

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：31104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08573

研究課題名(和文)新規昇圧物質CF6の内因性阻害物質の同定と創薬への応用

研究課題名(英文) Identification of endogenous inhibitors of CF6, a novel hypertensive substance, and their application to drug discovery.

研究代表者

田中 真実 (Tanaka, Makoto)

弘前学院大学・看護学部・准教授

研究者番号：10720873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CF6のプロスタサイクリン産生抑制作用に及ぼす影響を検討した。CF6過剰発現TGマウス繊維芽細胞のアラキドン酸遊離はWT細胞に比して有意に減少していた。Inhibitory protein IF1の過剰発現により有意に増加した。NO産生に及ぼすIF1の影響について検討した。アセチルコリン存在下において、TG細胞のNO産生はWT細胞に比較して有意に低下していた。IF1の過剰発現により、WT細胞のNO産生とほぼ同じレベルまで回復した。TG細胞のIF1過剰発現ではeNOSのserin-1177リン酸化が認められた。このことからIF1はCF6によるNO産生低下をキャンセルすることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CF6はF1分子モーターを活性化しプロスタサイクリン産生の抑制、食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症を引き起こす。このF1分子モーターを阻害する物質としてInhibitory protein IF1が同定された。IF1の有用性の検討は、心血管系における病態生理学的意義の解明並びに創薬を考えた上で極めて重要である。また、IF1投与によるCF6の細胞内情報伝達機構への影響の解明は、心疾患を初めとした循環器疾患の形成にCF6がどのように関与するかを明らかにできる点で学術的な特色と独創性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of CF6 on the inhibition of prostacyclin production. Arachidonic acid release from CF6-overexpressing TG mouse fibroblasts was significantly decreased compared to WT cells. It was significantly increased by overexpression of the inhibitory protein IF1. We investigated the effect of IF1 on NO production. Under acetylcholine stimulation, NO production in TG cells was significantly decreased compared to WT cells. Overexpression of IF1 restored NO production in TG cells to almost the same level as in WT cells. Serin-1177 phosphorylation of eNOS was observed in TG cells overexpressing IF1. This suggests that IF1 cancels the decrease in NO production by CF6.

研究分野：基礎医学

キーワード：アラキドン酸 Coupling factor 6(CF6) プロスタサイクリン 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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能は低下しているが、摘出標本(血管、臓器)での産生は著明に亢進している。そこで、プロスタサイクリン産生を抑制する内因性物質がSHRの流血中に存在するという仮説を立て、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明らかにした。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し、COXとプロスタサイクリン合成酵素には影響しない。CF6は血管内皮細胞から分泌され、その分泌はズリ応力により亢進する。また、ラットにrecombinant CF6を静注すると、昇圧反応が認められ、その反応はSHRがWKYに比較して大であった(J Clin Invest, 2001)。さらに、血中CF6濃度はSHR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、また、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明らかにした。さらに、血液透析患者では血中CF6濃度は高値を示し、内因性一酸化窒素合成酵素(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、脳卒中患者でもCF6濃度は上昇し、血中ホモシステイン濃度と正相関することを明らかにした。

(2) CF6の細胞内情報伝達機構に関しては、その受容体が血管内皮細胞表面に存在するEcto-ATP合成酵素の $\beta$ -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F1分子モーター(ATPase活性)の亢進を介して、Fo分子モーターを逆回転させることにより水素イオンの細胞内流入と、それに伴った細胞内酸性化を引き起こす。Efraptin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は消失する(Hypertension, 2005)。

(3) CF6の生理作用に関しては、血管内皮のプロスタサイクリン、一酸化窒素(NO)産生の抑制(Atherosclerosis, 2008)、並びに内皮依存性過分極因子(EDHF)産生の抑制を報告した(AHA, 2005)。血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をcDNA microarray法で検討すると、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dimethylaminohydrolase (DDAH-2)の低下が認められ、ADMAの分泌亢進が観察された。また、動脈硬化性分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と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)。

(4) CF6過剰発現マウスを用いたフェノタイプの検討では、腸間膜動脈のangiotensin IIに対する収縮性の亢進、食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症(Diabetologia, 2012)、運動負荷による生理的左室肥大の抑制(J Hypertens, 2010)が明らかとなった。CF6は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り、F1分子モーターを活性化しプロスタサイクリン産生の抑制、食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症を引き起こす。このF1分子モーターを阻害する物質としてInhibitory protein IF1が最近同定された。IF1はF1分子モーターの反時計回転(ATP分解)とCF6の作用は阻害するがミトコンドリアの時計回転(ATP産生)には全く影響を与えず、CF6の特異的阻害物質として作用する可能性が極めて大きい。本研究では、IF1のCF6の阻害に及ぼす影響を明らかにする。

## 2. 研究の目的

(1) プロスタサイクリンは動脈硬化の進展に拮抗する強力な生理活性物質の1つである。近年我々が同定したCF6は、体内に多数存在するプロスタサイクリン産生促進因子に唯一拮抗する生理活性物質である。また、我々は血管内皮細胞のNO産生とEDHF産生を抑制することを明らかにした。従って、CF6は血管内皮細胞における3系統すべての内皮依存性弛緩因子の産生を阻害し、動脈硬化を促進させる。一方で、CF6の共通作用である細胞内酸性化を介して食塩感受性高血圧、糖尿病、ならびに左室肥大の発症を引き起こす。

(2) CF6はF1分子モーターを活性化しプロスタサイクリン産生の抑制、食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症を引き起こす。このF1分子モーターを阻害する物質としてInhibitory protein IF1が同定された。IF1の有用性の検討は、心血管系における病態生理学的意義の解明並びに創薬を考えた上で極めて重要である。また、IF1投与によるCF6の細胞内情報伝達機構への影響の解明は、心疾患を初めとした循環器疾患の形成にCF6がどのように関与するかを明らかにできる点で学術的な特色と独創性がある。

## 3. 研究の方法

(1) IF1の抗CF6作用の有無について培養細胞とCF6過剰発現マウスから採取したTG細胞を用いて検討した。

(2) プロスタサイクリン産生抑制作用に及ぼす影響

TG 細胞に IF1-cDNA (Open Biosystems, Invitrogen MHS1010-73732)を transfection し IF1 を過剰発現後の細胞膜を  $^3\text{H}$  アラキドン酸でラベル後、30 分間に放出される  $^3\text{H}$  アラキドン酸を測定した。

(3) NO 産生に及ぼす IF1 の影響

野生型 C57BL/6J マウス並びに CF6 過剰発現マウスから線維芽細胞を培養し NO 産生に及ぼす IF1 の影響について検討した。アセチルコリン  $10^{-4}\text{M}$  存在下において、NO 産生は培養上清に分泌された NO 代謝産物(NOX)を NO2/NO3 Assay Kit を用いて測定した。

(4) NO 合成酵素(eNOS)の発現および活性化に及ぼす影響

NO 合成酵素(eNOS)の発現、活性化 (eNOS の serin-1177 リン酸化) については Western blot 法で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) プロスタサイクリン産生抑制作用に及ぼす影響

TG細胞からのアラキドン酸遊離はWT細胞に比して有意に減少していた。IF1の過剰発現により、WT細胞からのアラキドン酸遊離は変化しなかったが、TG細胞では有意に増加がみられた。すなわち、TG細胞に認められたプロスタサイクリン産生低下は、IF1の発現により回復が認められた。

(2) NO 産生に及ぼす IF1 の影響

CF6 は食塩感受性高血圧ならびに糖尿病の発症を引き起こすことから、細胞を培養し培養液中の NO を測定した。

アセチルコリン  $10^{-4}\text{M}$  存在下において、CF6 過剰発現線維芽細胞の NO 産生は野生型線維芽細胞の NO 産生に比較して有意に低下していた。IF1 の過剰発現により、野生型線維芽細胞の NO 産生は軽度増加したが有意ではなかった。一方、CF6 過剰発現線維芽細胞の NO 産生は有意に増加し、野生型線維芽細胞の NO 産生とほぼ同じレベルまで回復した。

(3) NO 合成酵素(eNOS)の発現および活性化に及ぼす影響

NO 合成酵素(eNOS)の発現、活性化について Western blot 法で検討した。IF1 過剰発現により CF6 過剰発現線維芽細胞 eNOS の serin-1177 リン酸化が認められた。この部位のリン酸化は、活性を亢進させることが報告されており、IF1 はこの機序により CF6 による NO 産生低下をキャンセルすることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長内 智宏  (Tomohiro Osanai)  (00169278)	弘前大学・保健学研究科・教授    (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関