

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590306

研究課題名(和文) 糖尿病性微小血管障害での c - Src と MAP キナーゼの役割解明と分子創薬

研究課題名(英文) Investigation of the role of c-Src and MAP kinases in diabetic microangiopathy and development of the new molecular pharmacotherapy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性微小血管障害における c-Src チロシンキナーゼと MAP キナーゼの関与の可能性について検討した。アンジオテンシン II (Angiotensin II, Ang II) は血管平滑筋細胞 (RASMC) の増殖や遊走を介して血管系のインスリン抵抗性に関与している。我々は、Ang II による RASMC 遊走に対する Src 阻害薬 PP2 と、siRNA を用いた Src 遺伝子発現抑制の効果を検討した。Src の siRNA は PP2 と同様に Ang II による RASMC の遊走を強力に阻害した。これらの結果は、Src チロシンキナーゼの薬理的又は遺伝子的な阻害が、レニン-アンジオテンシン系の関わる糖尿病性微小血管障害の新たな治療標的になる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possible involvement of Src tyrosine kinase and MAP kinases in diabetic microangiopathy. Angiotensin II (Ang II) plays an important role in insulin resistance in the vasculature. We examined the effects of PP2, a Src tyrosine kinase inhibitor and Src siRNA for Src gene silencing on Ang II-induced rat aortic smooth muscle cell (RASMC) migration. We found that PP2 and Src siRNA both inhibited Ang II-induced ERK1/2 and JNK activation in RASMC. We also found that both PP2 and Src siRNA strongly inhibited Ang II-induced RASMC migration. From these findings, it was inferred that direct inhibition of Src may be an effective option for vascular smooth muscle cell growth and migration. Pharmacological or genetic inhibition of Src may be an additional strategy to renin-angiotensin blockade for Ang II involved insulin resistance such as diabetic microangiopathy.

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：糖尿病性微小血管障害 c-Src MAPキナーゼ アンジオテンシンII 血管平滑筋 細胞遊走

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では、予備軍も含めて 1870 万人ともいわれる糖尿病患者の増加に伴い、糖尿病性微小血管障害による網膜症や透析患者、下肢切断患者も急増しその対策は急務である。研究開始当初の先行研究で、我々は、糖尿病性微小血管障害の根底をなすインスリン抵抗性に、ガン遺伝子産物 c-Src を介した MAP キナーゼの活性化が関与していることを明らかにしていた (Exp. Cell Res. 308:291-299, 2005)。これらの研究成果を背景に、糖尿病性微小血管障害に c-Src と MAP キナーゼが関与しているならば、これらを阻害する薬物の投与によって糖尿病合併症の発症や進展を抑制できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

以前より我々は、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を用いて動脈硬化性血管障害の発症や進展に関わる c-Src と MAP キナーゼの役割について研究を行い (J. Biol. Chem. 275: 11706-11712, 2000; Circ. Res. 90, 1222-1230, 2002; Mol. Pharmacol. 65: 832-841, 2004)、両者が細胞の分化や増殖、アポトーシスなどに関わることを明らかにした。さらに先行研究で我々は、糖尿病モデル動物の微小血管や腎系球体において c-Src や MAP キナーゼが活性化されていることを発見した。本研究では、「糖尿病性微小血管障害の細胞内メカニズムとして c-Src と MAP キナーゼが重要である」という仮説を立て、その証明と c-Src および MAP キナーゼの阻害による新しい糖尿病合併症の治療法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

最近の研究で、糖尿病をはじめとする生活習慣病の発症・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 等) が重要であることが明らかになってきた (J. Biol. Chem. 277: 9614-9621, 2002)。MAP キナーゼは蛋白質リン酸化酵素であるが、多くは上流の非受容体型チロシンキナーゼ c-Src によって活性の制御を受けている (Mol. Pharmacol. 65: 832-841, 2004; Endocrinology 147: 1377-1385, 2006)。本研究ではこの c-Src と MAP キナーゼを治療標的分子として定めて研究を進めた。本研究は、1) 糖尿病性微小血管障害の発症・進展における c-Src と MAP キナーゼの関与の証明と、2) 網膜症や腎症、閉塞性動脈硬化症などの糖尿病合併症に対する Src および MAP キナーゼ阻害薬の効果の検証を目的とした。まず始めに、培養血管平滑筋細胞 (RASMC)、血管内皮細胞を用いてインスリン抵抗性に起因する糖尿病性微小血管障害における c-Src と MAP キナーゼの役割の解明を目指した。次に RASMC を用いて、種々の Src および MAP キナーゼ阻害薬や siRNA を投与し、糖尿病性微小血管障害による合併症が抑制されるか否かを検討した。

### 4. 研究成果

(1) 我々は先行研究で、RASMC 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 (AII) の負荷によって抑制されることを明らかにしている。本研究では、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) のオルメサルタンが、c-Src と MAP キナーゼの抑制を介して、AII による RASMC の遊走を抑制することを明らかにした (図 1)。

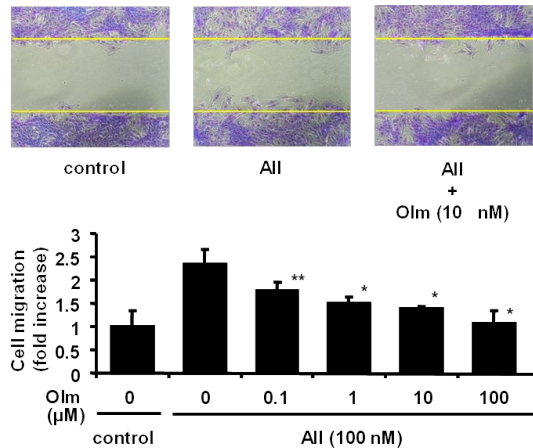


図 1 : AII による RASMC 遊走に対するオルメサルタンの阻害効果

(2) 糖尿病性微小血管障害に関わる AII の役割と ARB の効果が明らかになったので、オルメサルタンと Src 阻害薬である PP2 の効果を比較検討した。その結果、PP2 はオルメサルタンと同程度に AII による RASMC の遊走を阻害した (図 2、論文)。このことは糖尿病性微小血管障害の発症・進展に Src 阻害薬が有効である可能性を示唆している。

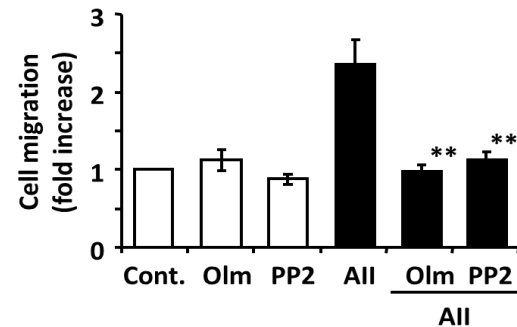


図 2 : AII による RASMC 遊走に対するオルメサルタンと PP2 の阻害効果の比較

(3) 次に Src の薬理的阻害と遺伝子発現阻害の有効性を比較検討するため、Src siRNA の transfection による Src silencing を行った。Src knockdown の効率は、Src siRNA 量を増加させるほど上昇し、25 pmol でほぼピークの 80% に達した (図 3)。

この条件下で、AII 刺激による RASMC 遊走に対する Src siRNA の阻害効果を Src 阻害薬である PP2 と比較検討した。その結果、PP2 を用いた実験結果と同様に Src siRNA は AII 刺激による RASMC 遊走を強力に阻害した (図 4、論文)。

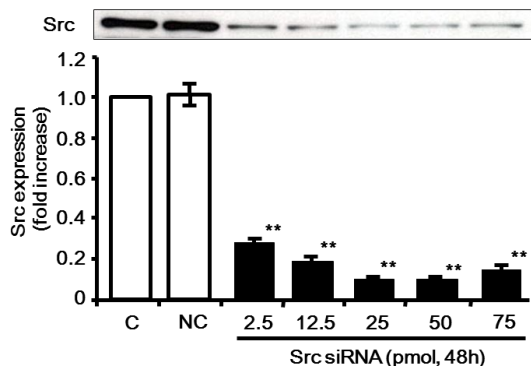


図3 : RASMC への Src siRNA transfection による Src 遺伝子発現阻害の効果

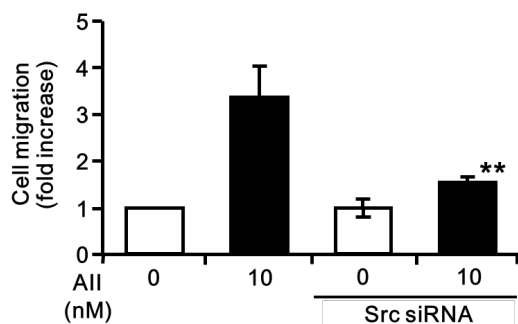


図4 : AII による RASMC 遊走に対する Src 遺伝子阻害による効果

(4) さらに最近、新規糖尿病治療薬のひとつである GLP-1 アナログの exendin-4 が AII による培養血管平滑筋細胞の増殖を阻害することを見出した。その細胞内機構として、AII 刺激による MAP キナーゼのひとつ JNK の活性化の抑制が関与している可能性があることが示唆された(未発表データ)。

以上の研究成果から、c-Src と MAP キナーゼは糖尿病性微小血管障害の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

## 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11件)

Masanori Yoshizumi, Yasuo Matsumura. Forum minireview, Pharmacology in health foods: Preface J. Pharmacol. Sci., 査読有, 115, (4), 2011, 459-460.

DOI: 10.1254/jphs.10R35FM

Keisuke Ishizawa, Masanori Yoshizumi, Yoshichika Kawai, Junji Terao, Yoshitaka Kihira, Yasumasa Ikeda, Shuhei Tomita, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki. Forum minireview, Pharmacology in health foods: Metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis.

J. Pharmacol. Sci., 査読有, 115, (4), 2011, 466-470. DOI: 10.1254/jphs.10R38FM

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, 116, (2), 2011, 173-180.

DOI: 10.1254/jphs.1101FP

Fujimoto E, Yoshizumi M, Kanbara T, Kurobe H, Motoki T, Sugano M, Nakayama T, Kitaichi T, Kitagawa T. Functional restoration of endothelial cells of the cryopreserved heart valve. Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg., 査読有, 59, (3), 2011, 169-174.

DOI: 10.1007/s11748-010-0711-y

Minoru Isosaki, Hitoshi Nakayama, Yoji Kyotani, Jing Zhao, Sayuko Tomita, Hiroyasu Satoh, Masanori Yoshizumi. Prevention of the wortmannin-induced inhibition of phosphoinositide 3-kinase by sulfhydryl reducing agents. Pharmacol. Rep., 査読有, 63, (3), 2011, 733-739.

Komatsubara AT, Asano T, Tsumoto H, Shimizu K, Nishiuchi T, Yoshizumi M, Ozawa K. Proteomic analysis of S-nitrosylation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). Proteome Sci., 査読有, 10(1), 2012, 74-80.

DOI: 10.1186/1477-5956-10-74

Jing Zhao, Yoji Kyotani, Satoyasu Ito, Kosuke Nagayama, Kentarō Ozawa, Masanori Yoshizumi. Comparison of the effects of Src inhibition and mitogen-activated protein kinase inhibition on the migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. The Journal of Nara Medical Association., 査読有, 63, (1,2), 2012, 25-35.

Masanori Yoshizumi, Yoji Kyotani, Jing Zhao, Kosuke Nagayama, Satoyasu Ito, Yuichi Tsuji, Kentarō Ozawa. The role of big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1)/extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) in the pathogenesis and progression of atherosclerosis. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 120, (4), 2012, 259-263.

DOI: 10.1254/jphs.12R11CP

京谷陽司、趙 晶、長山功佑、伊藤都裕、小澤健太郎、吉栖正典、閉塞性睡眠時無呼吸と心血管病、血管、査読有、35, (2), 2012, 69-74.

Ozawa K, Komatsubara AT, Nishimura Y, Sawada T, Kawafune H, Tsumoto H, Tsuji Y, Zhao J, Kyotani Y, Tanaka T, Takahashi R, Yoshizumi M. S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin. Scientific Reports, 査読有, 3, 2013, 2202. DOI: 10.1038/srep02202

Yoji Kyotani, Hiroyo Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyu

Sakuramoto-Tsuchida, Jing Zhao, Kentaro Ozawa, Kosuke Nagayama, Satoyasu Ito, Shin Takasawa, Hiroshi Kimura, Masayuki Uno, Masanori Yoshizumi. Intermittent hypoxia induces the proliferation of rat vascular smooth muscle cell with the increases in epidermal growth factor family and erbB2 receptor. *Exp. Cell Res.*, 査読有, 319, (19), 2013, 3042-3050.  
DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.08.014.

[学会発表](計25件)

吉栖正典. 【特別講演】「メタボリックシンドロームの基礎と臨床」、第52回徳島臨床カンファレンス、2011年9月27日、徳島 Nakayama H, Zhao J. Yoshizumi M. Effect of nicotinic acetylcholine receptor desensitization on nicotine signaling in PC12h cells. 23rd Biennial Meeting International Society for Neurochemistry, European Society for Neurochemistry, August 28-September 1, 2011, Athens, Greece 京谷陽司、高沢伸、太田浩世、広中安佐子、山内晶世、土田澄代、木村弘、宇野雅之、吉栖正典. Intermittent hypoxia induces rat smooth muscle cell proliferation with upregulation of erbB2 receptor and epidermal growth family mRNAs. 第84回日本生化学会、2011年9月21-24日、京都 京谷陽司、高沢伸、太田浩世、広中安佐子、山内晶世、土田澄代、趙晶、木村弘、伊藤都祐、吉栖正典. 間欠的低酸素は上皮成長因子及びerbB2受容体の増加を伴って血管平滑筋細胞の増殖を促進する。第85回日本薬理学会年会、2012年3月14~16日、京都 中山均、趙晶、吉栖正典. PC12細胞におけるニコチンによるERKリン酸化に対するニコチン性アセチルコリン受容体脱感作の影響。第85回日本薬理学会年会、2012年3月14~16日、京都

Yoji Kyotani, Hiroko Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Jing Zhao, Hiroshi Kimura, Masayuki Uno, Shin Takasawa, Masanori Yoshizumi. Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Intermittent Hypoxia is Independent on the Glucose-Induced insulin Secretion. 72nd Scientific Sessions, American Diabetes Association, June 8-12, 2012, Philadelphia, PA

趙晶、京谷陽司、中山均、伊藤都祐、長山功祐、小澤健太郎、吉栖正典. 血管平滑筋細胞への伸展刺激による細胞死に対するアゼルニジピンの阻害効果。第121回日本薬理学会近畿部会、2012年6月29日、徳島 京谷陽司、小澤健太郎、趙晶、長山功祐、伊藤都祐、吉栖正典. アンジオテンシンII刺激による血管平滑筋細胞の Mitogen-activated Protein Kinaseの活性化及び遊走に対するSrcの阻害効果。第121回日本薬理学

会近畿部会、2012年6月29日、徳島 小澤健太郎、津元裕樹、吉栖正典、辻本豪三. NOによるタンパク質修飾は小胞体タンパク質の発現を制御する。第121回日本薬理学会近畿部会、2012年6月29日 徳島

小澤健太郎、吉栖正典. 一酸化窒素によるタンパク質修飾の発現における役割。第20回大阪市大フォーラム、2012年8月10日、大阪 京谷陽司、太田浩世、趙晶、長山功祐、伊藤都祐、小澤健太郎、宇野雅之、木村弘、高沢伸、吉栖正典. 間欠的低酸素による血管平滑筋細胞の増殖促進作用。第42回日本心臓血管作動物質学会、2013年2月8,9日、奈良 趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、長山功祐、伊藤都祐、小松原晃、川舟広徒、辻優一、吉栖正典. 伸展負荷による血管平滑筋細胞死へのアゼルニジピンの阻害効果について。第42回日本心臓血管作動物質学会、2013年2月8,9日、奈良

小澤健太郎、小松原晃、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. 一酸化窒素によるパーキンソン病関連遺伝子の制御。第42回日本心臓血管作動物質学会、2013年2月8,9日、奈良

吉栖正典. 酸化ストレス・伸展ストレスに対する血管平滑筋細胞応答と病態。第1回狭山心腎血管研究会、2013年2月21日、大阪 小松原晃、小澤健太郎、川舟広徒、津元裕樹、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤によって誘導されるS-ニトロシル化蛋白の網羅的解析。第86回日本薬理学会年会、2013年3月21~23日、福岡

小澤健太郎、小松原晃、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. 一酸化窒素によるパーキンソン病関連タンパク質の制御機構。第86回日本薬理学会年会、2013年3月21~23日、福岡

小澤健太郎、小松原晃、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. 一酸化窒素によるパーキンソン病関連タンパク質の制御機構。第13回日本NO学会学術集会、2013年6月28,29日、沖縄 趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、長山功祐、伊藤都祐、横田紘子、小松原晃、川舟広徒、辻優一、吉栖正典. 伸展負荷による血管平滑筋細胞死に対するアゼルニジピンの阻害効果の解析。第123回日本薬理学会近畿部会、2013年7月12日、名古屋

小松原晃、小澤健太郎、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. NO修飾によるParkinの活性調節。第21回大阪市大フォーラム、2013年8月23日、大阪

小澤健太郎、小松原晃、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都祐、長山功祐、辻優一、吉栖正典. NO修飾によるParkinの活性化を介したミトコンドリアの品質管理機構。第21回大阪市大フォーラム、2013年8月23日、大阪

- ⑳ 小松原晃、小澤健太郎、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都裕、長山功佑、辻優一、吉栖正典 . NO修飾によるパーキンソン病関連タンパク質Parkinの活性調節機構 . 第124回日本薬理学会近畿部会、2013年11月1日、京都
- ㉑ 伊藤都裕、趙晶、京谷陽司、長山功佑、小松原晃、川舟広徒、辻優一、小澤健太郎、宇野雅之、吉栖正典 . 伸展負荷による血管平滑筋細胞死に対するオルメサルタンの抑制効果 . 第124回日本薬理学会近畿部会 2013年11月1日、京都
- ㉒ 趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、長山功佑、伊藤都裕、川舟広徒、小松原晃、辻優一、吉栖正典 . 伸展負荷による血管平滑筋細胞死に対するアゼルニジピンの保護効果の解析 . 第43回日本心臓血管作動物質学会、2014年2月15日～16日、神戸
- ㉓ 小松原晃、小澤健太郎、川舟広徒、辻優一、趙晶、吉栖正典 . パーキンのSNO化による活性上昇を介したミトコンドリアクオリティコントロールの調節 . 第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日～21日、仙台
- ㉔ 小澤健太郎、小松原晃、川舟広徒、趙晶、京谷陽司、伊藤都裕、長山功佑、辻優一、吉栖正典 . パーオキシナイトライトは脱ニトロシル化およびチロシンのニトロ化を通して脱分極ミトコンドリアの分解を抑制する . 第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日～21日、仙台

〔図書〕(計1件)

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付講座、平成22年度住居医学共同研究成果報告集、2011年、総ページ数 273 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)研究分担者

小澤健太郎 (OZAWA, Kentaro)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80507393