

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790885

研究課題名（和文） 糖尿病性血管合併症における新規蛋白質 naofen の役割に関する研究

研究課題名（英文） Role of naofen, a novel WD40-repeat protein, in diabetic angiopathy

研究代表者

黄 磊（HUANG LEI）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00556095

研究成果の概要（和文）：糖尿病血管障害に酸化ストレス（ROS）の産生を増加させ、p38 MAPK の活性化を介してアポトーシスを誘導することが報告されている。本研究では糖尿病血管障害の発生における新規タンパク質naofenとの関与を調べた。高血糖によるnaofen発現増加には、ROSを介するp38 MAPKの活性化およびNF- $\kappa$ B活性化が関与する可能性があると考えられる。細胞内情報伝達系におけるnaofenの位置付けを検討することによって、血管障害の発生機序が解明に近づくことができると期待している。

研究成果の概要（英文）：High glucose was shown to elicit reactive oxygen species (ROS) production and induce apoptosis accompanied by activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). We have reported that naofen, a novel WD40-repeat protein, may mediate apoptosis through caspase-3 activation. The present study was undertaken to investigate the potential involvement of naofen in diabetic angiopathy. Our results indicate that enhanced expression of naofen in vascular endothelial cells in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, also in high glucose-treated rat arterial endothelial cells. Furthermore, ROS generation, p38 MAPK activation and NF- $\kappa$ B activation, may be involved in high glucose-induced increase in naofen expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

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：糖尿病、血管障害、酸化ストレス、p38 MAPK

### 1. 研究開始当初の背景

（1）糖尿病は、長期にわたる高血糖や種々の代謝異常により、全身の臓器に合併症を引き起こす疾患である。高血糖がもたらす合併症の発症・進展機序には、ポリオール代謝の亢進、酸化ストレスの亢進、protein kinase C (PKC) の活性化などが注目されている。しかも、これらの生化学的異常はそれぞれ独立に作用するのではなく、相互に関連しあいながら血管合併症を発症・進展させる。糖尿病

では血管内皮細胞の機能障害とともに、細胞接着因子の発現亢進などによって動脈硬化が進展することが知られている。

（2）我々は、新規タンパク質 naofen (WD repeat-containing protein 35, WDR35) をクローニングし、機能解析を行ってきた。Naofen は 1170 アミノ酸残基からなり、その N 末端に WD-repeat ドメインを四つ含有するタンパク質であることが明らかとなった。

WD-repeat ドメインは、グリシン-ヒスチジン (GH) から始まりトリプトファン-アスパラギン酸 (WD) で終わる約 40 個のアミノ酸を含有する機能ドメインである。WD-repeat ドメインを含有するタンパク質は、細胞の成長、増殖、細胞内シグナル伝達およびアポトーシスなどさまざまな細胞機能に重要な役割を果たしていると考えられている。近年、naofen に関する臨床研究では、naofen 遺伝子変異が短肋骨多指症候群、冠状動脈疾患およびセンセンブレナー症候群の発症に関与すると報告された。ところで我々は、CCl<sub>4</sub>およびLPSによる肝傷害モデルラットやストレプトゾシン (STZ) による糖尿病モデルラットにおける naofen の発現増加が、アポトーシスに関連する可能性のあることを報告してきた。

(3) 糖尿病において、アポトーシスは血管障害の成因や合併症の発症に関与する。特に長期にわたる高血糖状態では、血管内皮細胞からインターロイキン (IL) -1、IL-8 などの炎症因子を分泌し、シクロオキシゲナーゼ (COX) -2 を介した PGE<sub>2</sub> や PGI<sub>2</sub> 等の産生が亢進する。さらに、糖尿病血管障害の病態発症・進展に酸化ストレス (ROS) の産生を増加させ、p38 MAPK の活性化を介してアポトーシスを誘導することが報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) 糖尿病血管障害の病態発症・進展における naofen の役割を調べた。

(2) 細胞内情報伝達系における naofen の位置付けを検討することによって、血管障害の発生機序が解明に近づくことができると期待している。

## 3. 研究の方法

(1) 合成した naofen ペプチド蛋白質 (アミノ酸の配列: 459-473) を用いて、ウサギに免疫し、抗 naofen 抗体を作成・精製した。

(2) 糖尿病血管内皮障害における naofen の発現を調べた。

① Wistar ラットにストレプトゾトシン (60 mg/kg) を腹腔内投与し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病 (STZ) ラットを作成した。

STZ 誘発性糖尿病ラットモデルの腎臓組織において、抗 naofen 抗体を用いて、naofen の発現を調べた。

② ラット大動脈内皮細胞 (RAEC) において、高グルコース状態 (30 mM) で培養し、naofen の発現を調べた。

(3) 高血糖による ROS の亢進が naofen と関与するかどうかを確認するため、過酸化水素を培養細胞に投与し、naofen の発現を調べた。

(4) 種々の阻害薬を用いて、細胞内情報伝達系における naofen の位置付けを検討した。

## 4. 研究成果

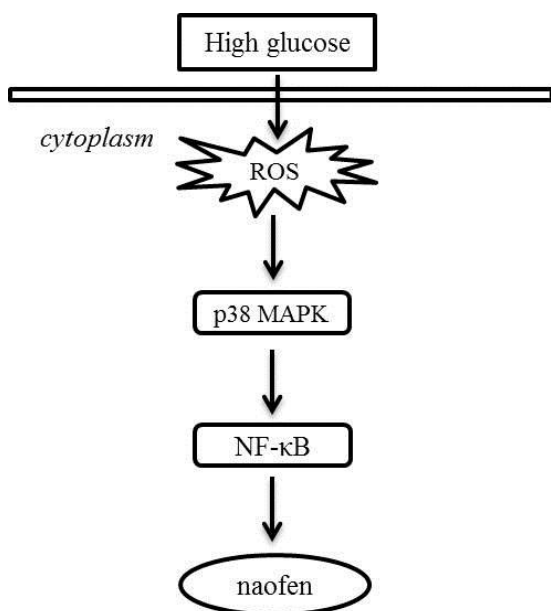
(1) STZ 誘発性糖尿病ラット腎臓組織において、抗 naofen 抗体を用いて免疫染色を実施し、腎血管内皮細胞の naofen 発現量を増加するという知見が得られた。

(2) 高グルコース培養したラット大動脈内皮細胞において、naofen mRNA の発現量が増加したことから、糖尿病血管障害の発生は naofen との関与することが考えられる。

(3) 高血糖による酸化ストレスの亢進が naofen と関与するかどうかを確認するため、過酸化水素を培養細胞に投与したところ、naofen の発現は増加した。抗酸化薬 EUK-8 および p38 MAPK 阻害薬 SB202190 の前投与は、過酸化水素によって誘導されたアポトーシスの発生を抑制したと同時に、naofen 発現の増加を抑制した。以上の実験結果から、細胞内情報伝達系における naofen の発現は、ROS を介する p38 MAPK シグナルの下流に存在することが確認された。

(4) ROS による naofen 発現増加に、p38 MAPK 下流で活性化される転写因子が関与するかどうかを検討した。NF- $\kappa$ B 阻害薬である APDC は、ROS による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し、同時に naofen の発現も抑制したことから、ROS による naofen 発現増加には、NF- $\kappa$ B 活性化が関与する可能性があると考えられる。本研究では、糖尿病血管障害の細胞内情報伝達系における naofen の位置付けを検討することによって、血管障害の発生機序解明に近づき、

糖尿病合併症の発症に対する治療薬の開発などに役立つものとなる。



#### 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5件)

(1) Koji Tsunekawa, Fumio Kondo, Teruhiko Okada, Guo-Gang Feng, Lei Huang, Naohisa Ishikawa, Shoshiro Okada. Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. BMC Neuroscience. 2013, 14(1):4. 査読有  
DOI : 10.1186/1471-2202-14-4

(2) Misako Harato, Lei Huang, Fumio Kondo, Koji Tsunekawa, Guo-Gang Feng, Jun-Hua Fan, Naohisa Ishikawa, Yoshihiro Fujiwara, Shoshiro Okada. Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. BMC Neuroscience. 2012; 13(1):149. 査読有  
DOI : 10.1186/1471-2202-13-149

(3) Koji Tsunekawa, Jun An, Lei Huang, Toshiaki Nonami, Tatsuro Koide, Fumio Kondo, Hiroshi Nishikawa, Tokutaro Miki, Satoru Sugiyama, Naohisa Ishikawa. Effects of 1-O-hexyl-2, 3, 5-trimethylhydroquinone in Carbon Tetrachloride-induced Hepatic Apoptosis with a Possible Relationship to Naofen. International Journal of Pharmacology. 2012; 8(5):434-439. 査読有  
DOI : 10.3923/ijp.2012.434.439

(4) Jun-Hua Fan, Guo-Gang Feng, Lei Huang, Koji Tsunekawa, Takashi Honda, Yoshiaki Katano, Yoshiki Hirooka, Hidemi Goto, Nobuhisa Kandatsu, Kazuo Ando, Yoshihiro Fujiwara, Tatsuro Koide, Shoshiro Okada, Naohisa Ishikawa. Role of naofen in apoptosis of hepatocytes induced by lipopolysaccharide through mitochondrial signaling in rats. Hepatology Research. 2012; 42(7):696-705. 査読有  
DOI : 10.1111/j.1872-034X.2012.00972.x

(5) Orapin Wongsawatkul, Guo-Gang Feng, Chang Li, Lei Huang, Fumio Kondo, Shuji Kurokawa, Yoshihiro Fujiwara and Naohisa Ishikawa. Effects of Naofen on Enzyme Activities of Serine Proteases and Matrix Metallo-proteinases. International Journal of Pharmacology. 2011; 7(3):388-393. 査読有  
DOI : 10.3923/ijp.2011.388.393

[学会発表] (計5件)

(1) 黄磊、Bupivacaine 処理 Neuro2a 細胞における WDR35 の発現に対する NF-κB の関与、第86回日本薬理学会年会、2013年3月21日、福岡市

(2) 馮国剛、黄磊、LPS を投与したラット肝細胞のアポトーシスに対するプロポフォルの保護作用、第86回日本薬理学会年会、2013年3月21日、福岡市

(3) 黄磊、Bupivacaine は Neuro2a 細胞における naofen (WDR35) 発現を増加させる---ROS を介する p38 MAPK 活性化との関連について、第21回日本 Cell Death 学会学術集会、2012年7月27日、名古屋市

(4) 黄磊、ブピバカインは Neuro2a 細胞における naofen 発現を増加させる、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都市

(5) 恒川幸司、黄磊、ドウモイ酸投与ラットの海馬における新規生体内物質 Naofen の役割、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都市

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/04.html#FS01>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黄 磊 (HUANG LEI)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00556095