

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591043

研究課題名（和文）一酸化窒素、活性酸素制御を介する血管内分泌及び血管老化制御による動脈硬化退縮療法

研究課題名（英文）Regression of Atherosclerosis by the regulation of nitric oxide and superoxide on vascular endocrinology and vascular aging

研究代表者

林 登志雄 (HAYASHI TOSHIO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80303634

研究成果の概要：高齢者を念頭にした老化血管における動脈硬化症退縮における血管老化制御の可能性を検討した。まず動脈硬化症への老化の関与及び一酸化窒素(NO)の老化に対する効果や冠危険因子との相互作用を検討した。次いで、老化に加えて高齢者に寄与の大きい動脈硬化危険因子としてエストロゲン（欠乏）、糖尿病、そして治療手段であり老化への直接作用もあるインスリンの老化及び血管機能への影響を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：老年医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学・動脈硬化学

キーワード：(1) 一酸化窒素 (2) 動脈硬化症 (3) 細胞老化 (4) エストロゲン (5) 糖尿病 (6) 動脈硬化退縮 (7) 血管内皮細胞 (8) NO ドナー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)後期以降の高齢者では癌よりも心筋梗塞、脳卒中等の動脈硬化性疾患が死因、また介護要因として大きな比率を占める。高齢者に安全かつ有効な治療法が必要である。(2)高齢者進行動脈硬化症には高脂血症等の普遍的危険因子に加え加齢と性(閉経)という高齢者特有の因子が関与するが有効な治療はまだない。(3)動脈硬化発症進展機序として一酸化窒素(NO)分泌能をはじめとする血管内皮機能が重要で、高脂血症、糖尿病、喫煙といっ

た各危険因子自体にも寄与する。(4)研究代表者は89年、動脈硬化初期病変及び高脂血症の段階にNO分泌低下を認め(Blood vessels89, Atherosclerosis 91),米国 UCLA Ignarro 教授の元で、NOと動脈硬化症を検討し(PNAS 92)、現在まで研究を続けてきた。(5)動脈硬化症で低下したNO分泌能は、基質のL-arginine,又は補酵素BH4の補充が有効とされたが、有効性は初期病変に留まり、進行動脈硬化病変では無効あるいは増悪をきたす。(6)我々は動脈硬化モデル動物において進行動脈硬化症で

は、血管壁 NO 産生代謝経路が種々変動制御される事を見いだした (PNAS 05, 06a press release)。 (7)動脈硬化症進展に細胞老化が増悪因子となった(PNAS06b)。 (8)動脈硬化症は発症期、初期、進展期で異なる病態を示し、治療目的が異なる可能性がある。加齢は細胞老化を介しこれを修飾する。 (9)高齢者進行動脈硬化症の研究は少なく、上記を元に新たな治療法への期待は大きい。

## 2. 研究の目的

高齢者 (進行) 動脈硬化病変に対する血管内皮機能制御 (遺伝子) 治療の有効性を明らかにする。危険因子として加齢と性に加え高齢者に頻度が高い高脂血症と糖尿病を想定し、これらの合併した病態を治療目標とする (高脂血症はヒト特有の動脈硬化症に、糖代謝は老化と密接に関係)。高齢者動脈硬化症は加齢 (及び閉経) の影響下に上記各危険因子が作用し、活性酸素等を介して血管内皮機能低下を伴いながら進行していく過程を推定している。その進行過程で NO 及び活性酸素を酵素活性レベル、遺伝子レベル等で各々制御する事により、細胞老化制御を視野に入れた動脈硬化進展制御療法を提唱する。

## 3. 研究の方法

(1)①内皮型 NO 合成酵素遺伝子 (eNOS) の SiRNA、②活性酸素除去を目指した NADPHoxidase SiRNA、③エストロゲン受容体  $\alpha$ ,  $\beta$  の vector、④テロメア短縮を抑制する hTERT の vector を用意する。(2)上記各遺伝子、SiRNA に L-arginine, L-citrulline, BH4 等の NO 合成酵素基質及び補酵素, L-NAME, apocynin 等の阻害酵素を用いて有効な老化、内皮機能制御法を確定する。血管内皮細胞機能 (NO と活性酸素産生等で評価)、細胞老化 (senescence associated  $\beta$  galactosidase (SA  $\beta$  gal), telomerase 活性等で評価) を内皮細胞で評価する。(3)高脂血症 (LDL, 酸化 LDL), 高グルコース, インスリン存在下で上記各条件で内皮機能、細胞老化、NO 合成酵素活性化機構を評価し、病態解明及び治療効果を検討する。

## 4. 研究成果

(1)細胞老化と NO : テロメラーゼ活性は正常細胞の老化に深く関わる。内皮細胞 telomerase 活性は、腫瘍細胞より一桁以上低い、測定できた。剖検ヒト高齢者大動脈では複雑病変を除く動脈硬化進展部位に老化指標物質 (SA  $\beta$  gal) を認めた。NO ドナー, DETA/NO は濃度、時間依存性に SA-  $\beta$  gal 活性を低下させ telomerase 活性を上昇させ

た。eNOS 導入も同様の成績を得た。

(2)エストロゲンと細胞老化、NO: 細胞を継代培養時の SA $\beta$  gal 活性、即ち老化細胞の割合は生理的濃度のエストロゲン投与により有意に低くなった。その効果はエストロゲン受容体阻害剤及び NO 合成酵素阻害剤で抑制された。エストロゲンは家兎動脈硬化を脂質を有意変化させずに 70%抑制し一部分 NO を介して作用した。arginase II 抑制作用も認めた。進行動脈硬化血管ではシトルリンやエストロゲンが NO bioavailability を高めていた。(3)グルコースと細胞老化、NO: 72 時間の高グルコースは eNOS 蛋白、NO 産生を抑制し、SA-  $\beta$  gal 陽性細胞が増加した。アルギニン、シトルリン、更に antioxidants は相加的に、細胞老化を抑制した。eNOS 導入も相加的に働いた。NO、L-arginine, L-citrulline や抗酸化剤と eNOS の抗老化作用と高齢者の動脈硬化治療との関連が示唆された。グルコースによる細胞老化は replicative 及び stress induced 双方の senescence が寄与する事が明らかになった。(4)インスリンと細胞老化 インスリンは正常グルコース下では内皮細胞老化を促進したが、高グルコース下では生理的濃度で老化抑制、高濃度で老化促進という 2 相性作用を示した。eNOSsiRNA, NADPH oxidase siRNA の導入実験よりこのインスリンの作用は一部が NO 依存性、一部は IGF 受容体の寄与を受ける事が示唆されて。

## 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) 全て査読有

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Hayashi T, Kawashima S, Itoh H, Yamada N, (他 8 名 1 番目) and on behalf of Japan CDM group. Low HDL-cholesterol is associated with the risk of stroke in elderly diabetic individuals: Changes in the risk for atherosclerotic diseases at various ages. Diabetes Care 2009 (in press)

2. Hayashi T, Yano K, (他 4 名 1 番目). Nitric oxide and endothelial cellular senescence Pharmacol Ther. 120:333-9, 2008

3: Sasaki N, Yamashita T, Takaya T, Shinohara M, Fukatsu A, Hayashi T, (他 6 名 6 番目). Augmentation of Vascular Remodeling by Uncoupled Endothelial

Nitric Oxide Synthase in a Mouse Model of Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1068-76

4: Hayashi T, Iguchi A. Pitavastatin Shows Promise in Treatment of Patients With Type 2 Diabetes. *Review of Endocrinology* 2008;1:1-3

5: Hayashi T, Kawashima S, (他 10 名 1 番目) and on behalf of Japan CDM group Importance of Lipid Levels in Elderly Diabetic Individuals-Baseline Characteristics and 1-year Survey of Cardiovascular Events- Circulation Journal 2008;72:218-225

6: Umegaki H, Haimoto H, Kario K. Visceral fat contribution of insulin resistance in elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 2008 ;56: 1373 -5.

7: Thanos PK, Michaelides M, Umegaki H, Volkow ND. D2R DNA transfer into the nucleus accumbens attenuates cocaine self-administration in rats. *Synapse.* 2008;62:481-6.

8: Umegaki H, Itoh A, Suzuki Y, Nabeshima T. Discontinuation of donepezil for the treatment of Alzheimer's disease in geriatric practice. *Int Psychogeriatr.* 2008;20:800-6.

9: Umegaki H, Kawamura T, Mogi N, Umemura T, Kanai A, Sano T. Glucose control levels, ischaemic brain lesions, and hyperinsulinaemia were associated with cognitive dysfunction in diabetic elderly. *Age Ageing.* 2008;37:458-61.

10: Zhu W, Zhang R, Hu C, Umegaki H. Effect of the entorhinal cortex on diurnal ACTH and corticosterone release in rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29:159-62.

11: Haimoto H, Iwata M, Wakai K, Umegaki H.

Long-term effects of a diet loosely restricting carbohydrates on HbA1c levels, BMI and tapering of sulfonylureas in type 2 diabetes: a 2-year follow-up study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 ;79:350-6.

12: Umegaki H, Iimuro S (他 6 名, 1 番目).

Factors associated with lower Mini Mental State Examination scores in elderly Japanese diabetes mellitus patients. *Neurobiol Aging.* 2008;29: 1022- 6.

13: Hayashi T, Nomura H, Osawa M, Funami J, Miyazaki A, Iguchi A, Nitric oxide (NO) metabolites are associated with survival in older patients. *J Am Geriatr Soc* 2007 ;55:1398-403

14: Takaya T, Hirata KI, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Hayashi T (他 10 名, 6 番目), Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M, Kawashima S. A Specific Role for eNOS-Derived Reactive Oxygen Species in Atherosclerosis Progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27: 1632-1637

15 Hayashi T, Yokote K, Saito Y, Iguchi A. Pitavastatin- Efficacy and Safety Expert of Opinion on Pharmacology 2007; 8:2315-27

16: Ding Qunfang, \*Hayashi T, (他 5 名, 2 番目). Risks of CHD identified by different criteria of metabolic syndrome and related changes of adipocytokines in elderly post menopausal women. *J Diabetes and its Complication* 2007 ;21: 315-9

17: Fukatsu A, Hayashi T, (他 6 名, 2 番目). Possible Usefulness of Apocynin, an NADPH Oxidase Inhibitor, for Nitrate Tolerance: Prevention from Nitric Oxide Donor-Induced Endothelial Cell Abnormalities. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H790-7

18: Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A. High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: implications for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:364-72.

19: Hayashi T, (他 6 名, 1 番目). beta1 antagonist and beta2 agonist, celiprolol, restores the impaired endothelial dependent and independent responses and decreased TNFalpha in rat with type II diabetes. *Life Sci.* 2007;80:592-9.

20: Miyazaki-Akita A, Hayashi T. (他 5 名, 2 番目). 17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease. J Pharmacol Exp Ther. 2007;320:591-8.

21: Osawa M, Hayashi T. (他 5 名 2 番目) Nitric oxide (NO) is a new clinical biomarker of survival in the elderly patients and its efficacy might be nearly equal to albumin. Nitric Oxide. 2007;16:157-63

22: Umegaki H., Onishi J, Suzuki Y, Endo H, Iguchi A. Attitudes toward disclosing the diagnosis of dementia in Japan. Int Psychogeriatr. 2007;19:253-65.

23: Onishi J, Suzuki Y, Umegaki H., Kawamura T, Imaizumi M, Iguchi A. Which two questions of Mini-Mental State Examination (MMSE) should we start from? Arch Gerontol Geriatr. 2007 ;44:43-8.

[学会発表] (計 26 件)

1: Hayashi T. (他10名1番目) Low HDL-cholesterol is associated with the risk of stroke in elderly diabetic individuals: Changes in the risk for atherosclerotic diseases at various ages. American Diabetes Association June 6 2009 New Orleans USA

2: Hayashi T. (他 3 名 1 番目) The role of glucose and insulin on endothelial senescence- The relation of diversity effect of insulin and telomerase- Annual Scientific Meeting American Geriatrics Society April 29 2009 Chicago USA

3: Hayashi T. HDL cholesterol is more important than glucose control in prevention of atherosclerotic diseases in Asian diabetic elderly. Symposium 5th Congress of European Union Geriatric Medicine Society Sep. 5, 2008 Copenhagen, Denmark (**press release**)

4: Hayashi T. Vascular senescence and NO in asian elderly. Invited speech at Symposium of Konkuk University Nov. 17, 2008 Seoul, Korea

5: 林登志雄 siRNAを用いた老化関連疾患の病態解明～薬物活性シンポジウムRNA干渉 08年10月23日徳島

6: 林登志雄 インスリンの細胞老化ストレスを介する動脈硬化への作用 Insulin exerts opposite control on high glucose-induced endothelial cellular senescence. 第40回日本動脈硬化学会シンポジウム「細胞ストレスと動脈硬化」08年7月15日筑波

7: 林登志雄 動脈硬化症における加齢と性の役割-本邦閉経後女性の心血管病リスクの面から- 第8回日本抗加齢医学会バトルセッション: 女性ホルモン補充療法をめぐる議論 (招待講演) 08年5月9日東京

8: 伊奈孝一郎 林登志雄 平井寿子 Funami J 井口昭久 アジア地区高齢女性における動脈硬化性疾患と遺伝子変異に関する検討 第8回日本NO学会学術集会 08年5月8日仙台

9: 林登志雄, 伊奈孝一郎, 井口昭久 各種高脂血症薬の糖尿病性心血管合併症進展予防効果の総合的検討-二年間の解析より-第51回日本糖尿病学会年次学術集会 08年5月22日東京

10: Hayashi T (他 3 名 1 番目) Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. 第72回日本循環器学会学術集会 08年3月23日福岡

11: Hayashi T (他 3 名 1 番目) Nitric Oxide Metabolites Are Associated with Survival in Older Patients. 同上

12: Hayashi T (他 3 名 1 番目) LDL and HDL cholesterol might play more important role than glucose control in the prevention of ischemic cardiovascular disease in Japanese diabetic old and old. Annual Scientific Meeting American Geriatrics Society May. 1, 2008 Washington USA

13: Hayashi T (他 3 名 1 番目) The effect of NO in endothelial senescence. 同上

14: Ding Qung-Fan D, Hayashi T. Metabolic syndrome and Diabetes in Chinese elderly female” 5<sup>th</sup> Asia/Oceania Geriatric and Gerontology International Meeting Symposium “The Health in Asian elderly female “ Oct. 20, 2008 Beijing, China

15: Funami J, Hayashi T.

“Pathophysiological Character of metabolic syndrome in Asian elderly female” 同上

16: Hayashi T. “Metabolic syndrome in Japan, Future attitude as Asian geriatricians” 同上

17: Zhang J, Hayashi T. “Health of Chinese elderly female” Approach for the Healthy Longevity in Asia” 5<sup>th</sup> Asia/Oceania Geriatric and Gerontology International Meeting Symposium “Approach for the Healthy Longevity in Asia” Oct.23, 2008 Beijing, China

18: Hayashi T. “The Healthy Longevity in Japan,”  
同上

19: Hayashi T. “Nitric oxide and endothelial cell senescence” AVDRC Symposium on vascular aging and atherosclerosis (Invited special lecture) Nov.16, 2007 Daegu, Korea

20: 林登志雄: 各種高脂血症薬の糖尿病合併心血管病進展予防効果の検討—厳格な脂質及び糖代謝制御の必要性について—第39回日本動脈硬化学会総会シンポジウム 糖尿病/耐糖能障害と動脈硬化 07年7月14日大阪

21: 林登志雄: 内皮細胞の老化はNOにより阻害される—閉経及び糖尿病に関連した動脈硬化症での意義 第39回日本動脈硬化学会総会シンポジウム血管細胞老化と動脈硬化 07年7月14日大阪

22: 林登志雄: Endothelial senescence is prevented by NO—The role in atherosclerosis—第7回日本NO学会 シンポジウム 07年5月大津

23: 林登志雄(他2名1番目)内皮細胞老化はNOで阻害される—糖尿病性血管合併症での意義 第50回日本糖尿病学会学術集会 07年5月仙台

24: 林登志雄 肥満・糖尿病における心血管障害の進展抑制—各種高脂血症薬、降圧薬の作用について—第50回日本糖尿病学会学術集会 ランチョンセミナー07年5月仙台

25: 林登志雄(他2名1番目)内皮細胞老化はNOで阻害される—動脈硬化症での意義—第49回日本老年医学会学術集会 07年6月札幌

26: 林登志雄(他2名1番目) グルコース負荷内皮細胞老化と内皮機能—糖尿病性血管合併症での意義 第11回日本心血管内分泌代謝学会 07年11月 東京

〔図書〕(計4件)

1: \*Toshio Hayashi, Akihisa Iguchi, Free radicals as atherosclerotic risk—The relation of NO Louis J Ignarro NO 2<sup>nd</sup> Edition Elsevier 2009 (in press)

2: 林 登志雄 老化的自然科学他 井口昭久/林 登志雄/余 沢雲 現代老年学(これからの老年学:中国語版) 雲南出版集団公司、雲南人民出版社 2008 p.3-34

3: 林 登志雄 老年病の臨床—高齢者の主要な疾患 老年医学テキスト 日本老年医学会 Medical View 社 2008 p.24-28

4: 林 登志雄 尿失禁 葛谷雅文/秋下雅弘 ベッドサイドの高齢者の診かた 南山堂 東京 2008 p.74-82

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

1: 林 登志雄(他2名1番目)特許出願整理番号2007P00056【提出】2007年10月10日 PCT出願2008年10月10日

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 登志雄(HAYASHI TOSHIO)  
名古屋大学医学部附属病院・講師  
研究者番号:80303634

(2)研究分担者

梅垣 宏行(UMEGAKI HIROYUKI)  
名古屋大学医学部附属病院・助教  
研究者番号:40345898

(3)連携研究者

なし