
原 著

メトホルミンはラット実験的自己免疫性心筋炎における 心筋障害を減弱し心機能を保護する

富 田 任

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野

(指導：南野 徹教授)

Metformin Attenuates Myocardial Damage and Left Ventricular Dysfunction in Rat Experimental Autoimmune Myocarditis

Makoto TOMITA

Department of Cardiovascular Biology and Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Tohru MINAMINO)

要 旨

【背景】メトホルミンは2型糖尿病薬として広く使用されており、インスリン抵抗性を改善し血糖値を低下させる。この作用は主に肝臓や筋肉内でアデノシン一リン酸 (AMP)-活性化蛋白キナーゼ (AMPK) を活性化することによる。近年、AMPKのシグナリング活性化が心血管保護にも有益であることが明らかになってきている。心筋の炎症に対するメトホルミンの効果は明らかではなく、ラット実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) を用い、メトホルミンの効果を検討した。

【方法・結果】8週齢のLewisラットに心筋ミオシンを感作しEAMを作製した。メトホルミンおよび溶媒で治療を行い、活動性炎症期である感作20日後に評価を行った。メトホルミン投与群では治療対象群に比し、左室壁厚増加の抑制、左室駆出率低下の改善、左室の炎症・障害の改善を認めた。また、治療対象群では左室心筋においてAMPK α サブユニットのリン酸化が抑制されたが、メトホルミン投与により著明な活性化を認めた。更に、EAM活動性炎症期の心臓から抽出した心臓非心筋細胞 (線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ) を培養し、メトホルミンの存在、非存在下においてTumor Necrosis Factor (TNF)- α を添加し、炎症関連遺伝子の発現を検討した。TNF- α を添加した心臓非心筋細胞ではInterleukin (IL)-1, IL-6, inducible nitric oxide synthase (iNOS), Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1の

Reprint requests to: Makoto TOMITA
Department of Cardiovascular Biology and
Medicine Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野
富田 任

mRNA 増加を認めたが、メトホルミン存在下では有意に抑制された。

【結論】メトホルミンは、EAM ラットの急性期心筋障害、心機能低下を抑制した。心臓非心筋細胞からの炎症性サイトカイン産生抑制が機序の一つとして推察された。

キーワード：メトホルミン、実験的自己免疫性心筋炎、AMPK

緒 言

メトホルミンは2型糖尿病治療の第一選択薬として広く使用されているピグアナイド薬である。筋肉での糖の取り込み亢進、肝臓での糖新生抑制などの作用により、インスリン抵抗性を改善し血糖値を低下させる¹⁾。大規模臨床試験である英国前向き糖尿病試験(UKPDS)では、メトホルミンによる治療はインスリンやスルホニルウレアによる治療と比較し、同等の血糖降下作用にも関わらず、糖尿病関連の心血管死や心筋梗塞のリスクを低下させた²⁾。メタ解析では、メトホルミンは心不全や糖尿病を有する患者において、有害事象を生じることなく全死亡を低下させる唯一の糖尿病治療薬であることが示された³⁾。これらの結果は、メトホルミンが血糖降下作用を超えた心保護効果を有することを示唆している。

メトホルミンの作用機序の一つとして、アデノシンリン酸(AMP)-活性化蛋白キナーゼ(AMPK)の活性化が知られている。AMPKは、5'-AMPによって活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである。酵母のsnf1プロテインキナーゼ・サブファミリーに属し、ほとんど全ての真核細胞に広く保存されている。哺乳動物のAMPKは、細胞内AMP濃度上昇によって活性化し、脂肪合成、コレステロール合成、蛋白合成などATPを消費する同化作用を抑制するとともに、解糖系、脂肪酸酸化などATP産生を促す異化作用を促進する。それゆえAMPKは、細胞内のエネルギー要求度に応じて中間代謝を制御する、いわゆる“metabolic sensor”、“fuel gauge”と呼ばれ、ストレス環境下でのエネルギー代謝の調節において中心的な役割を果たしている⁴⁾。近年、AMPKのシグナリング活性化が心血管保護に働くことが実験的に報告さ

れ、犬のペーシングによる心不全モデルやマウスの虚血再灌流モデルにおいて、メトホルミンはAMPKのリン酸化を介して心保護効果を示した⁵⁾⁶⁾。さらにメトホルミンは抗炎症作用⁷⁾や抗酸化作用⁸⁾⁻¹¹⁾を有することも明らかになってきているが、心臓炎症性疾患に対する効果を検討した報告はない。劇症型心筋炎は重篤な炎症性心疾患であり、急性期には心筋組織への炎症性細胞浸潤、心筋細胞の壊死、脱落を来す。その結果、高度の心機能障害を引き起こし、時に致死的となるため、急性期における有効な治療法の確立が望まれている。本研究では、ヒト劇症型心筋炎の動物モデルであるラット実験的自己免疫性心筋炎(experimental autoimmune myocarditis, 以下EAM)¹²⁾に対するメトホルミンの効果とその作用機序について検討を行った。

材料と方法

1. EAMの作成、薬剤の投与

7週齢の雄Lewisラットを日本チャールズリバー株式会社より購入し、新潟大学医学部動物実験施設で飼育・管理した。実験中、全ての動物は、当施設とアメリカ国立衛生研究所の実験動物取扱ガイドラインに従って管理した。EAMラットは既報の如く、8週齢のLewisラットをイソフルレンにより麻酔し、心筋ミオシン2.0mgと結核菌H37Raを含む完全フロイントアジュバントを混和した溶液を足底に注射し作製した¹²⁾。対照群には生理食塩水を投与した。

心筋ミオシンまたは生理食塩水で感作したラットを無作為に以下の3群に分け、心筋ミオシン感作直後より20日間、蒸留水または蒸留水に溶解したメトホルミン(300mg/kg/day)を12時間

毎に胃ゾンデより経胃投与した。3群は以下の通り：(1) 蒸留水を投与した対照ラット (CTL-DW, n = 3), (2) 蒸留水を投与した EAM ラット (EAM-DW, n = 7), (3) メトホルミン 300mg/kg/日を投与した EAM ラット (EAM-Met300, n = 7)。メトホルミン (1, 1-dimethylbiganide hydrochloride) はシグマ・アルドリッチより購入した。メトホルミンの容量は既報の報告¹³⁾¹⁴⁾, および予備実験より決定した。

2. 血圧, 心拍数および心機能計測

11週齢に達した時点(治療開始20日後)で, 心機能, 血圧, 心拍数測定を行った。2%のイソフルレンにて麻酔を導入した後, 0.5%に減量し, 8-14Hzプローブを用い, 以前我々が報告した方法¹⁵⁾により心臓エコー(ALOKA社製SSD-3500SV)を実施し, 心機能評価を行った。血圧測定にはTail-cuff方式自動血圧測定器(Softron社製BP-98A)を用いた¹⁵⁾。

3. 心重量および血液, 組織採取

心臓エコーを記録後, 体重測定し, 麻酔下に開胸を行い, 既報の方法で心臓表面のMacroscopic scoreを測定した¹²⁾。下大静脈より血液を採取し, 心臓を大血管起始部より切離, 摘出を行い洗浄した後, 心臓重量を測定した。心尖部を液体窒素で凍結保存し, 心室中部はホルマリン緩衝液に固定後, パラフィン包埋した。

4. 病理組織所見

心室中部短軸断面のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから5 μ mの切片を作成し, Hema-toxylin-Eosin染色, Azan-Mallory染色を行った。心筋炎により影響を受けた領域の広がりにはAzan-Mallory染色の切片で評価した。OLYMPUS BX 60の顕微鏡を用いて得られた染色切片のデジタル画像から, カラーイメージ解析ソフト, MacSCOPE version 2.6(三谷商事株式会社)を用いて心室面積に対する心筋炎面積比を既報の方法で算出した¹⁶⁾。

5. 心臓非心筋細胞の単離精製と培養

8週齢の雄LewisラットにEAMを発症させ, 活動性炎症期に両心室を無菌的に取り出し, 血液を生理食塩水で十分洗い落として細かく刻んだ後, 0.0075%タイプIIコラゲナーゼ(Invitrogen, Tokyo, Japan)入り0.25%トリプシンEDTA溶液(Invitrogen)中で, 37 $^{\circ}$ C, 20分間インキュベートし, 茶こしを用いてすりつぶして細胞を分離した。その後, 0.83% NH₄Cl入り0.17M Tris bufferで溶血した後, 125 μ mの金属篩を通して濾過し壊死組織片を取り除いた。その後, 直径35mmのdishに2mlのRPMI1640溶液(10%非働化済みFBS, 100 unit/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin入り)中で, 細胞が80-90%コンフルエントになる2-3週間培養した。この方法により, 線維芽細胞, 平滑筋細胞, 内皮細胞, マクロファージを含む非心筋心臓細胞が単離される¹⁷⁾。メト

表1 定量的RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列

Gene	Sense primer	Antisense primer
IL-1 β	5'-gctagtgtgatgttcccattag-3'	5'-cttttccattcttcttctttgggta-3'
IL-6	5'-ccgagtagacctcatagtacactt-3'	5'-cctattgaaaatctgctctgttct-3'
MCP-1	5'-ctgtctcagccagatgcagttaat-3'	5'-tatgggtcaagttcacattcaaag-3'
iNOS	5'-tttactattaccagatcgagccc-3'	5'-gtagtgttctctcttccaagggt-3'
IL-10	5'-actgctatgttgcctgcttact-3'	5'-gaattcaaatgctcttgatttct-3'
BNP	5'-ctgggaagtcctagccagttct-3'	5'-gtctatcttctgcccgaagcag-3'
γ -Actin	5'-agccttcttctctggcctggaggt-3'	5'-tggaggggcctgactgctcact-3'

表2 治療20日後の各群のデータの比較

	CTL-DW n=3	EAM-DW n=7	EAM-Met300 n=7
血行動態			
収縮期血圧 (mmHg)	105.3 ± 1.9	92.6 ± 1.6	99.9 ± 3.7
拡張期血圧 (mmHg)	75.0 ± 1.0	69.0 ± 1.4	73.1 ± 3.2
心拍数 (bpm)	358.7 ± 13.1	408.6 ± 9.8	390.1 ± 12.7
組織学的評価			
macroscopic score ^a	0	4.0*	2.6 ± 0.5* †
心重量 (g)	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1*	1.3 ± 0.1*
体重 (g)	215.7 ± 1.2	207.0 ± 6.1	212.0 ± 6.5
心/体重比 (mg/g)	3.9 ± 0.4	7.7 ± 0.4*	6.2 ± 0.5*
血液生化学検査			
白血球数 (/μl)	13150 ± 1750	19029 ± 1080	16414 ± 1322
ヘモグロビン (g/dl)	15.6 ± 0.1	14.4 ± 0.2	14.2 ± 0.5
血糖値 (mg/dl)	149.0 ± 5.5	138.9 ± 10.5	142.1 ± 10.5
乳酸値 (mg/dl)	30.8 ± 4.5	22.6 ± 3.2	36.5 ± 2.2 †

*p<0.05 vs CTL-DW, †p<0.05 vs EAM-DW

^a0, 炎症無し; 1, 小さな変色部位の存在; 2, 多数の変色巣の存在; 3, 心臓表面の1/3以下のび慢性変色領域の存在; 4, 心臓表面の1/3を超えるび慢性変色領域の存在.の5段階で評価した.

ホルミン 10 μM を前投与し, 2時間後に TNF-α (10ng/ml) を加え, その12時間後に細胞を採取し, 炎症性サイトカインの遺伝子発現について検討を行った.

6. RNA抽出と定量的RT-PCR

Trizol[®] (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて心室筋および培養細胞から総RNAを抽出し, 5 μg のRNAからランダムプライマーとマウス Moloney leukemia Virus 逆転写酵素を用いてcDNAを合成した. Interleukin-1 (IL-1)β, IL-6, Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1, Inducible Nitric oxide synthase (iNOS), IL-10, Brain natriuretic peptide (BNP), γ-actin については, 以前報告したプライマー¹⁶⁾⁻¹⁹⁾ (表1) を

用いた. 定量的RT-PCRのコピー数を求めるスタンダードとして用いるプラスミドは, 上述のプライマーとラット心筋炎心臓のcDNAを用いてPCRを行い, pGEM-T easy ベクターに挿入した後, JM109 コンピテント大腸菌にトランスフォーメーションし, MagExtractor プラスミドキット (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて作成した. それらのmRNAの絶対コピー数は, 同じプライマー, SYBR Premix Ex Taq (Takara, Otsu, Japan) ライトサイクラーにて測定し (10分間95℃, 次に95℃10秒, 62℃10秒, 72℃13秒を45サイクル), ライトサイクラーソフトウェアを用いてスタンダードカーブから求めた.

表3 経胸壁心エコー

	CTL-DW n=3	EAM-DW n=7	EAM-Met300 n=7
心室中隔厚 (mm)	1.3 ± 0.0	2.2 ± 0.0*	1.7 ± 0.1 †
左室後壁厚 (mm)	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1*	2.0 ± 0.2*
左室拡張末期径 (mm)	6.8 ± 0.5	6.8 ± 0.4	6.9 ± 0.4
左室収縮末期径 (mm)	4.1 ± 0.4	5.9 ± 0.4	4.6 ± 0.4
左室駆出率 (%)	74.4 ± 3.7	34.1 ± 5.3*	67.8 ± 2.8 †
心嚢液	0	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.5

*p<0.05 vs CTL-DW, †p<0.05 vs EAM-DW

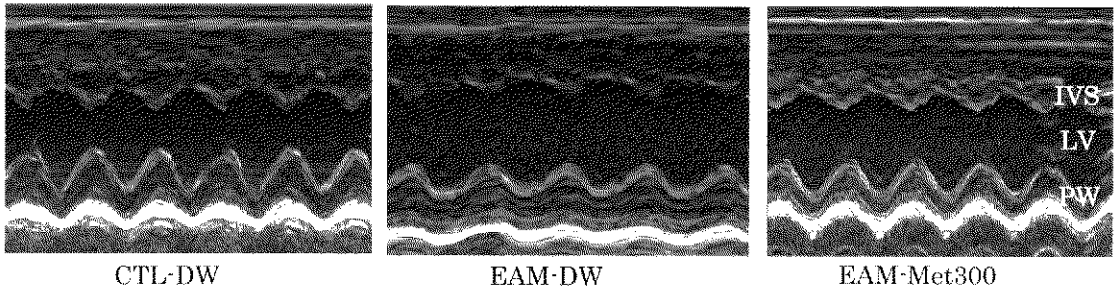


図1 心筋ミオシン感作20日目の心エコー図

左心室長軸像 M-mode 図を示す。IVS, 心室中隔; LV, 左心室; PW, 左室後壁。

7. Western blot

心臓心尖部より採取した心筋組織検体をホモジナイズ、溶解し、ウェスタンブロットを行った。蛋白濃度は Bradford 法で測定し、等量の蛋白にて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、一次抗体を 4℃ オーバーナイトで反応させた。一次抗体は AMPK α (1:1000, Cell Signaling Technology); phospho-AMPK α (1:3000, Cell Signaling Technology) を使用した。次に室温で 1 時間、二次抗体に反応させた。免疫ブロットは、可視化するための化学発光試薬 (ECL + Plus[®]) に反応させた後、X 線フィルムに感光させ評価した。

8. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で表記した。2 群間比較には Student's unpaired t 検定を用い、多群間比較には一元配置分散分析を用いた。有意差が認められた場合、Turkey または Bonferroni 法により多重比較を行った。P < 0.05 を統計学的有意差ありと判断した。

結 果

1. 血行動態, 血液生化学検査

治療開始 20 日時点での所見を表 1 に示す。すべての群において、心拍数、血圧に統計学的有意差を認めなかった。白血球数、ヘモグロビン、血糖値にも有意差を認めなかった。乳酸値は

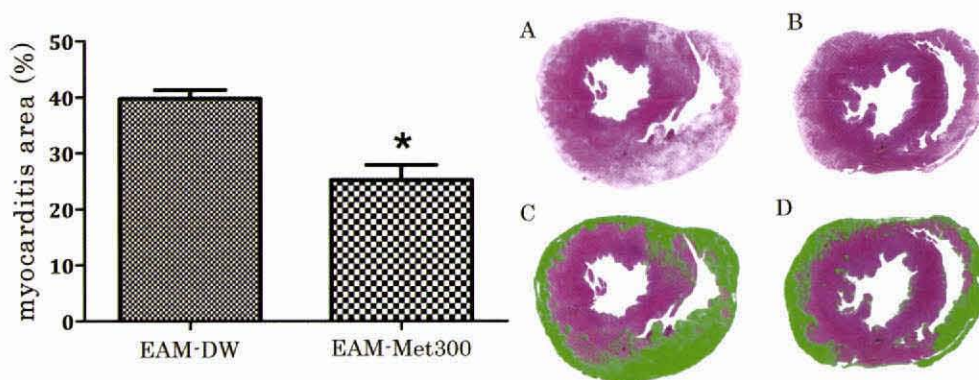


図2 組織学的評価

心室面積に対する心筋炎（緑色）面積比を算出した。EAM-DW (A, C) と比べ、EAM-Met300 (B, D) では炎症面積が有意に減少した。* $p < 0.05$ vs EAM-DW 群

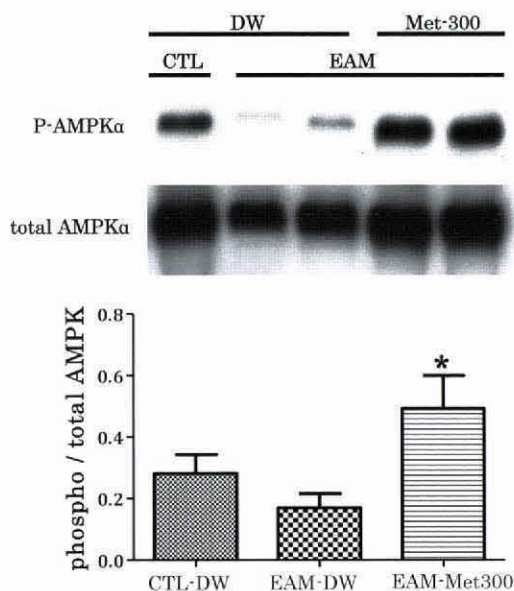


図3 AMPK α サブユニットのリン酸化

EAMラット心筋におけるAMPK α サブユニットのリン酸化は、EAM-DW群と比較してEAM-Met300群においてはAMPK α サブユニットのリン酸化の亢進を認めた。* $p < 0.05$ vs EAM-DW群

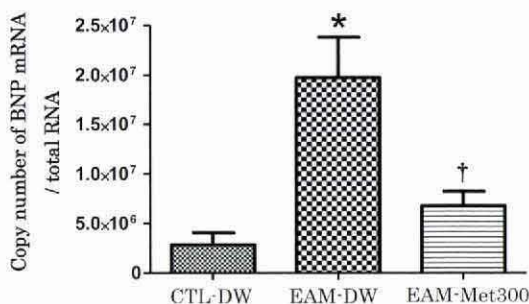


図4 EAMラット心臓のBNPmRNA遺伝子発現

EAMラット心筋におけるBNPmRNA遺伝子の発現はCTL-DW群と比し、EAM-DW群で有意に増加し、EAM-Met300群では有意に抑制された。* $p < 0.05$ vs CTL-DW群、† $p < 0.05$ vs EAM-DW群。

EAM-Met 300 群で他よりも高値であった。

2. 心重量, Macroscopic score

心重量は CTL-DW 群に比し, EAM-DW 群で有意に増加し, EAM-Met 300 群では改善を認めた。心重量/体重比も同様の傾向が観察されたが統計学的有意差は認められなかった。Macroscopic score は EAM-DW 群に比し, EAM-Met 300 で改善を認めた ($p < 0.05$)。 (表 2)

3. 心機能の改善

治療開始 20 日後の心エコー所見を表 3, 図 1 に示す。EAM-DW 群では, CTL-DW 群に比し, 左室壁の肥厚, 左室駆出率の低下を認めた。

EAM-Met 300 群では EAM-DW 群に比し, 壁肥厚の減弱, 左室駆出率の改善を認めた。

4. 組織病理評価

心室面積に対する心筋炎面積比は, EAM-DW 群に比し EAM-Met 300 群で有意に小さく, 肉眼所見と矛盾しない結果であった。

5. AMPK 活性

EAM-DW 群では CTL-DW 群に比し, AMPK α サブユニットのリン酸化が抑制されていた。EAM-Met 300 群においては AMPK α サブユニットのリン酸化の亢進を認めた ($p < 0.05$, 図 3)。

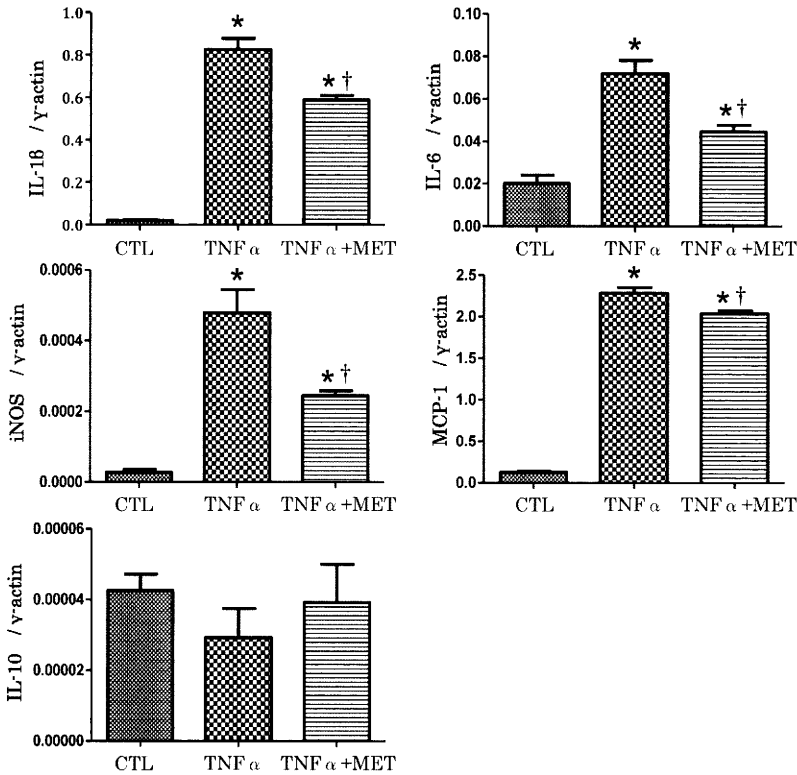


図 5 心臓非心筋細胞の遺伝子発現

EAM ラット心臓から培養した心臓非心筋細胞に TNF- α 10ng/ml を添加すると, IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP-1 の mRNA 発現の増加を認めた。メトホルミン 10 μ M 前投与によりこれらの増加は抑制された。IL-10 は有意な変化を認めなかった。

* $p < 0.05$ vs CTL 群, † $p < 0.05$ vs TNF α 10ng/ml 投与群

6. 心臓におけるBNPmRNA遺伝子発現

治療20日後のラット心臓におけるBNPmRNAの発現は、CTL-DW群と比し、EAM-DW群で有意に増加し、EAM-Met 300群では有意に抑制された(図4)。

7. 心臓非心筋細胞の遺伝子発現

活動性炎症期の両心室から抽出した心臓非心筋細胞では、TNF- α の刺激により、IL-1 β , IL-6, iNOS, MCP-1のmRNAの発現が有意に増加した。メトホルミンの前投与でこれらの炎症性サイトカインの上昇は有意に抑制された($p < 0.05$, 図5)。IL-10は変化を認めなかった。

考 察

本研究より、1. メトホルミンはEAMラットにおける急性期心筋障害を減弱し、心機能改善効果を有すること、2. メトホルミンの有益な効果はEAMラット心筋のAMPK活性化を伴っていること、3. メトホルミンのEAMラットに対する効果の機序として、心臓非心筋細胞への作用を介し、心筋における炎症を抑制している可能性があること、が示唆された。

心筋炎は病理組織所見により、リンパ球性心筋炎、巨細胞性心筋炎、好酸球性心筋炎、肉芽腫性心筋炎に分類されている²⁰⁾。さらに臨床経過からは急性心筋炎、劇症型心筋炎、慢性遷延性心筋炎、慢性不顕性心筋炎に分類される。巨細胞性心筋炎は心筋内に多核巨細胞を伴う激しい炎症がみられる病型であり、慢性不顕性に発症する場合と劇症型心筋炎として発症する場合がある。重症心筋炎を対象とした検討では巨細胞性心筋炎の頻度は4-41%と高い。巨細胞性心筋炎の治療としては、免疫抑制剤が選択されているが、予後は不良である。ラットのEAMは心筋ミオシンを抗原とした臓器特異炎である。抗原感作の約14日後にヒト巨細胞性心筋炎によく似た急性心筋炎を発症し、約2週間、炎症の活動期が続く¹²⁾。このモデルは小動物で簡便に作成できること、心筋炎発症率が100%であること、びまん性心筋障害による

慢性心不全を呈することなどの特徴を有する。本研究において、メトホルミンはEAM急性期における左室壁厚増加の軽減、左室駆出率の改善を示し、心不全の重症度を示す左心室におけるBNPmRNA発現を抑制していた。組織学的には炎症所見の軽減を認めており、抗炎症作用を介して心筋障害抑制に働いたと考えられる。この結果はこれまでに報告のない、心臓の炎症性疾患に対するメトホルミンの有益な作用を示唆している。

ラットEAMでは、心臓局所において心筋ミオシンを抗原提示している樹状細胞が、投与したミオシンに感作された抗原特異性T細胞クローンを賦活化し、心臓局所で活性化されたT細胞、ならびに樹状細胞がIL-1, IL-2ならびにTNF- α などのサイトカインを産生する。これらのサイトカインにより、心臓在住の線維芽細胞などの非心筋非炎症細胞も活性化され多くの炎症性サイトカインを産生し、さらに末梢のリンパ球が心臓に呼び込まれることで心筋での重度の炎症、障害が引き起こされる²¹⁾。心筋組織におけるサイトカインmRNAに関しては、心筋炎発症初期は炎症性サイトカイン(IL-1, MCP-1)とTh1サイトカイン(IL-2, IFN γ , TNF α)が発現し、治癒期にかけてTh2サイトカイン(IL-4, IL-10)の発現が優位となることを我々は報告してきた²²⁾。本研究では、EAMの発症と進展に関わる線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージを含む心臓非心筋細胞に対するメトホルミンの直接作用を検討するため、*in vitro*の検討を行った。TNF- α の刺激により、心臓非心筋細胞におけるIL-1 β , IL-6, iNOS, MCP-1のmRNAの発現は有意に増加し、メトホルミン前投与により有意に抑制された。最近、NathらはEAMと同様にT細胞による細胞性免疫が主病態である、ヒト多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳炎(EAE)の発症をメトホルミンが抑制することを報告した²³⁾。彼らの論文においてメトホルミンはマクロファージのAMPKを活性化し、エンドトキシンによる炎症性サイトカインならびにメディエーターの発現を抑制した。また、Sagらは恒常的にAMPKが活性化しているマクロファージでは炎症性サイトカイン

の産生が低下することを報告している²⁴⁾。さらにEAMラット心臓において、IL-1 β , iNOSはマクロファージ, MCP-1やIL-6は主に線維芽細胞からそれぞれ主に産生されていることを我々はすでに報告している¹⁷⁾¹⁸⁾²⁵⁾。これらの結果は, メトホルミンは心臓非心筋細胞に対し抗炎症作用を有し, EAMに対する有益な効果の一つの機序として, 心臓非心筋細胞での炎症性サイトカイン抑制を示唆するものである。

本研究において, AMPKの活性化を示すAMPK α サブユニットのリン酸化は, 心臓において治療対照群では抑制されていたが, メトホルミンを投与した群では著明な増大を認めた。AMPKはストレス環境下でのエネルギー代謝の調節において中心的な役割を果たす⁴⁾とともに, 最近の研究では, エネルギー代謝とは独立したAMPKの役割, 活性化の機序も明らかになってきている。AMPKを介する心筋保護作用の機序としては, 一酸化窒素の産生増加, インスリン抵抗性の改善, 代謝への影響, 抗線維化作用などが報告されている²⁶⁾。AMPKの活性化は心筋細胞で起こっている可能性もあり, 心臓非心筋細胞に対する抗炎症作用以外に, 今回のEAMに対するメトホルミンの有用性としてこれらの機序の関与も考えられた。

結 語

メトホルミンはEAMラットにおける心筋障害を減弱し, 心機能改善効果を認めた。メトホルミンの効果はAMPK活性化を伴い, 心臓非心筋細胞からの炎症性サイトカイン産生抑制が機序の一つとして示唆された。

謝 辞

本研究のご指導及び論文のご高閲をいただいた新潟大学医歯学総合病院循環器内科, 相澤義房名誉教授, 南野 徹教授, 小玉 誠前准教授, また, 実験の遂行にあたり直接ご指導をいただいた伊藤正洋先生, 埴晴雄先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R and Zinman B: Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32: 193 - 203, 2009.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS34). *Lancet* 352: 854 - 865, 1998.
- 3) Roussel R, Travert F, Pasquet B, Wilson PW, Smith SC Jr, Goto S, Ravaud P, Marre M, Porath A, Bhatt DL and Steg PG: Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry Investigators. Metformin use and mortality among patients with diabetes and atherothrombosis. *Arch Intern Med* 170: 1892 - 1899, 2010.
- 4) Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 714: 774 - 785, 2007.
- 5) Gundewar S, Calvert JW, Jha S, Toedt-Pingel I, Ji SY, Nunez D, Ramachandran A, Anaya-Cisneros M, Tian R and Lefer DJ: Activation of AMP-Activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res* 104: 403 - 411, 2009.
- 6) Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, Ito S, Ogai A, Asakura M, Kim J, Minamino T, Takashima S, Sanada S, Sugimachi M, Komamura K, Mochizuki N and Kitakaze M: Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 119: 2568 - 2577, 2009.
- 7) Hattori Y, Suzuki K, Hattori S and Kasai K: Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 47: 1183 - 1188, 2006.

- 8) Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, Djelidi R, Couturier M, Therond P, Legrand A and Beaudeux JL: Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol* 72: 176 - 183, 2006.
- 9) Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont - Rousselot D, Thérond P, Legrand A and Beaudeux JL: Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 54: 829 - 834, 2005.
- 10) Gallo A, Ceolotto G, Pinton P, Iori E, Murphy E, Rutter GA, Rizzuto R, Semplicini A and Avogaro A: Metformin prevents glucose-induced protein kinase C - beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. *Diabetes* 54: 1123 - 1131, 2005.
- 11) Bonnefont - Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardès - Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J and Vasson MP: An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 52: 586 - 589, 2003.
- 12) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 250 - 262, 1990.
- 13) Zhang CX, Pan SN, Meng RS, Peng CQ, Xiong ZJ, Chen BL, Chen GQ, Yao FJ, Chen YL, Ma YD and Dong YG: Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMPK - eNOS pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 55 - 62, 2011.
- 14) Garber AJ, Duncan TG, Goodman AM, Mills DJ and Rohlf JL: Efficacy of metformin in type II diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *Am J Med* 103: 491 - 497, 1997.
- 15) Mitsuma W, Ito M, Kodama M, Fuse K, Okamura K, Minagawa S, Kato K, Hanawa H, Toba K, Nakazawa M and Aizawa Y: Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 987 - 994, 2006.
- 16) Chang H, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Elnaggar R, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: Hydrodynamic-based delivery of an interleukin - 22 - Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol* 177: 3635 - 3643, 2006.
- 17) Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovascular Research* 68: 278 - 288, 2005.
- 18) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clinical Science* 103: 623 - 632, 2002.
- 19) Elnaggar R, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Chang H, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J and Aizawa Y: The effect of hydrodynamics-based delivery of an IL - 13 - Ig fusion gene for experimental autoimmune myocarditis in rats and its possible mechanism. *Eur. J. Immunol.* 35: 1995 - 2005, 2005.
- 20) 和泉 徹, 磯部光章, 河合祥雄, 川名正敏, 木村一雄, 許 俊鋭, 小玉 誠, 佐地 勉, 廣江道昭, 松崎益徳, 松森 昭, 森本紳一郎, 由谷親夫: 急性および慢性心筋炎の診断・治療に関するガイドライン (2009年改訂版).
- 21) Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S and Abo T: Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol*

- Cell Cardiol 29: 491 - 502, 1997.
- 22) Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S and Abo T: Recombinant Murine Interleukin - 12 Facilitates Induction of Cardiac Myosin - Specific Type 1 Helper T Cells in Rats. *Circ Res* 82: 1035 - 1042, 1998.
- 23) Nath N, Khan M, Paintlia MK, Hoda MN and Giri S: Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol* 182: 8005 - 8014, 2009.
- 24) Sag D, Carling D, Stout RD and Suttles J: Adenosine 5' - monophosphate - activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti - inflammatory functional phenotype. *J Immunol* 181: 8633 - 8641, 2008.
- 25) Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M and Aizawa Y: Effect of hydrodynamics - based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin - 1 receptor antagonist - Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation*. 111: 1593 - 600, 2005.
- 26) Li C and Keaney JF Jr: AMP - activated protein kinase: a stress - responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 10: 111 - 115, 2010.

(平成25年1月11日受付)