

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790082

研究課題名(和文) 圧カストレスモデル血管細胞を用いたドコサヘキサエン酸の薬理作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pharmacological action of docosahexaenoic acid on the function of vascular smooth muscle cells exposed to pulsatile pressure

研究代表者

町田 拓自 (MACHIDA, Takuji)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：90433424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：収縮期高血圧を擬似的に再現した圧カストレス環境下において、血管平滑筋細胞を培養することにより変化する細胞機能(シクロオキシゲナーゼ-2発現抑制作用や細胞肥大作用)の一部とその機序を明らかにし、さらに、n-3系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸が正常状態に回復させる作用があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The effect of pressure stress on vascular smooth muscle cells (VSMCs) function and the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on the function were investigated. The pressure stress which can simulate systolic hypertension was exposed to VSMCs by using an originally designed pulsatile pressure-loading apparatus. The pressure stress reduced interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and stimulated VSMCs hypertrophy. Reduced extracellular signal-regulated kinase activation by the pressure may cause the COX-2 reduction. Docosahexaenoic acid DHA prevented the COX-2 reduction and the hypertrophy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ドコサヘキサエン酸 圧カストレス 血管平滑筋細胞 シクロオキシゲナーゼ-2

1. 研究開始当初の背景

n-3 系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の摂取は、不整脈や動脈硬化、高血圧症など様々な循環器疾患の発症及び進展を抑制する。この循環器疾患に対する有用性の機序の一つに血管構成細胞への直接的な影響があることから、申請者の所属する研究室では、これまでに DHA が培養血管平滑筋細胞機能に及ぼす影響を検討し、DHA が血管平滑筋細胞機能を活性化することを報告してきた。(Eur J Pharmacol. 427, 195-201, 2001; Br J Pharmacol. 136, 613-619, 2002; J Pharmacol Sci. 99, 113-116, 2005)

一方、血管は、血圧や血流によりずり応力、伸展、圧力などの血行力学因子に絶えずさらされている。従って、血行力学因子は、神経伝達物質やオートコイドなどの化学・液性因子とともに血管の恒常性を維持する重要な因子と考えられており、現在、国内外を問わず血行力学因子と血管構成細胞との関連の解明が精力的に行われている。申請者の所属する研究室では、血行力学因子のうち圧力に着目し、培養細胞に圧力を負荷できる特殊な装置を開発した。(特許公開番号: 2004-61189) 申請者らは、圧力ストレス環境下による血管平滑筋細胞及び内皮細胞の機能変化の解明の評価に、本装置が有用であることを報告している。(Cardiovasc Drug Ther. 22, 383-390, 2008; J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 10, 210-215, 2009)

2. 研究の目的

上述の通り、DHA は培養血管平滑筋細胞の機能を活性化するが、治療薬としての DHA の薬理作用を考えた場合、病態を再現したモデルでの細胞機能の変化に及ぼす DHA の影響を検討する必要がある。そこで本研究では、収縮期高血圧を擬似的に再現した圧力ストレス環境下において、DHA が血管平滑筋細胞に対してどのような影響を及ぼすかを検討し、DHA による循環器疾患に対する有用性の一端を明らかにすることを全体構想とした。

具体的な研究項目は、

- (1) 圧力ストレス環境におけるアラキドン酸代謝系に及ぼす DHA の影響
 - (2) 圧力ストレス環境におけるカルシウムチャネル発現に及ぼす DHA の影響
 - (3) 圧力ストレス環境における細胞増殖・肥大に及ぼす DHA の影響
- の3つである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養・試薬刺激

本研究では、6-7 週齢のラットから酵素法により単離した血管平滑筋細胞を培養し実験に用いた。

タンパク質および mRNA を検討する研究においてはセミコンフルエントの状態で、牛胎児血清を含まない培地に交換し、24 時間後に各薬物で処理、または圧力負荷を一定時間行った。

細胞増殖、肥大を検討する研究においては、細胞を単離後、すぐに圧力を負荷または DHA 処理を開始し、一定時間培養した。

(2) 細胞への圧力負荷

培養細胞への圧力負荷は、培養インキュベーターと同じ温度、大気条件の加圧タンク内に細胞を静置し、内圧を 80 から 160 mmHg まで繰り返し負荷することで行った。また、正常血圧を想定した細胞との比較をする際には、内圧を 80-120 mmHg に設定して同様の実験を行った。

(3) タンパク質発現・活性化の解析

細胞から Mammalian Protein Extraction Buffer (GE ヘルスケア) を用いてタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法にてタンパク質発現及び活性化を検討した。バンドの検出には本研究費により購入したケミルミ撮影装置 (Ez-Capture MG、アトー株式会社) を用いた。

(4) mRNA 発現の解析

TRI reagent (Sigma-Aldrich) を用いて細胞から RNA を抽出し、SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (Invitrogen) を用いて 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) によりリアルタイム RT-PCR を行って発現量を解析した。

(5) 細胞数、直径の測定

細胞をトリプシン-EDTA 溶液で培養ディッシュから剥離し、コールターカウンター (ベックマンコールター) により細胞数、直径を測定した。

4. 研究成果

(1) 圧力ストレス環境におけるアラキドン酸代謝系に及ぼす DHA の影響

インターロイキン-1 β (IL-1 β : 3 ng/ml) で細胞を刺激するとシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) は 24 時間まで時間依存的に発現が誘導されたが、その発現量は、収縮期高血圧を想定した圧力環境下においては抑制されていた。また、同様の効果は、IL-1 β 10 ng/ml あるいは 30 ng/ml 刺激の時ににおいても認められた。(図 1) この圧力負荷による COX-2 発現抑制作用は、COX-2 mRNA 発現に対しても認められた。一方、圧力負荷は COX-1 タンパク質発現には影響を与えなかった。正常血圧を想定した 80-120 mmHg の圧力は、

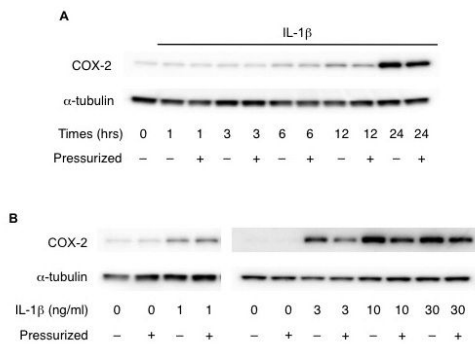
IL-1 β 刺激による COX-2 発現に影響を与えなかった。これらのことから COX-2 発現抑制作用は、圧力依存的に起きることが明らかとなった。

収縮期高血圧を想定した圧カストレスは、IL-1 β 刺激による活性化される細胞内シグナル伝達の一つである Extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を抑制した。このことから圧カストレスが ERK の活性化を抑制することで、COX-2 発現を抑制していることが考えられた。

血管平滑筋細胞での主要な COX 代謝物であるプロスタグランジン₂ (PGI₂) 産生量に及ぼす 80-160 mmHg 圧カストレスの影響を次に検討した。その結果、圧カストレスは、COX-2 発現への影響とは相違して PGI₂ 産生を有意に促進した。この機序を解明するために、PGI 合成酵素の mRNA 発現に及ぼす圧カストレスの影響を検討したが、圧カストレスによる有意な影響は認められなかった。この機序を解明するにはさらなる検討が必要である。

DHA (30 μ M) は、圧カストレスによる COX-2 タンパク質及び mRNA 発現の抑制作用を改善した。申請者は、DHA は同様に圧カストレスによる誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現抑制作用も改善することも見出している。これら COX-2、iNOS 発現を改善することが、DHA の循環器疾患への有用性と関連していることが考えられた。

図 1 : 圧カ負荷は IL-1 β 刺激による COX-2 タンパク質発現を時間依存的、濃度依存的に抑制する。



(2) 圧カストレス環境におけるカルシウムチャンネル発現に及ぼす DHA の影響

申請者の所属する研究室では、DHA が血管平滑筋細胞のカルシウム代謝を抑制することを報告している。(Eur J Pharmacol. 427, 195-201, 2001) この機序として、電位依存性カルシウムチャンネルへの影響が主として考えられることを見出しているが、電位非依存性カルシウムチャンネルへの影響については不明である。そこで本研究では、ラット培養血管平滑筋細胞に発現する Transient receptor potential (TRP) チャンネルのうち、

TRPC1、TRPC4、TRPC6 の発現が、圧カストレスおよび DHA によってどのような影響を受けるかについて検討した。その結果、圧カストレス単独では、TRPC チャンネル発現に影響を与えないものの、DHA を処理した細胞に圧カストレスを負荷すると、TRPC4 mRNA 発現は影響を受けなかったものの、TRPC1 及び TRPC6 mRNA 発現が抑制された。このことが DHA による細胞内 Ca²⁺流入抑制作用の機序と関連しているかについてはさらなる検討が必要である。

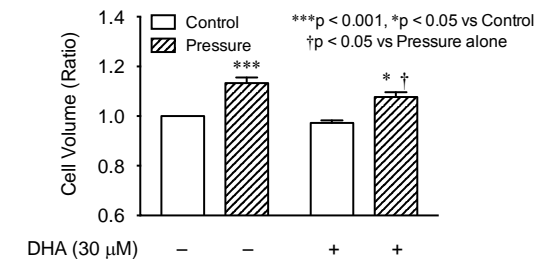
(3) 圧カストレス環境における細胞増殖・肥大に及ぼす DHA の影響

血管平滑筋細胞の異常な増殖や肥大は、循環器疾患を誘発する引金ともなり、また悪化させる要因である。そこで収縮期高血圧を想定した圧カストレスや DHA が、血管平滑筋細胞の増殖、肥大にどのような影響を及ぼすかを検討した。

80-160 mmHg の圧カを 48 時間負荷しても細胞増殖作用には影響は認められなかった。一方、同条件の圧カ負荷は、有意に細胞の直径を増加させ、圧カ負荷による細胞肥大作用が観察された。DHA を処理した細胞においては、圧カ負荷による肥大作用が部分的ではあるが有意に抑制された。(図 2)

このことから、DHA は圧カ負荷による細胞肥大作用を抑制することが明らかとなり、これが DHA の循環器疾患への有用性と関連している可能性が考えられた。

図 2 : DHA は圧カ負荷による血管平滑筋細胞肥大作用を改善する。



(4) 総括

本研究により、収縮期高血圧を想定した圧カストレスは、血管平滑筋細胞の COX-2 発現を抑制し、細胞肥大を引き起こすことが明らかとなった。COX-2 発現抑制作用の機序としては細胞内シグナル伝達物質の一つである ERK が圧カ負荷によって抑制されることが一因である可能性が考えられた。

また、DHA は、圧カ負荷によって抑制された COX-2 発現の回復させ、TRPC 発現を抑制し、圧カ負荷によって引き起こされた細胞肥大を抑制した。このことが DHA の循環器

疾患への有用性に関連していることが考えられた。

圧力負荷装置を用いた本実験系により、循環器疾患のモデルの一部を *in vitro* で再現することが可能となり、循環器疾患メカニズムの細胞レベルでの解明と新たな薬理作用の探索に有用であると考えられる。

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)

[学会発表](計 5 件)

町田拓自、畠山奈々絵、中野敬太、高塚あかり、飯塚健治、平藤雅彦
圧力負荷による血管平滑筋細胞での iNOS 発現抑制作用機序における ERK-NF- κ B の役割
第 64 回日本薬理学会北部会
平成 25 年 9 月 13 日
旭川市大雪クリスタルホール

中野敬太、町田拓自、畠山奈々絵、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞での収縮期高血圧を想定した圧力負荷による NO 産生系抑制作用
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013
平成 25 年 8 月 31 日
熊本大学

中野敬太、町田拓自、畠山奈々絵、高塚あかり、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞での圧力負荷による一酸化窒素産生系抑制作用機序の検討
第 27 回北海道薬物作用談話会
平成 25 年 7 月 20 日
酪農学園大学

竹鼻真梨、町田拓自、久保田誠樹、松田知美、飯塚健治、平藤雅彦
圧力負荷による血管平滑筋細胞肥大作用に及ぼすドコサヘキサエン酸の効果
日本薬学会北海道支部第 140 回例会
平成 25 年 5 月 18-19 日
札幌コンベンションセンター

町田拓自、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞での圧カストレスによる誘導型 NO 合成酵素抑制機序の検討
日本薬学会第 133 年会
平成 25 年 3 月 27-30 日
パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 拓自 (MACHIDA Takuji)

北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号：90433424