

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08890

研究課題名(和文) 転写因子Nrf2の活性化を利用してグルコーススパイクによる血管傷害を予防する。

研究課題名(英文) Prevention of the vascular injury induced by glucose spike through the activation of the transcription factor Nrf2

研究代表者

西尾 善彦(Nishio, Yoshihiko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：40281084

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)：8週齢のラットを食餌(コントロール食, CD; ウェスタン食, WTD)およびグルコーススパイク(GS)の有無により4群に分け、12週間給餌後、GS(-)群に生理食塩水をGS(+)群にブドウ糖を1日2回、1週間腹腔内投与した。上記の4群において19週齢でVehicleあるいはバロキサロンメチルを2週間経口投与し、20週で検討を行った。WTD群はCD群に比し血管内皮機能についてGS(+)群においてのみ内皮機能の低下を認めた。この内皮機能低下は、バロキサロンメチル投与群ではWTD-GS(+)群の内皮機能障害を認めず、DHE染色でも蛍光強度の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はグルコーススパイクとインスリン抵抗性の血管内皮機能に及ぼす影響を個別に検討したものであり、グルコーススパイクは食餌誘発性肥満によるインスリン抵抗性との相乗作用によるレドックス関連遺伝子発現の不均衡化を介して、高濃度グルコースに対する血管内皮の脆弱性を増強させることを示した。さらに転写因子nrf2の活性化薬であるCDDO-Meはこの遺伝子発現の不均衡を是正し、グルコーススパイクによる血管内皮機能障害に対して保護効果を有することが明らかになった。この結果は糖尿病の大血管合併症を予防する戦略を考える上で極めて重要な示唆となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neither insulin resistance nor pure glucose spikes significantly deteriorated endothelial dysfunction. However, under high-glucose (20 mM) conditions, the endothelial dysfunction of thoracic aortas from insulin resistant rats subjected to glucose spikes was significantly impaired. We observed significantly enhanced DHE fluorescence as a marker of reactive oxygen species, upregulation of an oxidative stress-related gene (NOX2), and downregulation of an antioxidant gene (SOD2) in the aortas. As expected, treatment of the aorta of this group with antioxidant agents significantly improved endothelial function. We also noted that pretreatment of aortas from the same group with CDDO-Me attenuated endothelial dysfunction, accompanied by a correction of the redox imbalance, as observed in gene expression and DHE fluorescence studies. Thus, we showed that insulin resistance and glucose spikes exert a synergistic effect on aortic endothelial dysfunction and the treatment with CDDO-Me prevent it.

研究分野：糖尿病学

キーワード：内皮機能

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は慢性の高血糖を呈する疾患であるが、患者の予後や QOL に関わるのは血管合併症の存在である。高血糖が血管合併症を誘導するメカニズムについてはこれまで様々な検討がなされてきて、Protein kinase C の異常活性化、終末糖化産物の蓄積、ヘキサミン経路の活性化、ソルビトールの蓄積などその分子メカニズムが提唱されているが、コンセンサスの形成には至っていない。しかしながら、大血管合併症についていえばその分子メカニズムはともかく血管内皮の障害が重要であり、それによる単球や血小板といった血球成分や血管平滑筋とのインターラクションに異常が生じて炎症や、血管壁硬化といった病変が進行することが考えられている。臨床的には高血糖、特にグルコーススパイクと呼ばれる一過性の高血糖が血管内皮細胞障害に重要であること、グルコーススパイクは内皮細胞での酸化ストレスを高め障害を引き起こし、血管壁での炎症反応や遺伝子発現異常を誘導すると考えられている。実際の糖尿病治療の場ではグルコーススパイクを生じさせない食事や血糖降下薬の使い方など様々な工夫がなされているが、糖尿病状態で食後のグルコーススパイクをなくすことは本質的に困難である。したがって、グルコーススパイクによる血管内皮障害を低減する方法を確立することは、糖尿病の血管合併症の克服に直結する極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

酸化ストレスに対処するために細胞は様々な活性酸素処理システムを有しているが、内皮細胞における活性酸素処理に重要なシステムは NADPH、還元型グルタチオンを利用するグルタチオンペルオキシダーゼによるシステムである。この活性酸素処理システムは転写因子 Nrf2 によって発現が誘導されることより転写因子 Nrf2 の活性化がグルコーススパイクによる内皮傷害を予防することができる可能性がある。本研究はラットを用いたグルコーススパイクによる血管傷害モデルを用いて、Nrf2 の活性化がグルコーススパイクによる血管内皮傷害を予防できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

8 週齢の雄性 Wistar ラットを食餌（コントロール食, CD; ウェスタン食, WTD）とグルコーススパイク (GS) の有無により以下の 4 群（各群 7 匹）に分けた: 1) CD-GS (-), 2) CD-GS (+), 3) WTD-GS (-), 4) WTD-GS (+). 給餌は 13 週間（8~21 週齢）行い、20 週齢で GS (-) と GS (+) 群にそれぞれ生理食塩水および 20%ブドウ糖(1 g/kg)を 1 日 2 回、1 週間腹腔内投与した。血糖変動は 48 時間持続的に間質液グルコース濃度で評価した。21 週齢で血液および胸部大動脈を採取し実験に用いた。摘出した大動脈をそれぞれ 5.5 mM および 20 mM グルコースに 2 時間暴露し、ワイヤミオグラフを用いてアセチルコリン (ACh) に対する血管弛緩反応を記録した。また、real-time PCR で遺伝子発現を、DHE 染色でスーパーオキシドの放出量を評価した。さらに CDDO-Me の血管保護効果を評価するため、この 4 群をさらに Vehicle と CDDO-Me 投与群に分けた（計 8 群、各群 4 匹）。それぞれセサミ油と CDDO-Me (3 mg/kg) を 19 週齢より 2 週間、1 日 1 回経口投与した。20 週齢で同様に生理食塩水あるいはブドウ糖を 1 週間腹腔内投与し 21 週齢で胸部大動脈を採取した。統計解析は一元および二元配置分散分析を、相関はピアソンの相関係数を用いた。

4. 研究成果

(1) **結果** 4 群間 (CD-GS [-], CD-GS [+], WTD-GS [-], WTD-GS [+]) の内皮機能の比較では、摘出した動脈を 5 mM グルコースに 2 時間暴露しても 4 群とも内皮障害は認められなかったが、20 mM グルコースに暴露すると WTD-GS (+) 群でのみ内皮機能の低下が認められた。浸透圧対照の 20 mM ラフィノースの暴露ではこの低下は認められなかった。20 mM グルコース下でも NO ドナーであるニトロプルシドに対する血管弛緩反応は 4 群間で差はなく、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME により 4 群間の ACh に対する弛緩反応の差が消失したことから、WTD-GS (+) 群から摘出した大動脈は、高グルコース条件下で NO 依存性弛緩反応が障害されていることが示唆された。この機序を調べるため代謝指標を評価したが、WTD 群は CD 群に比し体重・内蔵脂肪量増加や高インスリン抵抗性を認めたものの、WTD 群の GS (-) と GS (+) 群間で代謝指標に差は認められなかった。しかし内皮機能の指標である pD2 (-log ACh EC 50) 値とインスリン抵抗性指標および血清遊離脂肪酸 (FFA) 値の間に負の相関を認めたことから、インスリン抵抗性、特にメタボリック症候群に関連する因子である FFA が内皮機能の脆弱性と関連している可能性が示唆された。薬理的評価では、NOX2 阻害薬 (GSK2795039)、SOD、ミトコンドリアスーパーオキシド特異的スカベンジャー (Mito-TEMPO) により WTD-GS (+) 群の内皮障害が改善した。遺伝子発現解析では、WTD-GS (+) 群の大動脈において NOX2 の mRNA 発現の増加と SOD2 の mRNA 発現の低下を認め、レドックス関連酵素発現の不均衡化が示唆された。WTD-GS (+) 群より摘出した大動脈を 20 mM グルコースに 2 時間暴露し DHE 染色を行ったところ蛍光強度の増加を認めた。ラジカルソースを明らかにするため各試薬を用いて同様に DHE 染色をした結果、WTD-GS (+) 群の動脈の蛍光強度の増加は GSK2795039 および Mito-TEMPO の添加により消失した。この結果は高グルコース条件下で放出が亢進したスーパーオキシドは NOX2 およびミトコンドリア由来であることを示している (図 1)。次にこの WTD-GS (+) 群の内皮機能の障害が CDDO-Me の投与により改善するかどうかを評価するため、上記の 4 群をさらに Vehicle 群と CDDO-Me 群に分け、それぞれ 2 週間経口投与し同様の実験を行った。その結果、Vehicle を投与した WTD-GS (+) 群では高グルコース条件下で

内皮障害が観察されたが CDDO-Me を投与した同群ではその内皮障害は観察されなかった(図 2) . この CDDO-Me の血管保護効果の機序を明らかにするため、代謝指標への影響を評価したが CDDO-Me 投与による変化は認められなかった . 一方、WTD-GS (+) 群の遺伝子発現解析において Vehicle 群で観察された NOX2 の mRNA 発現の増加と SOD2 の mRNA 発現の低下は CDDO-Me 群では観察されなかった . 同様に WTD-GS (+) 群の DHE 染色では Vehicle 群で認められた高グルコース条件下での蛍光強度の増加が CDDO-Me 群では消失していた(図 3) .

(2) 結論及び考察 WTD 誘発性肥満ラットにグルコーススパイクを反復した結果、高グルコース暴露に対する胸部大動脈内皮機能の脆弱性が亢進した . この内皮機能の脆弱性は CDDO-Me の前投与により改善した . インスリン抵抗性状態でグルコーススパイクを反復することにより高グルコースに対する内皮反応が変化した理由として、レドックス関連酵素発現の不均衡化が考えられる . 今回、既報と同様にグルコーススパイク単独 (CD-GS [+]) 群では NOX2 発現の増加傾向を、WTD 誘発性のインスリン抵抗性単独 (WTD-GS [-]) 群では SOD2 発現の低下傾向を認めたとが有意差はなく、いずれも高グルコース条件において内皮機能障害を惹起するには不十分であった . 一方、インスリン抵抗性とグルコーススパイクの組み合わせにより明らかな NOX2 発現の増加と SOD2 発現の低下を認め、その結果高グルコース条件下の内皮障害を認めた . この相乗効果の機序は不明であるが、pD2 と血清 FFA 値に負の相関があり肥満と関連した高 FFA 血症が関連している可能性がある . FFA 自体に NOX 発現の増加や SOD 発現の低下作用があることが報告されており、FFA とグルコーススパイクの相乗作用によりこれらのレドックス関連酵素発現の不均衡化を惹起したのかもしれない . 高グルコース条件でのみ内皮障害が観察された理由として、内皮細胞は GLUT1 を介して濃度依存的にグルコースを細胞内に取り込むため、高濃度グルコース暴露によりグルコースの細胞内流入が増加する . その結果ミトコンドリア由来のスーパーオキシド産生が増加することにより NO 依存性弛緩反応が减弱した可能性がある . 今回の実験でも Mito-TEMPO により高グルコース下の内皮機能が改善したことはこの仮説を支持する . 特に WTD-GS (+) 群では SOD2 発現の低下によりミトコンドリア由来のスーパーオキシド除去能が低下していることに加え、NOX2 発現の増加が高グルコース条件下でミトコンドリアのスーパーオキシド産生を亢進させることが報告されており、その結果 NO 利用能の低下を介して内皮依存性弛緩反応の低下を認めたと考えられた . CDDO-Me の前投与により WTD-GS (+) 群の NOX2 発現の増加と SOD2 発現の低下が消失した結果、高グルコース条件でも内皮障害やスーパーオキシドの放出亢進は認められなかった .

今回我々は、グルコーススパイクは食餌誘発性肥満によるインスリン抵抗性との相乗作用によるレドックス関連遺伝子発現の不均衡化を介して、高濃度グルコースに対する血管内皮の脆弱性を増強させることを示した . さらに CDDO-Me はこの遺伝子発現の不均衡を是正し、グルコーススパイクに対する内皮機能の保護効果を有することを明らかにした .

図 1

活性酸素種の評価 (D H E 染色)

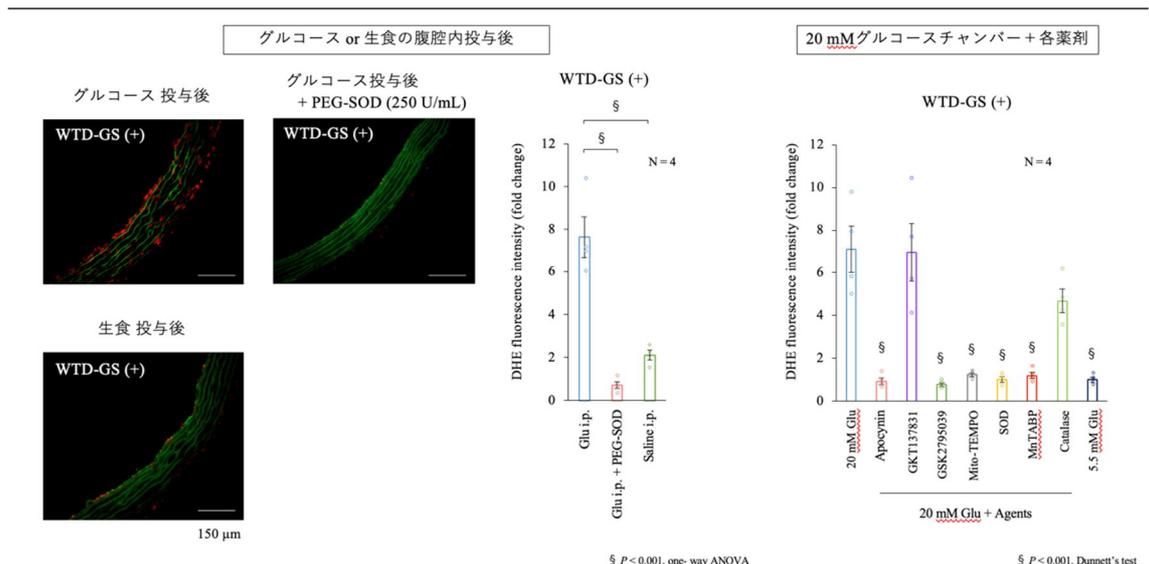


図 2

内皮障害に対するCDDO-Meの効果

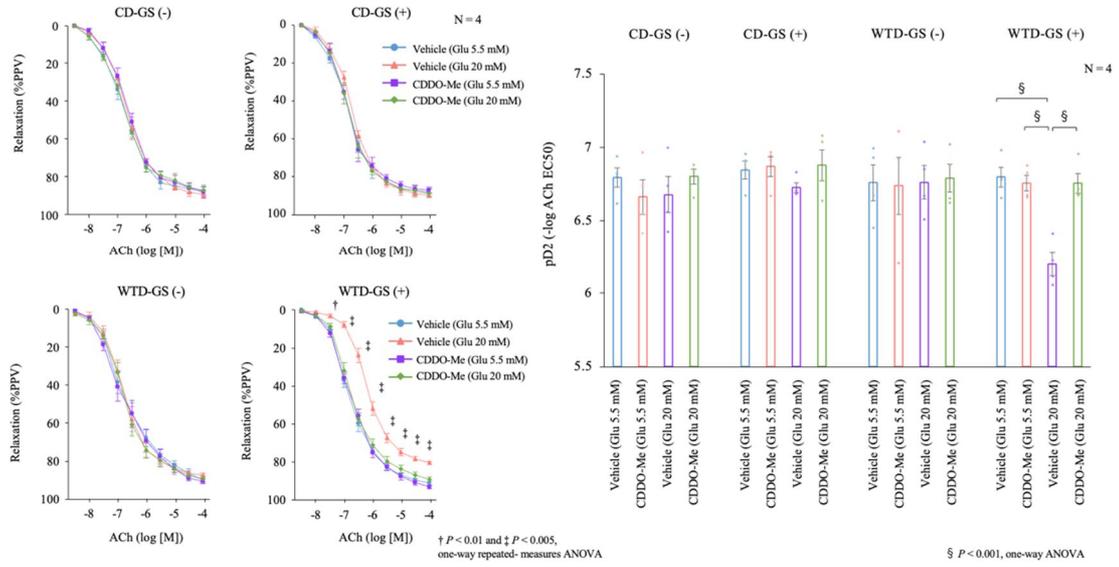
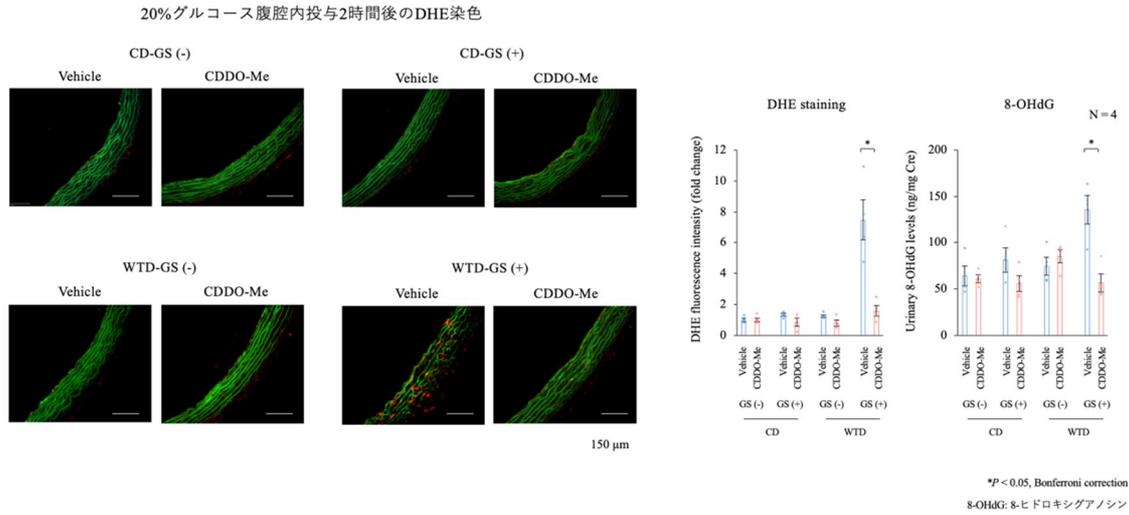


図3

CDDO-Me投与による活性酸素種放出量の変化



*P < 0.05, Bonferroni correction
8-OHdG: 8-ヒドロキシグアノシン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogiso Kazuma, Shayo Sigfrid Casmir, Kawade Shigeru, Hashiguchi Hiroshi, Deguchi Takahisa, Nishio Yoshihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Repeated glucose spikes and insulin resistance synergistically deteriorate endothelial function and bardoxolone methyl ameliorates endothelial dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0263080	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 Shayo Sigfrid Casmir, Ogiso Kazuma, Kawade Shigeru, Hashiguchi Hiroshi, Deguchi Takahisa, Nishio Yoshihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Dietary obesity and glycemc excursions cause a parallel increase in STEAP4 and pro-inflammatory gene expression in murine PBMCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 358 ~ 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13340-021-00542-1	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 小木曾和馬、Shayo Shigfrid、川出茂、橋口裕、出口尚寿、西尾善彦
2. 発表標題 食事誘導性肥満が一過性高血糖による血管内皮障害を増強する機序の検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shayo Shigfrid、小木曾和馬、川出茂、橋口裕、出口尚寿、西尾善彦
2. 発表標題 Glucose spike and high-fat diet differentially regulates atherosclerotic gene in rat peripheral blood mononuclear cells.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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