

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18390074

研究課題名（和文） 血管内皮細胞カルシウム流入経路関連遺伝子の網羅的解析と創薬ターゲット遺伝子の探索

研究課題名（英文） Calcium entry channel related gene expression profiles of endothelial cells by micro-bead array analysis and target gene identification for drug discovery

研究代表者 渡邊 裕司 (WATANABE HIROSHI)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50262803

## 研究成果の概要：

血管内皮細胞の機能調節に重要である容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路に関連する遺伝子群を網羅的に解析し、創薬ターゲットとなる候補遺伝子を探索した。容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が失活した培養血管内皮細胞系と、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を保持した細胞系を樹立し、差次的発現遺伝子を単離した。最終的には容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入の有無により効果的に発現差を示す 812 クローンから 99 のクラスター (98 contig と 4 cluster-singlet、640 クローン) と 172 クローンの singlet を分離解析に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

年度	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	9,300,000	2,790,000	12,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環・血管内皮細胞・カルシウム・ゲノム・創薬

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの心血管作動薬は、心筋細胞や平滑筋細胞を標的としており、内皮細胞を直接標的化したものは存在しない。この理由は、心筋細胞や平滑筋細胞とは異なり、内皮細胞が電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルや  $\text{Na}^+$  /  $\text{Ca}^{2+}$  交換機構を有さず、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を中心とした  $\text{Ca}^{2+}$  制御を受けるためである。血管内皮細胞の容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入調節機構を直接のターゲットとすることは本研究の大きな特色と考えられる。これまで血管内皮細胞の容

量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路に関する研究を継続し、その成果により容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路が失活した培養血管内皮細胞系を樹立することに成功した。この細胞系を対象とし、最先端の遺伝子工学的技術である DNA マイクロビーズアレイや Functional DNA チップを用いる事により、血管内皮細胞  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路関連遺伝子の構造と機能解析を行い、内皮細胞をターゲットとした創薬候補遺伝子の決定を目指していくものである。

NO やプロスタサイクリンの産生など血

圧調節や抗血栓作用に関わる内皮機能が、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入により調節されることは多くの報告で明らかであり、その構造、機能を解明する本研究の成果は、血管内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  調節異常が関与する動脈硬化、高血圧などの血管病態の発症メカニズムの解明にも大きく寄与するものと思われる。

これまで申請者らは、細胞骨格系がさまざまな機構により各種細胞内イオン濃度を調節することを見いだし(第 11 回日本循環器学会 Young Investigator's Award 最優秀賞)、特に、細胞骨格調節系タンパクである MLCK の活性化が容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路を結ぶ中心的なシグナルとなり、細胞機能の調節にも重要であることを国内外において初めて明らかにした(FASEB J, 1998,2001; Arterioscl Thromb Vasc Biol, 2001; Cardiovasc Res, 2000, 2004)。しかし、その本態についてはいまだ多くの点が未解明であり、内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路を創薬ターゲットという視点から解析した研究は国際的にも欠如している。対象とする容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路を失活した培養血管内皮細胞系は、申請者らが新たに樹立した細胞系であり、さらに内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  調節異常が関与する種々の血管病態に対して新しい発想からの治療薬の開発も目指すものである。

## 2. 研究の目的

(1) 血管内皮細胞における容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路に関連する遺伝子群を網羅的に解析し、創薬ターゲットとなる候補遺伝子を探索することを目的とし、下記の期間内成果目標を掲げ研究を実施する。平成 18 年度：DNA マイクロビーズアレイ技術を用い容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を保持した培養血管内皮細胞系と、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が失活した細胞系とで発現量に変化する遺伝子群を網羅的に取得し、得られた cDNA を PCR 増幅、クローニングした後に、それぞれの遺伝子配列を決定する。

(2) 血管内皮機能の発現・調節に細胞内カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )濃度の変化が関与し、とくに細胞外からの容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が重要であることが注目されている。平成 19 年度以降の研究では、血管内皮細胞における容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路に関連する遺伝子群を網羅的に解析し、得られた遺伝子情報から Functional DNA チップを作成し、 $\text{Ca}^{2+}$  流入経路関連遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 本研究

①対象：1 個体のブタ下行大動脈血管内

皮細胞から分離樹立した容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入が失活した培養血管内皮細胞系(D 系)と、容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を保持した細胞系(W 系)を対象とする。

② D 系と、W 系とで、mRNA を抽出し、PCR-Select cDNA サブトラクション法を用い、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが生じている cDNA からアレイによるスクリーニングを行い差次的発現遺伝子を単離した。

③ドットプロット法によるディファレンシャルスクリーニングとバーチャルノーザンプロット法により cDNA 発現量の差を確認後、cDNA のシーケンシングを実施し既知遺伝子および EST の配列と比較し、クローンを同定した。

④クローニング用のベクターは pT7Blue-2 (Novagen 社) の BamH I/ Eco RI 間に Pac I サイトを導入したものを使用し、回収した Bam HI - Pac I 断片を pT7Blue-2 の Bam HI - Pac I 間にライゲーションした。TempliPhi DNA Amplification Kit (Amersham Bioscience 社) を用いてシーケンス鋳型を調製し、T7 プライマーを用いて Dye Terminator 法 (DYEnamic ET dye terminator kit, Amersham Bioscience 社) によりシーケンス反応を行い、MegaBACE 1000 キャピラリーシーケンサーにてワンパス DNA シーケンシングを行った。

⑤得られた遺伝子フラグメントを Affymetrix417Arrayer を用いてスポットし、Functional DNA チップを作製した。

⑥シーケンス配列解析：ベースコールされた全ての配列 (input sequence) について配列解析処理を行った。また塩基配列データベースに対する BLAST ホモロジーサーチを行い、その際、塩基配列データベースは NCBI の non redundant 核酸データベースを用いた。

(2) 発展研究

①細胞外及び細胞内 pH の影響、細胞の継代化による影響など容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入を調節する要因についても新たな検討を加えた。細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) 測定には、蛍光色素 BCECM/AM を用いた。血管内皮機能の指標としての NO 産生は蛍光色素 DAF-FM/DA を用い、 $\text{PGI}_2$  の測定には、その代謝産物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$  を酵素免疫測定法により測定した。細胞外 pH ( $\text{pH}_o$ ) の変化には pH 6.4、6.9 および 7.4 に調整した HEPES 溶液を使用し、細胞内アシドー

シスを惹起させるためプロピオン酸 (20 mmol/L)を用いた。

②細胞膜に存在し、容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に深く関わる蛋白である Orai1、小胞体に存在するセンサー蛋白である Stim 1 遺伝子を、得られた遺伝子情報から  $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路関連遺伝子として探索した。

③発展研究として、血管内皮細胞傷害後の再生過程における血管内皮細胞機能の変化を、光増感法による選択的血管内皮細胞障害モデルを用い検討した。Wistar 系雄性ラットにローズベンガルを静注後、右肢大腿動脈に 540 nm の光を照射し、発生した活性酸素種により血管の内側から内皮細胞に傷害を与えた。翌日、1、2、4 週目に傷害部位をリング状に摘出し、等尺性張力を測定した。対照は、対側肢とした。また、摘出血管からパラフィン包埋切片を作成し、内皮細胞の脱落、再被覆および内膜肥厚の変化、更にシクロオキシゲナーゼ(COX)の発現を免疫組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)本研究成果

①容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が失活した培養血管内皮細胞系(D系)と、容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を保持した細胞系(W系)を対象に、PCR-Select cDNA サブトラクション法を用い、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが生じている差次的発現遺伝子を単離した。

②シーケンスの有効クローン (Phred 値 15 以上の塩基が 300 個以上あるクローン) 合計 850 クローンを回収した。各種フィルターにより解析の信頼性に悪影響を及ぼす配列を除き、最終的に 812 クローンから 99 のクラスター (98 contig と 4 cluster-singlet、640 クローン) と 172 クローンの singlet の分離解析に成功した。

③contig のコンセンサス配列及び singlet 配列をクエリー配列として塩基配列データベース(NCBI の non redundant 核酸データベースおよび non redundant アミノ酸データベース)に対する BLAST ホモロジーサーチを行った。

④本研究により、容量性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の有無により効果的に発現差を示す遺伝子を取得することに成功した。得られた遺伝子から Functional DNA チップを作成し、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路関連遺伝子を探索中である。なお詳細な解析結果は、本報告書に記載するには膨大なデータ量であり、今後、論文報告後ホームページ等を通じて公開予定である。

##### (2)発展研究成果

①血管内皮細胞  $\text{Ca}^{2+}$ 流入に及ぼす細胞外及び細胞内 pH の影響

(1) ブラジキニン(BK:10 nmol/L)刺激による内皮細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 応答は、pH<sub>i</sub> 6.9、6.4 において 30±15%、80±4% 減弱した (P<0.001 vs.

pH<sub>i</sub>7.4)。また、サブシガーゲン(TG: 1 μmol/L)刺激による内皮細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 応答は、pH<sub>i</sub> 6.9、6.4 において 23±9%、97±1% 減弱した (P<0.001 vs. pH<sub>i</sub>7.4)。これら酸性条件下における内皮細胞  $\text{Ca}^{2+}$ 応答抑制作用は pH<sub>o</sub> を 7.4 に戻す事により直ちに解除された。

(2) BK 刺激による NO 産生は、pH<sub>i</sub> 6.9、6.4 において 38±3%、91±2%抑制された(P<0.001 vs. pH<sub>i</sub>7.4)。PGI<sub>2</sub> 産生は、pH<sub>i</sub> 6.9、6.4 において 55±15%、77±29%抑制された(P<0.001 vs. pH<sub>i</sub>7.4)。酸性条件下における NO 産生抑制作用は pH<sub>o</sub>7.4 により直ちに解除された。

(3) 無  $\text{Ca}^{2+}$ 溶液中において、BK および TG によって惹起される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、pH<sub>o</sub>6.4、6.9 の影響を受けなかった。

(4)プロピオン酸は、pH<sub>i</sub> を 7.3 から 6.9 まで低下させた。しかし、この細胞内アシドーシス条件下で BK と TG による  $\text{Ca}^{2+}$ 応答、および NO 産生は変化しなかった。

【①総括】細胞内アシドーシスではなく細胞外アシドーシスが、細胞内貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出には影響を与えず、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入のみを選択的かつ可逆的に抑制することが確認された。また、細胞外アシドーシスによる血管内皮  $\text{Ca}^{2+}$ 応答抑制により、NO、PGI<sub>2</sub> といった EDRF 産生も抑制されることが示された。血管内皮細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、細胞間結合を変化させ血管透過性を亢進させる。虚血/再灌流時に生じるアシドーシスからの急激な回復は、血管内皮細胞内への急峻な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇とそれに伴う EDRF の過剰産生により、組織血流の過灌流や血管透過性の亢進が生じ、再灌流障害の要因となり得ることが考えられた。(Cardiovasc Res, in press)

細胞外アシドーシスが SOCE を抑制する機序については現時点では不明であるが、Orai1、Stim 1 の関与を含め検討中である。

##### ②再生血管内皮細胞の機能変化

フェニレフリン刺激による等尺性張力は、傷害後 1、2、4 週目のどの時点においても傷害血管と対照血管の間に有意な差を認めなかった。また、sodium nitroprusside(SNP)投与による血管弛緩反応も有意差を認めなかった。これにより光増感法モデルは血管内皮細胞を選択的に剥離可能にするモデルであり、傷害血管の平滑筋は血管内皮非依存性の収縮ならびに弛緩機能を保持している事を確認した。アセチルコリン(ACh)による弛緩反応は、傷害翌日では傷害血管において完全に消失したが、1 週目に回復し、以降の最大弛緩率は対照血管と同程度であった。しかし感受性は 1 週目以降経時的に低下した。NO 合成酵素阻害剤である N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)存在下で、ACh 依存性血管弛緩反応は傷害血管、対照血管ともに減

弱した。L-NAME に COX 阻害剤であるインドメタシンを併用しても、対照血管では L-NAME 単独と変わらなかったのに対し、傷害血管では ACh 依存性血管弛緩反応の増強を認めた。同様の増強は、COX-1 阻害剤である SC-560 あるいは COX-2 阻害剤である NS-398 によっても認めた。これより、再生内皮細胞は、COX 由来の血管収縮性因子を産生している事が示唆された。さらに、トロンボキサン(TX)A<sub>2</sub>/ (PG)H<sub>2</sub> 受容体阻害剤である SQ-29548 あるいは PGF<sub>2</sub> $\alpha$  受容体阻害剤 AL-8810 存在下でも、ACh 依存性血管弛緩反応の増強を認めたが、TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害剤である OKY-046 存在下では弛緩反応の増強は認めなかった。これより、血管収縮性因子は TXA<sub>2</sub> ではなく、PGH<sub>2</sub> および PGF<sub>2</sub> $\alpha$  であることが示唆された。COX のタンパク発現を免疫組織学的に観察したところ、COX-1 は、対照血管および傷害血管ともに内皮細胞において発現を認め、COX-2 は、傷害血管の内皮細胞において発現を認めた。COX 阻害剤存在下で増強した血管弛緩反応は、高濃度 KCl 溶液で完全に消失したことから、内皮細胞由来過分極因子の遊離も関与していることが示唆された。また傷害血管では、ACh 刺激により血管弛緩因子とともに血管収縮性因子が遊離されるにも関わらず、対照血管と同等の最大収縮率を示したことは、内皮細胞由来過分極因子の産生が代償機構として増強している可能性が考えられた。以上より、再生内皮細胞は、ACh 刺激により NO および内皮細胞由来過分極因子などの血管拡張因子のみならず、COX-1 および COX-2 依存性に PGH<sub>2</sub> あるいは PGF<sub>2</sub> $\alpha$  などの血管収縮性プロスタノイドを産生する事が明らかとなった。(Cardiovasc Res, 79,161-168,2008)

#### 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 4 件)

- Asai M, Takeuchi K, Uchida S, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Yamada S, Hayashi H, Watanabe H : Misinterpretation of the effect of amlodipine on cytosolic calcium concentration with fura-2 fluorospectrometry, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 377, 423-427, 2008. (査読有)
  - Hirao A, Kondo K, Takeuchi K, Inui N, Umemura K, Ohashi K, Watanabe H : Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodeled rat femoral arteries, Cardiovasc Res, 79,161-168,2008. (査読有)
  - 渡邊裕司 : 血管内皮細胞と ER ストレス, 血管医学, 9(4) ,51-57,2008. (査読無)
  - Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H : Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca<sup>2+</sup> entry via non-selective cation channels, Cardiovasc Res, (in press) (査読有)
- [学会発表] (計 11 件)
- Takeuchi K , Hirao A, Iida K, Ohashi K, Watanabe H : Regenerated Endothelium Produces not Vasodilative but Vasoconstrictive Prostanoid(s) via Cyclooxygenase - dependent Pathway, The72st Annual Scientific Meeting the Japanese Circulation Society, 福岡, 2008, 3月29日.
  - Takeuchi K , Iida K, Watanabe H : Free Fatty Acids (FFAs), Arachidonic and Linoleic Acids but not other FFAs, Suppress Endothelial Function by Inhibiting Endothelial Ca<sup>2+</sup> Responses, The72st Annual Scientific Meeting the Japanese Circulation Society/P, 福岡, 2008, 3月28日.
  - Asai M, Takeuchi K, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H : Extracellular but not Intracellular Acidosis Suppresses Endothelial Function by nhibiting Intracellular Calcium Responses, The72st Annual Scientific Meeting the Japanese Circulation Society/P, 福岡, 2008, 3月28日.
  - Takeuchi K, Utsumi A, Inui N, Watanabe H : Biomarkers in cardiovascular diseases: A new tool to evaluate endothelial function, The 3rd China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology/P, 2007, 8月23日, Dalian (China) .
  - 竹内和彦, 内海明子, 乾直輝, 渡邊裕司 : Protease-activated receptor(PAR) を介する血管内皮細胞内カルシウム応答に対するブラジキニン(BK) および BK 受容体拮抗薬の作用, 第 28 回日本臨床薬理学会年会/P, 栃木, 2007, 11月29日.
  - Takeuchi K, Watanabe H : Direct Effect of ACE Inhibitors on Endothelium : ACE Inhibitors Enhance Kallikrein-induced Ca<sup>2+</sup> Responses via Endogenous Bradykinin Endothelial Cells, The71st Annual Scientific Meeting the Japanese Circulation Society/P, 神戸, 2007, 3月17日.

7. Takeuchi K, Yang Yingbao, Watanabe H : Antiproliferative Effect of Cyclic AMP on Human Umbilical Vein Endothelial Cells through TGF-beta Inducing p21 (Cip1/ Waf1) Expression, The 71st Annual Scientific Meeting the Japanese Circulation Society/P, 神戸, 2007, 3月17日.
8. 竹内和彦, 渡邊裕司 : カリクレイン誘導性血管内皮細胞内カルシウム応答に対する ACE 阻害薬の作用, 第 27 回日本臨床薬理学会年会/P, 東京, 2006, 11月30日.
9. Hirao A, Kondo K, Takeuchi K, Umemura K, Watanabe H : Regenerated endothelial cells produce vasoconstrictive prostanoid(s) rather than vasodilative prostanoid(s) through COX-1 and COX-2 dependent pathways, The 79th Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 14, 2006, Chicago(USA).
10. Takeuchi K, Nakamura R, Kageyama M, Watanabe H : Assessment of Posture-Related Dynamic Changes in Cerebral Blood Flow Using Near-Infrared Time-Resolved Spectroscopy: A New Tool To Evaluate Effects of Antihypertensives on Cerebral Circulation, The 79th Scientific Sessions of American Heart Association, Nov 13, 2006, Chicago(USA).
11. 竹内和彦, 中村玲子, 影山美智代, 平尾晃子, 渡邊裕司 : カリクレインによる血管内皮細胞内カルシウム応答の変化の検討, 日本循環器学会 第 128 回東海・第 113 回北陸合同地方会, 名古屋, 2006, 11月5日.

[図書] (計 2 件)

1. 渡邊裕司 : 協和企画, AHA Highlights 2007, Cardiovascular Pharmacogenomics : Advances and Challenges in Personalized Medicine, 2007, 126-131
2. Tran QK, Watanabe H : Springer, Handbook of Experimental Pharmacology, The Vascular Endothelium I , Calcium Signalling in the Endothelium, 2006, 145-187

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/cpharm/clinpharm.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 裕司 (WATANABE HIROSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 50262803

##### (2) 研究分担者

佐藤 洋 (SATO HIROSHI)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 30293632

加藤 秀樹 (KATO HIDEKI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80314029

最上 秀夫 (MOGAMI HIDEO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 90311604

##### (3) 連携研究者