

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790389  
 研究課題名（和文） プロテオミクス解析によるスタチンの多面的作用の分子機序の解明

研究課題名（英文） Proteomic analysis in pleiotropic effects of statin

## 研究代表者

塩田 正之（SHIOTA MASAYUKI）  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：30381990

研究成果の概要：スタチンには心血管保護作用が知られているが、その分子機序は不明である。そこでスタチンによって活性化される Akt のインタラクトーム解析を行い、機序の解明を目的とした。血管内皮細胞をスタチンで処理し、アフィニティー精製を行うことでインタラクトーム解析を試みた。結果、22 種類のタンパク質を同定した。そのうち Hsp70 ファミリー分子についてさらに詳細な実験を進めた。スタチンが誘導する内皮機能の亢進を Hsp70 阻害剤は有意に抑制した。以上より、Hsp70 は Akt の活性制御に関与しスタチンによる心血管保護効果に寄与していることが明らかになった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス、スタチン、多面的作用、プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

スタチン（HMG-CoA 還元酵素阻害薬）はコレステロール合成経路の律速段階である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより血清コレステロール低下作用を有する。スタチンによる冠動脈イベントの発症や進行の抑制は、コレステロール低下作用とは独立した他の作用機序によることを示す報告が相次いでいる。その一つに血管新生や内皮機能改善作用の誘発という血管保護作用が示されている。近年、このスタチンの多面的作用の分

子機序に対する研究が盛んに行われており、注目すべきものとして PI3K/Akt 経路の活性化が挙げられる。しかし、Akt 活性化を介した eNOS 活性化以外の分子機序はほとんど不明のままであり、スタチンは当初の予想以上のポテンシャルを有しているにも関わらず、その多面的作用発現のメカニズムはわかっていない。

## 2. 研究の目的

スタチンの多面的作用の分子メカニズム

を明らかにすべく、そのキー分子である Akt に会合する分子を網羅的に同定する。スタチン投薬時の Akt のインタラクトーム解析 (包括的な相互作用解析) を行い、Akt 活性化時に結合する分子を包括的に同定することで分子ネットワークを明らかにする。病態時、投薬時での結合分子の結果を比較し、差異を見出すことでスタチンのもたらす内皮機能改善作用の分子機序を解明する。

### 3. 研究の方法

#### A. インタラクトーム解析

##### (1) 頸動脈を標的としたインタラクトーム解析

塩化セシウム密度勾配法にて高力価組換えアデノウイルス (C 末端に strep タグを付加した Akt) を調製した。8 週齢のラットの頸動脈を結さし、組換えアデノウイルスを注入した。30 分後に血流を再開させ、48 時間後に頸動脈を摘出し、タンパク質を調製後、strep-tactin にてアフィニティー精製を行った。

##### (2) 大腿筋を標的としたインタラクトーム解析

塩化セシウム密度勾配法にて高力価組換えアデノウイルスを 10 週齢のマウス大腿部に筋注した。48 時間後に大腿筋を摘出し、タンパク質を調製後、strep-tactin にてアフィニティー精製を行った。

(3) 細胞レベルでのインタラクトーム解析  
細胞はラット頸動脈より単離した血管内皮細胞 (rAECs) を使用した。遺伝子導入後、pravastatin (1・M) で処理した rAECs よりタンパク質を抽出した後、strep-tactin カラムにてアフィニティー精製を行った。

いずれも SDS-PAGE にて展開した後、銀染色を行いバンドを切り出した。トリプシンにてゲル内消化を行った後、MALDI-TOF 質量分析計 (BRUKER DALTONICS 社) にてタンパク質を同定した。

#### B. Hsc70 の内皮機能における機能の解析

(1) 細胞はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を使用した。Hsp70 阻害剤として KNK437 を 100 μM で使用した。pravastatin は 1 μM で使用した。

(2) 内皮機能  
内皮機能の評価項目にはボイデンチャンバーによる細胞遊走、マトリゲルを用いた脈管形成、eNOS のリン酸化を用いた。

(3) 血管新生評価  
KNK437 (50 μg/g) を前投与したマウスに下肢虚血を作成し、レーザー Doppler 血流測定器にて血流の回復を 5 日間計測した。5 日目の組織切片を作成し、CD31 免疫染色にて血管密度を評価した

### 4. 研究成果

#### A. インタラクトーム解析

##### (1) 頸動脈を標的としたインタラクトーム解析

strep 精製とそれに引き続いた銀染色の結果、Akt の発現タンパク量が不十分であることがわかった。よって結合タンパクをほとんど認めなかった。EGFP を発現する組換えアデノウイルスを用いて、遺伝子導入後、頸動脈の組織切片を作成し、観察するという方法でも遺伝子導入効率を検討したが、いずれも低く、strep 精製にとって十分量のタンパクを得ることができないことが判明した。

##### (2) 大腿筋を標的としたインタラクトーム解析

strep 精製とそれに引き続いた銀染色の結果、Akt の発現タンパク量が不十分であった。よって結合タンパクをほとんど認めなかった。遺伝子導入後、大腿筋のタンパク抽出液を作成し、western blot にてタンパク質の発現を検討したが、strep 精製を行うのに十分なタンパク質が用意できないことが判明した。

##### (3) 細胞レベルでのインタラクトーム解析

rAECs を用いたインタラクトーム解析の結果、恒常的に Akt1 結合する 22 種類のタンパク質を同定した。そのうちのひとつに Hsp70 ファミリー分子を複数同定した。

pravastatin の処置によって Akt への結合が亢進するスポットを複数確認したが、質量分析の結果、同定には至らなかった。

#### B. Hsp70 の内皮機能における機能の解析

(1) KNK437 は pravastatin が誘導する細胞遊走、脈管形成を阻害した。(図 1) KNK437 は pravastatin が誘導する eNOS リン酸化、Akt リン酸化を阻害した。以上より、KNK437 による Hsp70 ファミリーの阻害は内皮機能低下を誘発することが明らかとなった。その際の、分子機序として Akt のリン酸化抑制を認めた。(図 2)

(2) KNK437 はマウス下肢虚血における血流、血管密度の回復を有意に抑制したことから血管新生にとって必須であることが明らかとなった。(図 3, 4)

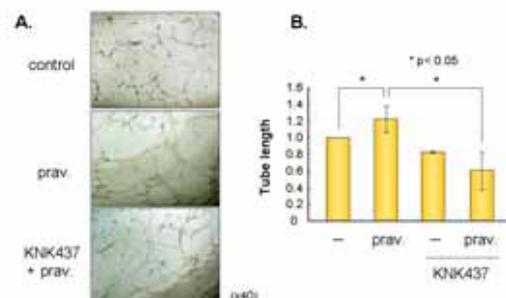


図1. pravastatin が誘導する脈管形成に対する KNK437 の阻害作用  
A は実際の顕微鏡像。B は A の脈管の長さを計測して定量化した。

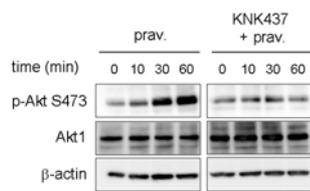


図2. プラバスタチンによるAktリン酸化に対するKNK437の阻害作用

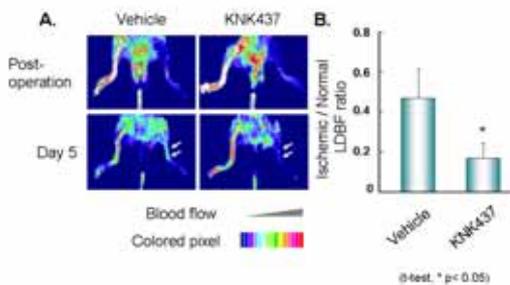


図3. 下肢虚血モデルによる血流回復に対するKNK437の作用  
Aは実際の血流測定像。BはAの血流を計測して定量化した。

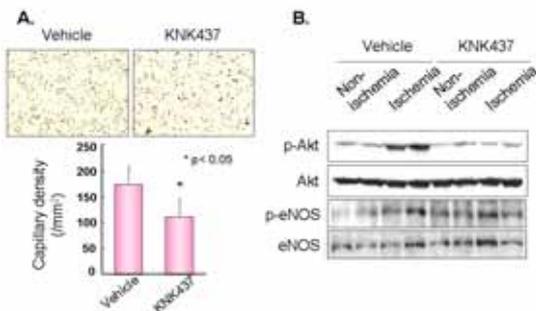


図4. 下肢虚血モデルによる血流回復に対するKNK437の作用  
A上段は大腿筋の組織切片を作成し、抗CD31抗体にて免疫染色を行った染色像。  
下段は血管の数を計測して定量化した。Bは大腿筋より組織抽出液を作成し、上記の抗体にてWestern Blotを行った結果を示す。

## 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)

Shiota, M., Kusakabe, H., Hikita, Y., Nakao, T., Izumi, Y., and Iwao, H. Pharmacogenomics of Cardiovascular Pharmacology: Molecular Network Analysis in Pleiotropic Effects of Statin an Experimental Elucidation of the Pharmacologic Action From Protein-Protein Interaction Analysis *J Pharmacol Sci* 107, 15-19 2008 査読有  
Nakao, T., Shiota, M., Tatemoto, Y.,

Izumi, Y., and Iwao, H. Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/p70 S6 kinase signaling. *J Pharmacol Sci* 105, 334-341 2007 査読有

[学会発表](計 11件)

塩田正之、泉康雄、中尾隆文、岩尾洋  
Hsc70 は血管内皮細胞における Akt シグナル制御に必須である 第 82 回薬理学会年会 2009 年 3 月 16 日 横浜

塩田正之、泉康雄、中尾隆文、岩尾洋  
内皮機能における Heat shock cognate protein 70(Hsc70)の役割 第 38 回日本心臓血管作動物質学会 2009 年 2 月 6 日 岡山

塩田正之、泉康雄、中尾隆文、岩尾洋 Hsc70 (Hsp70 ファミリー) の内皮機能における役割 第 18 回日本循環薬理学会 2008 年 11 月 21 日 千葉

塩田正之、泉康雄、川本由貴子、中尾隆文、岩尾洋 プラバスタチンによる内皮細胞遊走とその機序の解析 第 114 回薬理学会近畿部会 2008 年 11 月 14 日 神戸

Hiroshi Iwao, Hiromi Kusakabe, Masayuki Shiota, Takafumi Nakao, Yasukatsu Izumi Hsp70 plays a critical role in angiogenesis ISH 2008 年 6 月 16 日 ベルリン

疋田優子、塩田正之、日下部裕美、泉康雄、中尾隆文、三浦克之、岩尾洋 FGF-2 はプラバスタチンが誘導する血管新生に關与する 第 81 回薬理学会年会 2008 年 3 月 19 日 横浜

日下部裕美、塩田正之、疋田優子、泉康雄、中尾隆文、三浦克之、岩尾洋 Hsp70 は Akt の活性を制御し、血管新生に關与する 第 81 回薬理学会年会 2008 年 3 月 19 日 横浜

塩田正之、日下部裕美、疋田優子、中尾隆文、泉康雄、岩尾洋 スタチンの多面的作用発現の分子機序の解析 第 112 回薬理学会近畿部会 2007 年 11 月 16 日 大阪

疋田優子、塩田正之、日下部裕美、泉康雄、岩尾洋 プラバスタチン依存的 FGF-2 発現は血管新生に關与する 第 30 回日本高血圧学会 2007 年 10 月 25 日 沖縄

日下部裕美、塩田正之、疋田優子、泉康雄、岩尾洋 HSP70 はスタチンによる Akt の活性化を制御し、血管内皮細胞遊走および脈管形

成に關与する 第 30 回日本高血圧学会  
2007 年 10 月 25 日 沖縄

疋田優子、塩田正之、日下部裕美、泉康雄、  
中尾隆文、岩尾洋 プラバスタチンはラット  
大動脈血管内皮細胞において FGF-2 の産生を  
増加させる 第 111 回薬理学会近畿部会  
2007 年 6 月 15 日 名古屋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塩田 正之 ( SHIOTA MASAYUKI )  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：30381990

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし