

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590127

研究課題名(和文) 細小血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性形成とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms related to the development of insulin resistance in microvascular endothelial cell

研究代表者

小林 恒雄 (Kobayashi, Tsuneo)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90339523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗や糖尿病は、様々な血管障害を誘発することが知られている。本研究により、インスリン抵抗モデル動物において、内皮細胞のGRK2/eNOS、IRS/PTP1B/eNOS シグナル伝達異常により、血管弛緩反応の低下が誘発され、これらの原因として、GRK2 活性の亢進や、血中の異常血小板の増加によって引き起こされている可能性が示唆された。Up4A、5-HT によって誘発される血管収縮反応の増加が認められた。この収縮増加の原因として、SERT、Rho kinase、COX/TP receptor シグナル異常が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus and insulin resistance are associated with a variety of adverse cardiovascular events, and to treat such vascular complication, it is important to improve insulin sensitivity and vascular dysfunction. I found: (i) that the GRK2/eNOS, and IRS/PTP1B/eNOS plays important roles in endothelium-derived relaxation and NO production in the artery, (ii) that the impaired NO production in endothelial cells that I detected in insulin-resistance model or type 2 diabetic models may be attributable to a reduced Akt/eNOS activity, which in turn may result from an enhanced GRK2 activity and an abnormal platelets. Moreover, AT1 receptor-antagonist, PTP1B inhibitor, and GRK2 inhibitor normalized endothelial function. I also found that the Up4A- and 5-HT -induced contraction is augmented in insulin-resistance models. This augmentation may be due to smooth muscle activation mediated by SERT, Rho kinase and COX/TP receptor signaling.

研究分野：機能形態学

キーワード：血管 糖尿病 インスリン抵抗

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの現在考えられている概略は、肥満などによって生じたインスリン抵抗により、糖尿病、高脂血症、高血圧が生じ、この三者が動脈硬化の発症、進展に大きな役割をしているとする考えである。これらの合併症は医療費の莫大な増加の一因ともなっていることから、糖尿病及びその合併症の予防と治療の重要性が高まっており、具体的な対策を必要としている。しかし、インスリン抵抗と血管障害や、それらの詳細な作用機序に関しては、まだ未解決の分野が多く、更に現在臨床にて使用されている治療薬は重篤な副作用などを含むため、インスリン抵抗における新規治療薬の開発、改善法の確立が望まれる。

2. 研究の目的

糖尿病時において形成されるインスリン抵抗と血管機能について、内皮細胞の Akt/eNOS 合成酵素 (NOS) pathway を中心とし、インスリン抵抗形成における signal pathway や新規生理機能の解明を行い、糖尿病時における細小血管機能障害と共に、それに起因するインスリン抵抗についての新規治療予防方法も提供する。更に、それに伴った糖尿病罹患期間・程度とインスリンを含む様々な薬物治療の効果、血糖コントロール、angiotensin、脂質、インスリン値などの血液因子の影響についても合わせて情報提供する。

3. 研究の方法

(1) 各種パラメーターの検討:

1 型 2 型糖尿病、インスリン抵抗モデルラット、マウスであるストレプトゾトシン (STZ) 誘発モデルラット、GK ラット、ob/ob マウス、db/db マウス、対照群及び各種慢性投与群について、血中グルコース、トリグリセリド、コレステロール、糖負荷試験、血小板、アンジオテンシン量、トロンボキサン量の測定を行った。

(2) 血管反応の検討:

上記モデル動物と対照群、慢性投与群について、腸間膜動脈、大動脈、頸動脈、腎動脈を摘出し、内皮依存性弛緩反応、血管収縮反応の検討を行い、各種阻害薬も用いてこれら血管機能の検討を行った。更に、ob/ob マウスに対する GRK2 siRNA の投与実験: ob/ob マウスに GRK2 siRNA を尾静脈投与し、胸部大動脈および肝臓における GRK2 発現量を検討すると共に血管反応を検討した。また、NO 測定も合わせて行った。

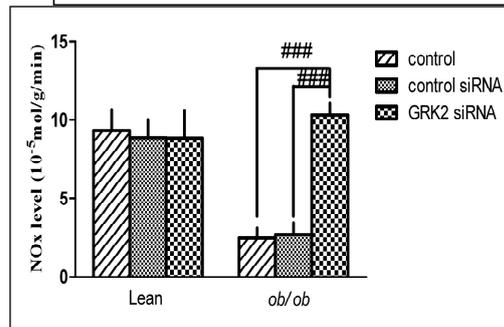
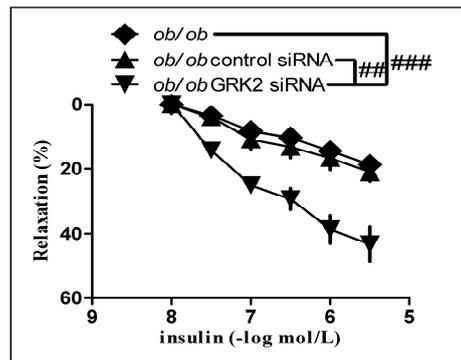
(3) 分子生物学的検討

上記モデル動物と対照群より血管を摘出し、ウェスタンブロッティング、免疫染色等を用いて、タンパク発現、リン酸化タンパク質発現の検討を行った。

4. 研究成果

1) 糖尿病時におけるインスリン誘発内皮依

存性弛緩、Akt/eNOS 経路と GRK2/ β -arrestin2 経路の関係について検討した。自然発症 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスの胸部大動脈において、インスリン誘発 Akt/eNOS 経路依存性血管弛緩反応の減弱及び NO 産生の減少が確認され、この弛緩反応の減弱及び NO 産生の減少は、GRK2 を抑制する (GRK2 siRNA や GRK2-inhibitor 使用等) ことにより改善された (Fig. 1)。これらの反応は β -arrestin2 siRNA の処置により消失した。以上の結果から、インスリン抵抗を呈した胸部大動脈において、膜移行を起こした GRK2 は



負の制御因子として働き、 β -arrestin2 を介して Akt/eNOS シグナル伝達を抑制することにより、糖尿病性血管内皮障害を増悪させていることが明らかとなり、GRK2 の抑制がインスリン抵抗糖尿病性血管障害の治療戦略となりえることが示唆された。2) 糖尿病群においては insulin-receptor substrate (IRS) と eNOS リン酸化蛋白質発現の低下、NO 産生およびインスリン弛緩反応の減弱が認められた。アンジオテンシン 2 の前処置によりインスリン弛緩反応の減弱、膜分画における protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 発現の増加が認められた。さらに PTP1B inhibitor と アンジオテンシン 2 を同時処置したところ、両群共にインスリン弛緩反応、NO 産生、IRS1/eNOS 蛋白質発現が改善した。以上のことから内皮細胞インスリン抵抗時におけるインスリン弛緩反応の減弱は、IRS1/eNOS/NO pathway の障害に起因しており、アンジオテンシン 2/PTP1B pathway の恒常的活性化により引き起こされていると考えられる。以上の結果から、アンジオテンシン阻害薬、PTP1B inhibitor は、インスリン抵抗時における血管障害の新しい治療戦略を提唱するものである。

更に、このような病態時における細小血管、大血管における Akt/eNOS シグナル伝達異常を誘発する原因物質の同定を試みた。糖尿病群より抽出した血小板を正常頸動脈に処置することによって、コントロール群由来の血小板処置群と比較し、ACh 誘発内皮依存性弛緩反応の減弱、eNOS の Ser1177 部位のリン酸化タンパク発現低下が認められた。以上の結果は、糖尿病時の血中における activated 血小板は、内皮細胞機能を低下させ、その機序として、上述の Akt/eNOS の活性低下を誘発していることを示唆し、血小板の正常化によるインスリン抵抗時の血管障害の新しい治療戦略を提唱するものである。

2. インスリン抵抗モデルラットにおいて血圧の増加や血管収縮増加が認められる。ウリジンアデノシンテトラホスフェート (Up4A) は、その構造体にプリンとピリミジンをもつ近年発見された新規内皮細胞由来収縮因子であるが、血管に対する反応性や、病態時における反応性に関する報告は少なく、糖尿病病態時の反応性に関しては不明である。そこで、インスリン抵抗型 2 型糖尿病モデルラット腎動脈における Up4A の収縮反応性に関し、特に、一酸化窒素 (NO) と、血管収縮性 prostanoid シグナルとの関連性について検討を行った。インスリン抵抗群による Up4A の収縮力の増大は、P2 受容体の活性化による血管収縮性 prostanoids を介したシグナル亢進が関与していることが示唆され、P2 受容体阻害薬の新規開発は、インスリン抵抗を生じた血圧増加、血管収縮異常の治療方法として、新規に提唱するものである。5-HT_{2A} 受容体 agonist による収縮反応は、病態モデルの頸動脈にて増大し、p38 MAPK 阻害薬、Rho kinases 阻害薬処置により、コントロール群とほぼ同じ程度に回復した。また、5-HT transporter (SERT) 阻害薬処置は、5-HT による収縮反応を両群共に増大した。以上の結果から、インスリン抵抗時において、5-HT 収縮が増大し、これには平滑筋における SERT 活性あるいは、5-HT_{2A} 受容体活性化以降の機構が関与している可能性が示唆された。

以上の本研究から、肥満や糖尿病などのインスリン抵抗時において、血中のアンジオテンシンや activated platelet の増加は、内皮細胞内 GRK2 活性の亢進、PTP1B 活性の亢進による Akt 活性の低下、NO 合成酵素活性の低下を生じ、内皮細胞由来弛緩反応や内皮由来 NO 産生の低下を誘発することが示唆された (Fig. 2)。更に、内皮細胞インスリン抵抗性形成においても、これらの分子メカニズムが関与していることが示唆される。

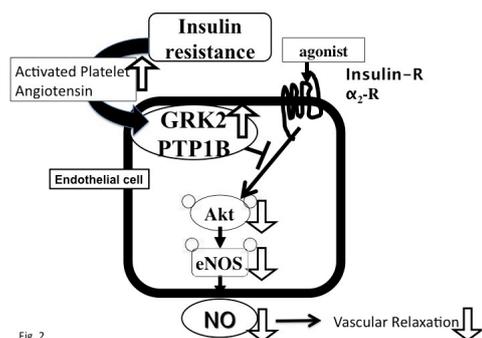


Fig. 2

また、5-HT、Up4A 誘発収縮反応の増加も認められ、平滑筋内の SERT や Rho-kinase 等の活性亢進が関与していることが示唆された (Fig. 3)。

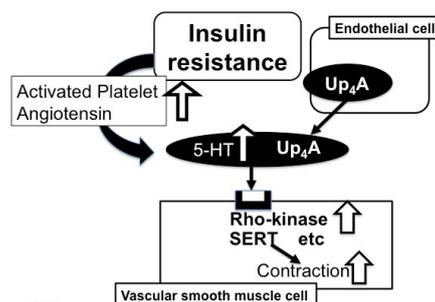


Fig. 3

今後、アンジオテンシン阻害、PTP1B inhibitor、GRK2 の抑制や血小板異常の改善薬の開発により、内皮インスリン抵抗性を改善し、インスリン抵抗時における血管障害の新規治療戦略となりえることが期待される。

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 9 件) (すべて査読あり)

- ① Ishida K, Taguchi K, Matsumoto T, Kobayashi T. Activated platelets from diabetic rats cause endothelial dysfunction by decreasing Akt/endothelial NO synthase signaling pathway. PLoS One. 9, 2014, e102310. DOI; 10.1371/journal.pone.0102310.
- ② Matsumoto T, Watanabe S, Taguchi K, Kobayashi T. Mechanisms underlying increased serotonin-induced contraction in carotid arteries from chronic type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. Pharmacol Res. 87C, 2014, 123-132. DOI; 10.1016/j.phrs.2014.07.001.
- ③ Matsumoto T, Watanabe S, Kawamura R, Taguchi K, Kobayashi T. Enhanced uridine adenosine tetraphosphate-induced contraction in renal artery from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats due to activated cyclooxygenase/thromboxane receptor axis. Pflugers Arch. 466, 2014,

- 331-42. DOI; 10.1007/s00424-013-1330-0.
- ④ Taguchi K, Hida M, Matsumoto T, Ikeuchi-Takahashi Y, Onishi H, Kobayashi T. Effect of short-term polyphenol treatment on endothelial dysfunction and thromboxane A2 levels in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull.* 37, 2014, 1056-61.
- ⑤ Nemoto S, Matsumoto T, Taguchi K, Kobayashi T. Relationships among protein tyrosine phosphatase 1B, angiotensin II, and insulin-mediated aortic responses in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Atherosclerosis.* 233, 2014, 64-71. DOI; 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.03
- ⑥ Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. G Protein-Coupled Receptor Kinase 2, With β -Arrestin 2, Impairs Insulin-Induced Akt/Endothelial Nitric Oxide Synthase Signaling in ob/ob Mouse Aorta. *Diabetes.* 61(8), 2012, 1978-85.
- ⑦ Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. Inhibitor of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Normalizes Vascular Endothelial Function in Type 2 Diabetic Mice by Improving β -Arrestin 2 Translocation and Ameliorating Akt/eNOS Signal Dysfunction. *Endocrinology* 153(7), 2012, 2985-2996.
- ⑧ Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. Angiotensin II type 2 receptor-dependent increase in nitric oxide synthase activity in the endothelium of db/db mice is mediated via a MEK pathway. *Pharmacol Res.* 66(1), 2012, 41-50
- ⑨ Kobayashi T, Nemoto S, Ishida K, Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K. Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats. *Clin Sci (Lond).* 123(6), 2012, 375-86.

[学会発表] (計 27 件)

- ① 飛田麻里、田口久美子、小柴春香、松本貴之、小林恒雄. 2型糖尿病マウスの肝臓及び血管機能における GRK2siRNA 投与の影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. 兵庫医療大学.
- ② 渡邊駿、松本貴之、山田浩介、足立都将、尾田未来、高木淳也、松原花歩、野一色柚葉、比嘉輝、木本靖子、田口久美子、小林恒雄. ラット摘出頸動脈におけるセロトニン誘発収縮反応に対するグルコース及びインスリンの影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. 兵庫医療大学.
- ③ 安藤眞、松本貴之、渡邊駿、山田浩介、井口舞香、鳥羽美貴子、金津智絵、新井隆三、上原千晶、佐川なつ実、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病モデルラット (OLETF ラット)

ト)腎動脈のウリジンアデノシントラフオスフェートおよびフェニレフリン収縮反応に対するエージングの影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. 兵庫医療大学.

- ④ 井口舞香、松本貴之、渡邊駿、安藤眞、山田浩介、足立都将、尾田未来、木本靖子、高木淳也、松原花歩、野一色柚葉、比嘉輝、田口久美子、小林恒雄. 自然発症高血圧ラット大腿動脈におけるノルエピネフリン収縮に対するニューロペプチド Y の効果. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. 兵庫医療大学.
- ⑤ 松原花歩、松本貴之、渡邊駿、山田浩介、安藤眞、井口舞香、木本靖子、野一色柚葉、比嘉輝、足立都将、尾田未来、高木淳也、田口久美子、小林恒雄. 自然発症高血圧ラット (SHR) 摘出動脈における心房性ナトリウム利尿ペプチド、アセチルコリン、ニトロプルシドナトリウム誘発弛緩反応の動脈部位差の検討. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. デザイン・クリエイティブセンター神戸.
- ⑥ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄. 糖尿病時における血管弛緩反応減弱と血中マイクロパーティクルの影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. デザイン・クリエイティブセンター神戸.
- ⑦ 登内絵梨香、田口久美子、高橋実夏、飛田麻里、松本貴之、小林恒雄. 糖尿病性血管機能障害におけるモリンの影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. デザイン・クリエイティブセンター神戸.
- ⑧ 松本貴之、田口久美子、小林恒雄. 血管内皮由来収縮因子 (EDCF) と血管病-特に新規 EDCF uridine-adenosine teraphosphate を中心に. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18-20 日. 名古屋国際会議場.
- ⑨ 渡邊駿、松本貴之、田口久美子、小林恒雄. Effect of various kinase inhibitors on the 5-HT-induced contraction in carotid arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18-20 日. 名古屋国際会議場.
- ⑩ 井口舞香、松本貴之、渡邊駿、安藤眞、山田浩介、足立都将、尾田未来、木本靖子、高木淳也、松原花歩、野一色柚葉、比嘉輝、田口久美子、小林恒雄. Mechanisms underlying the augmented norepinephrine-induced contraction in femoral arteries isolated from spontaneously hypertensive rat. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18-20 日. 名古屋国際会議場.
- ⑪ 安藤眞、松本貴之、渡邊駿、山田浩介、井口舞香、鳥羽美貴子、金津智絵、新井隆三、上原千晶、佐川なつ実、田口久美子、小林恒雄. Influence of type 2 diabetes and aging on uridine adenosine

- tetraphosphate-induced contraction in renal and iliac arteries. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18-20 日. 名古屋国際会議場.
- ⑬ 渡邊駿、松本貴之、上原千晶、佐川なつ実、山田浩介、金津智絵、鳥羽美貴子、新井隆三、田口久美子、小林恒雄. Epigallocatechin gallate suppresses responsiveness to vasoconstrictor prostanoides in superior mesenteric arteries from type 2 diabetic rat. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18-20 日. 名古屋国際会議場.
- ⑭ 飛田麻里、田口久美子、松本貴之、小林恒雄. 雌雄 2 型糖尿病モデルマウスにおける血管弛緩反応機序の検討. 第 58 回日本薬学会関東支部大会. 2014 年 10 月 4 日. 昭和薬科大学.
- ⑮ 飛田麻里、田口久美子、松本貴之、小林恒雄. 糖尿病時の血管弛緩機能障害に対する GRK2 の関与と性差について. 第 56 回日本平滑筋学会総会. 2014 年 8 月 6-8 日. 新横浜プリンスホテル.
- ⑯ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄. 糖尿病モデルラット頸動脈における血管弛緩反応減弱と血中マイクロパーティクルについて. 第 56 回日本平滑筋学会総会. 2014 年 8 月 6-8 日. 新横浜プリンスホテル.
- ⑰ 渡邊駿、松本貴之、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病モデルラット頸動脈におけるセロトニン収縮反応性の検討. 第 56 回日本平滑筋学会総会. 2014 年 8 月 6-8 日. 新横浜プリンスホテル.
- ⑱ 渡邊駿、松本貴之、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット頸動脈におけるセロトニンによる収縮反応と代謝系の薬理的検討. 第 130 回日本薬理学会関東支部会. 2014 年 7 月 5 日. 星薬科大学.
- ⑲ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄. 糖尿病性病態時に活性化された血小板は血管内皮機能障害を引き起こす. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本市総合体育館.
- ⑳ 松本貴之、渡邊駿、川村隆輔、金津智絵、鳥羽美貴子、新井隆三、上原千晶、佐川なつ実、山田浩介、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット摘出頸動脈におけるエンドセリン-1 収縮に対するエピガロカテキンガレート慢性投与の影響. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 3 月 27-30 日. 熊本市総合体育館.
- ㉑ 松本貴之、渡邊駿、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット腎動脈における新規内皮由来収縮因子 uridine adenosine tetraphosphate における収縮増大には cyclooxygenase/thromboxane receptor 経路が関与する. 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日～2014 年 3 月 21 日 東北大学百年記念会館
- ㉒ 渡邊駿、松本貴之、田口久美子、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット腎動脈における新規内皮収縮因子 Up4A の収縮反応と thromboxane A2 シグナルの関連. 第 57 回日本薬学会関東支部大会 2013 年 10 月 26 日 帝京大学板橋キャンパス
- ㉓ 松本貴之、渡邊駿、川村隆輔、名取世津子、森真里英、藤井真理子、松葉優矢、小林恒雄. 新規内皮由来収縮因子ウリジンアデノシンテトラフォスフェートの 2 型糖尿病ラット腎動脈における収縮反応性の変化. 第 55 回日本平滑筋学会総会 2013 年 8 月 6-8 日, 旭川⑳
- ㉔ 渡邊駿、松本貴之、松葉優矢、名取世津子、森真里英、藤井真理子、川村隆輔、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット摘出頸動脈におけるセロトニンによる収縮反応性の検討. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 03 月 27 日～2013 年 03 月 30 日 パシフィコ横浜
- ㉕ 松葉優矢、松本貴之、渡邊駿、森真里英、名取世津子、川村隆輔、藤井真理子、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット摘出腎動脈における uridine adenosine tetraphosphate による収縮反応性の検討. 日本薬学会第 133 年会 2013 年 03 月 27 日～2013 年 03 月 30 日 パシフィコ横浜
- ㉖ 根本真吾、松本貴之、小林恒雄. 2 型糖尿病ラット大動脈を用いたインスリン依存性弛緩反応における PI3-K p85 monomer と IRS-2-p85 complex の影響. 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 03 月 21 日～2013 年 03 月 23 日 福岡国際会議場
- ㉗ 田口久美子、松本貴之、小林恒雄、服部裕一. 糖尿病性血管内皮機能障害時における Akt シグナル伝達の減弱に対する GRK2 の関与. 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 03 月 21 日～2013 年 03 月 23 日 福岡国際会議場
- ㉘ 小林恒雄. 糖尿病時における内皮 NO 合成酵素リノ酸化調節と新規ターゲット分子. 第 22 回日本循環薬理学会 2012 年 11 月 30 日～2012 年 11 月 30 日 富山国際会議場

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 小林 恒雄
(Tsuneo Kobayashi)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90339523

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：