

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590823

研究課題名（和文）AMP キナーゼによるアルドステロン誘導性血管障害の抑制機序の解明

研究課題名（英文）The mechanism of inhibitory effect of AMP kinase for aldosterone-induced vascular damage

研究代表者

長田 太助（NAGATA DAISUKE）

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40393192

研究成果の概要（和文）：

Tet-On 発現システムを使い、血管内皮特異的に dominant-negative (dn) AMPK または constitutively-active (ca) AMPK を発現できるトランスジェニックマウス (TEK-rtTA/TRE-dnAMPK および TEK-rtTA/TRE-caAMPK) を開発した。ドキシサイクリン (DOX) 投与で目的の遺伝子を血管内皮特異的に発現誘導できる。DOCA 食塩処置した TEK-rtTA/TRE-caAMPK マウスの内皮依存性血管拡張反応は対象マウスに比して有意に増強していた。しかし L-NMMA の前投与で eNOS を阻害することによってそのような増強効果はほぼ完全に抑制された。一方 DOCA 食塩処置した TEK-rtTA/TRE-dnAMPK マウスでは内皮依存性血管拡張反応は対照マウスに比して有意に減弱していた。3 種類の DOCA-salt マウス (Wt, caAMPK, dnAMPK) の間で血圧に有意差はなかったことから、そのような内皮保護的な AMPK の作用は血圧には依存しないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded in creating vascular-endothelium-specific dominant-negative (dn) and constitutively-active (ca) AMPK transgenic mice using Tet-On expression system. In DOX-treated DOCA-salt TEK-rtTA/TRE-caAMPK mice, endothelium-dependent vasodilatation was significantly ameliorated compared to control DOCA-salt mice. L-NMMA pretreatment to inhibit eNOS completely canceled such ameliorating effect. Endothelium-dependent vasodilatation was significantly attenuated in DOX-treated DOCA-salt TEK-rtTA/TRE-dnAMPK mice than in control mice. The blood pressure levels of three types DOCA-salt mice (Wt, caAMPK, dnAMPK) were not different, suggesting that such endothelial-protective effect of AMPK was BP-independent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血管病態学

1. 研究開始当初の背景

アルドステロン(Aldo)は、心血管系病変のリスクファクターである。しかし、Aldoの心血管系組織に対する障害機序は未解明である。in vivoではMR拮抗薬にて血管炎症・線維化が有意に抑制されたが、MR拮抗薬で抑制できないAldoの催血管炎症作用があるとも報告されており、MR拮抗薬だけでAldoの作用は抑制できない可能性もある。

一方、メタボリック症候群(Mets)は内臓脂肪蓄積を最上流として、高血圧、耐糖能異常、脂質代謝異常を合併し、最終的に動脈硬化性疾患を発症する症候群であるが、内臓脂肪からのアディポカインが病態形成の主体をなしていることが明らかになってきた。“善玉”アディポカインであるアディポネクチン(ADN)は耐糖能を改善し、抗動脈硬化作用に働くが、MetSの病態では血中ADNは減少する。ADNは細胞膜上のレセプターに結合した後、AMPキナーゼと peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α を活性化する。ADNは多量体で大きな活性を示し、分解産物が活性を抑制することから臨床応用する場合に克服すべき課題が多い。我々はADNの下流のAMPKをMetSの病態を制御する鍵分子の一つと考え、AMPKの活性化が動脈硬化性病変形成抑制する可能性を示してきた。

我々は従来のRAS阻害薬、およびMR阻害薬では完全に遮断することが難しいAldo/MRによる血管炎症・血管障害をAMPKの活性化が効果的に抑制できる可能性があると仮説を立てた。

2. 研究の目的

AMP-activated protein kinase (AMPK)が抗動脈硬化作用を持つことが明らかとなってきたが、理論的にはAMPK活性化はMR活性化による血管障害をも抑制できる可能性もある。我々もそれを示唆する基礎実験データを持っているが、その分子機序は明らかではない。今回の研究では分子生物学的、発生工学的な手法を用いてこの機序を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

アルドステロン(Aldo)によるミネラルコルチコイド受容体(MR)の活性化およびその他の non-genomic な系を介して惹起される催

血管炎症反応を、どのようなメカニズムでAMPKは抑制するのか分子機序を検討した。in vitroの細胞培養系においてAdenovirus vectorでAMPKの恒常活性化型変異体(caAMPK)または優勢阻害型変異体(dnAMPK)を過剰発現させることでAMPK特異的な作用による血管炎症抑制機序について検討した。また、ドキシサイクリン(DOX)で血管特異的にcaAMPKを発現誘導可能なトランスジェニック(TG)マウスを用いてin vivoでの解析を実施し、生体内でのAMPKの役割を明らかにする。我々はTet on/offシステムによりドキシサイクリン(DOX)でcaAMPKを血管内皮特異的に発現誘導可能なダブルTGマウスを開発し(図1,2参照)、繁殖して研究に供した。

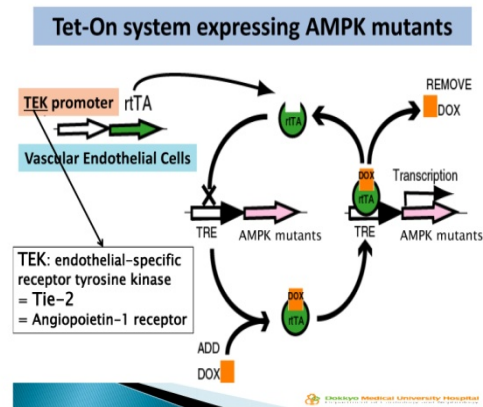


図 1

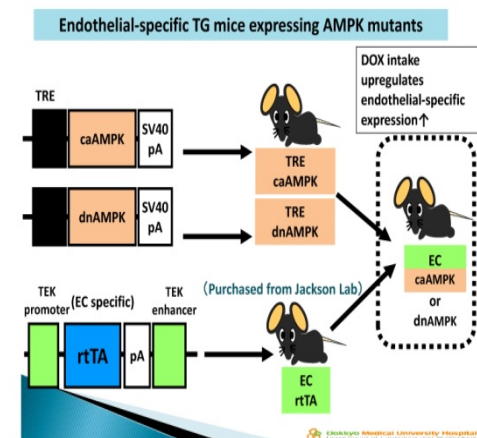


図 2

4. 研究成果

マウスの血管内皮に DOX 投与で caAMPK または dnAMPK を過剰発現させた条件と、DOX 投与した野生型マウス (対照群) との間で DOCA 皮下注射と生理食塩水投与を 4 週続けて内皮依存性血管拡張反応を比較した。最初に DOX 処置による内皮特異的発現を抗 AMPK α 抗体、抗 myc-tag 抗体を使った免疫染色にて確認したのち、以下のような検討をおこなった。野生型マウスと両 TG マウスに 4 週間 DOCA 食塩投与して血管内皮依存性血管拡張反応を測定する前にテールカフで血圧を測定したが、3 群間で統計的有意差はなかった。caAMPK DOCA・食塩マウスでは野生型と較べて有意に血管拡張反応が増強しており、逆に dnAMPK マウスでは血管拡張反応は有意に減弱していた (図 3, 4 参照)。caAMPK DOCA・食塩マウスの血管拡張反応の増強は L-NMMA 前投与で完全に消失した (図 5 参照)。AMPK の血管保護作用は eNOS-NO 系を介していることが示唆された。テルミサルタン、チアゾリジン誘導体など AMPK を活性化する薬剤の投与が caAMPK と同じ効果があるのか、その効果が dnAMPK マウスで消失するのかまで検討できなかった。しかし今回の検討でその可能性は十分あることが示せたので、今後引き続き薬剤投与の検討も予定通り実施していく予定である。また Aorta スライス標本において DAF-2DA で NO 放出を、APF で ROS を real time に観察する実験は現在引き続き実施している。また特異的な抗体を使った免疫染色、1) MAP kinase 系のリン酸化、2) NF- κ B 系 (IKK α β リン酸化、p65 リン酸化)、3) TGF- β 系 (Smad2/3 の Ser リン酸化)、4) 血管における eSelectin, ICAM-1, MCP-1, オステオポンチンの発現についても現在検討中である。

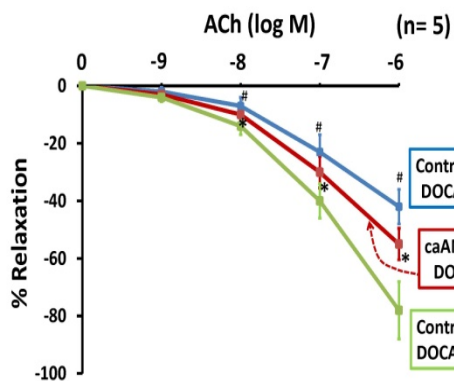


図 3

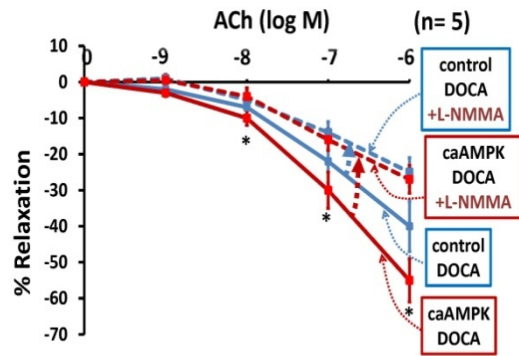


図 4

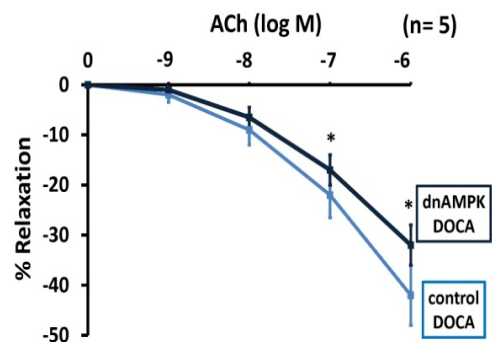


図 5

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1) 長田太助

Investigation of the Vascular Protective Function of AMPK in in vivo Models Using Endotheliumspecific AMPK Mutant Transgenic Mice

第 77 回日本循環器学会学術集会
2013 年 03 月 15 日
東京都

2) 長田太助

AMP キナーゼの血管保護作用の研究 -血管

内皮特異的 AMPK mutant transgenic mice を
用いた in vivo での検討

第 86 回日本内分泌学会学術総会
2013 年 04 月 12 日
仙台市

[その他]
ホームページ等
獨協医科大学 循環器・腎臓内科 長田研の
ホームページ
<http://plaza.umin.ac.jp/~renhtnd>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 太助 (NAGATA DAISUKE)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40393194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 君枝 (TANAKA KIMIE)
東京大学・保健センター・助教

研究者番号：30508065