

平成 26 年 4 月 8 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790265

研究課題名(和文) 糖尿病性血管障害におけるウリジンアデノシンテトラフォスフェートの生理的意義

研究課題名(英文) Pathophysiological role of uridine adenosine tetraphosphate in diabetic vasculopathy

研究代表者

松本 貴之 (Matsumoto, Takayuki)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30366835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：新規血管内皮由来収縮因子であるウリジンアデノシンテトラフォスフェート(Up4A)の糖尿病病態時における役割を明らかにするため、2型糖尿病モデルラット(GKラット)摘出動脈標本を用いてUp4Aの収縮反応とメカニズムを検討した。GKラット腎動脈においてUp4Aによる収縮反応増大が観察され、これにはP2受容体/cyclooxygenase/thromboxane受容体経路の異常が関与していることを明らかにした。本研究により、2型糖尿病時における血管機能障害においては、Up4Aの異常も関与すること、また、Up4A、トロンボキサン経路の是正が血管合併症の発症進展の抑止に繋がる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have assessed responses to Up4A, a novel endothelium-derived contracting factor, shown by renal arteries (RAs) from type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Up4A-induced contraction was greater in RA from the GK (vs. age-matched Wistar control). Inhibition of nitric oxide synthase increased the response to Up4A, whereas cyclooxygenase (COX) inhibition, antagonism of thromboxane (TX) receptor (TP) and P2 receptor decreased the response. In GK RA (vs. Wistar), COXs expression and TP agonist-induced contraction were greater, whereas the production of TXA2 by Up4A did not differ between groups. Our data indicate that the Up4A-induced contraction is closely associated with activation of COX/TP receptor axis. Clarifying the signal transduction and control of vascular tone by Up4A may be of significance to understanding the pathophysiology and advancing treatment of diabetes-associated vascular complications.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：糖尿病 血管機能障害 血管平滑筋細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において糖尿病患者及びその予備軍は激増し、重大な社会問題にまで発展していることが知られている。糖尿病は、インスリン依存性糖尿病 (1 型糖尿病) と、インスリン抵抗性を主徴とした (2 型糖尿病) に大別され、そのいずれも合併症を誘発し quality of life (QOL) を著しく低下させる。

国内外の多角的な研究によって、血糖コントロールに対する予防・治療戦略はめざましい進歩が見られることは周知の事実であるが、血糖をコントロールしたのみでは、合併症の発症・進展を完全に抑止できないことも重大な問題であり、そのメカニズム解明を含めて解決が急務となっている。糖尿病性合併症の病理学的特徴は血管機能障害であり、特に、血管内皮細胞の機能不全がその根底にあり、この機能を改善することが、糖尿病性合併症の発症・進展の抑止に重要であると考えられているが、糖尿病病態時における内皮機能障害メカニズム及び血管平滑筋細胞とのクロストークのメカニズムに関しては、完全に明らかとはなっていないのが現状である。

血管内皮細胞は、様々な因子を放出することで、血管緊張性を巧みに調節している。内皮由来因子として弛緩因子(EDRF)や収縮因子(EDCF)が知られており、申請者は、糖尿病病態時における内皮由来因子シグナルの変調をこれまで明らかとしてきた(Matsumoto T, et al. Am J Physiol. 2003;285:H283-91; Am J Physiol. 2004;287:H1064-71; Am J Physiol. 2005;289:H2234-43; Am J Physiol. 2005;289:H1933-40; Am J Physiol. 2007;293:H1480-90; Free Radic Biol Med. 2007;42:993-1007; Am J Physiol. 2008;295:H1165-76; J Pharmacol Exp Ther. 2009;329:324-34; Am J Physiol. 2009;296:H1388-97)。

ウリジンアデノシンテトラフォスフェート (Up<sub>4</sub>A) は、Jankowski 等によって、発見された新規 EDCF であり(Jankowski et al., Nat Med. 2005;11:223-7)、その構造として、プリンとピリミジンをもつユニークな dinucleotide である(Figure 1)。これまで、Up<sub>4</sub>A の種々の血管(腎、肺、胸部)における反応性

の変化は報告されていたが(Jankowski et al., Nat Med. 2005;11:223-7; Gui et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; Linder et al., Vascu Pharmacol. 2008;48:202-7; Hansen et al., Acta Physiol. 2010;200:171-9; Tolle et al., Br J Pharmacol. 2010;161:530-40)、病態時における反応性に関する報告は皆無であった。申請者は、最近、DOCA-salt 高血圧モデルラットにおける Up<sub>4</sub>A の反応性の血管部位における変化について世界に先駆けて明らかとした(Figure 1) (Matsumoto T, et al. Am J Physiol. 2011;301:H409-17; Pharmacol Res. 2012;65:81-90; Advances in Pharmacological Sciences. (Review) 2011;2011:435132)。しかしながら、糖尿病病態時における Up<sub>4</sub>A の反応性の変化ならびにそれに関連した分子メカニズムについては全く明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

糖尿病モデル動物を用いて、Up<sub>4</sub>A の糖尿病時における血管反応性の変化並びに、その情報伝達機構を明らかとすることを目的とする。血管は、全身にくまなく分布し、特に、動脈における収縮・拡張機構は、その部位によって異なることが知られており、また、糖尿病性合併症は、全身性に生ずることが知られているため、様々な部位の動脈における Up<sub>4</sub>A の血管反応性・分子機構を明らかとすることで、Up<sub>4</sub>A の糖尿病性合併症に対する生理的意義を理解することを目的とする。具体的には、1)薬理的・生理学的手法を用いて、Up<sub>4</sub>A の直接血管作用(収縮・弛緩)、さらには、内皮細胞・平滑筋細胞のクロストークとの関連を明確にするため、内皮細胞除去標本や、各種内皮由来弛緩因子の阻害条件下[一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害、cyclooxygenase(COX)阻害、内皮由来過分極因子阻害等]にて検討を行うこれにより、各動脈において Up<sub>4</sub>A 収縮においてどの程度内皮細胞由来因子が寄与しているかが明確になると思われる。また、これまでの報告によって、Up<sub>4</sub>A は、様々な血管緊張性調節分子に影響を及ぼすことが知られているので(Matsumoto T, et al. Advances in Pharmacological Sciences. (Review) 2011;2011:435132)、糖尿病病態下におけるこれらの分子の関与について、選択的活性化薬や阻害薬を用いて検討する。2)生化学・分子生物学的手法を用いて、糖尿病病態下における Up<sub>4</sub>A による血管緊張性調節分子の変調を同定する。例えば、Up<sub>4</sub>A 刺激・無刺激の動脈における channel や kinases 等の活性を比較検討する。また、Up<sub>4</sub>A が結合しうる受容体(purinoreceptor)の発現・分布の同定を行う。これらのデータを総括的に考察することによって、Up<sub>4</sub>A の糖尿病病態時における生理的意義が明確になると考えられ、糖尿病性血管合併症に対する治療戦略に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

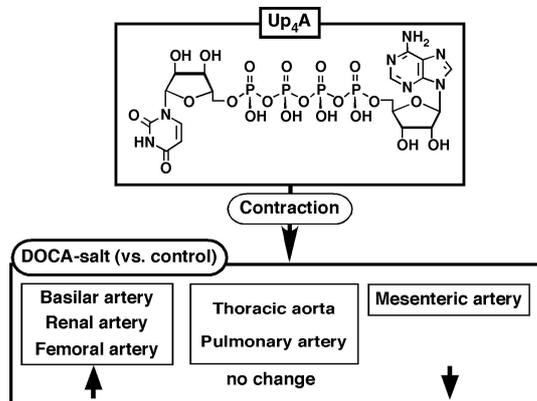


Figure 1. Up<sub>4</sub>A and Up<sub>4</sub>A-induced contraction in various arteries from DOCA-salt hypertensive rats.

慢性 2 型糖尿病モデルラットである、42-46 週齢の雄性 Goto-Kakizaki (GK)ラット (GK 群) 及び対照コントロールの Wistar ラット (対照群) より、頸動脈、大腿動脈、腎動脈を摘出し、リング標本作製して、定法に基づき Up<sub>4</sub>A、KCl、フェニレフリン (PE)、U46619 [トロンボキサン受容体 (TP 受容体) アゴニスト] の累積収縮反応を測定した。また、Up<sub>4</sub>A の収縮反応性における、シグナル伝達を探索するために、以下の阻害薬、アンタゴニストを累積開始 30 分前より処置した [NO 合成酵素阻害薬 (L-NNA)、COX 阻害薬 (indomethacin, VAS, NS309)、P2 受容体アンタゴニスト (suramin)、TP 受容体アンタゴニスト (SQ29548)]。腎動脈における COX-1、COX-2、P2 受容体蛋白発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。また、腎動脈における Up<sub>4</sub>A 刺激による TXA<sub>2</sub> 産生の検討は EIA 法を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

Up<sub>4</sub>A による収縮反応は、GK 群において、対照群と比較して、大腿動脈で減弱認められ、頸動脈では差が認められなかった。しかしながら、

腎動脈で増大が認められた (Figure 2)。腎動脈において受容体に依存しない KCl (10-80 mM) 及び PE による収縮反応は、GK 群と Wistar 群で同程度であった。NO 合成酵素阻害薬前処置によって Up<sub>4</sub>A の収縮反応は両群共に増強したが、依然、Up<sub>4</sub>A の収縮反応は GK 群にて増大していた。一方、COX 阻害薬、TP 受容体アンタゴニスト前処置によって、Up<sub>4</sub>A の収縮反応は両群共に抑制され、両群で反応の差が消失した。また、Up<sub>4</sub>A の反応は P2 受容体アンタゴニストで抑制された。Up<sub>4</sub>A 刺激による腎動脈における TXA<sub>2</sub> 遊離は両群で変化が認められなかったが、TP アゴニスト (U46619) による収縮反応は GK 群で感受性増大が認められた。COX-1 及び、COX-2 の蛋白発現は GK 群で対照群と比較して増加が認められたが、P2X<sub>1</sub> 及び P2Y<sub>2</sub> 受容体の発現は変化が認められなかった。

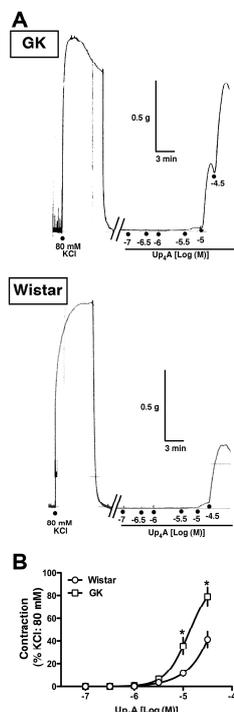


Figure 2. 摘出腎動脈におけるUp<sub>4</sub>Aの収縮反応

これらのことにより、GK 群による Up<sub>4</sub>A の収縮力の増大は、P2 受容体の活性化による血管収縮性 prostanoids を介したシグナル亢進が関与している可能性が示唆された。

現時点で、我々が知る限り、本研究で得られた結果は、2 型糖尿病病態時における Up<sub>4</sub>A の動脈における反応性を検討した初めての成果である。本研究で得られた結果は、Up<sub>4</sub>A による収縮反応が COX/TP 受容体のシグナルともクロストークしていることを初めて見出したものであり、COX/TP 受容体シグナルの異常は、糖尿病性血管機能障害に密接に関与していることから、Up<sub>4</sub>A シグナルを含めたこれらの異常の是正が糖尿病に関連した血管機能障害 (糖尿病性血管合併症) の、発症進展抑制に繋がる可能性がある。今後の更なる検討に期待する。

#### 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 3 件)

Matsumoto T, Watanabe S, Kawamura R, Taguchi K, Kobayashi T. Enhanced uridine adenosine tetraphosphate-induced contraction in renal artery from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats due to activated cyclooxygenase/thromboxane receptor axis. *Pflugers Arch.* 査読有 466, 2014, 331-42. DOI; 10.1007/s00424-013-1330-0.

Nemoto S, Matsumoto T, Taguchi K, Kobayashi T. Relationships among protein tyrosine phosphatase 1B, angiotensin II, and insulin-mediated aortic responses in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Atherosclerosis.* 査読有 233, 2014, 64-71. DOI; 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.032.

Matsumoto T, Watanabe S, Kawamura R, Taguchi K, Kobayashi T. Epigallocatechin gallate attenuates ET-1-induced contraction in carotid artery from type 2 diabetic OLETF rat at chronic stage of diabetes. *Life Sci.* 査読有 in press, 2014. DOI; 10.1016/j.lfs.2013.11.016.

[学会発表] (計 7 件)

松本貴之、渡邊駿、川村隆輔、名取世津子、森真里英、藤井真理子、松葉優矢、小林恒雄. 新規内皮由来収縮因子ウリジンアデノシンテトラフォスフェートの 2 型糖尿病ラット腎動脈における収縮反応性の変化. 第 55 回日本平滑筋学会総会. 2013 年 8 月 6 日-8 日. 旭川市大雪クリスタルホール.

Matsumoto T, Watanabe S, Kawamura R, Kobayashi T. Epigallocatechin gallate attenuates ET-1-induced contraction in carotid and thoracic aorta from type 2 diabetic OLETF

rat. Thirteenth International Conference on Endothelin. 2013年9月8日-11日. University of Tsukuba, Tokyo Campus.

渡邊駿、松本貴之、田口久美子、小林恒雄. 2型糖尿病ラット(GKラット)腎動脈における新規内皮由来収縮因子Up4Aの収縮反応とthromboxane A2シグナルの関連. 第57回日本薬学会関東支部大会. 2013年10月26日. 帝京大学.

松本貴之、渡邊駿、田口久美子、小林恒雄. Increased Up4A-induced contraction in type 2 diabetic renal artery due to activated COX/thromboxane receptor axis. 第87回日本薬理学会年会. 2014年3月19-21日. 東北大学、仙台国際センター.

松本貴之、渡邊駿、川村隆輔、金津智絵、鳥羽美貴子、新井隆三、上原千晶、佐川なつ実、山田浩介、田口久美子、小林恒雄. 2型糖尿病ラット摘出頸動脈におけるエンドセリン-1収縮に対するエピガロカテキンガレート慢性投与の影響. 日本薬学会第134年会. 2014年3月27日-30日. 熊本大学.

松葉優矢、松本貴之、渡邊駿、森真里英、名取世津子、川村隆輔、藤井真理子、小林恒雄. 2型糖尿病ラット摘出腎動脈におけるuridine adenosine tetraphosphateによる収縮反応の検討. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日-30日. パシフィコ横浜.

渡邊駿、松本貴之、松葉優矢、名取世津子、森真里英、藤井真理子、川村隆輔、小林恒雄. 2型糖尿病ラット摘出頸動脈におけるセロトニンによる収縮反応性の検討. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日-30日. パシフィコ横浜.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 松本 貴之  
(Matsumoto Takayuki)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30366835

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：