

平成22年4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19589002

研究課題名（和文） 心血管イベントを抑制する機能性食品素材の探索

研究課題名（英文） The screening of the new functional compounds for the prevention of cardiovascular events.

研究代表者

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00379942

研究成果の概要（和文）：我々は、致死的な心血管イベントを引き起こす血管攣縮（血管の異常収縮）の原因分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）とFynを同定し、その病的シグナル伝達経路を明らかにしてきた。本研究では、心血管の異常収縮を特異的に抑制する物質の探索を目的とし、病的シグナル伝達の反応の場と考えられる細胞膜上のマイクロドメイン「膜ラフト」と血管異常収縮の関連性についても検討した。その結果、血管の正常収縮には影響を与えず、SPCによって引き起こされる異常収縮のみを特異的に抑制する新規物質として、数種類の脂肪酸類、ポリフェノール類、植物抽出成分などを見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：Abnormal vascular smooth muscle (VSM) contraction (vasospasm) is one of the crucial phenomena which cause cardiac angina and myocardial infarction. We previously found that sphingosylphosphorylcholine (SPC) as an upstream mediator for the abnormal pathway through the activation of Fyn, a member of Src family tyrosine kinase. The localization of Fyn in cholesterol-enriched membrane microdomain, lipid rafts, suggest the essential roles of membrane lipid rafts in abnormal contraction. Therefore, we investigated the relationship between lipid rafts and SPC-induced Ca^{2+} -sensitization of VSM. In addition we screened novel compounds which could inhibit SPC-induced Ca^{2+} -sensitization. Some newly found compounds would be the candidates for novel functional food for vasospasm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：食品機能学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：心血管イベント、機能性食品、高脂血症（脂質異常症）、コレステロール、リポソーム、膜ドメイン、シグナル伝達、血管攣縮

1. 研究開始当初の背景

血管病とは、ある日突然襲ってくる血行障害であり、そのために、狭心症や心筋梗塞などの致命的な心血管イベントを引き起こす。我が国の血管病死亡者数は、ほぼガンと並び、死因の第2位を占め、食生活の欧米化に伴い更なる増加が懸念される。これまで、食生活や運動などの公衆疫学的指導と共に医療技術の開発・普及が図られてきたが、血管病の根本的撲滅を目指すには、医学的な成因の究明が重要であり、安全かつ有効な予防ならびに治療法の確立は緊急を要する課題である。血管病は、血管の中が狭くなって血液が流れなくなる病気であるが、その発症経路には二通りある。一つは、高脂血症・糖尿病・高血圧・喫煙・ストレスなどのリスクファクターによって引き起こされるもので、コレステロールなどが長い年月をかけて血管に蓄積し、動脈硬化を引き起こすタイプで、もう一つは、前述のリスクファクターがない健康な人においても、時と場所を選ばず、突然血管壁を構成している血管平滑筋が異常に収縮した状態（血管攣縮）を引き起こし、血液が流れなくなるタイプである。特に、後者の血管攣縮を伴う血管病は日本人に多く発症し、突然死の主要な原因となる致命的難病である。

通常、血管は、細胞質カルシウム依存性に収縮する事によって血圧や血流を一定に保っている（正常収縮）が、血管攣縮は、細胞質カルシウム濃度では説明がつかないカルシウム非依存性収縮である事が知られている。しかしながら、その上流の因子（直接の原因分子）は不明であり、また、その制御機構も不明なため、現在の血管病の治療薬は、原因の解っているカルシウム依存性の正常収縮を抑制したり、カルシウム濃度自体を低下させたりする薬剤が用いられている。その結果、十分な治療効果が得られないだけでなく、重篤な副作用が生じている。

近年、我々は、独自に開発した細胞質カルシウム濃度と張力の同時測定法、細胞膜に小孔を開けるスキンド法を用いて、血管攣縮を引き起こす原因分子としてスフィンゴシルホスホリコリン（SPC）と、その下流のシグナル分子であるFynを発見し、血管攣縮に特異的なシグナル伝達経路の一部を世界で初めて明らかにした

(Shirao et al., Circ. Res., 91, 112-119, 2002)。また、我々は、血管攣縮のシグナル伝達に膜コレステロールが必要である事、Fynの反応の場として膜ドメインが必要である事を突き止め、SPCによる血管攣縮がコレステロール依存性であることを発見した (Morikage et al., Circ. Res., 99, 299-306, 2006)。コレステロールは細胞膜に均一に分布するのではなく、細胞膜上のドメインである膜ラフトに局限して存

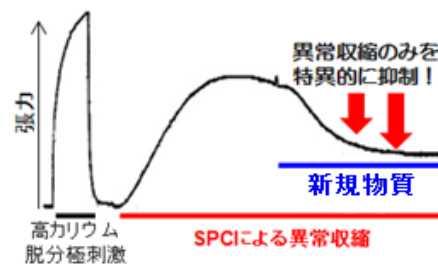
在する。膜コレステロールを選択的に除去すると膜ラフトの消失と共に血管病シグナル伝達も遮断されることから、コレステロールが蓄積した膜ラフトが血管攣縮を引き起こすシグナル伝達の反応の場となっている可能性が高い。しかしながら、血管平滑筋の膜ラフトは、その存在は示唆されるものの、役割については全く解明されていない。

2. 研究の目的

血管攣縮のシグナル伝達においてFynが中心的な役割を果たしているが、このFynは血管平滑筋収縮以外の細胞機能（細胞分裂や細胞遊走等）にも重要であるため、単なるFynの酵素阻害薬では重篤な副作用を引き起こす。そこで、Fynの活性化機構（細胞質から細胞膜への移動）を特異的に阻害する機能的阻害物質を探索した結果、魚油に含まれるエイコサペンタエン酸（EPA）を見出した (Nakao et al., Circ. Res., 91, 953-960, 2002)。しかしながら、以下の問題点により一部の血管病発症を阻止することができなかった。すなわち、①血管攣縮を抑制するためには、オール・シス型構造のEPAが必要であるが、抽出過程でエネルギー的に安定なトランス型に移行してしまうこと、②EPAは投与経路が内服に限られているため、EPAの腸からの吸収率が悪くなる中高年齢層の症例には効果が期待できないこと、である。そこで、本研究では、上記EPAの問題点を解決するために、血管攣縮に対するEPAの作用機構と膜ラフトの関連性を解明しつつ、並行して、血管攣縮を特異的に抑制する全く新しい食品素材の探索も行った。

3. 研究の方法

(1) 食品からの血管攣縮抑制物質の探索



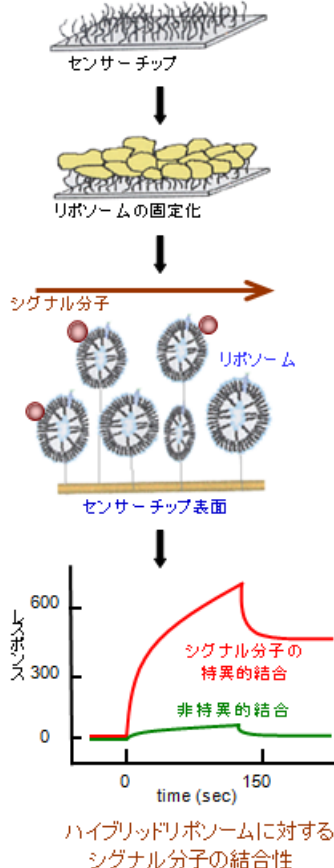
(図1) SPCが引き起こした異常収縮に対する、新規物質の特異的抑制パターン

我々が世界で初めて開発した、収縮とカルシウム濃度の同時測定法及びスキンド血管を用いて、Fynの活性化機構を特異的に阻害する事を指標とし、食品成分より機能性物質の探索を行った。さらに、得られた新規食品成分が、実際に血管の正常収縮（カルシウム依存性）には影響

を与える事なく、SPCによる血管の異常収縮（カルシウム非依存性）のみを選択的に抑制できるか詳細に検証した（図1）。

(2) 脂質膜に対するSPC及びEPAの親和性評価

培養細胞や動物モデルを用いた実験系は非常に重要であるが、細胞内の種々の多因子の影響を受けやすい。また、経費と時間の問題による個体数の制限や、個体差による再現性の問題もある。そこで、膜ラフトと特定のシグナル分子との相互作用を純粋な実験系で検討するため、ラフトドメイン様のハイブリッドリポソームを用いた。SPC及びEPAの膜通過・融合の効率を調べるため、ハイブリッドリポソームを用いた人工脂質膜を調製し、分子間相互作用解析装置（図2）で解析した。まず、ハイブリッドリポソームをセンサーチップに固定化し、マイクロ流路系に添加したSPC及びEPAとの分子間相互作用解析を行った。得られた結果より脂質膜に対するSPC及びEPAの親和性について数値化し、動力学解析（結合定数、解離定数など）も行った。



（図2）脂質膜と血管収縮シグナル分子との相互作用解析方法の概略

本研究で用いた分子間相互作用解析システムは、マイクロ流路系に脂質分子を添加することによりセンサー表面で起こる分子の結合や、解離により生じる微量な質量変化を解析することができるため、結合性の評価に最適であった。

(3) 血管収縮時の膜ラフトの視覚化

ハイブリッドリポソームをSPCで刺激し、クラスター化する膜ラフトの様子を走査型電子顕微鏡（SEM）及び原子間力顕微鏡（AFM）で観察した。SEMによる通常の観察手法では、高感度撮影を実現するために高真空観察の必要が不可欠であるが、含水試料の場合は試料中の水分が枯渇してしまう。そこで、低真空状態を保持したまま観察する機能を応用して観察像を得た。脂質膜の表面形状を観察した。さらに、膜の最表面構造ならびに物性について検討するため、AFMを用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 食品からの血管収縮抑制物質の探索

血管の正常収縮には影響を与えず、異常収縮のみを特異的に抑制する物質を探索した結果、数種類の脂肪酸類、ポリフェノール類、植物抽出物などから新規物質を見出すことができた。

(2) 脂質膜に対するSPC及びEPAの親和性評価

ラフトのモデル膜（ハイブリッドリポソーム）を調製し、病的シグナル分子群との親和性を評価した結果、血管異常収縮を引き起こすSPCは、コレステロールの濃度依存的に膜への親和性が増大し、さらに、スフィンゴ脂質の存在下で、膜との結合性が強くなる事を明らかにした。また、動力学解析の結果から、SPCは脂質膜に結合しやすく、一度結合したSPCは膜から離れにくいことも証明できた。

(3) 血管収縮時の膜ラフトの視覚化

走査型電子顕微鏡を用いて脂質膜の表面形状を観察したところ、膜ラフトの表面は、他の脂質膜表面に比べて、なだらかな構造をしていることを明らかにした。さらに、膜の最表面構造ならびに物性について検討するため、原子間力顕微鏡を用いて観察したところ、膜ラフトの最表面は全体的になだらかで、その中に10-50nmの突出したドメインが存在することを明らかにした。

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2件）

① 川道徳津美、岸博子、加治屋勝子、高田雄一、小林誠、血管異常収縮の分子機構と分子標的治療薬の探索、日本薬理学会誌、査読無、133、2009、124-129

② 加治屋勝子、岸博子、川道徳津美、小林誠、スフィンゴ脂質による血管収縮のカルシウム感受性制御の血管病における意義、血管医学、査読無、9、2008、223-238

[学会発表] (計9件)

- ①加治屋勝子、天然物由来の次世代型新規血管病治療薬の開発(3)、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月28日、東京大学(東京)
- ②加治屋勝子、血管平滑筋収縮のCa²⁺-sensitizationにおけるコレステロールと細胞膜ラフトの重要性、筋生理の集い、2009年12月19日、慈恵医科大学(東京)
- ③Katsuko Kajiya, Function of membrane rafts as a platform of cell signaling on abnormal vascular smooth muscle contraction, 36th International Union of Physiological Sciences, 2009年7月28日、京都国際会議場(京都)
- ④Katsuko Kajiya, Membrane rafts are novel platforms of signal transduction on abnormal vascular smooth muscle contraction, 32nd Annual Meeting of Japanese Working Group "Cardiac Structure and Metabolism", 2009年7月4日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
- ⑤加治屋勝子、天然物由来の次世代型新規血管病治療薬の開発(2)、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月27-29日、福岡国際会議場(福岡)
- ⑥加治屋勝子、天然物由来の次世代型新規血管病治療薬の開発(1)、日本農芸化学会中国支部第23回講演会、2009年1月24日、高知大学(高知)
- ⑦加治屋勝子、血管平滑筋の異常収縮におけるコレステロールと細胞膜ラフトの関与、第50回日本平滑筋学会、2008年7月3-4日、ホテルニューキャッスル(青森)
- ⑧Katsuko Kajiya, High affinity of sphingosylphosphorylcholine (SPC) for membrane rafts leading to abnormal vascular contraction, The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2008年3月27日、京王プラザホテル東京(東京)
- ⑨加治屋勝子、血管平滑筋のスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)誘導異常収縮における膜ラフトの役割、第59回日本生理学会中国四国地方会、2007年11月10日、徳島大学(徳島)

[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URL

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~lily>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00379942

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし