

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20663

研究課題名（和文）凝固系を標的とした高齢者のインスリン抵抗性改善策の開発

研究課題名（英文）Development of strategies for improvement of insulin resistance of the aged by targeting the blood coagulation system

研究代表者

平野 勝也（Hirano, Katsuya）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80291516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：血液凝固因子の受容体として働くPAR1の遺伝子を欠損するマウスにおいて、加齢に伴う肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝の発症が抑制されていることを明らかにした。脂肪の多い食餌を与えて飼育すると、PAR1遺伝子を持つ正常のマウスと同じように体重が増加し、インスリン抵抗性を発症したことから、PAR1欠損により加齢現象が特異的に阻害されていることが示唆された。アンチエイジング戦略の開発においてPAR1は有望な標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PAR1遺伝子欠損マウスにおいて、肝臓、骨格筋、脂肪組織に共通してインスリン分解酵素の発現が高いことを見出した。加齢に伴い凝固活性が亢進すると、PAR1を介してインスリン分解酵素の発現が低下し、慢性的にインスリン濃度が高い状況が続くことで、インスリン抵抗性が発症する機序が示唆された。本研究成果は、未だ謎が多い高齢者の糖尿病に特異的な仕組みの解明につながる点で学術的意義が高く、高齢者の糖尿病に特異的な予防治療法の開発につながる点で社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：In the mice that lack the gene encoding PAR1, a receptor for blood coagulation factors, we found that the aging-associated obesity, insulin resistance and fatty liver were prevented. When the PAR1-deficient mice were fed high fat diet, the obesity and insulin resistance developed just as in the case of normal mice that express the PAR1 gene. Our findings suggest that some aging-associated events were specifically suppressed in the PAR1-deficient mice. PAR1 is therefore anticipated to be a useful target for developing anti-aging strategies.

研究分野：生理学、健康科学、老年医学、代謝内分泌学

キーワード：血液凝固因子 受容体 プロテイナーゼ活性化型受容体 インスリン抵抗性 老化

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、認知症やサルコペニアなど加齢に伴う重大な健康障害の基盤となり、糖尿病対策は健康寿命の改善に向け重要な課題である。糖尿病の学界では、最近、高齢者の糖尿病を肥満の糖尿病とは異なる病態ととらえ、特別の対応の必要性が提唱されている。これまで適切なモデルが開発されておらず、高齢者の糖尿病研究は立ち遅れている。

凝固能亢進は、炎症などの病態でも生じるが、加齢に伴う生理的変化としても生じる。凝固因子は、血液凝固のみならず、プロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR) を介して炎症惹起などの細胞作用を發揮する。PAR には 4 種類のサブタイプがあり、PAR2 とこれを活性化する凝固第 VII 因子/組織因子複合体が肥満に伴うインスリン抵抗性に関わることが報告されている。

応募者は、PAR1 欠損マウスは、高脂肪食で飼育すると野生型と同等にインスリン抵抗性が発症するにも関わらず、加齢に伴って生じるインスリン抵抗性は抑制され、空腹時血糖も低値を示す予備的知見を得た。このマウスを用いて、加齢性糖尿病に特異的なメカニズム解明が可能と考えられた。

2. 研究の目的

加齢に伴うインスリン抵抗性の発症機構を、PAR1 欠損マウスをもちいて、これまでにない凝固系の新しい視点から明らかにし、高齢者に特化したインスリン抵抗性改善策を開発することを目的とする。代謝系と凝固系を癒合させる新しい学術領域を拓き、凝固系の視点から高齢者の健康と病態をとらえる新たな方向の加齢研究の開拓に挑戦する。

3. 研究の方法

高齢者のインスリン抵抗性改善策開発を目指して以下の動物実験を計画した。これにより、加齢性インスリン抵抗性における凝固系と PAR1 の役割を確立することを目的とした。

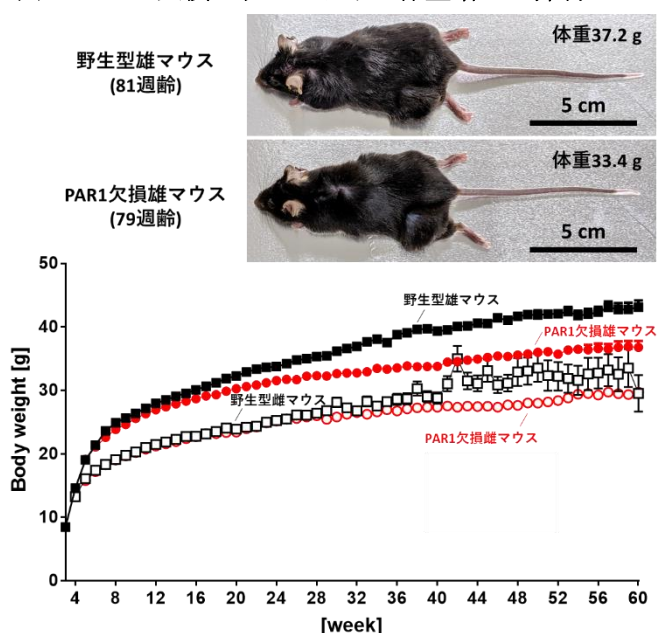
- (1) PAR1 欠損マウスの糖代謝の状況を、空腹時血糖値、耐糖能試験、インスリン耐用試験などで評価する。若齢 (24 週齢) と高齢 (>50 週齢)、および、高脂肪食負荷の有無で、野生型マウスと比較検討し、加齢に伴うインスリン抵抗性に特異的な PAR1 の関与を明らかにする。雌雄で比較し、性差の有無も検討する。脂肪組織、骨格筋、肝臓などの代謝関連臓器の病理解析を行う。脂肪細胞における制御性 T 細胞を含む炎症・免疫細胞の集積、サイトカイン発現など慢性炎症を評価する。アディポカインの発現解析から脂肪細胞機能を評価する。自発活動量、酸素消費量、体温、代謝関連ホルモン分泌を解析し、代謝全般を評価する。
- (2) 野生型マウスを用いて、PAR1 拮抗薬と抗凝固薬のインスリン抵抗性改善効果を検証する。若齢と高齢、および、高脂肪食負荷の有無の条件で比較検討する。PAR1 拮抗薬は抗血小板薬として米国では認可され、試薬としても入手可能である。PAR1 拮抗薬は飼料に混入させて経口投与する。この方法で効果を發揮することは検証済みである。
- (3) PAR1 欠損および野生型マウス由来の制御性 T 細胞および脂肪細胞の増殖性、遊走性、遺伝子発現パターン、サイトカイン・アディポカイン産生・分泌など細胞学的機能を評価する。野生型細胞に対して PAR1 作動薬の影響を評価する。これにより、PAR1 による脂肪慢性炎症の発症メカニズムを明らかにする。
- (4) 骨格筋、肝臓、脂肪組織の培養あるいは単離細胞を用いて、PAR1 作動薬の糖代謝に及ぼす作用を解析する。特に、インスリンによる糖取込み、それに関わる輸送体などの発現、膜輸送に及ぼす影響を明らかにする。さらに、これらの細胞の遺伝子発現パターンに及ぼす PAR1 作動薬の作用を網羅的に解析し、インスリン抵抗性発症の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 加齢に伴う体重増加が PAR1 欠損マウスにおいて、雌雄ともに抑制された (図 1)。

体重増加の解離は、雄の場合は 16 週齢から観察され、雌の場合は、雄よりも遅れて 40 週齢を過ぎて観察

図 1 PAR1 欠損マウスにおける体重増加の抑制



された。

80 週齢の超高齢マウスにおいても体重の違いは明らかであることに加え、PAR1 欠損マウスで毛並みが若く保たれていることを認めた (図 1 上部写真)。

- (2) PAR1 欠損により加齢性インスリン抵抗性が特異的に抑制された (図 2)。

若齢 (24 週齢) 雄マウスに高脂肪食を 8 週間投与すると、PAR1 欠損マウスも野生型マウスも同程度に体重が増加し、インスリンの血糖低下作用が減弱した (図 2 a)。すなわち、肥満に伴うインスリン抵抗性は、PAR1 欠損マウスも野生型マウスも同等に発症した。

通常食餌で飼育した高齢マウス (50 週齢以上) では、野生型マウスに比べて、PAR1 欠損マウスでインスリンの血糖低下作用が高く維持された (図 2 b)。

- (3) PAR1 欠損による加齢性インスリン抵抗性の発症抑制に性差はなかった (図 3 a)。

高齢 (50 週齢) マウスにおいて、インスリンが引き起こす血糖値低下反応は、雌雄ともに PAR1 欠損マウスで野生型よりも高かった (図 3 a)。しかしながら、インスリン感受性を、野生型および PAR1 欠損それぞれで性差を評価すると、いずれの場合も雌の反応性がオスよりも高かった (図 3 a)。

糖負荷による血糖上昇反応は、雄において PAR1 欠損マウスで野生型よりも低かった (図 3 b)。一方、雌においては、この血糖上昇反応に PAR1 欠損と野生型の差を認めなかった (図 3 b)。野生型において糖負荷による血糖上昇反応は雌の方が雄よりも低く抑えられていた。PAR1 欠損マウスにおいては雌雄で同等であった (図 3 b)。PAR1 欠損雄マウスの血糖上昇反応は、野生型および PAR1 欠損マウスの雌と同レベルであった。

- (4) PAR1 欠損により肝臓、骨格筋、脂肪組織で共通してインスリン分解酵素の発現が上昇した (図 4)。

糖代謝およびインスリン感受性の調節に関わる重要な臓器は、肝臓、骨格筋、脂肪組織である。この 3 臓器における遺伝子発現におよぼす PAR1 欠損の影響を、DNA マイクロアレイによって解析した (図 4)。PAR1 によって発現低下する遺伝子は、肝臓で 158 遺伝子、骨格筋で 92 遺伝子、脂肪組織で 377 遺伝子であった。一方、PAR1 欠損により発現上昇する遺伝子は、肝臓で 74 遺伝子、骨格筋で 175 遺伝子、脂肪組織で 175 遺伝子であった (図 4)。

図 4 遺伝子発現解析 (PAR1 欠損マウスと野生型マウスの比較)

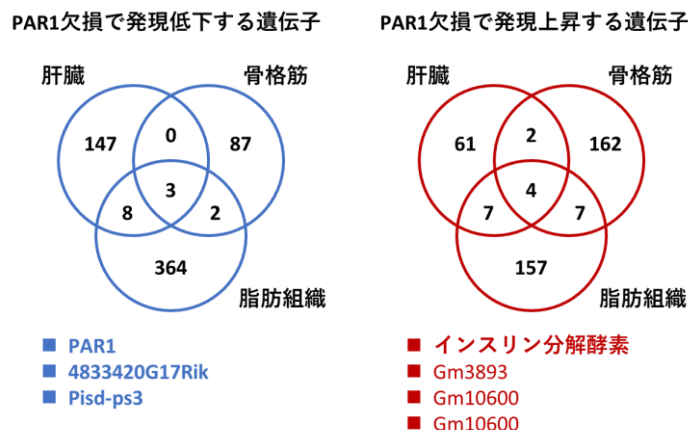


図 2 インスリン負荷試験

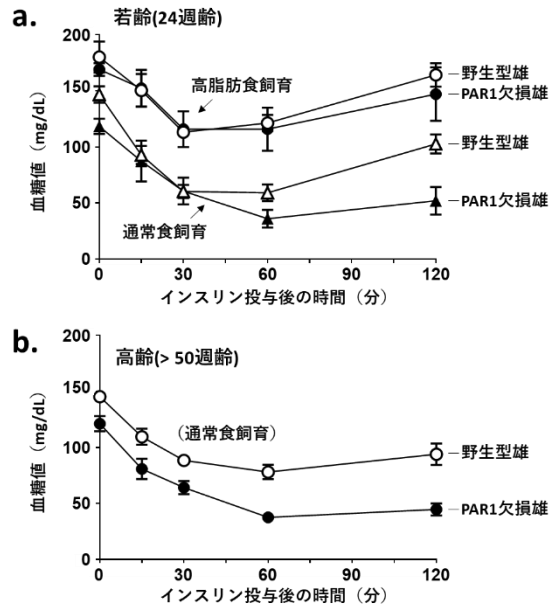
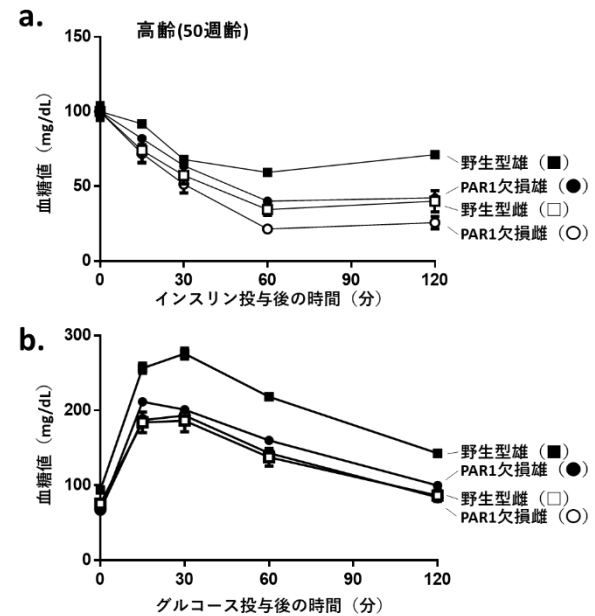


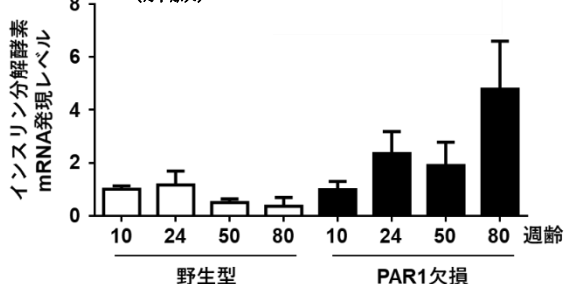
図 3 糖代謝の性差



肝臓、骨格筋、脂肪組織の3臓器に共通して PAR1 欠損により発現低下する遺伝子は3遺伝子、発現上昇する遺伝子は4遺伝子であった(図4)。発現低下する遺伝子のうち1つは PAR1 であった。この結果から、DNA マイクロアレイによる遺伝子解析が適正に実施されたことが示唆される。一方、発現上昇する遺伝子のうち1つはインスリン分解酵素であった。これらの遺伝子以外で発現低下および発現上昇する遺伝子は機能不明の遺伝子であった。

インスリン分解酵素 mRNA 発現を、肝臓を代表させて定量解析したところ、野生型では加齢とともに発現が低下する一方、PAR1 欠損では、10 週齢において野生型と同レベルであったものが、加齢とともにむしろ上昇した(図5)。

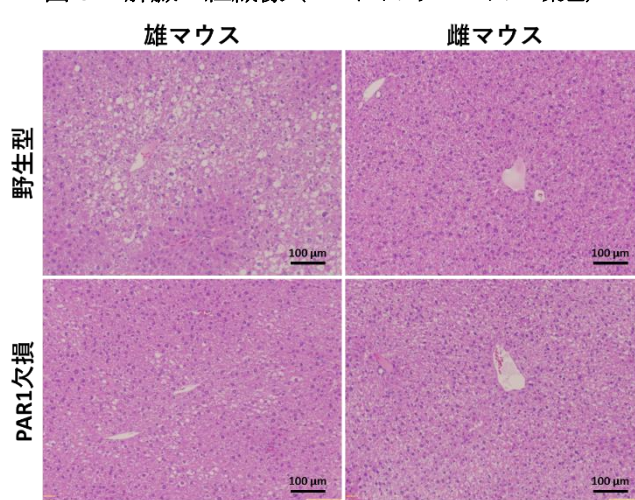
図5 インスリン分解酵素発現の加齢性変化(肝臓)



(5) 雄マウスにおいて PAR1 欠損による肝臓の脂肪沈着が抑制された(図6)。

50 週齢を越えたマウスの肝臓の組織を評価したところ、野生型では肝細胞の空胞化が明らかで、脂肪沈着が認められた。PAR1 欠損マウスにおいては脂肪沈着が減少していた。一方、雌マウスにおいては、野生型マウスも PAR1 欠損マウスも空胞化は著名ではなかった。

図6 肝臓の組織像(ヘマトキシリンエオジン染色)



【主な結果のまとめ】

- PAR1 欠損により加齢に伴う肥満とインスリン抵抗性の発症が抑制された。
- PAR1 欠損による加齢性インスリン抵抗性の発症抑制に性差を認めなかった。
- 肝臓、骨格筋、脂肪組織の代謝関連主要3臓器に共通して、PAR1 欠損によりインスリン分解酵素の発現が高かった。肝臓においては、インスリン分解酵素の発現は野生型マウスで加齢とともに低下するのに対し、PAR1 欠損マウスではむしろ上昇した。
- 加齢に伴う肝細胞の脂肪沈着が、雄マウスにおいて PAR1 欠損により抑制された。

【加齢に伴うインスリン抵抗性の発症機構に関する本研究の結論】

インスリン分解酵素欠損マウスは既に報告されており、加齢に伴ってインスリン抵抗性が生じる。一方、インスリン分解酵素を強制発現させたマウスでは、インスリン感受性が高いことが報告されている。1978 年に開発された2型糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラットでインスリン分解酵素遺伝子の機能喪失変異が見出されている。

本研究に用いた PAR1 欠損マウスでは、加齢性インスリン抵抗性が抑制され、インスリン分解酵素の発現が維持された。

これらのことから、加齢に伴って凝固活性が亢進すると、PAR1 を介してインスリン分解酵素の発現が抑制され、その結果、慢性的な高インスリン血症が生じ、インスリン受容体の反応性が低下し、インスリン抵抗性が発症するとする、加齢性インスリン抵抗性に特異的な発症機構が示唆される(図7)。

図7 加齢性インスリン抵抗性の発症機構(結論)



【総括】

本研究は、加齢に伴うインスリン抵抗性の発症機構を明らかにし、当初の研究目的を達成できたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野勝也
2. 発表標題 活性型凝固第XI因子は血管平滑筋の電位依存性L型カルシウムチャネルを活性化する
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本剛、平野勝也
2. 発表標題 糖質コルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストンの新たな脂肪細胞分化誘導剤としての可能性
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirano K, Hashimoto T
2. 発表標題 Characteristics of the adipocytes differentiated by a glucocorticoid receptor antagonist RU486
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Li X, Kurahara LH, Hiraishi K, Ishikawa K, Ishikawa R, Matsuda Y, Hirano K
2. 発表標題 Analysis of telomere length and expression of telomere-related proteins in the human lung with pulmonary hypertension
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 剛、平野 勝也
2. 発表標題 糖質コルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストン単独の脂肪細胞分化促進作用
3. 学会等名 第72回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 守安江梨伽、宮武美咲、平野勝也
2. 発表標題 血管平滑筋細胞において活性型ヒト凝固第XI因子は電位作動性L型Ca ²⁺ チャネルを介してCa ²⁺ 流入を引き起こす
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野勝也
2. 発表標題 Activated factor XI induces calcium signaling and cell migration by proteinase-activated receptor 1 (PAR1) in vascular smooth muscle cells
3. 学会等名 第37回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野勝也
2. 発表標題 活性型凝固第XI因子は血管平滑筋の電位依存性L型カルシウムチャネルを活性化する
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本剛、平野勝也
2. 発表標題 糖質コルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストンの新たな脂肪細胞分化誘導剤としての可能性
3. 学会等名 第73回日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirano K, Hashimoto T
2. 発表標題 Characteristics of the adipocytes differentiated by a glucocorticoid receptor antagonist RU486
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本剛、平野勝也
2. 発表標題 グルココルチコイド受容体拮抗薬 (RU486) 単独処理による脂肪細胞分化に伴う遺伝子発現特性
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本郁子、高田麻紀、Akram Hossain、劉文華、平野勝也、山口文徳、五十嵐淳介、徳田雅明、小西良士
2. 発表標題 COA-CI (コアクロル)のインシュリン分泌促進作用
3. 学会等名 第95回日本生化学学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野勝也, 平野真弓
2. 発表標題 血管内皮細胞の老化にともなう細胞間接着の未熟化
3. 学会等名 第52回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirano K, Hirano M
2. 発表標題 Decreased maturity of cell-cell contact in senescent vascular endothelial cells
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023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
研究 分 担 者	橋本 剛 (Hashimoto Takeshi) (80380153)	香川大学・医学部・助教 (16201)	

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