

機関番号	24601
研究種目	基盤研究C
研究期間	2008~2010
課題番号	20590258
研究課題名(和文)	メタボリックシンドロームにおける酸化ストレスの関与の証明と新しい抗酸化療法の開発
研究課題名(英文)	Investigation of the involvement of oxidative stress in metabolic syndrome and the development of new anti-oxidants
研究代表者	
	吉栖 正典 (YOSHIZUMI MASANORI)
	奈良県立医科大学・医学部・教授
	研究者番号: 60294667

研究成果の概要(和文): 培養ラット大動脈平滑筋細胞(VSMC)において、インスリン刺激による細胞内糖取込みが、アンジオテンシン II (Ang II) や酸化ストレスによって抑制された。Thy-1 腎炎ラットの腎糸球体メサンギウム領域で、MAP キナーゼの一つ、BMK1 の活性上昇と培養メサンギウム細胞での Ang II や酸化ストレスによる BMK1 の活性の上昇を発見した。VSMC において過酸化水素刺激による BMK1 の活性上昇と、非受容体型チロシンキナーゼ c-Src の活性上昇が確認された。c-Src と BMK1 の siRNA を細胞にトランスフェクトした実験から、c-Src と BMK1 は酸化ストレスによる細胞死に抵抗的・防御的に働いていることを解明した。c-Src と BMK1 はメタボリックシンドローム治療のターゲットになりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文): We investigated the possible involvement of oxidative stress in metabolic syndrome using in vivo and in vitro strategies. We examined the effect of angiotensin II (Ang II) on insulin-induced glucose uptake and its intracellular mechanisms in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC). Ang II or oxidative stress inhibited insulin-induced glucose uptake, which was reversed by an ERK inhibitor but not by a JNK inhibitor in VSMC. In the chronic mesangioproliferative glomerulonephritis (GN) rat model using uninephrectomy and anti-Thy-1 antibody injection, activation of BMK1 was observed in the glomeruli at day 28 and 56 of GN. In the cultured rat mesangial cells, Ang II and oxidative stress induced BMK1 activation, suggesting that Ang II and oxidative stress involves in an inflammation-induced metabolic syndrome. We also found that BMK1 was activated by H₂O₂ in a time- and concentration-dependent manner in cultured rat VSMC. The activation of Src tyrosine kinase was also observed which was parallel with the BMK1 activation. We established an experimental model of BMK1 knock down VSMC using siRNA transfection technology. Furthermore, our results also showed that cell death was increased when H₂O₂ was added into the BMK1 siRNA transfected VSMC in which BMK1 expression was inhibited. From these findings, it was suggested that BMK1 may play an essential role in protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis, which is mediated by Src-mediated signaling pathway. c-Src and BMK1 may be possible targets for the treatment of metabolic syndrome clinically.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野: 循環薬理学

科研費の分科・細目: 基礎医学・薬理学一般

キーワード: メタボリックシンドローム、酸化ストレス、シグナル伝達、インスリン抵抗性、BMK1

1. 研究開始当初の背景

近年、増加の著しい「メタボリックシンドローム」の対策は急務であるが、多くの病因が関与しており、その治療法はいまだ確立していない。本研究では、「メタボリックシンドロームの発症や進展には酸化ストレスの関与が重要である」という仮説を立て、その証明と新しい抗酸化療法を確立することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①メタボリックシンドロームの発症・進展における酸化ストレスの関与の証明と、②メタボリックシンドロームに対する抗酸化薬の効果の検証することにある。具体的には、

- ① 培養ラット大動脈平滑筋細胞、血管内皮細胞でのインスリン抵抗性発現の細胞内分子機構における酸化ストレスの役割を解明する。
- ② メタボリックシンドロームモデルラットを用いた *in vivo* での酸化ストレス産生増大を証明し、抗酸化薬によるインスリン抵抗性の改善および心血管病予防効果を検討する。

メタボリックシンドロームにおける酸化ストレスの関与を証明できれば、それを標的とした新しい抗酸化療法の開発につながる。

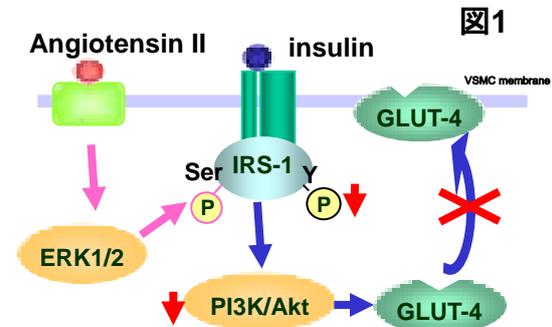
3. 研究の方法

最近の研究から、糖尿病や動脈硬化、高血圧などの生活習慣病の発症・進展の細胞内情報伝達機構に Mitogen-Activated Protein (MAP) キナーゼ family (ERK1/2, JNK, p38, BMK1) が重要であることが明らかになってきた。MAP キナーゼは、細胞の分化・増殖やアポトーシスなどに関わる蛋白質リン酸化酵素であるが、酸化ストレスや浸透圧ストレスに感受性があるといわれており、メタボリックシンドロームの発症・進展に関与している可能性が高いことが考えられる。本研究ではこの MAP キナーゼを標的分子の一つとして定め、特に BMK1 に焦点を当てて実験を行った。具体的には、①培養血管平滑筋細胞を用いてインスリン抵抗性に起因する血管障害における MAP キナーゼと酸化ストレスの役割の解明に取り組んだ。②次にメタボリックシンドロームのモデル動物を作成し、メタボリックシンドロームによる心血管病の発症・進展に酸化ストレスがどのように関与しているかについて検討した。以上、*in vitro* と *in vivo* の両面から3年間の研究を行った。

4. 研究成果

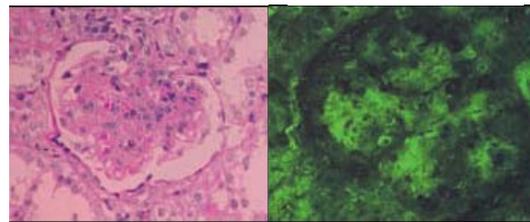
(1) 培養ラット大動脈平滑筋細胞において、インスリン刺激による細胞内への糖取り込みが、アンジオテンシン II (Ang II) や酸化ス

レスの負荷によって抑制されることを見いだした。その細胞内メカニズムとして、Ang II による ERK1/2 の活性化がインスリンシグナルを阻害し、インスリン抵抗性を惹起していると考えられた。Ang II による ERK1/2 活性化経路を阻害することが、インスリン抵抗性の改善、および糖尿病患者における心血管イベント発生の抑制に有用となる可能性が示唆された (図1)。

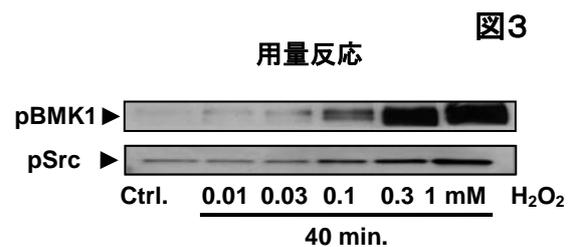


(2) Thy-1 腎炎ラットモデルにおいて、腎糸球体メサンギウム領域で、MAP キナーゼ family のひとつである BMK1 の活性上昇が観察され、培養ラットメサンギウム細胞においても、アンジオテンシン II (Ang II) や酸化ストレスの負荷によって BMK1 の活性が上昇することを見いだした。この実験結果から、炎症によって惹起されるメタボリックシンドロームへの Ang II や酸化ストレスの関与が示唆された (図2、論文④)。

図2
PAS 染色 リン酸化 BMK1 免疫染色

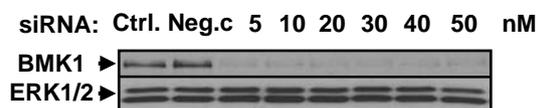


(3) 培養ラット大動脈平滑筋細胞において過酸化水素刺激による酸化ストレスの増大によって、BMK1 の活性上昇と、非受容体型チロシンキナーゼ c-Src の用量依存的な活性上昇が確認された (図3、論文⑨)。



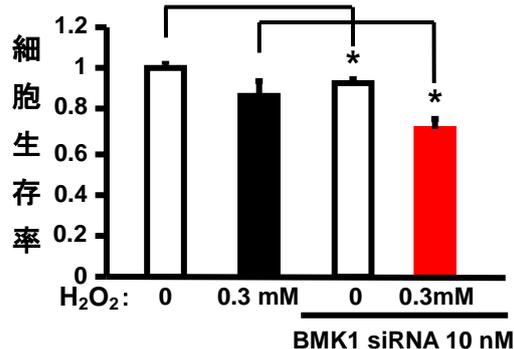
(4)さらにBMK1のsiRNAを細胞にトランスフェクトし、BMK1の発現抑制が得られる実験系を確立した(図4)。図ではnegative controlのERK1/2の発現に比べ、BMK1のsiRNAのトランスフェクションによって有意にその蛋白発現が抑制されていることを示している。

図4



この系を用いた実験で、BMK1のsiRNAを細胞にトランスフェクトすると過酸化水素刺激による血管平滑筋細胞死がさらに増悪した。c-SrcのsiRNAトランスフェクト実験でも同様の結果が得られた。これらの実験結果から逆に考えると、c-SrcとBMK1は酸化ストレスによる細胞死に抵抗的・防御的に働いていることが明らかになった(図5、論文⑨)。

図5



(5)これらの研究成果から、メタボリックシンドロームの根底にあるインスリン抵抗性の発症・進展に酸化ストレスが関与している可能性が高いこと示唆された。また、c-SrcとBMK1は臨床的にメタボリックシンドローム治療のひとつのターゲットになりうる可能性を示している。

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12件)

① Li L, Tataka RJ, Natarajan K, Taba Y, Garin G, Tai C, Leung E, Surapishat J, Yoshizumi M, Yan C, Abe JI, Berk BC. Fluid shear stress inhibits TNF-mediated JNK activation via MEK5-BMK1 in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 370(1), 2008, 159-163.

- ② Nakayama H, Hamada M, Fujikake N, Nagai Y, Zhao J, Hatano O, Shimoke K, Isosaki M, Yoshizumi M, Ikeuchi T. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 377(2), 2008, 550-555.
- ③ Nakayama H, Zhao J, Amany El-Fakharany, Isosaki M, Satoh H, Kyotani Y, Yoshizumi M. Neuroprotective effects of pramipexole against tunicamycin-induced cell death in PC12 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 査読有, 36, 2009, 1183-1185.
- ④ Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Kitamura A, Matsuura S, Yoshizumi M, Tamaki T, Kawachi H, Kagami S. ERK5 activation enhances mesangial cell viability and collagenmatrix accumulation in rat progressive glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 査読有, 298, 2010, F167-F176.
- ⑤ Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ueki M, Ono S, Izawa-Ishizawa Y, Fukuhara Y, Lei Y, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K, Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ, Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M, Kitagawa T, Tomita S. Role of HIF-1 α in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 査読有, 30, 2010, 210-217.
- ⑥ Liu G, Miyata K, Hitomi H, Yao L, Sun GP, Suzaki Y, Hosomi N, Kiyomoto H, Nakano D, Tamaki T, Yoshizumi M, Nishiyama A. Involvement of mineralocorticoid receptor in high glucose-induced big mitogen-activated protein kinase 1 activation and mesangial cell proliferation. *J. Hypertens.*, 査読有, 28, 2010, 536-542.
- ⑦ 京谷陽司、趙 晶、吉栖正典. 最近の話題「サプリメントのEBM」、*日本薬理学雑誌*、査読有、133、2009、297.
- ⑧ Yoji Kyotani, Jing Zhao, Sayuko Tomita, Hitoshi Nakayama, Minoru Isosaki, Masayuki Uno, Masanori Yoshizumi. Olmesartan inhibits angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and MAP kinase pathways. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 113, (2), 2010, 161-168.
- ⑨ Jing Zhao, Yoji Kyotani, Satoyasu Itoh, Hitoshi Nakayama, Minoru Isosaki, Masanori Yoshizumi. Big Mitogen-activated Protein Kinase 1 Protects Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells from Oxidative Damage. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 115, 2011, 印刷中.
- ⑩ Masanori Yoshizumi, Yasuo Matsumura. *Pharmacology in Health Foods: Preface*. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 115, (4), 2011,

459-460.

- ⑪ Keisuke Ishizawa, Masanori Yoshizumi, Yoshichika Kawai, Junji Terao, Yoshitaka Kihira, Yasumasa Ikeda, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Pharmacology in Health Food: Metabolism of Quercetin In Vivo and Its Protective Effect Against Arteriosclerosis. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 115, (4), 2011, 466-470.
- ⑫ 吉栖正典. 「メタボリックシンドローム対策の実際」チーム医療で取り組むメタボリックシンドローム対策、循環器 plus、査読無、10, (12)、2010、10-12.

〔学会発表〕(計15件)

- ① 趙 晶、中山 均、京谷陽司、磯崎 稔、佐藤広康、吉栖正典. PC12h細胞におけるツニカマイシンによる細胞死に対するプラミペキソールの影響. 第114回日本薬理学会近畿部会、2008年11月14日、神戸.
- ② 中山 均、エルファカラニイ アマニイ、趙 晶、磯崎 稔、佐藤広康、吉栖正典. PC12細胞におけるポリグルタミン酸誘導小胞体ストレスおよび細胞内シグナリングに対するポリグルタミン鎖長の影響. 第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜.
- ③ 磯崎 稔、中山 均、佐藤広康、吉栖正典. ウォルトマンニン活性に対するSH還元剤の影響. 第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、横浜.
- ④ 京谷陽司、趙晶、富田小優子、佐藤広康、中山均、磯崎稔、宇野雅之、吉栖正典. Angiotensin IIによる血管平滑筋細胞の遊走に対するOlmesartanの阻害効果. 第115回日本薬理学会近畿部会、2009年6月26日、金沢.
- ⑤ 趙晶、京谷陽司、富田小優子、中山均、磯崎稔、佐藤広康、吉栖正典. 酸化ストレスによる培養ラット大動脈平滑筋細胞死におけるBMK1/ERK5の役割の検討. 第116回日本薬理学会近畿部会2009年11月13日、大津.
- ⑥ 福原弥生、富田修平、木平孝高、池田康将、石澤啓介、土屋浩一郎、吉栖正典、玉置俊晃. T細胞のHIF-1 α は、動脈硬化に伴う血管リモデリングを抑制的に制御する. 第39回日本心脈管作動物質学会総会、2010年2月5日、名古屋.
- ⑦ 石澤啓介、吉栖正典、Dorjsuren Narantungalag、今村優子、池田康将、寺尾純二、土屋浩一郎、玉置俊晃. シンポジウム「健康食品の薬理学」ケルセチンの生体内動態と動脈硬化予防効果. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月17日、大阪.
- ⑧ 趙 晶、京谷陽司、富田小優子、中山均、佐藤広康、磯崎稔、吉栖正典. 酸化ストレスによる血管平滑筋細胞死におけるBMK1/ERK5の役割. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日、大阪.
- ⑨ 京谷陽司、趙晶、富田小優子、佐藤広康、中山均、磯崎稔、宇野雅之、吉栖正典. アンジオテンシン IIによるSrcおよびMAPキナーゼを介した血管平滑筋細胞の遊走に対するオルメサルタンの阻害作用. 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16日、大阪.
- ⑩ 吉栖正典. 動脈硬化の発症・進展におけるbig MAP kinase 1の役割. 第29回財団法人篷庵社研究助成発表会、2010年7月23日、塩野義製薬株式会社中央研究所、大阪.
- ⑪ 趙 晶、京谷陽司、富田小優子、中山 均、磯崎 稔、佐藤広康、吉栖正典. 酸化ストレスによる培養ラット大動脈平滑筋細胞死における Src 及び BMK1/ERK5 の役割の検討. 第118回日本薬理学会近畿部会、2010年11月19日、大阪.
- ⑫ 中山均、吉栖正典. PC12 細胞における細胞表面膜受容体の同定. 第33回日本分子生物学会年回・第83回日本生化学会大会合同年会、2010年12月7~10日、神戸.
- ⑬ 中山 均、趙晶、吉栖正典. PC12 細胞における細胞表面膜受容体のビオチン化. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月24日、横浜(誌上開催).
- ⑭ 趙 晶、京谷陽司、富田小優子、中山 均、磯崎 稔、佐藤広康、吉栖正典. 酸化ストレスによる血管平滑筋細胞死における Src と BMK1/ERK5 の役割. 第84回日本薬理学会年会、2011年3月24日、横浜(誌上開催).
- ⑮ 中山 均、吉栖正典. 喫煙が細胞膜受容体に与える影響—外膜蛋白質の特異的定量法の検討. 2010年度「住居医学」共同研究成果報告会、2010年3月24日、奈良県立医科大学.

〔図書〕(計2件)

- ① 吉栖正典. 財団法人篷庵社、(第29回)財団法人篷庵社研究助成発表会講演要旨集. 2010年、総ページ数61ページ.
- ② 中山 均、吉栖正典. 奈良県立医科大学住居医学大和ハウス寄附講座、平成21年度住居医学共同研究成果報告集. 2010年、総ページ数287ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~pha/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉栖 正典 (YOSHIZUMI MASANORI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60294667

(2) 研究協力者

趙 晶 (JING ZHAO)
奈良県立医科大学・医学部・研究生

京谷陽司 (KYOTANI YOJI)
奈良県立医科大学・医学部・大学院生

中川常磐 (NAKAGAWA TOKIWA)
奈良県立医科大学・医学部・教務職員