

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09393

研究課題名(和文) 低血糖による合併症増悪機序におけるmtROSとWarburg effectの関与

研究課題名(英文) Involvement of mtROS and Warburg effect in diabetic complications progression mechanism by hypoglycemia

研究代表者

久木留 大介 (Kukidome, Daisuke)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10555759

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)：低糖濃度群では正常糖濃度群に比しミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)産生増加を認めた。低糖状態が脂肪酸酸化を介して脂肪酸からacetyl-CoAへ変換する経路が亢進し、低糖濃度群でのmtROS産生増加は、遊離脂肪酸のトランスポーター阻害剤により抑制された。低糖濃度群では正常糖濃度群に比し内皮機能低下を認め、それらはMnSOD過剰発現や遊離脂肪酸のトランスポーター阻害剤により改善した。本研究により、血管内皮細胞における低血糖時のmtROS産生増加機序に脂肪酸酸化亢進が関与すること、また低血糖誘導mtROS産生増加が低糖状態における血管内皮障害の一因になりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Results: We found that low glucose (LG) increased mtROS generation in endothelial cells (ECs); this effect was suppressed by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD). Comprehensive metabolic analysis using capillary electrophoresis-mass spectrometry and oxygen consumption rate assessment revealed that the pathway from fatty acid to acetyl-CoA via fatty acid oxidation (FAO) was upregulated in ECs under LG. In addition, etomoxir, a specific inhibitor of the free fatty acid transporter, decreased LG-induced mtROS production. These results suggested that LG increased mtROS generation through activation of FAO. We further revealed that LG inhibited eNOS phosphorylation and increased the expression of VCAM-1 and ICAM-1. These effects were prevented either by overexpression of MnSOD or by etomoxir. Conclusions: These findings suggested that activation of FAO followed by mtROS production could be a novel therapeutic target for endothelial dysfunction during hypoglycemia.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：ミトコンドリア由来活性酸素種 低血糖 糖尿病 動脈硬化 糖尿病細小血管合併症

## 1. 研究開始当初の背景

本邦でも未だ糖尿病網膜症による失明者や糖尿病足病変による下肢切断が各年間3,000人以上、糖尿病腎症による新規透析導入患者が年間17,000人以上にのぼっている。本邦のみならず世界中で糖尿病患者の著増、それに伴う糖尿病合併症に苦しむ患者の増加は、喫緊の課題である。

糖尿病合併症発症進展阻止のためには、合併症発症機構の解明が重要である。申請者らのグループではこれまでに、1) 高血糖が培養血管内皮細胞においてミトコンドリア由来活性酸素種 (mitochondrial reactive oxygen species: mtROS) の過剰産生を引き起こし、さらにこの mtROS がこれまで糖尿病合併症の成因と考えられていた細胞内代謝異常を引き起こすこと (Nature 2000)、2) 血管内皮細胞に特異的に MnSOD (mtROS 除去酵素) を発現させたトランスジェニックマウス (eMnSODTg マウス) の開発に成功し、in vivo で mtROS の制御により、糖尿病網膜症の発症抑制が認められたこと (BBRC 2008) 等を報告している。申請者自身も 3) 糖尿病治療薬メトホルミンが AMPK-PGC-1 $\alpha$ -MnSOD 経路の亢進により、mtROS を抑制すること (Diabetes 2006)、4) TNF- $\alpha$  によるインスリン作用障害機序において mtROS の産生増加が関与していること (Diabetes 2006) など、糖尿病およびその合併症発症において mtROS の関与が大きいことを明らかにしている。

一方、大規模臨床研究において血糖是正開始後1年間以内の網膜症進展症例が通常血糖管理群より厳格血糖管理群にむしろ多いと報告されている (Kumamoto Study, DCCT)。さらに、長期罹病糖尿病患者において、急速な血糖是正を契機に、一過性に網膜症が進展することも知られている。また近年では、重篤な低血糖が細小血管合併症増悪のリスクを増加させる (NEJM 2010)、低血糖が血管内皮機能障害を生じる (Diabetes Care 2010)、低血糖が致死的な心血管障害をもたらす (Diabetes 2014) と報告されるなど、低血糖による糖尿病合併症への影響も懸念され、低血糖を回避した「質の良い血糖コントロール」が望まれている。

## 2. 研究の目的

血管内皮細胞における ROS 過剰産生は、血管内皮障害、それに引き続き起こる動脈硬化病変の形成において極めて重要な役割を果たす。加えて、mtROS は、糖尿病血管合併症の病因における中心的役割を担っていると考えられている。また厳格な血糖管理による低血糖も、ROS の産生や血管障害に関与するという報告もあるが、その機序は未だ不明である。そこで、血管内皮細胞において低グルコース状態が mtROS 産生に及ぼす影響、さらには低グルコース誘導 mtROS と血管内皮障害との関連を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

ウシ血管内皮細胞 (EC) および特異的 mtROS 除去酵素である manganese superoxide dismutase (MnSOD) 過剰発現 EC を 5.5 mmol/L または 2.5 mmol/L 糖濃度で培養し、mtROS 産生への影響を還元型 MitoTracker Red を用いて、エネルギー代謝プロファイルを網羅的メタボローム解析と細胞外フラックスアナライザーで、脂肪酸酸化への影響は  $\beta$  酸化阻害剤 (etomoxir, Trimetazidine) を用い検討した。低グルコース状態と血管内皮障害との関連は、ウエスタンブロット法にて endothelial nitric oxide synthase (eNOS) のリン酸化を、RT-PCR 法を用いて vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の mRNA 発現を評価した。

## 4. 研究成果

2.5 mmol/L 糖濃度群では 5.5 mmol/L 糖濃度群に比し約 1.5 倍の mtROS 産生増加を認めた。その増加は MnSOD 過剰発現にて完全に抑制された。網羅的メタボローム解析; 2.5 mmol/L 糖濃度群では解糖系代謝産物 (fructose 1,6-diphosphate, 3-phosphoglyceric acid, pyruvic acid 等) の細胞内濃度低下を認めながらも解糖系と脂肪酸酸化の代謝産物である Acetyl-CoA は 5.5 mmol/L 糖濃度群と同等の結果や、ミトコンドリア酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) の測定; パルミチン酸非添加培養下では、5.5 mmol/L 糖濃度群、2.5 mmol/L 糖濃度群の両群において OCR は同等であった。一方、パルミチン酸共培養下の 2.5 mmol/L 糖濃度群では 5.5 mmol/L 糖濃度群に比し OCR の有意な増加 ( $225.9 \pm 9.2$  vs  $189.8 \pm 10.4$  pmol/min) を認めたことより、低グルコース状態が脂肪酸酸化を介して脂肪酸から Acetyl-CoA へ変換する経路が亢進することを確認した。さらに、2.5 mmol/L 糖濃度群での mtROS 産生増加は、etomoxir および Trimetazidine による酸化阻害により完全に抑制された。2.5 mmol/L 糖濃度群では 5.5 mmol/L 糖濃度群に比し eNOS リン酸化の阻害ならびに VCAM-1、ICAM-1 の mRNA 発現上昇を認めた。それらは MnSOD 過剰発現や etomoxir 共培養により改善を認めた。

以上の結果から、低血糖により脂肪酸酸化亢進を介して mtROS が増加することは、低血糖による血管内皮障害を抑制するための新たな治療ターゲットになると考えられた。

これらの結果を、J Diabetes Investig 8:750-761, 2017 にて論文報告し、52th EASD Annual Meeting, 51th EASD Annual Meeting の国際学会で発表した。

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 6 件)

1. Kajihara N, Kukidome D, Sada K, Motoshima H, Furukawa N, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells. J Diabetes Investig 8:750-761, 2017. 査読有
2. Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Nishi Y, Shimamura R, Kawashima J, Shimoda S, Mizuta H, Araki E: Impaired balance is related to the progression of diabetic complications in both young and older adults. Journal of diabetes and its complications Aug;31(8):1275-1282, 2017. 査読有
3. Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, Senokuchi T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. PLoS One. Jul 6;11(7): e0158619, 2016. 査読有
4. Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Matsui K, Obayashi K, Ando Y, Araki E: Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. Diabet Med. Jan;33(1):62-9, 2016. 査読有
5. Nishikawa T, Araki E: Involvement of advanced glycation end-products in 'hyperglycemic memory'. J Diabetes Investig 7(3):297-299, 2016. 査読有
6. Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Matsui K, Obayashi K, Ando Y, Araki E: Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. Diabet Med 33(1):62-69, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Kukidome D, Kajihara N, Hanatani S, Kawashima J, Matsumura T, Araki E: Renal protective effect of sodium dependent glucose transporter 2 inhibitor in combination with the renin angiotensin system blockers in early stage of diabetic nephropathy. 53th EASD Annual Meeting, 2017/9/11-2017/9/15, Lisbon, Portugal, Poster

2. Kukidome D, Kajihara N, Hanatani S, Kawashima J, Matsumura T, Araki E: Impaired balance strongly correlated with advanced microvascular complications in younger participants with diabetes. IDF congress 2017, 2017/12/4-2017/12/8, Abu Dhabi. UAE, Poster

3. Kajihara N, Kukidome D, Sada K, Motoshima H, Matsumura T, Nishikawa T, Araki E: Hypoglycemia-induced retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial ROS production caused by fatty acid oxidation. 52th EASD Annual Meeting, 2016/9/12-2016/9/16, Messe Munchen, Munich, Germany, Poster

4. Sata K, Nishikawa T, Kukidome D, Kajiwara N, Motoshima H, Matsumura T, Araki E: Cellular hypoxia and mitochondrial reactive oxygen species may promote hyperglycaemic damage in a coordinated manner. 51th EASD Annual Meeting, 2015/9/14-2015/9/18, Stockholm, Sweden, Oral

5. Kukidome D, Sato M, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E: Impaired balance ability, particularly one-leg stand evaluation, is associated with diabetic complications even in younger adults with type 2 diabetes. 51th EASD Annual Meeting, 2015/9/14-2015/9/18, Stockholm, Sweden, Poster

〔図書〕(計 2 件)

1. 久木大介, 梶原伸宏、西川武志、荒木栄一: ミトコンドリアと糖尿病合併症. Diabetes Frontier Vol.28 No.6 2017-12
2. 西川武志、木下博之、久木大介、梶原伸宏、荒木栄一: 糖尿病合併症発症予防における血糖管理マーカーを考える—HbA1cの限界と酸化ストレスマーカーの可能性—. 日本体質医学会雑誌 第80巻1号, 2018年2月

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

久木留 大介 ( KUKIDOME Daisuke )

熊本大学医学部附属病院・助教

研究者番号：10555759

(2)研究分担者

荒木 栄一 ( ARAKI Eiichi )

熊本大学大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10253733

松村 剛 ( MATSUMURA Takeshi )

熊本大学大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：20398192

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )