

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 5 月 9 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590946

研究課題名（和文） 新規昇圧物質カップリングファクター6による血管傷害性の評価と創薬への活用

研究課題名（英文） Estimation of coupling factor 6-induced vascular damage and utilization for drug discovery

研究代表者

長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00169278

研究成果の概要（和文）：

Coupling factor 6 (CF6) は血管平滑筋細胞の表面に存在する ATP 合成酵素の β -subunit と結合し、ATP を ADP に分解することにより、細胞内へ水素イオンの流入を亢進させた。CF6 は c-Src の活性化を介して Ca 流入を惹起し、angiotensin II (AngII) 依存性の細胞内 Ca 濃度の上昇を亢進させた。これらの細胞内 Ca 反応は高血圧自然発症ラット (SHR) で亢進しており、CF6-C 末端に対する抗体で抑制されたことから、CF6-C 末端側の関与が明らかとなった。マウス腸間膜細小動脈を用いた検討では、細動脈局所に発現した CF6 は cSrc の活性化を介して AngII の収縮反応に関与し、その作用は CF6 中和抗体の前投与により抑制された。従って、細動脈における CF6 の阻害はレニン・アンジオテンシン系阻害薬と同様に、AngII に対して拮抗的に作用する可能が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Coupling factor 6 (CF6) bound to β -subunit of ATP synthase at the surface of vascular smooth muscle cells (VSMC), and induced proton influx into the cytoplasm via degradation of ATP to ADP. CF6 induced influx of extracellular calcium and increased intracellular free calcium concentration in response to angiotensin II. These responsiveness of calcium to CF6 was enhanced in spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with Wister Kyoto rats, and were abolished after pretreatment with anti-CF6-C terminus antibody, suggesting that the C-terminus of CF6 is involved in the action of its peptide. In the experiment of mesenteric arteries, CF6 in the arteriole induced the contraction in response to angiotensin II via activation of tyrosine kinase c-Src, and it was attenuated by pretreatment with anti-CF6-C terminus antibody. Overall, these suggest that inhibition of CF6 may antagonize the action of angiotensin II as other inhibitors of rennin-angiotensin system.

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	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科

キーワード：Coupling factor 6, Angiotensin II, Vascular smooth muscle cells, Mesenteric arteriole, Spontaneously hypertensive rat

1. 研究開始当初の背景

プロスタサイクリンは強力な血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を有する生理活性物質である。高血圧自然発症ラット(SHR)ではプロスタサイクリンの内因性産生は低下している。しかし、血液を除去した摘出標本(血管、臓器)での産生は内因性に反して著明に亢進している。この矛盾はSHRにおいてプロスタサイクリン産生を抑制する内因性物質が流血中に存在するという仮説によって説明可能と考えた。近年我々はcoupling factor 6 (CF6)がプロスタサイクリンの産生を阻害する内因性ペプチドであることを発見した(J Biol Chem 1998)。CF6はphospholipase A2を阻害することによりプロスタサイクリン産生を阻害する。COXとプロスタサイクリン合成酵素には影響しない(J Biol Chem 1998)。CF6は血管内皮細胞の表面に存在し、そこから放出され、ずり応力により分泌はさらに亢進する(Circulation, 2001)。ラットにrecombinant CF6を静注すると、昇圧活性を有し、その昇圧反応はSHRがWKYに比較して亢進していた(J Clin Invest, 2001)。また、CF6はSHRの血中で高値を呈し、中和抗体の投与により降圧が認められ、その反応はWKYに比較して亢進していた(J Clin Invest, 2001)。CF6はヒト血中にも存在し、本態性高血圧症患者において高値を示すこと、血中CF6濃度は食塩負荷により増加し、アスコルビン酸投与によりその増加反応は消失することを報告した(J Hypertens 2003)。さらに、最近我々は血液透析患者では血中CF6濃度は高値を示し、内因性nitric oxide synthase (NOS)阻害物質であるasymmetric dimethylarginine (ADMA)と正相関すること、虚血性心疾患の発症と密接な関係を有することを明らかにした(Kidney Int, 2003)。

CF6産生に関する基礎的検討では、tumor necrosis factor- α とずり応力によりCF6 mRNA発現と分泌は亢進し、その反応はNF-kBのdominant negativeにより阻害されることを明らかにした(Cardiovas Res, 2004 and 2005)。CF6のプロモーター解析では、ラットCF6プロモーター領域に1ヶ所のNF-kB結合部位が存在し、NF-kB結合部位のdeletion並びにdouble mutationにより、ずり応力によるルシフェラーゼ活性の亢進は完全に阻害された(Cardiovas Res, 2005)。

CF6の細胞内情報伝達機構に関しては、最近その受容体が血管内皮細胞表面に存在するATP合成酵素の β -subunitであることを明

らかにした(Hypertension, 2005)。受容体に結合したCF6はATPase活性を亢進させ、Foを介して水素イオンを細胞内に流入させ、それに伴って細胞内酸性化を引き起こす。EfrapentinによりATPaseを阻害すると、CF6による細胞内酸性化は抑制され、CF6によるプロスタサイクリン産生の抑制作用が消失する(Hypertension, 2005)。

CF6の生理作用に関しては、血管内皮細胞のNO産生と内皮依存性過分極因子(EDHF)産生を抑制することが明らかとなった(J Hypertens, 2006)。血管内皮細胞にCF6を投与し、cDNA microarrayで増減する遺伝子を検討すると、内因性NOS阻害物質ADMAの産生酵素(PRMT-1)の亢進並びに分解酵素(DDAH-2)の低下が認められ、ADMAの分泌亢進も証明された。さらに、動脈硬化の促進因子であるエストロゲン受容体、ウロキナーゼ受容体の発現亢進、並びに心不全関連ペプチドであるrelaxin、neuregulinの発現亢進も認められた(J Hypertens, 2006)。また、ラット冠細小動脈の収縮実験では、NOとプロスタサイクリンを阻害しても、CF6は強力な収縮を惹起させ、epoxyeicosatrienoic acid (EET)を初めとしたEDHFの産生を阻害して、血管収縮をきたすことも明らかとなった(AHA, 2005)。

最近我々はCF6を投与すると血管平滑筋の細胞内pHが低下することを発見した。通常の生理活性物質が細胞内pHを上昇させるのと対照的である。興味深いことに2型糖尿病でCF6が上昇しており、骨格筋の細胞内pHが低下していることが観察されている。これらは、1) CF6が血管内皮細胞以外を標的細胞として作用すること、2) 細動脈平滑筋に作用して直接的に細動脈硬化の発症・進展に関与する可能性があること、3) CF6は細動脈硬化に関連する糖代謝異常をも惹起し、相乗的に血管障害性を発揮する可能性があることを示唆している。CF6の新規の生理作用に関する臨床的並びに基礎的研究は我々の施設以外では全く行われておらず、本研究がそのパイオニアである。これまでの研究で、遺伝的なCF6発現亢進動物SHRでCF6による昇圧反応性が亢進していること、分子生物学的手法を用いたCF6過剰発現動物で2型糖尿病が発症することを明かにしたが、CF6の細動脈血管傷害性の作用機序とそれに拮抗する創薬に向けたCF6作用の活性中心に関しては依然として不明である。これらを明らかにするために、CF6過剰発現マウスの摘出細動脈の収縮反応性をex vivoで検討し、他の生理活

性物質による血管収縮作用との相互作用を解明することにより循環器疾患における CF6 の病態生理学的意義を確立する。また、CF6 の血管平滑筋における細胞内情報伝達機構と細動脈硬化の発症・進展機序との関連に関して、SHR と正常血圧モデル(WKY)を比較検討することにより血管病の病態形成における CF6 の役割を明らかにする。さらに CF6 の C 末端に対する中和抗体を使用することにより、CF6 作用の活性中心を推察する。これらから、CF6 の病態生理学的意義の解明と創薬に向けた CF6 の活性中心の同定が期待される。

2. 研究の目的

我々は最近 CF6 を投与すると血管平滑筋細胞内の pH が低下することを発見した (**Hypertension, 2005**)。従って、血中 CF6 の生理作用はおそらく細胞表面にある ATP 合成酵素を介することが推察される。

本研究で明らかにする第 1 点目は、血管平滑筋細胞に CF6 を投与し、CF6 の細胞内情報伝達機構に関して、 ^{125}I -CF6 と VSMC の結合実験、 ^3H アラキドン酸遊離実験、ATPase 活性測定実験、並びに細胞内 pH の indicator である BCECF を用いた細胞内 pH 測定と ATPase 阻害薬の各パラメーターへの影響を明らかにし、血管平滑筋細胞における CF6 の細胞内情報伝達機構を解明することである。特に血管平滑筋細胞は細胞内カルシウムの増加を伴って収縮反応が惹起されるので、細胞内カルシウム濃度に及ぼす CF6 の影響を fura-2 を用いて解析する。

本研究で明らかにする第 2 点目は、CF6 の血管平滑筋に対する細胞内情報伝達系が解明されれば、疾患モデルである SHR と WKY で CF6 に対する反応性の差異について検討する。もし SHR が WKY に比してシグナル亢進が認められれば、その原因について細胞内情報伝達系のどのステップに異常が存在するか解明する。

本研究で明らかにする第 3 点目は、CF6 の心血管系に及ぼす *in vivo* の影響を包括的に明らかにし、心血管障害性を metabolom として理解するために、CF6 過剰発現マウスと野生型マウス(WT)の冠細小動脈を含んだ心臓を摘出し、Easy キットを用いて mRNA を抽出後、microarray 法で CF6 過剰発現マウスにおける遺伝子 4 万個の網羅的解析を行う。

本研究で明らかにする第 4 点目は、CF6 過剰発現マウス細小動脈を用いて、アンジオテンシン II の収縮作用における CF6 の役割に関して摘出血管径を直接 CCD カメラで観察することにより明らかとする。CF6 によりアンジオテンシン II の収縮反応が亢進する可能性が強く推察されるが、分子機序を種々の細胞内シグナル拮抗薬を用いて同定する。さらに、

創薬に向けた基礎研究として CF6 の中和抗体を作製し、アンジオテンシン III による収縮反応に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

CF6 の細胞内情報伝達機構

CF6 は ATP 合成酵素の 1 つの component であり、ATP 合成酵素から容易に遊離する性質を有する。CF6 が欠損した ATP 合成酵素はその活性が約 1/10 に低下することが報告されている。最近、細胞表面に存在する ATP 合成酵素は、angiotensin や HDL コレステロールの apoA1 受容体として作用することが報告されている。CF6 が細胞表面 ATP 合成酵素に作用する場合、ATP 合成酵素は酸化的リン酸化により ATP を産生するので、水素イオンの移動により細胞内 pH が変化する。実際、我々は最近 CF6 を投与すると血管平滑筋細胞内の pH が低下することを発見した。従って、血中 CF6 の生理作用は細胞表面にある ATP 合成酵素を介する可能性が極めて強い。

1) ^{125}I -CF6 と VSMC の結合実験を行った。 ^{125}I -CF6 と VSMC の至適結合条件を決定後、cold-CF6 を種々の濃度添加し、competitive displacement analysis により CF6 受容体の存在の有無並びに受容体数・Kd を求めた。さらに、CF6 と VSMC の結合を調節する分子について検討した。

2) ATP 合成酵素の catalytic domain inhibitor である efrapentin を前投与し、CF6 のプロスタサイクリン産生抑制作用に及ぼす影響を明らかにするために、VSMC の細胞膜を ^3H アラキドン酸でラベル後、以下について検討した。Efrapentin 10^{-5}M で 30 分 preincubation 後、CF6 10^{-7}M 添加し 30 分間に放出される ^3H アラキドン酸を測定した。

3) ATP 合成酵素は酸化的リン酸化により ATP を産生する。細胞表面の ATP 合成酵素が CF6 の受容体の場合、CF6 投与により ATP 並びに ADP 産生が影響を受けるはずである。VSMC に CF6 を投与し、ADP 産生量を pyruvate kinase-lactate dehydrogenase 反応により比色法で測定した。

4) ATP 合成酵素は酸化的リン酸化により ATP を産生するので、水素イオンの移動により細胞内 pH が変化する可能性がある。実際、我々は最近 CF6 を投与すると VSMC の pH が低下することを発見した。細胞内 pH の indicator である BCECF を VSMC 内に load し、CF6 投与による細胞内 pH の変化に対する ATP 合成酵素 inhibitor である efrapentin 前投与の影響を蛍光装置を用いて明らかにした。

CF6 反応性亢進機序の解明

CF6 が細胞表面 ATP 合成酵素に作用する場

合、ATP 合成酵素は酸化リン酸化により ATP を産生するので、水素イオンの移動により細胞内 pH が変化する。実際、我々は最近 CF6 を投与すると血管平滑筋細胞内の pH が低下することを発見した。

CF6 の細胞内情報伝達機構が完全に証明された後に、疾患モデルでの病態形成意義を明らかにするために、SHR と WKY を比較検討した。これまでの CF6 昇圧反応性の成績から平滑筋でも CF6 の反応性亢進が推察されるが、1) 結合実験、2) ATPase 活性測定、3) 細胞内 pH 測定を行い、CF6 の反応性亢進がいずれのステップの異常に起因するかを明らかにした。

CF6 の心血管系遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析

1) CF6 の心血管系に及ぼす *in vivo* の影響を包括的に明らかにし、血管障害性を *metabolom* として理解するために、CF6 過剰発現マウスと野生型マウス(WT)の冠細小動脈を含む心臓を摘出し、Easy キットを用いて mRNA を抽出した。

2) CF6 過剰発現により増加または減少する遺伝子を日立の *microarray* キットを用いて検出した。その中で血管収縮・弛緩に関するもの、血栓形成に関するものを *pick up* し、CF6 の循環器系に及ぼす新規の作用を検索した。

CF6 過剰発現マウス摘出細小動脈による CF6 血管収縮作用の分子機序

CF6 は通常ミトコンドリアに *sorting* される。CF6 が各臓器全般に発現し、血中 CF6 濃度が上昇することをデザインし、CF6 過剰発現マウスを作製した。Human elongation factor 1 α を *promotor* とし、ヒトカルシトニン N 末端 (*secretion signal peptide*) と mature CF6 cDNA を接続した発現ユニットを作製した。筑波大学生命科学動物資源センターに依頼し遺伝子導入マウス(ヘテロ)を3匹作製してもらった。現在その内の3系統で CF6 過剰発現マウスを作製済みで繁殖中である。

1) CF6 過剰発現マウスから摘出した腸間膜細小動脈 (直径 60-120 μm) を用いて、CF6 の血管収縮作用の分子機序について *ex vivo* で明らかにした。また、他の生理活性物質による血管収縮作用との相互作用を解明した。具体的には、CF6 過剰発現マウス細小動脈を用いて、アンジオテンシン II の収縮作用における内因性 CF6 の生理作用を摘出血管径を直接 CCD カメラで観察・検討した。CF6 によりアンジオテンシン II の収縮反応が亢進する可能性が強く推察されるが、その場合、分子機序を細胞内シグナル拮抗薬を用いて同定する。具体的には、これまでの検討で CF6 はチロシ

ンキナーゼ c-Src を活性化する可能性が大きいので、c-Src 阻害薬 PP1 について検討した。

2) 創薬に向けた基礎研究として CF6 の N 末端並びに C 末端に対する中和抗体を作製し、CF6 を介したアンジオテンシン II による収縮反応亢進作用に及ぼす影響を明らかにした。これまで我々は、C 末端に対する中和抗体がアンジオテンシン II による摘出血管の収縮を抑制する予備的データを得ており、それについて更なる検討を加えた。

4. 研究成果

CF6 過剰発現マウス摘出細小動脈による CF6 血管収縮作用の分子機序

結果 : 1) 摘出腸間膜細小動脈の AngII 投与前の血管径は両群で差がなかった。AngII (10^{-11} - 10^{-6} M) による収縮反応は TG が WT に比較して約 1.5 倍有意に大であった。AngII による収縮反応は PP1 の前投与並びに CF6 抗体の前投与により著明に抑制 (PP1 : $-79\pm 5\%$, CF6 抗体 : $-85\pm 5\%$) され、TG と WT 間の差は消失した。非特異的 IgG の前投与は AngII による収縮反応に影響を与えなかった。また、PP1 並びに CF6 抗体前投与は KCl に対する収縮反応に影響を与えなかった。

結論 : 細動脈局所に発現した CF6 は cSrc の活性化を介して AngII の収縮反応に関与し、その作用は CF6 中和抗体の前投与によりほぼ完全に抑制された。従って、細動脈局所の CF6 阻害はレニン・アンジオテンシン系阻害薬と同様に、AngII に対して拮抗的に作用する可能が示唆された。

CF6 の細胞内情報伝達機構と反応性亢進機序

結果 : 1) Competitive displacement analysis より求めた CF6 受容体の Kd 値は SHR が WKY に比較して小であった。2) アラキドン酸基遊離は SHR と WKY 間で差はなかった。CF6 投与により、アラキドン酸遊離は用量依存性に減少しその程度は SHR が WKY に比して大であった ($51.3\pm 2.7\%$ vs $24.5\pm 6.9\%$)。また、CF6 による抑制効果は efrapentin 並びに ATP 合成酵素 β -subunit 抗体の前投与により完全に阻害された。3) ATPase 活性は、CF6 10^{-7} M 投与により上昇し、SHR が WKY に比較して大であった。4) 細胞内 pH は CF6 10^{-7} M 投与により低下し、その低下は SHR が WKY に比較して大であった。5) c-Src は CF6 10^{-7} M 投与により tyrosine 残基がリン酸化され、その反応は SHR が WKY に比較して 2 倍大であった。6) A7r5 細胞に CF6 10^{-7} M を添加すると、細胞内遊離 Ca 濃度の上昇が認められ、nifedipine 投与により完全に抑制された。AngII 10^{-7} M による細胞内遊離 Ca 濃度の上昇は CF6 10^{-7} M 前投与

により増強され、その程度は SHR が WKY に比較して大であった(412±26 vs 162±14 nM, p<0.05)。CF6 による Ca influx と AngII 依存性 Ca 濃度上昇の増強作用は c-Src 阻害薬 PP1 の前投与により消失した。7) これらの作用はすべて CF6 の C 末端に対す抗体で阻害された。**結論** : CF6 は VSMC の表面に存在する ATP 合成酵素のβ-subunit と結合し、ATP を ADP に分解することにより、細胞内への水素イオンの influx を亢進させた。CF6 は c-Src の活性化を介して、Ca influx と AngII 依存性 Ca 濃度上昇の亢進作用を示した。これらの反応は SHR で亢進しており、CF6 の高血圧への関与が示唆された。この作用には CF6 の C 末端側が関与することが明らかとなった。

CF6 の心血管系遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析

血管収縮・弛緩に関連分子、血栓形成関連分子の中で**CF6**過剰発現マウス心が有意に発現亢進しているものはなかった。

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 5 件)

- ① Osanai T, Tomita H, Kushibiki M, Yamada M, Tanaka M, Ashitate T, Echizen T, Katoh C, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. *Cardiovasc Res*. 2009;81:780-787.
- ② Osanai T, Tomita H, Yamada M, Tanaka M, Ashitate T, Echizen T, Katoh C, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6-induced prostacyclin inhibition is enhanced in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2009;27:1823-1828.
- ③ Osanai T, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 as a novel vasoactive and proatherogenic peptide in vascular endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;380:205-214.
- ④ Osanai T, Fujiwara N, Sasaki S, Metoki N, Saitoh G, Tomita H, Nishimura T, Shibitani S, Yokoyama H, Konta Y, Magota K, Okumura K. Novel pro-atherogenic molecule coupling factor 6 is elevated in patients with stroke: A possible linkage to homocysteine. *Ann Med*.

2010;42:79-86.

- ⑤ Ashitate T, Osanai T, Tanaka M, Magota K, Echizen T, Izumiyama K, Yokoyama H, Shibutani S, Hanada K, Tomita H, Okumura K. Overexpression of coupling factor 6 causes cardiac dysfunction under high salt diet in mice. *J Hypertens* 2010;28:2243-2251.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 induces tissue acidosis and thereby salt-sensitive hypertension with diabetes by Rac1 activation and insulin receptor inactivation. Scientific Sessions 2011 (American Heart Association), Orland (USA), November 13-16, 2011.
- ② 長内智宏, 泉山圭, 相楽繁樹, 山本祐子, 奥村謙 : Coupling factor 6 は細胞内酸性化を介して Rac1 を活性化し食塩感受性高血圧とインスリン抵抗性を惹起する第 34 回日本高血圧学会総会 平成 23 年 10 月 20-22 日、宇都宮
- ③ Osanai T, Okumura K: Interaction between coupling factor 6 and ecto F1Fo complex induces hypertension and diabetes by tissue acidosis. Scientific Sessions 2010 (American Heart Association), Chicago (USA), November 14-17, 2010.
- ④ 長内智宏, 渋谷修司, 花田賢二, 泉山圭, 相楽繁樹, 山本祐子, 奥村謙 : 新規の細胞内 pH 調節機構 F₁F_o complex は coupling factor 6 で活性化され血圧並びに糖代謝を調節する。第 33 回日本高血圧学会総会 平成 22 年 10 月 15-17 日、福岡
- ⑤ Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 enhances the action of angiotensin II and causes insulin resistance in mice. Scientific Sessions 2009 (American Heart Association), Orland (USA), November 15-18, 2009
- ⑥ 長内智宏, 榎引基, 山田雅大, 奥村謙 : 新規の昇圧物質 coupling factor 6 は cSrc の活性化を介して angiotensin II の収縮反応を亢進させる。第 32 回日本高血圧学会総会、平成 21 年 10 月 1-3

日

〔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〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00169278

(2) 研究分担者

奥村 謙 (OKUMURA KEN)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20185549

(3) 連携研究者

なし