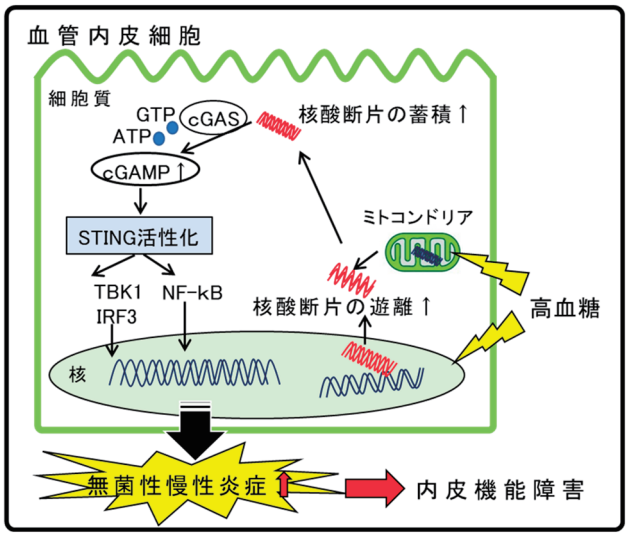
205　糖尿病による血管老化に起因する核酸障害と血管機能	福田　大受

【目的】生活習慣病などによって生じる血管の炎症が動脈硬化の基盤病態である。糖尿病は動脈硬化の最大の危険因子のひとつである。しかし、高血糖が血管における炎症を発症させる機序については十分に検討されたとは言えない。近年、過栄養や老化に伴う核酸障害によって遊離する自己由来の核酸断片が、本来であれば外来微生物由来の核酸断片を認識して生体防御に寄与する核酸受容体を活性化させ、炎症性疾患の発症に関与することが明らかになってきた。そこで本研究の目的は、細胞質内に存在する核酸受容体のひとつである stimulator of interferon genes（STING）が糖尿病性の血管内皮障害に関与するかどうかを検討し、糖尿病による血管障害の新規メカニズムとして核酸障害に関連したシグナルの関与を解明し、新規治療標的を探索することである。

【方法】糖尿病は生後８週齢のマウスにストレプトゾシン（STZ）を投与することによって誘導した。野生型（WT）マウスと *STING* 欠損（KO）マウスを用いた。血管における核酸障害は、大動脈における H2AX のリン酸化によって確認した。血管内皮依存性・非依存性の血管弛緩反応は、マウスから摘出した大動脈リング標本を用いて、それぞれアセチルコリンとニトロプルシドに対する反応性から評価した。STING アゴニスト（cGAMP）や STING アンタゴニスト（C-176）を用いて、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）や WT マウスから摘出した大動脈リング標本を刺激し、STING シグナルが血管内皮機能に与える影響を検討した。遺伝子発現は定量的 RT-PCR（qPCR）を、タンパク発現はウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

【結果】糖尿病を発症させることで、WT マウスの大動脈における STING の発現が増加した。また糖尿病によって、大動脈における H2AX のリン酸化が増加しており、大動脈において核酸障害が生じることが示唆された。WT マウスと *STING* KO マウスは STZ の投与によって、同程度の血糖値の上昇を認め、体重や脂質などの代謝パラメータにも差を認めなかった。両系統ともに糖尿病の発症によって血管内皮依存性血管弛緩反応は悪化したが、*STING* KO マウスの内皮依存性血管弛緩反応は、WT マウスと比べて保たれていた。内皮非依存性の血管弛緩反応には、両系統間で差を認めなかった。また、大動脈における eNOS のリン酸化は *STING* KO マウスでは、WT マウスと比較して保たれていた。*in vitro* 実験において cGAMP は HUVEC における *ICMA-1* や *VCAM-1* などの炎症性物質の発現を有意に増加させたが、C-176 の存在下では、その作用が打ち消された。さらに大動脈リング標本を用いた検討においても、cGAMP は、血管内皮機能を悪化させた。以上から、STING シグナルの活性化によって、血管内皮機能が悪化することが確認された。最後に、C-176 の投与を受けた糖尿病マウスにおいては、非治療群と比較して内皮依存性血管弛緩反応が保たれていた。この結果から、STING が糖尿病性血管内皮機能障害の治療標的になる可能性が示唆された。

概念図



205. 糖尿病による血管老化に起因する核酸障害と血管機能

福田　大受

*徳島大学 大学院医歯薬学研究部 循環器内科学

Key words：糖尿病性血管機能障害，炎症，血管内皮細胞，STING

緒　言

生活習慣病などによって生じる血管の炎症が動脈硬化の基盤病態である。糖尿病は動脈硬化の最大の危険因子のひとつであるが、高血糖が血管における炎症を発症させる機序については不明な点が多い。近年、我々を含む幾つかの研究グループが、過栄養や老化に伴って生じる核酸障害によって遊離する自己由来の核酸断片（cell free DNA、cfDNA）が、本来であれば外来微生物由来の核酸断片を認識して生体防御に寄与する核酸受容体を活性化させ、種々の炎症性疾患の病態に関与する事を報告している［1］。実際に我々は、肥満によって肥大化した脂肪細胞から遊離する cfDNA が、脂肪組織に存在するマクロファージの Toll 様受容体（TLR）9 を活性化することで肥満誘導性のインスリン抵抗の発症に関与することや、肥満患者の cfDNA 濃度が内臓脂肪面積やインスリン抵抗性と有意な正の相関を示すことを報告している［2］。また、TLR9 の活性化は動脈硬化の進展を促進することや、急性冠症候群患者の責任冠動脈から採取された血液中の cfDNA 濃度が、血管内光干渉断層法で観察された動脈硬化プラークの不安定性指標と正の相関を示すことを明らかにしている［3］。さらに、我々は、TLR9 以外にも、細胞質内に存在する核酸受容体である stimulator of interferon genes（STING）が、動脈硬化の進展に関与することを、臨床と基礎研究の両面から報告している［4］。しかし、高血糖によって生じる血管の炎症に、核酸障害や核酸受容体が関与するかどうかは検証されていない。そこで本研究の目的は、STING が糖尿病性の血管内皮障害に関与するかどうかを検討し、糖尿病による血管障害の新規メカニズムとして核酸障害に関連したシグナルの関与を解明することであった。今回の研究の結果によって、糖尿病に伴う核酸障害に伴って生じる STING の活性化が、血管内皮機能を低下させる事に加え、STING が糖尿病性血管障害の新規治療標的になる可能性が示された。

方　法

1. 実験動物

研究には生後 8 週齢の雄性の野生型（WT）マウスと *STING* 欠損（KO）マウスを用いた。糖尿病はストレプトゾトシン（STZ）の腹腔内投与によって誘導した。一部の糖尿病マウスは STING 阻害薬である C-176 の腹腔内投与を受けた。マウスの血糖値は血糖測定器で、その他の代謝パラメータの測定は外注検査を利用した。

2. 血管弛緩反応

各マウスから摘出した大動脈リング標本を用いて、血管内皮依存性血管弛緩反応はアセチルコリン（Ach）に対する血管反応として、また内皮非依存性血管内皮反応はニトロプルシド（SNP）に対する血管反応として評価した［5］。また STING シグナルが血管弛緩反応に与える影響を検証するため、STING アゴニスト（cGAMP）や C-176 で処理した大動脈リング標本（WT マウスから採取）を用いた。

*現在の所属：大阪公立大学 大学院医学研究科 循環器内科学

3. 細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた。STING シグナルの活性化にはアゴニストである cGAMP を、STING シグナルの阻害には C-176 を用いた。

4. 遺伝子発現・蛋白発現の定量評価

マウスの大動脈や HUVEC における遺伝子発現は定量的 RT-PCR（qPCR)、タンパク発現はウエスタンブロッティング法を用いて定量評価を行った。

5. 統計解析

2 群間の比較は Student's t-検定を、多群間比較は one-way ANOVA を用いて統計解析を行った。血管機能検査の評価は two-factor repeated measures ANOVA を用いて統計解析を行った。

結　果

1. 糖尿病は大動脈の STING 発現と核酸障害を誘導する

STZ の投与により WT マウスの血糖値は有意に上昇し、糖尿病が誘導された。糖尿病マウスの大動脈においては、*STING* の発現（図 1A）と核酸障害のマーカーである H2AX のリン酸化が増加した（図 1B)。これらの結果から、糖尿病条件下では、血管における STING 発現が増加するだけでなく、核酸障害が生じていることが明らかになった。

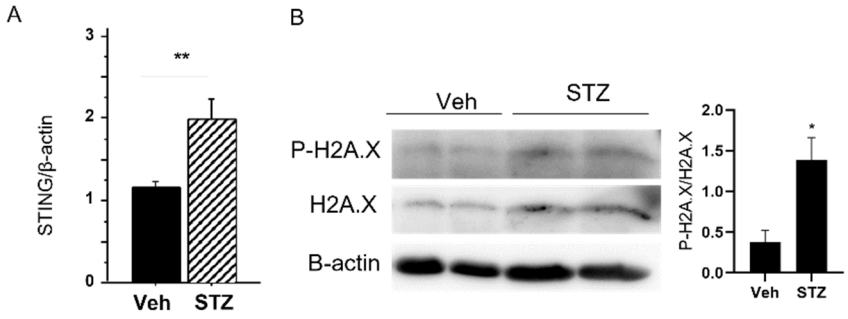


図 1. 糖尿病マウスにおける *STING* 発現と DNA 障害

A) 糖尿病マウスの大動脈では *STING* 発現が増加した。

B) 糖尿病マウスの大動脈では DNA 障害マーカーの 1 つである H2AX のリン酸化が増加した。統計処理は Student's t-検定で行った（*P＜0.05、**P＜0.01）。

2. *STING* の遺伝的欠損は糖尿病性血管内皮機能障害の発現を抑制する

STZ 投与によって、WT マウスと *STING* KO マウスは同程度に血糖上昇を認め（WT： 458±39 mg/dl vs. *STING* KO：463±38 mg/dl)、他の代謝パラメータにも差は認められなかった。非糖尿病マウスでは、WT マウスと *STING* KO マウスの間で血管機能に差を認めなかったが、糖尿病条件下では、WT マウスは、*STING* KO マウスと比較し、Ach 反応性の内皮依存性血管弛緩反応が有意に悪化していた（図 2A)。一方、SNP 反応性の内皮非依存性の血管弛緩反応は、両群間で差を認めなかった。また、内皮依存性血管弛緩反応に関与する $eNOS^{ser1177}$ のリン酸化は、糖尿病 WT マウスと比較して、糖尿病 *STING* KO マウスで保たれていた（図 2B)。これらの結果は、糖尿病条件下では、STING が血管内皮機能の悪化に関与することが示唆された。

3. STING の活性化は血管内皮機能を悪化させる

STING の血管内皮細胞機能に与える影響を検討するために、HUVEC に cGAMP を作用させる *in vitro* 実験を行った。その結果、cGAMP によって *ICAM-1* や *VCAM-1* などの炎症性物質の発現が有意に増え（図 3A）、内皮機能に関わる eNOS のリン酸化は有意に低下した。これらの変化は、STING 阻害薬の C-176 の存在下で軽減され、STING の活性化が血管内皮細胞機能を悪化させることが分かった。

次に我々は、STING が血管内皮機能に与える影響を検討するために WT マウスから採取した大動脈リング標本を用いた *ex vivo* 研究を行った。大動脈リング標本を cGAMP の存在下で培養し、血管弛緩反応を検討したところ、内皮依存性血管弛緩反応は有意に悪化したが、内皮非依存性の血管弛緩反応に影響は見られなかった（図 3B）。これらの結果は、STING シグナルの活性化が血管内皮機能の悪化に関与することを示している。

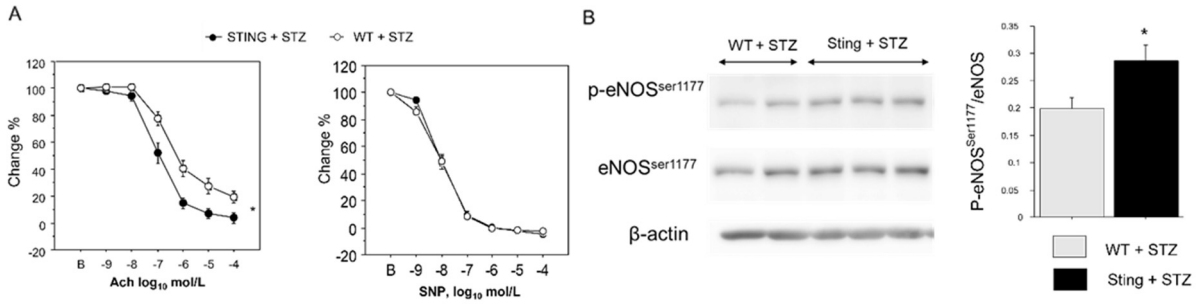


図 2. *STING* の欠損が血管機能に与える影響

A）糖尿病条件下では、WT マウスは、*STING* KO マウスと比較し、内皮依存性血管弛緩反応が有意に悪化した。統計処理は two-factor repeated measures ANOVA で行った（*P＜0.05）。

B）eNOS のリン酸化は、糖尿病 WT マウスと比較して、糖尿病 *STING* KO マウスで有意に高かった。統計処理は Student's t-検定で行った（*P＜0.05）。

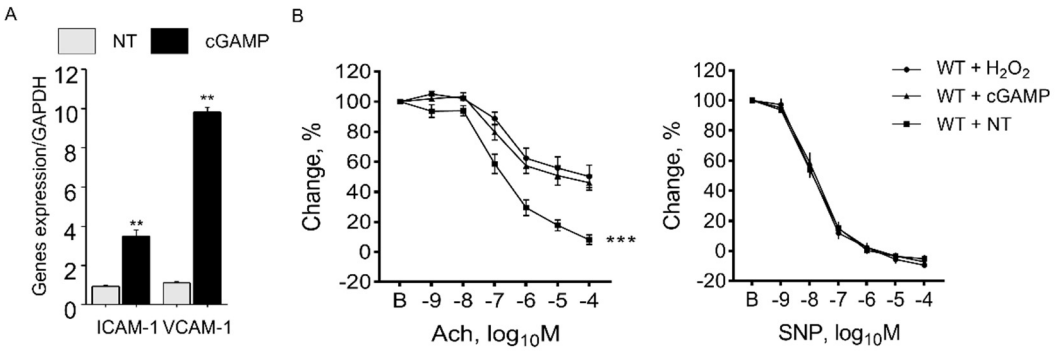


図 3. STING の活性化が血管内皮機能に与える影響

A） cGMAP によって血管内皮細胞における炎症性物質の発現が増加する。統計処理は Student's t-検定で行った（**P＜0.01）。

B） cGMAP によって血管内皮依存性血管弛緩反応が悪化するが、血管内皮非依存性の血管弛緩反応には影響がみられなかった。統計処理は two-factor repeated measures ANOVA で行った（***P＜0.001）。

4. STING 阻害薬は糖尿病性血管内皮障害の発現を抑制する

次に STING が糖尿病性血管内皮障害の治療標的となる可能性を検証するため、糖尿病を発症させた WT マウスに C-176 の投与を行った。その結果、糖尿病によって誘導された内皮依存性血管弛緩反応の悪化が、C-176 によって抑制されることが示された（図 4A）。さらに、糖尿病マウスの動脈においては、eNOS のリン酸化の低下を認めたが、C-176 の投与を受けたマウスの大動脈においては、eNOS のリン酸化が改善しており（図 4B）、糖尿病マウスにおける STING 阻害は、糖尿病性血管内皮機能障害を改善することが示された。

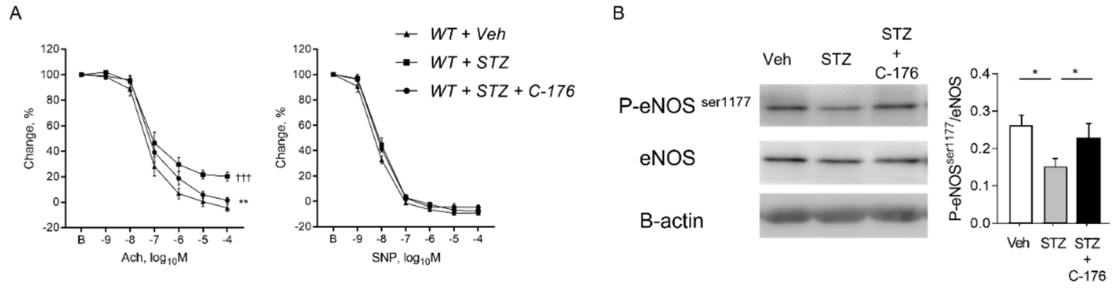


図 4. STING 阻害薬は糖尿病性血管内皮障害の発症を抑制する

A) 糖尿病マウスにC-176を投与することで、血管内皮依存性の血管弛緩反応の悪化が抑制された。血管内皮非依存性の血管弛緩反応に関しては影響がなかった。統計処理はtwo-factor repeated measures ANOVAで行った。**P＜0.01（STZ vs. STZ＋C-176）、†††P＜0.001（STZ vs. Veh）。

B) C-176投与を受けた糖尿病マウスの大動脈では、糖尿病によって低下したeNOSのリン酸化が改善した。統計処理はone-way ANOVAで行った。*P＜0.05

考　察

糖尿病は血管病の最大の危険因子の 1 つであり、血管病の予防は糖尿病患者の予後改善のための最重要事項である。糖尿病による血管内皮機能障害は、動脈硬化性疾患の初期段階であり、可逆的であるために、これまでから治療標的になりうることが示唆されてきた［6］。しかし、糖尿病によって血管内皮機能障害が生じる機序は十分に解明されておらず、治療方法も確立されていなかった。また近年の多くの基礎研究は慢性炎症が動脈硬化やインスリン抵抗性の基盤病態であることを示してきたが、高血糖がどのような機序で血管の炎症を引き起こすかは不明であった［7］。本研究では、高血糖によって生じる核酸障害を介した STING の活性化が、血管内皮細胞の機能を悪化させることを明らかにし、さらに STING シグナルの阻害薬が、糖尿病性血管内皮機能障害の発展を予防することを示した。

これまでから、自己核酸の障害に伴って生じる自然免疫系の活性化が、様々な炎症性疾患の病態に関与する事が報告されてきた。これらの報告は、主にマクロファージなどの炎症性細胞における核酸受容体の活性化で説明されてきた。しかし、血管内皮細胞は血管の内腔を覆っており、血流にのって運ばれてくる病原体由来物質と最初に接触する細胞でもある。よって、これまでにも血管内皮細胞におけるパターン認識受容体の発現とその機能が報告されてきた［8］。本研究では、これまでに検討されてこなかった血管内皮細胞における STING の機能に注目した検討であり、糖尿病性血管障害の新規メカニズムを明らかにしたことになる。

さらに本研究では STING の阻害によって糖尿病性血管内皮機能障害の悪化が抑制されることを示した。STING は本来、自然免疫を担い、自己防御に不可欠な役割を果たしている。よって長期間における全身的阻害は、易感染性などの副作用が生じる可能性がある。そこで、局所的かつ期間限定的に阻害をする、もしくは、

さらに関連シグナルを詳細に解析することによって、免疫機能には影響のない標的を発見するなどの工夫が必要であると考えられる。しかし、本研究は核酸障害に起因する自然免疫機構が生活習慣病関連の血管病に関与することを示したものであり、今後の発展が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部循環器内科学の佐田政隆教授である。長年にわたり多方面からご指導いただけましたことに心より感謝いたします。同教室の教室員の先生方、技術補佐員にもお礼申し上げます。

この度は、栄誉ある上原記念生命科学財団研究助成を賜り、大変光栄に存じます。理事長の上原明様をはじめ、選考委員の先生方、また、事務局の方々に心からお礼を申し上げます。

文　献

1) Fetterman JL, Holbrook M, Westbrook DG, Brown JA, Feeley KP, Breton-Romero R, Linder EA, Berk BD, Weisbrod RM, Widlansky ME, Gokce N, Ballinger SW and Hamburg NM. Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease. Cardiovasc Diabetol. 2016 Mar 31;15:53. PMID: 27036979 DOI: 10.1186/s12933-016-0372-y.

2) Nishimoto S*, Fukuda D*, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. (*; equally contribution) Sci Adv. 2016 Mar 25;2(3):e1501332. eCollection 2016 Mar. PMID: 27051864 DOI: 10.1126/sciadv.1501332.

3) Fukuda D*, Nishimoto S*, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, Sata, M. Toll-Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis. (*; equal contribution) J Am Heart Assoc. 2019 Apr 2;8(7):e010860. PMID: 30905257 DOI: 10.1161/JAHA.118.010860.

4) Pham PT*, Fukuda D*, Nishimoto S, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Takahashi Y, Sato T, Tanaka K, Suto K, Kawabata Y, Yamaguchi K, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimada K, Kanematsu Y, Takagi Y, Shimabukuro M, Setou M, Barber GN, Sata M. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: A link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases. (*; equal contribution) Eur Heart J. 2021 Nov 7;42(42):4336-4348. PMID: 34226923 DOI: 10.1093/eurheartj/ehab249

5) Pham PT, Fukuda D, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Shimabukuro M and Sata M. Rivaroxaban, a specific FXa inhibitor, improved endothelium-dependent relaxation of aortic segments in diabetic mice. Sci Rep. 2019 Aug 1;9(1):11206. PMID: 31371788 DOI: 10.1038/s41598-019-47474-0.

6) Bonetti PO, Lerman LO and Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Feb 1;23(2):168-75. PMID: 12588755 DOI: 10.1161/01.atv.0000051384.43104.fc.

7) Paneni F, Beckman JA, Creager MA and Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. Eur Heart J. 2013 Aug;34(31):2436-43. Epub 2013 May 2. PMID: 23641007 DOI: 10.1093/eurheartj/eht149

8) Amersfoort J, Eelen G and Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? Nat Rev Immunol. 2022 Sep;22(9):576-588. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35288707 DOI: 10.1038/s41577-022-00694-4