

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07389

研究課題名(和文) 老化に伴うインスリン抵抗性の病態における血管内皮の シヌクレインの機能の検討

研究課題名(英文) Pathological involvement of endothelial alpha synuclein in age-related insulin resistance

研究代表者

鷹見 洋一 (Takami, Yoichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90621756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内在性及び液性因子としての シヌクレイン(SNCA)は血管内皮細胞(EC)に対し保護的機能を有し、老化に伴う発現低下が血管内皮機能障害に繋がる可能性がある。更に、液性因子としてのSNCAは脂肪組織や骨格筋において糖の取り込みを促進し、糖代謝に対しても保護的に作用する。ECにおいて老化に伴う内在性SNCA発現低下はインスリンによるeNOS活性化の減弱化を起し、また、老化に伴う液性因子としてのSNCAの低下はAkt-eNOS活性化を減弱させることより毛細血管拡張に伴うインスリンの骨格筋間質への動員及び骨格筋のインスリンレセプターへの結合を低下させ、インスリン抵抗性の病態に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSNCAは高血圧とインスリン抵抗性を加齢性疾患としての観点から共通病態基盤として結びつける分子となり、高齢者の予後に強く関連する心血管疾患に対する新規治療標的分子となり得ることを提唱できるものである。更に、SNCAは循環血液中に液性因子として存在し、全身の臓器で機能している可能性がある。現在までの我々の検討では、血管内皮の他、脂肪組織、骨格筋、マクロファージなどで新規機能の可能性を見出しており、加齢に伴う低下が各種加齢性疾患に関連している可能性がある。また、加齢や疾患によりSNCAの凝集による分子形態変化が生じる可能性もあり、それに伴う毒性や機能喪失に伴う病態への関与も想定される。

研究成果の概要(英文)：Alpha-synuclein (SNCA) as an intrinsic and humoral factor has a protective function on vascular endothelial cells (ECs) and its reduced expression with ageing may lead to vascular endothelial dysfunction. Furthermore, SNCA as a humoral factor promotes glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle and has a protective effect on glucose metabolism: the age-related decline in endogenous SNCA expression in ECs leads to attenuated insulin-induced eNOS activation, and the age-related decline in SNCA as a humoral factor leads to Akt-eNOS activation, thereby reducing insulin mobilisation to the skeletal muscle interstitium and binding to skeletal muscle insulin receptors in association with capillary vasodilatation, which may contribute to the pathogenesis of insulin resistance.

研究分野：老年医学

キーワード：シヌクレイン インスリン抵抗性 老化 血管内皮 骨格筋 eNOS 赤血球

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は生活習慣病に対する新規治療標的分子の探索のため、独自の遺伝子機能スクリーニングを行い、候補分子となった新規機能を報告してきた。その解析の過程で、 α -synuclein (SNCA) が血管内皮に発現し、分泌もされていることを発見し、ヒト血中にも数 nM レベルで存在することを見出した。SNCA は神経細胞に豊富に発現し、パーキンソン病などの synucleinopathy の原因物質で、そのオリゴマーの神経毒性は周知のことであるが、その生理機能は不明であった。その中で我々は、マウス及びヒトの検討にて血中 SNCA がメタボリック症候群、特に糖代謝異常や高血圧に対し保護的に作用する可能性があり、更に加齢とともに低下するという全く新規の現象を見出した(*Cell Mol Life Sci.* 2013、*Sci Rep.* 2015)。更に、血管内皮細胞 (EC) では細胞老化に伴い、SNCA の発現が低下し、*in vivo* においても老化マウスの大動脈にて、SNCA の発現が低下することが確認できた。EC にて SNCA をノックダウンすると細胞老化が誘導され、Sirt1 の低下や p53 の上昇などの老化関連分子の変化も認められ、eNOS 発現の低下及び活性の低下という EC の老化形質も呈した。液性因子としての SNCA の機能を検討するためにリコンビナントの SNCA (rSNCA) を EC に添加すると、eNOS の活性化及び NO の産生、NF κ B 活性抑制作用が確認できた。更に、SNCA ノックアウトマウス (SNCA KO) を用いての検討にて、大動脈輪のアセチルコリンに対する弛緩反応の減弱、収縮期血圧の上昇も認めた。以上より SNCA は EC の老化を調節し、血管内皮での老化に伴う内在性及び外因性 SNCA の低下は血管内皮機能低下に関与する可能性が考えられた (*FASEB J.* 2022)。

これまで我々は新規の老化関連分子としての SNCA が様々な加齢性疾患と関連するとの独自の観点から前述の血管内皮における細胞老化や加齢に伴う血管内皮機能障害に加え、脂肪や筋肉での糖代謝異常における病態生理機能との関連も示してきた。循環血液中に機能性分子として SNCA が存在していることから、液性因子として他の末梢組織においても機能し、血管内皮より分泌されている SNCA も関与していることも想定される。老化に伴い増加するインスリン抵抗性と高血圧は密接に関連しているが、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では血管内皮機能についての先行結果及びインスリン抵抗性と高血圧がヒト血中濃度 SNCA と強い負の相関を認めることや SNCA ノックアウトマウスではインスリン抵抗性を呈する先行結果を踏まえ、老化に伴うインスリン抵抗性の増大の機序について、高血圧との共通基盤と想定する血管内皮における内在性及び外因性の SNCA の機能低下との関連を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

骨格筋はインスリンによる糖の取り込みにおいて最も主要な器官であり、インスリン抵抗性の病態に大きく関与する。骨格筋において血管内皮機能はインスリン感受性に関与し、Akt-eNOS 経路活性化による毛細血管拡張に伴うインスリンの骨格筋間質への動員が骨格筋のインスリンレセプターへの結合を促進するためである。老化に伴い毛細血管における内在性及び外因性 SNCA の機能低下により eNOS 活性化が低下、毛細血管拡張障害を来し、骨格筋間質のインスリンの動員低下により骨格筋での糖の取り込みが低下するとの仮説のもと、以下の方法により検討した。

(1) EC における内在性 SNCA のインスリンシグナル、eNOS 活性化への影響の検討

HUVEC において SNCA を siRNA によりノックダウンをし、insulin(1.2mM)を添加後、30 分に細胞を回収し、Western blot にて下流の Akt の活性化 (phospho-Akt, total Akt) eNOS(phospho-eNOS, total eNOS)の活性化の状態を検討した。

(2) 飽和脂肪酸によるインスリンシグナル伝達障害に対する液性因子としての SNCA の作用の検討

脂肪細胞において、老化や肥満に伴い血中に増加する飽和脂肪酸はインスリンシグナル伝達障害を惹起することでインスリン抵抗性に関与するが、TLR4 を介した NF κ B 活性化がその病態で

重要であることが知られている。同様に血管内皮障害に伴うインスリンシグナル、eNOS 活性化にも影響していることが想定される。HUVEC に NFκB レポーター遺伝子をリポフェクションにより導入し、リコンビナント SNCA (rSNCA)10nM を添加後、不飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) 1.0mM で刺激後、NFκB 活性をルシフェラーゼ活性を測定することで検討した。また、rSNCA 添加による NFκB 活性の変化に伴う eNOS 活性への影響を Western blot にて評価した。

(3) *in vivo* での液性因子としての SNCA の組織における糖代謝への影響の検討。

野生型マウス (WT) へ rSNCA (14μg/kg) 及びトリチウムでラベルした 2-deoxy-D-glucose を静脈内投与することにより骨格筋や脂肪組織における糖の取り込みを RI 活性を測定することにより検討した。

(4) 血中 SNCA に関する組織の検討

In vivo における液性因子としての SNCA を規定する組織を検討する。最も SNCA を多く発現する脳の血中 SNCA への関与を検討するため、SNCA ノックアウトマウスの脳特異的 SNCA 過剰発現マウス (Thy1-SNCA : SNCA KO) を作成し、WT 及び SNCA KO の血中 SNCA を比較した。また、末梢においては赤血球に SNCA は多く発現していることから骨髓移植の実験系を用いて血球中の SNCA の血中 SNCA の関与を検討した。

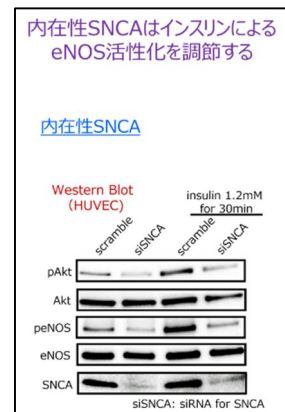
(5) 血管内皮内在性及び液性因子としての SNCA に関連する遺伝子改変マウスの作成およびその糖代謝機能の解析

血管内皮内在性 SNCA について、誘導型血管内皮特異的 SNCA KO (SNCA^{fl/fl}; VE-cadherin-CreERT2^{+/+}; iEC-SNCA KO) を作成し、そのコントロールとしては VE-cadherin-CreERT2^{+/+}とした (Tamoxifen(2 mg/25 g)を腹腔内投与)、液性因子としての SNCA については赤血球特異的 SNCA KO (SNCA^{fl/fl}; HBB-Cre^{+/+}; RBC-SNCA KO) を作成し、そのコントロールは HBB-Cre^{+/+}とした。更に液性因子としての SNCA については造血細胞特異的 SNCA KO (SNCA^{fl/fl}; Vav1-iCre^{+/+}; HC-SNCA KO) も作成し、Vav1-iCre^{+/+}をコントロールとした。

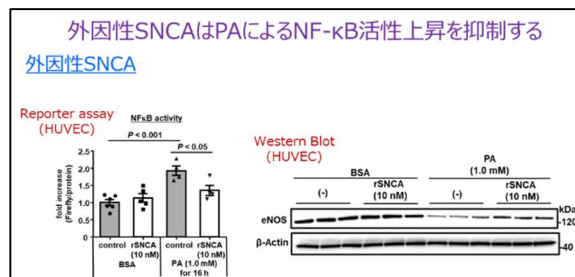
4. 研究成果

方法に記載した項目に対応した結果を示す。

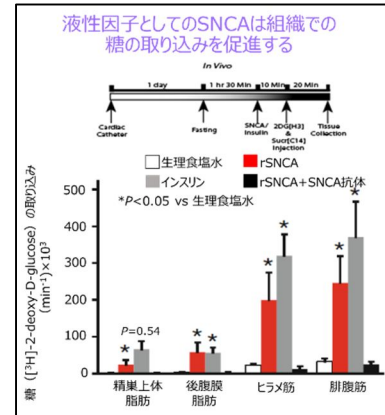
(1) HUVEC において内在性 SNCA の loss-of-function により insulin 添加による Akt の活性化が減弱し、更に eNOS の活性化も減弱を認めた。



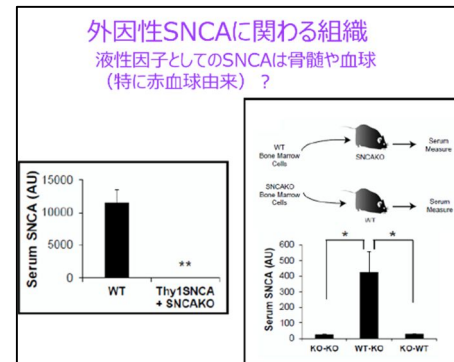
(2) HUVEC において rSNCA を添加することにより、PA による NFκB 活性の上昇が抑制され、更にそれに伴う eNOS 発現低下も抑制された。



- (3) マウスへの rSNCA 静脈投与により、骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋)及び脂肪組織(精巢上体脂肪、後腹膜脂肪)での糖の取り込みが上昇した。



- (4) Thy-1-SNCA:SNCA KO の血中 SNCA は SNCA KO に比し有意な変化を認めず、WT に比しては有意に低下していた。また、WT の骨髄を SNCA KO に骨髄移植すると血中 SNCA 濃度は有意に上昇し、SNCA KO の骨髄を WT に骨髄移植すると血中 SNCA 濃度は有意に低下を認めた。



- (5) iEC-SNCA KO (Tamoxifen (2 mg/25 g)を腹腔内投与)及び RBC-SNCA KO では各々、血管内皮及び赤血球において有意な SNCA 発現低下を認めなかった。HC-SNCA KO については Western blot にて赤血球において SNCA 発現を認めず、血清においても SNCA 発現は認めなかった。

我々は SNCAKO がインスリン抵抗性を呈することを報告したが、その機序は明らかでなかった。骨格筋は糖の取り込みにおいて最も主要な器官であり、その際にはインスリンによる血管内皮での Akt-eNOS 経路活性化による毛細血管拡張に伴うインスリンの骨格筋間質への動員、骨格筋のインスリンレセプターへの結合が重要な役割を担っている。我々は siRNA にて SNCA をノックダウンした EC において、インスリンによる eNOS 活性化が減弱することを見出した。これは老化に伴うインスリン抵抗性の病態に、血管内皮での SNCA の発現低下が関与する可能性を示唆するものと考えられる。また、老化に伴う循環血液中の液性因子としての SNCA の低下に伴い抗炎症作用が減弱することによる EC における eNOS 活性減弱や骨格筋や脂肪細胞での糖の取り込みの減弱もその病態に関与している可能性がある。in vivo における液性因子としての SNCA は前述の結果より脳ではなく、血球、特に発現の多い赤血球と考えられた。上述の如く iEC-SNCA KO 及び RBC-SNCA KO は当初の予定通りには組織特異的な SNCA のノックアウトを認めなかったが、HC-SNCA KO では赤血球及び血清 SNCA のノックアウトが認められ、液性因子としての SNCA についての in vivo における検討に用いることが期待できる。HC-SNCA KO は現在、交配中であり、更なる組織発現プロファイルを確認の上、液性因子としての SNCA の in vivo におけるの糖代謝への機能への関与を血管内皮機能を視点に検討予定としている。

インスリン抵抗性の病態において脂肪組織も重要な役割を担う。老化に伴い血中に増加する飽和脂肪酸は脂肪組織において PKC- θ のリン酸化 (Ser1101) による IRS-1 の不活化及び TLR4 を介する NF κ B 活性化を起こし、インスリンシグナルの障害をもたらすが、rSNCA がこれらを減弱させることを確認している。脂肪炎症にはマクロファージ (M ϕ) とのクロストークが病態に大きく関与する。M ϕ 活性化に関わる分子として、AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) があり、インスリン抵抗性を惹起することが報告されている。M ϕ に rSNCA を添加すると、AIM の発現及び分泌が抑制されることも見出している。液性因子としての SNCA について脂肪炎症

における病態生理機能についてもインスリン抵抗性の病態を検討する上で今後の課題である。

以上、老化に伴う血管内皮における内在性および外因性の SNCA の低下は、インスリン抵抗性の病態に關与している可能性が示唆された。

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 Takami Yoichi, Wang Cheng, Nakagami Hironori, Yamamoto Koichi, Nozato Yoichi, Imaizumi Yuki, Nagasawa Motonori, Takeshita Hikari, Nakajima Tsuneo, Takeda Shuko, Takeya Yasushi, Kaneda Yasufumi, Rakugi Hiromi	4. 巻 36
2. 論文標題 Novel pathophysiological roles of synuclein in age related vascular endothelial dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22555.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101621R	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	中神 啓徳 (Nakagami Hironori) (20325369)	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授 (14401)	
研究分担者	武田 朱公 (Takeda Shuko) (50784708)	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授 (14401)	

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