

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461110

研究課題名(和文) 糖尿病による心血管障害におけるROCKの役割：基礎から臨床へ

研究課題名(英文) Role of ROCK in diabetes-mediated cardiovascular disease: from bench to bedside

研究代表者

野間 玄督 (NOMA, KENSUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00379893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞実験および動物実験によって、高糖状態によりROCK活性が亢進、活性酸素種が増幅、血管内皮機能は低下するが、ROCK阻害薬によって、それらは改善することを確認した。臨床研究では、糖尿病においてROCK活性が亢進傾向を認めた。これらトランスレーショナル研究により、糖尿病患者においてROCKは治療ターゲットとなり得る可能性、また糖尿病により惹起される心血管疾患において有用なバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：From the results in endothelial cell and animal studies, we have found that high glucose inhibited endothelial function, and activated ROCK activity and ROS generation, all of which were reversed by administration of ROCK inhibitor. From the result in clinical study, ROCK activity was increased in diabetes patients compared to non-diabetes subjects. These results indicate not only that ROCK could be a therapeutic target in diabetes-evoked cardiovascular disease, but also that ROCK activity could be an useful biomarker of cardiovascular outcome in such patients.

研究分野：医歯薬学 循環器内科学

キーワード：ROCK 糖尿病 血管内皮機能 心血管障害

1. 研究開始当初の背景

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) は健常状態の内皮では二量体 (coupling) で存在し、一酸化窒素 (NO) の産生を介して心血管に保護的に作用する。一方で、eNOS は両刃の剣でもあり、生活習慣病下では eNOS が一量体 (uncoupling) で存在することで、NO を産生せずに活性酸素種 (ROS) を産生する。最近、平滑筋・内皮・心筋における Rho-associated kinase (ROCK) 活性の亢進が、炎症・動脈硬化・心肥大といった様々な心血管障害の発症や進展に重要な役割を担うことが報告されている。ROCK には 2 つの相同体があり、キナーゼドメインで 92% と高い相同性を持つために似た役割を果たすと考えられていたが、最近では ROCK1 と ROCK2 の機能的相違点が重要視されつつある。しかしながら、高血糖惹起による心血管障害における ROCK1 および ROCK2 の役割、また特に eNOS の uncoupling を介した酸化ストレスの増加にどのような機序で作用するのかは未だ明らかではない。

2. 研究の目的

ROCK1 および ROCK2 KO マウスより培養した内皮細胞を用いた in vitro 実験により、ROCK1 もしくは ROCK2 がどのような機序を介して高血糖による eNOS の uncoupling による ROS 産生を制御し、内皮機能障害と心血管障害に影響を及ぼすのかを検討する。また、ROCK 阻害剤投与前後の一型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン (STZ) 注入マウス、そして ROCK1 KO および ROCK2 KO マウスに STZ を注入したマウスにおける血糖、NO や ROS の産生、大動脈の eNOS の発現や ROCK 活性を評価することで、各 ROCK 相同体の eNOS の uncoupling に対する in vivo の役割を評価する。臨床研究では、内皮機

能や心血管疾患の予後を評価し、海外共同協力者・シカゴ大学の James K. Liao らと共同開発した新規抗体を用いて測定される白血球 ROCK 活性、そして静脈閉塞プレチスモグラフにより測定される血管 ROCK 活性が、糖尿病における心血管障害の治療マーカーとして有用であるかを検討する。

3. 研究の方法

1) ROCK1 および ROCK2 ノックアウトマウスより培養した内皮細胞を用いた in vitro 検討

A. 対象

遺伝子改変マウスであるシステムック ROCK1 ノックアウト (ROCK1^{+/-})、ROCK2 ノックアウト (ROCK2^{+/-})、およびコントロールマウス (WT)。

B. 方法

WT、ROCK1^{+/-}、ROCK2^{+/-} マウスより培養した内皮細胞を用いて、72 時間の高糖培養液に変更し、正常糖培養液と比較して eNOS の発現、eNOS の uncoupling (BH2、BH4)、ROCK 活性 (Western blot 法にて ROCK の下流蛋白である MBS のリン酸化の程度を評価 = phosphor-MBS / total-MBS)、NO と ROS の産生を ROCK 阻害剤投与の有無において評価し、培養液の高糖負荷による細胞障害における ROCK1 および ROCK2 の役割を検討する。

2) ROCK1 および ROCK2 ノックアウトマウスに STZ を注入した一型糖尿病モデル、そして二型糖尿病モデル (db/db マウス) を用いた in vivo 検討

A. 対象

WT、ROCK1^{+/-}、ROCK2^{+/-}に対して STZ (1000mg、2 回腹腔内投与の 2 週間後) を注入した一型糖尿病モデル、および二型糖尿病モデル (db/db マウス)。

B. 方法

STZ マウス、db/db マウスに対して ROCK 阻害剤ファスジルを 20mg/kg/day にて投与し、2 週間後に eNOS の uncoupling、ROCK 活性、NO と ROS 産生を評価。またマウス大動脈における血管内皮機能、および総頸動脈結紮 2 週間後の新生内膜の増殖を検討する。

3) 臨床研究において、血管内皮機能・ROCK 活性・心血管疾患の予後における検討

A. 対象

健常人群 50 例、明らかな合併症を有さない糖尿病群 100 例。

B. 方法

a) 静脈閉塞プレチスモグラフィ

ROCK 阻害剤ファスジルの前腕動脈内直接投与による前腕血流量 (FBF) の増加率 (%) をもって血管 ROCK 活性を評価する。また、アセチルコリン (ACh) の前腕動脈内直接投与の反応の程度をもって血管内皮機能を評価する。

b) 白血球 ROCK 活性 (Western blot 法: 現有設備)

海外共同協力者の James K. Liao と共同開発した抗体 (myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase; リン酸化抗体) を用いて末梢単核球における ROCK 活性を Western blot 法によって測定。この抗体の特異性が高いことは既

に確認している。また、血管と白血球における ROCK 活性が強い相関関係にあることも確認している。

c) Flow-mediated dilation (FMD)

5 分間の前腕駆血前後の血管拡張反応径を超音波にて観察して血管内皮機能を評価。

4. 研究成果

In vitro 研究では、高糖メEDIUM下において、内皮細胞における ROS 産生の亢進、NO 産生の低下、ROCK 活性の亢進、eNOS uncoupling の亢進を認め、ROCK 阻害剤ファスジルの投与によって、それらの改善を認めた。ROCK1^{+/-}および ROCK2^{+/-}マウスより培養した in vitro 研究は現在も進行中である。

In vivo 研究でも同様に、糖尿病モデルマウスにおいて ROS 産生の亢進、NO 産生の低下、ROCK 活性の亢進を認め、ROCK 阻害剤ファスジルの投与によって、それらの改善を認めた。

臨床研究では、非糖尿病患者と比して、糖尿病患者にて血管内皮機能の低下、血管 ROCK 活性の亢進、白血球 ROCK 活性の亢進を認め、現在も検討が進行中である。

また、in vitro 研究では外的 NO 製剤の投与によって血管平滑筋の ROCK 活性の亢進が抑制されること (PLoS One.2014)、臨床研究では安定狭心症患者における白血球 ROCK 活性の亢進を抑制させることをそれぞれ明らかにした (Hypertens Res.2015)、さらに原発性アルドステロン症患者における白血球 ROCK 活性が亢進しており、副腎腺腫摘出によって亢進した ROCK 活性が改善することも報告した (Hypertension.2015)。また急性心筋梗塞患者において、入院時の亢進した白血球 ROCK 活性が、心血管イベント、生命予後を予測する有用なバイオマーカーであることも明らかにした (Hypertension.2015)。

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) 全て査読有り。

1. Kishimoto S, Kajikawa M, Maruhashi T, Iwamoto Y, Matsumoto T, Iwamoto A, Oda N, Matsui S, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Goto C, Aibara Y, Nakashima A, Noma K, Higashi Y. Endothelial dysfunction and abnormal vascular structure are

- simultaneously present in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol.* 2017;231:181-187. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.01.024. 査読有り
2. Kajikawa M, **Noma K**, Nakashima A, Maruhashi T, Iwamoto Y, Matsumoto T, Iwamoto A, Oda N, Hidaka T, Kihara Y, Aibara Y, Chayama K, Sasaki S, Kato M, Dote K, Goto C, Liao JK, **Higashi Y**. Rho-associated kinase activity is an independent predictor of cardiovascular events in acute coronary syndrome. *Hypertension.* 2015;66:892-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05587. 査読有り
 3. Maruhashi T, **Noma K**, Iwamoto Y, Iwamoto A, Oda N, Kajikawa M, Matsumoto T, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Nakashima A, Goto C, Liao JK, **Higashi Y**. Exogenous Nitric Oxide Inhibits Rho-associated Kinase Activity in Patients with Angina Pectoris: a Randomized Controlled Trial. *Hypertens Res.* 2015;38:485-90. doi: 10.1038/hr.2015.24. 査読有り
 4. Matsumoto T, Oki K, Kajikawa M, Nakashima A, Maruhashi T, Iwamoto Y, Iwamoto A, Oda N, Hidaka T, Kihara Y, Kohno N, Chayama K, Goto C, Aibara Y, **Noma K**, Liao JK, **Higashi Y**. Effect of Aldosterone-Producing Adenoma on Endothelial Function and Rho-Associated Kinase Activity in Patients With Primary Aldosteronism. *Hypertension.* 2015;65:841-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.05001. 査読有り
 5. Maruhashi T, **Noma K**, Iwamoto Y, Iwamoto A, Oda N, Kajikawa M, Matsumoto T, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Nakashima A, Goto C, Liao JK, **Higashi Y**. Critical Role of Exogenous Nitric Oxide in ROCK Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One.* 2014;9:e109017. doi: 10.1371/journal.pone.0109017. 査読有り
- [学会発表](計 9 件)
1. **野間玄晝**、木原康樹、**東幸仁** . ” ROCK をターゲットとした心肥大 / 心疾患における治療戦略” 第 2 回 J-ISCP (国際心血管薬物療法学会日本部会) . 25-26 June 2016. 徳島, 日本.
 2. **野間玄晝**、木原康樹、**東幸仁** . ROCK 蛋白から斬った動脈硬化症：トランスレーショナル研究. 第 89 回日本薬理学会年会 . 9-11 Mar 2016. 横浜, 日本.
 3. **野間玄晝**、丸橋達也、木原康樹、**東幸仁** . 外因性 NO は ROCK 活性の抑制を介して心血管疾患を制御する：トランスレーショナル研究. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会. Oct 30 2015.10.30. 大阪, 日本.
 4. **野間玄晝**、木原康樹、**東幸仁** . 糖尿病と血管内皮機能. 第 49 回糖尿病学の進歩. 21-22 Feb 2015. 岡山, 日本.
 5. **Noma K**, Liao JK, Kihara Y, **Higashi Y**. Regulation of eNOS mRNA destabilization via ROCK2-mediated eEF1A1 phosphorylation 19th World Congress on Heart Disease. International Academy of Cardiology Annual Scientific Sessions. 25-28 Jul 2014. Boston, MA, USA.
 6. **Noma K**, Goto C, Kihara Y, **Higashi Y**. Clinical Impact of ROCK in Sustained Vasoconstriction in Patients with Essential Hypertension. 第 35 回日本循環制御医学会総会. 4-5 Jul 2014. 福岡, 日本.
 7. **野間玄晝**、木原康樹、**東幸仁** . ROCK Activity and Endothelial Function: Potential Candidates for Vascular and Anti-aging Biomarkers. 第 14 回日本抗加齢医学会総会. 6 June 2014. 大阪, 日本.
 8. **野間玄晝** , 木原康樹 , **東幸仁** . Destabilization of eNOS mRNA via ROCK2-mediated eEF1A1 phosphorylation. 第 3 回臨床高血圧フォーラム .24-25 May 2014, 広島, 日本 .
 9. **Noma K**, Goto C, Kihara Y, Liao JK, **Higashi Y**. Role of ROCK in sustained vasoconstriction in patients with essential hypertension. The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014). 14-17 Apr 2014 , 京都 , 日本 .
- [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

野間 玄督 (NOMA KENSUKE)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号：00379893

(2)研究分担者

東 幸仁 (HIGASHI YUKIHITO)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40346490

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

James K. Liao
シカゴ大学メディカルセンター
循環器科・教授