

発表番号 50 (0531)

## FRET コンストラクト遺伝子導入マウスを用いた食塩感受性高血圧における インスリン抵抗性と血管拡張不全の分子機構解明

迫田 秀之 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 浅野 知一郎 (東京大学大学院医学系研究科代謝生理学)  
 藤城 緑 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 穴井 元暢 (朝日生命成人病研究所)  
 櫛山 暁史 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 堀家 なな緒 (東京大学大学院医学系研究科代謝生理学)

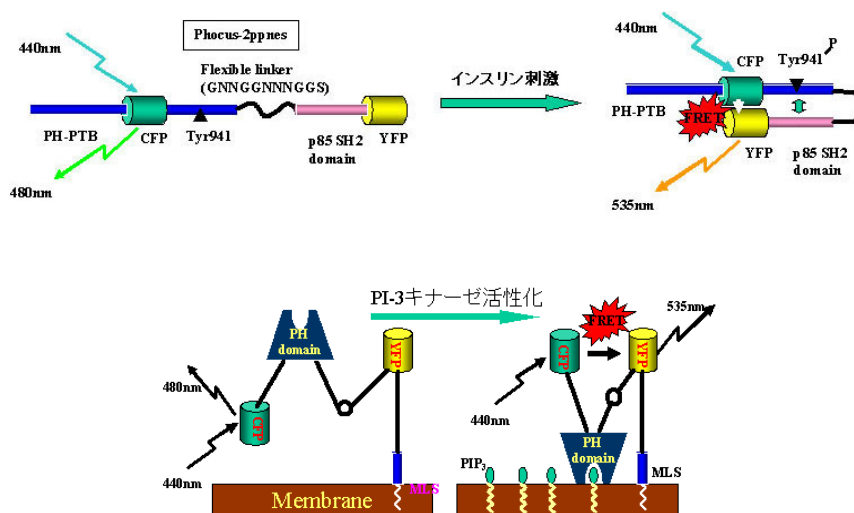
インスリンによる血管拡張作用は、インスリン受容体→IRS 蛋白リン酸化→PI 3-キナーゼ活性化(PI3,4,5-P<sub>3</sub>量の増加)→Akt 活性化→eNOS 活性化→NO 増加、cGMP 増加といった機序を介するとされている。一方、塩分感受性高血圧によるインスリン抵抗性症候群では、血管拡張機能不全や動脈硬化などの進行が引き起こされるが、心臓、大動脈、毛細血管、腎内血管など各種の血管において、どの段階で上記のシグナルが障害されているかは殆ど明らかにされていない。そこで、我々は、FRETを用いて生体内の単一細胞におけるシグナル伝達経時的に検出できるシステムの開発を試みた。

インスリンによる血管拡張の各段階の機序を測定する蛍光センサーを作成した。これらの蛍光センサーはいずれも CFP と YFP を含み、構造変化によって CFP と YFP が接近すると FRET による 535 nm の蛍光

が検出されるように作製されている(下図)。

これらの蛍光センサーを、アデノウイルスベクターに組み込んだ。PC12 細胞や HepG2 細胞に感染させ、Western blotting 法や蛍光顕微鏡で発現を確認できた。また、NGF やインスリンでこれらの蛍光センサーを発現した細胞を刺激し、FRET を測定した。その結果、各刺激によって、IRS 蛋白リン酸化、PI 3-キナーゼ活性が約 1.5 倍から 2 倍に増加する様子を経時的に観察することが出来た。

今回、われわれは、FRET を利用した蛍光センサーの開発に成功した。また、これまでにさまざまな高食塩食負荷ラットにおけるインスリン抵抗性機序や、RELMβ による血管障害などについても検討を進めている。今後、これらの蛍光センサーを利用して、これらのモデルの解析をさらに進めていく予定である。





助成番号 0531

## FRET コンストラクト遺伝子導入マウスを用いた食塩感受性高血圧における インスリン抵抗性と血管拡張不全の分子機構解明

迫田 秀之 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 浅野 知一郎 (東京大学大学院医学系研究科代謝生理学)  
 藤城 緑 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 穴井 元暢 (朝日生命成人病研究所)  
 櫛山 暁史 (東京大学医学部附属病院糖尿病代謝内科)  
 堀家 なな緒 (東京大学大学院医学系研究科代謝生理学)

### 1. 研究目的

シグナル伝達研究は多くの場合、細胞の可溶化から免疫沈降といった手法を用いて検討される。しかし、この手法では、血管のように、組織中に少数含まれる細胞におけるシグナル伝達を詳細に検討することは困難である。インスリンによる血管拡張作用は、インスリン受容体→IRS 蛋白リン酸化→PI 3-キナーゼ活性化 (PI3,4,5-P<sub>3</sub> 量の増加)→Akt 活性化→eNOS 活性化→NO 増加、cGMP 増加といった機序を介するとされている。一方、塩分感受性高血圧によるインスリン抵抗性症候群では、血管拡張機能不全や動脈硬化などの進行が引き起こされるが、心臓、大動脈、毛細血管、腎内血管など各種の血管において、どの段階で上記のシグナルが障害されているかは殆ど明らかにされていない。そこで、我々は、FRET を用いて生体内の単一細胞におけるシグナル伝達経時的に検出できるシステムを構築し、塩分感受性高血圧における血管機能障害の成因解明や治療方法の開発に役立てたいと考えている。

具体的には、FRET を引き起こす cDNA コンストラクトをアデノウイルスやトランスジェニックマウスの系で導入し、塩分感受性高血圧モデルにおいて各部分の血管におけるインスリンシグナルがどのように障害されているかを FRET を用いて解明する。さらに、チアゾリジン系薬剤やスタチン系薬剤、ARB 等による改善の作用機序を明らかにしたい。

本研究のように、生体における細胞内シグナル伝達を蛍光発色によって持続的に検出していくシステムは、当然のことながら、未だ殆ど開発されておらず、本計画は分析化学の手法を分子生物学に持ち込んだ極めて先進的な手法である。この独創的なシステムを用い、細胞内の PIP<sub>3</sub> 量、細胞内 AMP 量、Akt 活性化、eNos 活性化、細胞内 cGMP 量などを組織中の intact の細胞で検出できるように発展させ、塩分感受性高血圧における血管機

能障害の解明を進めることは、新規の血管拡張薬の開発に結びつく情報が得られる意義深い計画と考えている。

### 2. 研究方法

血管拡張に関与するインスリンシグナルの各段階を検出する蛍光センサーの作製

インスリン受容体→IRS 蛋白リン酸化→PI 3-キナーゼ活性化 (PI 3, 4, 5-P<sub>3</sub> 量の増加)→Akt 活性化→eNOS 活性化→NO 増加、cGMP 増加の経路はインスリンによる血管拡張の機序であるが、この各段階を測定する蛍光センサーを作製する。これらの蛍光センサーは、いずれも CFP と YFP を含み、構造変化によって CFP と YFP が接近すると FRET による 535 nm の蛍光が検出されるように作製されている。

我々は、すでに、インスリン受容体が IRS 蛋白をリン酸化する過程を FRET によって持続的に検出する蛍光センサーの開発を世界に先駆けて成功させた (Figure 1)。さらに、細胞内リン酸化 PIP<sub>3</sub> 量 (Figure 2)、Akt による eNOS 活性化、cGMP 産生量を FRET の発光によって計測できる蛍光センサーの作製にもすでに成功している。

そこで、これらを発現させるためのアデノウイルスを作製し、初代培養血管内皮細胞等の培養細胞に感染させることで、FRET コンストラクトを発現させ、単一細胞におけるインスリン蛍光センサーを発現するトランスジェニックマウスを用いた塩分感受性モデル動物の血管拡張障害機構の解明さらに我々は細胞内リン酸化 PIP<sub>3</sub> 量および cGMP 産生量を検出する FRET コンストラクトを安定に発現するトランスジェニックマウスを作製している段階である。これらの蛍光センサーを発現するトランスジェニックマウスを用いて、大動脈のほか、肝臓や筋肉、腎臓内の血管内皮細胞や動脈硬化巣部分におけるシグナルの変化を経時的かつ空間的にモニターできる系を構築する。

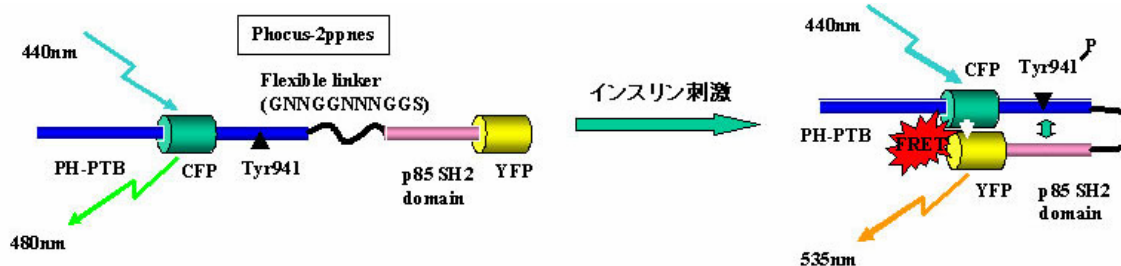


Figure 1

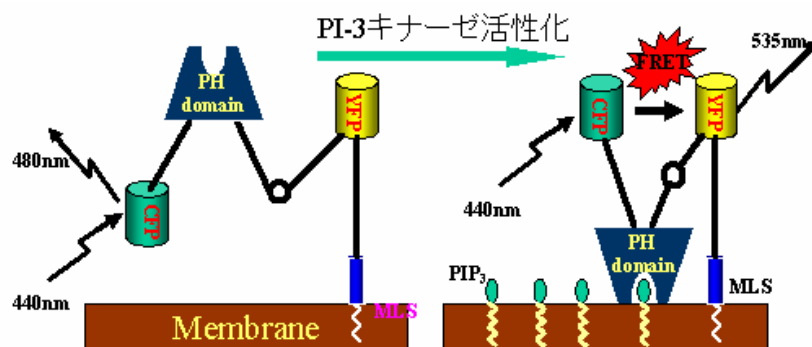


Figure 2

トランスジェニックマウスからは、組織より切片を切り出し、インスリン刺激後、440 nm の蛍光で励起し、FRET による 535 nm の蛍光を測定する。これによって、血管を構成する少数の細胞でのインスリンシグナルを intact な状態で定量的かつ経時的に検討するシステムを確立させたい。このマウスと塩分感受性高血圧マウスとを掛け合わせることで、血圧変化や動脈硬化の様々なステージにおける、血管内の種々の細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ、泡沫細胞など)におけるシグナルの変化を、血管拡張作用との関係について、経時的かつ空間的にモニターすることを可能にする。

また、血管保護(抗動脈硬化)作用を呈すると期待される治療薬物が血管のインスリンシグナル伝達、cGMP 合成にどのような影響を与えるかを検討進める。具体的には、チアゾリジン系薬剤やスタチン系薬剤、ARB の硬化を検討する。将来的には、この FRET のシステムを発展させることで、塩分感受性高血圧の血管機能を改善させる薬剤のスクリーニングに応用できる可能性を検討したい。

### 3. 研究結果

これらの 5 種類の蛍光センサーを、アデノウイルスベクターに組み込んだ。293 細胞、PC12 細胞や HepG2 細胞

に感染させ、抗 GFP 抗体を用いた Western blotting 法で予想される高さにバンドを確認できた。また、これらの蛍光センサーを発現させた細胞を蛍光顕微鏡で観察し、特定の波長によって蛍光が励起されることが確認できた。

次に、蛍光センサーを発現させた PC12 細胞を NGF で、HepG2 細胞をインスリンで刺激し、FRET を測定した。その結果、各刺激によって、IRS 蛋白質リン酸化、PI 3-キナーゼ活性が約 1.5 倍から 2 倍に増加する様子を経時的に観察することが出来た。

また、アデノウイルスをマウス尾静脈から注入することによって、マウス肝に蛍光センサーを発現させることを試みた。ウイルスを注入後 5 日後に、肝細胞の初代培養を行い、蛍光センサーの発現を、Western blotting 法、蛍光顕微鏡で検討した。ところが、Western blotting 法では、予想される高さより低い大きさのところにバンドが検出された。また、蛍光顕微鏡では、蛍光の励起が確認できなかった。

さらに、各蛍光センサーの transgenic mouse を作製した。各臓器における蛍光センサーの発現を Western blotting 法で確認したところ、マウス肝と同様に、予想される高さより低い大きさのところにバンドが検出され、蛍光顕微鏡では、蛍光の励起が確認できなかった。

#### 4. 考察と今後の課題

今回、われわれは、FRET を利用した蛍光センサーの開発に成功した。実際にアデノウイルスで培養細胞に発現させて、FRET の刺激による変化を経時的に観察することが出来た。

残念なことに、アデノウイルス静注マウスの肝や transgenic mouse では、蛍光センサーは発現しなかった。Western blotting 法で確認したところ、予想される高さより低い大きさのところにバンドが検出されたことより、蛍光センサーは、生体内においては異物と認識されてしまい、壊されてしまったものと考えられた。

我々はこれまでにさまざまな高食塩食負荷ラットにおけるインスリン抵抗性機序や、RELM  $\beta$  による血管障害などについても検討を進めている。今後は、これらの蛍光センサーを利用して、これらのモデルの解析をさらに進めていく予定である。

#### 参考文献

- Resistin-like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet. Kushiyama A, J Biol Chem. 280(51): 42016-25., 2005
- Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells. Sato M et al, Nat Biotechnol. 20(3): 287-94, 2002
- Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. Ogihara T et al, Hypertension. 40(6): 872-9, 2002
- High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. Ogihara T, Hypertension. 40(1): 83-9, 2002
- Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high-salt diet-fed rats. Ogihara T, Diabetes. 50(3): 573-83, 2001

0531

## Insulin resistance and impairment of vascular dilatation caused by high-salt induced hypertension in FRET construct transgenic mice.

Hideyuki Sakoda, Tomoichiro Asano, Midori Fujishiro, Motonobu Anai,  
Akifumi Kushiyama, Nanao Horike  
Graduate School of Medicine, University of Tokyo

### Summary

Vasodilatation caused by insulin activates three insulin receptor → IRS protein phosphorylation → PI-3-kinase (increase) → Akt activation → eNOS activation → NO quantity of PI3,4,5-P3 increases, and it is assumed that I go through the mechanism that I called cGMP increase.) On the other hand, for insulin-resistance by salt sensitivity high blood pressure, aggravation of vasodilatation malfunction or arteriosclerosis is caused, but it is not almost clarified which stage the signal mentioned above is affected at in various blood vessels such as a heart, the aorta, a capillary, a blood vessel in a kidney. Therefore we tried development of the system which we passed through signal transmission in a single cell in the living body with FRET and could detect for time.

I made the fluorescence sensor which measured mechanism of each stage of vasodilatation by insulin. These fluorescence sensors are made including CFP and YFP both so that the fluorescence of 535 nm by FRET is detected by a change of the structure when CFP and YFP approach it.

These fluorescence sensors were overexpressed PC12 cell or HepG2 cells using adenovirus vectors and were able to confirm expression with Western blotting method and a fluorescent microscope. In addition, I stimulated the cells which developed these fluorescence sensors with NGF or insulin and measured FRET. As a result, the FRET levels of IRS protein phosphorylation, PI 3-kinase activity were observed to increase by each stimulation from about 1.5 - 2 times for time, respectively.

We succeeded in development of the fluorescence sensor which used FRET this time. In addition, we have reported the forward examinations about insulin resistance mechanism in a various high salt food load rat or vascular lesion by RELM  $\beta$  till now. Using these fluorescence sensors, we are going to push forward analysis of these models more in future.