

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21590290

研究課題名(和文) 糖尿病合併症の原因となる微小血管機能異常の解明および医薬品の効力評価

研究課題名(英文) Studies of micro-vascular dysfunctions in diabetic complications.

研究代表者

野部 浩司 (NOBE, KOJI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：30276612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病合併症は微小血管機能と密接に関わっている。本研究では腸間膜動脈第二分枝(MA2)や腎葉間動脈(ILA)など微小血管標本を用いて、糖尿病性の血管機能障害を解明した。標本は、2型糖尿病モデルより摘出し、phenylephrine誘発収縮応答を、独自に構築したシステムを用いて正常および高血糖条件下にて評価した。MA2収縮は、糖尿病病態下で低下し、細胞外糖濃度依存的な収縮亢進も消失した。これに対して、腎内部のILA収縮は、糖尿病病態下で有意に亢進しており、さらに糖濃度依存的に増加した。これらの結果は、微小血管機能障害がそれぞれの組織で異なった変化することを示している。

研究成果の概要(英文)：Diabetic complications are correlated with dysfunction of small arteries. The objective of this study was to identify alterations of endothelial cell-denuded micro-vascular including mesenteric artery second branch (MA2) and interlobar artery (ILA) contractions as typical small arteries. Both MA2 and ILA tissues were isolated from male type 2 diabetic ob/ob mice aged 16&#8211;22 weeks and age-matched control (Lean) mice. Phenylephrine (PE)-induced contractions were assessed under normal and high-glucose (HG; twice normal glucose concentration) conditions using our originally established measurement system. In MA2, PE-induced contractile responses were reduced in ob/ob mouse and HG-dependent enhancement of the contraction also suppressed compared to the Lean mouse. Oppositely, contraction in ob/ob mouse ILA was increased and HG-dependent enhancement was also detected. These findings indicated that the diabetic micro-vascular functions were individually altered in each tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・薬理系薬学

キーワード：糖尿病 合併症 血管平滑筋 糖尿病性腎症 微小血管障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は、先進国・途上国を問わず全地球的規模で増加している。その多くが、遺伝的要因に加えて生活習慣により引き起こされるインスリン抵抗性の 2 型糖尿病である。その薬物治療は血糖コントロールを柱として行われてきた。しかしながら血糖上昇自体には自覚症状が無く、むしろ引き起こされる種々の糖尿病性合併症が患者の生活の質を低下させる大きな原因となっている。従って、糖尿病合併症の発症を回避する、あるいは合併症を軽減する治療法の確立が求められている。しかしながら、三大合併症(神経症、網膜症、腎症)を含むほとんどの合併症に関しては、その発症原因の詳細が明らかとなっておらず、効果的な治療ターゲットも見いだされていないのが現状である。

2. 研究の目的

糖尿病合併症の発症メカニズムを解明するため、我々研究グループは微小血管障害との関連性に着目した。それは、壊疽を引き起こす神経障害は周辺を走行する血流の障害により引き起こされ、網膜症は網膜に新生される微小血管により引き起こされ、腎症は腎臓内部の血管機能の変化が関連すると考えられるためである。これらのことを背景に、本課題研究では糖尿病モデル動物由来のいくつかの種類の微小血管組織を標本とし、その発生張力変化を検出するシステムを構築すること。さらにこれを用いて糖尿病により引き起こされる血管機能障害発生のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物：本研究ではヒトと類似した高血糖および肥満を伴う 2 型糖尿病モデルとして *ob/ob* mouse (16-22 weeks, mail) を用いた。対象として同過齢の C57Bl (Lean) mouse を用いた。実験動物の飼育、管理および取り扱いに関しては、日本薬理学会が定めたガイドラインに従い、昭和大学および城西大学の動物実験倫理委員会の承認・管理下にて行った。
- (2) 血液成分分析：尾静脈より採取した血液成分の分析は、SRL Inc. (Tokyo, Japan) にて行い、血糖値測定は簡易型血糖測定キットにて測定した。また、糖負荷試験 (OGTT) も一般的な方法に従い行った。
- (3) 微量張力測定装置：本研究の開始にあたり、マウス由来の血管標本による発生張力を測定する専用のシステムを構築した。詳細については研究成果を参照のこと。
- (4) 生化学的検討：標本中の目的タンパク質の発現量変化は Western Blot 法により、mRNA レベル変化は RT-PCR 法により一般的な手法にて行った。

- (5) 試薬：測定に用いた試薬類は全て特級品を用いた (Sigma-Aldrich, USA)。
- (6) データ解析：統計学的分析は、Y-stat program (医学図書出版、Tokyo, Japan) を用い、pared t-test および SNK test (多群間比較検定) にて行った。

4. 研究成果

- (1) 微量張力測定装置の改良と測定条件の設定：本課題研究の開始に当たり、マウス由来の微小血管標本の発生する張力を正確に検出することを試みた。検討に使用した腸間膜動脈第二分枝 (MA2) や腎葉間動脈 (ILA) は、いずれも直径 100~200  $\mu\text{m}$  の血管組織であり、長さも 1 mm 程度であった。さらに発生する張力については、最大 500  $\mu\text{N}$  (= 50 mg) ほどであるため、正確な発生張力変化を検出できるセンサーだけでなく血管標本の変化を正しくセンサーに伝えるピックアップが必要となった。そのため、センサーの感度向上と共にピックアップワイヤーの検討を行った。その結果、ステンレス製で直径 50  $\mu\text{m}$  で強度の高い(曲がりにくい)ワイヤーを選択した。これにより微小血管標本の収縮応答を正確に検出することに成功した。併せて測定条件(静止張力不可の方法や刺激頻度、薬物投与、除去の頻度など)を検討・設定した。対象として用いた胸部大動脈 (aorta) と腎動脈 (renal artery; RA) についても同様に測定条件設定を行った。

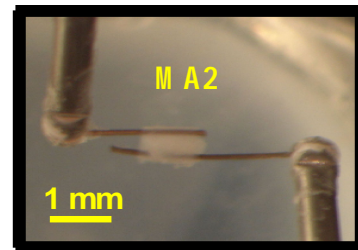


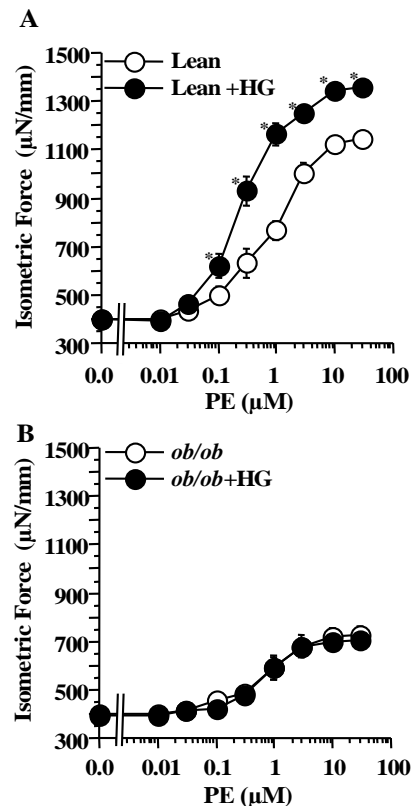
Fig. 1 Micro-vascular force measurement system (pickup wires).

- (2) 2 型糖尿病モデルマウス：本課題研究で採用した 2 型糖尿病モデルマウス (*ob/ob* mouse) について基礎的な検討を行った。対象となる Lean mouse と比較して、*ob/ob* mouse では有意な体重増加や血糖値の上昇などが認められた (Table 1)。しかしながら、腎機能を示す BUN に変化は認められなかったことから、本課題研究で使用したマウスは、慢性的な高血糖と肥満を伴う 2 型糖尿病であるが、腎症を発症する前の状態であると位置づけられた。

mice		Lean	<i>ob/ob</i>
n		5	5
BW	(g)	27.0 ± 3.2	49.5 ± 3.8*
Plasma Fasting glucose	(mg/mL)	139.3 ± 10.4	410.6 ± 22.9*
OGTT	(mg/mL)	222.9 ± 10.9	399.2 ± 15.5*
Insulin	( $\mu$ U/mL)	38.6 ± 3.9	155.5 ± 9.6*
PL	( $\mu$ g/dL)	206.1 ± 17.3	292.5 ± 20.0*
FFA	( $\mu$ EQ/L)	1165.2 ± 71.7	971.3 ± 19.1
TG	(mg/dL)	37.3 ± 3.7	43.9 ± 4.5*
t-Cho	(mg/dL)	107.1 ± 13.6	191.2 ± 9.7*

**Table** Body weights and blood parameters of Lean and *ob/ob* mice. Body weight (BW), 12-h fasted and OGTT (1 g/kg, 30 min post administration) and plasma glucose levels were measured in 16–22-week-old Lean and *ob/ob* mice. Levels of plasma insulin, phospholipids (PL), free fatty acids (FFA), triacylglycerol (TG), and total cholesterol (t-Cho) were measured as described in Materials and Methods. \* $p < 0.01$  vs. Lean mouse (Student's *t*-test).

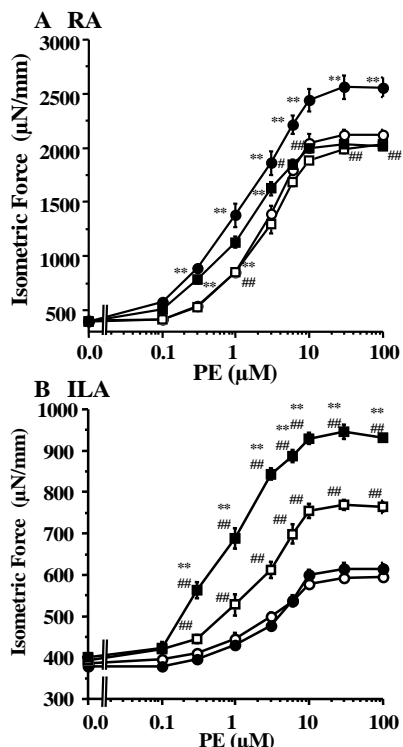
- (3) Phenylephrine (PE) 誘発 ME2 収縮応答変化: 糖尿病病態下の微小血管集収縮応答性変化を検出するため、典型的微小血管とされる MA2 を用いて検討を行った。PE 誘発の経時的・用量依存的な収縮反応は Lean mouse と比較して、*ob/ob* mouse において有意に低下していた (Fig. 2)。さらに糖尿病を想定した高血糖条件下として高糖濃度条件下(通常 2 倍の糖濃度条件下で 30 min 前処理: High glucose: HG 条件下)にて同様な検討を行ったところ、Lean mouse では糖濃度依存的な張力上昇が認められたが、*ob/ob* mouse では糖濃度変化に対する応答性が消失していた。これらの変化は、aorta や腸間膜動脈第一分枝 (MA1) では認められず、微小血管に特有の変化であることが明らかとなった。典型的微小血管組織においては糖尿病病態下で収縮応答性が低下し、食後などの高血糖による応答性も低下していることが示唆された。
- (4) PE 誘発 MA2 収縮応答変化のメカニズム解明: 見いだされた *ob/ob* mouse 由来の MA2 における収縮応答性変化について、その原因となるメカニズムを検討した。その結果、PE が刺激する  $\alpha_1$ -adrenaline receptor ( $\alpha_1$ -AR) の変化や血管平滑筋収縮に不可欠とされる細胞内カルシウムイオンの動員機構に変化は認められなかった。しかしながら、カルシウム非依存的な収縮制御機構である rho-rho kinase 経路の抑制が認められた。特に rho kinase の発現低下は、この経路を介した収縮応答低下を引き起こす大きな要因となることが予想された。ここまでの知見により、糖尿病病態下の微小血管収縮は抑制される傾向が認められ、これは末梢組織への円滑な血流確保を困難にしていることが予想された。



**Fig. 2.** Effects of PE on isometric force response under normal and HG conditions in MA2 isolated from Lean and *ob/ob* mice. MA2 tissues were isolated from Lean (A) and *ob/ob* (B) mice; subsequently, 50 mM KCl-induced isometric force development ( $\mu$ N/mm tissue) was measured as described in Materials and Methods. Following rinsing of tissues, indicated concentrations of PE were introduced under normal and HG (HG-PSS for 30 min) conditions. Concentration–response relationships for PE-induced isometric force responses in MA2 of Lean and *ob/ob* mice are indicated under normal (open) and HG (closed) conditions. Each value represents mean  $\pm$  SEM of 5 independent determinations. \*,  $p < 0.01$  vs. normal glucose conditions.

- (5) PE 誘発 ILA 収縮応答の変化: これまで検討を行ってきた典型的な微小血管障害に加えて、三大合併症の一つである糖尿病性腎症と微小血管機能との関連性を検討した。腎臓に関連する血管組織としてはこれまで RA が用いられ、様々な知見が得られてきた。しかしながら、実際に RA は腎臓と腹部大動脈をつなぐ血管部位であり、腎臓機能に直結する腎臓内部の血管とは言い難い。そこで、腎臓内部で糸球体に血流を送るための微小血管として、ILA を標本として検討を試みた。PE 誘発の経時的・用量依存的な収縮反応は Lean mouse と比較して、*ob/ob* mouse において有意に増加していた (Fig. 3)。さらに HG 条件下にて同様な検討を行ったところ、Lean mouse では糖濃度による収縮への影響はほとんど認められなかったが、*ob/ob*

mouse では糖濃度変化増加により顕著な収縮亢進が認められた。これらの変化は、RA では認められず、腎臓内部の血管組織に特有の変化であることが明らかとなった。腎臓内部の血管は、糖尿病病態下で収縮応答性が上昇し、食後などの高血糖によりさらに収縮亢進することが予想された。



**Fig. 3. Phenylephrine (PE)-induced force development in endothelial-denuded renal (RA) and interlobar (ILA) arterial rings under normal- and high-glucose conditions.** Isometric force developments in RA (A) and ILA (B) isolated from C57Bl (circles) and *ob/ob* (squares) mice were measured as described in “Materials and Methods”. Vascular tissues were pre-incubated under normal (open) and high (closed) glucose conditions at 37 °C for 30 min. Thereafter, indicated concentrations of PE were cumulatively added. Concentration-response relationships for PE-induced responses in RA and ILA were calculated as  $\mu\text{N}/\text{mm}$  tissue length. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of five independent determinations. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs response in normal-PSS. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs C57Bl mouse.

(6) PE 誘発 ILA 収縮応答変化のメカニズム解明:本課題研究により見いだされた *ob/ob* mouse 由来の ILA 収縮亢進のメカニズムを検討した結果、通常の糖濃度条件下にて認められた収縮上昇現象には細胞内カルシウム非依存的な protein kinase C (PKC) の発現上昇が関与していることが明らかとなった。一方、糖濃度依存的な収縮亢進現象に関しては、rho kinase の発現上昇を伴っており、ILA が示した二つの糖濃度条件下にて

引き起こされる収縮亢進現象は、それぞれ PKC と rho kinase の変化が関与していることが明らかとなった。これらの 2 つの細胞内収縮制御因子を人為的にコントロールすることにより、糖尿病性腎症の発症、増悪を軽減できる可能性が見いだされた。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Nobe K, Hashimoto T, Honda K, Two distinct dysfunctions in diabetic mouse mesenteric artery contraction are caused by changes in the Rho-Rho kinase pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, **683**, 217-225 (2012).

Nobe K, Association between diabetes-related factors and vascular smooth muscle function in diabetic complications. *Showa Univ. J. Pharmaceutical. Sci.*, **3**, 115-128 (2013).

[学会発表](計 2 件)

Nobe K, Distinct  $\alpha 1$ -adrenaline receptor subtypes contribute to intra- and extra-renal artery contraction in mice. 第 85 回・日本薬理学会年会(2012).

Nobe K, Alteration of mouse interlobar artery contraction in diabetic mouse model. 第 122 回・日本薬理学会関東部会(2010).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野部 浩司 (KOJI NOBE)

城西大学・薬学部・生理学研究室・准教授

研究者番号：30276617

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：