

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590855

研究課題名（和文） AMP kinase による抗動脈硬化作用の分子機序の解明

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of anti-atherosclerotic function of AMP kinase

研究代表者

長田太助（NAGATA DAISUKE）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：40393194

研究成果の概要：AMP kinase を恒常的に活性化すると低（無）酸素により誘導される血管内皮細胞のアポトーシスが抑制されることが示された。AMP kinase を活性化することが知られている各種糖尿病薬の血管保護作用の基盤になる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年			
度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：低（無）酸素、apoptosis、血管内皮細胞、分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

最終的に動脈硬化を惹起せしめるメタボリック症候群への対策は喫緊の検討課題である。最近、一般国民にも認知度が高くなってきた同症候群であるが、内臓脂肪蓄積がなぜ最終的に動脈硬化を高率に引き起こすのかを系統的に説明するには至っていない。一方、いわゆる”善玉”アディポサイトカインの代表格であるアディポネクチンやレプチンの作用機序のうち、一

部が AMP kinase (AMPK) を介すると報告されており、AMPK はメタボリック症候群による動脈硬化形成の鍵分子である可能性が指摘され、現在も注目されている。

2. 研究の目的

研究に汎用される AMPK の chemical activator である AICAR については非特異的な作用の存在が指摘されている。また従来報告のある 1 subunit の mutant 体は

サブユニットとの結合部位が欠落しており、本来の AMPK 活性化による生理的作用の大部分を観察できないため、近年 subunit の mutant などが使用されているが、薬剤で活性化されるキナーゼ活性と比肩できるほど強い活性を実現できなかった。そこで我々は 1 subunit の Threonine (Thr) 172 を Aspartic acid (Asp) に置換し、キナーゼ活性抑制部位 (inhibitory domain) のみを欠損し、subunit への結合部位を残した新規の AMPK constitutively active mutant (caAMPK) を作成した。この mutant 体を用いて特異的 AMPK の作用の観察が可能となった。

本研究により、AMPK の活性化により血管内皮保護作用を得られるか否かを明らかにする。これによってメタボリック症候群のターゲット分子の一つが明らかになり、効果的な動脈硬化抑制のための新規薬剤開発や、既存の薬剤 (チアゾリジン誘導体など) や適度な運動の抗動脈効果作用の理論的解明が可能になると期待される。

3. 研究の方法

主として Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) を用いて検討した。AMPK α 1 の自己抑制部位のみ欠失し Thr172 を Asp で置換した変異体を過剰発現する adenovirus vector (NcaAMPK) を構築して過剰発現用のツールとした。対照群として GFP を過剰発現できる adenovirus vector を、また一部の検討では従来使われていた caAMPK (CcaAMPK) を用いて比較検討した。また一部に dominant negative (dn)Akt を共発現させて Akt のシグナルを抑制する実験も実施した。通常酸素濃度で 40 時間おいた群と Anaerobic Chamber (Coy

Laboratory) で無酸素 40 時間処置した群を比較し、生細胞率 (WST-1 assay)、caspase 活性、アポトーシス関連蛋白について検討し、AMPK の血管内皮細胞保護作用を調べた。

4. 研究成果

無酸素群 / 通常酸素群で表した生細胞率は、CcaAMPK 過剰発現細胞では対照群とまったく変わりなかったが、NcaAMPK 過剰発現細胞では有意に高いことが確認された ($p < 0.01$: 図 1 参照)。また無酸素により対照群 (cont) ではカスパーゼ 3/7 活性は $171 \pm 20\%$ 上昇したが、NcaAMPK では $120 \pm 9\%$ に有意に抑制することが可能であった (図 2 参照)。

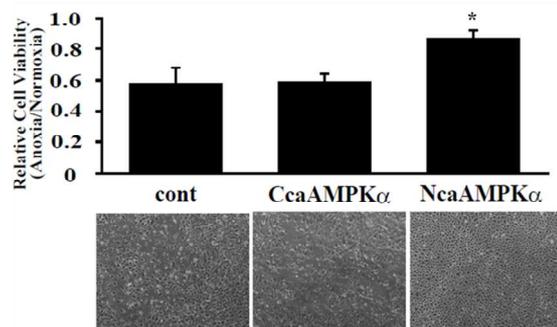


図 1 NcaAMPK は有意に生細胞率を改善

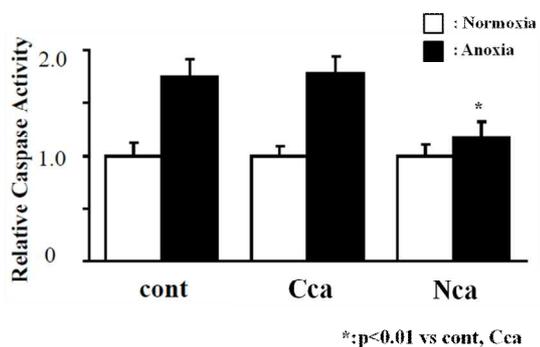


図 2 NcaAMPK は有意に caspase 活性を抑制した。

一方、NcaAMPK の過剰発現により caspase による PARP の cleavage は抑制されること

が示されたが、アポトーシス関連蛋白である Bcl-2 ファミリーの Bax, Bcl-xl に関して発現は不変であった。NcaAMPK は Akt リン酸化を増加させ、さらに Bad, FoxO1, FoxO3a のリン酸化を増加させたが(図3参照) dominant negative (dn) Akt の共発現でそれらは抑制された。

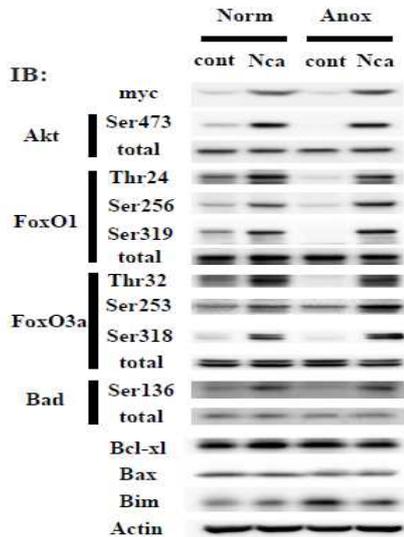
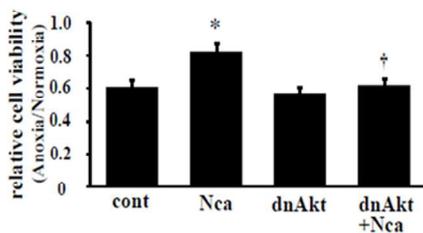


図3 NcaAMPK による Akt カスケード分子のリン酸化の変化

また dnAkt の共発現により NcaAMPK による生細胞率の上昇(図4参照)や PARP の cleavage の抑制は部分的に解除された(図5参照)。



*: $p < 0.01$ vs cont
†: $p < 0.01$ vs Nca

図4 dnAkt の共発現により NcaAMPK の細胞死抑制は解除される

HUVEC において AMPK の活性化は無酸素により誘導されるアポトーシスを抑制し

たが、それは Akt 活性化を介した作用である可能性が示された。

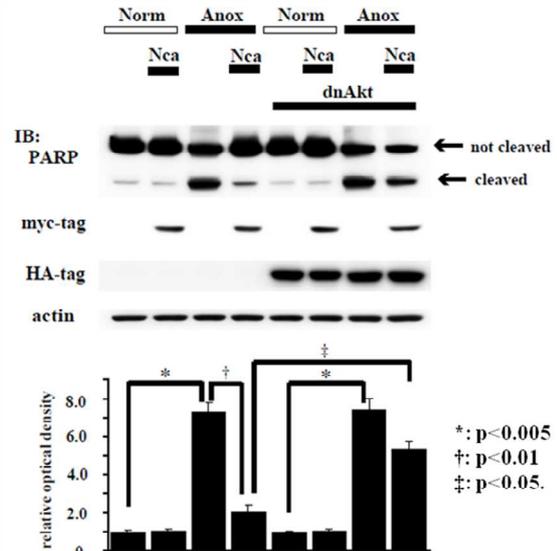


図5 dnAkt の共発現により NcaAMPK の caspase 活性抑制効果は部分的に解除される。

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2件)

Daisuke Nagata, Yasunobu Hirata, A new constitutively active mutant of AMP-activated protein kinase inhibits anoxia-induced apoptosis of vascular endothelial cell, Hypertension Research 32, 133-139, 2009 査読有

長田太助、平田恭信、アルドステロンによる催炎症作用と血管障害作用, Mebio 25, 44-53, 2008

[学会発表](計4件)

第8回 NO 学会学術総会(仙台:2008年5月9日)長田太助: AMP-activated protein kinase による低酸素誘導性血管内皮細胞アポトーシスの抑制機序の検討

The 62nd High Blood Pressure Research Conference 2008 (Atlanta, GA, USA:2008/9/17) Nagata D. AMP-activated protein kinase(AMPK) Inhibits Anoxia-induced Apoptosis of Vascular Endothelial Cell via Akt

Activation

第 31 日本高血圧学会学術総会（札幌：2008 年 10 月 10 日）長田太助：AMP キナーゼによる無酸素誘導性血管内皮細胞アポトーシス抑制作用の分子機序の検討

第 12 日本心血管内分泌代謝学会（東京：2007 年 11 月 29 日）長田太助：AMP activated protein kinase による無酸素誘導性血管内皮細胞アポトーシス抑制作用機序

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長田太助(NAGATA DAISUKE)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

平田恭信(HIRATA YASUNOBU)
東京大学・医学部附属病院・准教授