

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790190

研究課題名（和文）平滑筋細胞増殖由来血管系レドックス恒常性破綻を抑制する動脈硬化症予防薬の探索

研究課題名（英文）Exploration of the drug for atherosclerosis which related to the proliferation of smooth muscle cells-induced rupture of vascular redox homeostasis

研究代表者

神谷 哲朗（KAMIYA TETSURO）

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453057

研究成果の概要（和文）：血清誘導性平滑筋細胞増殖過程における抗酸化酵素発現量を測定したところ、細胞外局在型の SOD アイソザイムである EC-SOD のみ発現量が減少することを明らかにした。また、その発現減少機構に MEK/ERK 由来シグナルが関与することを明らかにした。各種フラボノイドの血管疾患予防薬としての有用性を検討したところ、luteolin および chrysoeriol に有用性が見出された。以上、EC-SOD 発現量を制御することにより、血管疾患の発症予防・進展抑制に繋がると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the regulation of EC-SOD during FCS-induced VSMCs proliferation to explore the drug for atherosclerosis. We confirmed that the reduction of EC-SOD during FCS-induced cells proliferation through MEK/ERK-derived signaling. Further, pretreatment with flavonoids such as luteolin and chrysoeriol significantly suppressed FCS-triggered EC-SOD reduction. Overall, we suggested that the regulation of EC-SOD might lead to improve vascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：EC-SOD、MEK/ERK、フラボノイド

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は、我が国の死亡原因の上位である血管疾患の基礎疾患であることから、その予防・改善に向けて予防ガイドラインの改定など社会的対策が進められている。近年、ガンを初め血管疾患などの病態を慢性炎症プロセスと捉える考え方が広まってきており、その炎症のキーファクターである酸化ストレスへの対応は喫緊の課題である。

Superoxide dismutase (SOD) は生体内における主要な抗酸化酵素であり、Cu,Zn-SOD、Mn-SOD および extracellular-SOD (EC-SOD) の三種の SOD アイソザイ

ムの存在が報告されている。Cu,Zn-SOD は細胞質に、Mn-SOD はミトコンドリアに局在するのに対して、EC-SOD は細胞外局在型の SOD アイソザイムであり、血管内皮細胞フロントラインにおいて、組織を酸化ストレスから防御していると考えられている。実際に、EC-SOD を過剰発現させた場合には、虚血後の梗塞部位のサイズが縮小すること、反対にノックダウンさせた場合には梗塞部位のサイズが増大することなど血管病態下における重要性が報告されている。

最近、血管系レドックス恒常性破綻の破綻が動脈硬化症を促進するという考え方が急速に広まっており、その予防策として食品な

どから摂取可能な抗酸化物質（フラボノイド、ポリフェノールなど）の適用が注目されている。しかし、血管疾患病態下における内因性の抗酸化酵素の発現調節機構の詳細は十分に解明されていない。従って、生体内における抗酸化酵素の発現並びに活性を制御することは、血管疾患の発症・増悪の抑制に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規動脈硬化症予防薬の探索である。そのためには、動脈硬化症発症・増悪のキーファクターである平滑筋細胞増殖過程における平滑筋細胞制御因子の発現変動とその機序の解明が必要であると考え、細胞外局在型 SOD アイソザイムである EC-SOD をはじめとする抗酸化酵素の発現とその機序の解明を目的とした。

また、食品由来のフラボノイドは抗酸化作用を有することが報告され、血管疾患予防への適応が期待されている。そこで、各種フラボノイドの血管疾患予防薬としての有用性を、SOD 発現制御の観点から検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト血管平滑筋細胞 (VSMCs) は 4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10% ウシ血清 (FCS) を含む DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。細胞の増殖誘導は細胞がコンフルエントになった後、培地を FCS 不含の DMEM に置換し、翌日種々の濃度の FCS を含む DMEM に交換し 24 時間まで培養した。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一種である extracellular-regulated protein kinase (ERK) および ERK kinase (MEK) 阻害剤である U0126 (10 μM) および PD98059 (50 μM) の影響は、FCS 含有 DMEM への置換と同時に添加し評価した。

### (2) 細胞増殖の測定

FCS 処理細胞の細胞並びに各種阻害剤で処理した細胞を、黄色チップを用いて細胞の間腔を作製し、その間腔への細胞増殖を顕微鏡下観察した。

### (3) mRNA 発現量の測定

FCS 処理細胞並びに各種阻害剤で処理した細胞から、トリゾール試薬を用いて総 RNA の抽出及び cDNA の合成を行った。調製した cDNA を用いて、SOD アイソザイムおよび epidermal growth factor (EGF) を含む各種成長因子の mRNA 発現量を RT-PCR 法にて測定した。

### (4) タンパク質発現量の測定

FCS 処理細胞並びに各種阻害剤で処理した細胞から、総タンパク質の抽出を行い、ウェスタンブロット法にて、リン酸化及び総 MEK/ERK 発現量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) FCS による VSMCs 細胞増殖評価

FCS 処理による VSMCs 増殖を検討した。10% FCS 含有 DMEM で培養したところ、FCS 不含 DMEM で培養した細胞と比較し、著しい細胞増殖の亢進が認められた (図 1)。また、この FCS 誘導性 VSMCs 増殖は FCS の濃度依存的に亢進する傾向が認められた (データ未掲載)。以上より、FCS 処理により VSMCs 増殖がすることが明らかとなった。また、今後細胞増殖を誘導する際の FCS の濃度は 10% とした。

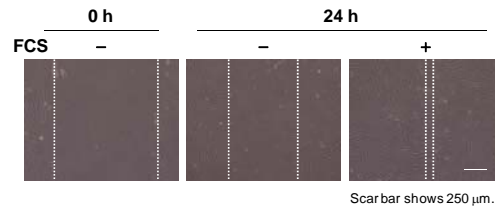


図 1 FCS 誘導性 VSMCs 増殖 (顕微鏡下で VSMCs 増殖を観察)

### (2) FCS 誘導性 VSMCs 増殖過程における SOD アイソザイムの発現変動

VSMCs を種々の濃度の FCS 含有 DMEM で培養したところ、FCS の濃度依存的に EC-SOD mRNA 発現量の減少が認められた (図 2)。一方、他の SOD アイソザイムである Cu, Zn-SOD および Mn-SOD の mRNA 発現量に変化は認められなかった。この結果より、FCS 誘導性 VSMCs 増殖過程において EC-SOD のみその発現量が調節を受けることが明らかとなった。また、EGF などの成長因子の mRNA 発現量の増大も認められ (データ未掲載)、これら因子が FCS 誘導性 VSMCs 増殖に関与している可能性が示唆された。

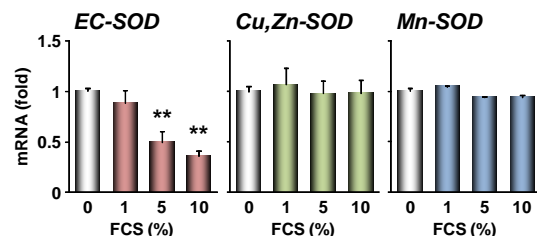


図 2 SOD 発現に及ぼす FCS の影響 (\*\*  $p < 0.01$  vs. FCS 不含 DMEM にて培養した VSMCs)

(3) FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少における MAPK の関与

MAPK は各種細胞内シグナルに関与することが知られている。特に、MEK/ERK は細胞の増殖・分化に大きく寄与することが報告されている。そこで、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少機構における MAPK の関与を検討した。VSMCs を 10% FCS 含有 DMEM で培養したところ、FCS 培養 15 分後から MEK/ERK のリン酸化レベルの増大が認められた(図 3)。一方、他の MAPK である c-jun N-terminal kinase (JNK) および p38-MAPK のリン酸化レベルの増大は認められなかった(データ未掲載)。以上の結果より、FCS 誘導性 VSMCs 増殖過程において、MAPK の内 MEK/ERK 由来シグナルのみ活性化されることが明らかとなった。

そこで次に、MEK/ERK の阻害剤を用いて FCS 誘導性 EC-SOD 発現への MEK/ERK の関与を検討した。U0126 および PD98059 を VSMCs に添加したところ、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少は有意に抑制された(図 4)。以上の結果より、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少に MEK/ERK 由来シグナルが関与していることが明らかとなった。

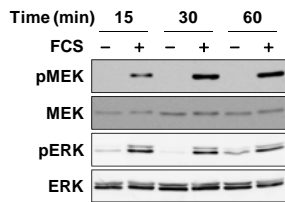


図 3 FCS 処理による MEK/ERK の活性化

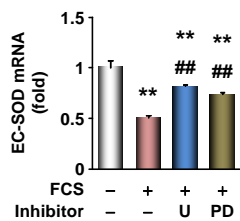


図 4 FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少に及ぼす MEK/ERK 由来シグナルの関与 (U; U0126 10  $\mu$ M, PD; PD98059 50  $\mu$ M, \*\*  $p < 0.01$  vs. FCS 不含 DMEM にて培養した VSMCs, ##  $p < 0.01$  vs. FCS 含有 DMEM にて培養した VSMCs)

(4) FCS 誘導性 VSMCs 増殖に及ぼす MEK/ERK 由来シグナルの関与

FCS 誘導性 VSMCs 増殖への MEK/ERK 由来シグナルの関与を MEK/ERK 阻害剤を用いて検討したところ、U0126 および PD98059 で処理した細胞において、FCS 誘導性 VSMCs 増殖の抑制が認められた(図 5)。以上の結果から、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少に、細胞増殖由来シグナルが関与している可能性が示唆された。

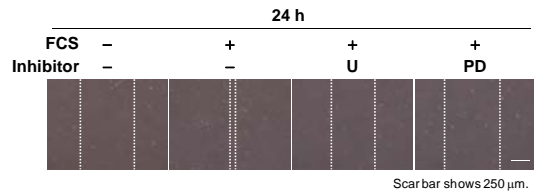


図 5 FCS 誘導性 VSMCs 増殖への MEK/ERK 由来シグナルの関与 (U; U0126 10  $\mu$ M, PD; PD98059 50  $\mu$ M)

(5) FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少に及ぼすフラボノイドの影響

他の先行する研究において、luteolin を含む各種フラボノイドが抗動脈硬化作用を示すことをすでに見出している(雑誌論文①)。そこで、影響の認められたフラボノイドの血管疾患予防薬としての有用性を、本反応系を用いてさらに検討した。Luteolin および chrysoeriol で処理した細胞において、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少抑制作用が認められた(図 6)。また、FCS 誘導性 MEK/ERK 由来シグナルへの影響を検討したところ、その抑制傾向が認められた(データ未掲載)。以上の結果より、luteolin および chrysoeriol を含むフラボノイドは新規動脈硬化症予防薬として有用である可能性が示唆された。

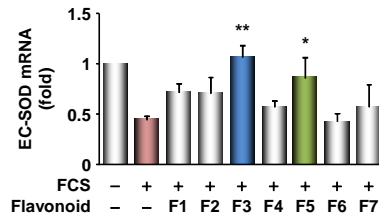


図 6 FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少へのフラボノイドの影響 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. FCS 含有 DMEM にて培養した VSMCs, F1; chrysin, F2; apigenin, F3; luteolin, F4; dismetin, F5; chrysoeriol, F6; 3',4'-dimethoxy luteolin, F7; tricetin, 各フラボノイドの濃度は 20  $\mu$ M)

以上の結果より、動脈硬化症発症・増悪のキーファクターである VSMCs 増殖過程において、SOD アイソザイムの内 EC-SOD のみ発現量が減少することが明らかとなった。EC-SOD は血管系において、抗酸化作用以外に一酸化窒素のバイオアベイラビリティの増大の基づく血管拡張にも関与することが報告されているため、EC-SOD の発現減少は血管のレドックス恒常性破綻並びに血管組織恒常性破綻に大きく関与しているものと考えられた。

MAPK の内 MEK/ERK は細胞増殖・分化への影響が多数報告されている。本研究においても FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少への関与が認

められたことから、EC-SOD 発現は細胞増殖や細胞周期と協調的に制御されている可能性が示唆された。

フラボノイドは食品由来の抗酸化物質として、各種疾患への適応が期待されている。本研究において、luteolin および chrysoeriol が、FCS 誘導性 EC-SOD 発現減少を抑制したことから、フラボノイドはそれ自身の抗酸化活性以外に生体内の抗酸化酵素の発現を制御する作用も有する可能性が示唆された。また、本研究結果から、luteolin および chrysoeriol をシード化合物に、新規動脈硬化症予防薬の探索へ向け重要な情報を提供出来ると考える。

#### 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 7 件)

- ① Junya Makino, Ryohei Nakanishi, Tetsuro Kamiya, (他 4 名, 3 番目), Luteolin suppresses the differentiation of THP-1 cells through the inhibition of NOX2 mRNA and the membrane translocation of p47<sup>phox</sup>., *J. Nat. Prod.*, in press, 査読有.
- ② Tetsuro Kamiya, Masatomo Machiura, Junya Makino, Hirokazu Hara, Isao Hozumi and Tetsuo Adachi, Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes., *Free Radic. Biol. Med.*, 61, 197-205, 2013, 査読有.
- ③ Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara and Tetsuo Adachi, Effect of endoplasmic reticulum (ER) stress inducer thapsigargin on the expression of extracellular-superoxide dismutase in mouse 3T3-L1 adipocytes., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 52, 101-105, 2012, 査読有.
- ④ Tetsuro Kamiya, Hiroko Nishihara, Hirokazu Hara and Tetsuo Adachi, Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress., *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11065-11070, 2012, 査読有.
- ⑤ Junya Makino, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara and Tetsuo Adachi, TPA induces the expression of EC-SOD in human monocytic THP-1 cells: involvement of PKC, MEK/ERK and NOX-derived ROS., *Free Radic. Res.*, 46, 637-644, 2012, 査読有.
- ⑥ Tetsuro Kamiya, Misato Izumi, Hirokazu

Hara and Tetsuo Adachi, Propolis suppresses CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity of COS7 cells through the prevention of intracellular ROS accumulation., *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 1126-1131, 2012, 査読有.

- ⑦ Aya Obara, Tetsuro Kamiya, Misato Izumi, Hirokazu Hara, Harutaka Yamada and Tetsuo Adachi, Extracellular-superoxide dismutase expression in COS7 cells exposed to cadmium chloride., 34, 1443-1447, 2011, 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 神谷 哲朗, 橋本 茉緒, 原 宏和, ニノ宮 真之, 瀨瀬 守, 足立 哲夫, FCS 誘導性血管平滑筋細胞増殖過程における EC-SOD 発現変動, 日本薬学会第 133 年会, 2013, 03, 29, 神奈川
- ② 神谷 哲朗, 服部 脩平, 原 宏和, 山田 晴生, 足立 哲夫, 低酸素状態下の COS7 細胞における EC-SOD 発現調節機構としてのエピジェネティクス, 第 24 回腎とフリーラジカル研究会, 2012, 10, 06, 東京
- ③ 神谷 哲朗, 牧野 純也, 町浦 雅量, 原 宏和, 足立 哲夫, ヒト単球系細胞株における EC-SOD 発現のエピジェネティック制御機構, 2012, 06, 07, 徳島
- ④ 神谷 哲朗, 和泉 美里, 原 宏和, 足立 哲夫, プロポリスのカドミウム誘導性腎尿細管上皮細胞傷害抑制作用, 2012, 03, 29, 北海道
- ⑤ 神谷 哲朗, 牧野 純也, 町浦 雅量, 原 宏和, 足立 哲夫, TPA による THP-1 細胞分化過程における EC-SOD 発現変動, 2011, 07, 02, 北海道

[図書] (計 2 件)

- ① 神谷 哲朗, 小原 彩, 和泉 美里, 原 宏和, 山田 晴生, 足立 哲夫, 東京医学社, 腎とフリーラジカル第 11 集, 2013, 63-66
- ② Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi, Regulation of EC-SOD in hypoxic adipocytes., *In Tech, Medic. Chem. Drug Design*, 2012, 143-158

[その他]

ホームページ

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/index.html>

第 65 回日本酸化ストレス学会学術奨励賞受賞、2012, 06, 07, 徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 哲朗 (KAMIYA TETSURO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし