

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08060

研究課題名(和文) 糖尿病合併が腹部大動脈瘤破裂とvasa vasorum機能不全に与える影響の検討

研究課題名(英文) The relationship between vasa vasorum impaired by diabetes and vulnerability of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

宮本 卓也 (Miyamoto, Takuya)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20447204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腹部大動脈瘤の発生、進展に糖尿病が与える影響を検討するために、アポE欠損マウスに対し、高脂肪食を与え、アンジオテンシンII (Ang II) (1000 ng/kg/min)を浸透圧ミニポンプにより4週間を皮下投与し腹部大動脈瘤モデルを作成した。大動脈瘤の瘤壁で、転写因子HIF-1 の発現が亢進していた。HIF-1 はミッドカインの発現を調節していることを知られている。これよりミッドカインの発現を検討したところ、やはり発現が亢進していた。ミッドカインとアポE両欠損マウスを作成し、大動脈瘤の発症及び進展、vasa vasorum血管新生に与える影響を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

画像診断の発展で、腹部大動脈瘤が偶発的に見つかることがあるが、しばしば無症候で進行し、突然死の原因となることがある。危険因子の多くは動脈硬化と共通するが、糖尿病は負の危険因子とされている。本研究では、糖尿病が腹部大動脈瘤の脆弱性に与える影響を検討することで、大動脈瘤の進展メカニズムを解明することを目指す。特に、大動脈壁を栄養する血管の血管vasa vasorumの機能に糖尿病による血管障害が与える影響を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of diabetes on the development and progression of abdominal aortic aneurysm, apoE deficient mice were fed a high-fat diet and angiotensin II (Ang II) (1000 ng / kg / min) was administered by an osmotic minipump for 4 weeks. Expression of hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 was upregulated in the tissue of the aortic aneurysm. Since HIF-1 is reported to induce midkine expression, we investigated the expression of midkine. As the result, midkine expression was also increased in the tissue of the aortic aneurysm. Therefore, we examined the effect of diabetes on abdominal aortic aneurysm and vasa vasorum angiogenesis using midkine and apoE double deficient mice.

研究分野：循環器内科

キーワード：腹部大動脈瘤 糖尿病 ミッドカイン

1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は、近年人口の高齢化に伴い増加しており、先進諸国では全死亡原因の1-2%を占める (Nature 2011;473:308-316)。大動脈瘤が破裂した場合の死亡率は60%以上であり、予後不良な疾患である。腎動脈下の腹部大動脈瘤が、全大動脈瘤の80%以上を占める。長年、腹部大動脈瘤は、単なる動脈硬化の晩期退行病変として考えられてきた。しかし、その発生機序は複雑で、必ずしも動脈硬化と同一ではない。腹部大動脈瘤の最も重要な危険因子は喫煙と高血圧であり、動脈硬化の危険因子と共通しているが、糖尿病はむしろ陰性危険因子であり (Ann Intern Med 1997;126:441-449)、コレステロール値と大動脈瘤による死亡率が相関しないなど、相違点も報告されている。特に糖尿病に関しては、非糖尿病患者に比べて、糖尿病患者の方が、腹部大動脈瘤の発生率が低いということが繰り返し報告されており (J Vasc Surg 2010; 52: 539-548、Eur J Vasc Endovasc Surg 2014; 47: 243-261)、Takagi H、Umemoto Tらのメタ解析結果でも、糖尿病患者では非糖尿病患者より腹部大動脈瘤破裂の発生率が低いことが報告された (Diabetes Vasc Dis Res 2016; 13: 341-347)。しかし Czeleko らは、糖尿病患者の方が、腹部大動脈瘤の発生率が高いと報告しており (Medycyna Metaboliczna 2016; 20: 34-42)、2012年にポーランドで約250万人の糖尿病および非糖尿病患者を対象に腹部大動脈瘤の発生率を検討した報告でも、男女とも糖尿病患者の方が、非糖尿病患者より、腹部大動脈瘤の発生率が高く、非破裂および破裂腹部大動脈瘤ともに、糖尿病患者で発生率が高いことが報告された (Diabetes Vasc Dis Res 2017;14:463-464)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病合併腹部大動脈瘤モデルを作成し、糖尿病合併が大動脈瘤発生および破裂に関与するメカニズムを明らかにすることである。近年、大動脈瘤の形成に vasa vasorum の関与が報告されている。Vasa vasorum は健康な血管壁において栄養供給および酸素供給を行い、血管壁の維持と修復に働く。動脈硬化巣では局所炎症が生じ、酸素需要を増加させ、動脈壁の組織低酸素状態を引き起こすことが知られている (Circ Res 2011;109:1141-52)。低酸素誘導因子 HIF-1 の発現増加により、vasa vasorum の増生が生じる。Vasa vasorum の増生と動脈硬化巣の進展には相関があり、vasa vasorum の増生は動脈硬化の病態生理に重要な役割を果たすことが報告されている (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:347-352)。アポE欠損マウスを用いた実験でも、血管外膜の vasa vasorum は動脈硬化プラークの進展と関係し、血管新生の抑制で、プラークサイズが縮小することが報告された (Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:4736-4741、Atherosclerosis 2011;215:336-373)。しかし糖尿病合併大動脈硬化モデルにおいて、高血糖が vasa vasorum に与える影響は、一定の見解を得ていない (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299:H699-H706、Atherosclerosis 2013;227:250-258)。高血糖では、微小血管における過剰な血管新生が糖尿病性腎症や増殖性糖尿病性網膜症の原因になるとともに、血管新生が障害されることにより、冠動脈側副血行路の発達障害や創傷治癒障害、糖尿病レシピエントの移植片拒絶が生じることが知られ、「血管新生パラドックス」と呼ばれる。糖尿病性末梢動脈疾患の重症虚血肢では、血管外膜には差はないが、血管中膜の vasa vasorum の機能低下があることが報告された (Eur J Vasc Endovasc Surg 2010;40:365-374)。大動脈遠位部ほど、vasa vasorum が減少し (Atherosclerosis 2016;247:127-134)。大動脈瘤壁では、内膜中膜の肥厚により腔が狭小化し、vasa vasorum が閉塞し、HIF-1 の発現が増加し、matrix metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9、Cathepsin S の発現が誘導される (PLoS One 2013;8(2):e57398)。実験的に大動脈外膜の vasa vasorum の血流を障害すると大動脈瘤が形成されることが確かめられている (PLoS One 2015;10(8):e0134386)。これまで糖尿病合併大動脈瘤の発生および破裂に vasa vasorum の役割を検討した報告はない。ヘパリン結合性成長因子 midkine はがん遺伝子として発見され、標的細胞の遊走、増殖、抗アポトーシス作用を有する (J Biochem 2002; 132: 359-371)。HIF-1 によって、発現が調節され、平滑筋の増殖や血管新生を促進する (Nephrol Dial Transplant 2016;31:1781-1787)。最近、midkine が炎症を惹起し、血管新生、抗アポトーシス効果により、動脈硬化を促進することが報告された (Takemoto Y, et al. Circ J 2017)。また高血糖刺激でも midkine 発現が亢進することが報告されている (Am J Pathol 2006;168:9-19)。

3. 研究の方法

1) 糖尿病合併腹部大動脈モデルにおける midkine の発現と vasa vasorum の関係

アポE欠損マウスに streptozotocin (STZ) (30-40 mg/kg)または溶媒を腹腔内投与し、糖尿病および非糖尿病マウスを作成する (Arterioscler Thromb Vasc Biol 1994; 1994; 14:141-147)。

それぞれのマウスにアンジオテンシン II (AngII) (1000 ng/kg/min) を浸透圧ミニポンプで、4週間皮下投与し大動脈瘤モデルを作成する。大動脈瘤の Neck および Sac 部位で、HIF-1 および midkine を免疫組織学的および Western ブロットで発現を確認する。Vasa vasorum の増生について、von Willebrand Factor (vWF) を免疫染色し、5、15、20 週と継時的に観察する。糖尿病マウスと非糖尿病マウスで、大動脈瘤形成および破裂に差があるか、vasa vasorum の増生、midkine の発現との関係について検討を行う。

2) アポ E と midkine 両欠損マウスを用いた検討

アポ E 欠損マウスと midkine 欠損マウスを交配し、両欠損マウスを作製した。両欠損マウスとアポ E 欠損マウスに、STZ 投与および AngII 投与を行い、糖尿病合併大動脈瘤モデルを作成する。糖尿病群と非糖尿病群で、midkine が大動脈瘤形成および瘤破裂、vasa vasorum 微小血管新生に与える影響を免疫組織学的に検討する。病変部の MMP 活性については、zymography および in situ zymography を用い評価を行う。MMP-2、MMP-9、MMP-12、macrophage inflammatory protein 1、interleukin-8、transforming growth factor- β 、cathepsins などの発現の変化を検討するとともに、マクロファージなどの炎症性細胞浸潤を観察する。Vasa vasorum 微小血管新生に関与する他の増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現についても検討する。

ラット血管平滑筋細胞において、siRNA を用いて midkine 発現を抑制し、高血糖下の平滑筋増殖に midkine が与える影響を検討する。また高血糖下に midkine 投与を行い、平滑筋細胞増殖に与える影響を検討する。

3) Midkine 投与と大動脈瘤破裂の関係

アポ E 欠損マウスに STZ 投与および AngII 投与を行い、糖尿病合併大動脈瘤モデルを作成する。Midkine を腹腔内投与し、vasa vasorum 微小血管新生に与える影響、および大動脈瘤破裂に与える影響を検討する。

4) 高血糖下 vasa vasorum 微小血管新生に影響を与える microRNA の検討

臨床応用を考えた場合、midkine を効率よく抑制することが重要である。近年、microRNA (miR)-124 は、midkine mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、midkine 産生を抑制することが報告された (Cell Physiol Biochem 2017;43:589-601)。また高血糖下に血管新生に関与する miR が数多く報告されている。これらを網羅的に解析することにより、糖尿病における血管新生パラドックスが、大動脈瘤形成に関与するメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

アポ E 欠損マウスに Ang II 投与を行い大動脈瘤を形成させると、大動脈瘤 Sac 部位に HIF-1 と midkine が発現することを確認した。またアポ E 欠損マウスと midkine 欠損マウスを交配させ、両欠損マウスを作製した。

Ang II 投与による腹部大動脈瘤の発生率が安定せず、Ang II 投与量を増加したり、高脂肪食投与を併用したりしたが、大動脈瘤の発生率が一定しなかった。

他の複数の大動脈瘤モデルも検討した。エラストラーゼ投与モデル、エラストラーゼ + 塩化カルシウム投与モデルなども検討したが、不可逆的な大動脈瘤が生じ、実験には適さなかった。

STZ による糖尿病は、1型糖尿病を発症するが、高脂肪食による糖尿病は、2型糖尿病を発症する。高脂肪食投与追加の Ang II 投与による腹部大動脈瘤の発生には、背景因子の調整が困難であり、高脂肪食投与の有無が、糖尿病の有無とは、必ずしも一致しないと考えられた。

腹部大動脈瘤の安定した作成と、糖尿病誘発法の検討を引き続き行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 哲 (Watanabe Tetsu) (40359568)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関