

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17690

研究課題名（和文）糖尿病による平滑筋細胞老化と動脈硬化の検討

研究課題名（英文）Smooth Muscle Cell Senescence and Atherosclerosis in Diabetes

研究代表者

中島 健一（Nakajima, Kenichi）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10815806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病の治療に伴う低血糖が死亡や心血管イベントを増加させる可能性がある。本研究では、低血糖がラット血管平滑筋全細胞に対する細胞老化関連酸性 α -ガラクトシダーゼ染色陽性細胞の割合を増加させることが明らかになり、低血糖が老化を促進させている可能性がある。その機序としてAMPKのリン酸化が関連している可能性がわかった。今後、血管老化の評価でもある脈波伝播速度と低血糖の関連性を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
日常の臨床において低血糖の発症を避けながら治療を行うことが重要である。本研究により低血糖そのものが血管平滑筋細胞の老化を引き起こす可能性が示唆された。つまり、低血糖そのものが動脈硬化を進める可能性がある。さらに低血糖が血管平滑筋の老化を起こす機序を解明することで、動脈硬化の発症進展を抑制する新たな治療ターゲットを見出せる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that hypoglycemia increases the proportion of cells positive for cell senescence-associated acidic α -galactosidase staining in rat vascular smooth muscle cells, suggesting that hypoglycemia may promote aging. The phosphorylation of AMPK may be involved in this mechanism. In the future, we plan to investigate the relationship between hypoglycemia and arterial aging by evaluating pulse wave velocity, which is also an assessment of vascular aging.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 低血糖 動脈硬化 平滑筋細胞 老化

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、心血管イベント発症の危険因子である。健康寿命の延伸のためには、心血管イベント発症抑制は重要な課題である。UKPDS35 の結果(Stratton IM et al BMJ 2000)、HbA1c の低下に伴い大血管障害のリスクが減少するものの、この関連性は糖尿病性細小血管症に比較すると小さいことが明らかになった。また、大規模試験の結果、HbA1c を指標とした厳格な血糖コントロールでは複合心血管イベントが抑制されないことが示された(The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group NEJM 2008, Patel A et al, NEJM 2008, Duckworth W et al, NEJM 2009)。また、同時に、厳格な血糖コントロールにより引き起こされる低血糖が死亡を増加させる可能性も指摘された。

既報では、低血糖が自律神経系を活性化させ、不整脈を引き起こし、死亡を増加させることが示唆されているが、私たちは低血糖が動脈硬化を促進させる可能性も想起した。私たちは、これまでに低血糖と動脈硬化性疾患進展に着目して研究を進め、非肥満 2 型糖尿病モデルである GK ラットにおいて繰り返す低血糖は血中アドレナリンの増加を介して、血管内皮細胞の接着因子の発現を増加させ、血管内皮細胞への単球接着を亢進させることや血管平滑筋細胞の増殖を促進させ、血管障害後の新生内膜の増加を引き起こすことを明らかにしてきた (Jin WL et al Diabetologia 2011, Yasunari E et al Endocrinology 2014)。しかし、低血糖を頻回に繰り返すと交感神経が不活化し、いわゆる無自覚性低血糖の状態となる。従って、この機序のみでは低血糖に対する動脈硬化進展の機序を説明できない。

一方で、加齢に伴って血管は、構造的あるいは機能的に変化し、老化する。日本人の平均寿命が大きく伸び、血管そのものが、老化することに加えて、糖尿病などの動脈硬化を促進させる疾患を併発することにより、心血管疾患のリスクがより増加するようになったと考えられる。糖尿病状態では、高血糖による酸化ストレスの産生が増加し、テロミア長の短縮を介して血管細胞の細胞老化を促進させ、ひいては、動脈硬化性疾患の発症に関与している可能性がある。また、2 型糖尿病を基盤とした動脈硬化性疾患の特徴のひとつとして血管の石灰化と硬化が挙げられる。一般的に、糖尿病などで認められるメンケベルグ型血管中膜石灰化は、血管平滑筋細胞を中心に形成され、大動脈～細動脈まで広い範囲で観察される。血管平滑筋細胞の細胞老化は、このような血管壁の石灰化や硬化に関与することが報告されており、平滑筋細胞の細胞老化を抑制することで動脈硬化性疾患の発症進展を抑制できる可能性がある。従って、高血糖による血管老化を抑制することは重要であるが、前述したように、高血糖の是正のみでは、心血管イベント発症を十分に抑制できないことから、低血糖も血管の老化の促進に関与する因子ではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、ラット平滑筋細胞や低血糖モデルラットを用いて低血糖が平滑筋細胞の細胞老化に与える影響を検討する。また、2 型糖尿病患者において低血糖が血管の老化に与える影響も検討する。日常の臨床において低血糖の発症を避けながら治療を行うことが重要であるが、本研究により低血糖による動脈硬化の発症進展の新たな分子機序を明らかにできれば、新規の治療薬開発時の有用な情報を提供しうる可能性もあり意義が深い。

3. 研究の方法

(1) 低血糖が血管平滑筋細胞の細胞老化を促進させるか否かを明らかにする

ラット血管平滑筋細胞を正常血糖(90mg/dl)と低血糖(40mg/dl)の条件で3-4日間培養し、細胞老化関連酸性ガラクトシトシダーゼ染色で細胞老化を評価する。同時に、低血糖が平滑筋細胞の増殖能に与える影響をBrd-U染色で、アポトーシスに与える影響に関してannexinVを用いたFACSなどで評価する。

(2) 低血糖が血管平滑筋細胞の老化を促進させる機序を解明する。

細胞老化を起こした細胞の多くが細胞周期のG1期に停止している。この現象には、癌抑制遺伝子 p53 のリン酸化が関与していることが知られている。本研究では培養平滑筋細胞を用いて低血糖から p53 のリン酸化、細胞周期停止等をもたらすシグナル経路を解明する。これに関して、P53 のリン酸化に影響を及ぼす因子として AMPK が知られており、AMPK の活性化を確認するとともに細胞老化、アポトーシスや細胞周期停止に関連する癌抑制遺伝子 p53 の発現をウェスタンブロッティング法で評価する。

(3) 2 型糖尿病患者における検討

現在、約 1000 名の心血管イベントの既往のない日本人 2 型糖尿病患者を対象に持続グルコースモニタリングにより評価した血糖変動と心血管イベントあるいは動脈硬化の指標の変化との関連性を 5 年間にわたり観察するコホート研究を行っている。本研究では、ベースラインで 445 名の患者に血管硬化を評価する脈波伝播速度(baPWV)を測定している。老化により血管硬化が引き

起こされるため、baPWV は、血管老化の指標としても知られている (Laurent S et al 2016 Can J Cardiol)。持続グルコースモニタリングにより評価した低血糖と 2,5 年目に測定する baPWV のベースラインからの変化の関連性を検討し、低血糖の血管老化に与える影響を 2 型糖尿病患者でも評価する。

対象者

30 歳～80 歳の外来通院中の 2 型糖尿病患者で、本研究への参加同意日から遡って半年間糖尿病治療薬の変更を行っていない(ただしインスリンの用量調整は可能)もしくは今後治療を変更する予定のない、血糖コントロールが安定した方。

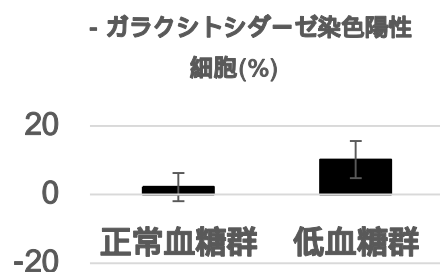
baPWV 測定方法

baPWV は血圧脈波検査装置 ABI-form(BP-203 RPE)により、5 分間のベッド上安静後、仰臥位で測定し、ABI(ankle-brachial index) 0.90 の患者は末梢動脈疾患ありと考え除外した。

4. 研究成果

(1)低血糖が血管平滑筋細胞の細胞老化を促進させるか否かを明らかにする

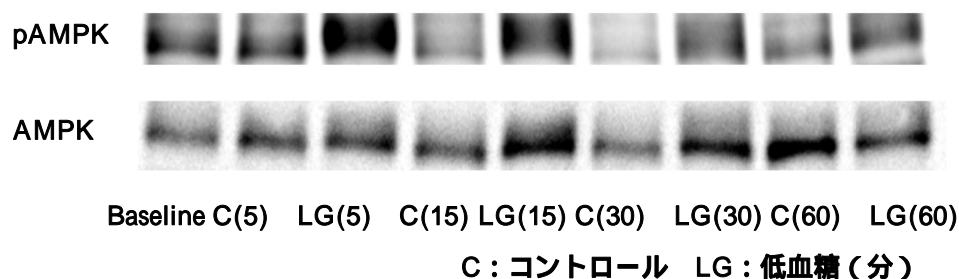
ラット血管平滑筋細胞を正常血糖(90mg/dl)と低血糖(40mg/dl)の条件で 3 - 4 日間培養し、細胞老化関連酸性ガラクトシダーゼ染色で細胞老化を評価した。低血糖条件では全細胞に対するガラクトシダーゼ染色陽性細胞の割合が増加していた(下図)。従って、低血糖は血管平滑筋細胞の老化を増加させると考えられる。



今後は低血糖が、平滑筋細胞の増殖能に与える影響を Brd-U 染色で、アポトーシスに与える影響に関して annexinV を用いた FACS など で評価する予定である。

(2)低血糖が血管平滑筋細胞の老化を促進させる機序を解明する。

細胞老化を起こした細胞の多くが細胞周期の G1 期に停止している。この現象には、癌抑制遺伝子 p53 のリン酸化が関与していることが知られている。本研究では培養平滑筋細胞を用いて低血糖から p53 のリン酸化、細胞周期停止等をもたらすシグナル経路を検討した。これに関して、P53 のリン酸化に影響を及ぼす因子として AMPK が知られている。低血糖条件は平滑筋細胞において P53 のリン酸化に影響を及ぼす因子である AMPK の活性化をきたすことを確認した(下図)。今後、ラット血管平滑筋細胞を正常血糖(90mg/dl)と低血糖(40mg/dl)の条件で培養し、AMPK の活性化を再確認するとともに細胞老化、アポトーシスや細胞周期停止に関連する癌抑制遺伝子 p53 の発現をウェスタンブロッティング法で評価する予定である。



今後は、低血糖が血管平滑筋細胞の細胞老化に与える影響を in vivo で検討する予定である。10 週令の GK ラットの腹腔内に生理食塩水を投与したコントロール群、インスリンを投与し低血糖を引き起こさせた低血糖群、インスリンと同時にグルコースを投与し低血糖を回避させた低血糖回避群を作成し、5 週間、3 日に 1 回注射を繰り返す。5 週後に各ラットから大動脈を摘出しパラフィン切片を作成し、低血糖による細胞老化への影響を老化関連酸性ガラクトシダーゼ染色で評価する。本検討により、低血糖が高インスリン血症と独立して、細胞老化を促進させるかを検討する予定である。

(3)2 型糖尿病患者における検討

現在、5 年時の baPWV 測定を行っている。今後、持続グルコースモニタリングにより評価した低血糖と baPWV のベースラインからの変化の関連性を検討し、低血糖の血管老化に与える影響を検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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