

|        |  |
|--------|--|
| 氏名（本籍） | 成瀬元気（岐阜県）  |
| 学位の種類  | 博士（医学）   |
| 学位授与番号 | 甲第1103号  |
| 学位授与日付 | 平成31年3月25日   |
| 学位授与要件 | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位論文題目 | The Intestine Responds to Heart Failure by Enhanced Mitochondrial Fusion through Glucagon-like Peptide-1 Signaling |
| 審査委員   | （主査）教授 森田 啓之<br>（副査）教授 土井 潔 教授 矢部 大介   |

## 論文内容の要旨

### 【目的, 諸言】

GLP-1 (glucagon-like peptide-1) は遠位小腸および大腸から分泌され、膵B細胞からのインスリン分泌を刺激するペプチドホルモンである。一方、GLP-1R (GLP-1 receptor) が心筋細胞にも発現されるという既報から GLP-1 の心臓に対する直接作用が想定されてきた。我々は、心不全患者において心機能低下の程度に応じて血中 GLP-1 濃度と心筋細胞の GLP-1R 発現が増加していることを報告した。しかし、心不全において増加した GLP-1 の病態生理学的意義は不明である。今回、高血圧性心不全モデルラットを用いて、GLP-1 の動態と心機能に対する影響、およびその機序を調べた。

### 【対象と方法】

Dahl 食塩感受性ラット (DS ラット) を高血圧性心不全モデル、Dahl 食塩抵抗性ラット (DR ラット) を非心不全コントロールモデルとして使用した。これらの動物に腸管からの GLP-1 分泌促進薬として  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤 miglitol (100mg/kg/day) と GLP-1 受容体拮抗薬 exendin (9-39) (2.2 nmol/kg/day) をそれぞれ投与し、食塩負荷 6 週後、11 週後に血圧と心機能 (心エコー・心カテーテル) を評価した。また、血液と組織を採取し、免疫染色、western blotting、RT-PCR により、心筋と腸管の組織学的評価と細胞内シグナル解析、細胞内超微細形態評価のため透過型電子顕微鏡観察を行った。さらに、*in vitro* で GLP-1 の心筋細胞への直接作用を検討した。

### 【結果】

DS ラットは食塩負荷後著明な高血圧を呈し、6 週で求心性肥大、11 週で左室拡張末期径 (LVDd) の拡大と左室駆出率の低下を認めた。心カテーテル法による心内圧測定では、左室拡張末期圧 (LVEDP) の上昇、収縮・拡張能の低下を認めた。心/体重比が増加して心肥大を認め、心筋細胞の肥大と線維化が見られた。DS ラットに miglitol を投与した群では、LVDd の拡大、収縮・拡張能の低下、LVEDP 上昇、心肥大、心筋線維化、心筋細胞肥大は全て軽減された。一方、exendin (9-39) 投与群では LVDd の拡大、心機能低下、心肥大、心筋線維化、および心筋細胞肥大が増悪した。DS 心不全ラットでは、小腸の GLP-1 分泌および血中 GLP-1 濃度が上昇し、miglitol 投与群と exendin (9-39) 投与群では、さらに上昇した。しかし、miglitol や exendin (9-39) による血糖値、HbA1c、血中インスリン濃度に対する影響は認められなかった。なお、DR ラットでは高血圧、心機能低下を呈することはなく、miglitol や exendin (9-39) 投与による血圧、心機能への影響もなかった。

次に、心筋において GLP-1R 下流シグナルである PKA (protein kinase A) の検討を行った。PKA

活性のマーカーである CREB (cAMP response element binding protein), ATF-1 (activating transcription factor 1) のリン酸化は DS 心不全ラットで増加し, miglitol 投与群でさらに増加した。一方, exendin (9-39) 投与群では減少した。

次に, 心筋細胞のミトコンドリアに着目した。DS 心不全ラットでは, ミトコンドリアのサイズが大きくなり, 数が減少した。Miglitol 投与群ではさらなるサイズ拡大と数の減少を, exendin (9-39) 投与群では縮小と数の増加を認めた。また, 心筋内 ATP 含有量は, DS 心不全ラットでは減少したが, miglitol 投与群では増加し, exendin (9-39) 投与群では減少した。心筋内 ATP 含有量と心機能が相関していたことから, ミトコンドリアダイナミクス変化を介した形態変化が心機能の変化に影響したと考えられる。そこでこれに関連した蛋白を検討したところ, DS 心不全ラット心筋では DRP-1 (dynamin-related protein 1) の Ser637 のリン酸化と mitofusin-1, OPA-1 の発現が増加した。Miglitol 投与群ではこれら蛋白のリン酸化や発現がさらに増加し, exendin (9-39) 投与群では減少した。

最後に, GLP-1 が心筋細胞の GLP-1R を介して作用することを *in vitro* でラット幼若心筋細胞を用いて検討した。GLP-1 を投与した心筋細胞では DRP-1 のリン酸化, mitofusin-1 の発現および ATP 含有量が増加した。また PKA 刺激薬 forskolin でも同様の結果が得られた。一方, これらの効果は exendin (9-39) や PKA 阻害剤 H-89 を投与することでキャンセルされた。

#### 【考察】

本研究では, 高血圧性心不全モデルラットにおいて内因性 GLP-1 の上昇は腸管の GLP-1 分泌増加によること, その意義は心機能低下に対する代償反応であることが示された。このことは心不全における「心腸連関」の存在を示唆する。また, GLP-1 の心保護作用機序のひとつに GLP-1R を介したミトコンドリアダイナミクスへの影響が考えられる。GLP-1 投与により, 心筋細胞のミトコンドリア総量が増加することなく, ミトコンドリア形態が変化した。すなわち, GLP-1 は GLP-1R-PKA-DRP-1 経路を介してミトコンドリアの融合を誘導し, ATP 産生を増加することで心筋細胞内のエネルギー状態を維持し, 心機能改善に寄与したと考えられる。

#### 【結論】

高血圧性心不全モデルラットにおける血中 GLP-1 濃度増加は, 心機能低下に対する代償反応であることが示唆された。Miglitol は血中 GLP-1 濃度を増加させて心筋細胞のミトコンドリア機能を改善することにより, 心機能低下を改善させた。以上より, 心不全の治療として, 内因性 GLP-1 を増加させる方法の有効性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 成瀬元気は, 高血圧性心不全モデルラットを用いて GLP-1 の動態と病態生理学的意義を検討することにより, 心不全における「心腸連関」の存在を明らかにした。その中で, GLP-1 の抗心不全作用機序のひとつが, 心筋細胞の GLP-1 受容体を介したミトコンドリアダイナミクスへの影響であることを初めて明らかにした。本研究の成果は, 循環器病学ならびに細胞生物学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Genki Naruse, Hiromitsu Kanamori, Akihiro Yoshida, Shingo Minatoguchi, Tomonori Kawaguchi, Masamitsu Iwasa, Yoshihisa Yamada, Atsushi Mikami, Masanori Kawasaki, Kazuhiko Nishigaki, Shinya Minatoguchi: The intestine responds to heart failure by enhanced mitochondrial fusion through glucagon-like peptide-1 signaling. *Cardiovascular Research*, doi: 10.1093/cvr/cvz002 (2019).