

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11036

研究課題名(和文) 終末糖化産物による血管障害防御因子に関する研究

研究課題名(英文) Protective factor against vascular disorder by advanced glycation end products

研究代表者

堀 隆光 (Hori, Takamitsu)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：00199522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の合併症に共通する重大なイベントとして血管障害があり、その起因物質の1つに終末糖化産物(AGEs)が挙げられる。しかしながら、その治療薬やAGEsの形成阻害剤などは未だ開発されておらず根本的な解決に至っていない。これまでに我々は、グアニンヌクレオチド変換因子であり、低分子量G蛋白質を活性化させるRasGRP2が血管内皮細胞に発現し、Rap1およびR-Ras経路を介してアポトーシスを抑制することを見出している。さらに本研究において、RasGRP2が両経路を介してAGEsによる血管透過性亢進を抑えることによって、血管障害の防御因子として働く可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の食生活や社会環境下において糖尿病を根絶することはほぼ不可能に近く、疾患そのものの克服だけでなく重症化予防についても目を向けて行かなければならない。今回の研究成果は、AGEsによる血管障害における防御メカニズムとして新たな知見を見出しており、糖尿病合併症による重症化を防ぐ画期的な予防薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Vascular disorder is a major event common to diabetic complications, and one of the causes is advanced glycation end products (AGEs). However, the therapeutic agents and AGEs formation inhibitors have not yet been developed and hasn't reached a basic resolution. So far, we have found that RAS guanyl nucleotide-releasing protein 2 (RasGRP2), a guanine nucleotide exchange factor, which activates small GTPases, is expressed in vascular endothelial cells and suppresses apoptosis via the Rap1 and R-Ras pathways. Furthermore, in this study, we clarified that RasGRP2 may act as a protective factor for vascular disorder by suppressing the vascular hyper-permeability caused by AGEs via both pathways.

研究分野：分子生物学

キーワード：AGEs 血管内皮細胞 グリセルアルデヒド 血管透過性 RasGRP2

1. 研究開始当初の背景

我が国の平成 28 年国民健康・栄養調査結果において、糖尿病有病者とその予備群は合わせて約 2,000 万人と推計されており、実に国民の 6 人に 1 人がこの疾患に関わっていることとなる。この数字は、現代の食生活や社会環境下において糖尿病を根絶することはほぼ不可能に近いことを意味しており、疾患そのものの克服だけでなく重症化予防についても目を向けて行かなければならない。糖尿病による主な死亡原因は、糖尿病合併症に共通する大血管障害、あるいは細小血管障害などの血管障害であり、その起因物質の 1 つとして終末糖化産物 (advanced glycation end-products; AGEs) が挙げられる。AGEs は、グルコースなどの還元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応 (メイラード反応) の後期段階で生成する構造体の総称であり、特に高血糖が持続する糖尿病では大量に生成される。体内で蓄積した AGEs は、その受容体である receptor for AGEs (RAGE) を介して細胞内にシグナルを伝達し、NADPH oxidase (NOX) の活性化によって活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を産生し、酸化ストレスを増加させる。そして、この酸化ストレスの増加が引き金となって血管障害を引き起こすことが知られている。しかしながら、未だ AGEs に対する有効な薬剤等は開発されておらず、重症化予防への道筋が立っていない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病の重症化予防の観点から血管内皮細胞に発現する RasGRP2 蛋白質に着目し、AGEs による血管障害において RasGRP2 の「防御因子」としての機能を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

不死化ヒト臍帯静脈内皮細胞の RasGRP2 安定過剰発現株 (R 株) およびその Mock 株 (M 株) を用いて、グリセルアルデヒド由来の toxic AGEs (TAGE) 処理による血管透過性への影響を解析した。血管透過性解析は蛍光標識デキストラン、細胞生存能解析は WST-8 および細胞内 ROS 解析は CellROX Green を用いた。また、TAGE による血管透過性亢進シグナル及び、RasGRP2 によるその抑制シグナルの阻害剤実験は ROS スカベンジャーである N-acetyl cysteine (NAC)、NOX 阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI)、および phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害剤である LY294002 (LY) を用いた。さらに、vascular endothelial (VE)-cadherin および zonula occludens-1 (ZO-1) タンパク質の発現や局在解析はそれぞれ Western blot 法や蛍光免疫染色法を用いた。

4. 研究成果

(1) RasGRP2 は、TAGE による血管透過性の増加を抑制する。

BSA 処理と比較して TAGE 処理では両株とも血管透過性が有意に増加したが、R 株では M 株よりその増加が有意に少なかった (図 1a)。このとき、両株とも BSA 処理と比較して TAGE 処理で細胞生存率を変化させなかった (図 1b)。さらに、BSA 処理と比較して TAGE 処理では両株とも細胞内 ROS レベルが有意に増加したが、R 株では M 株よりその増加が有意に少なかった (図 1c)。

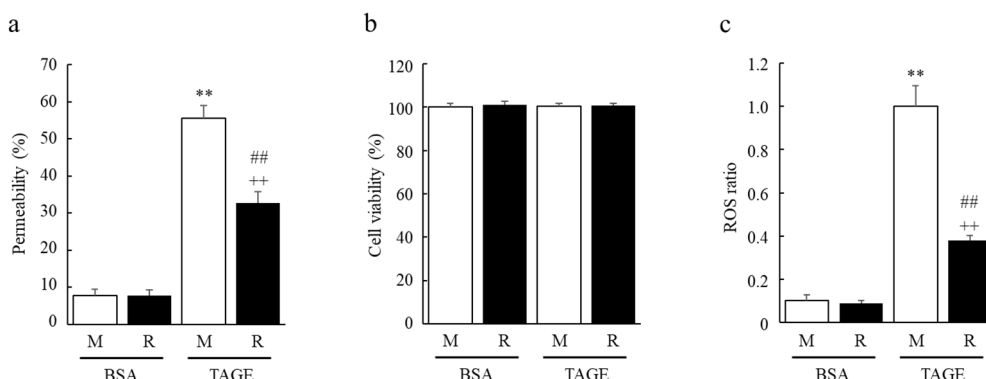


図 1. RasGRP2 による TAGE 誘導血管透過性亢進と ROS 産生の減少

(a) 血管透過性測定、(b) 細胞生存率測定、(c) 細胞内 ROS 測定

Data shown as the mean \pm SD (n = 3), **P < 0.01 compared with BSA-treated M cells, ++P < 0.01 compared with BSA-treated R cells, and ##P < 0.01 compared with TAGE-treated M cells.

(2) RasGRP2 は、TAGE によって誘導される ROS および非 ROS 経路を抑制することにより、血管透過性亢進を抑制する。

両株とも TAGE 処理による ROS の増加が、NAC 前処理によって解除されたが、DPI 前処理によって M 株は大幅に減少したのに対し、R 株では減少しなかった。さらに、DPI 前処理と比較して DPI + LY の同時処理は、両株とも有意な変化がなかった (図 2a)。

M 株において、TAGE 処理による血管透過性亢進は、NAC および DPI の前処理、DPI + LY の同時処理によって大幅に減少した。ただし、NAC+TAGE、DPI+TAGE および DPI + LY+TAGE の間に有意な差はなかった。一方、R 株において、どちらの前処理も TAGE 処理による血管透過性亢進を有意に変化させなかった。また、DPI + LY の同時前処理は TAGE の効果を有意に増加させた (図 2b)。

これらの結果は、ROS が TAGE による血管透過性亢進に関与しており、血管透過性に関連する ROS 経路が NOX のみに依存していることを示している。言い換えれば、TAGE による NOX 非依存性 ROS 産生は、血管透過性に影響を与えない。また、RasGRP2 は血管透過性に関連する ROS 経路を完全に抑制し、PI3K-Akt の活性化を通じて一部の非 ROS 経路に作用することを示している。

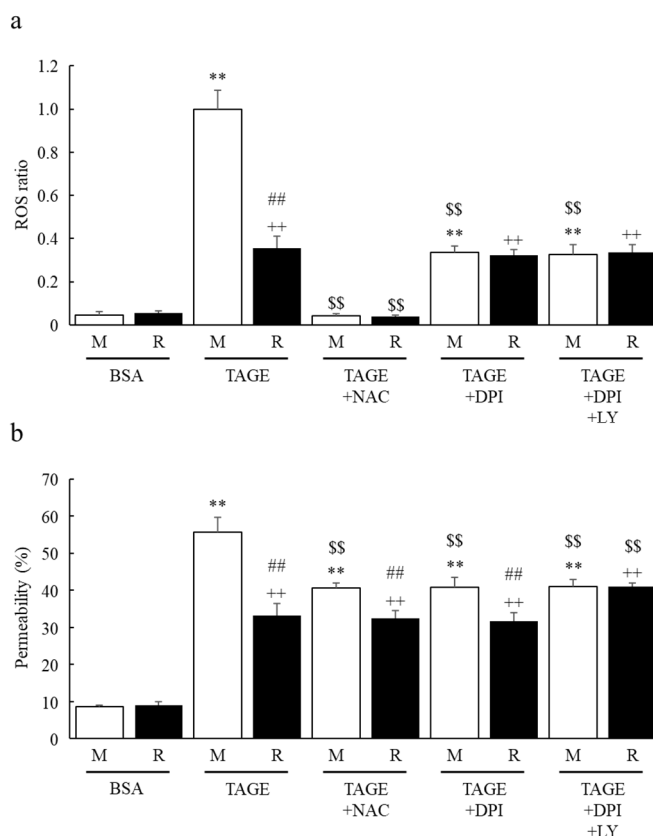


図 2. RasGRP2 による ROS および非 ROS 経路を介した TAGE 誘導血管透過性亢進の減少

(a) 細胞内 ROS 測定、(b) 血管透過性測定

Data shown as the mean \pm SD (n = 3), **P < 0.01 compared with BSA-treated M cells, ++P < 0.01 compared with BSA-treated R cells, ##P < 0.01 compared with each TAGE-treated M cells, and \$\$P < 0.01 compared with TAGE-treated cells alone.

(3) RasGRP2 は、TAGE による VE-cadherin 局在の乱れを保護する。

BSA 処理と比較して TAGE 処理では、両株とも VE-cadherin と ZO-1 のタンパク質発現量に変化していなかった (図 3a-c)。これらのタンパク質の局在は、免疫蛍光染色によって推定され、BSA 処理では両株とも細胞間接着部位に局在していた。TAGE 処理では、VE-cadherin の局在が、M 株で乱されたが R 株では乱されなかった。一方、ZO-1 の局在は、両株ともに乱された。さらに、阻害剤実験では M 株における TAGE による VE-cadherin 局在の乱れは、DPI 前処理によって保護されたが、ZO-1 局在の乱れは保護されなかった。DPI+LY の同時前処理でも同様の結果が得られた。一方、R 株では DPI 前処理による変化は見られなかったが、DPI + LY 同時処理では TAGE 処理単独と比較して VE-cadherin 局在のわずかな乱れが見られた (図 5)。

これらの結果は、RasGRP2 が TAGE による ROS 経路および非 ROS 経路を介した VE-cadherin 局在の乱れを保護することを示し、アドヘレンスジャンクションの安定化に影響を与えることを示唆している。

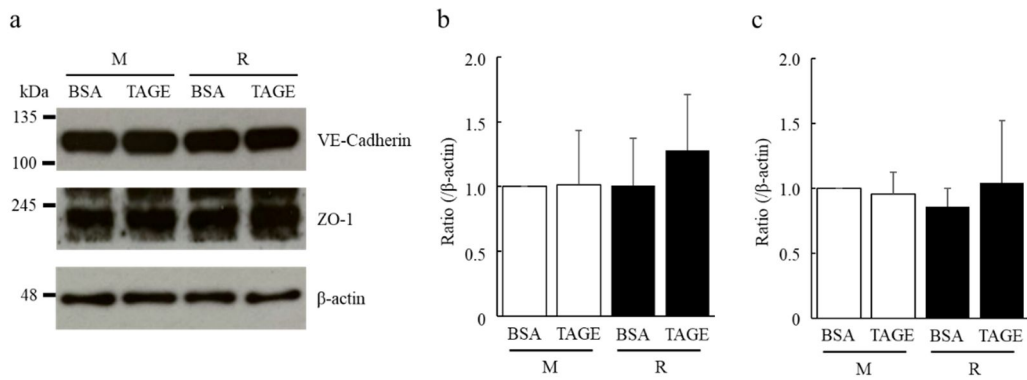


図 3. TAGE による VE-cadherin および ZO-1 タンパク質の発現
 (a) Western blotting、(b, c) VE-cadherin (b)および ZO-1 (c)のデンストメトリー分析
 Data shown as the mean \pm SD (n = 3).

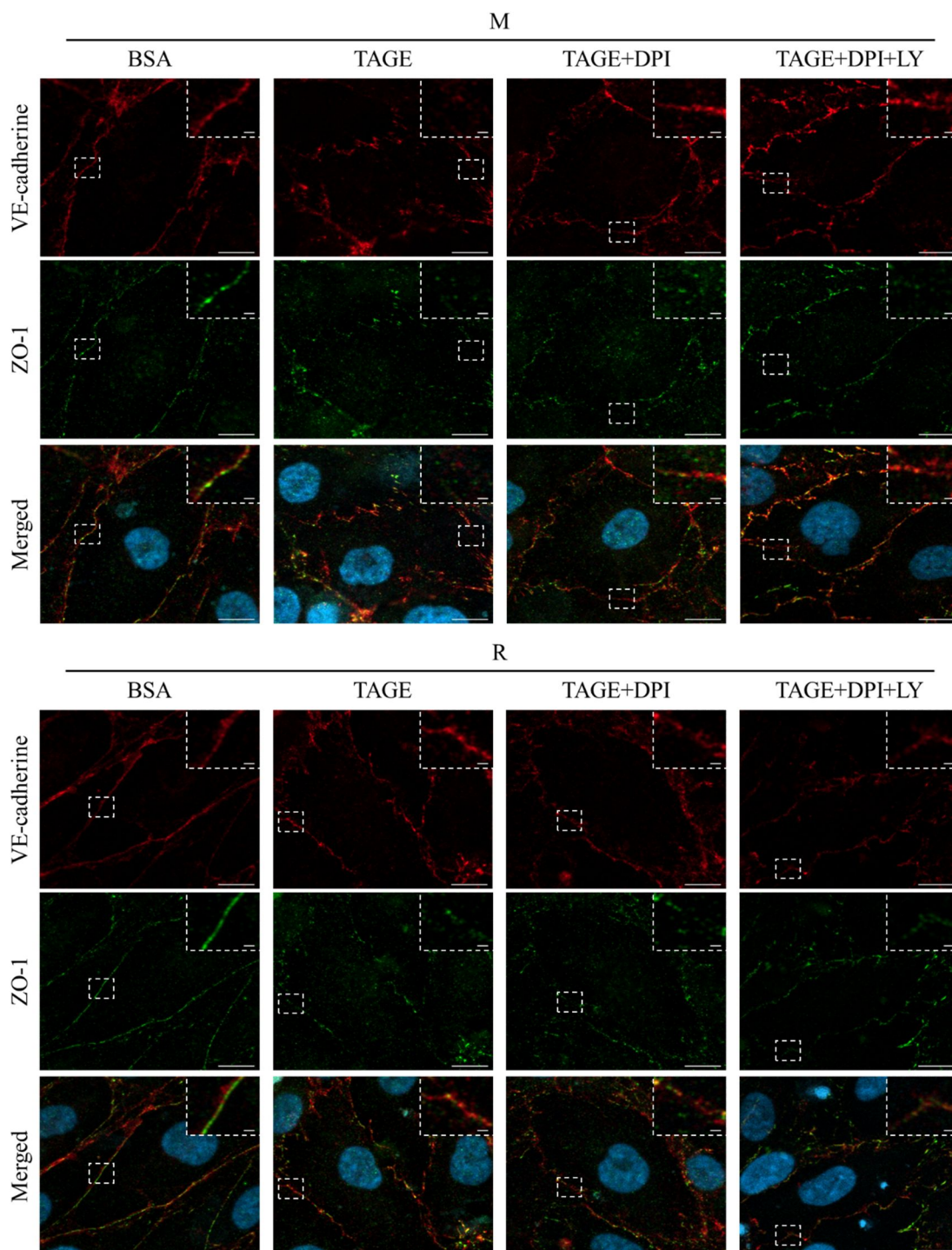


図 4. TAGE によって誘導された VE-cadherin 局在の乱れに対する RasGRP2 の保護効果
 VE-cadherin (red), ZO-1 (green), and merged, including nucleus (blue), images are shown.
 The dashed box indicates the enlarged area, which is shown in the upper right corner. Scale
 bar, 10 μ m. An enlarged area is shown for each image with a scale bar of 2 μ m.

(4) RasGRP2 は、Rap1 および R-Ras 経路を介して TAGE によって誘導される血管透過性亢進を抑制する。

コントロールと比較して Rap1 および R-Ras のノックダウンは、M 株の TAGE 処理による血管透過性亢進を増加させなかったが、R 株の TAGE 処理による血管透過性亢進を有意に増加させた(図 5)。この結果は、RasGRP2 が両方の経路に依存して血管透過性亢進を抑制することを示している。

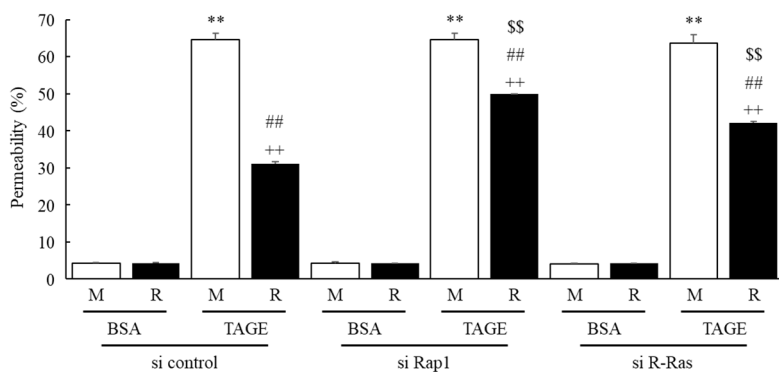


図 5. RasGRP2 の Rap1 および R-Ras 経路による TAGE 誘導血管透過性亢進の保護
 Data shown as the mean \pm SD (n = 3), **P < 0.01 compared with BSA-treated M cells, ++P < 0.01 compared with BSA-treated R cells, ##P < 0.01 compared with each TAGE-treated M cells, and \$\$P < 0.01 compared with each si control-treated cells.

以上の結果から、TAGE が ROS および非 ROS 経路などの複雑な経路を介してアドヘレンスジャンクションおよびタイトジャンクションを破壊することにより血管透過性を亢進し、RasGRP2 が Rap1 および R-Ras 経路を介してアドヘレンスジャンクションの乱れを保護することにより血管透過性亢進を抑制することを示した(図 6)。したがって、Rap1 と R-Ras の両方を活性化する RasGRP2 は、血管障害の防御因子として働く可能性が示唆された。

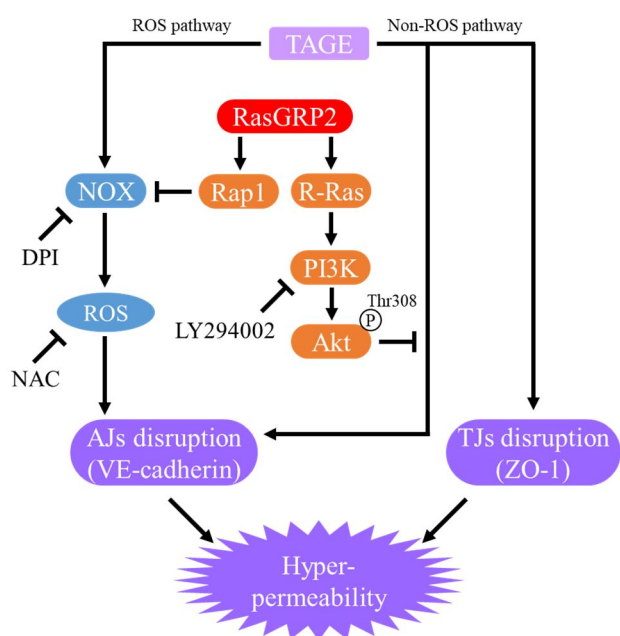


図 6. AGEs による血管透過性亢進において RasGRP2 の防御因子としての提案モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takino Jun-ichi, Sato Takuma, Kanetaka Takumi, Okihara Kasumi, Nagamine Kentaro, Takeuchi Masayoshi, Hori Takamitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 RasGRP2 inhibits glyceraldehyde-derived toxic advanced glycation end-products from inducing permeability in vascular endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82619-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takino Jun-ichi, Sato Takuma, Nagamine Kentaro, Hori Takamitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 The inhibition of Bax activation-induced apoptosis by RasGRP2 via R-Ras-PI3K-Akt signaling pathway in the endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53419-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Takuma, Takino Jun-ichi, Nagamine Kentaro, Nishio Kazuto, Hori Takamitsu	4. 巻 2019
2. 論文標題 RASGRP2 Suppresses Apoptosis via Inhibition of ROS Production in Vascular Endothelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Scientific World Journal	6. 最初と最後の頁 4639165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/4639165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takino Jun-ichi, Miyazaki Shouhei, Nagamine Kentaro, Hori Takamitsu	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of RASGRP2 in Vascular Endothelial Cells-A Mini Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金高匠、佐藤拓真、瀧野純一、長嶺憲太郎、竹内正義、堀隆光
2. 発表標題 TAGE (Toxic-AGEs) による血管透過性亢進に対するRasGRP2の影響
3. 学会等名 第59回 薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀隆光、佐藤拓真、長嶺憲太郎、竹内正義、瀧野純一
2. 発表標題 終末糖化産物による血管透過性亢進に対するRasGRP2の抑制
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓真、瀧野純一、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるRASGRP2によるオートファジーの抑制
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沖原香純、瀧野純、佐藤拓真、長嶺憲太郎、竹内正義、堀隆光
2. 発表標題 終末糖化産物による血管障害に対する防御因子の研究
3. 学会等名 第58回 薬学会中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧野純一、佐藤拓真、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるR-Ras-PI3K-Aktシグナル経路を介したRasGRP2によるBax活性化アポトーシスの阻害
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤拓真、瀧野純一、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるRASGRP2によるアポトーシス抑制経路の解析
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧野純一、佐藤拓真、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるRasGRP2のアポトーシス抑制機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀隆光、長嶺憲太郎、竹内正義、瀧野純一
2. 発表標題 終末糖化産物による血管透過性亢進に対するRasGRP2の影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧野純一、宮崎翔平、佐藤拓真、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞のオートファジーに対するRASGRP2の影響
3. 学会等名 第60回 薬学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋のどか、瀧野純一、宮崎翔平、長嶺憲太郎、堀隆光
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるRASGRP2による炎症関連遺伝子の抑制
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関