

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590933

研究課題名（和文） 虚血心筋における脂質メディエータースフィンゴシン1リン酸（S1P）の機能解析

研究課題名（英文） Exploring the roles of sphingosine 1-phosphate (S1P), a lipid mediator, in ischemic heart

研究代表者

五十嵐 淳介 (IGARASHI JUNSUKE)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：20346638

研究成果の概要（和文）：

当研究では虚血性心疾患における S1P とその関連分子の役割を解明することを企図して実験的に検討した。S1P シグナルにおいてはスフィンゴ脂質含有細胞膜マイクロドメインであるカベオラとその構成蛋白質 caveolin-1 が重要な役割を果たす。心筋虚血時に産生が高まることが知られるサイトカイン TGF β 1 の caveolin-1 と S1P シグナルへの効果を明らかにした。またステロイドホルモンが、血管内皮において caveolin-1 を誘導し、VEGF の作用を減弱させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We performed experimental research to explore the roles of S1P and related molecules in ischemic heart diseases. It has been established that sphingolipid-enriched micro-compartments of peripheral plasma membrane termed caveolae and their structural component protein caveolin-1 play key roles in mediating S1P signaling. We determined that a cytokine TGF β 1 promotes S1P signaling in cultured vascular endothelial cells by attenuating caveolin-1 expression. We also discovered that steroid hormones are capable of up-regulating caveolin-1 to down-regulated VEGF receptor signaling pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：心筋虚血、脂質メディエーター、スフィンゴ脂質、細胞内情報伝達機構、受容体シグナリング、caveolin-1、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血性心疾患研究の重要性。心血管系の動脈硬化性疾患の罹患者は高齢化の進展、食生活の欧米化等を背景に近年ますます増加してきた。近年では治療法の改善により、急性期における虚血性心疾患の生命予後は大きく改善する結果となった。しかし、一度虚

血に陥った心筋は、肉眼的な血行再建の後に完全にもとの機能を取り戻すことは難しく、PCI 術後の遠隔期に「心筋リモデリング」や「虚血性心筋症」と呼ばれる病態を呈し、うつ血性心不全の原因となって生活の質 (Quality of Life) を悪化させるとともに生命予後を不良にする。かかる病態は先に述

べた社会的背景のもと、本邦では近い将来ますます蔓延することが懸念される。従って、虚血に陥った心筋細胞及び微小血管を含む冠循環の機能を改善すること、及びその前提として、虚血性心疾患の病態を分子生物学的観点からよりよく理解することは大変重要である。

(2) S1P システムに着目した理由。

S1P は血管内皮細胞において S1P 受容体を介して血管新生を促進することが知られているが、虚血性心疾患での役割はこれまで明らかではなかった。

2. 研究の目的

本申請では虚血後心筋における血管新生促進性の脂質メディエータースフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) とその関連分子の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

培養血管内皮細胞を用いて、虚血性心疾患で大きな役割を果たすサイトカイン TGF β 1 と、ストレス反応機構の一つである糖質ステロイド、鉱質ステロイドの効果を検討した。

(1) 培養細胞：ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (BAEC)、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC)

(2) タンパク質発現、リン酸化：ウェスタンブロット法、免疫染色法、電子顕微鏡による観察

(3) 遺伝子発現：RT-PCR 法

(4) 血管新生能：Boyden chamber 法及び、内皮細胞と線維芽細胞の共培養による管腔形成能測定法

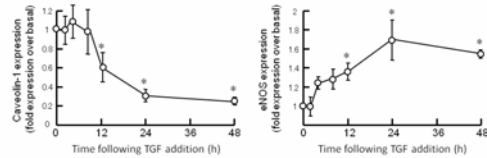
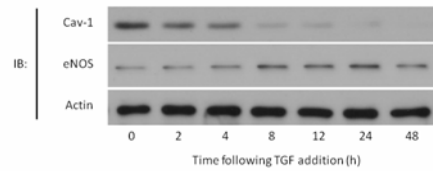
4. 研究成果

(1) TGF β 1 の効果。虚血後の心筋においてはサイトカイン TGF β 1 の産生が亢進していることが報告されているので、培養血管内皮細胞への TGF β 1 の効果を検討した。

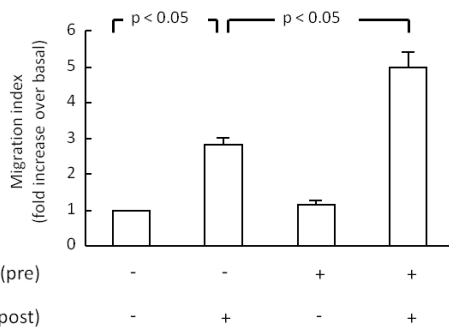
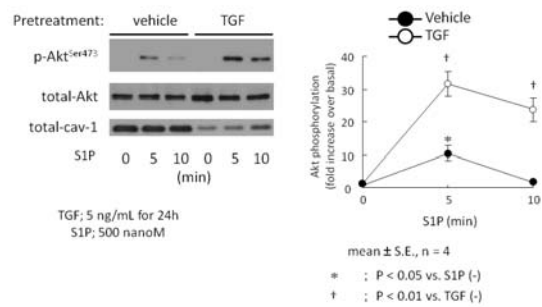
① TGF β 1 は caveolin-1 発現を減弱させる
BAEC 及び HUVEC において、TGF β 1 は経時的及び容量依存的に caveolin-1 の発現をタンパク質レベル、遺伝子レベルで減弱させる。かかる caveolin-1 発現低下は ALK-5 受容体によってもたらされることが明らかとなった。図は BAEC におけるウェスタンブロット法の結果を示す。

② caveolin-1 発現の減弱は S1P への細胞反応を亢進させる

TGF β 1 により caveolin-1 発現が減少した細胞を S1P で刺激すると、タンパク質リン酸化反応及び細胞遊走能が著明に亢進する。かかる反応亢進は TGF β 1 によらず siRNA による caveolin-1 の遺伝子ノックダウンによって



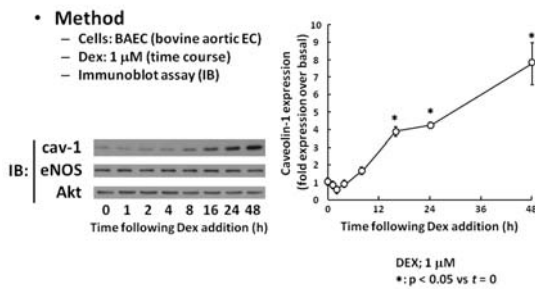
も観察されることから、TGF β 1 を介して、caveolin-1 が虚血後心筋の病態生理において、S1P シグナルに大きな役割を果たしていることが示唆された。上図は BAEC におけるウェスタンブロット法の結果であり、TGF β 1 処理により内皮細胞のリン酸化反応が著明に亢進することを示す。下図は Boyden Chamber 法の結果であり、TGF β 1 が S1P による細胞遊走反応を増加させることを示す。



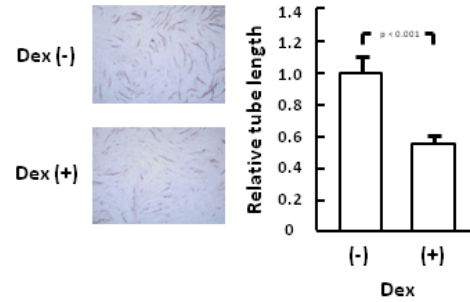
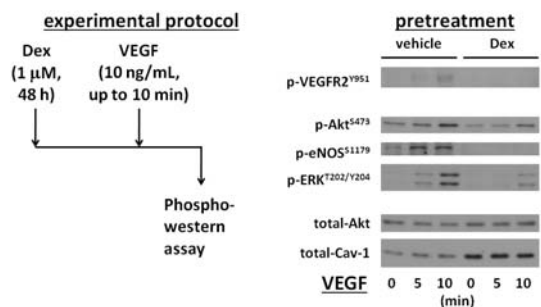
(2) ステロイドホルモンの効果。心筋虚血のようなストレス環境下ではステロイドホルモンの産生が増加する。先の研究で内皮細胞の caveolin-1 の重要性が明らかになったので、ステロイドの caveolin-1 発現への影響を検討した。

① ステロイドは caveolin-1 発現を増加させる

BAEC 及び HUVEC において、糖質ステロイドの一つであるデキサメサゾンを経時的及び容量依存的に caveolin-1 の発現をタンパク質レベル、遺伝子レベルで増加させる。かかる caveolin-1 発現増加はグルココルチコイド受容体によってもたらされることが明らかとなった。鉱質ステロイドの一つであるアルドステロンはミネラルコルチコイド受容体を介して同様の効果をもたらすが、性ステロイドホルモンであるエストロゲン、テストステロン、プロジェステロンには caveolin-1 発現への影響はなかった。図は BAEC におけるウエスタンブロット法の結果であり、デキサメサゾンが caveolin-1 を誘導する効果を示す。



②ステロイドによる caveolin-1 発現の増加は VEGF への細胞反応を減弱させる VEGF は内皮細胞にとって最も重要なポリペプチド型成長因子であり、著しい血管新生促進作用を持つ。研究代表者は以前に、VEGF と S1P の経路の相互作用について世界初の報告を行なっている (Igarashi et al., PNAS 2003(100)10664)。そこで、ステロイド処置によって caveolin-1 発現が増加した細胞での VEGF 反応を検討した。ホスホウエスタン法により、デキサメサゾン処理細胞では VEGF によるタンパク質リン酸化反応が著明に減弱する (上図)。かかるデキサメサゾンの効果は caveolin-1 の遺伝子ノックダウンにより相殺されることから caveolin-1 誘導によりもたらされることが分かった。管腔形成能測定法により、デキサメサゾンは HUVEC の血管新生能を阻害することが分かった (下図)。



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 6 件)

1. Nakai K, Yoneda K, Ishihara Y, Ohmori K, Moriue T, Igarashi J, Kohno M, Kosaka H and Kubota Y. Lipid peroxidation-induced VEGF expression in the skin of KKAY obese mice. *Experimental Dermatology*. 20(5):388-93, 2011. 査読有
2. Yang Y, Yamashita T, Nakamaru-Ogiso E, Hashimoto T, Murai M, Igarashi J, Miyoshi H, Mori N, Matsuno-Yagi A, Yagi T and Kosaka H. Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a ternary complex mechanism. *J Biol Chem*. 286(11):9287-97, 2011. 査読有
3. Yoneda K, Demitsu T, Manabe M, Igarashi J, Kosaka H, Inagaki N, Takahashi H, Kon A, Kakuai M and Kubota Y. Expression of wild-type, but not mutant, loricrin causes programmed cell death in HaCaT keratinocytes. *The Journal of Dermatology*. 37(11): 956-64, 2010. 査読有
4. Tsukamoto I, Sakakibara N, Maruyama T, Igarashi J, Kosaka H, Kubota Y, Tokuda M, Ashino H, Hattori K, Tanaka S, Kawata M and Konishi R. A novel nucleic acid analogue shows strong angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 399(4):699-704, 2010. 査読有
5. Yoneda K, Demitsu T, Nakai K, Moriue T, Ogawa W, Igarashi J, Kosaka H, and Kubota Y. Activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a cellular model of loricrin keratoderma. *J Biol Chem*. 285(21):16184-94, 2010. 査読有
6. Igarashi J, Shoji K, Hashimoto T, Moriue T, Yoneda K, Takamura T, Yamashita T, Kubota Y, and Kosaka H. Transforming Growth

Factor- β 1 Down-Regulates Caveolin-1 Expression And Enhances Sphingosine 1-Phosphate Signaling In Cultured Vascular Endothelial Cells. Am. J. Physiol. (Cell Physiology) 297: C1263-C1274, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. Igarashi J, Shoji K, Hashimoto T, Tsukamoto I, Yoneda K, Kubota Y, and Kosaka H. TGF β 1 down-regulates VEGFR-2 and attenuates VEGF-induced activation of protein kinase Akt in cultured endothelial cells. 2012/3/28 日本生理学会 長野県松本市

2. Igarashi J, Shoji K, Hashimoto T, Yoneda K, Moriue T, Tsukamoto I, Kubota Y, and Kosaka H. Glucocorticoid (GC) up-regulates expression of caveolin-1 (cav-1) and attenuates VEGF responses in endothelial cells (EC). 2011/3/29 日本生理学会 誌上開催

3. 五十嵐淳介、小路和代、橋本剛、米田耕造、森上徹也、塚本郁子、窪田泰夫、小坂博昭 ステロイド受容体アゴニストは caveolin-1 (cav-1) 発現を増加させることで血管内皮のVEGF反応を抑制する 2011/2/4 日本心脈管作動物質学会 香川県高松市

4. Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Kubota Y, and Kosaka H. Steroid Hormones Induce Caveolin-1 (cav-1) And Attenuate vascular endothelial growth factor (VEGF) Responses In Cultured Vascular Endothelial Cells (EC). 2010/11/16 American Heart Association Scientific Sessions. アメリカ合衆国イリノイ州シカゴ市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 淳介 (IGARASHI JUNSUKE)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：20346638

(2) 研究分担者

小坂 博昭 (KOSAKA HIROAKI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：60158897

橋本 剛 (HASHIMOTO TAKESHI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80380153

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：