

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11731

研究課題名(和文) 血管内皮機能に着目した糖尿病性血管障害発症機序の性差の解明と性差医療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of gender differences in the pathogenesis of diabetic angiopathy focusing on vascular endothelial function and its application to gender-specific medicine

研究代表者

竹之内 康広 (Takenouchi, Yasuhiro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30582233

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)：動脈硬化などの血管障害のリスクは女性の方が男性に比べ低いことが知られているが、糖尿病を併発している場合にそれは逆転し、女性の方が男性よりも高くなることが報告されている。本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて、性別による血管機能の違いを解明することを目的とした。糖尿病モデルの雌では血管内皮機能障害は生じないが、動脈硬化は生じる結果が示された。その一つの要因としてリソホスファチジン酸受容体の発現変化が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ詳細に解明されていない糖尿病による血管合併症のメカニズムについての性差に着目した検討は、これまでほとんど行われていない。本研究により検出された性別による血管機能や遺伝子発現変化は、性別に適合した医薬品や候補化合物を見出し、新たな性差医療への治療方策が提示できるものと期待される。本研究は、糖尿病患者における合併症の発症抑制や軽減へとつながり、学術的のみならず患者への貢献は大きく意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：It is known that the risk of vascular disorders such as atherosclerosis is lower in women than in men, but this is reversed when diabetes mellitus is concurrently present, and is reported to be higher in women than in men. In this study, we aimed to elucidate the differences in vascular function by gender using a mouse model of diabetes mellitus. The results showed that female diabetic models do not develop vascular endothelial dysfunction, but do develop atherosclerosis. One factor was thought to be altered expression of lysophosphatidic acid receptors.

研究分野：薬理学

キーワード：糖尿病 血管機能 性差

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

多くの疾患は生物学的性差により多大な影響を受ける。糖尿病合併症もその一つであり、糖尿病を起因とした血管機能障害によって発症する脳梗塞や狭心症などの心血管疾患にも性差が存在することが知られている。心血管疾患リスクは女性の方が男性に比べ低いことが知られているが、糖尿病を併発している場合にそれは逆転し、女性の方が男性よりも高くなることが報告されている(Wei M., et al., Diabetes Care, 1998: 21, 1167-72; Kajiwar A., et al., Diabetes Res Clin Pract 2014: 103, e7-10)。心血管疾患リスクの性差については疫学的報告が多くなされているにも関わらず、性差が生じる原因の詳細なメカニズムや、性別に応じた治療方法についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

さらに、現在の糖尿病の治療方針として血糖コントロールが重要とされているが、ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes)などの大規模臨床試験において、厳格血糖コントロールによる大血管合併症の抑制について有意な結果は得られていない。また、糖尿病による合併症は血管内皮機能障害が初期に認められ、血管病変の発症・進展に大きく関与していることが知られているが、血管内皮機能障害の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

以上の背景があるにも関わらず糖尿病の治療方針としては血糖コントロールがメインであり、血管内皮機能障害のメカニズムおよび性別による血管内皮機能の違いについての研究は遅れている。

2. 研究の目的

本研究はストレプトゾトシン誘発1型糖尿病モデルマウスを用いて、性別による糖尿病性血管機能障害発症の違いを解明し、糖尿病治療および性差医療への基盤を確立することを目的とした。全身に張り巡らされている血管の機能の性差が明らかとなれば、糖尿病に対する治療のみでなく、より広汎な血管障害性疾患への応用・発展も可能となる。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルマウス

雄性および雌性のICRマウスにストレプトゾトシン(STZ)を尾静脈投与(200 mg/kg body weight)することにより1型糖尿病を誘発させた。対照には生理食塩水を尾静脈投与したマウスを用いた。また、卵巣摘出手術(OVX)および偽手術(Sham)を行った雌性マウスを一部用いた。

(2) 血糖値および血中インスリン値の測定

麻酔下マウスの下大静脈から血液を採取し、遠心分離にて血漿を得た後、各種キットを用いて血糖値および血中インスリン値を測定した。

(3) マウス摘出血管を用いた血管反応性の測定

それぞれのマウスから胸部大動脈・腸間膜動脈および腎動脈を摘出し、マグヌス管内に静置し等尺性収縮張力を測定した。血管弛緩反応はプロスタグランジン_{F₂}あるいは₁受容体刺激薬フェニレフリンにより収縮させトーンスを保った後、アセチルコリンなどの血管弛緩物質を投与し、糖尿病による血管機能障害に対する性差を検討した。また、ノルアドレナリンなどの血管収縮物質に対する反応性も測定した。

(4) マウス摘出血管および腎臓における遺伝子発現変化の解析

それぞれのマウスから胸部大動脈を摘出し、RNAを抽出しcDNAを作成した。その後、定量的RT-PCR法を用いて性差により変動する遺伝子を解析した。

4. 研究成果

(1) 血中パラメータの測定

随時血糖値は雌雄とも生理食塩水投与群(雄:310±23 mg/dL, 雌:220±11 mg/dL (Sham), 257±22 mg/dL (OVX))に比べ、STZ投与群(雄:999±113 mg/dL, 雌:1243±166 mg/dL (Sham), 1100±64 mg/dL (OVX))で有意な上昇が見られ、STZ群のインスリン値は検出限界以下であった。これらの結果からSTZ投与により雌雄ともに糖尿病が誘発されることが示された。また、正常時の血糖値は雄より雌の方が低値を示すが、糖尿病病態時は雌の方が高い値を示したため血糖値の雌雄逆転が生じることが考えられた。

(2) 血管反応性の測定(図1、図2)

アセチルコリンによる摘出胸部大動脈の内皮依存性弛緩反応は、雄およびOVXマウスにおい

て STZ 投与群で生理食塩水投与群に比べ有意な減弱が認められたが、Sham マウスではほとんど変化が見られなかった (図 1)。一酸化窒素 (NO) ドナーである Sodium nitroprusside (SNP) による内皮依存性弛緩反応はすべてのマウスの胸部大動脈で STZ 投与による変化は見られなかった (図 2)。これらのことから雄では血管内皮機能障害が生じることが示唆され、雌では閉経後モデルである OVX においてのみ血管内皮機能障害を引き起こすことが考えられた。

図1. アセチルコリン (ACh)による内皮依存性累積弛緩反応

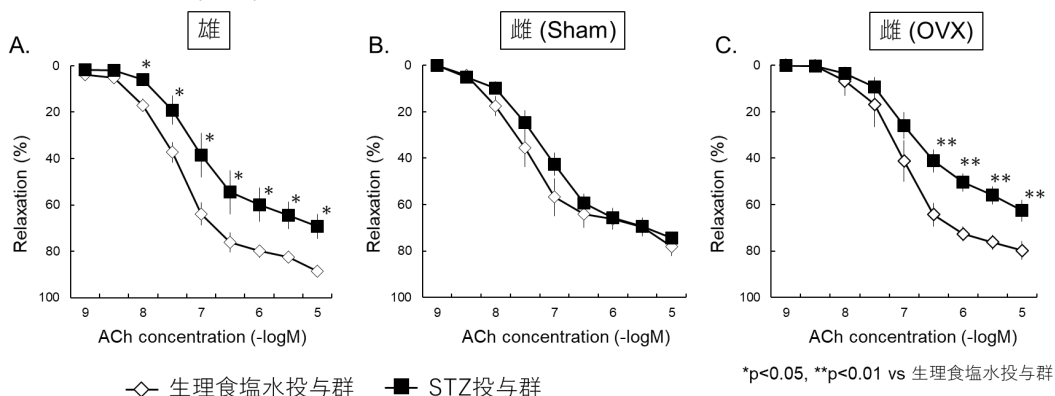
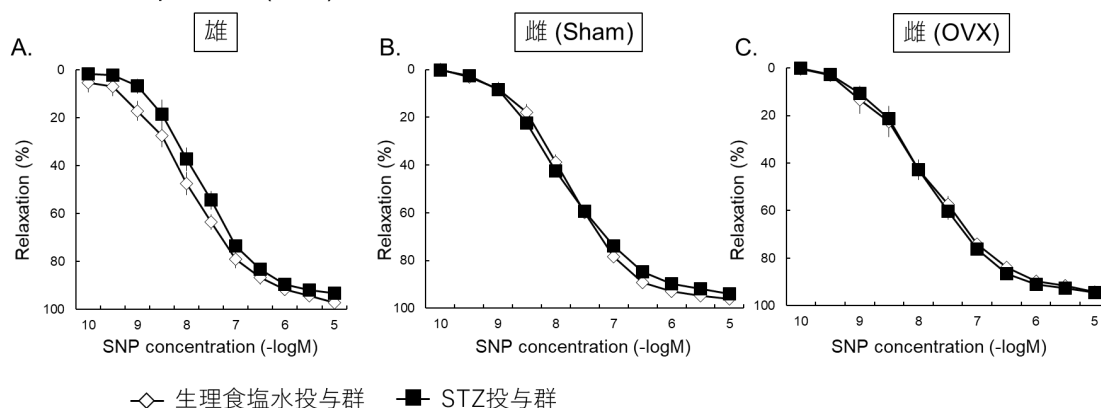


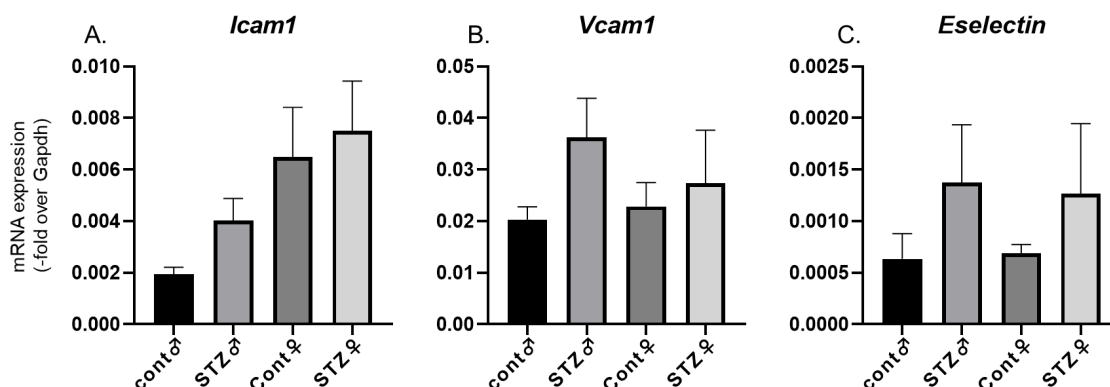
図2. Sodium nitroprusside (SNP)による内皮非依存性累積弛緩反応



(3) 胸部大動脈における遺伝子発現変化の解析 (図 3、図 4)

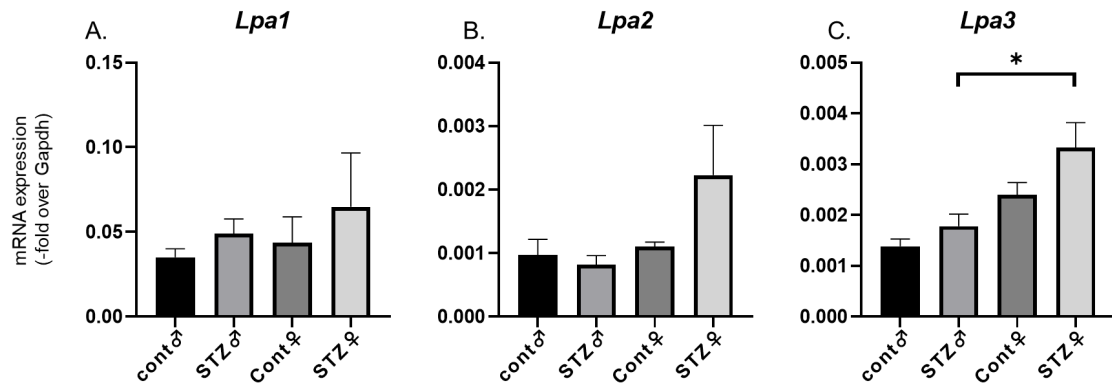
動脈硬化病変で発現が増加する接着分子である ICAM-1、VCAM-1 および E-Selectin の胸部大動脈における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法により測定した。これらの接着因子は雌雄ともに STZ を投与したマウスの胸部大動脈で、生理食塩水群に比べ増加傾向が認められた (図 3)。この結果から雄でも雌でも糖尿病により動脈硬化が進展することが考えられた。

図3. 動脈硬化に関連する遺伝子の発現変化



血管内皮機能障害は雄においてのみ引き起こされるにも関わらず動脈硬化進展は雌雄ともに変化が見られなかったことから、雌雄の血管に差を生じさせる因子について検討した。そこで我々は血管の弛緩や動脈硬化に関わる因子の一つとしてリゾホスファチジン酸 (LPA) に着目し、その受容体である 1 型・2 型および 3 型受容体 (Lpa1、Lpa2 および Lpa3) の遺伝子発現について検討した。その結果、雄や生理食塩水を投与した雌に比べ、STZ を投与した雌のマウスの胸部大動脈で発現が増加していた (図 4)。

図4. LPA受容体遺伝子の発現変化



LPA は培養内皮細胞において血管弛緩因子である一酸化窒素 (NO) 産生を誘導することが示されている (Kou R., et al., Biochemistry, 2002: 4, 4982-4988) 一方、血管内皮細胞の E-Selectin や VCAM-1 の発現を活性化し、白血球の接着や遊走を促進することが報告されている (Rizza C., et al., Lab Invest, 1999: 79, 1227-1235)。雌の STZ 投与群において内皮依存性血管弛緩反応の減弱が認められないにも関わらず動脈硬化因子の遺伝子発現増加を引き起される要因の一つとして、LPA 受容体の発現増加の可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takenouchi Yasuhiro, Seki Yoshie, Shiba Sachiko, Ohtake Kazuo, Nobe Koji, Kasono Keizo	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of dietary palmitoleic acid on vascular function in aorta of diabetic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Endocrine Disorders	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12902-022-01018-2	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 -
1. 著者名 Okamoto Yasuo, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Yamamoto Shinya, Ishimaru Hironobu, Tsuboi Kazuhito	4. 巻 88
2. 論文標題 Sphingosine 1-phosphate receptor type 2 positively regulates interleukin (IL)-4/IL-13-induced STAT6 phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 110156 ~ 110156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2021.110156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Oyadomari Miho, Zhang Jun, Hamada Yoshimasa, Takenouchi Yasuhiro, Tsuboi Kazuhito, Inagaki Mai, Tachikawa Masanori, Fujitani Yoshio, Okamoto Yasuo, Oyadomari Seiichi	4. 巻 54
2. 論文標題 ATF4-mediated transcriptional regulation protects against -cell loss during endoplasmic reticulum stress in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101338 ~ 101338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmet.2021.101338	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 -
1. 著者名 Kitakaze Keisuke, Tsuboi Kazuhito, Tsuda Maho, Takenouchi Yasuhiro, Ishimaru Hironobu, Okamoto Yasuo	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of a selective fluorescence-based enzyme assay for glycerophosphodiesterase family members GDE4 and GDE7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100141 ~ 100141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jlir.2021.100141	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 -

1. 著者名 Tsuboi Kazuhito, Tai Tatsuya, Yamashita Ryouhei, Ali Hanif, Watanabe Takashi, Uyama Toru, Okamoto Yoko, Kitakaze Keisuke, Takenouchi Yasuhiro, Go Shinji, Rahman Iffat Ara Sonia, Houchi Hitoshi, Tanaka Tamotsu, Okamoto Yasuo, Tokumura Akira, Matsuda Junko, Ueda Natsuo	4. 巻 1866
2. 論文標題 Involvement of acid ceramidase in the degradation of bioactive N-acyl ethanolamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158972 ~ 158972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.158972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenouchi Yasuhiro, Kitakaze Keisuke, Tsuboi Kazuhito, Okamoto Yasuo	4. 巻 391
2. 論文標題 Growth differentiation factor 15 facilitates lung fibrosis by activating macrophages and fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112010 ~ 112010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kushibe Seiji, Kobayashi Satoru, Arai Hiroyuki, Hamasaki Kei, Nobe Koji, Takenouchi Yasuhiro, Shiba Sachiko, Otake Kazuo, Shirahata Akira, Kasono Keizo	4. 巻 29
2. 論文標題 Effects of fish oil ingestion on haemorheological examinations in the low oxygen training	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Nutrition	6. 最初と最後の頁 127 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4010/jln.29.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenouchi Yasuhiro, Tsuboi Kazuhito, Ohsuka Kenji, Nobe Koji, Ohtake Kazuo, Okamoto Yasuo, Kasono Keizo	4. 巻 42
2. 論文標題 Chronic Treatment with α -Lipoic Acid Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation of Aortas in High-Fat Diet-Fed Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1456 ~ 1463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00800	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹之内康広, 牧田恭輔, 北風圭介, 坪井一人, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを用いた肺線維化における老化マクロファージの役割の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 石丸浩靖, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおけるp16過剰発現による線維化関連因子の遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 杉本理栄, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける細胞老化関連遺伝子p16 の肺線維化への関与の検討
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井梨玖, 細谷征矢, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維化における老化マクロファージの関与の検討
3. 学会等名 第35回創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細谷征矢, 酒井梨玖, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを用いた肺線維化におけるマクロファージ老化の関与の検討
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takenouchi, Keisuke Kitakaze, Kazuhito Tsuboi, Yasuo Okamoto
2. 発表標題 Growth differentiation factor 15 activates macrophages and fibroblasts
3. 学会等名 Experimental Biology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹之内康広, 新山佳史, 北風圭介, 坪井一人, 岡本 安雄
2. 発表標題 p16強制発現細胞における線維化関連因子の発現変化
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 竹之内康広, 新山佳史, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 p16の強制発現による肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける線維化関連因子の発現の変化
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新山佳史, 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺胞上皮細胞およびマクロファージにおける線維化関連因子の発現に対する老化遺伝子p16の役割
3. 学会等名 第34回 創薬・薬理フォーラム岡山
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 嶋田大雅, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症で増加するGrowth/differentiation factor 15 (GDF15) は線維化促進に関与する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 マウス虚血後再灌流腎間質線維化におけるリゾホスファチジン酸受容体の遺伝子発現変化
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹之内康広, 中川靖仁, 山本優, 荒木啓吾, 北風圭介, 坪井一人, 岡本安雄
2. 発表標題 虚血後再灌流腎間質線維化モデルマウスにおけるリゾホスファチジン酸の受容体および代謝酵素の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第135回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Takenouchi, Kazuhito Tsuboi, Keisuke Kitakaze, Yasuhito Nakagawa, Keigo Araki, Suguru Yamamoto, Yuji Kawai, Daichi Niiyama, Yasuo Okamoto
2. 発表標題 Expression of lysophosphatidic acid receptor subtypes in ischemia/reperfusion-induced renal fibrosis in mice
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹之内康広, 坪井一人, 北風圭介, 岡本安雄
2. 発表標題 肺線維症で増加するgrowth/differentiation factor 15 (GDF15) が線維化へ及ぼす影響
3. 学会等名 第60回日本生化学中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

〔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	岡本 安雄 (Okamoto Yasuo) (80293877)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究 分担者	坪井 一人 (Tsuboi Kazuhito) (80346642)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

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