

令和 4 年 9 月 9 日現在

機関番号：82654

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08991

研究課題名(和文)血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性を介した動脈硬化発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Atherosclerosis via Selective Insulin Resistance in Endothelial Cells

研究代表者

窪田 哲也 (Kubota, Tetsuya)

公益財団法人朝日生命成人病研究所・その他部局等・教授(移行)

研究者番号：60385698

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)：血管内皮細胞でIRS-2が低下すると、本当に動脈硬化症を発症するのかがどうかについて血管内皮細胞特異的IRS-2/ApoEダブル欠損マウスを作成し、高コレステロール食負荷を15週間行った。大動脈弁輪部の粥状動脈硬化を検討したところ、血管内皮細胞特異的IRS-2/ApoEダブル欠損マウスでは有意に粥状動脈硬化が亢進していた。また血管においてMCP-1やiNOSといった炎症性サイトカインやICAM1やVCAM1といった接着因子が上昇していた。以上のことから血管内皮細胞でIRS-2が低下すると炎症性サイトカインが増加し、動脈硬化が惹起されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や2型糖尿病は動脈硬化発症の重要なリスクファクターの一つであるが、なぜ肥満や2型糖尿病で動脈硬化が促進するのかは十分に解明されていない。血管内皮細胞は、動脈硬化発症・進展にも重要な役割を果たしており、「血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性」に着目した研究は、上流にある肥満や2型糖尿病と下流にある合併症としての動脈硬化症を包括的に解明しようとするものでありきわめて意義深い。本研究で血管内皮細胞のインスリンシグナル、特に選択的インスリン抵抗性を介した動脈硬化症における役割が解明されることにより、これまでにない新規の抗動脈硬化薬の発見という画期的な意義が予想される

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of Irs2 of endothelial cells in atherosclerosis, we generated the endothelial-specific Irs2/ApoE double deficient (ETIrs2/ApoEDKO) mice. These mice were fed a high-cholesterol diet for 15 weeks. Metabolic profiles did not differ between the control and ETIrs2/ApoEDKO mice. The ETIrs2/ApoEDKO mice showed the exaggerated atherosclerosis in both the aortic valve and aorta. Moreover, the wild-type bone marrow transplanted ETIrs2/ApoEDKO mice showed the exaggerated atherosclerosis in the aorta. The expression levels of MCP-1 and VCAM1 were significantly increased in the ETIrs2/ApoEDKO mice. Consistent with these data, LPS-induced MCP-1 and VCAM-1 expression levels were significantly enhanced in primary endothelial cells of the ETIrs2/ApoEDKO mice. These data indicate that Irs2 in the endothelial cells ameliorates atherosclerosis.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン抵抗性 血管内皮細胞 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに全身の IRS-1 欠損マウスや全身の IRS-2 欠損マウスを用いた解析により、野生型マウスに比して、IRS-1 欠損マウスでは血管弛緩反応が減弱、IRS-2 欠損マウスでは、IRS-1 欠損マウスよりも血管弛緩反応が減弱していることを明らかにしてきた。またそれに伴い、野生型マウスに比して、IRS-1 欠損マウスではカフ障害誘導性の内膜肥厚の増大を、IRS-2 欠損マウスでは、IRS-1 欠損マウスよりもカフ障害誘導性の内膜肥厚の増大を呈することを見出した (Circulation 24:3073-3080,2003, 図 4)。このことから IRS、特に IRS-2 を介した血管内皮機能は動脈硬化形成に重要な役割をしていることが示唆された。また、血管内皮細胞や肝細胞では、高インスリン血症により IRS-2 の発現が低下することを見出しており (Cell Metab. 13: 294-307, 2011, Cell Metab., 8:49-64, 2008)、本研究においても「血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性」を介した動脈硬化発症メカニズムにおいて IRS-2 が重要な役割をしているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

血管内皮細胞においてインスリンはインスリン受容体に結合した後、インスリン受容体基質 (IRS)-1,2、PI3 キナーゼ、Akt を介して eNOS を活性化するとともに、MAP キナーゼを介して ET-1 の発現を調節している。従って肥満・2 型糖尿病においては、この eNOS 活性化シグナルのどこかが障害され、「血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性」が惹起されると考えられる。以前我々は、食事誘導性肥満モデルマウスにおいて高インスリン血症が、血管内皮細胞の IRS-1、特に IRS-2 の発現を早期から低下させることによって、「血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性」を惹起し、eNOS 活性化に伴う毛細血管の拡張能の低下を引き起こし、インスリンの血中から間質の移行が障害され、インスリンの糖取り込みが障害されることを明らかにしている (Cell Metab. 13: 294-307, 2011)。しかしながら、自然発症型動脈硬化症モデルである ApoE 欠損マウスを用いて検討すると、高コレステロール負荷にて確かに IRS-2 の発現は低下していたが、野生型マウスと ApoE 欠損マウスにおいて血中インスリン値は同等であった。一方血中コレステロール値は ApoE 欠損マウスで著明に上昇し、動脈硬化病変が形成されていた。このことから動脈硬化病変における IRS-2 の発現低下は、高インスリン血症ではなく血中コレステロールの増加、特に LDL が重要な役割をしていると考えられた。そこで動脈硬化病変形成に重要な役割をしている LDL の構成成分であるリゾフォスファチジルコリン(16:0)を primary のマウス血管内皮細胞に添加したところ IRS-2 の発現が濃度依存的に低下することを見出した。そこで本研究では、第一にリゾフォスファチジルコリン(16:0)がどのように血管内皮細胞の IRS-2 の発現を調節しているのか、またそれによって血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性を発症するのかがどうかを検討する。さらに、血管内皮細胞で IRS-2 が低下すると、本当に動脈硬化症を発症するのかがどうかについて血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスを作成し、粥状動脈硬化とそのメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

(A) リゾフォスファチジルコリン(16:0)がどのように血管内皮細胞の IRS-2 の発現を調節しているのか、またそれによって血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性を発症するのかがどうか検討する

1. リゾフォスファチジルコリン(16:0)による血管内皮細胞の IRS-2 発現調節因子を明らかにするために、リゾフォスファチジルコリン(16:0)添加前後において RNAseq を行い候補分子の絞り込みを行う。2. 候補分子について、siRNA や過剰発現ベクターを作成し、IRS-2 の発現変化を観察し、リゾフォスファチジルコリン(16:0)による血管内皮細胞の IRS-2 発現調節因子を同定する。3. さらに IRS-2 の発現を直接調節しているかどうかを明らかにするために、IRS-2 のプロモーターを作成し、プロモーター活性を検討するとともに、Chip-qPCR, Co-IP を行い、IRS-2 の発現調節メカニズムの全貌を解明する。4. 同定した IRS-2 発現調節因子の発現パターンなどについて、ApoE 欠損マウスを用いて in vivo での役割を検討する。5. リゾフォスファチジルコリン(16:0)による血管内皮細胞の IRS-2 発現低下が、本当に選択的インスリン抵抗性を発症しているのかがどうかを明らかにするために、リゾフォスファチジルコリン(16:0)添加後、インスリン刺激を行い、Akt, eNOS, MAPK について検討するとともに、血管内皮依存性弛緩反応についても検討する。6. 血管内皮細胞特異的 IRS-2 過剰/ApoE 欠損マウスを作製し、リゾフォスファチジルコリン(16:0)投与による動脈硬化が抑制されるのかがどうか検討する。

(B) 血管内皮細胞の IRS-2 が動脈硬化症において果たす役割について検討する

1. 血管内皮細胞特異的 IRS-2/ApoE ダブル欠損マウスに高コレステロール食負荷を行い、粥状動脈硬化症に与える影響について検討する。すでに血管内皮細胞特異的 IRS-2/ApoE ダブル欠損マウスでは粥状動脈硬化が亢進していることを確認している。しかし血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスを作製する際に用いた Tie2-Cre マウスは血管内皮細胞のみならず、動脈硬化形成に重

要なマクロファージに分化誘導する骨髄細胞でも発現しているため、真に血管内皮細胞によるものかは不明である。そこで血管内皮細胞特異的 IRS-2/ApoE ダブル欠損マウスに骨髄照射を行い、GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植して、高コレステロール食負荷後の粥状動脈硬化病変について検討する。2. 粥状動脈硬化発症のメカニズムを明らかにするために、リスクファクター、血管内皮機能、マクロファージの接着、炎症性サイトカインなどを測定する。さらに粥腫部分の MAC-2 免疫染色などにより構成細胞成分や構成脂質成分を検討する。3. もしマクロファージの増加を認めた場合、マクロファージの接着が増加しているかどうか、大動脈を直接染色して検討するとともに、マクロファージのローリングが増加しているのかも確認する。4. TaqmanPCR による遺伝子発現変化などにより、接着因子や炎症性サイトカインが増加している場合は、primary の内皮細胞を用いてメカニズムを詳細に検討する。5. 血管内皮細胞特異的 IRS-2 欠損マウスの primary 内皮細胞とマクロファージの co-culture を行い、マクロファージに及ぼす影響について検討する。

4. 研究成果

高コレステロール食負荷した ApoE 欠損マウスの血管の Irs2 の発現レベルを検討したところ、高コレステロール食負荷 4 週目から有意に低下していた。そこで動脈硬化病変形成に重要な役割をしている LDL の構成成分であるリゾフォスファチジルコリン(16:0)を primary のマウス血管内皮細胞に添加したところ IRS-2 の発現が濃度依存的に低下することを見出した。次にリゾフォスファチジルコリン(16:0)がどのように血管内皮細胞の IRS-2 の発現を調節しているのか、またそれによって血管内皮細胞の選択的インスリン抵抗性を発症するのかどうか検討するために、IRS-2 を負に制御することで知られている SREBP2 の発現を検討したところ、リゾフォスファチジルコリン(16:0)添加によって、有意に亢進していた。また、血管内皮細胞で IRS-2 が低下すると、本当に動脈硬化症を発症するのかどうかについて血管内皮細胞特異的 IRS-2/ApoE ダブル欠損マウスを作成し、高コレステロール食負荷を 15 週間行った。まずリスクファクターを検討するために、体重、インスリン値、中性脂肪値、HDL 値を測定したが、コントロールと差を認めなかった。さらに、糖負荷試験とインスリン負荷試験を行ったが両群間で差を認めなかった。この時に、大動脈弁輪部の粥状動脈硬化を検討したところ、血管内皮細胞特異的 IRS-2/ApoE ダブル欠損マウスでは有意に粥状動脈硬化が亢進していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Yuki, Shimanaka Yuta, Caddeo Andrea, Kubo Takuya, Mao Yanli, Kubota Tetsuya, Kubota Naoto, Yamauchi Toshimasa, Mancina Rosellina Margherita, Baselli Guido, Luukkonen Panu, Pihlajam?ki Jussi, Yki-J?rvinen Hannele, Valenti Luca, Arai Hiroyuki, Romeo Stefano, Kono Nozomu	4. 巻 70
2. 論文標題 LPIAT1/MBOAT7 depletion increases triglyceride synthesis fueled by high phosphatidylinositol turnover	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 180 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-320646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toda Gotaro, Soeda Kotaro, Okazaki Yukiko, Kobayashi Naoki, Masuda Yukari, Arakawa Naoko, Suwanai Hirotsugu, Masamoto Yosuke, Izumida Yoshihiko, Kamei Nozomu, Sasako Takayoshi, Suzuki Ryo, Kubota Tetsuya, Kubota Naoto, Kurokawa Mineo, Tobe Kazuyuki, Noda Tetsuo, Honda Kenya, et al	4. 巻 79
2. 論文標題 Insulin- and Lipopolysaccharide-Mediated Signaling in Adipose Tissue Macrophages Regulates Postprandial Glycemia through Akt-mTOR Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 43 ~ 53.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aihara Masakazu, Kubota Naoto, Minami Takahiro, Shirakawa Rika, Sakurai Yoshitaka, Hayashi Takanori, Iwamoto Masahiko, Takamoto Iseki, Kubota Tetsuya, Suzuki Ryo, Usami Satoshi, Jinnouchi Hideaki, Aihara Makoto, Yamauchi Toshimasa, Sakata Toshiya, Kadowaki Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Association between tear and blood glucose concentrations: Random intercept model adjusted with confounders in tear samples negative for occult blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 266 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, Sano T, Kubota T, Hashimoto T, Mano A, Yamada K, Matsuo Y, Kubota N, Kadowaki T, Iwatsubo T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Neurodegener.	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13024-019-0315-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki T, Moro K, Kubota T, Kubota N, Kato T, Ohno H, Nakae S, Saito H, Koyasu S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Innate Lymphoid Cells in the Induction of Obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 202-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.06.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 窪田哲也
2. 発表標題 病態発症における臓器内・臓器間のインスリン作用失調メカニズム
3. 学会等名 インスリン分泌セミナー(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小堀勤子, 大西 由希子, 吉田洋子, 高尾 淑子, 田原たづ, 菊池 貴子, 窪田 哲也, 岩本 真彦, 震明 あすか, 春日 雅人
2. 発表標題 当院における2型糖尿病患者の初診時臨床像の過去30年間の変遷
3. 学会等名 第117回日本内科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田哲也、田浦順樹、古蘭信二、唐澤博史、門脇孝、窪田直人:
2. 発表標題 化合物Xは骨格筋特異的にGLUT4の translocationを増強し糖取り込みを改善する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田哲也、吉田洋子、高尾淑子、大西由希子、田原たづ、菊池貴子、震明あすか、岩本真彦、小堀勤子、春日雅人
2. 発表標題 院における過去30年間の初診時糖尿病性網膜症の頻度や重症度の変遷
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田哲也、窪田直人、門脇孝
2. 発表標題 肥満におけるM2マクロファージ活性化障害機構
3. 学会等名 第41回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 窪田哲也、窪田直人、林高則、相原允一、山内敏正、門脇孝
2. 発表標題 血管内皮細胞のIRS-2は動脈硬化 抑制に働く
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田哲也、窪田直人、林 高則、相原允一、山内敏正、門脇 孝
2. 発表標題 血管内皮細胞のIrs2は動脈硬化に抑制的に働く
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌学会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------