

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09255

研究課題名(和文)冠動脈バイパスグラフトのれん縮におけるインスリンと高血糖の影響

研究課題名(英文) Effects of insulin and hyperglycemia on the increased constriction tendency of coronary bypass grafts

研究代表者

蒲生 修治 (Gamoh, Shuji)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：20273930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者から採取された移植血管は、術後に攣縮を引き起こしやすく、予後不良となりやすい。そこで本研究では、糖尿病で血管収縮性が高まる機序を明らかにするため、インスリンまたはグルコースの濃度が血管平滑筋細胞の細胞膜受容体発現量に及ぼす影響を検討した。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞膜の5-HT_{2A}受容体レベルは、インスリンによる影響を受けなかったが、グルコースの濃度依存的に上昇する傾向が見られた。一方、AT₁受容体レベルは、インスリン、グルコース双方の影響を受けなかった。これらの結果から、糖尿病患者のグラフト攣縮は血管平滑筋の細胞膜受容体レベル以外の因子によりもたらされている可能性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンによる細胞膜受容体の取り込み作用に関する研究は、国内外を通じてほとんど行われておらず独自性が高い。そして本研究の最終目的は冠動脈バイパス術の成績向上に資するデータの提供であり、冠動脈バイパス術を受ける患者の半数近くが糖尿病を基礎疾患として有している現状を鑑みるに、本研究の社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Bypass grafts harvested from Diabetes mellitus (DM) tends to contraction causing to spasm after implantation. In this study, I have investigated the effect of the concentration of insulin or glucose on the expression level of membrane receptors in cultured smooth muscle cells to clarify the mechanism by which vasoconstriction increases in diabetes. Membrane level of serotonin 5-HT_{2A} in cultured human coronary smooth muscle cell were not affected by insulin, but tended to increase in a glucose concentration-dependent manner. On the other hand, the angiotensin AT₁ receptor was not affected by both insulin and glucose. These results suggest that the increased contraction tendency in bypass graft from patients with DM is caused by factors other than the cell membrane receptor level of vascular smooth muscle.

研究分野：薬理学

キーワード：糖尿病 冠動脈バイパス術 移植血管攣縮 セロトニン アンジオテンシン インスリン 高血糖

1. 研究開始当初の背景

冠動脈バイパス術において、移植血管の攣縮は早期グラフト閉塞を起こすだけでなく、遠隔期の血管開存率をも低下させる。特に糖尿病患者においては、グラフトの攣縮が生じやすいことが経験則としては知られていたが、その発生メカニズムは不明であった。糖尿病では血管内皮細胞の障害に注目が集まるが、申請者は、これまでに、糖尿病患者の伏在静脈では、セロトニンおよびアンジオテンシンに対する収縮反応性と血管平滑筋細胞膜のアンジオテンシン AT₁ 受容体レベルが、非糖尿病患者より有意に高いこと¹⁾。糖尿病患者の内胸動脈では、セロトニンに対する収縮反応性と血管平滑筋細胞のセロトニン 5-HT_{2A} 受容体レベルが、非糖尿病患者より有意に高いこと²⁾。摘出ヒト伏在静脈の血管平滑筋細胞膜 5-HT_{2A} 受容体レベルとセロトニンに対する収縮反応性が、インスリン濃度依存的に低下すること³⁾などを見出し報告してきた。これら一連の結果から、糖尿病により生じる細胞膜受容体レベル等の変化が血管の収縮反応性を高め、攣縮を生じやすくさせていると考えられる。

2. 研究の目的

これまでの予備的な研究成果から、インスリンが血管平滑筋の 5-HT_{2A} および AT₁ 受容体の細胞質内への取り込み(インターナリゼーション)を促進していること、糖尿病患者では血管平滑筋に対するインスリンの作用不全をきたしているため、それらの受容体が細胞膜に留まり、収縮反応性が増強されるのではないかと考えている。そこで本研究では、糖尿病による攣縮増強メカニズムの解明を目的とする。具体的には、(1)インスリンによる受容体取り込みが行われるかどうかを確認するとともに、作用および分子メカニズムを明らかにする。(2)高濃度グルコースが血管平滑筋に及ぼす影響について検討する。(3)血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の共培養系を確立し、糖尿病の病態(高血糖、低インスリン)環境下での異種細胞間クロストークによる血管収縮性への影響を検討する。これらの結果に基づき、糖尿病患者が、より安全に冠動脈バイパス術を受けられるようにするための基礎となるデータの提供を最終的な目的とする。

3. 研究の方法

血管サンプル

本研究では、冠動脈バイパス手術のために摘出されたグラフト血管のうち手術に使用されなかった余剰部位をサンプルとして使用する。手術の前に、担当医が患者に研究内容を説明し、書面にて本人(本人が意思を表明できない場合は親族)の同意が得られた場合のみ血管の提供を受ける(本学ならびに血管提供元病院倫理委員会承認済み)。余剰グラフト血管は、手術担当医により保存液中に浸漬され、速やかに当研究室に輸送される。その際、手術担当医より血管提供者の性別、年齢、嗜好品や併用薬、併発している他の疾患の有無および状態などが、患者の特定につながる個人情報隠して提供され、糖尿病歴の有無や病態を確認することができる。

(1) インスリンが内胸動脈のアンジオテンシン に対する収縮反応性に及ぼす影響

血管サンプルの血管内皮細胞の状態は、移植手術の前処理の過程でまちまちであるため、血管内皮細胞の影響を除くために血管内皮除去操作を施してから研究に使用する。血管の収縮張力の測定は、現有のマグナス装置を用いて行う。2 mm 幅に調製した血管サンプルのリング状標本を、37 °C の Tyrode 液で満たしたオルガンバス中に懸垂し、2.0 g の初期張力をかける。静止張力が安定したところで、インスリンによる前処置を 30 分間行い、その後アンジオテンシン を累積添加 (10^{-9} M ~ 10^{-5} M) して発生する血管収縮張力を、アナログ・デジタル変換器 (PowerLab) を用いて等尺性に記録する。

(2) 細胞膜受容体発現レベルに対するインスリン、高濃度グルコースの影響

報告者のグループは、ヒト大伏在静脈において、インスリンの濃度依存的に細胞膜 5-HT_{2A} 受容体レベルが低下し、血管収縮性が低下することを報告した³⁾。この結果に基づき、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の培養液中に、最終濃度として 10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M のインスリンを添加し、24 時間培養した後に細胞を回収する。キットにより可溶性画分と細胞膜画分を調製し、ウエスタンブロット法により 5-HT_{2A} および AT₁ 受容体量の変化を観察する。

同様に、培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の培養液中に、最終濃度として 0, 50, 100, 400 mg/dL のグルコースを添加し、24 時間培養した後に細胞を回収する。キットにより可溶性画分と細胞膜画分を調製し、ウエスタンブロット法により 5-HT_{2A} および AT₁ 受容体量の変化を観察する。

4. 研究成果

(1) 本研究では冠動脈バイパス手術のグラフト血管としてよく用いられる内胸動脈をサンプルとして使用する予定であったが、新型コロナ禍で血管提供先の病院での手術が予定通り実施されなくなり、さらにスタッフの業務量が過度に増大したため、サンプルの提供がほとんど行われなくなった。したがって、現在までに得られた例数は非常に少なく、未だ十分な考察ができる状況ではない。

(2) 培養ヒト冠動脈平滑筋細胞の細胞膜 5-HT_{2A} 受容体の発現レベルは、インスリンの濃度依存的な変化を生じなかったが、グルコースの濃度依存的に上昇する傾向が見られた ($0.05 < p < 0.1$)。この理由の解明にはさらなる検討が必要である。一方、細胞膜 AT₁ 受容体の発現レベルは、インスリン、グルコースの双方の影響を受けなかった。

我々のグループは以前、糖尿病患者の血管平滑筋細胞内では、ミオシン軽鎖ホスファターゼのサブユニットの一つである MYTP1 の発現量が有意に低下し、さらにリン酸化 MYTP1 (不活性型) の存在比が有意に上昇していることを報告している⁴⁾。今回の一連の検討から、糖尿病患者で見られる収縮反応性の増大は、細胞膜受容体の発現レベルの差によってもたらされたのではなく、細胞内分子の発現量や活性による寄与の方が大きいのではないかと考えられる。さらに、血糖、インスリンの双方とも、接触が大きいのは平滑筋よりもむしろ血管内皮細胞であるため、血管平滑筋で生じた変化は血管内皮細胞とのクロストークにより

生じる可能性が高いと思われる。

今回の研究計画に記載していた血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の共培養系の確立や、クロストークの影響などは、コロナ禍に伴う資材不足等により大幅に予定より着手が大きく遅れたため、現時点では実験系の確立段階であり、未だ公表できるデータを持ち合わせていない。今後、研究の進展があれば、速やかに学会や学術論文等で結果を発表する予定である。

参考文献

- 1) Yokota A, Gamoh S, Tanaka-Totoribe N, Shiba T, Kuwabara M, Nakamura E, Hayase T, Hisa H, Nakamura K, Yamamoto R. Angiotensin II, as well as 5-hydroxytryptamine, is a potent vasospasm inducer of saphenous vein graft for coronary artery bypass grafting in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6:82-87, 2016.
- 2) Shiba T, Yokota A, Gamoh S, Tanaka-Totoribe N, Kuwabara M, Nakamura E, Hayase T, Nakamura K, Yamamoto R. Diabetes Mellitus Induces Hyperreactivity of 5-Hydroxytryptamine (5-HT)-Induced Constriction in Human Internal Thoracic Artery and Is Associated with Increase in the Membrane Protein Level of 5-HT 2A Receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 41:820-823, 2018.
- 3) Kanai T, Kuwabara M, Tanaka-Totoribe N, Nakamura E, Matsuo Y, Gamoh S, Suzuki A, Asada Y, Hisa H, Yamamoto R. Insulin induces internalization of the plasma membrane 5-hydroxytryptamine_{2A} (5-HT_{2A}) receptor in the isolated human endothelium-denuded saphenous vein via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 118:178-185, 2012.
- 4) Matsuo Y, Gamoh S, et al. The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: 323-327 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka-Totoribe Naoko, Hidaka Muneaki, Gamoh Shuji, Yokota Atsuko, Nakamura Eisaku, Kuwabara Masachika, Tsunozumi Jun, Yamamoto Ryuichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Effects of M-1, a Major Metabolite of Sarpogrelate, on 5-HT-Induced Constriction of Isolated Human Internal Thoracic Artery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1979 ~ 1982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥取部直子, 蒲生修治, 横田敦子, 中村栄作, 桑原正知, 常住淳, 山本隆一
2. 発表標題 冠動脈バイパス手術（CABG）における内胸動脈バイパスグラフトの血管れん縮を予防するパパペリンの至適濃度の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥取部直子, 蒲生修治, 日高宗明, 比佐博彰, 山本隆一
2. 発表標題 ラット摘出腸管血管灌流標本において、麻薬拮抗薬であるナロキソンは血管平滑筋 extrajunctional 1 受容体を抑制するが intrajunctional 1 受容体には作用しない
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西川正純（監修）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 359
3. 書名 運動機能・認知機能改善食品の開発（第 編、第1章）	

〔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	常住 淳 (Tsunezumi Jun) (90583310)	九州保健福祉大学・薬学部・准教授 (37604)	

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
---------	---------