

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25年5月24日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580131
 研究課題名（和文）血管病発症の分子メカニズム解明と、革新的天然成分による予防的治療法の開発
 研究課題名（英文）The elucidation of molecular mechanism of vasospasm and the development of the prophylactic treatment with innovative natural ingredient.
 研究代表者
 加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)
 山口大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：00379942

研究成果の概要（和文）：我々は、血管攣縮（血管の異常収縮）に代表される致死的な血管病の原因分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン（SPC）と Fyn を同定し、その病的シグナル伝達経路の一部を明らかにしてきた。本研究では、血管異常収縮の詳細な分子メカニズムを解明することを目的とし、病的シグナル伝達の反応の場と考えられる細胞膜上のマイクロドメイン「膜ラフト」と血管異常収縮の関連性について検討した。また、血管病の予防的治療法を開発するため、血管の正常収縮には影響を与えず、SPC によって引き起こされる異常収縮のみを特異的に抑制する物質の機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Abnormal vascular smooth muscle (VSM) contraction (vasospasm) is one of the crucial phenomena which cause cardiac angina and myocardial infarction. We previously found that sphingosylphosphorylcholine (SPC) as an upstream mediator for the abnormal pathway through the activation of Fyn, a member of Src family tyrosine kinase. The localization of Fyn in cholesterol-enriched membrane microdomain, lipid rafts, suggest the essential roles of membrane lipid rafts in abnormal contraction. Therefore, we investigated the relationship between lipid rafts and SPC-induced Ca^{2+} -sensitization of VSM. In addition, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) revealed prophylactic compounds that can markedly inhibit the Ca^{2+} -sensitization, without affecting physiological Ca^{2+} -dependent contraction. These results suggest that innovative natural ingredient may contain novel protective components active against abnormal VSM contraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：膜動態科学、食品機能学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：血管病、膜ラフト、モデル膜、リポソーム、シグナル伝達、天然成分

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中などの血管病は、合計すると我が国死因の第二位であり、また、突然死の主原因となる致死の難病でもある。通常、血管は、細胞質 Ca^{2+} 依存性に収縮する事により、血圧や血流を一定に保っている（正常収縮）が、恐ろしい血管病の本態である血管の異常収縮は、この Ca^{2+} では説明がつかない、Rho キナーゼを介した Ca^{2+} 非依存性の収縮によって引き起こされる。しかしながら、この異常収縮の制御機構が不明なため抑制薬が開発できず、原因の解っている正常収縮を抑制する薬剤が用いられてきた。その結果、治療効果が不十分なだけでなく、正常収縮の抑制、即ち血圧の低下が生じている。従って、血管異常収縮の分子機構を早急に解明し、適切な予防的治療法を開発することが、国民衛生上の緊急かつ最重要課題である。近年、我々は、世界に先駆けて血管異常収縮の原因分子である SPC を同定し (Circ Res, 2002)、また、SPC による血管異常収縮が、血中コレステロール濃度が正常な動物やヒトでは起こらず、高コレステロール血症の場合のみ観察され、その上、LDL コレステロール値とは正相関するが、HDL コレステロールとは逆相関する事を見出した。つまり、SPC による血管異常収縮がコレステロール依存性であることを発見し、異常収縮のシグナル伝達に膜コレステロールが必要である事、Fyn の反応の場として膜ドメインが必要である事を突き止めた (Circ Res, 2006)。膜コレステロールを選択的に除去すると膜ラフトの消失と共に血管病シグナル伝達も遮断されることから、コレステロールが蓄積した膜ラフトが血管の異常収縮を引き起こすシグナル伝達の反応の場となっている可能性が高い。最近の知見では、膜ラフトは静的ではなく、刺激によりシグナル分子が出入りすると同時に、ラフト自体もその大きさや脂質組成が動的に変化（クラスター化）することが示されている。このような膜ラフトの挙動や膜ラフトに局在するシグナル分子の動態について解明し、血管異常収縮における膜ラフトの役割、さらには血管異常収縮の詳細な分子機構を解明する必要がある。

一方、理想的には、SPC 産生による血管異常収縮の後に作用する“治療薬”ではなく、異常収縮そのものを予防する事が重要である。我々は、多種多様な構造を有する数多くの天然物の中から、新規物質が、*in vitro* 系において SPC による血管異常収縮を特異的に抑制する事を

世界に先駆けて発見した（特許出願準備中のため詳細は未記載）。新規成分は、血管正常収縮を抑制することなく、SPC による血管異常収縮のみを選択的に抑制できる、微量で非常に高い効果を示す革新的物質であり、他の天然成分とは雲泥の差である。そこで、革新的天然成分の機能解析を行い、予防的治療法として早期の実用化を目指す。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的として、血管異常収縮の反応の場と考えられる膜ラフトの挙動や、膜ラフトに局在するシグナル分子の動態について解明し、血管異常収縮における膜ラフトの役割、さらには血管異常収縮の詳細な分子機構を解明する必要がある。そこで、独自に開発したハイブリッドリポソームを応用して、膜ラフトの動態変化を経時観察すると共に、血管異常収縮を引き起こす病的シグナル分子の多因子・同時可視化を行い、分子間相互作用を定量的・経時的に評価する。このハイブリッドリポソームの利点は、①培養細胞や動物モデルを用いた実験系のように細胞内の種々の多因子の影響を受けないこと、②経費と時間の問題による個体数の制限や個体差による再現性の問題を考慮する必要がないこと、③感度の選択性を向上させることで、目的にあったモデル膜を調製することが可能であること、の3点である。

さらに、我々は、血管病発症後に作用する治療薬ではなく、血管の異常収縮そのものの予防法を開発するため、多種多様な構造を有する数多くの天然物をスクリーニングし、*in vitro* 系において血管の正常機能（血圧を維持する正常収縮）に影響を与えることなく、SPC による異常収縮のみを特異的に抑制する新規成分を見出している。天然成分、特に食品由来の機能性成分であれば、血管病が発症する「前」から、日常食として気軽に摂取することが可能であり、真の血管病予防効果が期待できる。そこで、本研究の第二の目的は、予防的治療法の開発を目指し、新規成分の機能評価を行う事である。

3. 研究の方法

(1) 膜ラフトの直接的視覚化による解析

血管病原因分子である SPC が血管異常収縮

を引き起こすためには、第一段階として細胞膜へ結合するが、通常用いられる培養細胞を用いた実験系では、細胞内の他の多因子の影響を受けやすく、本研究のように病的シグナル経路の中で膜ラフトに注目して検討する場合には、少なくとも初期段階の実験系としては不向きである。そこで、本研究では、膜ラフトと特定の病的シグナル分子との相互作用を純粋な実験系で検討するため、独自に開発したハイブリッドリポソームを応用し、ラフトの人工モデル膜を作成した。このラフトの人工モデル膜を用いて、SPCと膜との相互作用解析や、膜表面の挙動解析をするための条件検討を行った。

(2) 生体レベル解析

革新的天然成分の早期実用化を目指すためには、生体レベルでの検証を行い、有効血中濃度とこれに必要な経口摂取量を決定する必要がある。しかしながら、系統化された血管攣縮のモデル動物が入手困難なため、モデル動物を作成する必要がある。また、天然成分の *in vitro* 系における血管異常収縮の抑制効果は確認しているものの、実験動物に供与するために適切な濃度設定の検討が必要である。本研究では、独自のサンプル濃縮調製法を用いた生体レベル検証で用いる最適濃度を調べた。

4. 研究成果

(1) ラフトの人工モデル膜(ハイブリッドリポソーム)と病的シグナル分子との相互作用解析

SPCによる血管の異常収縮は、血清および血管組織のコレステロール濃度に依存することから(図1)、コレステロール含量を変化させた人工膜を調製し、表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて、SPCと人工膜との親和性評価を行った。その結果、人工モデル膜中のコレステロール濃度が上昇するほど、SPCの親和性が高くなっており、また、動力学解析を行ったところ、コレステロール含有率が高くなるほどSPCの結合が速く、強く結合し、一度結合したSPCは膜から離れにくいことを証明した。つまり、SPCとコレステロールとの直接的な親和力が、血管の異常収縮を引き起こす重要なファクターであることを突き止めた。また、独自に開発したハイブリッドリポソームを応用し、ラフトの構

成成分であるコレステロールとスフィンゴ脂質の構成比を変化させることで、ラフトの人工モデル膜の作製に成功した。この人工ラフトモデル膜に対するSPCの結合量を調べたところ、コレステロールのみで調製した人工膜に比べて、人工ラフトモデル膜の方が、高い親和性を示した。次に、実際の血管平滑筋細胞を用いて、SPCとの相互作用解析を行った。これまでのSPR法では、2つの問題点があり、細胞を用いた解析が困難であった。一つ目は、SPR装置の流路系に使われているチューブ等に細胞が吸着してしまい、解析に必要な細胞の量を、解析部に固定化することが難しいことである。二つ目は、細胞の大きさがマイクロ単位であるため、SPRシグナルの検出限界である300nmの範囲を超えてしまっており、正確な解析ができないことである。そこで、我々は、Bio-Rad社との共同研究によりSPR法を改良し、生きた細胞を用いた生体分子間相互作用の解析方法を開発した(図2)。SPCは、その構造中にある水酸基の立体配置により、Dエリスロ型とLスレオ型が存在するため、我々が改良した解析方法を用いて、血管平滑筋細胞に対するSPC立体異性体の結合反応を解析した。その結果、Dエリスロ型SPCは濃度依存的に血管平滑筋細胞と結合するが、Lスレオ型SPCは結合が見られなかった。これは、SPCによって引き起こされる血管の異常収縮反応と相関している。つまり、細胞膜に結合しないLスレオ型SPCは、血管の異常収縮も引き起こさず、細胞膜に濃度依存的に結合するDエリスロ型SPCは、血管の異常収縮を引き起こした。確認のため、血管の異常収縮を引き起こさない他のスフィンゴ脂質類(スフィンゴシン、スフィンゴシン1リン酸、スフィンゴミエリン等)についても調べたところ、他のスフィンゴ脂質類は、血管平滑筋細胞に対して結合しなかった。

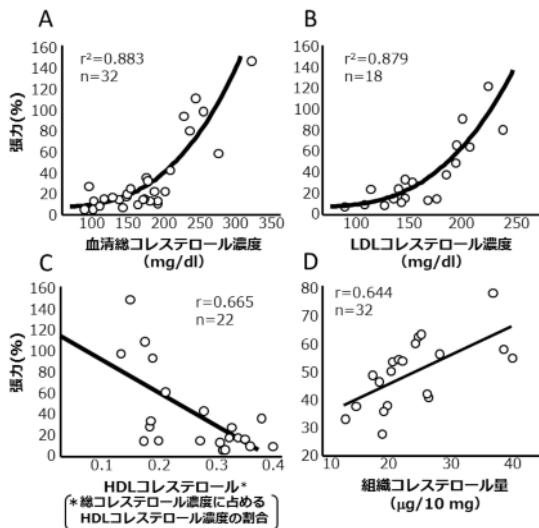


図1. SPCによる血管異常収縮と、血清総コレステロール濃度(A)、LDLコレステロール濃度(B)、HDLコレステロール(C)および血管組織コレステロール量(D)との関係

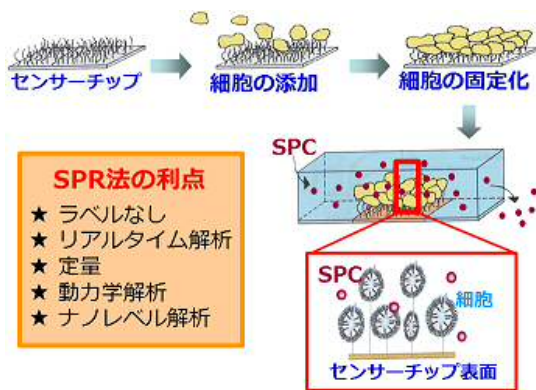


図2. SPCと生細胞との相互作用解析法(概略)

(2) 走査型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡による膜ラフトの挙動解析

クラスター化(動的変化)する膜ラフトの挙動を観察するため、ラフトの人工モデル膜(ハイブリッドリポソーム)を用いて走査型電子顕微鏡(SEM)の観察条件を検討したところ、非蒸着で(試料を破壊せず)、低加速電圧観測(微細形状の鮮明観察)により、3次元計測を行う測定条件を確立した。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)においては、膜の最表面像を原子オーダーという極めて高い分解能で観察する測定条件を確立した。まず、人工モデル膜では、ラフトではない形質膜のモデル膜表面は、全体的に凹凸が見られるが、ラフトの人工モデル膜では表面形状がなだらかになっていることを明らかにした。これ

らのモデル膜にSPCを添加すると、膜全体が隆起したが、他のスフィンゴ脂質の添加では見られなかった。実際に、血管平滑筋細胞を用いて、細胞構造を観察したところ、SPC刺激による細胞膜表面構造のダイナミックな変化をとらえることに成功した。

(3) 革新的天然成分の機能解析

これまでの研究で、SPC刺激時に起こるFynの細胞質から細胞膜への移動を特異的に抑制する物質として、魚油に多く含まれるn-3系多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸(EPA)を発見した。しかしながら、EPAのみで血管病を予防するために必要な量を摂取することは困難であるため、EPA以外にも血管の異常収縮を特異的に抑制する物質を探索したところ、新規の候補素材を見出した。そこで、血管の正常収縮および異常収縮に対して、天然成分の濃度による収縮反応性を調べ、抑制率および抑制速度の観点から、生体レベル検証で用いる最適濃度を決定した。本研究で用いた天然成分は、食品由来であるため、血管異常収縮の予防成分として、毎日の食事から摂取し、血管病を防ぐことができる予防的治療候補素材であるため、引き続き、後述(4)に記載の実験動物を用いた生体レベル解析を進める。

(4) 脳血管攣縮モデルマウスの作成

これまで、血管イメージング装置によるイヌの血管造影観察に成功しており、イヌの髄腔内にSPCを注入すると脳血管攣縮を起こすこと、さらにEPAを投与することにより血管が弛緩することを確認している。しかしながら、大・中型動物では、遺伝子改変が困難なため、新たに、遺伝子操作が可能なモデルマウスの作成が必要である。そこで、野生型マウスを用いて、高い確率で脳血管攣縮を誘発させる技術を確認し、脳血管攣縮の組織学的確認を行ったところ、脳切片の神経細胞が細胞質に凝集し、細胞数が減少していることを確認した。今後は、このモデルマウスを用いて、天然成分の生体レベル検証を進める。

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)

①Dan Xu, Hiroko Kishi, Hozumi Kawamichi,

Katsuko Kajiya, Yuichi Takada, Sei Kobayashi, Sphingosylphosphorylcholine induces stress fiber formation via activation of Fyn-RhoA-ROCK signaling pathway in fibroblasts, Cellular Signalling, 査読有, 24, 282-289, 2012, DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.09.013

②Katsuko Kajiya, Hiroko Kishi, Yuichi Takada, Ying Zhang, Tomohiko Kimura, Kenji Miyanari, Hiroshi Hagihara, Sei Kobayashi, New avenues to vascular disease prevention by food components, Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 査読有, 217, 284-289, 2012, [http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/ffij-e217\(3\)](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/ffij-e217(3))

[学会発表] (計 37 件)

①Katsuko Kajiya, Structural and functional analysis of membrane microdomain as a platform for cell signaling pathway of Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction, The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 27-29, 2013, Tower Hall Funabori, Tokyo. (入澤宏・彩記念若手研究奨励賞)

②Katsuko Kajiya, The importance of cholesterol and membrane lipid rafts as a platform of signaling pathway in abnormal vascular smooth muscle contraction, The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, May

19-21, 2010, Morioka Civic Cultural Hall (MALIOS) & Iwate Prefecture Citizen's Cultural Exchange Center (Aiina), Morioka.

(Poster Award)

③Katsuko Kajiya, Important role of membrane lipid rafts in Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction, XXth World Congress of the International Society for Heart Research, May 13-16, 2010, Kyoto International Conference Center, Kyoto.

[図書] (計 2 件)

①加治屋勝子、国際文献社、化学と生物、2012、269-276.

②加治屋勝子、食品研究社、フードリサーチ、2010、36-38.

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~lily/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00379942

(2) 研究分担者

岸 博子 (KISHI HIROKO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40359899