

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460497

研究課題名(和文)なぜ耐糖能異常は動脈硬化性疾患の危険因子なのか：新規モデルマウスを用いた解析

研究課題名(英文) Impaired glucose tolerance as a risk factor for arteriosclerotic disease: analysis in new model mice

研究代表者

浅井 明 (ASAI, Akira)

東北大学・農学研究科・特任准教授

研究者番号：30500011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：耐糖能異常易発性と抵抗性(Prone系とResistant系)の新規モデルマウスを用いた動脈硬化巣形成モデル実験系を確立し、Prone系での動脈硬化巣形成の亢進を確認した。さらに、この実験系でのProne系マウスにおける動脈硬化巣形成が、メトホルミンの投与によって抑制されることを明らかにした。また、耐糖能異常における「血糖値変動の繰り返し」が動脈硬化巣形成に及ぼす影響をより直接的に評価するモデル実験系を構築し、グルコース投与によって血糖値変動を誘発したマウスで動脈硬化巣形成が亢進することを認めた。以上の結果は、耐糖能異常が生体レベルで動脈硬化巣初期形成を惹起することを明確に示している。

研究成果の概要(英文)：We established an experimental model system for assessing atherosclerotic lesion formation in vivo using new impaired glucose tolerance-prone and -resistant mice. We confirmed that arteriosclerotic lesion formation is accelerated in the prone mice as compared to the resistant mice. In addition, the accelerated lesion formation in the prone mice was suppressed by metformin. We also established another experimental model system for evaluating the effect of repetitive blood glucose spikes more directly on atherosclerotic lesion formation, and demonstrated that oral glucose administration-induced blood glucose fluctuation accelerates the lesion formation in mice. These results clearly demonstrate that impaired glucose tolerance actually evokes atherosclerotic lesion formation in vivo.

研究分野：糖尿病代謝学

キーワード：耐糖能異常 動脈硬化 糖尿病 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は動脈硬化性疾患の重要な危険因子であり、欧米では糖尿病患者の実に 40~50%が心筋梗塞を直接の死因としている。糖代謝異常による動脈硬化性疾患発症リスクの増大は、2 型糖尿病の前段階である耐糖能異常者において既に認められ、多くの疫学的研究の結果は、食後の血糖値上昇が空腹時血糖よりも優れた心血管疾患の予測因子であることを示している。

食後高血糖は、活性酸素・窒素種の過剰産生などを介して動脈硬化巣の形成を促進するものと考えられ(図 1)、いくつかの研究では食後の血糖上昇に伴う酸化・ニトロ化マーカーの上昇や血管内皮機能の低下が示されている。しかし、このようなバイオマーカーの一過的な変動が示されている一方で、食後高血糖による血糖値変動 (glycemic spike) の繰り返しが、実際の転帰として動脈硬化病変の進展に至ることを示す生体 (動物) レベルでの実験的知見は乏しく、動脈硬化巣形成の促進において、図 1 に示したような仮説の中で実際にどの経路が中心的な役割を担っているのかは明らかでない。

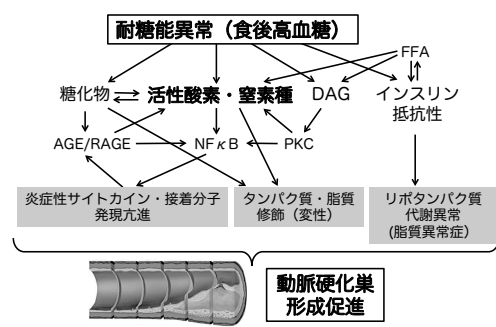


図 1 耐糖能異常はなぜ動脈硬化巣形成を促進するのか (生体内で推定される様々な経路)

これまでの糖尿病と動脈硬化性疾患との関係についての動物実験では、レプチン受容体欠損マウスや STZ 投与マウスなどの糖尿病マウスとアポリポプロテイン E や LDL 受容体などの遺伝子欠損による高コレステロール血症マウスとの交配モデルが主に用いられてきた。しかし、これら既存のモデル動物は、進行した糖尿病モデルであり、空腹時血糖も著高で脂質代謝にも異常をきたしている。また、顕著な高コレステロール血症によって動脈硬化病変も著しく進行した状態となる。したがって、これら既存のモデル動物を用いて、『耐糖能異常 (前糖尿病段階) と動脈硬化巣の初期形成との関係』を評価することは困難である。

一方で、近年我々が選抜交配によって新たに確立した耐糖能異常易発性の Prone 系マウスは、ヒトと同様、多遺伝子性の耐糖能異常発症基盤を有し、著明な空腹時血糖の上昇は認めず、経口ブドウ糖負荷試験において臨床上の耐糖能異常者とよく似た血糖変動を示す [Nagao et al., J Diabetes Invest, 2012]。

また、血中脂質にも顕著な異常は認めず動脈硬化巣の形成も上記のモデル動物と比較して軽度である。したがって、耐糖能異常易発性の Prone 系のマウスとその対照としての正常耐糖能を維持する Resistant 系マウスは、糖尿病前段階としての耐糖能異常が動脈硬化巣形成の初期段階に与える影響を生体レベルで評価しうるこれまでにないモデル動物である。実際、研究代表者らはこれまでに選抜交配過程のマウスを用いた試験において、Prone 系マウスにおける動脈硬化巣形成が Resistant 系マウスと比較して顕著に亢進することを見出している (図 2) [Asai et al., Atherosclerosis, 2013]。

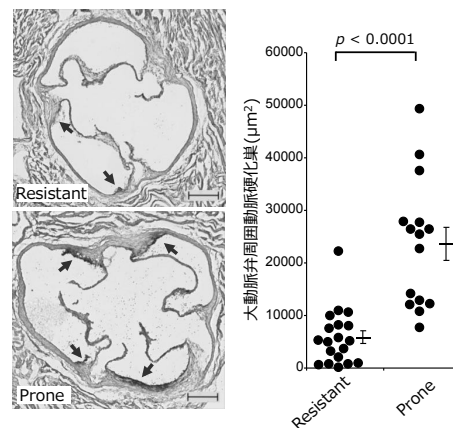


図 2 正常体糖能 (Resistant 系) マウスと比較して耐糖能異常 (Prone 系) マウスでは動脈硬化巣形成 (矢印) の亢進を認める

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが近年新たに確立した耐糖能異常易発性 (Prone 系) および耐糖能異常抵抗性 (Resistant 系) の 2 系統のマウスを主に用いて、(1) 動脈硬化巣の形成・進展に及ぼす耐糖能異常 (食後高血糖) の影響を評価する動物モデル系を確立し、(2) 耐糖能異常と動脈硬化巣形成との因果関係 (作用機序) を動物レベルで明らかにするとともに、(3) 耐糖能異常による動脈硬化巣形成促進に対する種々の介入の有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化巣の形成・進展に及ぼす耐糖能異常の影響を評価する動物モデル系確立

① Prone/Resistant 両系統マウスの飼育期間、飼料等を検討し、定量的な動脈硬化巣形成が再現性よく得られる飼育試験条件を確立する。

② 耐糖能異常において「血糖値変動の繰り返し」が動脈硬化巣形成に及ぼす影響をより直接的に評価する実験系として、通常マウスを用いてグルコースを反復投与する実験系を新たに構築する。

(2) 耐糖能異常が動脈硬化巣形成を促進する作用機序の動物レベルでの解析

上記(1)で構築した実験系において、動脈壁の解析を中心に、どのような変化が動脈硬化巣の形成に先行して認められるのかを検討する。

(3)耐糖能異常による動脈硬化巣形成促進に対する介入の有効性

上記(1)で構築した実験系における血糖降下薬等の有効性(動脈硬化抑制作用)を検討し、耐糖能異常と動脈硬化との関連を解析するための生体(動物)レベルでの評価系としての有用性を検証する。

4. 研究成果

(1)動脈硬化巣の形成・進展に及ぼす耐糖能異常の影響を評価する動物モデル系確立

①「Prone/Resistant系モデル」

Prone/Resistant 両系統の雌性マウスを動脈硬化誘発飼料(コレステロール/コラーゲン含有高脂肪飼料)で20週間(8~20週齢)飼育することによって、大動脈弁周囲に定量解析可能な動脈硬化巣が形成され、Prone系で動脈硬化巣が亢進していることを確認した。また、この試験飼育条件で形成される動脈硬化巣の大きさには優れた再現性があり、Prone系における動脈硬化巣の平均サイズはResistant系の約4倍であった。

②「グルコース反復投与モデル」

雌性C57BL/6マウスを用いて①と同様の条件で飼育し、その試験飼育期間を通じて、グルコースの経口投与(1日2回)を継続した。その結果、グルコース投与後に一過性の血糖値上昇を認め、試験飼育期間後の大動脈弁周囲における動脈硬化巣サイズは蒸留水を投与した対照マウスの約4倍であった。グルコース投与マウスと対照マウスの間で、体重、脂肪組織重量、各血清脂質パラメーター等には差を認めなかったことから、この「グルコース反復投与モデル」は、動脈硬化巣形成における血糖値変動の直接的な作用の評価に有用と考えられた(図3)。

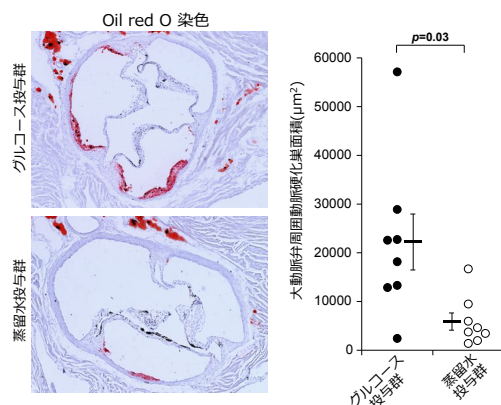


図3 グルコース反復投与による血糖値変動の繰り返しはマウス大動脈弁周囲における動脈硬化巣形成(矢印)を促進した

(2)耐糖能異常が動脈硬化巣形成を促進する作用機序の動物レベルでの解析

上記(1)②の「グルコース反復投与モデル」において明らかな動脈硬化巣の形成を認めない胸部大動脈壁を用いた遺伝子発現解析の結果、グルコース反復投与マウスで動脈壁へのマクロファージの集積や接着分子群の発現が上昇することを支持する知見を得た(図4)。同様の傾向は前記(1)①「Prone/Resistant系モデル」のProne系においても認められた。

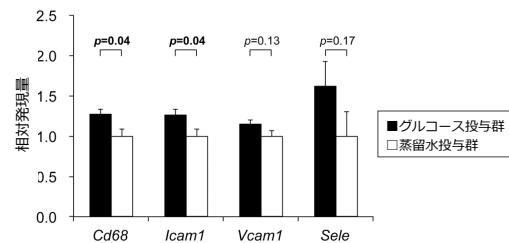


図4 「グルコース反復投与モデル」における胸部大動脈の遺伝子発現解析

(3)耐糖能異常による動脈硬化巣形成促進に対する介入の有効性

前記(1)①の「Prone/Resistant系モデル」を用いて、動脈硬化巣形成に及ぼすメトホルミンの効果を検討し、Prone系マウスにおける動脈硬化巣形成がメトホルミンの投与によって抑制されることを認めた(図5)。

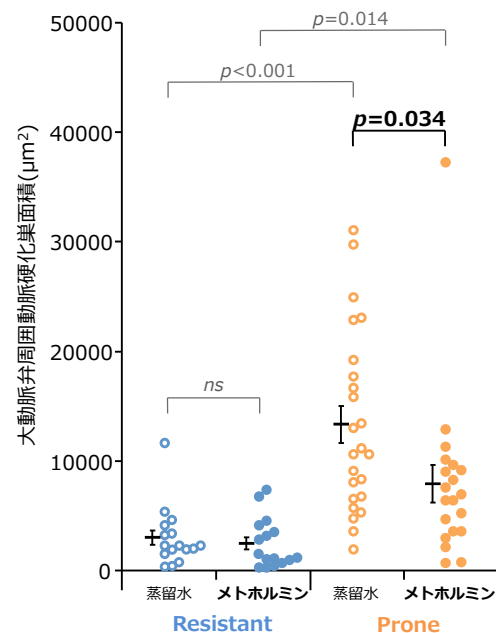


図5 メトホルミンの投与がProne/Resistant両系統マウスの動脈硬化巣形成に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- ① M Nagao, A Asai, H Sugihara, S Oikawa. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J* 62(7):561-572 (2015) 査読有
DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0055

- ② M Nagao, A Asai, H Sugihara, S Oikawa. Transgenerational changes of metabolic phenotypes in two selectively bred mouse colonies for different susceptibilities to diet-induced glucose intolerance. *Endocr J* 62(4):371-378 (2015) 査読有
DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0241
- ③ Y Shuto, A Asai, M Nagao, H Sugihara, S Oikawa. Repetitive Glucose Spikes Accelerate Atherosclerotic Lesion Formation in C57BL/6 Mice. *PLoS One* 10(8):e0136840 (2015) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0136840
- ④ 長尾元嗣, 浅井明, 杉原仁, 及川眞一, 脂肪摂取と2型糖尿病、オレオサイエンス 15(2):69-78 (2015) 査読無
<http://id.ndl.go.jp/bib/026060606>

[学会発表] (計10件)

- ① 浅井明, 長尾元嗣, 宮澤陽夫, 杉原仁, 及川眞一, 新規耐糖能異常モデルマウスにおける過食、体重増加:若齢期におけるレプチン動態との関係、第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2017年2月10日~11日、はまぎんホールヴィアマール (横浜)
- ② 浅井明, 選抜交配による新規耐糖能異常モデルマウスの作出とその解析、第28回夏期油脂・コレステロール研究会、2016年7月15日~16日、ホテルパーク (岐阜)
- ③ A Asai, M Nagao, M Kawahara, T Miyazawa, H Sugihara, S Oikawa. Antiatherogenic effect of metformin in two mouse lines with different susceptibility to glucose intolerance. 84th European Atherosclerosis Society Congress, 2016年5月29日~6月1日, Congress und Messe Innsbruck GmbH, インズブルック (オーストリア)
- ④ 浅井明, 長尾元嗣, 宮澤陽夫, 杉原仁, 及川眞一, 選抜交配による高脂肪食誘発性糖尿病モデルマウスの開発、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月13日~15日、武庫川女子大学 (西宮)
- ⑤ 浅井明, 長尾元嗣, 川原百代, 加藤俊治, 宮澤陽夫, 杉原仁, 及川眞一, 高脂肪食投与後の糖尿病発症における過食、体重増加とレプチンとの関係:新規選抜交配モデルの解析から、第59回日本糖尿病学会学術集会、2016年5月19日~21日、国立京都国際会館 (京都)
- ⑥ 浅井明, 周東佑樹, 長尾元嗣, 杉原仁, 宮澤陽夫, 及川眞一, 食後高血糖が動脈硬化に及ぼす影響~新規耐糖能異常モデルマウスを用いた解析~, 日本栄養・食糧学会東北支部 (第49回) 北海道支部 (第45回) 合同支部大会、2016年11月24日~25日、東北大学農学部 (仙台)
- ⑦ 周東佑樹, 浅井明, 長尾元嗣, 杉原仁, 及川眞一, 新規耐糖能異常モデルマウスにおけるメトホルミンの抗動脈硬化作用、第23回日本過酸化脂質・抗酸化物質学会、2015年8月22日、東北大学片平北門会館 (仙台)
- ⑧ 周東佑樹, 浅井明, 長尾元嗣, 川原百代, 杉原仁, 及川眞一, Metforminの抗動脈硬化作用に関する耐糖能異常マウスを用いた検討、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2015年7月9日~10日、仙台国際センター (仙台)
- ⑨ Y Shuto, A Asai, M Nagao, M Kawahara, H Sugihara, S Oikawa. Twice-daily hyperglycemic spikes accelerate atherosclerotic lesion formation in C57BL/6 mice. 50th EASD Annual Meeting, 2014年9月15日~9月19日, Reed Messe Wien Congress Center, ウィーン (オーストリア)
- ⑩ 周東佑樹, 浅井明, 長尾元嗣, 川原百代, 杉原仁, 及川眞一, 血糖変動が動脈硬化薬形成に及ぼす影響:マウスを用いた生体レベルでの解析、第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2014年7月10日~11日、京王プラザホテル (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 明 (ASAI, Akira)
東北大学・大学院農学研究科・特任准教授
研究者番号: 30500011

(3) 連携研究者

長尾 元嗣 (NAGAO, Mototsugu)
日本医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10468762

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 80361145