

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2008 ~ 2009  
 課題番号：20790551  
 研究課題名（和文）  
 CSE ノックアウトマウスを用いた高ホモシステインモデルにおける血管障害の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the vascular lesion in the high homocysteine model  
 who used CSE knockout mouse  
 研究代表者  
 山本 美智子 (YAMAMOTO MICHIKO)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：60445450

## 研究成果の概要（和文）：

CSE ノックアウトマウスを用いて高ホモシステイン血症モデルを作製する本研究は、きわめて新規性、独創性の高い研究であると言える。また、CBS<sup>+/-</sup> マウスと、CSE<sup>-/-</sup> マウスの高ホモシステイン血症モデルを機能的に比較する事は、高ホモシステイン血症の血管障害発症機序に迫る、有用性の高い研究であると考える。

## 研究成果の概要（英文）：

This study to make a high homocysteine blood symptom model with CSE knockout mouse is extremely novelty and originality. In addition, we think that it is a study of the utility to approach for vascular lesion onset mechanism of the high homocysteine blood symptom to compare a high homocysteine blood symptom model of the CSE<sup>-/-</sup> mouse with a CBS<sup>+/-</sup> mouse functionally.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

ホモシステインは、血液中に含まれる含硫アミノ酸の一つであり、メチオニン代謝経路から S-アデノシル 1-メチオニン (SAM) S-ア

デノシルホモシステイン (SAH) を介して生成され、メチオニン合成酵素によりメチオニンに戻るリメチレーション回路の代謝産物である。また、ホモシステインはシスタチオ

ニン - シンターゼ (Cystathionine - Synthase: CBS)によりシスタチオニンに代謝され、シスタチオニン - リアーゼ (Cystathionine - Lyase: CES)によりシステインに代謝される。近年、高血圧、高脂血症、喫煙、糖尿病、肥満などの血管病の危険因子に加え、ホモシステインが新たな血管病疾患の危険因子として注目されている。例えば虚血性疾患である心筋梗塞の患者の2割程度にしか高コレステロール血症がみられず、それ以外の代謝性因子として高ホモシステイン血症の関与が疑われている。臨床及び基礎研究のデータから高ホモシステイン血症では、1.血管内皮障害、2.血小板凝集促進による血栓症のリスクの増大、3.血管壁の平滑筋細胞の増殖や、コラーゲン線維の過剰な合成、により動脈硬化の進展を引き起こす。ホモシステインを無毒化する代謝には、葉酸 (folate)、ビタミン B6 (vitamin B6)、ビタミン B12 (vitamin B12) が関与しており、ホモシステインが上昇すると心血管疾患リスクが増大する可能性があることから、葉酸やビタミン B を内服すると血中のホモシステイン濃度が低下し、心血管疾患が低下すると期待されている。しかしながら、葉酸、ビタミン B6、ビタミン B12 のサプリメントは、ホモシステイン値を低下させるが、心血管疾患の発症リスクを低減させなかったとの報告もある。高ホモシステイン血症が血管障害を引き起こす詳細な機序は不明であるが1.ホモシステインの自動酸化により活性酸素種 (ROS) を生じ、またグルタチオン・ペルオキシダーゼの低下により抗酸化能が低下して酸化ストレスが生じる、2.二次的に SAH が増加して、低メチレーション状態になる事が示唆されている。近年、高ホモシステイン血症の血管障害モデルとして、CBS ヘテロ欠損型 (CBS<sup>+/-</sup>) マウスに高メチオニン・低葉酸

食を摂取させたモデルが国内外で広く使われている。このマウスでは血管の内皮障害、活性酸素の上昇、肝臓等における SAH 濃度の上昇が報告されている。

## 2. 研究の目的

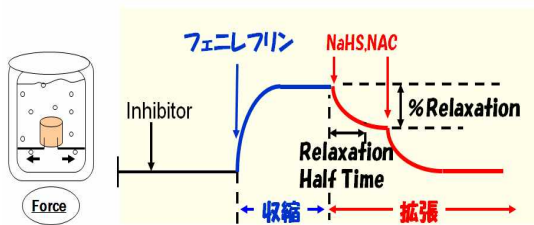
近年、我々は CSE ノックアウトマウス (CSE<sup>-/-</sup>) (石井 功教授 群馬大学 分子細胞機能学) を用いて、その肝臓のメタボローム解析と血管機能の検討を行ってきた。このマウスの肝臓においてはシスタチオニン濃度の上昇が認められ、CBS<sup>+/-</sup> マウスと同様に、正常食では血管障害が認められなかった。しかし、CSE<sup>-/-</sup> マウスが高メチオニン、低葉酸負荷時に血中ホモシステイン濃度にどのような影響を与えるかは明らかではない。本研究の最終目的は、CBS<sup>+/-</sup> マウスと、CSE<sup>-/-</sup> マウスに高メチオニン、低葉酸負荷を加え、その血管障害の発症と代謝変化を比較して、高ホモシステイン血症における、血管障害の発症機序を明らかにする事である。また、申請者は近年 NO、CO に続く第3のガス H<sub>2</sub>S の血管作用について検討を加えてきた。H<sub>2</sub>S は、血管平滑筋においては CSE から産生される。申請者は外因性 H<sub>2</sub>S が ATP 感受性カリウムチャンネル (IK<sub>ATP</sub> チャンネル) の活性化を介して血管拡張に働く事を検証した。そこで、これらマウスの正常及び高ホモシステイン血症モデルにおいて、内因性 H<sub>2</sub>S による血管拡張反応の変化についても合わせて検討を加えた。

## 3. 研究の方法

(1) Organ chamber による血管拡張能の検討: 特種食を与えた、CBS<sup>+/-</sup> マウスおよび CSE<sup>-/-</sup> マウス大動脈リング (3-4mm) を酸素化した Krebs buffer で満たした Organ chamber に装着する。フェニレフリンを段階的に投与して収縮能を観察する。フェニレフリンで血管を収縮させて安定後に、血管内皮依存性拡

張反応をアセチルコリン、内皮非依存性血管拡張を DETA-NONOate を段階的に投与して、観察する。血管の最大拡張の初期収縮に対する割合を%Relaxation、拡張のスピードを Relaxation half time として計算する。(図3) また、別の群において、血管に NaHS (H<sub>2</sub>S ドナー)、N-アセチルシステイン (システインドナー；内因性の H<sub>2</sub>S 産生の基質に働く) を投与して、これらによる血管拡張が高ホモシステイン血症でどのように変化するかを検討した。(図1)

図1 Organchamberの血管のセッティングとchart模式図



(2) 高ホモシステイン血症モデルの作製：

CBS および CSE ノックアウトマウスは、現在、申請者が所属する医化学教室で交配、繁殖中であり、適宜 PCR によりジェノタイピングを行っている。CBS ホモ欠損マウス (CBS<sup>-/-</sup>) は順調に成長しない、もしくは短命であることから、ヘテロ欠損マウス (CBS<sup>+/-</sup>) の高メチオンin・低葉酸食負荷モデルを使用する。CBS<sup>+/-</sup> マウスおよび CSE<sup>-/-</sup> マウスは離乳時より特種食を始める。飲料水は常時飲めるようにし、コントロール群には、葉酸 7.5mg/kg、L-メチオニン 4.0mg/kg の特種食を与え、高メチオニン群には、コントロール群の食事に L-メチオニンを 0.5%追加する。この特種食を 8 週間行った。

(3) 血漿ホモシステイン濃度の測定：

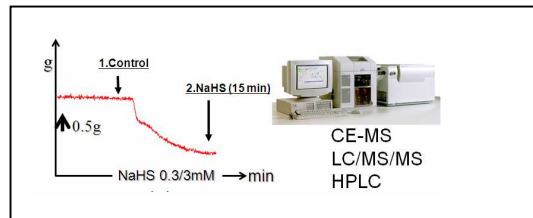
マウスからヘパリン採血を行い、血漿を遠心分離した。血漿中ホモシステイン濃度を HPLC 蛍光法にて測定を行う。総ホモシステイン量の決定は、全てのジスルフィド結合 (S-S 結

合) を NaBH<sub>4</sub> で還元したチオール結合 (S-H 結合) 後の測定により決定した。また、血漿中のメチオニン濃度を HPLC クーロアレイ法にて測定し、その代謝変化を比較、検討した。

(4) Capillary electrophoresis mass

spectrometry を用いたメタボローム解析：

ラットの血管をホモジェネートして、代謝産物濃度を質量分析器で測定した。血管を採取する際には、代謝の変化がないよう注意を払う必要がある。マウスを安楽死させた後に速やかに目的の臓器を取り出して液体窒素で凍結し、冷却やした 0.4mol/L トリクロロ酢酸に浸けた。また、ホモジェネートは、臓器を取り出してから、速やかに行った。

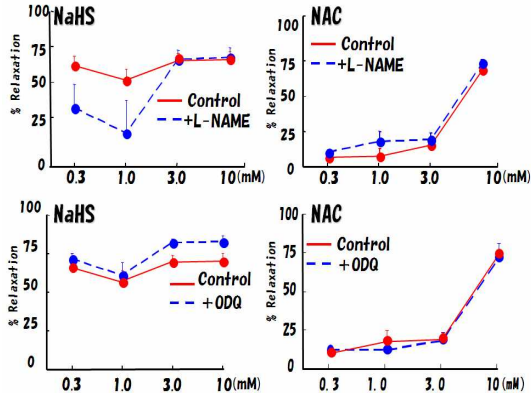


4 . 研究成果

(1) 血管拡張機能の検討

ラット大動脈に H<sub>2</sub>S ドナーである NaHS、システインドナーである NAC を添加して H<sub>2</sub>S の血管拡張能を、また、CSE ホモ欠損マウス (CSE<sup>-/-</sup>)、ヘテロ欠損マウス (CSE<sup>+/-</sup>)、ホモマウス (CSE<sup>+/+</sup>) の血管拡張能を検討した。ラットの血管拡張能は、NaHS 低濃度による血管拡張は NO 合成阻害剤 L-NAME で抑制される傾向にあったが、有意差はなく、高濃度では全く変化を認めなかった。NAC による血管拡張に L-NAME は影響を与えなかった。グアニレートサイクレーズ阻害剤 ODQ は NaHS, NAC による血管拡張に有意な影響を与えなかった (図2)。

図2: NaHS, NACによる血管拡張作用へのNO・cGMPの関与



マウスの血管拡張能は、CSE<sup>+/+</sup>と比較しCSE<sup>-/-</sup>、CSE<sup>+/-</sup>ではアセチルコリン、NaHS、NACで血管拡張能が低下していたが、有意差は認められなかった。

高ホモシステイン血症モデルでの血管拡張能は、CBS<sup>+/-</sup>、CSE<sup>-/-</sup>マウスともに血管内皮障害を起こしており、高メチオニン、低葉酸負荷時に血中ホモシステイン濃度に影響を与える事が示唆された。

#### (2) メタボローム解析

メタボローム解析は、NaHS、NAC添加後、血管ホモジェネートを作成し、capillary electrophoresis mass spectrometryを用いて行った。メタボローム解析の結果、NaHS投与後の血管内AMP濃度はコントロールと比較して5倍に上昇し、Lactate、Adenosine濃度の上昇も認められた。また、NACについても各代謝産物で同様に上昇が見られた。

申請者は、NAC、NaHSによる血管内AMP濃度の上昇を介したIKatp活性化が関与している事を既に報告しているが、今回、メタボローム解析を行う事により、H<sub>2</sub>Sによる血管拡張に低酸素性血管拡張メディエーターの関与が示唆された。血管のメタボローム解析は世界的にも皆無であり、ガスによる血管拡張機序とその障害を代謝から検討する興味深いものである。また、血管病におけるH<sub>2</sub>Sの作用についての報告は稀であり、ノックアウトマウスを用いて血管拡張能を比較した事は、血管障害の

発生機序に迫る研究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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 美智子 (YAMAMOTO MICHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445450

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし