

糖尿病性血管障害時における GRK2 関与のメカニズム

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学研究室

田口 久美子

1. はじめに

糖尿病は遺伝的素因と環境素因が複雑に絡み合い、しばしば、高血圧や脂質異常症、動脈硬化等多くの疾患を合併している場合が多く、これら疾患に共通した病理学的特徴は、血管障害であることが知られている。しかしながら、血管内皮細胞レベルで起こっている複雑な変化は未解決な部分が多い。現在、新規に糖尿病およびその合併症へ移行する患者数は世界的レベルで増加の一途を辿っている。そこで、その抑止のため、厳格な血糖コントロールに加えて、心血管保護作用を併せ持つような新規メカニズムの画期的薬剤が求められている。申請者は、近年、G タンパク共役型受容体キナーゼ (G-protein coupled receptor kinase 2; GRK2) が糖尿病時において増加し、GRK2 とダウンストリームターゲットタンパクである β -arrestin 2 (β arr2) とが拮抗し、シグナル伝達が抑制されていることを報告した [1]。そこで、今回、申請者は、さらに糖尿病時における GRK2 増加メカニズムを解明し、糖尿病のみならず、その心血管系合併症をカバーできる GRK2 阻害薬の新規治療薬としての可能性を検討することで糖尿病合併症の治療戦略の確立をめざし研究を行った。

2. 方法

In vitro 実験系と *in vivo* 実験系に実験系を分離し、*in vitro* 実験では、血管内皮細胞における反応を直接的に観察し、*in vivo* 実験においては、GRK2 阻害薬を糖尿病モデルマウスに投与することで、GRK2 阻害薬の新規治療薬としての可能性を提唱しようとするものであった。

【*in vitro* 系】血管内皮細胞の培養細胞系を立ち上げ、GRK2 の関与を特に次の 3 点についてウェスタンブロッティング法を用いて分子生物学的レベルで検討した。

- ① GRK2 の活性亢進・誘導原因物質の探索：glucose 濃度やオータコイド (Angiotensin II; Ang II) の影響を検討した。
- ② GRK2 と Akt/eNOS 経路の関与について、これらタンパク発現や活性の病態時を意識した高 glucose 暴露時における変化を解析した。
- ③ Akt 経路だけではなく、GRK2 が影響を及ぼすであろう経路 (MAPK) についても検討し、総合的に GRK2 抑制が及ぼす他のタンパクへの影響を解析することで、GRK2 阻害薬の創薬の可能性を検証した。

【*in vivo* 系】糖尿病モデル動物を用いて、様々な血管作動性物質による血管反応をリアルタイムに観察し、病態時における反応性変化を検討した。また、*in vitro* 実験で得た結果をもとに、血管反応における Akt/eNOS をはじめとする種々のタンパクや酵素の発現・活性変化、胸部大動脈弛緩因子である NO 動態に関して詳細にトレースした。さらに、糖尿病モデル動物への GRK2 阻害薬の投与を試みることで、治療的効果について立証した。

3. 結果

【*in vitro* 系】ヒト血管内皮細胞 (HUVEC; ヒト臍帯静脈内皮細胞) を用いた培養実験系を立ち上げ、それによって、以下の結果を得た。

- ① GRK2 誘導原因物質の探索：これまでに得られている研究結果や報告 [2-4] から今回、強力な血管収縮物質である Ang II やリゾホスファチジルコリン (LPC)、過酸化水素を HUVEC に処置したところ、48 時間経過後も GRK2 の誘導は起こらなかった。しかしながら、high glucose 処置下に同様に上記物質を同時に処置すると、Ang II 処置時のみ GRK2 誘導が観察された。この現象は、Ang II の濃度依存的に観察された。
- ② GRK2 と Akt/eNOS 経路の関与について：GRK2 誘導時 (high glucose + Ang II 処置 48 時間経過後)、clonidine 刺激による Akt/eNOS 経路を介した NO 産生について検討をした。

GRK2 誘導時、Akt や eNOS の発現量については変化が認められなかったが、Akt と eNOS のリン酸化量は有意に減少した。そして、GRK2 阻害薬を high glucose + Ang II と共に処置することにより、GRK2 の誘導を抑え、かつ、clonidine 刺激による Akt と eNOS リン酸化の低下が抑制された。この時の NO 産生についても同様に eNOS のリン酸化量に呼応する結果となった。

- ③ GRK2 誘導経路について：Ang II 単独処置においては時間依存的に NO 産生の増加がみられていたが、GRK2 の誘導は確認されなかった。しかし、大変興味深いことに、high glucose + Ang II 処置下においては、NO 産生が抑制され GRK2 の誘導が確認された。つまり、high glucose 処置下では、Ang II / Akt / eNOS / NO 産生という経路が抑制されることが示唆された。そこで、多くのタンパクと会合することが知られている GRK2 が他の経路活性へのスイッチングを引き起こしているのではないかと考え、まず、糖尿病時に活性化が報告されている MAPK 経路の関与を検討した。High glucose 処置下において Ang II 刺激によって活性化される経路を探索した。その結果、ERK1/2 のリン酸化が Ang II 単独処置では減少していくが、high glucose + Ang II 処置により GRK2 の誘導と共に増加していくことが明らかとなった。

【*in vivo* 系】Nicotinamide + STZ 誘発 2 型糖尿病モデルマウスを用いて検討した。このモデルは血糖値が高くインスリン抵抗性を示し、かつ高血圧を合併している。今回、胸部大動脈を用いた clonidine による血管弛緩反応を検討したが、この糖尿病モデルで弛緩反応は有意に減弱していた。またこの動物における胸部大動脈血管の GRK2 発現も増加していた。さらに、GRK2 阻害薬を単回投与した結果、コントロールレベルまでの血圧の低下、clonidine 誘発血管弛緩反応の改善が認められた。一方で、雌性 nicotinamide + STZ 誘発 2 型糖尿病モデルマウスは、血圧の上昇も clonidine 誘発血管弛緩反応の減弱も認められず、GRK2 発現の増加も認められなかった。更に GRK2 阻害薬を単回投与しても全く変化が認められなかった。胸部大動脈を用いて、clonidine 刺激時における Akt / eNOS / NO 産生経路について検討したが、雌性糖尿病においては、Akt も eNOS も発現量およびリン酸化量にコントロール群や GRK2 阻害薬処置糖尿病群との間に変化が認められなかった。NO 産生についても同様の結果となった。一方、雄性糖尿病群は、期待通り Akt や eNOS 発現は変化がなかったが、clonidine 刺激による Akt や eNOS のリン酸化および NO 産生が減少し、GRK2 阻害薬単投与によりこれら反応がコントロール群レベルまで改善した。

4. 考察と課題

本研究により以下の点について明らかとなった。

- ・ GRK2 は G protein coupled receptor (GPCR) やその他いくつかの基質をリン酸化し、シグナル伝達を惹起する重要なタンパクであるが、様々な病態において病態悪化因子として働いていることが報告されている。今回、2 型糖尿病モデルマウスにおいても GRK2 発現増大を確認し、GRK2 阻害薬処置により clonidine 誘発シグナル伝達および NO 産生・血管弛緩反応が改善されることから糖尿病においても GRK2 は病態悪化因子として働いていることが明らかとなった。

- ・ 高血圧を合併していない雌性 2 型糖尿病モデルマウスにおいては、GRK2 の増大・血管弛緩反応の減弱が認められなかった。このことから、雌においては GRK2 増大を抑制する因子が存在するのではないかと考えられたが、詳細については今後の検討を行うべきである [5]。

- ・ 内皮障害を惹起すると言われる様々な物質を HUVEC に処置することで、GRK2 と血管内皮障害の関与について検討した結果、高血圧の原因物質ともいわれる Ang II 処置により GRK2 発現が変化することを見出した。大変興味深いことに、Ang II 単独により 48 時間培養では GRK2 の発現誘導を確認することはなかったが、high glucose 及び Ang II 処置により誘導されることが明らかとなった。High glucose 単独処置においても GRK2 発現誘導は起こらないことから、high glucose と Ang II の相乗効果と考えられるが、詳細な機序については今後の検討課題である。ただし、高血圧を合併した糖尿病における心血管障害に対して、GRK2 を阻害することが新しい治療的戦略となりうることを提唱することができた。

- ・ さらに、GRK2 は様々なタンパクと会合することが知られているが、今回、GRK2 は Akt / eNOS / NO 産生経路を障害し、GRK2 阻害薬を処置することで改善することを明らかとした。つまり、*in vivo* 実験でみられる血管弛緩反応の減弱の原因が血管内皮細胞における GRK2 の Akt / eNOS 経路の障害によることを見出したのである。

- ・ 加えて、high glucose 及び Ang II 処置による ERK1/2 発現の増加を確認していることから、

MAPK シグナルの関与も明らかとなった。

以上、本研究によって、糖尿病病態時における Akt / eNOS シグナルの異常には、内皮細胞における GRK2 が密接に関与していること、また、高血糖と Ang II の相乗効果により GRK2 が誘導される可能性を示唆した。さらには、Akt シグナルと共に MAPK シグナルの関与も示唆されていた。また、雌においては、GRK2 抑制因子が存在することによる血管保護作用が働いている可能性を明らかとした。胸部大動脈においては、NO 産生シグナルが血管緊張性調節に重要であり、本研究で見出された成果が糖尿病性血管障害に対する治療戦略の一助となれば幸いである。

5. 発表論文、参考論文

- [1] **Taguchi K**, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. G protein-coupled receptor kinase 2, with β -arrestin 2, impairs insulin-induced Akt / eNOS signaling in *ob/ob* mouse aorta. *Diabetes*. 61(8):1978-1985 (2012)
- [2] **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 -arrestin2 translocation and ameliorating Akt / eNOS signal dysfunction. *Endocrinology*. 153(7):2985-2996 (2012)
- [3] **Taguchi K**, Kobayashi T, Takenouchi Y, Matsumoto T, Kamata K. Angiotensin II causes endothelial dysfunction via the GRK2 / Akt / eNOS pathway in aortas from a murine type 2 diabetic model. *Pharmacol Res*. 64:535-546 (2011)
- [4] **Taguchi K**, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Dysfunction of endothelium-dependent relaxation to insulin via PKC-mediated GRK2 / Akt activation in aortas of *ob/ob* mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301:H571-H583 (2011)
- [5] **Taguchi K**, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. Suppressed G-protein-coupled receptor kinase 2 activity protects female diabetic-mouse aorta against endothelial dysfunction. *Acta Physiol (Oxf)*. 207(1):142-155 (2013)