

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590762

研究課題名（和文）細胞老化制御による進行動脈硬化症治療—本邦高齢者へのオーダーメイド治療を目指す—

研究課題名（英文）Investigation of the regression of advanced atherosclerosis through the regulation of cellular senescence— custom-made therapy to Japanese elderly—

研究代表者

林 登志雄 (Toshio Hayashi)

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（和文）：

高齢者動脈硬化症の特徴に基づく内皮機能制御を伴う細胞老化制御療法開発を目指した。危険因子として加齢、脂質異常症、糖尿病の合併を想定、細胞老化をtelomerase, NO等にて制御し、血管壁構成細胞及び病態モデル動物で動脈硬化進展抑制効果を目ざした。細胞老化制御と特許申請法を含むNO bioavailabilityとの関連も調べた。# 1 遺伝子導入による老化制御と各種内皮機能 # 2 遺伝子導入と阻害剤等の組み合わせ—NO bioavailability増加条件 # 3 治療手段としての細胞老化制御 # 4 病態(細胞)での検討：糖尿病モデル細胞 # 5 ヒト検体を用いた老化度と病態の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

Aging is associated with diabetes and dyslipidemia as atherosclerosis characterized by endothelial dysfunction and oxidative stress leading NO destruction. We introduce one example. High glucose especially causes stress-induced premature and replicative senescence. We examined the regulatory role of various products on NO bioavailability, endothelial senescence and its functions. Exposure of HUVECs to high glucose for increased SA- β galactosidase activity, a senescence marker, and decreased telomerase activity, a replicative senescence marker. We found the anti-senescent effect of statin, estrogen and citrulline. eNOSsiRNA reduced those effects. Streptozotocin-induced diabetes showed more senescent cells in endothelium of aged rats compared with age-matched control and insulin, statin or estrogen-treated rats. The regulatory effects of various products on endothelial senescence might be important for elderly medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：老年科学・代謝内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学：内科一般

キーワード：抗老化、動脈硬化性疾患、遺伝子制御、一酸化窒素、内皮機能制御

1. 研究開始当初の背景

(1)本邦人口の1割を超えた後期高齢者では心筋梗塞,脳卒中等の動脈硬化性疾患が癌よりも死因で約2倍,介護要因で約4倍に増える。高齢者動脈硬化性疾患の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脂質異常症等の冠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。(3)動脈硬化症進展機序としてNO 分泌能等の血管内皮機能が重要である。(4)申請者は89年、NO分泌能の低下を高脂血症の段階から認め(Blood vessels89),米国 UCLA Ignarro 教授(98年ノーベル医学生理学賞)の元で、NOと動脈硬化症、性を研究し(PNAS 92)継続する(PNAS05, 06a)。(5)我々は進行動脈硬化症モデル動物で各危険因子によるNO bioavailability 低下への種々の血管壁NO産生代謝変動の寄与を見出した(PNAS 05, 06b)。遺伝背景も含む本邦高齢者に相応しいオーダーメイド医療を提案する必要性がある。

2. 研究の目的

世界一の長寿国、本邦高齢者の健康長寿を目的とし、高齢者動脈硬化症の特徴に基づき設計した細胞老化制御療法の有効性を明らかにし内皮機能制御と合わせた手法を確立する。

3. 研究の方法

具体的には危険因子として加齢及び高齢者に普遍的な高脂血症と糖尿病の合併を想定、細胞老化をtelomerase, NO及び活性酸素制御等により、酵素活性及び遺伝子レベルで制御し血管壁構成細胞及び病態モデル動物での動脈硬化進展抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入による老化制御と各種内皮機能各種老化指標(テロメラーゼ活性,テロメア長、老化関連βガラクトシダーゼ染色性等)NO放出能(NO代謝物、eNOSmRNA, 同蛋白), 活性酸素放出能(FACSscan等)で基礎検討を行った。

(2) 遺伝子導入と補酵素,阻害剤等の組み合わせ利用-NO bioavailabilityの増加条件を検討した。L- arginine, L-citrulline等のNO合成酵素基質及び補酵素, L-NAME等の阻害剤,エストロゲン等を用いた。

(3) 治療手段としての細胞老化制御-遺伝子、阻害剤等の組み合わせ:eNOS, iNOS, GTPCH-1ベクターと各SiRNA、エストロゲン受容体ER α , β 、Telomeraseの各ベクターの組み合わせを、血管壁構成諸細胞にて、citrulline-arginine cycle, NADPH oxidase活性等で評価した。

(4) 病態(細胞レベル)での検討: 糖尿病モデル細胞で老化制御作用効果を検討した。高脂血症としてLDL, HDL,酸化LDL各種濃度負荷時の老化制御効果をみた。

(5) ヒト検体を用いた老化度と病態の検討 後期高齢者telomere長の検討報告がなく、糖尿病罹患高齢者には早期の老化が認められるとの先行知見に基づき本学老年内科外来通院(自立)、特別養護老人ホーム入居要介護後期高齢者と健常及糖尿病罹患非高齢者のテロメア長等、各種老化指標と生理活性物質を検討した。

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23件) 全て査読有

1.Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yamada N. et al. Management of type IIb dyslipidemia J Atheroscler Thromb. 2012 (in press)

2.Yokoyama S, Yamashita S, Hayashi T, Yamada N. et al. Back-ground to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan: A revised edition of the report on the meeting of the Research Group for the Management of Primary Hyperlipidemia J Atheroscler Thromb 2012 (in press)

3. Hayashi T, Kawashima S, Nomura H et al. Age, gender, insulin and blood glucose control status alter the risk of ischemic heart disease and stroke among elderly diabetic patients. Cardiovasc Diabetol. 2012 (in press)

4. Gotoda T, Arai H, Hayashi T, Yamada N et al. Management of type I and V hyperlipidemia The Research Committee for Primary Hyperlipidemia, Research on Measures against Intractable Diseases by the Ministry of Health, Labor, and Welfare in Japan. J A T 2012;19:1-12

5. Matsui-Hirai H, Hayashi T, Ignarro LJ, Hattori Y, et al Dose-Dependent Modulatory Effects of Insulin on

Glucose-induced Endothelial Senescence in vitro and in vivo: A Relationship between Telomeres and Nitric Oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337:591-599

6. Ina K, Hayashi T et al. (他 4 名 2 番目) Depression, quality of life (QoL) and will to live of community-dwelling postmenopausal women in three Asian countries: Korea, China and Japan. *Archive Ger.Gel.* 2011;53:8-12

7. Hayashi T, Ina K, Maeda M, Nomura H. The effects of selective estrogen receptor modulator treatment following hormone replacement therapy on elderly postmenopausal women with osteoporosis *NO* 2011;34:199-203

8. Hayashi T, Nomura H et.al. Place of death for the elderly in need of end-of-life home care: A study in Japan. *Arch Gerontol Geriatr.* 2011;53:242-244

9. Ochiai M, Hayashi T, et al. Short-term effects of L-citrulline on arterial stiffness in middle-aged men. *Int. J. Cardiology* 2012;155:257-261

10. Napoli C, Cacciatore F, Hayashi T, Ignarro LJ. et al. Endothelial Progenitor Cells as Therapeutic Agents in the Microcirculation. *Atherosclerosis* 2011;215:9-22

11. Hirai H, Maeda M, Qunfang D, Hayashi T. The role of insulin growth factor on atherosclerosis and endothelial function: The effect on hyper-lipidemia and aging. *Life Sci.* 2011;88:425-31.

12. Hayashi T, Iguchi A. Possibility of the regression of atherosclerosis through prevention of endothelial senescence by regulation of nitric oxide and free radical scavengers. *Geriatr Gerontol Int.* 2010;10: 115-130

13. Kishimoto N, Hayashi T, Sakuma I et al. A hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor improves endothelial function within 7 days in patients with chronic hemodialysis. *Int J Cardiol* 2010; 145:21-26

14. de Nigris F, Hayashi T, Ignarro LJ, Napoli C et al. CXCR4/YY1 inhibition impairs VEGF network and angiogenesis during malignancy *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2010;107: 14484-89.

15. Zhang X-H, Hayashi T et. al. Beneficial effect of the oligomerized polyphenol oligonol on high glucose-induced changes in eNOS phosphorylation and dephosphorylation in endothelial cells. *Br J Pharmacology* 2010; 159:928-938

16. Hattori Y, Hayashi T. et al. A glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, upregulates NO production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells *Diabetologia* 2010;53:2256-63

17. Funami J, Hayashi T et al. (他 8 名 2 番目) Clinical factors such as B-type natriuretic peptide link to factor VII, endothelial NO synthase and estrogen receptor alpha polymorphism in elderly women. *Life Sci.* 2009 ;85:316-21.

18. Hayashi T, Itoh H, Watanabe H, Iguchi A et al. HDL relates the risk of stroke in very elderly diabetic individuals: The change in the risk factors for atherosclerotic diseases at various ages. *Diabetes Care* 2009; 32: 1221-3

19. Hayashi T, Yano K, et al. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther.* 2008;120:333-9

20. Hayashi T, Kawashima S et al. Importance of lipid levels in elderly diabetic individuals: baseline characteristics and 1-year survey of cardiovascular events. *Circ J.* 2008;72:218- 25.

21. Sasaki N, Hayashi T, Kawashima S. et al. Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial NO synthase in a mouse model of diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1068-76.

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

23. Simano H, Arai H, Hayashi T, Yamada N. et al. Proposed Guideleins for Hypertriglyceridemia in Japan with non-HDL Cholesterol as the second Target. *J Atherosclero Thromb* 2008;15:116-121

[学会発表] (計 40 件)

1. 第 5 回日本アミノ酸学会年次集会 : 2011 年 11 月 4-5 日名古屋 ワークショップ : 生活習慣病, 老化とアミノ酸 林 登志雄 (招待講演)

(2-4. 9th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics Gerontology and Geriatrics 2011 23-27 Oct. 2011 Melbourne Australia)

2. Low HDL-Cholesterol is Associated With Risk of Ischemic heart disease and Stroke in Elderly Diabetic Patients. Hayashi T, Ina K, et al.

3. Dose-Dependent Modulatory Effects of Insulin on Glucose-induced Endothelial Senescence in vitro and in vivo: A Relationship between Telomeres and NO. Hayashi T et al.,.

4. Place of death for the elderly in need of end-of-life home care. Ina K, Hayashi T et al.

5. 日本アミノ酸学会第 4 回夏のシンポジウム

2011 年 9 月 9 日 新潟 (招待講演) 動脈硬化症とアミノ酸 - アルギニン, シトルリンを中心に - 林 登志雄

(6.-10 第 53 回日本老年医学会学術集会 2011 年 6 月 15-17 日 東京)

6. 糖尿病合併心血管病への動脈硬化危険因子の影響-5 年度調査- 林 登志雄, 他 9 名

7. 高血圧モデル・アンギオテンシン II による血管内皮細胞老化は HMG-CoA 還元酵素阻害剤により回復する。 林 登志雄, 伊奈孝一郎

8. 細胞老化抑制物質の検討-高グルコースモデルを用いて- 林 登志雄, 伊奈孝一郎

9. 在宅医療において在宅しを規定する因子について検討 伊奈孝一郎, 林 登志雄, 他 4 名

10 糖尿病患者薬物療法医療経済解析のためのアセスメントモデル 伊奈孝一郎, 林 登志雄

11. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011 年 5 月 19-21 日札幌 脂質異常症合併糖尿病患者の薬物療法における医療経済解析用アセスメントモデル 伊奈孝一郎, 林

登志雄

12. The 20th Korea Lipid and Atherosclerosis Society Annual Meeting 2011 年 9 月 7-8 日 Seoul Korea Special Invited Lecture. Clinical Approach for Atherosclerosis in Elderly Hayashi T.

13. 第 52 回日本老年医学会学術集会 2010 年 6 月 24-26 日 神戸 シンポジウム; 老化と内皮機能障害/動脈硬化 林 登志雄

(14-15 2010 American Geriatric Society MEETING 2010 年 3 月 25-30 日 Orlando FL, USA)

14. Differences in the risk of stroke and ischemic heart disease by age among diabetics with insulin Hayashi T, et al.

15. Depression, quality of life and will to live of community-dwelling postmenopausal women in: Korea, China and Japan Ina K, Hayashi T et al.

16. 14th International Congress of Endocrinology 同年 3 月 25-30 日 Kyoto Interactions of glucose and insulin in regulation of replicative and stress-induced endothelial senescence Hayashi T

17. 愛知県難病研究会特別講演 2010 年 11 月 24 日 愛知県における原発性高脂血症の実態と診療の在り方-早期診断と在宅医療 林 登志雄

18. America's Gerontology Society 62nd Annual Scientific Meeting. Atlanta, GA, Late Breaker Session 2009 Nov. 18-22 40. Interactions of glucose and insulin in regulation of replicative and stress-induced senescence Hayashi T et al.

19. 第 41 回日本動脈硬化学会学術集会 2009 年 7 月 17-18 日 下関 Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. M. Ochiai, T. Hayashi

(20-21. 19th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatric Paris, July 5-9 2009)

20. Oral speech: Low HDL-cholesterol is associated with stroke in elderly diabetic individuals. Hayashi T et al.

21. Depression, Quality of Life and Living will of postmenopausal elderly women in east asia, Japan, Korea and China. Ina K, Hayashi T. (22-26 第 51 回日本老年医学会 2009 年 6 月 20-22 日 横浜)

22. 糖尿病合併心血管病危険因子の検討—日本人の脂質の寄与の年代差 林 登志雄 他

23. 本邦高齢女性の動脈硬化関連遺伝子変異病態解析の有用性 伊奈孝一郎, 林登志雄

24. グルコースとインシュリンの細胞老化と動脈硬化への作用(2報) 林 登志雄他

25. 東アジア3カ国閉経後から後期高齢女性の精神, QOLの検討 伊奈孝一郎, 林登志雄他

26. 老化及び老年医学研 2007 年度受賞者講演 血管老化を標的とした一酸化窒素, 活性酸素制御を介する動脈硬化退縮療法 林登志雄

27. The American Diabetes Association's 69th Scientific Sessions New Orleans June 5-9, 2009 HDL regulates the risk of stroke in very elderly diabetic individuals -The change in the risk factors at various ages. T.Hayashi et al. (28-29. The 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation June 1-3, 2009 Matsushima, Miyagi)

28. Biphasic effects of insulin on endothelial senescence. K Ina, T.Hayashi et al.

29. A new view of atherosclerosis related pharmacogenetics based gene analysis in Japanese elderly women. K Ina, T. Hayashi et al. (30-31 第 52 回日本糖尿病学会学術集会 同年 5 月 21-24 日大阪)

30. 優秀演題 糖尿病罹患における脳卒中リスクとしての脂質の影響-年齢による危険因子の変化-伊奈孝一郎, 林 登志雄他

31. 優秀演題 血管内皮細胞老化におけるグルコースとインシュリン 林登志雄他 (32-39 第 9 回日本 NO 学術集会 2009 年 5 月 8-9 日 静岡)

32. シンポジウム NO とインスリン抵抗性-糖尿病・老化) グルコースと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 林 登志雄

33. セミナー: シトルリン～NO 産生と動脈硬化予防への展望 林 登志雄

34. 閉経後高齢女性におけるラロキシフェンの有用性の検討—HRT からの移行例との比較試験成績から— 伊奈孝一郎, 林 登志雄

35. HMG CoA 還元酵素阻害剤は慢性透析患者に Pleiotropic 効果として、動脈硬化血管内皮機能を改善する。伊奈孝一郎, 林登志雄他

36. 日本人高齢女性における遺伝子変異解析に基づく、遺伝薬理学関連動脈硬化症の可能性の検討 石塚 麻子, 林 登志雄他 2 名

37. IGF-1 (インスリン様細胞成長因子) の動脈硬化症への影響 金谷りえ, 林登志雄

38. L-シトルリン短期間摂取がヒトの血管弾性に及ぼす影響 落合将之, 林 登志雄他 2 名

39. エストロゲン及び一酸化窒素の老化シグナルへの影響 平井寿子, 林 登志雄他 3 名

40. The American Geriatrics Society 2009 Annual Scientific Meeting May 3-5, Chicago, IL, USA GACA Poster The role of glucose and insulin on endothelial senescence- The relation of diversity effect of insulin. Hayashi T et al.

[図書] (計 3 件)

1. 林 登志雄 疾患からみた薬理学 渡邊裕司編 改訂 3 版 骨粗鬆症 2011 pp.132-141
2. Hayashi T, Iguchi A. Atherosclerosis and Aging –The relation of NO- PP.673-703 Elsevier Co.Ltd., Ignarro LJ ed. "Nitric Oxide Biology and Pathobiology" 2010 2nd edition
3. 林 登志雄, 余澤雲編 「これからの老年医学」井口昭久監修、中国語版 昆明医学中央出版/名大出版社 全 316 頁 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: シトルリンと NO

発明者: 林 登志雄他 2 名

権利者: 林 登志雄, 名古屋大学他

種類: 番号: 2007P0056

取得年月日: 2009 年 10 月 10 日

国内外の別: 国内及び国外(5 カ国)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 登志雄 (Toshio Hayashi)

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 (Hiroyuki Umegaki)

名古屋大学医学部附属病院 (助教)

研究者番号：40345898

(H21-22)

(3)連携研究者 なし