

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659586

研究課題名(和文) 糖尿病治療薬をターゲットとした新しい血管病治療の探索研究

研究課題名(英文) New strategy using diabetes therapeutic drug for the patients with vascular disease

研究代表者

古森 公浩 (KOMORI, KIMIHIRO)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40225587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】マウス下肢虚血モデルを用いて2型糖尿病治療薬であるメトホルミン投与による血管新生効果を検討した。【方法】野生型マウスとeNOS遺伝子欠損マウスを、メトホルミン投与群(M群)と非投与群(C群)に分類し下肢虚血モデルを作製【結果】野生型マウスM群で有意に虚血/健肢血流比が改善した。毛細血管密度とAMPK/eNOSリン酸化率もM群で有意に高かった。一方eNOS遺伝子欠損マウスでAMPKリン酸化率はM群で有意に高かったが、血流と毛細血管密度は両群で差はなかった【結論】メトホルミンは下肢虚血状態で血流を改善した。その機序としてAMPK/eNOS活性血路による血管新生促進作用が考えられた。

研究成果の概要(英文)：(Background) We investigated whether metformin modulates the revascularization processes in vivo employing a hindlimb model of ischemia-induced angiogenesis. (Methods) Wild-type (WT) mice or eNOS deficient (eNOS-KO) mice were randomly divided into two groups. Mice were treated with or without metformin and were subjected to unilateral hind limb ischemia. (Results) WT mice (metformin group) showed accelerated limb perfusion following hindlimb ischemic surgery based upon laser Doppler measurements of blood flow and increased capillary density in ischemic muscle compared to non-treated mice. Metformin group significantly enhanced ischemia-induced increase in AMPK and eNOS phosphorylation levels in WT mice. In eNOS-KO mice, metformin significantly increased the phosphorylation of AMPK in ischemic tissue, but did not affect blood flow recovery in ischemic limb. (Conclusions) Metformin could promote revascularization in response to tissue ischemia via an AMPK/eNOS-dependent mechanism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 外科学一般

キーワード：血管外科学

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は、心筋梗塞や脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった重篤な大血管障害の罹患率を上昇させる危険因子の一つである。メトフォルミンは2 型糖尿病の経口治療薬として、世界中で広く用いられている。近年の研究において、メトフォルミンは血糖降下作用以外の機序を介する心血管保護作用を有しており、心血管障害による糖尿病関連死の減少に寄与することが報告されている。その他にも、メトフォルミンが血管内皮細胞機能を促進することや、肥満ラットモデルにおいて血管リモデリングを抑制することも知られている。

これらのメトフォルミンの多面的作用(pleiotropic effects)の機序には、AMPK の活性化が関与していることが、多くの研究報告から分かってきた。メトフォルミンは、肝細胞や内皮細胞において AMPK を活性化する。一方で、AMPK は生体のエネルギーや代謝恒常性の調節を司っており、eNOS のリン酸化を直接的に促進することが知られている。また、AMPK activator(活性化因子)が eNOS のリン酸化を介して血管内皮細胞機能を促進することも報告されている。しかしながら、メトフォルミンの血管新生促進効果に関しては、未だ報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、マウス下肢虚血モデルを用いて、メトフォルミン投与が虚血組織における血管新生作用に影響を及ぼすか否かを検討すること。

3. 研究の方法

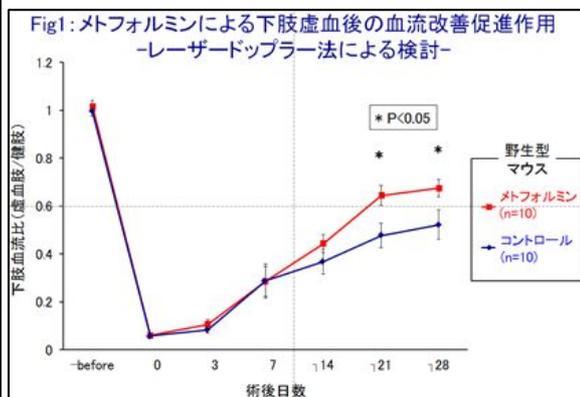
野生型マウス(N=20)と eNOS 遺伝子欠損マウス(N=10)を、各々メトフォルミン投与群(強制経口投与, 150 or 300mg/kg/day)と非投与群に分類した。メトフォルミン投与開始翌日に、マウス片側下肢虚血モデルを作製した。モデル作製後も引き続き、メトフォルミン投与を 28 日間連続して行った。体重、血糖値、血中インスリン値を、各々メトフォルミン投与開始前と術後 28 日目に測定した。血管新生の効果判定として、(1)レーザー Doppler 血流解析を用いて術後 3, 7, 14, 21, 28 日目に計測、(2)CD31 免疫組織染色を用いて毛細血管密度を測定、 α -SMA 免疫組織染色を用いて細動脈密度を測定、(3)Western blot 法を用いて AMPK と eNOS のリン酸化率を測定した。

4. 研究成果

(1)結果

メトフォルミン投与は、体重、血糖値、インスリン値のいずれも影響を与えなかった。野生型マウスのメトフォルミン投与群では、術後 28 日目に虚血肢/健肢血流比が非投与群

と比較して有意に改善した(Fig1)。



虚血肢の毛細血管密度と細動脈密度に関しても、メトフォルミン投与群の方が有意に高い結果であった。また、術後 7 日目のメトフォルミン投与群の虚血筋肉組織において、AMPK と eNOS のリン酸化の増強が確認された。

一方 eNOS 遺伝子欠損マウスでは、虚血肢/健肢血流比は両群間で有意差を認めなかった。また野生型マウスと比べて下肢虚血の程度が重症であったことから、臨床スコアを用いた比較評価も行ったが、両群間の差は認めなかった。虚血肢の毛細血管密度と細動脈密度に関しても、両群間で差は認めなかった。すなわち、eNOS 遺伝子欠損マウスにおいては、メトフォルミン投与による下肢虚血後の血管新生促進作用は認めなかった。一方、AMPK のリン酸化に関しては、メトフォルミン投与群の方が非投与群と比べて有意に増強していた。

(2)考察

野生型マウスのメトフォルミン投与群では、虚血肢の血流が改善し、毛細血管密度と細血管密度が増加することがわかった。また、虚血筋肉組織における AMPK と eNOS のリン酸化の増強が確認された。しかし、一方で eNOS 遺伝子欠損マウスにおいては、メトフォルミン投与による虚血肢の血流改善や、毛細血管と細血管密度の増加は認めなかった。このことから、メトフォルミン投与による虚血肢の血流改善効果と血管新生効果には、eNOS の活性化が関わっていると考えられた。

2 型糖尿病は、心筋梗塞や脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった重篤な大血管障害の罹患率を上昇させる危険因子の一つであり、その機序としては、虚血状態下で細小血管が障害され、側副路血管の発達が抑制される事が知られている。一方、本研究ではメトフォルミン投与により虚血組織における血管新生効果が増強されたことから、メトフォルミンが糖尿病関連血管障害疾患を改善する効果を有する可能性が示唆されたと言えるであろう。

メトフォルミンは AMPK を活性化し、血管内皮細胞における eNOS の活性化を促すことがすでに報告されている。また、我々は過去に AMPK の活性化が虚血肢の血管新生を促進するという報告をしている。すなわち今回、eNOS 遺伝子欠損マウスの虚血筋肉組織において AMPK が活性化していたにも関わらず、メトフォルミン投与による血流改善を認めなかったことを考え合わせると、メトフォルミンの血管新生効果は、AMPK/eNOS 依存経路の活性化を介していると考えられた。

(3)結論

メトフォルミン投与により、野生型マウス下肢虚血モデルにおける虚血肢の血流は改善した。その機序としては、AMPK/eNOS 依存経路の活性化により、血管新生効果が増強されることが考えられた。本研究により、メトフォルミンはその血糖降下作用に加えて、虚血組織における血管新生促進作用を有しており、虚血性動脈疾患の病態を改善する効果が期待されることが示唆された。

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 28 件)

1. Takahashi N, Shibata R, Ouchi N, Sugimoto M, Murohara T, Komori K: Metformin stimulates ischemia-induced revascularization through an eNOS dependent pathway in the ischemic hindlimb mice model J Vasc Surg, 2014. in press, 査読有
2. Kodama A, Itoh T, Komori K: Possible roles of 5-HT in vein graft failure due to intimal hyperplasia 5-HT, nitric oxide and vein graft. Surg Today;44:213-8,2014, 査読有 doi:10.1007/s00595-013-0555-z.
3. Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Kato T, Asai N, Komori K, Takahashi M: Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure. J Vasc Surg. 2013 Aug 12, 査読有 doi: 10.1016/j.jvs.2013.06.080.
4. Inoue Y, Yoshikawa D, Ishii H, Isobe S, Kumagai S, Suzuki S, Okumura S, Hayashi M, Matsubara T, Ohshima S, Banno H, Komori K, Kato K, Murohara T: Post Stress Perfusion Abnormalities Detected by Myocardial Perfusion SPECT Predict Long-Term Mortality after Elective Abdominal Aortic Aneurysm Repair. Circulation Journal,77(5):1229-34, 2013, 査読有
5. Ihara T, Komori K, Yamamoto K, Kobayashi M, Banno H, Kodama A: Three-Dimensional Workstation is Useful for Measuring the Correct Size of Abdominal Aortic Aneurysm Diameters. Annals of Vascular Surgery, 27(2):154-61,2013, 査読有 doi:10.1016/j.avsg.2012.03.009.
6. Maekawa T, Komori K, Morisaki K, Itoh T: Ezetimibe reduces intimal hyperplasia in rabbit jugular vein graft. J Vasc Surg;56(6):1689-97, 2012, 査読有
7. Maekawa T, Komori K, Kajikuri J, Itoh T: Characteristics of the actions by which 5-hydroxytryptamine affects electrical and mechanical activities in rabbit jugular vein graft. Br J Pharmacol, 166(4):1419-32,2012, 査読有 doi10.1111/j.1476-5381.2012.01867.x
8. Hori A, Shibata R, Morisaki K, Murohara T, Komori K: Cilostazol stimulates revascularization in response to ischaemia via an eNOS-dependent mechanism. Eur J Vasc Endovasc Surg,43(1):62-5, 2012, 査読有 doi:10.1016/j.ejvs.2011.07.015.

[学会発表](計 65 件)

1. 古森公浩
血管病治療のパラダイムシフト 大動脈瘤と末梢動脈閉塞症
日本医工学治療学会 第 30 回学術大会
(2014 年 3 月 21 日名鉄グランドホテル、名古屋市)
2. 古森公浩

- 破裂性腹部大動脈瘤治療の最前線
第 50 回 日本腹部救急医学会総会
(2014年3月6~7日京王プラザホテル、
東京都新宿区)
3. Komori K
Can pre op myocardial perfusion SPE
CT test predict late CV death after
AAA repair.
Controversies and Updates in Vascul
ar Surgery (CACVS)
(2014年1月23-25日 Paris, France)
 4. 古森公浩
静脈血栓塞栓症
第 75 回日本臨床外科学会総会
(2013年11月21日名古屋国際会議場、
名古屋市)
 5. 古森公浩
Peripheral arterial disease (PAD) 治
療の最前線
第 54 回日本脈管学会総会
(2013年10月10~12日 ステーション
コンファレンス東京、東京都千代田区)
 6. 古森公浩
末梢動脈疾患の診療
第 4 回脈管専門医教育セッション
(2013年10月11日 ステーションコン
ファレンス東京、東京都千代田区)
 7. 古森公浩
Periphral Arterial Disease (PAD) の
検査とマネジメント
第 6 回 DAIICHI-SANKYO SYMPOSIUM FOR
THROMBOSIS UPDATE
(2013年5月31日 山形国際ホテル、山
形市)
 8. 古森公浩
血管病治療のパラダイムシフト
第 113 回日本外科学会定期学術総会
(2013年4月11日~13日福岡国際会議
場、福岡市)
 9. 古森公浩
腎動脈再建を伴う腹部大動脈瘤手術
第 113 回日本外科学会定期学術総会
(2013年4月11日~13日福岡国際会議
場、福岡市)
 10. 古森公浩
Stentgraft の過去 5 年の変遷と治療成
績
第 7 回 Japan Endovascular Symposium
(2012年8月30日 東京慈恵医科大学、
東京都港区)
11. 古森公浩
重症虚血肢に対する集学的治療
第 112 回日本外科学会定期学術総会
(2012年4月12日~14日幕張メッセ
千葉市)
- 〔図書〕(計 6 件)
1. 古森公浩(森正樹、土岐祐一郎、左近賢
人、池田正孝)(株式会社南江堂)
エキスパートによる 消化器外科 静脈
血栓塞栓症 診療指針
.診断 CQ39 どんなときに VTE を使う
のか?
189(140-142), 2014.3.31 発行
 2. 古森公浩(他 34 名)(株式会社医学書院)
今日の治療指針
末梢性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症、バ
ージャー病)
2128(419-421), 2014.1.1 発行
 3. 古森公浩(高本眞一)(株式会社文光堂)
腹部大動脈瘤に対するステントグラフ
ト治療
心臓外科 Knack & Pitfalls
大動脈外科の要点と盲点 第 2 版
426(362-374), 2013.10.7 発行
 4. 古森公浩(加藤治文、畠山勝義、北野正
剛、若林剛)(株式会社医学書院)
第 18 章 リンパ系
標準外科学 第 13 版
743(667-670), 2013.3.1 発行
 5. 古森公浩(井上博、許俊鋭、檜垣實男、
代田浩之、筒井裕之)
(株式会社医学書院)
急性動脈閉塞症、急性上腸間膜動脈閉塞
症、コルステロール塞栓
今日の循環器疾患治療指針
968(731-737), 2013.1.1 発行
- 〔その他〕
ホームページ等
名古屋大学 大学院 医学系研究科 血管外科
<http://www.vasc Surg.jp/>
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
古森 公浩 (KOMORI KIMIHIRO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40225587

(2)研究分担者

成田 裕司 (NARITA HIROSHI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 00528739

児玉 章朗 (KODAMA AKIO)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号： 10528748

杉本 昌之 (SUGIMOTO MASAYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号： 0047814