

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08492

研究課題名(和文) mtROSとNrf2を介した糖尿病大血管症発現機序解明と制御による治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of diabetic macroangiopathy via mtROS and Nrf2

研究代表者

久木留 大介 (Kukidome, Daisuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：10555759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食負荷マウスと比較して高脂肪食負荷マウスに血管内皮特異的にMnSODを過剰発現させたマウスでは大動脈弁輪部および大動脈での動脈硬化病変の減少を認めた。高糖濃度刺激では正常糖濃度群に比し、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)でミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)産生増加を認めるが、NRF2遺伝子の発現は増加を認めなかった。本研究により、高脂肪食負荷マウスでは血管内皮特異的にMnSODを過剰発現することで動脈硬化を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病大血管合併症は、糖尿病患者のQOLや健康寿命低下に多大な影響を及ぼすと考えられる。mtROSと動脈硬化発症の関連を明らかにすることは、糖尿病患者のQOLや健康寿命改善に寄与しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the effect of endothelial-specific mitochondrial reactive oxygen species(mtROS) reductase, and the involvement of NRF2 expression in atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient(apoE^{-/-}) mice. We detected the decrease in the arteriosclerosis lesion formation in endothelial cells in the aortic sinus and the intima of aorta in high-fat diet fed endothelial-specific MnSOD overexpressed apoE deficient (eMnSODtg apoE^{-/-}) mice compared with a high-fat diet fed apoE^{-/-} mice. In in vitro assay, although high-glucose condition increase the mtROS in human aortic endothelial cells, that did not increase NRF2 expression.

These results suggested that overexpression of MnSOD in endothelial cells suppressed the atherosclerotic lesion formation in high-fat diet fed apoE^{-/-} mice without the suppression of NRF2 expression.

研究分野：糖尿病合併症

キーワード：酸化ストレス ミトコンドリア 動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は動脈硬化の主要な危険因子の一つであり、動脈硬化の予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。また、糖尿病治療の主な目標の1つは、糖尿病血管合併症の発症・進展予防である。血管合併症の抑制が、患者の生命予後およびquality of lifeの維持に重要である。糖尿病血管合併症には、糖尿病特異的な細小血管合併症と糖尿病特異的ではないものの一般人口と比較して、糖尿病患者で2~4倍程度合併しやすいとする大血管障害がある。

申請者らは、糖尿病合併症発症機序の一つとして高血糖によるmtROSの産生増加機序を提唱し、糖尿病およびその合併症発症においてmtROSの関与が大きいことを明らかにしている(Nature 2000, Diabetes 2006, BBRC 2008, Plos One 2016, J Diabetes Investig 2017)。生体には、酸化ストレスから組織の恒常性維持するために、ROSに対する消去系としてグルタチオンシステム、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ等が存在している。近年、これら酸化ストレス応答性抗酸化酵素群の発現を統合的に制御するNrf2/Keap1システムが動脈硬化進展の鍵分子として注目されている。

本研究では、invitro研究、invivo研究の両面から、糖尿病大血管合併症の発症機序に関して、血管内皮細胞のmtROS産生増加および転写因子Nrf2に着目した。

2. 研究の目的

本研究はヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)および申請者らが独自に作製した血管内皮特異的にMnSODを発現し、mtROSによる影響を除去するeMnSODTgマウス(BBRC 2008)を用い、in vitro研究、in vivo研究の両面から、糖尿病大血管合併症の発症機序を解明することにより、血管内皮細胞のmtROS産生増加を抑制すること、転写因子Nrf2を制御することが糖尿病大血管合併症の新規治療法となりうるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)および特異的mtROS除去酵素であるmanganesesuperoxidedismutase(MnSOD)過剰発現HAECを5.5mmol/Lまたは25mmol/Lの糖濃度で培養し、mtROS産生への影響を還元型MitoTrackerRedを用いて検討し、Nrf2と血管内皮障害との関連は、ウェスタンブロット法にてNrf2タンパク発現を、RT-PCR法を用いて評価した。動脈硬化関連遺伝子として接着分子vascularcelladhesionmolecule-1(VCAM-1)、およびintercellularadhesionmolecule-1(ICAM-1)のmRNA発現を評価した。

また、アポリポタンパク質E(ApoE)欠損マウスと内皮特異的にMnSODを過剰発現させたマウスを交配し、内皮特異的MnSOD過剰発現動脈硬化モデルマウス(eMnSODTg⁺ApoE^{-/-}マウス)を作製した。そのマウスを12週齢から高脂肪食で8週間飼育し、投与期間中の摂餌量、体重および随時血糖の推移を観察した。さらに投与終了時に腹腔内ブドウ糖負荷試験(ipGTT)および腹腔内インスリン負荷試験(ipITT)を施行し、2群間での耐糖能の差を比較検討した。同時に血清を回収し血清脂質値を比較した。さらに、両群の大動脈及び弁輪部を回収し、大動脈洞の動脈硬化病変形成度をoil red O染色で評価した。

4. 研究成果

HAECを用いたin vitroの検討では、高血糖刺激においてmtROS産生増加を認めた。一方で、アデノウイルスを用いたMnSOD過剰発現HAECでは、高血糖刺激で増加したmtROS産生が抑制された。RT-PCRでの検討では、高血糖刺激でNrf2、ICAM1およびVCAM1のmRNAやタンパク発現は上昇を認めなかった。

in vivoの検討においては、高脂肪食負荷をしたコントロールのApoE^{-/-}マウスと高脂肪食負荷をしたeMnSODTg⁺ApoE^{-/-}マウスの2群間でipGTT、ipITT、体重および随時血糖に有意な差は認め

なかった。加えて、血清脂質値に関しても2群間で有意な差は認めなかった。一方で、大動脈洞および胸部大動脈では大脈硬化病変の形成はeMnSODTg⁺ ApoE^{-/-}マウス群において、ApoE^{-/-}マウス群と比較してそれぞれp:0.0392、p:0.000627と動脈硬化病変の形成は有意に抑制されていた。

以上の結果から、高脂肪食負荷 ApoE^{-/-}マウスにおいて、血管内皮特異的な MnSOD 過剰発現は、耐糖能や血清脂質に影響を与えず動脈硬化抑制を発揮した。細胞実験では HAEC において高血糖刺激では Nrf2 や ICAM1 および VCAM1 発現に影響を与えなかった。以上のことから大血管合併症発症には mtROS を介した経路の存在が示唆され、その mtROS を抑制することは動脈硬化進展抑制効果が期待されることが考えられた。つまり、mtROS を血管内皮特異的に抑制することが、大血管合併症を抑制するための新たな治療ターゲットになると考えられた。一方、当初は MnSOD 過剰発現における抗動脈硬化作用機序に Nrf2 や ICAM1、VCAM1 の関連性が予想されたが、その関連性は証明しえず、その機序解明という今後の課題が残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀬ノ口 隆文 (Senokuchi Takafumi) (00530320)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任講師 (17401)	
研究分担者	松村 剛 (Matamura Takeshi) (20398192)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関