

糖尿病性血管機能障害における血小板由来因子との クロストークと治療戦略の確立

石田 恵子

星薬科大学 機能形態学研究室

Effect of platelet-derived factor on vascular endothelial dysfunction in diabetic rats.

Keiko ISHIDA

Department of Physiology and Morphology, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University

はじめに

近年、ライフスタイルの変化などにより増加の一途を辿っている糖尿病は、長期的な罹患により腎症、網膜症、神経障害など、糖尿病に特有の三大合併症を誘発する他、脳梗塞、心筋梗塞などのリスクファクターとなる重大な疾患である。糖尿病合併症は患者の quality of life (QOL) を著しく低下するばかりでなく、社会問題となっている医療費増加の一要因である。しかしながら、糖尿病合併症は血糖コントロールのみでは完全に予防することができないため、合併症の発症・進展の抑止を目的とした治療戦略の確立が重要な課題となっている。合併症の病理学的特徴は血管障害であり、糖尿病病態時において内皮細胞由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factors; EDRFs) と収縮因子 (endothelium-derived contracting factors; EDCFs) のバランス異常が報告されている。EDRF は、主に一酸化窒素 (nitric oxide; NO)、プロスタサイクリン (PGI₂)、内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) などがあり、EDCF は PGE₂、PGF₂、PGD₂、TXA₂ などのアラキドン酸代謝物、endothelin-1 などがあり、これらが相互にクロストークして血管緊張性が巧妙に調節されている¹⁾。このため EDRF と EDCF を介した細胞情報伝達機構障害の解明は、新たな治療ターゲットとなりうる可能性がある。

当研究室はこれまで、2型糖尿病モデルラット上腸間膜動脈において、内皮依存性弛緩反応の減弱や EDCF の一種である prostanoids 産生増加による血管収縮性異常を明らかにしており、これらの内皮機能障害は血小板凝集阻害薬である ozagrel²⁾ や cilostazol³⁾ 慢性投与に

より一部は正されることを見出ししてきた (Fig.1)。このため、血小板活性が内皮機能に影響を与えていることは明確である。実際に、糖尿病は早期より血小板の機能異常が観察され、血栓が生じやすいことが知られている⁴⁾。この血小板の機能異常は、血管機能障害の前段階から動物モデルやヒトにおいても認められる。したがって活性化血小板由来因子が、血管内皮機能障害の発症及び進展へ関与することが示唆されている⁵⁾。そこで私は、糖尿病時における血小板由来因子が血管内皮機能に及ぼす影響について検討を行ったので、ここに述べる。

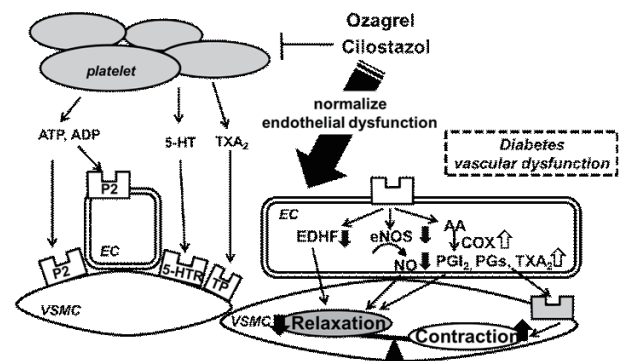


Fig. 1. Treatment with anti-platelet drugs has improved on diabetic vascular dysfunction. The release of vasoactive mediators by platelets (left). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in mesenteric arteries in diabetic rats (right). EC = endothelial cell, VSMC = vascular smooth muscle cell, ATP = adenosine triphosphate, ADP = adenosine diphosphate, 5-HT = 5-hydroxytryptamine (serotonin), TXA₂ = thromboxane A₂, P₂ = purinergic receptor, 5-HT R = serotonergic receptor, TP = thromboxane receptor, EDHF = endothelium-derived hyperpolarizing factor, eNOS = endothelial nitric oxide synthase, NO = nitric oxide, AA = arachidonic acid, COX = cyclooxygenase, PGI₂ = prostacyclin, PGs = prostanoids.

1. GK ラット上腸間膜動脈における細胞外 nucleotides 誘発収縮反応の検討

細胞外 nucleotides (ATP、UTP) は、活性血小板だけでなく内皮細胞から放出され、血管において内皮、平滑筋細胞膜上の P2X (P2X₁-P2X₇)、P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, and P2Y₁₁-P2Y₁₄) receptor に作用することで、EDRF、EDCF とともに遊離し、血管緊張性だけでなく血栓防止などにも重要な役割を果たす物質の一つである^{6,7)}。このため、糖尿病時における purinergic signaling を介した血管緊張性調節メカニズムを明らかにし、新たな障害機序の解明を試みた。2 型糖尿病モデル Goto-Kakizaki (GK) ラット(37-42 週齢)上腸間膜動脈では対照群と比較し、細胞外 nucleotides (ATP、UTP) に対する収縮反応性の増大が観察された (Fig.2)。これは内皮除去標本や cyclooxygenase (COX) 阻害薬、P2Y receptor antagonist で抑制されることから、内皮の P2Y-receptor を介した COX 由来のプロスタノイドが収縮反応性増大に寄与していると考えられる。実際、上腸間膜動脈において ATP、UTP 刺激下の PGE₂、PGF_{2α} 産生量の増加が糖尿病群で認められた (Fig.3)。

プロスタノイドは phospholipase A₂ (PLA₂) により細胞膜より遊離したアラキドン酸が COX により変換されるアラキドン酸カスケードより産生される。生体内に存在する種々の PLA₂ 分子種のうち細胞質型 PLA₂ (cPLA₂) の活性化は、agonist による細胞内 Ca²⁺ 上昇や Ser⁵⁰⁵ のリン酸化により誘起される。しかしながら、高血糖やインスリン、angiotensin II (Ang II) 刺激でも活性が誘発されるため、炎症病態時の関与が指摘されている。このため細胞外 nucleotides 刺激時の phospho-cPLA₂ 発現並びに COX-1、COX-2 発現について検討したところ、糖尿病群において上昇が認められた。また superoxide は、EDCF 誘発収縮反応を増大させることが知られているが、上腸間膜動脈における superoxide 産生は糖尿病群で増大していた。

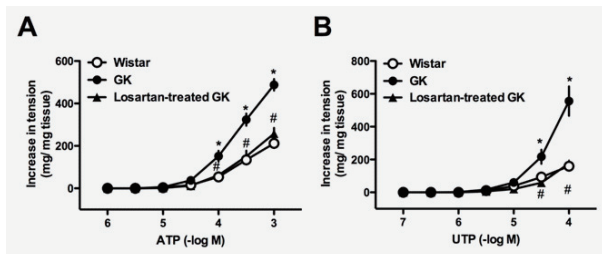


Fig. 2. Short-term (2 weeks) treatment with losartan suppresses nucleotide-induced contractions in GK rats. (A) and (B) concentration-response curves for ATP-induced (A) or UTP-induced (B) contractions in rings of mesenteric arteries obtained from Wistar, GK, and losartan-treated GK rats. Data are means ± SE from 8-12 experiments. **P* < 0.05, the GK group vs. the Wistar group. #*P* < 0.05, the losartan-treated GK group vs. the GK group.

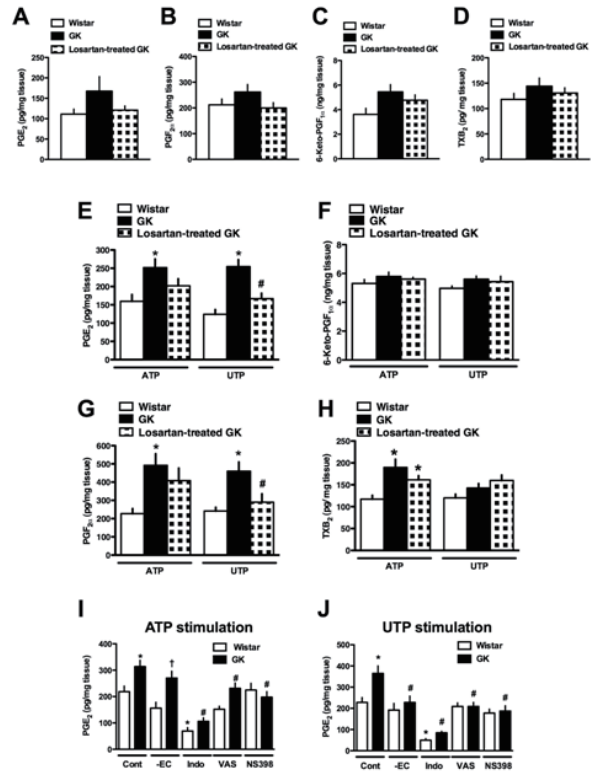


Fig. 3. Release of prostanoids [PGE₂ (A and E), PGF_{2α} (B and G), 6-keto-PGF_{1α} (a stable metabolite of prostacyclin; C and F), and thromboxane (TX) B₂ (a stable metabolite of TX A₂; D and H)] from rings of mesenteric arteries isolated from Wistar, GK, and losartan-treated GK rats either without (A-D) or with (E-H) stimulation by 3 × 10⁻⁴ M ATP or 10⁻⁴ M UTP. I and J: effects of endothelial denaturation or COX inhibitors (10⁻⁵ M Indo, 10⁻⁴ M VAS, or 10⁻⁶ M NS-398) on PGE₂ release from rings of mesenteric arteries isolated from Wistar and GK rats upon stimulation with either 3 × 10⁻⁴ M ATP (I) or 10⁻⁴ M UTP (J). Data are means ± SE from 6-12 experiments. **P* < 0.05 vs. the Wistar group in (E), (G), and (H). #*P* < 0.05, the losartan-treated GK group with UTP vs. the GK group with UTP in (E) and (G). In (I) and (J), **P* < 0.05 vs. the Wistar control group. #*P* < 0.05 vs. the GK control group. †*P* < 0.05 vs. the Wistar group with endothelium denaturation.

Ang II は、血圧調節に関与するのみならず、superoxide 産生にも関与することから、血管に対して多彩な作用を示すペプチドである。このため種々の病態に対する関与が指摘され、Ang II type I receptor blockers (ARBs) が 2 型糖尿病患者の血管機能障害に有用であることが報告されている⁸⁾。そこで、ARB である losartan (25 mg/kg/day; 2 week) 投与群を作成し、細胞外 nucleotides 誘発収縮反応増大に対する影響について検討した。その結果、losartan 投与により、ATP、UTP 誘発収縮反応、UTP 刺激下の PGE₂、PGF_{2α} 産生量、phospho-cPLA₂ level、COX-2 発現、superoxide 産生の是正が認められた。これらの結果より、2 型糖尿病時における ATP、UTP 収縮反応性の増大は内皮の

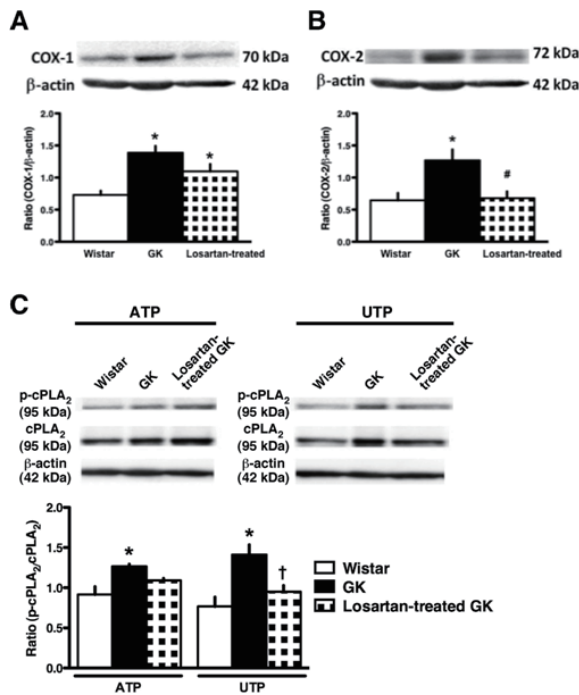


Fig. 4. *A* and *B*: analysis of COX-1 (*A*) and COX-2 (*B*) protein expressions in mesenteric arteries from Wistar, GK, and losartan-treated GK rats. Data are means \pm SE from 6-8 experiments. * $P < 0.05$ vs. the Wistar group. # $P < 0.05$, the losartan-treated GK group vs. the GK group. *Top*: representative Western blot is shown (The same samples were loaded on the same gel for COX-1; COX-2, and β -actin. Therefore, the β -actin loading control blot in figure appeared to be the same.) (*C*) Western blots for ATP (3×10^{-4} M)-induced or UTP (10^{-4} M)-induced cPLA₂ phosphorylation in mesenteric arteries obtained from Wistar, GK, and losartan-treated GK rats. Ratios were calculated for the optical density of phosphorylated (p)-cPLA₂ over that of cPLA₂. Data are means \pm SE from 6 experiments. * $P < 0.05$ vs. the corresponding Wistar group. # $P < 0.05$, the losartan-treated GK group vs. the GK group. † $P < 0.05$, the losartan-treated GK group with UTP vs. the GK group with UTP.

P2Yreceptor を介した cPLA₂/COX 経路の活性による EDCF 産生増大によることが明らかとなった。また losartan はこれらのシグナルを抑制したが、これには酸化ストレス低下が一要因だと考えられる⁹⁾。

2. GK ラット上腸間膜動脈における PGE₂ 収縮反応性増大メカニズムの検討

続いて、P2Y 刺激時において特に産生量が増加していた prostanoids の一つである prostaglandine E₂ (PGE₂) に着目した。EDCF の一つである PGE₂ は、糖尿病や高血圧症など心血管病態時においてその産生が増大する¹⁰⁾。ATP、UTP 収縮反応性の増大は、血管内皮細胞における PGE₂ 産生量増加だけでなく、平滑筋細胞における PGE₂ の感受性増大も一因ではないかと考え、GK ラットを用い、長期的に糖尿病に罹患した状態での

PGE₂ 収縮反応性の変化について検討を行った。対照群と比較して糖尿病群において、内皮除去標本および、NOS 阻害薬 (L-NNA) 前処置下での PGE₂ 収縮反応性の増大が観察されたため、PGE₂ 収縮反応は血管平滑筋を介した反応であると考えられる。実際に、PGE₂ receptor は4つのサブタイプ (EP1-EP4) が存在し¹¹⁾、中でも血管平滑筋細胞に存在する EP1、EP3 receptor を介し、血管収縮反応が惹起されることが報告されている¹²⁾。そこで、EP1-/EP3-receptor agonist (sulprostone) による収縮反応性、並びに EP1-receptor antagonist 存在下での PGE₂、sulprostone 収縮反応を検討し、収縮増大に寄与する受容体について検討した。EP1-/EP3-receptor agonist による収縮反応性は、PGE₂ 収縮同様、糖尿病群において増大が認められた。しかしながら、EP1 receptor antagonist (sc-19220) 存在下では、対照群、糖尿病群いずれにおいても PGE₂ 並びに EP1-/EP3-receptor agonist による収縮反応は影響を受けなかった (Fig. 5)。このため、上腸間膜動脈における PGE₂ 収縮は EP3-receptor を介した

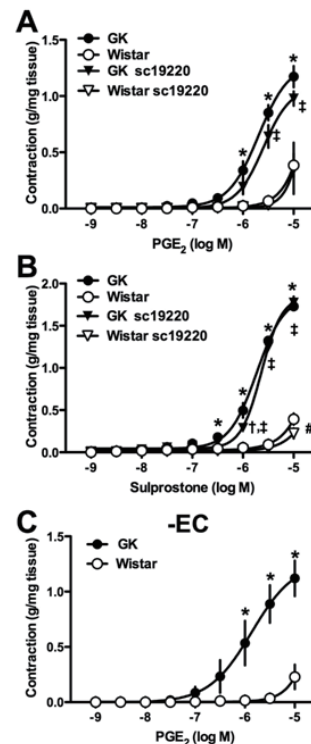


Fig. 5. Effects of EP1 antagonist on PGE₂-induced vasoconstriction in superior mesenteric artery rings from GK rats. Concentration-response curves for PGE₂ (*A*) and sulprostone (*B*) in the presence of 10^{-4} M L-NNA or 10^{-4} M L-NNA plus 10^{-5} M sc19220, and for PGE₂ following endothelial denatation (*C*). Data, which are shown for superior mesenteric arteries from diabetic GK and control Wistar rats, are means \pm SE ($n = 5$ or 6). * $P < 0.05$, GK vs. Wistar. # $P < 0.05$, Wistar vs. Wistar sc19220. † $P < 0.05$, GK vs. GK sc19220. ‡ $P < 0.05$, GK sc19220 vs. Wistar sc19220.

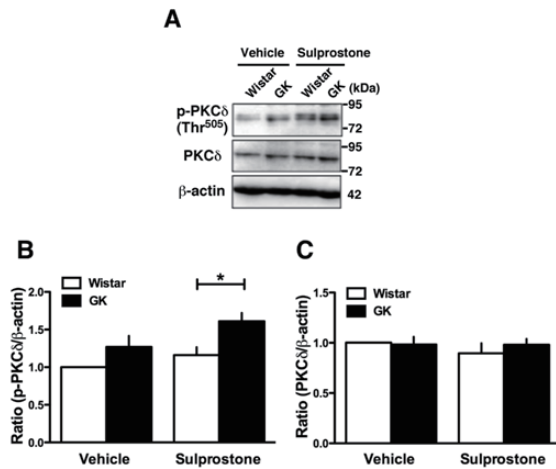


Fig. 6. Phosphorylation of PKC δ by EP3 agonist in superior mesenteric arteries from diabetic GK rats. Phospho-PKC δ (Thr⁵⁰⁵) and total PKC δ protein contents were assessed by Western blotting in superior mesenteric artery rings stimulated with sulprostone (10^{-5} M), or treated with vehicle, for 10 min. (A) Representative blots are shown for phosphorylation of PKC δ at Thr⁵⁰⁵ (p-PKC δ) and for PKC δ in Wistar and GK arterial rings stimulated with sulprostone or without stimulation (vehicle), in each case in the presence of 10^{-4} M L-NNA. Bands for phospho-PKC δ (B) or total PKC δ (C), or for β -actin, were quantified, ratios being calculated for the optical density of phospho- or total PKC δ over that of β -actin. Data are means \pm SE from eight experiments. * P <0.05, GK vs. corresponding Wistar.

反応であり、EP3-receptor signal が糖尿病時の収縮増大に寄与していると考えられる。

Protein kinase C は収縮調節キナーゼの一つであり、cPKC (α , β I, β II and γ)、nPKC (δ , ϵ , θ , and η)、aPKC (ζ , λ) の3つのサブファミリーに分類される。このうち血管平滑筋収縮には、PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ が重要だと考えられている¹³⁾。近年、EP3-receptor を介した血管平滑筋収縮反応に PKC δ の関与が報告された¹²⁾。このため、PKC δ 阻害薬 (rottlerin) 存在下での EP1-/EP3-receptor agonist による収縮反応を検討したところ、糖尿病群において収縮反応性増大の抑制が認められた。さらに糖尿病群上腸間膜動脈では、EP1-/EP3-receptor agonist 刺激による PKC δ (Fig. 6)、並びに平滑筋収縮調節因子である caldesmon の活性上昇が認められた。このため、GK ラット上腸間膜動脈における PGE₂ 収縮反応性の増大は、血管平滑筋の EP3 receptor を介した PKC δ 活性増加の関与が示唆された¹⁴⁾。したがって、ATP、UTP 収縮反応性の増大は、血管内皮細胞における PGE₂ 産生量増加だけでなく、平滑筋細胞における PGE₂ の感受性増大も一因であると考えられる。

3. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット上腸間膜動脈における extracellular nucleotides 誘発弛緩反応の検討

一方、細胞外 nucleotides は P2Y₁、P2Y₂ receptor に作用することで、血管弛緩反応に関与することも報告されている¹⁵⁾。EDRF の一つである NO は eNOS から産生され、その活性は Ca²⁺/calmodulin だけでなく様々なキナーゼによりリン酸化されることで調節されている¹⁶⁾。種々存在する eNOS のリン酸化サイトのうち、活性調節は Ser¹¹⁷⁷、抑制調節は Thr⁴⁹⁵ 部位が担っており、eNOS 活性低下による NO 産生低下が、糖尿病性血管機能障害を引き起こす一因であることが報告されている¹⁷⁾。そこで今回、糖尿病病態時における細胞外 nucleotides の弛緩反応性変化、特に 1 型糖尿病を長期的に罹患した状態での細胞外 nucleotides の血管反応の変化について検討を行った。実験には 8 週齢の雄性 Wistar ラットに streptozotocin (STZ; 65 mg/kg) を尾静脈注射し、投与後 50-57 週経過した動物 (58-65 週齢) を STZ 誘発糖尿病ラットとして用いた。対照群と比較し糖尿病群において、ATP 誘発弛緩反応 (非選択的 P2 agonist) は変化が認められなかったのに対し、ADP 誘発弛緩反応 (P2Y₁receptor agonist) 並びに P2Y₁ receptor selective agonist (2-MeSADP) 誘発弛緩反応は減弱が認められた (Fig. 7)。この ADP 誘発弛緩反応は、両群ともに内皮除去標本、NOS 阻害薬 (L-NNA)、P2Y₁ receptor selective antagonist (MRS2179) 処置によりほぼ完全に抑制されたことから、内皮細胞の P2Y₁-receptor を介した NO 依存性の弛緩反応であり、糖尿病時このシグナルが障害されていると考えられる。実際に糖尿病群上腸間膜動脈において、ADP 刺激時の NO 代謝物産生量、eNOS の Ser¹¹⁷⁷ 部位のリン酸化タンパク発現が有意に低下していた (Fig. 8)。興味深いことに、両群間において P2Y₁-receptor の発現量の変化は認められなかった。このた

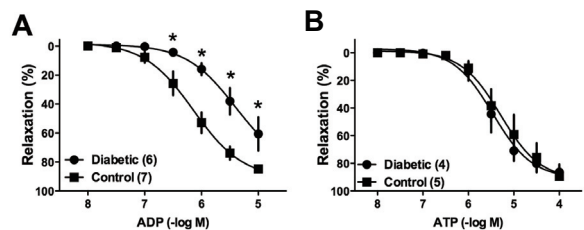


Fig. 7. P2Y₁-agonist-mediated relaxation is impaired in diabetic superior mesenteric arteries. Concentration-response curves for adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP) (A), and adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP) (B). Data, which are shown for superior mesenteric arteries from diabetic and control rats, are means \pm SE, with the number of determinations being shown within parentheses. * P <0.05 vs. control.

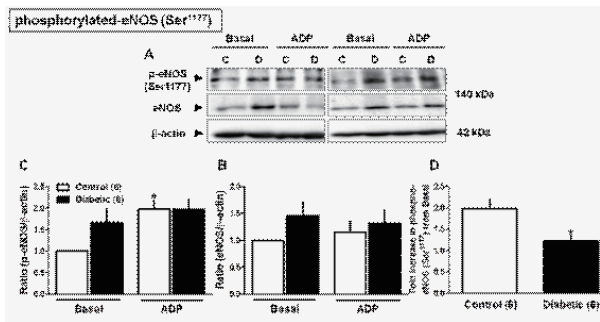


Fig. 8. Phosphorylation of endothelial NO synthase (eNOS) at Ser¹¹⁷⁷ by adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP) is reduced in superior mesenteric arteries from diabetic rats. Phospho-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) and total eNOS protein contents were assessed by Western blotting in superior mesenteric rings treated with ADP (3×10^{-6} M) or vehicle (basal) for 15 min. (A) Representative blots are shown for phosphorylated eNOS (A: Ser¹¹⁷⁷), as well as for eNOS, in control and diabetic arterial rings, in each case with ('ADP') or without ('Basal') stimulation with ADP. (B) Bands for eNOS and β -actin quantified, ratios being calculated for the optical density of eNOS over that of β -actin. (C) Quantification of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ (C). Ratios were calculated for the optical density of phosphorylated p-eNOS over that of β -actin. (D) Quantification of eNOS phosphorylation (D: Ser¹¹⁷⁷): y-axis shows fold increase (vs. corresponding basal). Data are means \pm SE, with the number of determinations being shown within parentheses. * $P < 0.05$ vs. corresponding control.

め、receptor 以降のシグナル減弱が関与していると考えられる。すなわち、糖尿病時には細胞外 nucleotides は、内皮の P2Y₁-receptor を介したプロスタノイド産生増加による収縮増大だけでなく、内皮の P2Y₁-receptor を介した NO シグナリングの障害により、弛緩減弱も起きており、purinergic signalling の血管緊張性調節破綻により内皮機能障害が惹起されていることが示唆された¹⁸⁾。

4. 糖尿病時における血小板及びマイクロパーティクルの血管内皮機能への影響

先の研究より、糖尿病性血管障害時、血小板由来因子の刺激による血管反応性変化、並びにシグナル伝達障害起きることが示された。このため、糖尿病時における血小板の活性化亢進が血管内皮機能不全を誘発するのではないかと考え、STZ 誘発糖尿病ラットより血小板の精製を行い、これらが血管内皮機能に及ぼす影響について検討した。

実験に用いた糖尿病群は対照群と比較し、血糖値、血中コレステロール値、トリグリセリド値、遊離脂肪酸値の増加、総頸動脈における ACh 誘発内皮依存性弛緩反応の減弱が観察された。このように血管内皮機能が障害されている糖尿病群並びに対照群の動脈血より血小板を

精製した。各群の血小板は対照群より抽出した総頸動脈に処置し、ACh 並びに sodium nitroprusside (SNP) 誘発内皮非依存性弛緩反応を検討し、血小板の内皮機能への影響を検討した。その結果、糖尿病群由来の血小板処置群は、対照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 (Fig. 9) 並びに、無処置群と比較し eNOS の Ser¹¹⁷⁷ 部位のリン酸化タンパク発現低下が認められた。このため血小板より放出される血管機能障害因子として、マイクロパーティクル (microparticle: MP) に着目した。

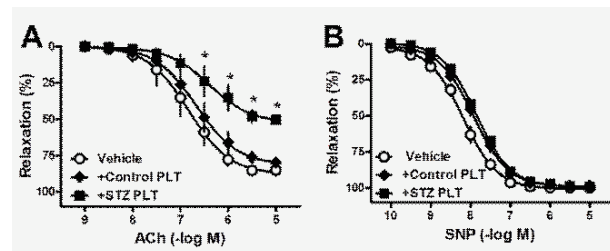


Fig. 9. Effect of platelet on ACh-induced relaxation. Concentration-response curves for ACh-induced (A) or SNP-induced (B) relaxations in rings of carotid arteries obtained from control rats. Ordinate shows relaxation as a percentage of phenylephrine-induced contraction. Carotid arteries were exposed for 30 min to platelet isolated from control rats and STZ rats. Data are means \pm SE for 5 experiments. * $P < 0.05$ the control PLT-treated group vs. the STZ PLT-treated group.

MP は、細胞はずり応力や agonist 刺激を受けた際に放出する 0.1~1.0 μ m の膜小胞体である。血小板だけでなく、赤血球や白血球、血管内皮細胞等、血球由来細胞からも産生される。MP はプロコアグulant 活性だけでなく、産生の起源となった細胞の膜抗原を含有するため、細胞間の接着を促進し炎症病態時の発症・進展に関与する物質として注目されている¹⁹⁾。近年、MP が糖尿病や動脈硬化、急性心筋梗塞等の血栓性疾患時に産生が上昇することが報告され始めてきた²⁰⁾。そこで、STZ 誘発糖尿病ラットより MP の精製を行い、血小板による血管内皮機能障害に MP が関与するか検討した。MP は全血 5 mL より得られる platelet poor plasma (PPP) を遠心分離し調製した。対照群より抽出した総頸動脈に MP を処置し、24 時間培養を行った。その結果、対照群由来 MP 処置群は生理食塩水処置群と比較して変化が認められなかったのに対し、糖尿病群由来 MP 処置群は ACh 誘発内皮依存性弛緩反応の減弱が認められた (Fig. 10)。このため、糖尿病群由来の血小板並びに MP は、内皮依存性弛緩反応を減弱させ、血管内皮機能障害を惹起することが明らかとなった。したがって、糖尿病に長期的に罹患した血小板は血管内皮機能障害促進因子として作用し、これは血小板より遊離された MP も関与する可能性が示唆された。

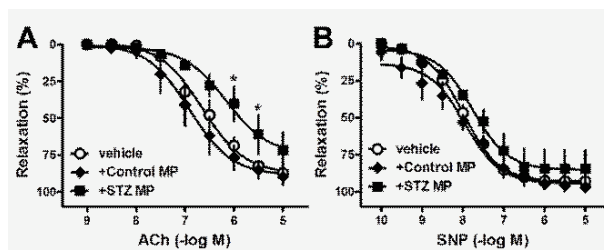


Fig. 10. Treatment with microparticles from STZ rats suppresses ACh-induced relaxation in rings of carotid arteries obtained from control rats. Carotid arteries were treatment for 24 h to microparticles isolated from control groups (+Control MP), STZ groups (+STZ MP) or vehicle. Concentration-response curves for ACh-induced (A) or SNP-induced (B) relaxations in rings of carotid arteries obtained from control rats. Data are means \pm SE for 3 experiments. * $P < 0.05$ the control MP-treated group vs. the STZ MP-treated group.

おわりに

血小板は血栓形成だけでなく、活性化された際、生理活性物質の放出や様々な分子を膜表面へ発現することで他細胞とクロストークする。このため炎症や免疫応答など生体反応に関与しており、糖尿病や動脈硬化など血栓性疾患の発症・進展を解明する上で無視できない存在である。

本研究の結果から、血小板由来因子による糖尿病性血管内皮機能障害の機序の一端が明らかになった。すなわち糖尿病の長期的な罹患は、細胞外 nucleotides 刺激による purinergic signal を介した血管緊張性調節も障害し、血管機能障害を惹起することが明らかとなった。また糖尿病時の血中 MP は、新たな血管内皮機能減弱因子である可能性が示唆された。しかしながら糖尿病時の MP による障害メカニズムについては全く不明である。MP の産生量が、MP に含まれる分子等、MP の質の問題かを明らかにすると共に、障害因子として働く MP の産生細胞を同定する必要がある。今後これらの点を明らかにしていくことで、糖尿病性血管障害の発症機序を解明し、新規治療戦略が確立されることを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、平成24年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜りましたことに深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、機能形態学研究室鎌田勝雄前教授並びに機能形態学研究室小林恒雄教授に心より感謝致します。最後に本研究に御指導、御協力頂きました松本貴之講師、田口久美子博士並びに同研究室の皆様へ深く感謝致します。

参考文献

- 1) Feletou, M. & Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H985-H1002 (2006).
- 2) Matsumoto, T., Takaoka, E., Ishida, K., Nakayama, N., Noguchi, E., Kobayashi, T. & Kamata, K. Abnormalities of endothelium-dependent responses in mesenteric arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats are improved by chronic treatment with thromboxane A_2 synthase inhibitor. *Atherosclerosis* **205**, 87-95 (2009).
- 3) Matsumoto, T., Noguchi, E., Ishida, K., Nakayama, N., Kobayashi, T. & Kamata, K. Cilostazol improves endothelial dysfunction by increasing endothelium-derived hyperpolarizing factor response in mesenteric arteries from Type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **599**, 102-109 (2008).
- 4) Natarajan, A., Zaman, A.G. & Marshall, S.M. Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of anti-platelet agents. *Diab Vasc Dis Res* **5**, 138-144 (2008).
- 5) Shimokawa, H. & Vanhoutte, P.M. Hypercholesterolemia causes generalized impairment of endothelial-dependent relaxation to aggregating platelets in porcine arteries. *J Am Coll Cardiol* **13**, 1402-1408 (1989).
- 6) Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1471-1483 (2007).
- 7) Erlinge, D. & Burnstock, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* **4**, 1-20 (2008).
- 8) Lindholm, L.H., Ibsen, H., Dahlof, B., Devereux, R.B., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Julius, S., Kjeldsen, S.E., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Nieminen, M.S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H., Aurup, P., Edelman, J. & Snapinn, S.; Study Group LIFE. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet* **359**, 1004-1010 (2002).
- 9) Ishida, K., Matsumoto, T., Taguchi, K., Kamata, K. & Kobayashi, T. Mechanisms underlying altered extracellular nucleotide-induced contractions in mesenteric arteries from rats in later-stage type 2 diabetes: effect of ANG II type 1 receptor antagonism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1850-H1861 (2011).
- 10) Natarajan, R. & Nadler, J.L. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1542-1548 (2004).
- 11) Woodward, D.F., Jones, R.L. & Narumiya, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* **63**, 471-538 (2011).
- 12) Kobayashi, K., Murata, T., Hori, M. & Ozaki, H. Prostaglandin E2-prostanoid EP3 signal induces vascular contraction via nPKC and ROCK activation in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* **660**, 375-380 (2011).
- 13) Salamanca, D.A. & Khalil, R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol* **70**, 1537-1547 (2005).

- 14) Ishida, K., Matsumoto, T., Taguchi, K., Kamata, K. & Kobayashi, T. Protein kinase C delta contributes to increase in EP3 agonist-induced contraction in mesenteric arteries from type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pflugers Arch* **463**, 593-602 (2012).
- 15) Boarder, M.R. & Hourani, S.M. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 99-107 (1998).
- 16) Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605 (1999).
- 17) Chen, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R. & Kemp, B.E. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* **443**, 285-289 (1999).
- 18) Ishida, K., Matsumoto, T., Taguchi, K., Kamata, K. & Kobayashi, T. Mechanisms underlying reduced P2Y₁-receptor-mediated relaxation in superior mesenteric arteries from long-term streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Physiol* **207**, 130-41 (2013).
- 19) Rautou, P.E., Vion, A.C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* **109**, 593-606 (2011).
- 20) Shantsila, E., Kamphuisen, P.M., & Lip, G.Y.H. Circulating microparticle in cardiovascular disease; implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **8**, 2358-2368 (2010).

Effect of platelet-derived factor on vascular endothelial dysfunction in diabetic rats.

Keiko ISHIDA

Department of Physiology and Morphology, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University

There is growing body of evidence suggested that vascular dysfunction in diabetes cause or contribute to the etiology of vascular complications such as nephropathy, neuropathy, and retinopathy. Although platelet activation is seen in diabetes states, the relationship between platelet and vascular function in diabetes remains unclear. In the present study, we investigated the effects of platelet, platelet-derived substances such as nucleotides, and platelet-derived microparticle on vascular functions including endothelial cell and smooth muscle cell in arteries from diabetic animal models. We found that 1) extracellular nucleotides (i.e., ATP and UTP)-induced vasoconstrictions were increased in diabetic arteries and these were attributable to increasing release of endothelium-derived contracting factors, 2) other nucleotide ADP-induced vasodilation was impaired in diabetic arteries due to reduction of endothelial nitric oxide synthase activity, and 3) platelet and microparticle isolated from diabetic rats led to impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from control rats. These findings suggested that platelet-derived factors or platelet itself could affect vascular function in diabetic states and the regulation of platelet function may be therapeutic target in diabetes-associated vascular dysfunction.