HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the changes of oxidative stress and autophagy in the hearts of streptozotocin-induced early diabetes rats, and the improvement effects by azuki bean (Vigna angularis) extract [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	冨原, 朋美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第13705号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74972
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomomi_Tomihara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

様式　5

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（保健科学）　　氏名：冨原（北）　朋美

学位論文題名

Studies on the changes of oxidative stress and autophagy in the hearts of streptozotocin-induced early diabetes rats, and the improvement effects by azuki bean (*Vigna angularis*) extract

（ストレプトゾトシン誘導初期糖尿病ラットの心臓における酸化ストレスおよびオートファジーの変化と小豆抽出物による改善効果に関する研究）

【緒言】

糖尿病は高血糖症を特徴とする代謝性疾患で、様々な器官や組織で機能障害と合併症を引き起こす。常時収縮・弛緩を繰り返す心臓は恒常的にATP供給が必要で、ATPは主に脂肪酸（FA）と糖代謝で生産される。通常の心臓ではATPの60～70%をFAβ-酸化により生産するが、糖尿病では糖代謝が通常通り行えないため、FAβ-酸化によりATPの90～100%を生産する。心筋でのFA取込み・FA酸化の増加により生じる過度のROS生産は、細胞や組織へ酸化的ダメージを与える。その酸化的ダメージは、糖尿病性心筋症発症の特徴である心筋細胞死、線維化、心肥大、オートファジー機能異常を生じさせ、最終的には心不全を引き起こす。

最近の研究で、エピガロカテキン、ケルセチンやレスベラトロールのような植物由来ポリフェノールには、代謝性疾患における運動やカロリー制限に似た効果があり、肥満、心血管疾患や糖尿病に有益であることが示された。また、糖尿病発症から16週のSTZ誘導糖尿病マウスにおいて心肥大、線維化、オートファジー停滞が観察されるが、レスベラトロール長期投与が心機能低下、オートファジー機能異常、酸化的損傷を改善させたという報告がある。

小豆はプロアントシアニン、カテキンやケルセチンなどの植物由来のポリフェノールが豊富で、抗酸化作用がある。小豆は、酸化ストレス、高血圧、肥満や糖尿病に有益な効果をもつという先行研究がある。また、小豆抽出物(ABE)はSTZ誘導初期糖尿病ラットの腎臓で酸化的ストレスを減少させ、オートファジーを刺激することも知られている。しかし、初期糖尿病の心臓での酸化的ストレスやオートファジー機能変化についての研究はほとんどなく、ABEが糖尿病の心臓の機能変化の予防や改善に有効かどうかについては明らかにされていない。そこで本研究では、STZ誘導初期糖尿病（糖尿病発症後4週目）ラットの心臓における酸化ストレス状態および酸化ストレスと密接な関係にあるオートファジー機能の変化を明らかにすること、およびABEが心臓での酸化的ストレスやオートファジー機能変化にもたらす効果を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

実験にはWistar系雄ラットを用い、12時間の明暗サイクル下で23±1℃の温度で飼育した。6週齢のラットに対し0.05Mクエン酸緩衝液(pH4.6)0.5mLに溶解したSTZを尾静脈に単回静脈内注射（55mg/kg体重）した。STZ注入45時間後に血漿中グルコース濃度を測定し300mg/dL以上の動物を糖尿病モデルラットとして用いた。コントロール群（Cont群）と糖尿病群(STZ群)には蒸留水のみを、糖尿病+ABE投与群（STZ+ABE群）には40mg/kgのABE溶液を4週間経口投与した。一晩絶食させた後、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で解剖し、血液と心臓を採取した。

血漿中のグルコース濃度はグルコースCⅡ-テストワコーを用いて測定し、心臓組織中の酸化ス

トレスおよびオートファジー関連タンパク量はウェスタンブロット法を用いて測定した。また、8-OHdGは、特異的なモノクローナル抗体を用いてELISAにより測定した。統計分析は一元配置分散分析後、Fisher's exact testを行った。

【結果】

Cont群と比較して糖尿病群（STZ群、STZ+ABE群）において血漿中のグルコース濃度およびペルオキシソームに局在するACOX1とカタラーゼ量は有意に高かった。STZ群におけるp62、リン酸化p62（p-p62）およびHO-1量は、Cont群と比較して有意に高く、ABE投与によりp-p62、HO-1および8-OHdGのレベルは有意に低下した。mTOR、Beclin1、LC3(LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比)やAtg7量などのオートファジー誘導・開始に関連するタンパク質量は各群において有意な変化は認められなかったが、オートファゴソーム-リソソーム融合に関連するLAMP2量および融合阻害に関連するO-GlcNAc修飾タンパク質量はCont群と比較してSTZ群において有意に高かった。一方、STZ+ABE群においては有意な変化はみられなかった。

【考察】

FAβ-酸化が行われると、その過程でH_2O_2などのROSが生成され、細胞にダメージを与えることが知られている。ACOX1はペルオキシソームの直鎖FAβ-酸化システムの律速酵素であり、カタラーゼの標的基質であるH_2O_2を生成する。ペルオキシソームに局在するカタラーゼは、H_2O_2から酸素と水への変換を触媒する抗酸化酵素である。糖尿病群でACOX1量およびカタラーゼ量が増加したことから、ペルオキシソームFAβ-酸化およびH_2O_2産生が増加したことが示唆された。ABEの投与はこの変化に影響を及ぼさなかった。STZ群において酸化ストレスマーカーであるp62、p-p62、HO-1量はCont群と比較して有意に高かったことから、STZ群の心臓は酸化的ダメージが大きいことが示唆された。またABE投与によりp-p62、HO-1および8-OHdGのレベルはSTZ群と比較して有意に低下した。これらのことより、ABEはSTZ誘導糖尿病により上昇した血糖値やACOX1量の増加に対して効果はなかったが、酸化的損傷を抑える効果があることが明らかになった。

先行研究でオートファジーに必須なタンパク質の欠損などによりオートファジー機能不全が生じると、損傷した細胞小器官やタンパク質などのオートファジーで分解される物質をオートファゴソームへ運搬する役割を担うp62やp-p62が蓄積することが知られている。また、糖尿病モデル動物（糖尿病発症から16週）の心臓においてもp62の蓄積が報告されている。本研究でもp62、p-p62量がSTZ群で有意に増加していたため、STZ誘導初期糖尿病ラットの心臓でもオートファジー機能異常が生じていることが示唆された。このメカニズムを明らかにするため、オートファジー関連タンパク質について検討した。オートファジーの誘導・開始で重要なmTOR、Beclin1、LC3(LC3Ⅱ/LC3Ⅰ比)およびAtg7量は各群において有意な変化は認められなかった。しかし、オートファゴソームとリソソームの融合に必要なLAMP2量、それらの融合阻害に関連するO-GlcNAcによるタンパク質修飾はCont群と比較してSTZ群において有意に高かった。これらの結果から、初期糖尿病の心臓ではオートファジー誘導・開始関連タンパク質に変化はないが、p62・p-p62量の増加とオートファゴソームとリソソームの融合に関連するタンパク質に変化が生じていることが示された。これらの変化は、ABE投与により抑制されることが明らかになった。

【結論】

STZ誘導初期糖尿病ラットの心臓でペルオキシソームACOX1、カタラーゼ、p62、p-p62およびHO-1量が増加したことから、初期糖尿病の心臓ではペルオキシソームFAβ-酸化が亢進し、酸化的ストレスが増加していることが示唆された。ABEは酸化ストレスマーカーであるp-p62、HO-1、8-OHdGレベルを有意に低下させた。これらの結果から、ABEは抗酸化作用を有し、STZ誘導初期糖尿病ラットの心臓を酸化的損傷から保護することが示唆された。

STZ群においてp62、p-p62量、およびオートファゴソームとリソソームの融合に関連するLAMP2、O-GlcNAc修飾がCont群と比較して有意に増加したことから、STZ誘導初期糖尿病ラットのオートファジー機能に異常が生じていることが示唆された。また、糖尿病動物の心臓におけるオートファジー機能異常は、オートファゴソームとリソソームとの融合阻害から始まる可能性が示唆された。これらの結果から、ABEには初期糖尿病によるp62、p-p62、LAMP2およびO-GlcNAc修飾量の増加を抑える効果があり、糖尿病初期からのABE投与はオートファジー機能の維持にも効果がある可能性が示唆された。