

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K09554
研究課題名(和文) 糖尿病によるストレス誘導性細胞老化のROCKによる制御：基礎から臨床へ橋渡し研究

研究課題名(英文) Role of ROCK in stress-induced cellular senescence on diabetes: 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・専門研究員

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)：内皮細胞の実験によって、高血糖におけるeNOSの発現は軽度亢進、eNOSリン酸化は低下、ROCK活性は亢進した。ROCK阻害薬の投与によって、eNOSリン酸化の低下、ROCK活性の亢進は軽減した。また高血糖によるストレス誘導性細胞老化へROCK、特にROCK2の強い関与が示唆されたが、結果が安定しないために、まだ多くの検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化の制御は人類の大きな夢、目的の一つであるが、糖尿病が老化を著しく促進する因子であることは既知である。現在、糖尿病の新規治療薬が次々と開発されるが、糖尿病治療法の選択目的は、血糖降下と変動抑制の先にある糖尿病合併症の発症と進展の抑制である。糖尿病による血管障害、臓器障害の機序を一つずつ丁寧に明らかにすること、その中でも糖尿病によるストレス誘導性細胞老化におけるROCKの役割を明らかにすること、さらに臨床研究で糖尿病、老化、血管障害により惹起される糖尿病性血管症に対して、ROCKを治療ターゲットとした新規治療方針を確立することは、オーダーメイド医療時代における臨床的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：From the results in endothelial cells, we found the substantial increase of eNOS, decrease of eNOS phosphorylation, and increase of ROCK activity, all of which were reversed by ROCK inhibitor. Also, from the results so far, there might be the significant association of ROCK2 with stress-induced cellular senescence evoked by high glucose, however, further experiments will be needed to verify.

研究分野：医歯薬学 循環器内科学

キーワード：ROCK 糖尿病 ストレス誘導性細胞老化 心血管障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病では、いわゆる動脈硬化である大血管症のみならず、腎症・網膜症・神経症などの小血管症を合併が社会的な問題となっている。我々はこれまでに、他の生活習慣病では反応性に低下する内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)発現が、糖尿病/高グルコース(HG)においてはむしろ発現が亢進するために、eNOS uncoupling /ROS 産生 /酸化ストレスを介した臓器障害が Rho-associated kinase (ROCK)を介して急速に進行することを見出した。また近年、細胞分裂寿命によらない細胞老化であるストレス誘導性細胞老化が注目されており、その主要因子である TNF /NF- B シグナルは炎症惹起、液性因子の分泌を介して臓器障害を進展させることが報告されている。しかし、糖尿病におけるストレス誘導性細胞老化への ROCK の関与については未だ明らかではない。

2. 研究の目的

糖尿病によるストレス誘導性細胞老化を介した脳心血管障害における Rho-associated kinase (ROCK1、ROCK2)の役割を、in vitro (内皮細胞) と in vivo (マウス)にて検討、臨床研究では、糖尿病による細胞老化を介した血管障害 /臓器障害に対する ROCK 阻害効果の有効性を検討する。In vitroでは、高グルコース刺激 /ストレス誘導性細胞老化、in vivoでは遺伝子改変動物を用いた高齢 /高血糖 /脳虚血再灌流障害モデルによって ROCK、特に ROCK2 /NF- B の役割を検討。臨床研究では、新規かつ既存の薬剤、生活習慣の改善を介した ROCK 阻害による老化 /ROCK 活性 /血管機能 /脳心血管疾患の予後への有益性を検討。

3. 研究の方法

1) HUVEC、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

HUVEC、遺伝子改変マウスであるシステミック 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

HUVEC (ROCK 阻害薬 fasudil を使用)、WT、ROCK1+/-、ROCK2+/-マウスより培養した内皮細胞を用いて、TNF 投与後 12 時間後に、72 時間の高糖培養液に変更し、正常糖培養液と比しての eNOS の発現、eNOS の uncoupling (BH2、BH4)、Akt、Akt リン酸化、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、ROS、老化制御因子(PGC1 β 、p53、NF- B (p65)、p16、p21)の産生を評価し、培養液の高グルコース /ストレス誘導性細胞老化負荷における ROCK、主として ROCK2 /NF- B の役割を検討。

2) 内皮特異的 ROCK2 KO、db/db (二型糖尿病モデル) における高齢、若年マウスの一過性脳虚血再灌流障害モデルを用いた in vivo 検討

A. 対象

高齢(30 週齢)および若年(10 週齢)の内皮特異的 ROCK2 KO、コントロール(WT)、db/db マウス(二型糖尿病モデル: ROCK 阻害薬 fasudil 20 mg/kg/day 投与)。

B. 方法

フィラメントを用いて中大脳動脈を 2 時間完全閉塞、22 時間の再還流後に脳梗塞領域を評価する一過性脳虚血再還流障害モデルを用いて検討¹。また対象マウス大動脈を用いて内皮機能、eNOS、eNOS リン酸化、eNOS uncoupling (BH4 /BH2)、Akt、Akt リン酸化、ROCK 活性、ROS、NO、老化制御因子を検討。

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 50 例、合併症を有す糖尿病群 50 例。

B. 方法

a) 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。

b) Flow-mediated dilation (FMD: 現有設備)

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。

c) Pulse wave velocity (ba PWV: オムロンコーリン: 現有設備)

四肢(両上肢、両足首)に血圧測定カフを巻き、四肢血圧測定に引き続き、低圧で巻いたカフ内の容積脈波の立ち上がりの時間差(T)を計測、上腕 - 足首間の距離の差を時間差で除して、上腕 - 足首間の ba PWV を測定し、aortic stiffness を

評価。

d) 脳心血管疾患の追跡予後評価。

4. 研究成果

In vitro (内皮細胞) による検討では、高グルコース培養液 72 時間刺激では eNOS の発現は軽度亢進、eNOS リン酸化は低下、ROCK 活性は亢進した。ROCK 阻害薬の投与によって、eNOS リン酸化の低下、ROCK 活性の亢進は軽減した。TNF 投与における検討では培養条件を変えながら検討しているが、再現性に問題が残っているために、未だ続行確認中であるが、HUVEC、ROCK2KO 内皮細胞、ROCK1KO 内皮細胞の検討により、内皮における ROCK2 がストレス誘導性細胞老化により強い関与が認められた。In vivo (マウス) による検討は、上記の如くに in vitro による検討により、ROCK2 がストレス誘導性細胞老化に関与しているため、ROCK1KO マウスは用いず、WT (littermate) および ROCK2KO マウスを用いて施行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishimoto Shinji, Oki Kenji, Maruhashi Tatsuya, Kajikawa Masato, Matsui Shogo, Hashimoto Haruki, Takaeko Yuji, Kihara Yasuki, Chayama Kazuaki, Goto Chikara, Aibara Yoshiki, Yusoff Farina Mohamad, Nakashima Ayumu, Noma Kensuke, Liao James K., Higashi Yukihito	4. 巻 37
2. 論文標題 Eplerenone improves endothelial function and arterial stiffness and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with idiopathic hyperaldosteronism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 1083 ~ 1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000001989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野間玄督、梶川正人、木原康樹、東幸仁
2. 発表標題 脳心血管障害の予測因子としてのROCK活性
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東 幸仁 (HIGASHI YUKIHITO) (40346490)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	
研究分担者	中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU) (40448262)	広島大学・医科学研究科（医）・共同研究講座教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高橋 信也 (TAKAHASHI SHINYA) (70423382)	広島大学・医科学研究科（医）・教授 (15401)	
研究 分担者	田口 隆浩 (TAGUCHI TAKAHIRO) (70772010)	広島大学・病院（医）・助教 (15401)	
研究 協力者	リアオ ジェームス (Liao James)	シカゴ大学メディカルセンター	