

平成元・2年度科学研究費補助金

# 研 究 成 果 報 告 書

(一 般 研 究 C)

## 糖尿病心筋におけるカルシウムチャネル 異常の分子機構とその臨床的意義

平 成 3 年 3 月

滋賀医科大学第三内科講師

研究代表者 柏 木 厚 典



(研究課題番号 01570357)

# 目 次

1. は し が き .....	1
2. 研 究 発 表 .....	2
(1) 学 会 誌	
(2) 出 版 物	
3. 研 究 成 果	
糖尿病心筋におけるカルシウムチャネル異常の分子機構 とその臨床的意義 ーまとめー	
ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋膜電位依存性 カルシウムチャネル異常 .....	資料 1
ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋細胞膜分画への [ <sup>3</sup> H] PN200-110結合能増加について .....	資料 2
ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋細胞膜 $\beta$ -アドレナリン 受容体の膜特異的低下について .....	資料 3
糖尿病ラット心筋プロテインキナーゼC活性とそれに及 ぼすベラパミル効果 .....	資料 4
糖尿病に特異的な心病変と臨床像 .....	資料 5

滋賀医科大学附属図書館



1990025238

## は し が き

糖尿病患者における心合併症は死因の第一位を占め、その特異病態は代謝障害及び血管障害の面から検討されている。一方最近心不全、心筋症、虚血性心筋障害と細胞内カルシウム貯留の密接な関係が指摘されている。糖尿病患者心筋組織には過剰のカルシウムが沈着していることが報告されている。一方実験的糖尿病ラット心筋では初期よりミトコンドリアの形態異常が認められ、カルシウムの細胞よりの排泄障害をきたすことが示唆されている。このように糖尿病心筋細胞における心筋細胞障害及び変性機構として糖尿病代謝障害と密接に関連した心筋内カルシウム調節異常すなわち流入の過剰と排泄障害がその主要因である可能性が示唆されている。本研究では糖尿病ラット心筋組織又は単離心筋細胞を用いて次のことを検討する。①糖尿病代謝障害は筋細胞内でのカルシウム貯留をきたすか？②増加した細胞内カルシウムの局在性（ミトコンドリア、小胞体など）と細胞小器官障害、③心筋内カルシウムチャネルの異常とその異常の分子機構を明らかにする。④カルシウム拮抗剤を用いて糖尿病性心筋障害治療の新しいところみを行う。

### 研究組織

研究代表者 柏木厚典（滋賀医科大学第三内科）

協同研究者 西尾善彦，紀田康雄，小川勉，田中逸，朝比奈崇介，  
阿部奈々美，池淵元祥，高木敬之（滋賀医科大学第三内科），  
佐伯行一（滋賀医科大学実験実習機器センター）

### 研究経費

平成元年度 1,300千円

平成2年度 900千円

---

2,200千円

# 研 究 発 表

## (1) 学 会 誌

1. Nishio Y., Kashiwagi A., Kida Y., Kodama M., Abe N., Saeki Y., Shigeta Y. : Deficiency of  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 37 : 1181-1187, 1988.
2. Kashiwagi A., Nishio Y., Saeki Y., Kida Y., Kodama M., Shigeta Y. : Plasma membrane-specific deficiency in cardiac  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 37 : (85A) 1988.
3. Is difference of arterial and venous oxygen content a possible marker for diabetic foot. : *Diabetes Care* 11 : 515-516, 1988.
4. 阿部奈々美, 柏木厚典, 紀田稔雄, 西尾善彦, 児玉光顕, 田中逸, 繁田幸男. : 糖尿病患者のうっ血性心不全—9年間の入院患者606例での検討—. *糖尿病* 32 : 683-685, 1989.
5. Kashiwagi A., Nishio Y., Saeki Y., Kida Y., Kodama M., Shigeta Y. : Plasma membrane-specific deficiency in cardiac  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozocin-diabetic rats. *Am J Physiol.* 257 : E127-E132, 1989.
6. 柏木厚典, 西尾善彦, 小川勉, 児玉光顕, 朝比奈崇介, 池淵元祥, 繁田幸男. : ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋膜電位依存性カルシウムチャンネル異常(速報). *糖尿病* 32 : 683-685, 1989.
7. Nishio Y., Kashiwagi A., Ogawa T., Asahina T., Ikebuchi M., Kodama M., Shigeta Y. : Increase in [ 3 H] PN200-110 binding to cardiac muscle membrane in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 39 : 1064-1069, 1990.
8. Tanaka Y., Kashiwagi A., Ogawa T., Abe N., Asahina T., Ikebuchi M., Takagi Y., Shigeta Y. : Effect of verapamil on cardiac protein kinase C activity in diabetic rats. (submit to *Eur J Pharmacol* 1991)
9. Kashiwagi A., Obata T., Suzaki M., Takagi Y., Kida Y., Ogawa T., Tanaka S., Asahina T., Ikebuchi M., Saeki Y., Kikkawa R., and Shigeta Y. : Increase in cardiac muscle fructose content in streptozocin-induced diabetic rats. (submit to *Metabolism* 1991)
10. 小川勉, 柏木厚典, 繁田幸男. : 糖尿病ラット骨格筋における電位依存性カルシウムチャンネル異常と細胞内カルシウム蓄積(糖尿病 投稿予定, 1991)

## (2) 出 版 物

11. 柏木厚典. 糖尿病に特異的な心病変と臨床像(総説) *糖尿病カレントレビュー* 175-199, 1990.
12. 柏木厚典. 糖尿病性心筋障害と細小血管症の関係—病態と成因(特集・糖尿病と心臓) *プラクティス* 7 : 309-314, 1990.

13. Shigeta Y., Kashiwagi A. : New aspects in prevention and cure of diabetes mellitus and its complications. Current status of prevention and treatment of diabetic complications. (Elsevier Science Publishers BV, 99-107, 1990)
14. Kashiwagi A., Abe N., Kida Y., Nishio Y., Kodama S., Tanaka S., and Shigeta Y. : Frequency and risk factors of congestive heart failure in diabetic patients. Current status of prevention and treatment of diabetic complications. (Elsevier Science Publishers BV, 603-607, 1990)
15. Nishio Y., Kashiwagi A., Kida Y., Kodama M., Abe N., Shigeta Y. : Specific decrease in cardiac cell surface  $\beta$ -adrenergic receptor in streptozocin-diabetic rats. Current status of prevention and treatment of diabetic complications. (Elsevier Science Publishers BV, 620-623, 1990)
16. Shigeta Y., Kashiwagi A. : Pathophysiological mechanism of defective inotropic response to a  $\beta$ -adrenergic agonist in the diabetic heart. (Reaven Press, 35-44, 1991)
17. Kashiwagi A., Shigeta Y. : Hemostatic abnormalities in diabetic macroangiopathy. Diabetic complications, Epidemiology and pathogenetic mechanisms. (Reaven Press, 345-358, 1991)
18. Kashiwagi A., Nishio Y., Ogawa T., Tanaka Y., Kodama M., Asahina T., Ikebuchi M., Shigeta Y. : Increases in Voltage-sensitive calcium channel of cardiac and skeletal muscle in streptozocin-induced diabetic rats. (In press, Kluwer Academic Publisher, 1991)

# 研 究 成 果

## 糖尿病心筋におけるカルシウムチャネル異常の分子機構とその臨床的意義—まとめ

### 1. 糖尿病心筋における代謝障害により心筋内カルシウム分布異常をきたし、カルシウム貯留をきたすか？

ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラット心筋細胞内小器官 (ミトコンドリアMIT, 筋小胞体SR) のカルシウム含量と細胞障害: 細胞内カルシウムの定量は Mata M. et al (Histochem 87: 339, 1987) らの蓚酸ピロアンチモネート法を一部改変し、マイクロウエーブ固定法 (水平博士の開発した方法 Acta Histochem Cytochem 23: 501, 1990) を併用して電子顕微鏡上にて Energy disperse X-ray microanalysis 法にて測定した。糖尿病作成20週のSTZラットはこれまでの報告と同じく、MITの膨潤とクリステの配列異常が認められ、一部 Myofibril の粗造化と錯綜配列、脂肪空胞のMIT周囲への集積が認められた。すなわち心筋変性の課程が進行していることが示唆された。正常、糖尿病共に細胞内カルシウムピロアンチモネートの結合物は主にMIT, SRに存在する。DMになると特にMITへのカルシウム沈着が明らかとなり対照に比して48%の増加を示した。またカルシウムのMIT内分布はMITにより heterogenous であり、分布は広くその中央値は高値側へ変位していた。特にMITの形態的異常の大きいものにその高値を認めた。糖尿病心筋のSRにもカルシウムの貯留の強いことが示唆されたがその変化は軽微であった。これらの結果は今後論文にする予定である。

### 2. 心筋内カルシウムチャネル異常とその異常の分子機構

論文6, 7に示すように、糖尿病心筋細胞膜の電位依存性カルシウムチャネル (VOCC) を L-type, VOCC数をその特異的阻害剤である (3H) PN200-110を用いて測定したところ、糖尿病作成後6週以後増加し、10週では対照に比し結合数が64%増加したが結合の親和性には差を認めなかった。またその結合に対する verapamil の抑制効果は糖尿病ラット群では対照に比し軽度であり、結合に関し

て質的異常も認められた。VOCCの増加が細胞内カルシウムの増加に実際働いているかに関しては、今後更に検討を要する。細胞内45Caの流入, Patch clamp法の検討, VOCC蛋白の増加, mRNAの変動も検討中である。

### 3. 糖尿病ラット骨格筋におけるVOCCの異常と細胞内カルシウム分布異常

論文10で投稿を予定しているが、糖尿病心筋で認められた細胞内カルシウム異常がヒラメ筋でも認められた。すなわち22週のDMラットヒラメ筋組織内カルシウム含量を組織を可溶化後原子吸光法で測定したところ対照に比し42%増加した。更に細胞内カルシウム局在性をX線微小分析法を用いて検討したところ糖尿病ラットMIT内カルシウム含量は心筋と同じく高値に変位していた。下腿三頭筋より作成した粗膜分画への [3H] PN200-110結合を検討したところ、VOCC数は糖尿病作成後6週から増加し、10週では対照に比し91%増加したが、結合の親和性には異常を認めなかった。

### 4. カルシウム拮抗剤の糖尿病心筋 protein kinase C (PKC) 活性に及ぼす影響

論文8にて投稿しているが、糖尿病心筋内PKC活性を膜分画、可溶性分画に分けて測定したところ、対照群に比し細胞膜分画では41%, 可溶性分画では94%増加していた。心筋PKC活性化は negative inotropic and chronotropic に働くといわれていて、糖尿病心筋において既に我々が報告したごとく  $\beta$ -アドレナリン作用不全 (論文1, 2, 5, 15, 16) とともに心機能不全に何らかの役割を果たしていることが考えられ、現在  $\alpha$ -アドレナリン作用不全との関係を検討中である。糖尿病心筋PKC活性の異常に対する *invivo* verapamil 投与の効果を検討したところ、糖尿病に於けるそれら異常は正常化した。

### 5. 糖尿病心筋におけるポリオール代謝系の検討—特に

#### 心筋内フルクトースの異常蓄積—

論文 9 にて投稿しているが、糖尿病における高血糖は心筋内でポリオール代謝系を活性化して正常対照ラット心筋に比し65倍のフルクトースの貯留を認め、最近 nonenzymatic fructosylation の重要性が話題になっていることから、その心筋障害に於ける意義に関する検討を考慮している。