

高血糖と動脈硬化 ～マウスを用いた動物実験の成績から～

浅井 明^{1,2}¹日本医科大学大学院医学研究科内分泌糖尿病代謝内科学分野²東北大学大学院農学研究科食の健康科学ユニット

Hyperglycemia and Atherosclerosis: Experimental Results in Mice

Akira Asai^{1,2}¹Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Nippon Medical School Graduate School of Medicine²Food and Health Science Research Unit, Tohoku University Graduate School of Agricultural Science

Abstract

Epidemiological evidence indicates that patients with diabetes mellitus are at increased risk for atherosclerotic cardiovascular and cerebrovascular diseases. Furthermore, recent reports have demonstrated that the risk for atherosclerotic events is increased even in individuals in a pre-diabetic state, for example in those with impaired glucose tolerance. Although a number of studies have investigated the molecular mechanisms underlying the causal role of hyperglycemia (both chronic and transient) in the pathogenesis of atherosclerosis, little compelling evidence has been found *in vivo*. This article summarizes the potentials and pitfalls of using mouse models to study hyperglycemia-induced atherosclerosis in the hope of elucidating its complicated molecular mechanisms.

(日本医科大学医学会雑誌 2017; 13: 194-198)

Key words: atherosclerosis, diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, hyperglycemia, mouse models

1. はじめに

糖尿病が動脈硬化性疾患の重要な危険因子であることは今日では議論の余地のないところである。さらに近年では、糖代謝異常による動脈硬化性疾患発症リスクの増大が、2型糖尿病と診断される以前の耐糖能異常 (impaired glucose tolerance; IGT) の状態においてすでに認められることが、国内外の多くの疫学研究の結果から明らかとなってきた。このような背景か

ら、直近に改訂された「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017年版 (日本動脈硬化学会)」では、「糖尿病患者では細小血管障害のみならず動脈硬化性疾患発症予防を念頭に置いた患者管理が求められる」とされている¹。

糖尿病における慢性的な高血糖状態や IGT における血糖変動の繰り返しは、活性酸素種の産生亢進、生体分子の糖化変性、炎症性反応の惹起など、多岐にわたる動脈硬化惹起的な反応を誘発するものと考えられているが、実際に生体内でどのような作用機序が動脈

Correspondence to Akira Asai, Food and Health Science Research Unit, Tohoku University Graduate School of Agricultural Science, 468-1 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-0845, Japan

E-mail: akira.asai.b3@tohoku.ac.jp

Journal Website (<http://www2.nms.ac.jp/jmanms/>)

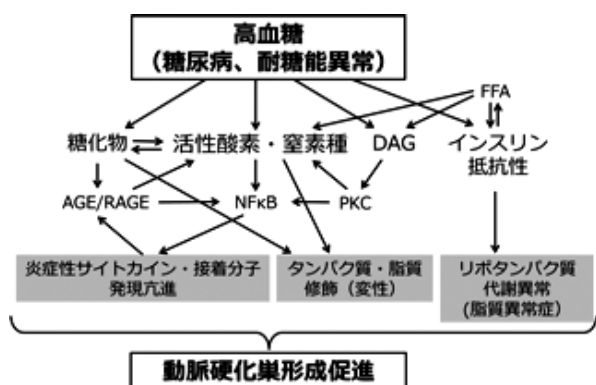


図1 高血糖状態が動脈硬化巣形成を惹起するに至る様々な推定経路

硬化巣形成亢進において中心的な役割を果たしているのかについては必ずしも明確でない(図1)。糖代謝異常が動脈硬化巣形成を惹起する生体内作用機序の解明は、その予防・治療戦略において不可欠な知見であり、今日に至るまで数多くの生体レベルでの基礎研究(モデル動物を用いた研究)がなされてきている。本稿では、モデルマウスを用いた糖代謝異常と動脈硬化との関係についての研究を中心に、これまでの知見を概説しつつ今後の課題を考えたい。

2. マウスを用いた動脈硬化研究における問題点

モデル動物を用いた生体レベルでの病理基盤研究においては、個体サイズの小ささやライフサイクルの短さ、飼育や繁殖の容易さに加えて、全ゲノム情報の解明、遺伝子改変技術の確立、さらには抗体、実験器具等の研究ツールの充実といった観点から、今日ではマウスが最も汎用される。動脈硬化研究においてもマウスを用いて盛んに研究が行われているが、動脈硬化研究においてはヒトとマウスとの脂質代謝(リポタンパク質代謝)の違いに注意が必要である。

余剰コレステロールの末梢組織から肝臓への輸送(reverse cholesterol transport; RCT)において、ヒトではHDL中のコレステロールエステルがコレステロールエステル転送タンパク質(cholesterylester transfer protein; CETP)の働きによってVLDLやLDLに移行し、主にLDL受容体によって肝臓に取り込まれる。一方、マウスやラットなどの齧歯類ではCETPを欠損しているため²、肝臓へのHDLの直接的な取り込みがRCTの大部分を担っている。したがってマウスの血中コレステロールの大部分はHDLコレステロールであり、動脈硬化巣形成において中心的な役割を担うnon-HDLコレステロール(LDLコレステ

ロールを含む)の血中濃度は非常に低い。このことから、通常の飼育条件下においては、野生型マウスでは動脈硬化巣の形成を全く認めない。

このような背景から、脂質代謝・動脈硬化研究のツールとして様々なリポタンパク質代謝遺伝子改変マウスが作出されており³、近年の動脈硬化研究においてはアポリポプロテインE(ApoE)欠損マウスやLDL受容体(LDLR)欠損マウスを用いることが主流となっている。ApoE欠損マウスやLDLR欠損マウスは顕著な高non-HDLコレステロール値を示し、比較的短期間(数週間~数カ月)で大動脈全体に動脈硬化巣の形成を認める。一方で野生型マウスでは、コレステロールとコール酸を添加した動脈硬化惹起飼料(Atherogenic diet; AD)を用いて長期間(数カ月~半年)飼育することによって、動脈硬化巣の形成を誘発できることが知られている。しかしその動脈硬化巣形成は心臓の大動脈弁周囲のみに局限され、マウスの系統間においても動脈硬化巣形成の感受性に差異が認められる⁴。

3. 糖尿病と動脈硬化：マウスを用いた成績と課題

マウスを用いた動脈硬化研究において、糖代謝異常、高血糖の影響を評価するモデルとしては、上述のApoE欠損マウスやLDLR欠損マウスの膝島β細胞をストレプトゾトシン(STZ)で破壊した1型糖尿病モデルや、レプチンシグナル異常による過食によって高度の肥満・インスリン抵抗性をきたす*db/db*マウスや*ob/ob*マウスとApoE欠損マウスやLDLR欠損マウスを交配した2型糖尿病モデルマウスが多用されている^{5,6}。これらのモデルマウスは顕性の糖尿病モデルであり(常に200mg/dLを超えるような血糖値の著高を認める)、多くの報告で高血糖による動脈硬化巣形成の亢進を認めているが、一方で糖尿病状態が動脈硬化巣の大きさに有意な影響を与えなかったとする報告も散見される。

これらのモデルにおいて糖尿病状態の影響が認められない場合、その最大の要因として考えられるのは、著しい血中コレステロール(non-HDLコレステロール)の高値である。ApoE欠損マウスやLDLR欠損マウスでは、しばしば1,000mg/dLを超えるような著しい高コレステロール血症を示し、そのほとんどが(LDLコレステロールを含む)non-HDLコレステロールである。このような状態においては、動脈硬化巣形成に寄与する因子として血中コレステロールの影響が圧倒的に大きくなり、動脈硬化巣形成も短期間で著し

表1 糖尿病と動脈硬化に関するヒトの病態とモデルマウスとの比較

	ヒト	モデルマウス
糖尿病発症時期		
1型糖尿病	小児～成人	若齢期
2型糖尿病	主に中年期以降	若齢期
インスリン		
欠乏	1型糖尿病	膵β細胞破壊 (STZ)
抵抗性	2型糖尿病	肥満モデル (<i>ob/ob</i> , <i>db/db</i> , 高脂肪食)
レプチン		
欠損	—	<i>ob/ob</i>
受容体欠損	—	<i>db/db</i>
高値・抵抗性	肥満	高脂肪食による肥満
リポタンパク質代謝		
CETP	あり	なし
Non-HDL コレステロール	100～250 mg/dL	ApoE 欠損や LDLR 欠損で 400～3000 mg/dL
ApoE	正常	欠損モデルあり
LDLR	正常 (FHで欠損)	欠損モデルあり
動脈硬化巣形成期間	数十年	数週間～数ヶ月

FH, 家族性高コレステロール血症
文献5をもとに改変

く進行するため、長期間にわたる血糖値の影響（コレステロールと比較すれば小さいと考えられる）を検出することが困難になる可能性が指摘されている^{7,8}。これらのモデルマウスを用いた糖尿病・動脈硬化研究において考慮すべき、糖・脂質代謝におけるヒトとマウスの違いを表1に示した。

4. 耐糖能異常と動脈硬化： 新規モデルマウスを用いた解析

上述のSTZ投与マウスや高度肥満 (*db/db* や *ob/ob*) マウスは、空腹時においても顕著な高血糖を示す顕性糖尿病のモデル動物であるが、IGTにおいてすでに動脈硬化性疾患発症リスクが増大することが疫学的に明らかとなってきたことから、より初期（軽度）の糖代謝異常が動脈硬化巣形成に及ぼす影響を評価しうるモデル動物の確立が期待される。

近年われわれは、高脂肪食投与後の耐糖能を指標としたマウスの選抜交配によって、耐糖能に明らかな差異を認める2系統のマウス〔耐糖能異常易発性 (SDG-P) および耐糖能異常抵抗性 (SDG-R)〕を確立した^{9,10}。SDG-P マウスは糖負荷試験においてヒトのIGTと同様の血糖変動を示す一方で、SDG-R マウスは正常耐糖能を維持する。したがって両系統のマウスは、耐糖能異常、2型糖尿病発症の病理基盤のみならず、初期（軽度）糖代謝異常が動脈硬化巣形成に与える影響の

評価においても有用なモデル動物となるものと考えられた。そこでSDG-P/R 両系統マウスをADで飼育した結果、実際にSDG-P マウスにおける動脈硬化巣の形成はSDG-R マウスと比較して明らかに亢進していた¹¹。

またわれわれは、IGTにおいて「血糖変動の繰り返し」そのものが動脈硬化巣形成に及ぼす影響をより直接的に評価するため、野生型マウス (C57BL/6) にグルコースを1日2回強制投与することによって血糖変動を誘発し、動脈硬化巣の形成が血糖変動のみによって著しく惹起されることを示した (図2)¹²。血糖変動の誘発による動脈硬化巣形成促進についてはApoE 欠損マウスを用いた既報があるが¹³、われわれの研究では著しい高コレステロール血症を示さない野生型マウスを用いることによって、血糖変動の影響をより明確に示す結果が得られた。

野生型マウスのリポタンパク質代謝を持つSDG-P/R やC57BL/6を用いて行われたこれらの試験においては、ADでの飼育下においても、血中コレステロールの著しい増加は認めず、non-HDL/HDLコレステロール比もほぼヒトと同程度であった。したがって結果的に、血中コレステロールの影響を最小限に、長期間の血糖値の影響をより正確に評価することができたものと考えられる。しかし一方で、これらの野生型マウスでは、動脈硬化巣の形成が大動脈周囲に限られることによる解析手法の限界や、ADを用いた飼育条

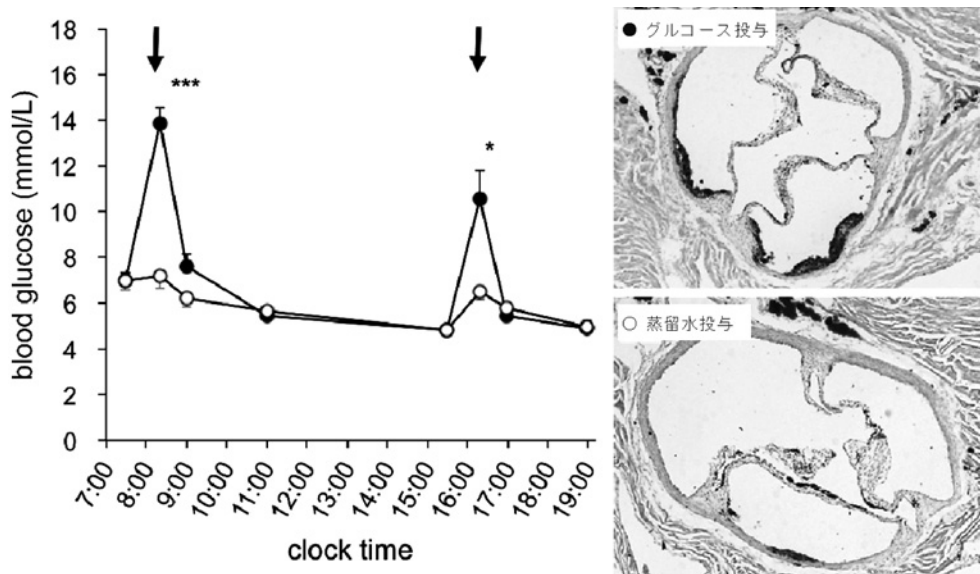


図2 グルコース投与による血糖変動の繰り返し（矢印）と大動脈弁部における動脈硬化巣形成の促進（文献12より改変）

件が生理的なコレステロール代謝状態とは言い難い（極度なコレステロール性の脂肪肝、胆石を認める）点にも留意が必要である。

5. おわりに

今日、糖尿病患者数の増加は世界的な問題となっており、今後もさらなる増加が見込まれることから、その合併症対策は焦眉の課題である。近年のDCCTやUKPDSといった糖尿病患者における大規模介入試験の追跡調査の結果は、糖尿病早期の介入期間における厳格な血糖コントロール（強化療法）が、介入終了後も長期にわたって、細小血管障害のみならず、大血管障害の発症をも抑制しうることを示している^{14,15}。この事実は“metabolic memory”や“legacy effect”と称され、糖尿病合併症としての動脈硬化性疾患の発症抑制において、その初期段階における血糖コントロールが重要であることを強く支持している。IGTや2型糖尿病初期といった早期の糖代謝異常が動脈硬化巣形成を亢進する作用機序の解明、さらにはその予防・治療方法の開発において、本稿で紹介したようなモデル動物を用いた基礎研究の成果が生かされることを期待したい。

謝辞：本稿で紹介したわれわれの研究は、及川眞一名誉教授、杉原仁教授の指導のもと、長尾元嗣、周東佑樹、川原百代の各氏をはじめ日本医科大学大学院内分泌糖尿病代謝内科学分野の方々の多大な協力を得て行われたもので

ある。また研究の一部は、JSPS 科研費、MSD、サノフィ、リリー、ロッセ重光学術賞の各研究助成を受けて行われた。ここに記して深謝いたします。

文 献

1. 日本動脈硬化学会編：動脈硬化性疾患予防ガイドライン2017年版。2017; p. 31.
2. Hogarth CA, Roy A, Ebert DL: Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003; 135: 71-81.
3. 島野 仁：トランスジェニックマウスを用いた脂質代謝・動脈硬化形成の解析。蛋白質核酸酵素 1994; 39: 2211-2221.
4. Paigen B, Ishida BY, Verstyuyft J, et al: Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 316-323.
5. Goldberg IJ, Dansky HM: Diabetic vascular disease: an experimental objective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1693-1701.
6. Wu KK, Huan Y: Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 2007; 191: 241-249.
7. Kanter JE, Johansson F, LeBoeuf RC, Bornfeldt KE: Do glucose and lipids exert independent effects on atherosclerotic lesion initiation or progression to advanced plaques? *Circ Res* 2007; 100: 769-781.
8. Chait A, Bornfeldt KE: Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia? *J Lipid Res* 2009; 50 (Suppl): S335-S339.
9. Nagao M, Asai A, Kawahara M, et al: Selective breeding of mice for different susceptibilities to high fat diet-induced glucose intolerance: Development of two novel mouse lines, Selectively bred Diet-induced Glucose intolerance-Prone and -Resistant. *J Diabetes Investig* 2012; 3: 245-251.
10. Nagao M, Asai A, Sugihara H, Oikawa S: Transgenerational changes of metabolic phenotypes

- in two selectively bred mouse colonies for different susceptibilities to diet-induced glucose intolerance. *Endocr J* 2015; 62: 371-378.
11. Asai A, Nagao M, Kawahara M, et al: Effect of impaired glucose tolerance on atherosclerotic lesion formation: An evaluation in selectively bred mice with different susceptibilities to glucose intolerance. *Atherosclerosis* 2013; 231: 421-426.
 12. Shuto Y, Asai A, Nagao M, et al: Repetitive Glucose Spikes Accelerate Atherosclerotic Lesion Formation in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 2015; 10: e0136840.
 13. Mita T, Otsuka A, Azuma K, et al: Swings in blood glucose levels accelerate atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 679-685.
 14. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/
Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study Research Group: Intensive diabetes treatment and cardiovascular outcomes in type 1 diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-year follow-up. *Diabetes Care* 2016; 39: 686-693.
 15. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al: 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359: 1577-1589.

(受付 : 2017 年 7 月 31 日)

(受理 : 2017 年 8 月 9 日)
