

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08203

研究課題名(和文) エストロジェンの心血管機能調節作用の解明：オキシトシンとビタミンDの関与の検証

研究課題名(英文) Clarification of action of estrogen to regulate cardiovascular function:
Validation of involvement of oxytocin and vitamin D

研究代表者

村田 拓也 (Murata, Takuya)

福井大学・ライフサイエンス支援センター・准教授

研究者番号：70281186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、エストロジェンの心血管系の調節におけるオキシトシン(OT)およびビタミンD(VD)の役割を明らかにすることである。マウス心房筋由来細胞において、VDレセプター(VDR)の発現を抑制すると、Caトランジェントの異常が観察され、心機能に関わる数種類の遺伝子の発現が減少した。ラットの発情前期において、血圧は低下し、大動脈のOTレセプター(OTR)のmRNA発現が増加した。さらに、卵巣摘出した雌ラット右心房のVDRのmRNA発現が、エストロジェン投与により抑制された。以上のことから、エストロジェンの心血管作用において、OT作用とVD作用が補完的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the roles of oxytocin (OT) and vitamin D (VD) in regulation of the cardiovascular system by estrogen. Suppression of expression of the VD receptor (VDR) in murine atrial cardiomyocyte-derived cells resulted in Ca transient abnormalities and decreased the expression of several genes involved in the cardiac function. In the proestrus of rats, blood pressure decreased and mRNA expression of the aortic OT receptor (OTR) increased. Furthermore, mRNA expression of VDR in the right atrium of ovariectomized female rats was suppressed by estrogen administration. These findings suggest that OT and VD have complementary roles to promote regulation of the cardiovascular system by estrogen.

研究分野：内分泌学

キーワード：エストロジェン オキシトシン ビタミンD 心機能 ラット

1. 研究開始当初の背景

高血圧は、脳、腎、心などの血管障害を起因とする臓器障害の大きなリスクファクターとなっている。女性の高血圧は、閉経後に急増することや、月経時に血圧が上昇することから、女性特有のメカニズムが指摘されている。

エストロジェンは、卵巣で産生され、性周期中の卵巣の変化に伴い変動する女性ステロイドホルモンである。エストロジェンは心血管系の調節に関わっており、エストロジェンにより誘導される因子の多角的な検証は、女性特有の高血圧発症メカニズムの解明に必須である。

オキシトシン (OT) は、下垂体後葉から分泌され、子宮の収縮や乳汁射出に関わるホルモンである。OT レセプター (OTR) の発現は、エストロジェンに強く誘導される因子の一つであり、OT は中枢性および末梢性に心血管系にも作用し心拍数減少や血圧低下を起こすことが報告されている [1]。

活性型ビタミン D (VD) は、腸管からの Ca の吸収に関わるビタミンと考えられてきたが、体内で活性化されること、受容体を介して作用を発現していること、幅広い細胞の活動に関わる因子であることから、ステロイド骨格の開環したステロイドホルモンと考えられている。VD 不足による異常は多岐にわたり報告されているが、血液中の VD 濃度と高血圧とに負の相関があること [2] や、血中 VD 濃度が低い女性では将来高血圧になるリスクが増大すること [3] などが報告され、VD 不足と高血圧、特に女性の高血圧との関連について注目されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エストロジェンによる調節を受け、かつ心血管系の調節に関わっている OT および VD の作用に注目し、エストロジェンによる心血管系調節の作用機序を解明することである。エストロジェンの作用により OT および VD がどのような制御や影響を受けているのか、OT および VD が心血管系へどのように作用しているのか、そして OT と VD とに相互作用があるのかについて検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス心房筋由来培養細胞 HL-1 では、細胞質 Ca²⁺濃度が上昇する Ca トランジェントが周期的に起こる。これは、心筋細胞の収縮に対応する。VD が Ca トランジェントの発現に関与しているかどうかを調べるために、HL-1 の VDR を siRNA でノックダウンし、Ca トランジェントの変化を Ca 蛍光色素である Fluo-4 を用いて調べた。(2) HL-1 において、VD で誘導される遺伝子を明らかにするために、siRNA で VDR をノックダウンした HL-1 で DNA アレイ解析を行った。(3) HL-1 で、VDR をノックダウンして発

現が増加する遺伝子 (VDR 関連遺伝子) をそれぞれ siRNA でノックダウンした場合の Ca トランジェントの変化について調べた。さらに、それぞれの VDR 関連遺伝子をノックダウンした場合の VDR 関連遺伝子の発現の変化を real time PCR 法により測定した。(4) Wistar Imamichi 雌ラットにおいて、性周期中の血圧の変化をソフトロン社の非観血血圧計を用いて測定した。(5) 性周期中あるいは卵巣摘出後にエストロジェン処置をした雌ラットにおける心血管系の OTR および VTR の発現の変化を、real time PCR 法により測定し、性周期中の血圧の変化との関連について検討した。

4. 研究成果

マウス心房筋由来培養細胞 HL-1 細胞において、心拍数の調節に関わる Ca トランジェントの測定を行った。Ca トランジェントを観察した細胞は、一定の間隔で繰り返している周期性のある細胞 (rhythmic)、不規則な間隔の細胞 (arrhythmic)、散発的あるいは見られない細胞 (sporadic/none) の3種類に分類した (図1)。正常細胞において、80%の細胞に周期的な Ca トランジェント (rhythmic) が観察された。HL-1 細胞を VDR に対する siRNA で処置し、VDR の発現を抑制すると、control RNA で処置したコントロール細胞では 80%の周期的な Ca トランジェントが観察されたが、VDR をノックダウンした細胞では 20%まで減少した (図2)。VDR siRNA で処置した細胞に、humanVDR (hVDR) を発現させると、Ca トランジェントは 80%まで回復した (図2)。

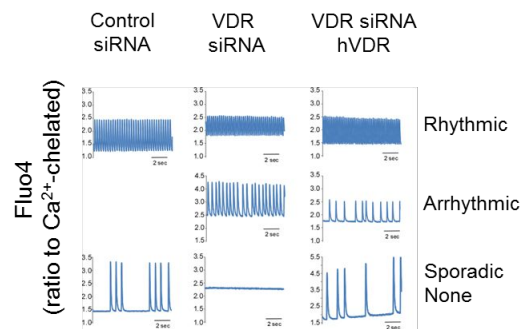


図1 VDR をノックダウンした HL-1 の Ca トランジェント

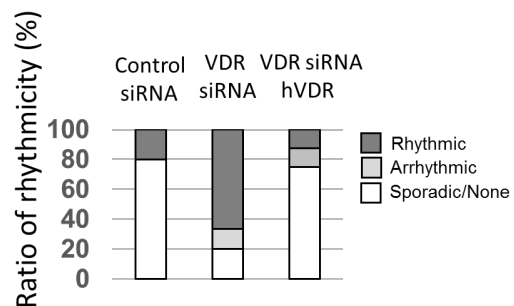


図2 VDR をノックダウンした HL-1 の Ca トランジェントの周期性の割合

これは、VD 作用が、HL-1 細胞での周期的な Ca トランジエントの調節に関わっていることを示唆している。

次に、VD が HL-1 細胞での遺伝子の発現にどのように関わっているかを調べるために、siRNA により VDR をノックダウンした HL-1 細胞における遺伝子発現の変動を DNA アレイ解析により調べた。その結果、actinin 2 (act2)、PDZ and LIM domain protein 3 (PDL)、PLAGL1 (PLA)、そして the cardiac myosin-binding protein C (MYB) の 4 遺伝子の発現が減少していることがわかった。act2、PDL、MYB は、心筋の収縮や細胞骨格に関わる遺伝子であり、PLA は転写に関わる遺伝子である。VD は、これらの遺伝子の発現を介して、Ca トランジエントの調節に関与している可能性が考えらる。

そこで、これらの 4 つの VDR 関連遺伝子の発現をそれぞれの siRNA により HL-1 細胞でノックダウンした場合、VD をノックダウンした場合と同様に Ca トランジエントに異常が生じるかどうかを調べた。その結果、act2、PDL、PLA、あるいは MYB をノックダウンした場合、周期的な Ca トランジエントは、コントロール細胞 80% に対して、それぞれ 50%、37.5%、62.5%、62.5% であった。このことは、VD による心機能の調節に act2、PDL、PLA、MYB の 4 遺伝子に関わっていること、特に act2 と PDL がより強く関わっていることを示唆している。さらに、発現するそれぞれの遺伝子を調べたところ、MYB の発現を抑制すると act2、PDL、PLA、VDR の発現が減少した (図 3)。このことは、VD と MYB が相互に発現を調節しながら、他の VDR 関連遺伝子を調節するネットワークを構築して、心機能を調節していることを示唆している。

ラットの性周期中では、卵胞の発育に伴い発情前期に血中エストロゲン濃度が増加する。性周期を回帰している雌ラットで血压測定を行ったところ、発情前期に低下し、発情期と比べて有意に低いことが明らかになった (図 4)。

一方、大動脈の OT レセプター (OTR) の mRNA 発現は、発情前期に増加することがわかった (図 5)。エストロゲンが OT 作用を介して血压を調節している可能性を示している。大動脈の VDR には有意な差は見られなかった。さらに、卵巣摘出した雌ラットの右心房および左心房の VDR の mRNA 発現が、エストロゲン投与により抑制された (図 6)。また、ラット子宮 VDR の発現は、発情後期に比べて、発情休止期と発情前期において有意に減少し、発情期に増加した。このことから、VDR 発現はエストロゲンによって抑制的に制御されている因子であることが示唆される。したがって、エストロゲンの心血管作用において、OT 作用と VD 作用を介する異なった経路が関与している可能性が考えられた。

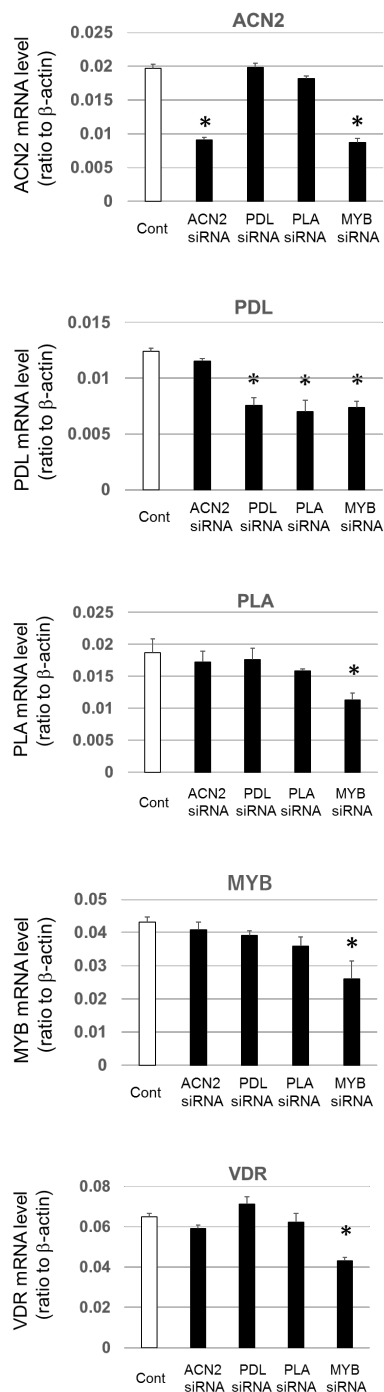


図 3 VDR 関連遺伝子をノックダウンした HL-1 での遺伝子発現

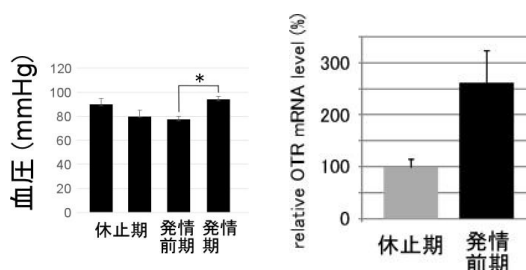


図 4 ラット性周期中の血压の変化

図 5 ラット大動脈の OTR mRNA の変化

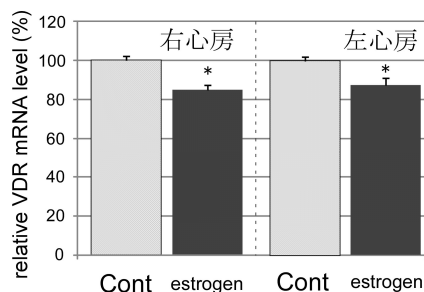


図6 卵巣摘出ラットにおける心房 VDRmRNA 量に対するエストロジェンの効果

以上のことから、VD は、心筋の収縮や細胞骨格に関わる遺伝子である *act2*、PDL、MYB と転写に関わる遺伝子である PLA の発現を調節することにより、マウス心房筋由来培養細胞 HL-1 細胞の周期的 Ca トランジェントを調節していると考えられる。さらに、これらの VDR 関連遺伝子が関与したネットワークの存在が推定され、VD の作用不足はこのネットワークを破綻させている可能性が考えられた。血圧調節においては、ラットの性周期中で、血中エストロジェン濃度の高い発情前期で低下することがわかった。発情前期において、OTR 発現は増加し、VDR 発現は低下する傾向が見られた。この性周期中の変化を見る限りは、エストロジェンの作用が OT と VD の作用を相加的に介しているのではなく、むしろ OT と VD は補完的な調節作用を有しているのではないかと考えられた。

今後の課題として、生体において VD が心血管機能の調節にどのようにどの程度関わっているのかを検証する必要がある。VDR に加え VDR 関連遺伝子のノックアウトマウス、あるいはより現実に近い状態として VD 欠乏食摂取による低 VD 動物の利用が考えられる。さらに、細胞骨格の調節に VDR 関連遺伝子がどのように関わり、それがどのように心血管機能に関わっているのかは、今後の大きな課題と考えられる。

<引用文献>

- (1) Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation. *J Neuroendocrinol* 24: 599-608, 2012.
- (2) Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A. Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens* 29: 636-645. 2011
- (3) Griffin FC, Gadegbeku CA, Sowers MR. Vitamin D and subsequent systolic hypertension among women. *Am J Hypertens* 24: 316-321. 2011.

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. T. Murata, A. Takeuchi, S. Matsuoka. Involvement of vitamin D receptor in the generation of rhythmic Ca transient in murine atrial myocyte-derived cell line HL-1. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016.3.22-24, Sapporo, Japan
2. T. Murata, A. Takeuchi, S. Matsuoka. Involvement of vitamin D receptor and its related genes in the generation of rhythmic Ca transient in murine atrial myocyte-derived cell line HL-1. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2017.3.28-30, Hamamatsu, Japan

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村田 拓也 (MURATA, Takuya)

福井大学・ライフサイエンス支援センター・准教授

研究者番号：70281186

(2)研究分担者

松岡 達 (MATSUOKA, Satoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00263096

成田 和巳 (NARITA, Kazumi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：80270958

(平成29年度まで)