

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461849

研究課題名(和文) 糖尿病性血管障害に先行する血管内皮細胞障害のスクリーニング検査法と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of screening examination and a therapy for vascular endothelial cells disorder preceding diabetic angiopathy

研究代表者

福山 直人 (FUKUYAMA, Naoto)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50349338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本において糖尿病は急増している。糖尿病は動脈硬化を促進するため、心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の原因となっており、主たる死因にもなっている。しかしながら、糖尿病による動脈硬化の初期病変の検出は困難なため、動脈硬化をターゲットにした初期治療は現在不可能である。本研究では、動脈硬化の初期病変である血管内皮細胞障害を放射光による微小血管造影法により検出し、その早期治療を行うことが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The patients with diabetes increase rapidly in Japan. Diabetes causes arteriosclerotic disease such as myocardial infarction or cerebral infarction and becomes the main cause of death. However, the initial treatment that targeted arteriosclerosis is impossible because the detection of the arteriosclerotic early-stage disease due to diabetes is difficult. In this study, we detected the vascular endothelial cells disorder that was arteriosclerotic early-stage disease by microangiography using the synchrotron radiation and showed that the early treatment could be provided.

研究分野：生理学、総合内科学、活性酸素学、高齢医学、放射線医学、栄養学、病態生理学

キーワード：動脈硬化 微小血管造影法 糖尿病

1. 研究開始初の背景

糖尿病患者は、全国で2,210万人いると推定されており、毎年、1.4万人前後がその合併症により死亡する(平成19年国民健康・栄養調査、人口動態統計)。合併症の中核をなす心筋梗塞、脳梗塞や腎不全は血管の動脈硬化により発症する。そのため、日本国内だけではなく世界中で動脈硬化の発症予測因子や診断法について検討されてきた。動脈硬化の独立した発症予測因子として、年齢、喫煙、総コレステロール値、収縮期血圧、高血圧やホモシステインなどが報告されている。また、動脈硬化や動脈硬化の初期病変である血管内皮細胞障害のバイオマーカーとして、高感度CRP、IL-6、オステオポンチンやトロポモジュリンなどが報告され、動脈硬化の検出法として頸動脈超音波検査による内中膜複合体の肥厚、狭窄やプラークの検出や脈波を利用したCAVI(心臓足首血管指数)検査やABI(足関節上腕血圧比)検査などが報告されている。これらの検査法は現在臨床応用されているが、動脈硬化の初期病変である微小細動脈における血管内皮細胞障害を検出することはできず、そのため、早期治療は困難となっている。

動脈硬化の初期病変である血管内皮細胞障害は、血管のずり応力により出現するが、血管のずり応力は、血管の内径に対して、その内径を調節する血管平滑筋の比率が高い血管ほど多くかかることが知られている。したがって、生体内における血管内皮細胞障害は、血管内腔に対して血管平滑筋比率の高い血管、すなわち、抵抗血管である細動脈、中でも、直径300 μm 以下の微小細動脈に出現することが想定され、動脈硬化の早期病変を診断するために微小細動脈における血管内皮細胞障害を検討する必要があるが、これまで微小細動脈における血管内皮細胞障害を検出する方法は、確立されていない。

正常な血管内皮細胞は、ずり応力やアセチルコリン刺激に対してNitric oxide (NO)を産生し血管拡張する事が既に報告されており、血管内皮細胞障害が生じた場合には、アセチルコリンにより血管内皮細胞からNOが放出されず、アセチルコリンが血管平滑筋細胞に直接作用し血管が収縮する奇異性血管収縮反応が認められることが想定されている。

我々は、微量ヨードの検出能に優れた33.2KeVの単色X線を用い、生体における直径50 μm の微小血管の可視化に成功し、冠動脈穿通枝、大脳穿通枝動脈、腫瘍新生血管や腎臓の糸球体などを可視化した(Ishii M, et.al. Eur Surg Res. 2009)。この技術を利用することにより直径300 μm 以下の微小細動脈の血管内皮細胞障害を検出できるスクリーニング検査法を開発することができ、血管内皮細胞障害時における早期治療の介入効果を検討することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性血管障害の初期病変である微小細動脈の血管内皮細胞障害を可視化し、そのスクリーニング検査法の開発及び治療の介入効果を示すことである。そのため、1型および2型糖尿病動物実験モデルを用いて、(1)放射光微小血管造影法により、後肢における直径100 μm の微小細動脈の可視化が可能であること、(2)微小細動脈においてアセチルコリンによる正常な血管反応と奇異性血管反応の描出が可能であること、(3)微小細動脈における奇異性血管収縮反応が動脈硬化や血管内皮細胞障害のバイオマーカーよりも鋭敏な指標であること、(4)微小細動脈の血管内皮細胞障害が中大脳動脈の狭窄や閉塞に先行して生じること、などを明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験動物モデルを利用して研究を行った。

(1) 動物実験モデル

1型糖尿病モデルとしてF344/Jcl(フィッシャー)ラットにストレプトゾトシン(STZ)を投与したモデルを利用した。2型糖尿病モデルはOLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラットを利用し、コントロールラットとしてLET0(Otsuka Long-Evans Tokushima)ラットを用いて比較検討を行った。OLETFラットはこれまで我々が用いてきた動物実験モデルであり、16週齢で血管内皮細胞障害による奇異性血管収縮反応が、32週齢で大脳動脈、冠動脈や大脳穿通枝動脈の狭窄や閉塞が認められるモデルである。

(2) 微小血管における奇異性血管収縮反応の可視化と奇異性血管収縮反応が中大脳動脈の閉塞や狭窄に先行して生じる事の証明
微小血管における奇異性血管収縮反応の可視化: 微小血管造影は16週齢のラットを用いてSPRING-8で行い、後肢の指尖部の血管造影を行う。血管造影は1匹のラットに対して2回行い、1回目の造影はアセチルコリンを負荷せず造影し、2回目の造影はアセチルコリン負荷(30 pmol/kg/min)後に血管造影を行う。アセチルコリン負荷により、奇異性血管収縮反応を描出することができる。血管造影後は採血及び後肢、大脳、心臓や腎臓を採材し、血液検査に関しては後述する3の項目を測定し、諸臓器に関しては、病理組織学的に、H.E染色やALP染色だけではなく、血管内皮細胞に対するCD34抗体を用いた免疫染色を行い、血管内皮細胞障害や臓器障害の有無を検討した。

(3) 血管収縮反応が中大脳動脈の閉塞や狭窄に先行することの証明

微小細動脈における血管内皮細胞障害が中大脳動脈の閉塞や狭窄に先行して生じる事を証明するために16週齢及び32週齢のラット

トを用いて中大脳動脈の微小血管造影を行った。微小細動脈における血管内皮細胞障害は16週齢で認められるため、中大脳動脈の狭窄や閉塞などが16週齢で認められず、32週齢で認められた場合には、奇異性血管収縮反応が中大脳動脈の閉塞や狭窄に先行することの証明となる。血管造影後には採血を行い、併せて大脳、心臓や腎臓などを摘出し、病理学的にも臓器障害の検討を行う。

(4) 奇異性血管収縮反応がバイオマーカーより鋭敏な指標となることの証明

4週齢及び微小血管造影を施行する16週齢と32週齢に、CBC(全血球検査)と血糖値、クレアチニンやCKなどの血液生化学的検査に加え、動脈硬化のバイオマーカーである高感度CRPやIL-6などや血管内皮細胞障害マーカーとして報告されているカドヘリン陽性血管内皮細胞由来微小粒子(CD144-EMP)、トロンボモジュリン、フォン・ウィルブランド因子(von Willebrand factor, vWF)、などを測定し、奇異性血管収縮反応が各種バイオマーカーより早期に動脈硬化性病変を検出できるか検討した。

(5) 早期治療の介入効果に対する検討

16週齢のOLETFラット及びLETOラットに対して、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシンII受容体阻害薬や抗血小板薬などの治療を行い、前年度までと同様の検討を加えることにより、血管内皮細胞障害発症時における早期治療の介入に治療効果があるのか検討した。

4. 研究成果

(1) 放射光を用いた微小血管造影法による微小血管の可視化の検討

本研究においてラット下肢、大脳、心臓、腎臓において微小血管造影を施行した。ラット下肢、大脳及び腎臓では直径30 μ mの微小細動脈を動画にて可視化することが可能であったが、心臓においては直径50 μ mの微小細動脈を動画で可視化することが可能であった。

(2) アセチルコリンに対する正常な血管収縮反応と奇異性血管収縮反応の可視化の検討

コントロールラットであるフィッシャーラットおよびLETOラットでは16週齢、32週齢いずれにおいても下肢動脈においてアセチルコリンによる血管拡張反応が確認された。しかし、糖尿病ラットでは、16週齢、32週齢ともに一見血管が拡張しているような微小細動脈においても、奇異性血管収縮反応が生じることを確認することができた。

(3) 奇異性血管収縮反応が中大脳動脈の閉塞や狭窄に先行することの証明

微小細動脈における血管内皮細胞障害が中

大脳動脈の閉塞や狭窄に先行して生じることを証明するために16週齢及び32週齢のラットを用いて下肢動脈および大脳の微小血管を描出し狭窄や閉塞の有無を確認した。また、中大脳動脈の微小血管造影も行った。微小細動脈における血管内皮細胞障害は糖尿病モデルラットの16週齢および32週齢で認められたが、中大脳動脈の狭窄や閉塞などは32週齢でのみ認められ、奇異性血管収縮反応が冠動脈や中大脳動脈の閉塞や狭窄、腎臓の糸球体障害に先行することが証明できた。

(4) 奇異性血管収縮反応が血中バイオマーカーより鋭敏な指標となることの証明

微小血管造影を施行する16週齢と32週齢以降経時的に、CBC(全血球検査)と血糖値、クレアチニンやCKなどの血液生化学的検査に加え、動脈硬化のバイオマーカーである高感度CRPやIL-6などや血管内皮細胞障害マーカーとして報告されているカドヘリン陽性血管内皮細胞由来微小粒子(CD144-EMP)、トロンボモジュリン、フォン・ウィルブランド因子(von Willebrand factor, vWF)などを測定した。その結果、糖尿病モデルにおいて16週齢、32週齢いずれも奇異性血管収縮反応が確認されたが、各種バイオマーカーにおいては32週齢の一部の糖尿病ラットでIL-6が上昇しているのみであり、奇異性血管収縮反応が各種バイオマーカーより先行して出現することが確認された。また、各種バイオマーカーのなかでもIL-6値が早く上昇することが確認できた。

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2件)

Fukuyama, N., Tsukamoto, Y., Takizawa, S., Ikeya, Y., Fujii, T., Shinozaki, Y., Takahari, Y., Kawabe, N., Wakana, N., Umetani, K., Todoroki, K., Fukui, S., Tanaka, C., Tanaka, E., Mori, H. Altered blood flow in cerebral perforating arteries of rat models of diabetes: A synchrotron radiation microangiographic study toward clinical evaluation of white matter hyperintensities. 2015 Geriatrics and Gerontology International, 15, pp. 74-80. 査読有
DOI: 10.1111/ggi.12658

Fujii T, Fukuyama N, Ikeya Y, Tanaka C, Shinozaki Y, Fukushima K, Umetani K, Ikari Y, Mori H. Development of Fingertip Synchrotron Radiation Microangiography toward Clinical Prediction of Diabetic Microangiopathy. Tokai J Exp Clin Med. 2015, 20;40(1):1-7. 査読有
<http://mj-med-u-tokai.com/index.html>

〔学会発表〕(計1件)

福山 直人、Altered Blood Flow in Cerebral Perforating Arteries of Rat Models of Diabetes. 第80回日本循環器学会学術集会。2016年03月19日。仙台国際センター(宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 直人 (FUKUYAMA, Naoto)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 50349338

(2) 連携研究者

盛 英三 (MORI, Hidezo)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 90146598

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA, Shunya)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 70197234