計画及び材料と方法

#### 1 ミトコンドリア遺伝子異常の検討

糖尿病の原因となる遺伝子異常としてミトコンドリア遺伝子の異常が発見された、ミトコンドリア遺伝子異常は多臓器に出現するため末梢血白血球を調べることによって他臓器のミトコンドリア遺伝子異常も推測できる。従って、白血球のミトコンドリア遺伝子異常の検出が、心臓障害の発症前早期診断、発症後の重症度、予後の判定に役立つことが期待される。剖検心筋、生検心筋、末梢血白血球についてそれぞれミトコンドリア遺伝子異常を検討する。DNAの抽出は核DNAも一緒に抽出されるが、作製するオリゴヌクレオチドプライマーがミトコンドリアに対するものであるため、PCRで増幅されるDNA断片はミトコンドリアのものである。PCRはdenaturation 94°C、15秒、annealing 50°C、15秒、primer extension 72°C、80秒を1サイクルとして30サイクル行う。3243番の点変異を検出する場合は制限酵素Apa Iを使用する。

#### 2 ミトコンドリア機能異常の検討

ラットにストレプトゾトシンで糖尿病を発症させ、ミトコンドリア内に存在するピルビ

ン酸脱水素酵素 (PDH) の変化を検討。また、PDH キナーゼ活性は PDH complex の ATP 依存性不活性度を測定することで評価した。

### 3 その他

末梢血白血球におけるミトコンドリア DNA の塩基配列を調べ、3243 番以外の異常を検出した。また、ミトコンドリア遺伝子異常を有する心筋の電子顕微鏡像も検討。同様に末梢血白血球の核遺伝子を調べ、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子の多型性を検討。また、フローサイトメトリーによる細胞周期の検索を行った。

## III 研究成果

1 ヒト剖検左室心筋を用いた検討ではミトコンドリア DNA の D-loop 領域と ATPase 遺伝子の 8.4kb の間に存在する 7.4kb の欠失を 7 例中 5 例に認めた。末梢血白血球での検討では糖尿病 100 例、心筋症 8 例、虚血性心疾患 10 例、その他 2 例のうち糖尿病 1 例で同欠失を認めた。

2 糖尿病ラットの検討で、糖尿病群では心筋の PDH キナーゼ及び PDH 活性に大きな変化はなかったが、そのラットに高濃度食塩水を摂取させると心筋の PDH キナーゼ活性が正常ラットよりも約 3 倍上昇、それに伴い PDH 活性が著しく低下した。糖尿病ラットにインスリンを投与すると、両者は正常ラットのレベルに回復した。運動トレーニングを行ったラットではミトコンドリア DNA 量の増加、酵素チトクローム b の mRNA の増加を認めた。

3 患者の末梢血白血球で調べたミトコンドリア 3243 番の点変異は糖尿病患者の約 1% に認められた。また、Leucin tRNA3256 番の C から T への変異を有する患者を新たに発見した。この患者は糖尿病のコントロールは不安定で、増殖性網膜症、腎症、神経障害を認めた。心伝導障害は認めなかったが、骨格筋の萎縮が進行し、筋肉の 3256 番の C から T への変異はほぼ 100% であった。同様に 3271 番の A から G への点変異を発見した。この症例は難聴はあるものの神経症状は認められなかったが、母親に糖尿病、難聴、心不全を認めた。ミトコンドリア遺伝子異常を有する症例の心筋を電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアのサイズの縮小、数の増加を認めた。ミトコンドリア 3243 番の点変異がある糖尿病例では心室性不整脈を認める例が多かった。また、安静時 QTc の延長もみられた。CoQ10 の大量、長期投与でも心室性不整脈数は低下しなかったが、運動後の血清乳酸値の減少を認めた。マウスインスリンノーマ細胞株を EtBr 処理にてミトコンドリア遺伝子転写を抑制すると、グルコースによる細胞内 Ca 濃度の上昇やインスリン分泌の亢進がほぼ完全に抑制された。一方、SU 剤に対する反応は保たれていた。ミトコンドリア Leucin tRNA (3243) に A から G 変異を有す MELAS 患者の剖検心では隣ラ氏島のサイズの縮小、β 細胞数の減少などが認められた。糖尿病患者の剖検心を用いたフローサイトメトリーによる検討では、心疾患を有さない例に比べて、有意に細胞周期 G2M 期の細胞の増加を認めた。ACE 遺伝子多型に関しては II タイプが最も頻度が多かった。糖尿病剖検心筋では細胞周囲の線維化がみられた。

#### IV 考察

末梢血白血球を用いたミトコンドリア DNA 変異で後天的に生じたと思われる D-loop から ATPase 6 遺伝子の間 8.4kb に存在する 7.4kb の欠失は糖尿病患者 1 例のみに認められたが、この症例は心不全症状は呈していない。これはミトコンドリア遺伝子異常をもつミトコンドリアがある閾値以上に増加しないと機能は低下しないものと思われる。心筋では欠失は蓄積されるが、末梢血白血球では欠失が生じても壊れてしまい、検出が困難になるものと思われる。糖尿病で後天的にミトコンドリア遺伝子変異が生じるのはフリーラジカルが影響しているものと考えられる。3243 番と比較して頻度は低いながらも 3271 番点変異も心臓障害を合併する可能性のある糖尿病の原因遺伝子の一つとして考えられる。ミトコンドリア心筋症をその遺伝子型に基づいて分類、すなわちアミノ酸置換はあるものの蛋白合成系の変異はない群と蛋白合成に関与する tRNA、rRNA にも変異を有する 2 群に分けて、その病像の特徴の理解を計った。蛋白合成系の変異がある群では、ない群に比べると重篤で、ミトコンドリア脳筋症に伴う心筋症として診断されることも多い。このうち Leucine tRNA (UUR) 遺伝子 3243 番の A から G への変異をもつ患者では糖尿病の発現と心筋症がしばしばみられる。これまでミトコンドリア遺伝子 3243 番の A から G への点変異、8344 番の A から G への点変異、3394 番の C から T への点変異、多重欠失、重複による糖尿病が明らかになった。3243 番点変異例は高率に糖尿病、感音性難聴、心伝導障害を合併することが明らかになった。心拍変動で評価した自律神経障害は 3243 変異糖尿病症例のみならず、3243 変異 IGT 症例及び NGT 症例でも、それぞれ非変異糖尿病、IGT、NGT 症例に比較して有意に高頻度に認められた。また、QT 時間も 3243 変異糖尿病、IGT、NGT 症例はそれぞれ非変異糖尿病、IGT、NGT 症例に比較して有意に延長していた。3243 点変異と自律神経障害、QT 時間延長の関連性が明らかになったといえる。新しい糖尿病関連ミトコンドリア遺伝子異常において 3256 番の C から T への点変異は同じ DHU loop の変異である 3243 点変異、重篤な乳児心筋症を来す 3254 点変異と同様に tRNA の生理活性を障害し、ミトコンドリア機能を低下させ、インスリン分泌低下、筋萎縮を来すものと考えられる。ラットでの検討は糖尿病心における糖代謝は高濃度食塩摂取により著しく抑制されることを示唆しており、また、この代謝モデルは PDH キナーゼの活性及び遺伝子発現の調節機構を検討するのに有用と思われる。ミトコンドリア遺伝子異常の治療として CoQ10 の大量投与が試みられたが不整脈に関しては明かな効果はみられなかった。投与量、投与期間、投与対象を変えると違った結果かであるかも知れぬ。診断においても、ミトコンドリア遺伝子変異が多臓器に出現することを利用して、白血球ミトコンドリア遺伝子の検討で心筋ミトコンドリア遺伝子変異のスクリーニングかできることが期待される。

#### V 研究成果の発表

- 1 Takeda N, Tanamura A, Iwai T, Hayashi Y, Nomura S: Mutations of myocardial mitochondrial DNA in diabetic patients. In: heart hypertrophy and failure (eds) Dhalla NS, Pierce GN, Panagia V, Beamish RE. Kluwer Academic Publ., Boston, 1995, pp59-66.
- 2 Takeda N: Mitochondrial DNA mutations in diabetes mellitus and heart disease.

- Internal Med. 34: 932-932, 1995
- 3 Takeda N, Dixon IMC, Hata T, Elimban V, Shah KR, Dhalla NS: Sequence of alterations in subcellular organelles during the development of heart dysfunction in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 30 (suppl) S113-S122, 1996
  - 4 Takeda N: Mitochondrial DNA mutations and heart disease. *Exp Clin Cardiol* 1: 21-24, 1996
  - 5 Takeda N: Mitochondrial DNA mutations in diabetic heart. *Diabetes Res Clin Pract* 31 (Suppl): S123-S126, 1996
  - 6 Takeda N, Ota Y, Tanaka Y, Shikata C, Hayashi Y, Nemoto S, Tanamura A, Iwai T, Nakamura I: Myocardial adaptive changes and damage in ischemic heart disease. *Annals New York Acad Sci* 793: 282-288, 1996
  - 7 Xu Y-J, Elimban V, Takeda S, Ren B, Takeda N, Dhalla NS: Cardiac sarcoplasmic reticulum function and gene expression in chronic diabetes. *Cardiovasc Pathobiol* 1: 89-96, 1996
  - 8 Liu X, Takeda N, Dhalla NS: TroponinI phosphorylation in heart homogenate from diabetic rats. *Biochem Biophys Acta* 1316: 78-84, 1996
  - 9 Takeda N: Cardiomyopathies and mitochondrial DNA mutations. *Mol Cell Biochem* 176: 287-290, 1997
  - 10 Liu X, Takeda N, Dhalla NS: Myosin light-chain phosphorylation in diabetic cardiomyopathy in rats. *Metabolism* 46: 71-75, 1997
  - 11 Takeda N, Yamaguchi M, Doi K, Tanaka Y, Shikata C, Hayashi Y, Tsuchiya M, Tanamura A, Iwai T: Adaptation of myocardial energetics and mitochondrial DNA mutations. In: *Adaptation Biology and Medicine* (eds) Pandolf K, Takeda N, Singal P. Narosa Publ. House, Delhi, in press
  - 12 Yamaguchi M, Doi K, Tanaka Y, Shikata C, Hayashi Y, Tanamura A, Iwai T: Cardiac adaptations in diabetes mellitus. In: *Adaptation Biology and Medicine* (eds) Pandolf K, Takeda N, Singal P. Narosa Publ. House, Delhi, in press
  - 13 Maassen JA, Jansen N, Kadowaki T, van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ: The molecular basis and clinical characteristics of Maternally Inherited Diabetes and Deafness

- (MIDD), a recently recognized diabetic subtype. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes* 104: 205-211, 1996
- 14 Suzuki Y, Hata T, Atsumi Y, Kadowaki H, Odawara M, Taniyama M, Kadowaki T, Miyaoka H, Tanaka Y, Asahina T, Matsuoka K: Diabetes with the 3243 mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) mutation. *Diabetes Care* 19: 739-743, 1996
  - 15 Maassen JA and Kadowaki T: Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD), a new diabetes subtype. *Diabetologia* 39: 375-382, 1996
  - 16 Kadowaki T: Maternally inherited diabetes and deafness. A new type of diabetes mellitus. In: *Diabetes Mellitus* (eds) LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, 1996, pp591-595
  - 17 Suzuki Y, Kobayashi T, Taniyama M, Atsumi Y, Oka Y, Kadowaki T, Kadowaki H, Hosokawa K, Asahina T, Shimada A, Matsuoka K: Islet cell antibody in mitochondrial diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 35: 163-165, 1997
  - 18 Suzuki Y, Iizuka T, Kobayashi T, Nishikawa T, Atsumi Y, Kadowaki T, Oka Y, Kadowaki H, Taniyama M, Hosokawa K, Asahina T, Matsuoka K: Diabetes mellitus associated with 3243 mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation: insulin secretion and sensitivity. *Metabolism* 46: 1019-1023, 1997
  - 19 Hayakawa T, Noda M, Yasuda K, Yorifuji H, Sakura H, Terauchi Y, Hayashi J, Hanahan D, Kanazawa Y, Yazaki Y, Kadowaki T: Abolishment of glucose-regulated insulin secretion by inhibition of mitochondrial transcription in a pancreatic b-cell line. *J Biol Chem*, in press
  - 20 Hayakawa M, Katsumata K, Yoneda M, Tanaka M, Sugiyama S, Ozawa T: Age-related extensive fragmentation of mitochondrial DNA into minicircles. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 369-377, 1996
  - 21 Sugiyama S, Yamada K, Hayakawa M, Esumi H, Ozawa T: Effects of ubiquinone enriched diet on deterioration of mitochondrial respiratory function caused by fried beef derived mutagenic factor in rats. *Biochem Mol Biol Int* 40: 305-314, 1996
  - 22 Nakai N, Sato Y, Oshida Y, Yoshimura A, Fujitsuka N, Sugiyama S, Shimomura Y: Effects of aging on the activities of pyruvate dehydrogenase complex and its kinase in rat heart. *Life Sci* 60: 2309-2314, 1997

- 23 Sugiyama S: HMG CoA reductase inhibitor accelerates aging effect on diaphragm mitochondrial respiratory function in rats. *Biochem Mol Biol Int*, in press
- 24 Hirai M, Suzuki S, Onoda M, et al.: Mitochondrial DNA 3349 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 951-955, 1996
- 25 Suzuki S, Ohtomo M, Satoh Y, et al.: Effect of manidipine and delapril on insulin sensitivity in Japanese type 2 diabetic patients with essential hypertension. *Diabetes Res Clin Pract* 33: 43-51, 1996
- 26 Toyota T, Satoh J, Suzuki S: Diabetic neuropathy. *Internal med* 36: 139-142, 1997
- 27 Suzuki Y, Muramatsu T, Taniyama M, et al.: No association of ALDH2 genotype in MELAS. *Diabetologia* 40: 1241-1242, 1997
- 28 Suzuki Y, Suzuki S, Hinoko Y, et al: Diabetes associated with a novel 3264 mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation. *Diabetes Care* 20: 1138-1140, 1997
- 29 Sato Y, Hirai S, Muto G, Ohta S, Suzuki S, Toyota T: Screening for diabetes in school children in Sendai. *Excerpta Med Int Congress Series* 1141: 33-36, 1997
- 30 Liu A, Suzuki S, Hirai M, et al.: Association of mitochondrial DNA 3394T-C mutation NADH dehydrogenase subunit I with Japanese and Chinese non insulin dependent diabetes mellitus. *Excerpta Med Int Congress Series* 1141: 73-78, 1997
- 31 Ogata M, Uchimura T, Iizuka Y, et al.: Effect of non-insulin dependent diabetes on cyclosporin disposition in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochem Pharm Bull* 20: 1026-1029, 1997
- 32 Suzuki S, Hinoko Y, Ohtomo, et al.: The effects of coenzyme Q10 treatment on maternal-inherited diabetes mellitus with deafness and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Diabetologia*, in press
- 33 Hinoko Y, Suzuki S, Komatsu K, et al.: Oxidative DNA damage and its relationship to diabetic complications. *Diabetes*, in press
- 34 Hirai M, Suzuki S, Onoda M, et al.: Mitochondrial DNA mutation in an Japanese family with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, in press

35 Hirai M, Suzuki S, Hinoko Y, Chiba M, Hirai A, Toyota T: Group-specific component protein genotype is associated with non-insulin dependent diabetes mellitus in Japan. *Diabetologia*, in press