

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590315

研究課題名(和文)肥満を基盤とするメタボリックシンドロームにおけるプロテアーゼ受容体 2 の意義

研究課題名(英文)Role of protease-activated receptor 2 in metabolic syndrome

研究代表者

籠田 智美(KAGOTA, Satomi)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：00291807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肥満を基盤とするメタボリックシンドローム(MetS)は、心血管疾患の発症率が高く、慢性全身性炎症状態であるとされるが、血管機能障害におけるprotease-activated receptor-2 (PAR-2)の関連性に着目した報告はない。そこで、MetSモデルラットを用いてPAR-2依存性動脈拡張能を検討した。

結果、MetSラットの動脈では、MetSの発症に伴い一酸化窒素(NO)に対する反応性が減弱するが、PAR-2を介した拡張はNO合成酵素活性亢進が生じることにより正常を保持していることを見いだした。また、MetSにおける動脈周囲脂肪組織は、拡張能低下を補っている可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome (MetS) is characterized by accumulation of atherosclerotic risk. Increased visceral adiposity is attributed to the development of cardiovascular complications in the syndrome via overproduction of inflammatory factors released from adipocytes. However, the role of protease-activated receptor 2 (PAR2) in vascular responsiveness in MetS is not fully understood. Therefore, we studied changes in PAR2-mediated vasodilation using an animal model of MetS.

Our study demonstrates that PAR2-mediated vasodilation is preserved even though nitric oxide (NO)-mediated vasodilation by other agonists is impaired in arteries of MetS rats. Enhancement of endothelial NO synthase may play an important role in the preservation of PAR2-mediated vasodilation. Furthermore, we propose that perivascular adipose tissue wrapped around the blood vessel enhances NO-mediated vasodilation under pathological conditions to compensate for impaired vasodilation in MetS.

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：血管拡張機能 メタボリックシンドローム PAR-2 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

Protease-activated receptors (PARs)は、セリンプロテアーゼにより活性化される G 蛋白共役型受容体で、これまでに4つのサブタイプ (PAR-1、PAR-2、PAR-3、PAR-4) がクローニングされている。PARs は、循環器系、消化器系、呼吸器系、神経系など様々な臓器に広く分布しており、運動や分泌などの機能調節に関与することが知られている<sup>1, 2)</sup>。PARs の活性化は、蛋白分解酵素により特定の細胞外領域が切断され新たに生じた N 末端領域が受容体に作用して起きることから、炎症反応や組織障害など病的状態における存在意義が注目されている。現在までに、PAR-1 や PAR-4 が血液凝固系に深く関わっていることが明らかとされ<sup>3)</sup>、そのアンタゴニストが動脈硬化の初期段階をターゲットとした予防薬として臨床試験が行われている (米国)。一方 PAR-2 は、血管壁、主として血管内皮細胞に存在すること、血管内皮細胞由来弛緩因子の産生を介して血管緊張性調節に関与することが知られている<sup>2)</sup>。PAR-2 は、その活性化に関するプロテアーゼが他の PARs とは異なり、トロンピンでは活性化されず、トリプシン、肥満細胞トリプターゼ等により活性化されることから、他の PARs とは異なる生物学的意義をもつことが示唆されている。しかし、生理的アゴニストや生物学的意義など未だ不明な点が多い<sup>4)</sup>。

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積によりインスリン抵抗性が生じ、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などの動脈硬化の危険因子が一個人に集積している状態で、動脈硬化性疾患や糖尿病の発症が相乗的に増加することから、強力な危険因子として注目されている。メタボリックシンドロームの基盤となる「肥満」は、脂肪細胞が多様な炎症性サイトカインを産生分泌することから、全身性の慢性炎症状態と考えられている<sup>5)</sup>。一方、PAR-2 発現は、炎症性サイトカイン刺激により亢進する<sup>6)</sup>、動脈硬化部位やバルーン処置後の動脈壁で亢進している<sup>7, 8)</sup>ことから、動脈硬化性血管障害への PAR-2 の関与が示唆されている。さらに最近、血液凝固や血圧維持に関与する血中および組織カリクレインが PAR-2 活性化を起こす<sup>9, 10)</sup>、インスリンが PAR-2 活性に影響する<sup>11)</sup>ことが報告されている。また、動物モデルを用いた検討により、高血圧<sup>12-14)</sup>や糖代謝異常<sup>15, 16)</sup>における PAR-2 応答の亢進を示唆する報告が散見される。しかし、肥満を基盤としたメタボリックシンドロームに生じる血管障害と PAR-2 との関連性に着目した報告はみあたらない。

## 2. 研究の目的

我々は、PARs 研究者の McGuire 博士 (研究協力者、カナダ・メモリアル大学) との共同研究において、肥満・糖尿病モデル db/db マウスの細動脈では、PAR-2 発現の亢進と PAR-2 を介した血管拡張機能の亢進が生じる

ことをみいだしている<sup>17)</sup>。この結果から「肥満を基盤とするメタボリックシンドロームに生じる血管壁障害に PAR-2 が関与している」と確信した。そこで、「メタボリックシンドロームでは、蓄積した脂肪細胞からのアディポカインにより、血管壁 PAR-2 発現が亢進し、その結果、血管拡張、細胞浸潤や透過性亢進といった PAR-2 応答の亢進を介して動脈の組織障害がおこる」という仮説を立てた。本研究ではこの仮説を証明することにより、メタボリックシンドロームの基盤である「肥満」による PAR-2 応答亢進のメカニズムや、高頻度に生じる血管障害との関連性を明らかにすることを目的とする。

本研究の成果は、メタボリックシンドロームにおける心血管イベント発症の予防・治療法に新知見を提供するとともに、候補医薬品としての応用研究へ発展することが期待できる。また、PAR-2 は他の PARs に比べ、その存在意義に関する研究、特に疾患との関連性についての解析が遅れている。本研究により、血管壁 PAR-2 の生物学的意義の一端を明らかにすることは、メタボリックシンドロームの予防・治療法の探索の新たなアプローチに繋がるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

我々の仮説「蓄積した内臓脂肪細胞からのアディポカインにより、血管壁 PAR-2 発現と PAR-2 を介する応答が亢進する」を実証するため、始めに、各種のメタボリックシンドローム動物を用いて、その細動脈における PAR-2 発現と機能変化を比較検討することにより、メタボリックシンドロームと PAR-2 応答との間に再現性・普遍性があることを実証する。次いで、内臓脂肪細胞が血管壁 PAR-2 の発現およびその機能に影響を及ぼすか否かを検討する。

実験には、メタボリックシンドロームモデル SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* (SHRSP.ZF) ラットを用いた。SHRSP.ZF ラットは、脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP) と肥満モデル Zucker fatty ラット (レプチン受容体異常により過食が生じ肥満を呈する) を掛け合わせて作成されたコンジュニックラットで、高血圧と肥満を発症するとともに、インスリン抵抗性、糖および脂質代謝異常を呈するメタボリックシンドロームのモデル動物ある<sup>18)</sup>。

SHRSP.ZF ラットより、胸部大動脈および腸間膜動脈を摘出し、オルガンバス法を用いて収縮・弛緩反応性を、ウエスタンブロット法を用いてタンパク発現量を、RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量をそれぞれ測定し、正常対象 Wistar-Kyoto ラット (WKY) と比較した。次いで、内臓脂肪細胞である動脈周囲脂肪組織の有無により、腸間膜動脈における PAR-2 依存性拡張反応に変化が生じるか否かを検討するため、脂肪組織を除去または除去しない動脈標本を作成し、オルガンバス法を用いて弛緩反応を比較した。

#### 4. 研究成果

SHRSP.ZF ラットの胸部大動脈および腸間膜動脈において、メタボリックシンドロームの発症に伴い、血管壁における酸化ストレスが亢進することにより、血管平滑筋における一酸化窒素(NO)に対する反応性が減弱すること(発表論文 1,2, 学会発表 2,3,5,6)しかしこのような時期においても、他のNOを介した血管拡張薬とは異なり、PAR-2を介した弛緩反応は正常を保持していることを見いだした(発表論文 3, 学会発表 1,4,7)。このようなPAR-2依存性拡張機能の保持機構として、COX経路は関与していないこと、PAR-2刺激によるNO合成酵素の活性化が他の弛緩薬とは異なる機構を介していることを見いだした。一方、SHRSP.ZF ラットの動脈壁におけるPAR-2発現量は、予想に反し、mRNA量およびタンパク発現量ともにWKYに比べ減少していることを見いだした。これらのことから、メタボリックシンドロームを呈するSHRSP.ZF ラットの動脈では、PAR-2刺激によるNO産生の亢進を介して動脈弛緩能が正常に維持されていることを明らかにした(発表論文 3,4, 学会発表 8,10,12)。SHRSP.ZF ラットは、高血圧を呈するメタボリックシンドロームのモデルであり、動脈に生じたPAR-2の変化は、正常血圧のメタボリックシンドロームモデルdb/dbマウスにみられた変化<sup>17)</sup>と同じであった。このことから、メタボリックシンドロームとPAR-2応答亢進との間に血圧は関与していないと考える。

メタボリックシンドロームにおける腸管膜動脈周囲の脂肪組織は、動脈拡張能の低下を補うように、NOを介する血管拡張薬による弛緩反応を増強すること、このような増強効果は血管拡張能が低下している時期にのみ観察されることを見いだした。しかし、正常対象のWKYの腸間膜動脈における拡張反応においては、血管周囲脂肪組織による影響は認められなかった。一方、収縮反応においては、SHRSP.ZF ラットおよびWKYともに、血管周囲脂肪組織による影響はみられなかった。さらに、胸部大動脈においては、血管周囲脂肪組織による血管拡張反応に対する影響は、腸間膜動脈の場合に比べ小さかった(執筆中、学会発表 9,11)。血管周囲脂肪組織のPAR-2発現を確認している。今後は、血管周囲脂肪組織と血管壁細胞とのクロストークにPAR-2が寄与しているか否かを検討していきたい。

以上、メタボリックシンドロームにおいてNOを介する血管拡張能の減弱が生じるにもかかわらず、PAR-2は正常な拡張能を維持していることを明らかとした。このことは、PAR-2が病態時における循環維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。さらに、メタボリックシンドロームにおいて、動脈周囲脂肪組織が抵抗性血管の拡張能低下を補っている可能性を見いだした。

#### 参考文献

- 1) Hansen KK. et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008; 377: 377.
- 2) Ramachandran R. & Hollenberg. MD, Br J Pharmacol, 2008; 153: S263.
- 3) Hansen KK. et al., Biol Chem, 2008; 389: 971.
- 4) Scarborough RM., Curr Med Chem, 2003; 1: 73.
- 5) Dandona P. et al., Circulation, 2005; 111: 1448.
- 6) Hamilton JR. et al., Circ Res, 2001; 89: 92.
- 7) Napoli C. et al., Endocrinology, 2004; 150: 849.
- 8) Damiano BP. et al., Thromb Haemost, 1999; 81: 808.
- 9) Hollenberg MD. et al. Biol Chem, 2010; 391: 299.
- 10) Abdallah RT. et al., J Biol Chem, 2010; 285: 35206.
- 11) Hyun E. et al., J Immunology, 2010; 184: 2702.
- 12) McGuire JJ. et al., Pflugers Arch, 2007; 454: 535.
- 13) McGuire JJ. et al., Peptides, 2010; 31: 227.
- 14) Sobey CG. & Cocks TM., Stroke, 1998; 29: 1439.
- 15) Roviezzo F. et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005; 25: 2349.
- 16) Matsumoto T. et al., Peptides, 2009; 30: 1729.
- 17) Kagota S. et al., Br J Pharmacol, 2011; 164: 358.
- 18) Ikeda K. et al, Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004; 31: 358.

#### 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 4 件)

Telmisartan prevents impairment of vasodilation via protease-activated receptor 2 in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* rats with metabolic syndrome. Kagota S., Maruyama K., Wakuda H., McGuire JJ., Yoshikawa N., Nakamura K., Shinozuka K. Vascular Pharmacology (submitted).

Chronic oxidative-nitrosative stress impairs coronary vasodilation in metabolic syndrome model rats. Kagota S., Maruyama K., Tada Y., Fukushima K., Umetani K., Wakuda H., Shinozuka K. Microvascular Research 2013; 88: 70-78.

Abnormal amount of intracellular calcium regulatory proteins in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* rats with metabolic syndrome and cardiac dysfunction. Kagota S., Maruyama K., Tada Y., Wakuda H., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 2013; 91: 124-133.

Effects of telmisartan on arterial vasodilation via protease-activated receptor-2 activation in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* rats with metabolic syndrome. Kagota S., Maruyama K., Wakuda H., McGuire J.J., Yoshikawa N., Nakamura K., Shinozuka K. Proceedings of the 10th International Congress on Coronary Artery Disease (Eds; Lewis BS., Borer JS., Flugelman MY., Halon DA.) 2013; p139-142.

〔学会発表〕(計 12 件)

The mechanisms of preservation of vasorelaxation induced by protease-activated receptor-2 activation in aorta of metabolic syndrome rats. Maruyama K., Kagota S., Wakuda H., McGuire JJ., Yoshikawa N., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K. ATVB 2014, 2014.5.3 (Toronto, Canada)

Influence of perivascular adipose tissue on vasodilation in metabolic syndrome. Kagota S., Maruyama K., Iwata S., Wakuda H., Yoshikawa N., Nakamura K., Shinozuka K. ATVB 2014, 2014.5.3 (Toronto, Canada)

メタボリックシンドロームモデル SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr ラット大動脈に生じるプロテアーゼ活性化型受容体-2 を介する拡張機能の保持機構. 丸山加菜、籠田智美、和久田浩一、John J McGuire、吉川紀子、中村一基、国友勝、篠塚和正. 日本薬学会第 134 年会, 2014.3.29 (熊本)

メタボリックシンドロームにおける血管拡張機能と血管周囲脂肪. 籠田智美、丸山加菜、篠塚和正. 第 87 回日本薬理学会 年会, 2014.3.21 (仙台)

Effects of telmisartan on arterial vasodilation via protease-activated receptor-2 activation in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats with metabolic syndrome. Kagota S., Maruyama K., Wakuda H., McGuire JJ., Yoshikawa N., Nakamura K., Shinozuka K. International Congress on Coronary Artery Disease, 2013.10.15 (Florence, Italy)

加齢に伴うメタボリックシンドロームラットのプロテアーゼ活性化型受容体-2 依存性血管拡張機能の変化. 丸山加菜、籠田智美、和久田浩一、John J. McGuire、吉川紀子、中村一基、篠塚和正. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013.3.21 (福岡)

メタボリックシンドロームモデル SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr ラットの左室拡張機能障害の機序. 籠田智美、丸山加菜、多田有加里、和久田浩一、吉川紀子、中村一基、篠塚和正. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013.3.22 (福岡)

Chronic administration of tempol protects impaired coronary vasodilation in metabolic syndrome model rats, SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats. Kagota S., Maruyama K., Fukushima K., Umetani K., Tada Y., Wakuda H., Kunitomo M., Nakamura K., Shinozuka K. 24th ISH2012, 2012.10.3 (Sydney, Australia)

Preserved vasodilation via activation of protease-activated receptor-2 in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats with metabolic syndrome. Maruyama K., Kagota S., Wakuda H., McGuire JJ., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K. 24th ISH2012, 2012.10.1 (Sydney, Australia)

Cardiac dysfunction in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats with metabolic

syndrome. Kagota S., Tada Y., Maruyama K., Wakuda H., Nakamura K., Kunitomo M., Shinozuka K. 3rd International Congress on Abdominal Obesity, 2012.7.11 (Quebec, Canada)

⑪ メタボリックシンドロームモデル SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr ラットの冠動脈拡張機能障害に対する Tempol の予防効果. 籠田智美、多田有加里、福島和人、梅谷啓二、丸山加菜、和久田浩一、国友勝、中村一基、篠塚和正. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012.3.14 (京都)

⑫ メタボリックシンドロームモデル SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr ラットのプロテナーゼ活性化型受容体-2 を介した血管弛緩反応性. 丸山加菜、籠田智美、和久田浩一、John J. McGuire、中村一基、国友勝、篠塚和正. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012.3.14 (京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(出願なし)

〔その他〕(ホームページ等なし)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

籠田 智美 (KAGOTA, Satomi)  
武庫川女子大学・薬学部・准教授  
研究者番号：291807

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

丸山 加菜 (MARUYAMA, Kana)  
武庫川女子大学・薬学部・助手  
研究者番号：20611396