

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590881

研究課題名(和文)細胞老化制御による進行動脈硬化症退縮 本邦高齢者生活習慣病の新規治療法を目指して

研究課題名(英文)The regression of atherosclerosis through the regulation of cellular senescence:
the possible new therapy for Japanese lifestyle related diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は高グルコース3日で生じる内皮細胞老化がヒト血管病変に酷似し、他の生活習慣病モデル(高血圧、脂質異常症)の老化刺激より強力で、インスリンにより特異制御されラット等にも認める事等を報告した。更に超高齢社会、日本の健康長寿を目指し高齢者動脈硬化症を予防する細胞老化制御療法の提唱を目的に1)高齢者に普遍的な食後高血糖モデルの検討と高グルコース下細胞老化機序の解明、2)高齢者動脈硬化治療応用の動物モデルでの証明、3)surrogate markerにてヒトでの知見をえた。厚生労働科研(主任)での後期高齢糖尿病患者動脈硬化の特徴を踏まえ検討した。

研究成果の概要(英文)：We have found that cultured endothelial senescence induced by 3 days exposure to high glucose medium was found very close to human vascular lesion, and the high glucose is the stronger stimulus for endothelial senescence than other lifestyle related disease models such as hypertension or dyslipidemia. Further we performed 1) the study of the relation between postprandial hyperglycemic status and endothelial senescence, 2) the study of animal model of atherosclerosis and endothelial senescence and 3) the study of cellular senescence in human blood sample. The results might be helpful for understanding how endothelial senescence is important for human atherosclerosis.

研究分野：糖尿病学、老年医学

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) 後期高齢者は本邦人口の1割を超え、心筋梗塞、脳卒中等の動脈硬化性疾患は死因として癌の約2倍、介護要因として約4倍の頻度が増える。高齢者の健康長寿、QOL維持には、高齢者動脈硬化性疾患の安全かつ有効な治療が必要である。

(2) 高齢者(進行)動脈硬化症には脂質異常症等の普遍的な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。当該領域は不明点も尚多く、ホルモン補充療法も含め有効な治療法はまだない。

(3) 各生活習慣病による動脈硬化症進展に一酸化窒素(NO)等の血管内皮機能が大きく寄与する。

(4) 申請者は89年、NO分泌能の低下を高脂血症の段階に認め(Atheroscler 91)、米国UCLA Ignarro教授(98年ノーベル医学生理学賞、研究協力者)の元で、NOと動脈硬化症、性の関連を研究し(Hayashi et al. PNAS 92)、現在も共同研究している(Hayashi et al. PNAS 05, PNAS 06a, JPET 11)。

(5) 動脈硬化症で低下したNO分泌回復に対するNO合成酵素の基質L-arginine/補酵素BH4補充の有効性は初期病変に限局し、進行病変にはL-citrullineとestrogenが有用で血管壁NO産生代謝経路であるL-citrulline/L-arginine cycle活性化とarginaseII抑制が著効した(Hayashi et al. PNAS 05, PNAS 06b press release, 国際特許申請中)。

(6) 高血糖性細胞老化の動物モデルでの再現及びインスリンの制御機構を見出した(JPET 11)。

(7) 高齢者心血管病は無症候期が長く非典型的発症により致死率も高い。動脈硬化性疾患には性差と人種差を認め、我々は韓国、中国で基盤研究海外調査を行いオリエンタル人種に特異的な遺伝子変異(NO合成酵素、エストロゲン受容体、凝固因子等)と高齢者心血管病や関連疾患(高脂血症、心不全、虚血性心疾患)との関連を見出した(米国及び欧州各老年医学会シンポ08, Life Sci.09, Diabetes Care 09, Arch Ger Ger10等)。

2. 研究の目的

(1) 高齢者に普遍的な食後高血糖モデルの検討と高グルコース下細胞老化機序の解明、(2) 高齢者動脈硬化治療応用の動物モデルでの証明、(3) surrogate markerでのヒトの知見。これらより、高齢者動脈硬化症を予防する細胞老化制御療法を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 高齢者食後高血糖(耐糖能異常)モデルの検討と高グルコース下細胞老化機序の解明：脂質異常症、糖尿病モデルにて培養血管壁構成細胞を用い細胞機能及び老化制御機構評価を行う。

(2) 高齢者動脈硬化治療応用の動物モデルで検討する。

(3) surrogate markerによるヒトでの知見を得る。

4. 研究成果

(1) 高齢者食後高血糖(耐糖能異常)モデルの検討と高グルコース下細胞老化機序の解明：脂質異常症、糖尿病モデルにて培養血管壁構成細胞を用い細胞機能及び老化制御機構評価を行った。replicative/stress induced 双方の老化を検討し内皮はNO及び活性酸素制御等にて、平滑筋、マクロファージはp51等に着目し血管壁全体の抗老化療法にて動脈硬化抑制/退縮を企図した。東アジア人の遺伝子変異(eNOSとHDL・TG, estrogen受容体とBNP, FactorVIIとHDL)、後期高齢糖尿病患者の動脈硬化の特徴(HDL, LDL/HDL比)を踏まえ検討した。

高齢者に普遍的な食後高血糖(耐糖能異常)モデルは糖尿病モデル(持続的高グルコース)と異なりstress induced senescenceで、内皮機能はNOよりも活性酸素制御の影響を大きく受けた。抗老化療法による動脈硬化抑制(及び退縮)では、アルギニン、シトルリンが各々NO合成酵素を活性化し血管内皮機能改善を介し抗動脈硬化作用を示し、同時に細胞(動脈内皮)老化も抑制した。抗老化作用物質として種々の候補を検討し、肝X受容体作動物質やCa拮抗薬の作用の可能性を見出し、前者には抗動脈硬化作用も認め双方とも論文化した(Hayashi T. et al. PNAS 2014, Hayashi T. et al. PLOS ONE 2014等)。食後高血糖モデルの細胞老化と動脈硬化との関連はNO合成酵素よりNADPH oxidase等活性酸素産生酵素への作用が認められ論文化した(Maeda M, Hayashi T. et al. PLOS ONE 2015)。

(2) 高齢者動脈硬化治療応用の動物モデルでの証明：動物モデルとして一般的なapoE KOマウス、コレステロール食負荷家兎等に加え動脈硬化(石灰化)進行病変をもつ動物モデル実験、遺伝子変異モデルで検討した。高齢者動脈硬化危険因子として加齢と脂質異常症及び耐糖能異常併存を想定し、ZDF:Zucker diabetic fatty ratの有用性を見出し、上記肝X受容体作動物質の作用確認に用い論文採択された(Hayashi T. et al. PNAS2014)。耐糖能異常モデルである経管でのグルコースの1日2時間X2-3回投与の食後高血糖ラットモデルも論文投稿し、

採択された (Maeda M, Hayashi T. et al. PLOS One 2015)

(3) surrogate marker (アルブミン等従来の指標に NO 代謝物等,更に本研究での候補)によるヒトでの知見を得る事により高齢者動脈硬化症を予防する細胞老化制御療法の手法の確立をめざした。高齢者健康長寿を目的に、内皮機能制御を伴う細胞老化制御療法の生活習慣病治療への応用を目指した。ヒトでの検討では、後期高齢者 telomere 長の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倫理委員会での研究承認後、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に、サザンプロット法等を改変し確立した手法にて老化指標マーカーでもある telomere 長, NO 代謝物や各種サイトカインを検討し学会発表(老年医学会)した。

(4) 加齢を伴った各危険因子による進行動脈硬化症の共通項には血管内皮機能障害(NO 低下, O₂-増加)を認めた。これら動脈硬化発症進展全てに細胞老化は増悪因子として寄与した。高齢者心血管病は無症候期が長く非定型的発症により致死率も高く、非侵襲的治療が有益である事が推測された。

(5) 後期高齢者は多臓器疾患(多くは動脈硬化関連)に罹患し従来の医療,投薬では更なる医療介護費増加(現在後期高齢者で 20 兆円/年)が必須で薬物相互作用,多数科受診による専門医毎の治療乱立等も問題化している。この解決策の一つとして、個体差のある本邦高齢者に相応しいオーダーメイド医療が必要であり、上記の試みは有用であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

Maeda M, Hayashi T, Hattori Y, Kuzuya M. Inter- mittent high glucose implements stress-induced senescence in human endothelial cells: The role of super- oxide by NADPH oxidase. PLOS ONE2015(in press) ,査読有

Hattori Y, Hattori K, Hayashi T. Pleiotropic Benefits of Metformin: Macrophage Targeting as its Anti-inflammatory Mechanisms. Diabetes 2015 (in press) 査読有

Hayashi T, Kotania H, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori Y, Ignarro LJ. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation

with an additional mechanism for its atheroprotection in diabetes. Proc Nat Acad Sci USA2014; 111:1168-1173, doi:10.1073/pnas. 1322153111. 査読有

Hayashi T, Yamaguchi T, Taguchi K, Ina K, Maeda M, Sakakibara Y, Kuzuya M, Hattori Y. eNOS-Dependent Anti-senescence Effect of the Calcium Channel Blocker Nifedipine in Human Endothelial Cells. PLOS ONE 2014;9:e88391-7, doi: 10.1371/journal.pone.0088391,査読有

Koh KK, Sakuma I, Hayashi T, Kim SH, Chung WJ. Renin-angiotensin system inhibitor and statins combination therapeutics - what have we learnt? Expert Opin Pharmacother 2014;8:1,査読有

Hayashi T, Kubota K, Kawashima S, Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Araki A, Noda M, Noto H, Sakuma I, Yoshizumi M, Ina K, Nomura H; Japan CDM group. "Efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors in the prevention of cerebrovascular attack in 1016 patients older than 75 years among 4014 type 2 diabetic individuals." Int J Cardiol 2014; 177: 860-866,査読有

Morita M, Hayashi T, Ochiai M, Maeda M, Yamaguchi T, Ina K, Kuzuya M. Oral supplementation with a combination of L-citrulline & L-arginine rapidly increases plasma L-arginine and enhances NO bioavailability. Biochem Biophys Res Commun. 2014;454:53-57: doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.029. 査読有

Hayashi T. The role of L-arginine and L-citrulline on atherosclerosis. Seikagaku 2014;86:325-329,査読有

Hayashi T, Kawashima S, Nomura H, Itoh H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Sone H, Hattori Y, Yoshizumi M, Ina K, Kubota K; Japan Cholesterol and Diabetes Mellitus Investigation Group. Metabolic predictors of ischemic heart disease & cerebrovascular attack in elderly diabetic individuals: difference in risk by age. Cardiovascular Diabetology 12;10-19:2013,査読有

Umegaki H, Hayashi T, Nomura H, Yanagawa M, Nonogaki Z, Nakshima H, Kuzuya M. Cognitive dysfunction:

an emerging concept of a new diabetic complication in the elderly. Geriatr Gerontol Int. 2013;13:28-34. doi: 10.1111/j.1447-0594.査読有

Ina K, Hayashi T, Araki A, Kawashima S, Sone H, Watanabe H, Ohru T, Yokote K, Takemoto M, Kubota K, Noda M, Noto H, Ding QF, Zhang J, Yu ZY, Yoon BK, Nomura H, Kuzuya M; Japan CDM Group. Importance of high-density lipoprotein cholesterol levels in elderly diabetic individuals with type IIb dyslipidemia: A 2-year survey of cardiovascular events. Geriatr Gerontol Int. 2013;13:108-114. doi: 10.1111/ggi.12168.査読有

Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K. Short-term effects of L- citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. Int J Cardiol. 2012;155:257-61. doi: 10.1016/j.ijcard. 2010.10.00.査読有

Yokoyama S, Yamashita S, Ishibashi S, Sone H, Oikawa S, Shirai K, Ohta T, Bujo H, Kobayashi J, Arai H, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Gotoda T, Suzuki H, Yamada N. Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan. J Atheroscler Thromb. 2012;19:207-12.査読有

Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yokoyama S, Oikawa S, Kobayashi J, Shirai K, Ota T, Yamashita S, Gotoda T, Harada-Shiba M, Sone H, Eto M, Suzuki H, Yamada N; Research Committee for Primary Hyperlipidemia, Research on Measures against Intractable Diseases. Management of type IIb dyslipidemia. J Atheroscler Thromb. 2012;19:105-14. 査読有

Gotoda T, Shirai K, Ohta T, Kobayashi J, Yokoyama S, Oikawa S, Bujo H, Ishibashi S, Arai H, Yamashita S, Harada-Shiba M, Eto M, Hayashi T, Sone H, Suzuki H, Yamada N. Diagnosis and management of type I & V hyperlipoproteinemia. J Atheroscler Thromb 2012;19:1-12.査読有

Sone H, Tanaka S, Tanaka S, Iimuro S, Ishibashi S, Oikawa S, Shimano H, Katayama S, Ohashi Y, Akanuma Y,

Yamada N, Hayashi T, Japan Diabetes Complication Study Group. Comparison of various lipid variables as predictors of coronary heart disease in Japanese men & women with type 2 diabetes: subanalysis of Japan Diabetes Complication Study. Diabetes Care. 2012;35:1150-7.査読有

Ding Q., Zhang X., Ge N., Hayashi T. Association of ER PvuII and eNOS G894T Polymorphisms With Obesity and Related Diseases in Elderly Postmenopausal Women: A 7-years Prospective Study in a Community in China. J Am Ger Soc;60: 132: 2012.査読有

林 登志雄 生活習慣病への治療戦略、東海支部総合内科専門医部会教育セミナー『脂質異常症、性差』日本内科学会誌 2012;101:2242-49.査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

TOSHIO HAYASHI, KOUTARO YOKOTE, MINORU TAKEMOTO, MITSUHIKO NODA, HIROSHI NOTO, ATSUSHI ARAKI, HIROHITO SONE, KOICHIRO INA, HIDEKI NOMURA, JAPAN CDM GROUP. PREDICTORS OF ISCHEMIC HEART DISEASE AND CEREBROVASCULAR ATTACK IN DIABETIC INDIVIDUALS: LESSONS FROM 9.1 YEARS STUDY OF 4014 DIABETIC PATIENTS INCLUDING 1016 LATE ELDERLY OLDER THAN 75 Y.O.- DIFFERENCE OF RISK BY AGE, 10th IDF-WPR and 6th AASD Scientific Meeting 2014/9/21 ~ 9/24 シンガポール, シンガポール

Koichiro Ina, Toshio Hayashi, LOWER HDL CHOLESTEROL IS ASSOCIATED WITH THE RISK OF STROKE IN DIABETIC INDIVIDUALS WITH POOR GLYCEMIC CONTROL :5.5-YEAR SURVEY OF CARDIOVASCULAR ENENT, 10th IDF-WPR and 6th AASD Scientific Meeting 2014/9/21 ~ 9/24 シンガポール, シンガポール

Koichiro Ina, Toshio Hayashi, The importance of lower triglyceride in diabetic individuals with type A dyslipidemia, 10th IDF-WPR and 6th AASD Scientific Meeting 2014/9/21 ~ 9/24 シンガポール, シンガポール

林 登志雄、山口 知恵、前田 守彦、伊奈 孝一郎、飯田 万由、血管内皮細胞老化は肝 X 受容体アゴニストにより制御される、第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 優秀演題 2013/7/19 ~ 7/20 京王プラザホテル(東京都新宿区)

林 登志雄、伊奈 孝一郎、葛谷 雅文、横手 幸太郎、竹本 稔、荒木 厚、渡邊 裕司、後期高齢者糖尿病心血管合併症の危険因子-9.1 年間の前向きコホート研究より非高齢、第 46 回日本動脈硬化学会 2014/7/9 ~ 7/10 京王プラザホテル(東京都新宿区)

伊奈 孝一郎、林 登志雄、山口 知恵、前田 守彦、葛谷 雅文、The effect of Amino Acids on the Progression of Atherosclerosis and Aging.2nd、第 37 回日本基礎老化学会 2014/6/26 ~ 6/27 あいち健康プラザ(愛知県大府市)

Tohio Hayashi, Metabolic Predictors of Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Attack in Late Elderly Diabetic Individuals:Lessons from 9years Observatio of 4014 Diabetic Patients, 74th Annual Meeting of American diabetes Association 2014/6/13 ~ 6/17 サンフランシスコ, アメリカ

Tohio Hayashi, Effect of Educational Hospitalization of Diabetes on Control of Diabetes and its complications-one year follow up nation wide survey for 1200 japanese Diabetologists, 74th Annual Meeting of American diabetes Association 2014/6/13 ~ 6/17 サンフランシスコ,アメリカ

林 登志雄、渡邊 裕司、横手 幸太郎、竹本 稔、大類 孝、荒木 厚、伊奈 孝一郎、野村 秀樹、後期高齢者糖尿病心血管合併症の危険因子-8.8 年間の前向きコホート研究より非高齢者、前期高齢者との年代別比較を踏まえて、第 56 回日本老年医学会学術集会 2014/6/12 ~ 6/14 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

林 登志雄、伊奈 孝一郎、葛谷 雅文、肝臓 X 受容体は血管老化制限を介し、糖尿病性動脈硬化を予防する、第 56 回日本老年医学会学術集会 2014/6/12 ~ 6/14 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

林 登志雄、能登 洋、竹本 稔、荒木 厚、伊奈 孝一郎、横手 幸太郎、野田 光彦、糖尿病地域医療連携の実際：糖尿病専門医実態調査から、第 57 回日本糖尿病学会

年次学術集会 シンポジウム 19 , 2014/5/22 ~ 5/24 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

林 登志雄、伊奈 孝一郎、核内受容体と細胞老化-肝臓 X 受容体の作用を中心に、第 55 回日本老年医学会学術集会 2013/6/4 ~ 6/6 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

飯田 万由、林 登志雄、前田 守彦、伊奈 孝一郎、山口 知恵、後期高齢者テロメア長測定の意味について、第 36 回日本基礎老化学会 2013/6/4 ~ 6/6 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

山口 知恵、林 登志雄、前田 守彦、伊奈 孝一郎、飯田 万由、食品成分(L-シトルリン及びL-アルギニン)投与が動脈硬化及び血管老化の進展抑制に及ぼす影響に関する研究、第 36 回日本基礎老化学会 2013/6/4 ~ 6/6 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

前田 守彦、林 登志雄、山口 知恵、伊奈 孝一郎、飯田 万由、高グルコース間歇刺激による血管内皮細胞の老化機序について、第 36 回日本基礎老化学会 2013/6/4 ~ 6/6 大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

Hayashi T, Ina K. The effects of selective estrogen receptor modulator treatment following hormone replacement therapy on elderly postmenopausal women with osteoporosis. The Gerontological Society of America's 65th Annual Scientific Meeting, 2012/11/14 ~ 11/18 サンディエゴ, アメリカ

Hayashi T. Metabolic predictors of ischemic heart disease and cerebrovascular attack in elderly diabetic individuals: The roles of HDL-C and LDL-C/HDL-C ratio、第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 シンポジウム 2.生活習慣病の疫学研究から動脈硬化を予防する 2012/7/19 ~ 7/20 ヒルトン福岡シーホークホテル(福岡県福岡市)

林 登志雄、井藤英喜 他 9 名 1 番目、糖尿病性心血管病危険因子の検討：5.5 年コホート研究より、第 54 回日本老年医学会学術集会 優秀演題賞候補セッション 2012/6/28 ~ 6/30 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

林 登志雄、川嶋 成乃亮 他 7 名 1 番目、
糖尿病性患者における心血管病発症リス
クの年代別、性別検討成績:HDL-C と
LDL-C/HDL-C 比の意義について
第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会
2012/5/17 ~ 5/19 パシフィコ横浜 (神奈
川県横浜市)

Ding Q., Zhang X., Ge N., Hayashi
T., Luo F., Zhang J., Wan Z., Cao L.,
Association of ERα PvuII and eNOS
G894T polymorphisms with obesity
and related diseases in elderly
postmenopausal women: A 7-years
prospective study in a community in
China. 2012 Annual Scientific Meeting
of the American Geriatrics Society
2012/5/3-5/5 ワシントン , アメリカ

[図書] (計 2 件)

1. Hayashi T. Risk Factor of
Cardiovascular Diseases: Primary
Prevention: Chapter 2 Aging
Wakabayashi T and Kolb-Bachofen V
eds. Elsevier. 2013 , PP.25-36
2. Hayashi T. Risk Factor of
Cardiovascular Diseases: Primary
Prevention: Chapter 3 Gender
Wakabayashi T and Kolb-Bachofen V
eds. Elsevier. 2013 , PP.37-52

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・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 40345898