

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750361

研究課題名(和文) 低血糖による動脈硬化促進機序の解明

研究課題名(英文) Investigation the mechanism of hypoglycemic state induced atherogenic progression

研究代表者

後藤 広昌 (Goto, Hiromasa)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90622746

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)：GKラット頸動脈にバルーン障害を加え、腹腔内に生食投与群(S群)、インスリン(15U/kg)投与による反復低血糖群(S群)、インスリン(15U/kg)、ブドウ糖を同時投与による低血糖回避群(IG群)に分け検討した所、I群ではS群およびIG群と比較し細胞増殖を伴う有意な頸動脈新生内膜形成増加を認め、興味深い事に β_1 受容体拮抗薬の併用投与を行うと新生内膜形成の増加が有意に抑制された。

ラット平滑筋の検討ではアドレナリン刺激により濃度依存的に細胞増殖能が増加しており、 β_1 受容体拮抗薬前投与により細胞の G0/G1 からS 期への移行を抑制することで平滑筋細胞増殖抑制に寄与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, insulin was injected intraperitoneally into nonobese diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats, once every 3 days for 4 weeks after balloon injury of carotid artery to induce hypoglycemia. Then, we evaluated balloon injury-induced neointima formation. Insulin treatment enhanced neointima formation and increased the number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells in the carotid artery. Injection of glucose with insulin prevented hypoglycemia and abrogated intimal thickening. Also, bunazosin, an β_1 adrenergic receptor antagonist, prevented intimal thickening and accumulation of PCNA-positive cells induced by insulin treatment despite the presence of concomitant hypoglycemia and high adrenaline levels. Incubation of cultured smooth muscle cells with adrenaline resulted in a significant increase in their proliferation and G0/G1 to S phase progression. These adrenaline-induced effects were abrogated by bunazosin.

研究分野：代謝内分泌学 (糖尿病学・内分泌学)

キーワード：低血糖症 新生内膜形成 アドレナリン作用

1. 研究開始当初の背景

高血糖そのものが血管障害を引き起こすことから、血糖管理を行えば心血管イベントの発症を抑制することが期待される。しかしながら最近発表された大規模研究の結果、厳格な血糖コントロールのみでは心血管イベントの発症を抑制できないことが示された。同時に、厳格な血糖コントロールを行うことでむしろ死亡が増加しており、この死亡に低血糖が影響していることを示唆する報告もなされている。これまでの報告では、低血糖が自律神経系を障害させ不整脈などにより死亡を引き起こしていると推測しているがその詳細なメカニズムは必ずしも明らかになっていない。特に低血糖が動脈硬化に与える影響に関しては不明である。この点に関して我々は非肥満型糖尿病モデルである GK ラットを用いてインスリンを注射することで誘発した低血糖が血管内皮細胞への単球の接着に与える影響を世界で初めて検討した (Jin WL et al *diabetologia* 2011)。結果として、インスリンで誘導される低血糖はラット大動脈の血管内皮細胞への単球接着を亢進させた。また、グルコースをインスリンと同時に投与し低血糖を回避させることで単球接着の増加は抑制された。低血糖の際に血中アドレナリンが増加していたため、この作用を抑制させる目的で $\alpha 1B$ 受容体阻害剤を混餌し同様の検討を行った。インスリンによる低血糖を認めているのも関わらず、 $\alpha 1B$ 受容体阻害剤によりアドレナリン作用を抑制すると血管内皮細胞への単球接着の増加は抑制された。

次に、アドレナリンの血管に対する作用を検討した。HUVEC にアドレナリンを負荷したところ、転写因子の NF-kB や接着因子の発現が増加した。この増加はアデニル酸シクラーゼの阻害剤により消失したことから、アドレナリンが cAMP/NF-KB 経路を活性化させ、接着因子の発現を増加させていることが示唆された。これらの結果から、低血糖を繰り返すことは血中アドレナリン増加による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と考えられる。

一方で、動脈硬化病変の形成は内皮の炎症、単球 (マクロファージ) の接着と遊走以外にも、平滑筋細胞の増殖と遊走といった複雑に絡み合ったメカニズムで構成されているが、特に、進行した動脈硬化病変では内膜下に増殖・遊走した平滑筋細胞が主な細胞である事が知られている (Stary HC et al. *Circulation* 1995)。低血糖が心血管死を増加させる可能性が示唆されているが、これには低血糖が平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、プラーク破綻を引き起こしている可能性がある。また、糖尿病患者において平滑筋細胞増殖がプライマリーの動脈硬化形成に重要であるのみならず (Dzau VJ et al. *Nat Med* 2002)、冠動脈病変拡張後の再狭窄の重要なメカニズムである事が言われている (Kornowski R et al. *Circulation* 1997)。実際に、非糖尿病患者に比較して糖尿病患者では冠動脈形成術後の再狭窄が多いことが報告されており、高血糖が平滑筋細胞の増殖などを促進させることが原因の一つになっていることが示唆されている (Berry C. *JACC* 2007)。他方、低血糖も同様に冠動脈形成術後の再狭窄に関連している可能性が示されている (Nusca A et al. *Catheter Cardiovasc Interv* 2011)。そこで、本研究では低血糖が動脈硬化に与える影響をさらに検討する

こととした。

2. 研究の目的

低血糖が動脈硬化進展に関わっている可能性が示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では低血糖モデルラットやマウスモデルを作成し、低血糖が血管障害後の内膜新生に与える影響に与える影響を検討する。また、*in vitro* で低血糖が平滑筋細胞に与える影響及びそのメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

1) 低血糖が平滑筋細胞の増殖及びバルーンによる血管障害後の新生内膜形成亢進に関与するか否かを、非肥満糖尿病モデルである GK ラットを用いて検討する。

10 週令の非肥満糖尿病モデルである GK ラットの頸動脈にバルーンにて血管障害を引き起こさせる(図 2)。次に、この GK ラットの腹腔内に生理食塩水を投与した①コントロール群(S 群)、インスリンを投与し低血糖を引き起こさせた(I 群)②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(IG 群)③低血糖回避群を作成し、4 週間 3 日に 1 回注射を繰り返す。注射後、血糖値の推移を測定することにより、低血糖の有無を確認した。また、低血糖の際にカテコラミンなどの増加が認められるかを採血にて確認した。4 週後に各ラットから左右頸動脈を摘出しパラフィン切片を作成する。バルーン挿入部から 0.5mm、1.0mm、1.5mm、2mm、2.5mm、3mm 体側の血管切片を elastic Verhoeff-Van Gieson 染色し、イメージ・アナライザーにて Intima, Media, Intima/Media ratio を定量的に評価した。次に、低血糖の際のカテコラミン増加が内膜新生形成に関与している可能性があるた

め以下の実験を行った。10 週令の GK ラットの頸動脈にバルーンにて血管障害を引き起こさせた。次に、この 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(SN 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(IN 群)、さらに、普通食に $\alpha 1$ 受容体拮抗薬(塩酸ブナゾシン)を混餌させ、生理食塩水を投与した $\alpha 1$ ブロッカー群(SB 群)、インスリンにより低血糖を引き起こさせるが $\alpha 1$ 受容体拮抗薬(塩酸ブナゾシン)によりカテコラミン作用を阻害した低血糖+ $\alpha 1$ 受容体拮抗薬(塩酸ブナゾシン)群を作成し(IB 群)、同様に 3 日 1 回注射を繰り返し、4 週後にラット頸動脈を抽出し、血管障害後の新生内膜形成を評価した。

2)ラット血管平滑筋細胞を用いて、カテコラミンが平滑筋細胞を増殖させるメカニズムを検討する。

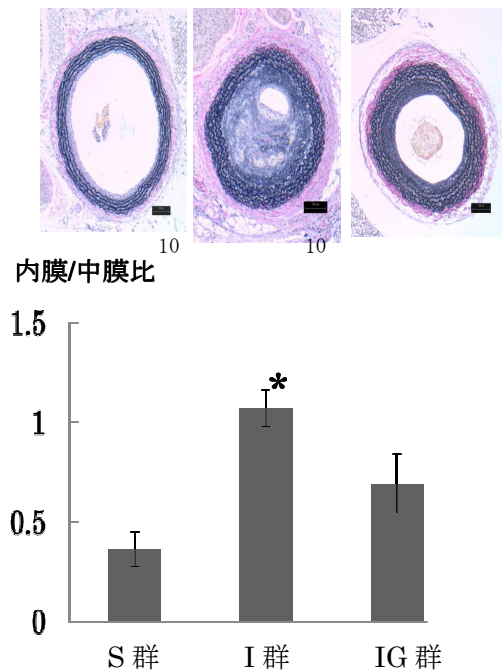
ラットの血管平滑筋細胞にアドレナリンで刺激した際の細胞増殖の変化を Brd-U assay で検討した。次に、 $\alpha 1$ 受容体拮抗薬(塩酸ブナゾシン)を前投与しアドレナリンの作用を阻害した場合の細胞増殖の変化も Brd-U assay で評価する。さらに、アドレナリンの下流の細胞増殖に関わるシグナルをウエスタンブロット法や細胞周期移行を Flow Cytometry Analysis を用いて解析した。

4. 研究成果

11 週令 GK ラットの頸動脈をバルーンで傷害し、3 日毎に生食を腹腔内投与する群(S 群)、インスリン(15U/kg)を投与し繰り返し低血糖を起こす群、インスリン(15U/kg)と共にブドウ糖を投与し低血糖を回避する群(IG 群)に分け、低血糖の新生内膜形成に与える影響について検討した。血糖の推移に関しては S 群では変化がなかったが、I 群

では血糖は 2.5mmol/l 程度まで低下し、低血糖が発症したと考えられた。一方で、IG 群では血糖は 4.6mmol/l 程度まで低下にとどまり、低血糖は回避できた。

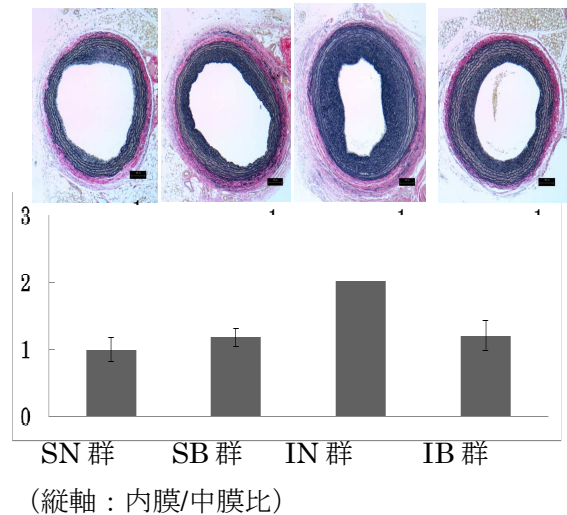
頸動脈をバルーンで傷害後、4 週間の間、3 群間で、体重や脂質代謝に関しては差を認めなかった。このような状況下で、I 群では S 群および IG 群と比較し、細胞増殖を伴って、頸動脈の血管傷害後の新生内膜形成は、有意に増加していた（下図）。



低血糖によるアドレナリンの増加が新生内膜形成に与える影響を与えていると考え、生食投与+普通食群(SN 群)、生食投与+ $\alpha 1$ 受容体拮抗薬(塩酸ブナゾシン)混餌群(SB 群)、インスリン投与による低血糖+普通食群(IN 群)、インスリン投与による低血糖+ $\alpha 1$ 受容体拮抗薬混餌群(IB 群)の 4 群でその影響を検討した。先ほどのプロトコールと同様にバルーンによる頸動脈の血管傷害後、3 日毎にこれらの注射を繰り返した。

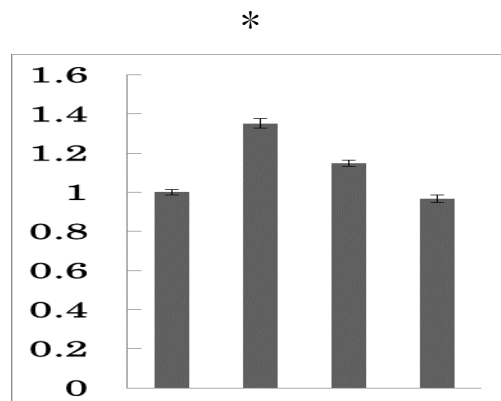
SB 群と IB 群では低血糖を認め、血清のアドレナリンおよびノルアドレナリンの値が増加していた。頸動脈をバルーンで傷害後、4 週間の間、4 群間で、体重や脂質代謝に関しては差を認めなかった。このよう

な状況下で、I 群では S 群および IG 群と比較し、細胞増殖を伴って、頸動脈の血管傷害後の新生内膜形成は、有意に増加していた（下図）。一方で、低血糖によりアドレナリンの増加を認めたものの、 $\alpha 1$ 受容体拮抗薬を投与している IB 群では、IN 群と比較し、細胞増殖の抑制と伴に血管傷害後の新生内膜形成の増加が有意に抑制されていた。



以上、in vivo のデータから、低血糖の際のアドレナリン作用によりバルーン障害後の内膜新生が亢進されると考えられた。

In vitro ではラット SMC はアドレナリン刺激により濃度依存的(0.1-10 μ M)に BrdU で評価した増殖能は、有意な増加した。このアドレナリンによる平滑筋増殖能は、塩酸ブナゾシンを前投与することにより抑制できた（下図）。



アドレナリン-	+	+	-
塩酸ブナゾシン-	-	+	+

また、アドレナリンは、細胞増殖シグナル **ERK** のリン酸化を亢進させた。さらに、フローサイトメトリーの検討から細胞の **S** 期へ移行を促進させていることがわかった。これらのアドレナリンによる作用は塩酸ブナゾシンを同時に投与することにより有意に抑制された。

以上より、繰り返す低血糖によるアドレナリン作用の増加は、平滑筋細胞の増殖を促進し、バルーン傷害後の内膜の新生が増加する。このデータから臨床の現場において、血管形成術後の再狭窄に低血糖が関与する可能性があり、特にインスリン治療中の患者の低血糖の合併に十分留意する必要がある。

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 1 件)

Repetitive hypoglycemia increases circulating adrenaline level with resultant worsening of intimal thickening after vascular injury in male Goto-Kakizaki rat carotid artery.

Yasunari E, Mita T, Osonoi Y, Azuma K, Goto H, Ohmura C, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H.

Endocrinology. 2014 155(6):2244-53

査読 有り

[学会発表] (計 1 件)

三田 智也

繰り返す低血糖はアドレナリン作用の増加を介して平滑筋細胞の増殖と血管傷害後の新生内膜形成を促進させる

糖尿病合併症学会 2013 年 09 月 13 日～2013 年 09 月 14 日 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 広昌 (Hiromasa Goto)

順天堂大学大学院 医学部

助教

研究者番号 : 90622746