

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462600

研究課題名(和文) 選択的エストロゲン受容体の血管新生 VEGF 系と閉経後糖尿病性微小循環異常との関係

研究課題名(英文) Estrogen receptor alpha are predominantly involved in heart VEGF pathway in diabetic female mice.

研究代表者

山口 直人 (Yamaguchi, Naoto)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40239900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：閉経後の女性における糖尿病性心不全の背景には、心組織内の微小循環異常がある。この病態に対する選択的エストロゲン受容体(ER)の役割を解析する目的にて、1型糖尿病モデル(ストレプトゾトシン投与)を、ERアルファ-ノックアウト(ER KO)、ER KOの2系統に誘導し、心機能、心組織におけるVEGF(血管内皮増殖因子)関連分子の発現等を野生型との比較において検討した。KO群では心機能低下、VEGF発現低下がみられ、特にER KO群では有意であった。閉経後の糖尿病性心不全の病態にはエストロゲン減少・枯渇状態が関連しており、特に受容体が優位に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that vascular endothelial growth factor (VEGF) is critical for heart tissue (coronary) microvascular angiogenesis in diabetes. Here we attempt to elucidate the effects of estrogen and its specific receptor (ER) subtype in heart tissue VEGF pathways and microvascular angiogenesis using 15-week female mice that are either wild-type (WT), lack of ER alpha (ER alpha KO) or beta (ER beta KO), all of them have diabetes induced by streptozotocin. Cardiac function was reduced and VEGF expression was down-regulated in both ER alpha KO and ER beta KO mice, especially in ER alpha KO mice, compared to WT. These findings suggest that ER alpha are predominantly involved in the pathogenesis of diabetic heart failure through down-regulation of tissue VEGF pathway.

研究分野：循環器病学 病理学

キーワード：糖尿病 血管内皮増殖因子 エストロゲン受容体 閉経 心不全

1. 研究開始当初の背景

(1) VEGF系、エストロゲン系および糖尿病との相互関係:

血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor :VEGF) は、正常と病態の両環境における血管新生に係わる多機能性サイトカインである。ストレプトゾトシン(STZ)誘発性1型糖尿病ラットを用いた我々の先行研究では、1) 正常な心・脳組織内では VEGF カスケードは eNOS-NO 系を介して臓器微小循環を保持する事、2) 糖尿病性臓器障害の病態の一つである微小循環異常は、臓器組織 VEGF の発現異常と関連が深く (Jesmin, et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007)、3) 特にエストロゲン低下環境では、低 VEGF 血症は糖尿病と心・脳系疾患の発症リスクである事 (Yamaguchi et al. *Circulation J* 2009)、4) エストロゲン受容体 (estrogen-receptors: ERs) ノックアウト (KO) 動物では、臓器組織 VEGF 発現異常と心・脳微小循環異常には相関が認められた (Jesmin, Yamaguchi et al. *Eur J Pharmacol* 2010)。

近年、選択的 ER の隣臓細胞アポトーシス抑制を介する糖尿病でのインスリン分泌保護作用 (*Br J Pharmacol* 2011)、ER KO マウスにみられる糖尿病型表現型 (*Diabetologia* 2006)、ER の ESR1 intron 1 (rs9340799) 遺伝子多型における2型糖尿病との関連性 (*Diabetes* 2007)、選択的 ER 遺伝子変異とヒト糖尿病との親和性 (*Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006)、閉経後のエストロゲン低下と2型糖尿病発症との相関 (*J Clin Endocrinol Metab.* 2003) 等の報告が諸家より相次いでいる。

VEGF 遺伝子のプロモータ領域にはエストロゲン応答配列 (ERE) があり、エストロゲン (E2) と受容体の複合体は VEGF の転写調節因子である。エストロゲン/ERs-VEGF 系

を介する血管新生系には、糖尿病性心・脳疾患と臓器内微小循環異常の病態との強い関連性が示唆される。分担者の Jesmin らは、エストロゲンの冠・脳微小循環への保護作用は、VEGF カスケードの調節を介すること (*Endocrinology* 2004)、閉経後糖尿病ラットモデルにおける血清 VEGF 低下と心機能低下との相関 (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006)、更に、我々は、血清中や心組織中における VEGF の主要な調節因子 (genomic pathway) は選択的に ER であること (*Eur J Pharmacol* 2010)、脳では微小循環系と VEGF 発現の調節に対し ER と ER は等しく関与している事を示した (*Biomed Res* 2010)。従って、エストロゲンの VEGF や関連する血管新生系、更に臓器内の微小循環異常と糖尿病性臓器障害との関係に関して、ER 受容体のレベルでの解析を、ととの選択個別的に進める必要がある。

(2) 閉経後女性を対象とする我々の最近の研究では、糖尿病患者の血清 VEGF 濃度は健康人に比べて明らかな低値を示した (*World Health Care Congress* 2010, Washington US)。閉経後の血清 VEGF 濃度の低下は糖尿病発症のリスク因子であり、動物実験データ (既述) との総合的な考察により、VEGF 濃度の異常は、閉経後の糖尿病発症の病態に関連する可能性が示唆された。ヒト血清に対する追加研究では、低 VEGF 血症を示す閉経期糖尿病患者には、血清中 TNF-alpha 値の上昇が認められた。閉経期糖尿病患者の血中 VEGF 濃度と炎症指標との関係も示唆された (*Journal of Epidemiology* 2010)。

(3) 作業仮説「エストロゲン/エストロゲン受容体 (ERs) 系は、高血糖の有無や臓器毎に、と各 ER が、共同または選択個別的に、VEGF 系を介して、心・脳の糖尿病性微小循環に深く関連している。」の検証が研究テーマである。ととの両受容体を同時に刺激する閉経後女性へのエストロゲン補充療

法は血栓症、脳卒中などのリスクが高く (Women's Health Initiative: WHI) 臓器保護目的には用いられない (Science 2005)。しかし遺伝子改変マウス実験では、エストラジオール (E2) の臓器特異的な抗糖尿病作用等、受容体 (ER,) 毎の解析では抗糖尿病、エネルギー代謝改善、抗炎症/抗酸化ストレス作用の報告が集積中である (Nature Review Endocrinology 2009)。受容体ごとの作用を解析する必要がある。

2. 研究の目的

血管内皮増殖因子 (VEGF) カスケードの異常は、臓器の微小循環異常を介して糖尿病性心血管系疾患を齎す。VEGF 遺伝子の転写調節因子であるエストロゲン/エストロゲン受容体 (ER) 系の、糖尿病環境における VEGF カスケードと臓器障害への影響を動物モデルで解析し、性ホルモン環境の変化や性差が齎す糖尿病性心・脳疾患への影響、それらと ER-VEGF 系関連因子との関係を明らかにする。エストロゲン/ER(,)-VEGF 系を基軸病態とする閉経後の糖尿病性臓器障害への新規治療法を、選択個別的なエストロゲン受容体への介入により解析する。

3. 研究の方法

(1) および 受容体の各エストロゲン受容体 (estrogen receptor alpha: ER ; estrogen receptor beta: ER) 遺伝子欠損マウス (knockout: KO)、野生型マウス (対照群) に対して、1 型糖尿病 (STZ 誘発性) を誘発する。卵巣摘除群、卵巣摘除+エストロゲン投与群、および対照群を設定する。心臓形態、機能と臓器内微小循環動態を評価する。1 か月および 3 か月後に塗擦 (sacrifice) し、血液、尿、臓器の各検体を採取し、糖尿病、脂質代謝異常、炎症系、血液凝固線溶系、内分泌系、VEGF 系を中心とする成長因子や関連するシグナル伝達系、内皮細胞指標、各臓器の

病理組織と毛細血管の免疫組織化学的解析等を行う。それらの結果を、卵巣摘除、エストロゲン補充の条件ごとに比較し、閉経後における糖尿病臓器障害と臓器内微小循環異常に対する ER、及び ER の受容体ごとの役割/関与を解析し、非エストロゲン製剤による治療的介入法を開発する。

(2) 1 型糖尿病マウスモデルの作成と解析

1) 遺伝子欠損マウス: ER -KO, ER -KO の 2 系統で各 10 週令 (Taconic lab, Jesmin et al. Eur J Pharmacol 2010; Jesmin et al. Biomed Res 2010) を用いる。

2) 1 型糖尿病の誘発: 野生型 (雌) と 2 系統の ER-KO マウス (各群 30 匹程度) に対して、ストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内 (i.p.) 投与 (150mg/kgBw) する。

3) 手術および薬物投与: シヤム手術、卵巣摘除 (両側) およびエストロゲン (E2) 補充投与を行う。卵巣摘除後 1 ~ 3 か月間の観察を行う。麻酔はイソフルレンを用いる。E2 持続投与には薬剤徐放装置 (Silastic :Dow Corning Corp.) を用い、正常動物の基礎分泌 E2 濃度環境 (25 ~ 30pg/ml) を維持する。

4) 心機能低下の評価: 糖尿病性血管障害としての心臓リモデリングの評価の観点より循環動態・心機能・心微小循環動態の解析を行う。血圧、脈拍、心電図所見、心臓エコー検査の基本的指標。

5) 生化学的指標: 高感度 CRP, 総コレステロール値、HDL-C, LDL-C, 中性脂肪、LDL/HDL、lipoprotein(a), 血糖値、クレアチニン等。

6) 内皮細胞機能の指標: 血液凝固系: vWF, フィブリノーゲン, TXA2; 線溶系: tPA, PAI-1; 炎症: TNF-, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, IL-6; 血管トーン; 血管生理活性物質: endothelin-1 (ET-1), NO など。

4. 研究成果

我々の共同研究施設において、雌マウスの野生型 (WT) エストロゲン 受容体ノック

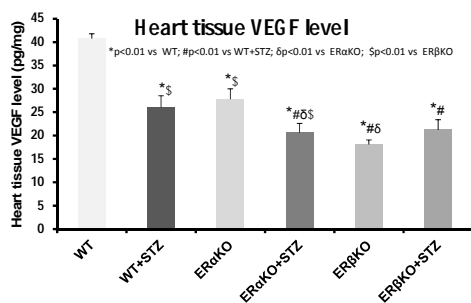
アウトマウス(ER KO)とエストロゲン 受容体ノックアウトマウス(ER KO)を繁殖させ、8週齢でSTZ (150 mg/kg, ip/日) を2回投与した。・野生型 (WT, n=15)・ストレプトゾトシン(STZ)投与マウス (WT+STZ, n=13) ・エストロゲン 受容体ノックアウトマウス (ER KO, n=12) ・ ER KO+STZ 投与マウス (ER KO+STZ, n=12) ・エストロゲン 受容体ノックアウトマウス (ER KO, n=12) ・ ER KO+STZ 投与マウス (ER KO+STZ, n=12)。以上の各群を設定した。

(1)心臓超音波検査:

野生型マウスでは、非糖尿病群との比較において、糖尿病心では拡張および収縮不全による心機能低下がみられた。ノックアウトマウスでは、ER KO、ER KO 共に、ある程度の心機能低下を認めた。ER KO では、糖尿病合併群における心機能低下の増悪が認められたが、ER KO では心機能の増悪は認められなかった。

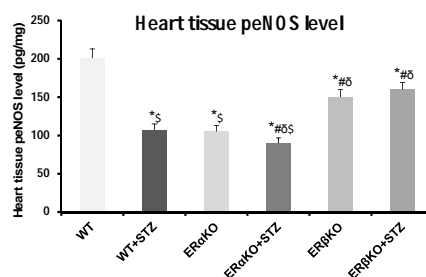
(2)心臓組織 VEGF レベル:

野生型マウスでは、糖尿病の誘発により、組織 VEGF 発現レベルは抑制/低下を示した。前回の我々の報告と同様、今回の研究でも、ER KO と ER KO の両方の心臓において、組織 VEGF 発現は野生型に比べ有意に抑制/低下を示した。本研究での特筆すべき所見として、ER KO マウスでは STZ の糖尿病誘発により、VEGF 発現の更なる抑制/低下が明らかであったが、この糖尿病誘発による組織 VEGF 発現低下の増悪は、ER KO マウスでは明らかではなかった。



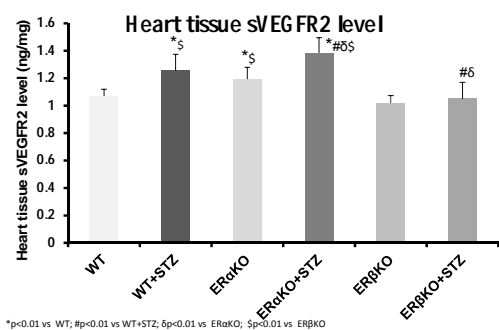
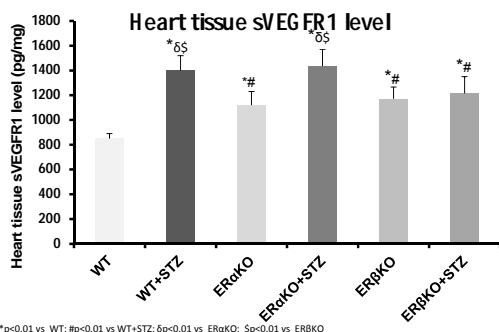
(3)心臓組織の血管新生系である VEGF シグナル伝達系における組織リン酸化レベル (peNOS):

eNOS は VEGF シグナル伝達系の下流に存在する重要な分子である。ラットでの研究と一致して、雌マウスの糖尿病心組織において、リン酸化 eNOS(peNOS)濃度は有意に抑制された。野生型マウスおよび ER KO マウスの心臓に比べると、peNOS 濃度は ER KO マウスで著しく低下していた。ER KO マウスにおいては非糖尿病群に比べ STZ 投与群では peNOS 減少の増悪を認めた。ER KO マウスにおいては、STZ 投与群および非糖尿病群間での peNOS 発現に相違は明らかではなかった。



(4)心臓組織の可溶性 VEGF 受容体 (sVEGFR1 および sVEGFR2) レベル:

今回のマウス実験では、ラットでの実験と一致して、心臓組織内の可溶性 VEGF 受容体発現レベルはリガンドである VEGF レベルと逆相関し、かつ雌糖尿病心における側副血行路形成障害と相関する傾向を示した。非糖尿病群に比べ糖尿病群での sVEGFR1 の有意な亢進/増加が ER KO マウスでみられた。ER KO マウスにおいては、非糖尿病群と糖尿病群とでは組織 sVEGFR1 発現レベルに有意差を認めなかった。この糖尿病誘発の有無による発現亢進差に関する ER KO と ER KO との差異については、sVEGFR2 でも同様であった。



(5) VEGF 関連血管新生系において、血管の成熟を促すために必要な心臓 Tie- 2 受容体のリン酸化レベル:

VEGF を介した血管新生により形成された血管の成熟 (maturation) には angiopoietin 1 と Tie-2 受容体間の相互作用が重要である。本実験では、心臓における Tie-2 受容体のリン酸化の濃度測定、および心臓 VEGF レベルの相関関係を調べた。

VEGF と同様に Tie-2 発現レベルは糖尿病心臓組織において有意な減少を示した。我々の発表論文 (*European Journal of Pharmacology*, 2010) の内容と一致して、Tie-2 の発現は ER KO と ER KO の両方の雌ノックアウトマウスの心臓において減少を示した。STZ 誘発性糖尿病を負荷された ER KO マウスでは、その心臓組織における Tie-2 発現は、非糖尿病群と比較して更に抑制/低下を示した。一方、ER KO マウスにおいては、Tie-2 は ER KO マウスの心臓において有意な減少を示したが、STZ 投与による更なる抑制/低下は認められなかった。

(6) 1 型糖尿病モデルエストロゲン受容体ノックアウトマウス研究のまとめ:

1. ER KO 雌マウスにおける心臓組織 VEGF 発現の抑制/低下は、糖尿病の合併により増悪を示した。ER KO マウスでは、糖尿病合併による VEGF 発現の抑制/低下の増悪は、明らかではなかった。

2. ノックアウトマウスでは心機能の低下が認められた。野生型で認められた糖尿病誘発による心機能の低下は、ER KO マウスでは明らかであったが、ER KO では認められなかった。

3. 血管形成の成熟を促す作用を有するリン酸化 Tie- 2 受容体の組織発現レベルは、組織 VEGF 発現レベルと平衡した変化を示した。

本研究の結果

紙面の関係にて要約文に記載。

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 3 件)

Akter S, Jesmin S, Iwashima Y, Hideaki S, Rahman MA, Islam MM, Moroi M, Shimojo N, Yamaguchi N, Kawano S, Mizutani T, Kawano Y. Higher circulatory level of endothelin-1 in hypertensive subjects screened through a cross-sectional study of rural Bangladeshi women. *Hypertens Res.* 38:208-12, 2015.

Mamun AA, Jesmin S, Rahman MA, Islam MM, Khatun T, Sultana SN, Moroi M, Yamaguchi N, Okazaki O, Kawano S. Innovation of a potential novel biomarker to predict the risk of developing diabetes in postmenopausal women based on the estrogen-VEGF axis. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 106:S152-S153, 2014.

Jesmin S, Mamun AA, Rahman MA, Md. Islam MM, Shimojo N, Sultana SN, Yamaguchi N, Okazaki O, Kawano S. Effects of diabetes on cardiac VEGF system in estrogen/estrogen receptor manipulated animal model. Diabetes Research and Clinical Practice. 106:S47-S48, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

Jesmin S, Mamun AA, Rahman MA, Islam MM, Shimojo N, Sultana SN, Yamaguchi N, Okazaki O, Kawano S. Effects of diabetes on cardiac VEGF system in estrogen/estrogen receptor manipulated animal model, 10th International Diabetes Federation- Western Pacific Region Congress (10th IDF-WPR Congress) 2014, Suntec, Singapore, November 21-24, 2014.

Mamun AA, Jesmin S, Rahman MA, Islam MM, Khatun T, Sultana SN, Moroi M, Yamaguchi N, Okazaki O, Kawano S. Innovation of a potential novel biomarker to predict the risk of developing diabetes in postmenopausal women based on the estrogen-VEGF axis, 10th International Diabetes Federation- Western Pacific Region Congress (10th IDF-WPR Congress) 2014, Suntec, Singapore, November 21-24, 2014.

Jesmin S, Rahman MA, Islam MM, Sohael F, Shimojo N, Sultana SN, Yamaguchi N, Kawano S, Okazaki O. Cardiac VEGF system in diabetic estrogen/estrogen receptor manipulated animal model, The 3rd International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis (ICLA 2014), Seoul, Korea, September 12-13, 2014.

Jesmin S, Rahman MA, Sohael F, Islam MM, Shimojo N, Khatun T, Sultana SN, Yamaguchi N, Kawano S. Role of estrogen receptors in

regulating VEGF signaling in female mice heart. The 3rd International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis (ICLA 2014), Seoul, Korea, September 12-13, 2014.

〔図書〕(計 1 件)

Jesmin S, A. Rahman, AA. Mamun, F. Sohael, S. Akter, Y. Iwashima, N. Shimojo, N. Yamaguchi, M. Hiroe, T. Mizutani, M. Moroi. Moroi.

Development of Therapeutic Strategy to Restore Coronary Microcirculation and VEGF Signaling Cascade in Diabetes: A novel approach to prevent cardiac complication in diabetes.

Advances in diabetes care, (pages 449-474, Apple Press, Canada), 2013.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 直人(YAMAGUCHI, Naoto)
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号: 40239900

(2) 研究分担者

荒井(ジェスミン)サブリーナ
(ARAI, Jesmin, Subrina)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号: 60374261