

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860061

研究課題名(和文)血管細胞での圧カストレスセンサーの解明とドコサヘキサエン酸による機能調節

研究課題名(英文)Elucidation of sensors of pulsatile pressure stress in vascular smooth muscle cells and the modulation of cell function by docosahexaenoic acid

研究代表者

町田 拓自(Machida, Takuji)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：90433424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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は、血管平滑筋細胞のインテグリン-focal adhesion kinase系を活性化し、細胞機能に影響を与えることが示唆された。これが圧カストレスセンサーとして重要な役割を担っている可能性がある。DHAによる細胞機能変化の機序には核内受容体PPARが関与していると考えられるが、さらなる検討が必要である。また、圧カストレスの有無に関わらずDHAとレゾルビンD1がアンギオテンシンIIによる細胞増殖を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the effects of pressure stress and docosahexaenoic acid (DHA) on vascular smooth muscle cells (VSMCs) function. The pressure stress which simulates systolic hypertension activated focal adhesion kinase in VSMCs. Although we assume that PPAR activation plays a part in the mechanisms of the modulation of cell function by DHA, further studies are required to clarify the precise mechanisms. DHA and resolvin D1 inhibited angiotensin II-induced cell proliferation in the absence or the presence of pressure stress.

研究分野：薬理学

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 focal adhesion kinase 細胞増殖 レゾルビンD1

1. 研究開始当初の背景

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。申請者らは、圧カストレス環境下において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; Eur J Pharmacol. 731, 44-49, 2014)

一方、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) さらに近年、DHA 代謝物であるレゾルビン D、プロテクチン D、エポキシドコサペンタエン酸 (EDP) などが様々な生理作用を有することが報告されている。

2. 研究の目的

上記背景のもと、申請者は最近、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、血管平滑筋細胞の誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 及びシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現が低下すること、また DHA がそれら酵素発現を回復させることを見出した (Eur J Pharmacol. 731, 44-49, 2014)。本研究は圧カストレスがどのようなメカニズムで血管平滑筋細胞機能を低下させているのか、その分子機構を明らかにし、さらに DHA の細胞機能改善作用の調節機構を解明することを全体構想としている。

具体的な研究項目は、

- (1) 圧カストレスを感知するストレスセンサーの実体とシグナル伝達機構の解明
 - (2) 圧カストレスによる細胞膜受容体発現および機能への影響の検討
 - (3) DHA 及びその代謝物の作用メカニズムの解明
- 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。また、ラット大動脈由来血管平滑筋細胞 A7r5 細胞も用いた。

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、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。

細胞増殖を検討する研究においては、A7r5 細胞を使用して実験を行った。

(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、ライブセルアナライザー (NanoEnTek) により細胞数、直径を測定した。

4. 研究成果

(1) 圧カストレスを感知するストレスセンサーの実体とシグナル伝達機構の解明

血管壁にかかるメカニカルストレスのうち、ずり応力、伸展刺激に関しては、これらを感知するセンサーとしてインテグリン-focal adhesion kinase (FAK) 経路が報告されている。そこで本研究においても FAK の活性化を指標にこの経路の関与について検討した。その結果、FAK 阻害薬の PF 573228 (1

μM)は、圧カストレスによる IL-1β (3 ng/ml) で誘導した iNOS 及び COX-2 発現抑制作用を解除した。また、IL-1β刺激後 0.5、1、12、24 時間のいずれにおいても、圧カストレスは FAK のリン酸化を増加させた。

以上の結果より、圧カストレスは、FAK を活性化し、このことが iNOS 及び COX-2 発現抑制作用と関連していることが考えられた。以前の検討で、圧カストレスは、IL-1β刺激による extracellular signal-regulated kinase 活性を抑制することを報告した。FAK は、さらにその上流に存在し、圧カストレスを感知しているものと考えられた。

(2) 圧カストレスによる細胞膜受容体発現および機能への影響の検討

収縮期高血圧を想定した圧力が、血管収縮作用を有する生理活性物質、セロトニンやアンジオテンシン II (Ang II) の受容体発現にどのような影響を与えるかについて検討した。セロトニン 5-HT_{2A} 受容体 mRNA 発現は、IL-1β刺激により増加したが、圧カストレスおよび DHA 処理によっては影響が認められなかった。また、アンジオテンシン II AT₁ 受容体 mRNA 発現は圧カストレス及び IL-1β刺激による顕著な影響を受けなかった。しかし、Ang II (100 nM) 刺激による細胞増殖能は、圧カストレス環境下において増強した。従って圧カストレスは、AT₁ 受容体 mRNA 発現には著明な影響を与えないもの Ang II による機能変化を亢進する可能性が見出された。

(3) DHA 及びその代謝物の作用メカニズムの解明

血管平滑筋細胞において DHA は、IL-1β刺激による iNOS 及び COX-2 発現を増強させる。先の検討で、この現象は圧カストレス下でさらに増強されることを見出した。DHA の酵素発現増強作用の機序を検討するために、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) δ の関与について検討した。有意な影響は認められなかったものの、DHA による iNOS 発現増強作用が PPARδ阻害薬である GSK 3787 に有意な影響を受けなかった。今後、PPARα及び PPARγの関与についても検討する必要がある。

CYP エポキシゲナーゼ阻害薬である一方、DHA の CYP エポキシゲナーゼ代謝物の 1 つである 19, 20-EDP (1 nM) は、iNOS 発現を増強させる傾向を示した (p < 0.1)。一方、DHA の代謝物であるレゾルビン D1 及びプロテクチン D1 は、iNOS 及び COX-2 発現に影響を与えなかった。

DHA 及びレゾルビン D1 は、圧カストレスの有無に関わらず Ang II 刺激による細胞増殖を有意に抑制した。このことは高血圧発症後においても DHA 及びレゾルビン D1 が薬理作用を有することを示しており、治療薬への応用を念頭にさらなる研究を行う価値があることを示している。

(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、血管平滑筋細胞のインテグリン-FAK 系を活性化し、このことが、iNOS 及び COX-2 発現抑制作用に関連していることが示唆された。また、圧カストレスは、昇圧性の生理活性物質であるセロトニン、Ang II の受容体発現に影響を与えないものの、Ang II 刺激による細胞増殖能を増強することが明らかとなった。このことが、病態の進展を加速する可能性が示唆された。DHA による誘導型酵素発現増強作用については明確な機序を見出すことができなかった。19, 20-EDP が DHA と同様に iNOS 発現を増強する傾向を示したことから、DHA、EDP のリガンドである PPAR の関与について今後も検討を続ける必要がある。また、DHA 及びレゾルビン D1 は、圧カストレスの有無に関わらず Ang II による細胞増殖を有意に抑制した。このことが n-3 系多価不飽和脂肪酸摂取による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。

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 6 件)

町田拓自

高血圧ストレスモデル血管細胞を用いた細胞応答の解明及び薬理作用機序探索ツールとしての応用

日本薬学会北海道支部第 142 回例会 < 奨励賞受賞講演 >

平成 27 年 5 月 16-17 日

札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

林愛美、町田拓自、遠藤朋子、飯塚健治、平藤雅彦

血管平滑筋細胞プロスタノイド産生に及ぼす圧カストレスの影響

日本薬学会北海道支部第 142 回例会

平成 27 年 5 月 16-17 日

札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

遠藤朋子、町田拓自、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞での波動圧力負荷によるシクロオキシゲナーゼ-2 発現抑制作用

第 88 回日本薬理学会年会

平成 27 年 3 月 18-20 日

名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

遠藤朋子、町田拓自、中野敬太、飯塚健治、平藤雅彦

血管平滑筋細胞アラキドン酸代謝系に及ぼす収縮期高血圧を想定した圧カストレスの

影響

第 65 回日本薬理学会北部会
平成 26 年 9 月 26-27 日
コラッセ福島 (福島県福島市)

遠藤朋子、町田拓自、中野敬太、青田晃明、
高塚あかり、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞でのシクロオキシゲナーゼ
発現に及ぼす圧カストレスの影響
第 28 回北海道薬物作用談話会
平成 26 年 7 月 19 日
北海道大学 (北海道札幌市)

青田晃明、町田拓自、中野敬太、高塚あか
り、飯塚健治、平藤雅彦
血管平滑筋細胞でのアラキドン酸代謝系に
及ぼす圧カストレスの影響
日本薬学会北海道支部第 141 回例会
平成 26 年 5 月 24-25 日
札幌コンベンションセンター (北海道札幌
市)

〔その他〕

<招待講演>

町田拓自

Altered functions in vascular smooth
muscle cells of hypertension models and
their modulation by docosahexaenoic acid
アルバータ大学薬学部 Faculty Seminar
平成 27 年 11 月 16 日
カナダ アルバータ大学薬学部 (カナダアル
バータ州・エドモントン市)

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・准教授
研究者番号: 90433424