

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870258

研究課題名(和文)血管内皮機能不全分子GRK2の制御機構に関する分子薬理的解析

研究課題名(英文)Molecular pharmacological characterization of GRK2 control mechanism in endothelial dysfunction

研究代表者

田口 久美子(Taguchi, Kumiko)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20600472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は血管内皮機能不全分子としてのGRK2(G protein coupled receptor kinase 2)に着目し、GRK2が血管内皮機能を制御するメカニズムを解明し糖尿病性合併症の治療薬開発に応用する目的で行った。その結果、高グルコース処置下の内皮細胞において、インスリンやアンジオテンシンII刺激によりGRK2が誘導され、Akt/NO S経路を介したNO産生を抑制させることを見出した。さらに、2型糖尿病モデルマウスにGRK2siRNAを投与することで、減弱していた血管弛緩反応が改善されることを確認した。GRK2は糖尿病性血管障害を増悪させるタンパクであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Many various complications (cardiovascular disease and atherosclerosis etc.) are caused by affection of long-term diabetes. The vascular disorder is the characteristic in common. This leads to impaired endothelial function, which has become a serious public-health threat, and so we designed the present study to elucidate mechanism to control the vascular function, and to suggest that GRK2 (G protein coupled receptor kinase 2) uncovers new molecular targets for the treatment of diabetic complications. As a result, we found that in the endothelium under high glucose condition, GRK2 was up-regulated by the stimulation of insulin or angiotensin II, and let to a stronger inhibition of insulin-induced Akt/eNOS/NO production pathway. Furthermore, we confirmed that the endothelium-dependent vasorelaxation that attenuated in diabetes was improved by giving GRK2 siRNA to spontaneous type 2 diabetes mice, suggesting that GRK2 is a precipitating factor on the development of diabetic complications.

研究分野：薬学

キーワード：血管内皮障害 糖尿病 GRK2

1. 研究開始当初の背景

長期的な糖尿病の罹患により多くの様々な合併症が引き起こされ、糖尿性合併症に共通した特徴は血管障害である。その原因の一つとして血管内皮機能の低下が知られているが、申請者は、2004年に血管内皮細胞において糖尿病時には Akt/eNOS 経路の活性が減弱することで nitric oxide (NO) 産生の減少・血管弛緩機能の低下を示すことを明らかにした。しかし、なぜ糖尿病時にこの経路の活性が減弱するのかについては解明されていない。申請者は、高血圧を併発した糖尿病モデルマウス胸部大動脈において GRK2 発現が増加し、血管内皮細胞において GRK2 活性上昇が GRK2 の下流タンパクである β -arrestin2 の働きを抑制することにより Akt/eNOS 経路を阻害していることを発見した。GRK2 は、様々な病態時に悪化因子として働くことが報告されているが、詳細なメカニズムは未解決の部分が多く残されており、また創薬における標的分子としても検討すべきことが多い。

2. 研究の目的

申請者は、GRK2(G-protein coupled receptor kinase 2)が、糖尿病病態時には血管に集積し、Akt/eNOS 経路を抑制することにより血管内皮障害を引き起こしていることを見出した。さらに、申請者は、雌の場合は糖尿病時に GRK2 の働きが抑制されることで血管内皮機能が保護されていることも明らかとした。そこで、本研究は糖尿病時の血管における GRK2 制御機構を明らかにし、GRK2 自身もしくは GRK2 活性抑制分子を標的とした糖尿病性合併症の治療薬開発へと展開するための研究基盤を確立することを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1)ヒト血管内皮細胞における GRK2 発現量と活性の評価：ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を 5-30 mM glucose 培地で培養時、糖尿病時に血管弛緩反応を減弱させることが報告されている様々な物質を同時に処置した。その後、細胞および培地を回収し、western blot や NOx 測定を行った。

(2)1 型糖尿病モデルラットを用いた血管弛緩反応の検討：ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルラット、対照ラットについて、頸動脈を摘出し、ACh 誘発血管内皮依存性弛緩反応の検討を行い、さらに血管弛緩機序に關与するタンパク発現を検討した。

(3)2 型糖尿病モデルマウスに対する 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 発現量を検討した。

4. 研究成果

(1)ヒト血管内皮細胞における GRK2 発現量と活性の評価：ヒト血管内皮細胞(HUVEC);

ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いた培養細胞実験系を立ち上げ、糖尿病性血管障害時の GRK2 誘導原因物質の探索を行った。その結果、高グルコース(30 mM)処置下、アンジオテンシン II(100 nM)を同時処置したことで 48 時間後、GRK2 の誘導が確認された。また、高インスリン(100 nM)を同時処置したところ、72 時間後に GRK2 誘導が確認された。この時、GRK2 の活性も上昇していた。この時、ERK1/2 のリン酸化も増加してくることから、GRK2 の誘導経路として MAPK 経路が関与している可能性が考えられた。

(2) 1 型糖尿病モデルラットを用いた血管弛緩反応の検討(Figure 1)：STZ 誘発糖尿病ラットより採取した血小板が活性化した状態で頸動脈に接着し、血管弛緩因子である NO を産生させる NO 合成酵素(eNOS)の発現を減少させることを明らかにした(Figure 2)。GRK2 は eNOS 活性による NO 産生を制御していることから、活性化血小板の血管内皮細胞への接着が GRK2 を誘導しているのではないかと考え、詳細な検討を開始した。

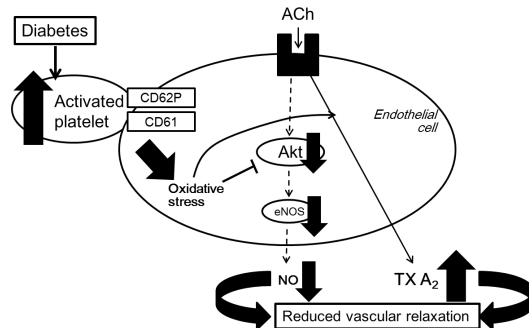


Figure 1. 糖尿病時に活性化した血小板が酸化ストレスによってAkt活性を抑え、トロンボキサンAを増加させることで血管弛緩反応を抑制してしまう。(ref.4)

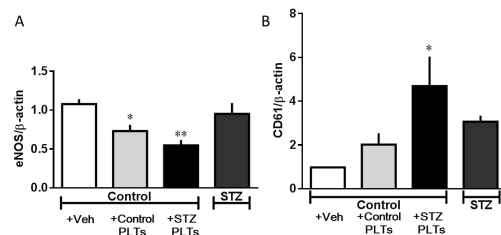


Figure 2. 血小板処置後の摘出胸部大動脈におけるeNOS(A)およびCD61(血小板マーカー)発現(B)。(ref.4)

(3) 2 型糖尿病モデルマウスに対する GRK2 siRNA の投与実験：自然発症 2 型糖尿病モデル *ob/ob* マウスに GRK2 siRNA 投与を試みた。本実験において、*ob/ob* マウスでは、肝臓における増加していた GRK2 発現を抑制し、Akt/eNOS 経路を *ob/ob* マウスの胸部大動脈における血管内皮機能障害は劇的に改善された。さらに、今回全身投与を試みたことから、糖代謝や脂質代謝の改善もみられたことから、現在、様々な臓器について検討中である。

本研究により、GRK2 が糖尿病性血管障害において増悪因子であることが示唆され、GRK2 が Akt 経路や MAPK 経路の制御に重要な役割を果たしていることが解明された。

さらに、糖尿病において、GRK2 を抑制させることで心血管機能を正常化させる可能性が示唆された。本研究によって明らかとなった分子機序は、今後、血糖コントロール作用と心血管保護作用を併せ持った治療薬開発に向けた臨床への利用可能な極めて重要な発見である。

今後は、糖尿病モデル動物において、GRK2 阻害薬や GRK2 siRNA の全身投与や慢性投与を試み、様々な臓器に対する作用を検討していく。また、今回検討したタンパク以外にも様々なタンパクとの相互作用を細かく検討していく。このように *in vitro* 実験や *in vivo* 実験を重ねていくことで、臨床応用へつなげていきたいと考えている。

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 10 件)

Takebe M, Oishi H, Taguchi K, Aoki Y, Takashina M, Tomita K, Yokoo H, Takano Y, Yamazaki M, Hattori Y. Inhibition of Histone deacetylases protects septic mice from lung and splenic apoptosis. *J Surg Res*. 査読有 187, 2014, 559-70.

DOI; 10.1016/j.jss.2013.10.050.

Hayashi T, Kotani H, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori Y, Ignarro LJ. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation with an additional mechanism for its atheroprotection in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有 111, 2014, 1168-73.

DOI; 10.1073/pnas.1322153111.

Hayashi T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Taguchi K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori Y. eNOS-dependent antisense effect of a calcium channel blocker in human endothelial cells. *PLoS One*. 査読有 9, 2014, e88391.

DOI; 10.1371/journal.pone.0088391.

Taguchi K, Sakata K, Ohashi W, Imaizumi T, Imura J, Hattori Y. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 349, 2014, 199-208.

DOI; 10.1124/jpet.113.211854.

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*. 査読有 37, 2014, 1056-61.

URL; <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00157>

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*. 査読有 87C, 2014, 123-132.

DOI; 10.1016/j.phrs.2014.07.001.

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*. 査読有 9, 2014, e102310.

DOI; 10.1371/journal.pone.0102310.

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*. 査読有 466, 2014, 331-42.

DOI; 10.1007/s00424-013-1330-0.

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*. 査読有 233, 2014, 64-71.

DOI; 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.032.

Matsumoto T, Watanabe S, Kawamura R, Taguchi K, Kobayashi T. Epigallocatechin gallate attenuates ET-1-induced contraction in carotid artery from type 2 diabetic OLETF rat at chronic stage of disease. *Life Sci*. 査読有 24;118(2):200-205, 2014.

DOI; 10.1016/j.lfs.2013.11.016.

[学会発表](計 21 件)

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。

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。

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、足立都將、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.

井口舞香、松本貴之、渡邊駿、安藤眞、山田浩介、足立都將、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.

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)腎動脈のウリジンアデノシンテトラフォ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.

渡邊駿、松本貴之、山田浩介、足立都將、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.

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.

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.

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.

井口舞香、松本貴之、渡邊駿、安藤眞、山田浩介、足立都將、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.

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.

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.

田口久美子. 糖尿病性血管合併症における GRK2 の関与と新規治療ターゲットとしての可能性. 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.

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.

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.

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.

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.

田口久美子. GRK2, with -arrestin2 impairs insulin-induced Akt/eNOS signaling in ob/ob mouse aorta. 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.

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部会. 2014 年 7 月 5 日. 星薬科大学.

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.

②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.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 田口 久美子
(Taguchi Kumiko)
星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20600472

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：