

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590665

研究課題名（和文） 加齢に伴う血管病変に対するアミノ酸トランスポーター標的療法の探索研究

研究課題名（英文） New therapeutic strategy against age-related vascular injury targeted to L-type amino acid transporter

研究代表者

神崎 恒一（KOZAKI KOICHI）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80272540

研究成果の概要（和文）：アミノ酸トランスポーターLAT1 は培養血管平滑筋細胞の増殖や生存に必須だけでなく、生体においても頸動脈の血管障害後内膜肥厚の進展にも関わっていることがラット、マウスを用いた実験から明らかになった。そして血管平滑筋細胞に存在するLAT1をターゲットにして、LAT1の機能をブロックすることで血管病変の形成を抑えるという、動脈硬化治療の新たな方法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A series of in vivo and in vitro experiments have revealed that L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is pivotal for the growth of cultured vascular smooth muscle cells, and the growth of intimal thickening in the injured artery. And, therapeutic experiments targeted to LAT1 in the vascular smooth muscle cells inhibited intimal growth of the artery. These results indicate a new therapeutic LAT1-targeted strategy against age-related vascular injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	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：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：老年医学・血管傷害

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸トランスポーターは、細胞への栄養供給に重要な機能を有し、細胞増殖を規定する必須の因子の一つと位置づけられている。そのうち、細胞内へ必須アミノ酸を供給する輸送系 L トランスポーター（L-type amino acid transporter 1；LAT1）は、1 回膜貫通型タンパク 4F2hc（4F2 抗原重鎖；CD98）とヘテロ二量体を形成し、古典的 System L の特性である Leu, Ile, Phe, Met, Tyr, His,

Try, Val などの中性アミノ酸を輸送するトランスポーター分子として機能する。

LAT1 は 512 個のアミノ酸からなる非糖化タンパクであり、脳、腎、胎盤、精巣、骨髄などに分布している。LAT1 は細胞増殖に必須のアミノ酸トランスポーターであり、冠動脈形成術後などの急性内膜肥厚に重要な役割を果たすと考えられる。実際、我々はこれまでの研究において、血管平滑筋細胞の増殖、バルーン傷害後内膜肥厚、動脈硬化病変の形成

に LAT1 が関与し、阻害薬を用いることによって内膜肥厚が抑制できる可能性を示してきた。

2. 研究の目的

LAT が細胞増殖にとって重要ということから、血管平滑筋細胞の増殖が重要な病態である冠動脈形成術後再狭窄の主因としての新生内膜形成や、血管中膜平滑筋細胞が脱分化し増殖能が高まることが重要な機序である粥状動脈硬化病変の形成に、LAT を介するアミノ酸輸送が関わっていることが推測される。実験レベルでは頸動脈バルーン傷害モデルを初めとする実験的動脈硬化病変形成に LAT が関与していること、また LAT を阻害することによってこれらの病変形成が抑えられることが予想される。そこで本研究では LAT1 を標的とした動脈硬化治療戦略の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

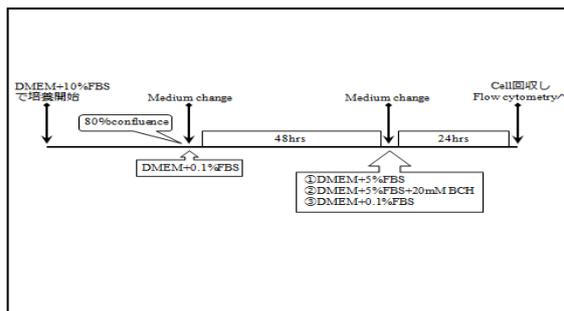
(1) ラット培養血管平滑筋細胞 (RASMC) の細胞周期に対するLAT阻害剤の影響: RASMCの培地にLAT1 阻害薬であるBCHを添加すると細胞増殖が抑制されることをこれまでを示したが、その機序を明らかにするために、細胞周期に対するBCHの影響をFACS解析によって検討した。

<細胞培養条件>

Wistarラットの大動脈由来の血管平滑筋細胞(RASMC)のstockを実験に使用した。培地には10% Fetal Bovine Serum (FBS)を含む、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用い、5%CO₂条件下にて37°Cで培養した。また、実験に応じて、FBSの濃度を変更し、また培地にBCHを添加した。

<LAT1 阻害剤による細胞周期検討実験>

上記の条件で培養した6cm dish上のRASMCを実験に使用した。80%confluenceに達した時点でDMEM+0.1%FBSにmediumを交換した。48時間培養後、今度は3種類の培地(①5%FBS加DMEM、②5%FBS加DMEM+20mM-BCH、③0.1%FBS加DMEM)にmedium changeを行い、24時間培養した。24時間後にこの細胞を回収し、flow cytometryにてそれぞれの培養条件下での細胞周期を評価した。



(2) ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける傷害後のLAT1発現更新の確認: Wistar雄性ラットの頸動脈にバルーン傷害を施し、手術1、3、7、14日後に傷害頸動脈を摘出し、以下の実験に用いた。

<mRNA発現>

頸動脈からmRNAを抽出し、アプライドバイオシステムズ社製リアルタイムPCR装置にてLAT1およびGAPDHのmRNA発現量を定量化し、GAPDHに対するLAT1のmRNAの発現の程度の比を経時的に評価した。

<タンパク発現>

抽出タンパク溶液は頸動脈homogenateから超遠心により調整した。その後、タンパク濃度を測定し、一定タンパク量に含まれるLAT1の発現量をWestern Blotting (WB)法により経時比較した。

<免疫染色>

バルーン傷害術14日後のラット頸動脈を灌流固定の後摘出し、後固定を行った。その後横断のパラフィン切片を作製し、特異的抗体およびDAB染色キット(VECTASTAIN ABC Kit)を用いて免疫染色を行った。

(3) LAT1欠損マウスを用いた、血管障害後内膜肥厚の検討(ワイヤー傷害モデル): LAT1ヘテロ欠損マウス(ホモ欠損マウスは胎生致死)を作成し、Sataらの方法に従い(Sata M. J Mol Cell Cardiol 2000)、cookストレートガイドワイヤーを用いて11~14週齢の雄性マウスおよび対照マウスの大動脈に対してwire障害を行った。障害28日後に血管を取り出し標本作製、染色後、新生内膜および中膜の断面積を計測し、I/Mratioを求めた。

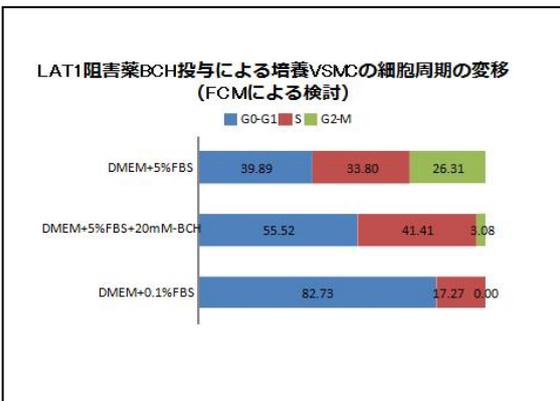
(4) LAT1欠損マウスを用いた、血管障害後内膜肥厚の検討(カフ傷害モデル): LAT1ヘテロ欠損マウスおよび対照マウスの大動脈周囲にポリエチレン製カフ(PE90、長さ2mm)を装着した。カフ装着28日後に血管を取り出し標本作製、染色後、新生内膜および中膜の断面積を計測し、I/Mratioを求めた。

(5) ApoE欠損マウスの動脈硬化病変形成過程に対するLAT1の関与: LAT1欠損マウスホモ接合体は胎生致死となるため、ApoE欠損マウスとの掛け合わせによって、生後の血管障害病変をみることは不可能である。そこで、ヘテロ接合体とのバッククロスを行った。ApoE欠損マウスは20~48週齢で大動脈付近に顕著な粥状動脈硬化病変を形成することがわかっており、ApoEおよびLAT1のダブルノックアウトマウスでも同様もしくは軽度の血管変性がみられるものと予想される。そこで同様に20~48週齢時および一年齢時点で大動脈の展開標本作成した後Oil red O染色を行い、粥腫面積を定量評価した。

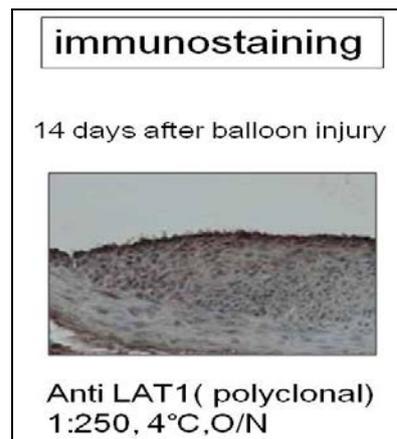
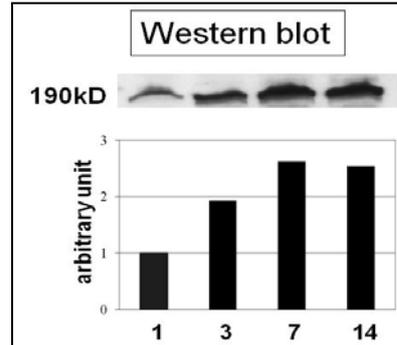
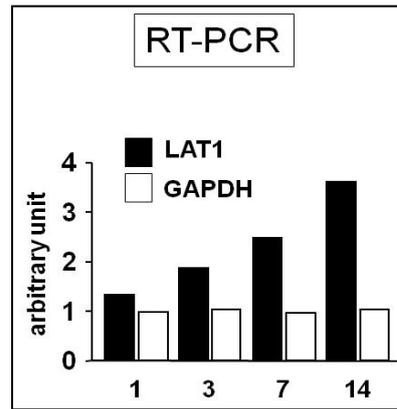
(6) マウス大脳皮質下慢性虚血病変モデルの構築とその評価：脳における慢性低還流モデルを作成し、脳が高発現部位であるLAT1への影響を検討した。具体的にはShibataらの方法に従い (Shibata M. Stroke 2004)、マウスの両側頸動脈露出後、内径 0.18mm、長さ 2.5mmの極小コイルを頸動脈周囲に巻きつけることで頸動脈を狭小化し、脳を通常の 70%程度の慢性低還流状態にする。術後 30 日後付近で脳を取り出し標本作製、Kluver-Barrera染色にて関心領域の脱髄病変の確認・スコア化を行う。また狭小コイル装着に伴う脳低還流時の炎症の状態について脳ホモジネートを用いたELISAにより発現の確認を行った。

4. 研究成果

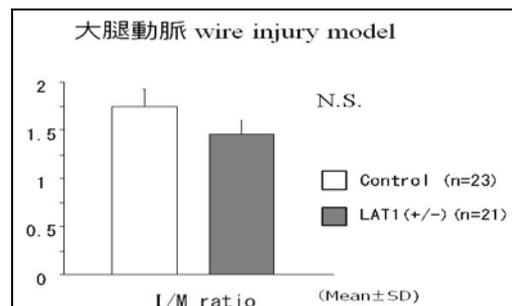
(1) ラット培養血管平滑筋細胞 (RASMC) の細胞周期に対するLAT1阻害剤の影響：RASMCの培地にLAT1 阻害薬であるBCHを添加すると細胞増殖が抑制されることをこれまでを示したが、その機序を明らかにするために、細胞周期に対するBCHの影響をFACS解析によって検討した。その結果、BCH投与によってG2-M期にある細胞の割合が低下していた。



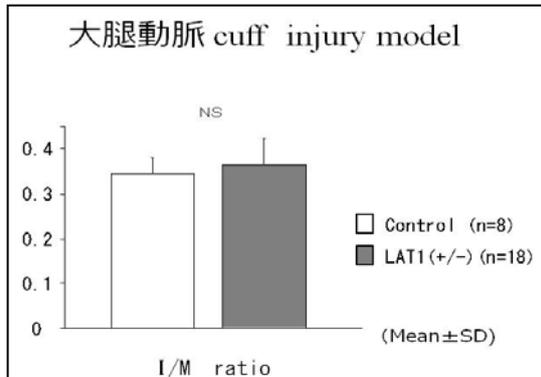
(2) ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおける傷害後のLAT1発現更新：雄性Wistarラットの頸動脈にバルーン傷害を施し、術後 3 日、7 日、14 日の時点で傷害頸動脈を摘出した。①傷害血管を用いたRT-PCRの結果、傷害頸動脈におけるLAT1-mRNAの経時的な発現更新が認められた。また②血管ホモジネートを用いたWestern Blottingでは、傷害頸動脈におけるLAT1の経時的な発現更新が認められた。さらに、③免疫染色にて新生内膜肥厚病変上でのLAT1発現が確認できた。



(3) LAT1 欠損マウスを用いた、血管障害後内膜肥厚の検討 (ワイヤー傷害モデル)：11～14 週齢のLAT1ヘテロ欠損マウス大腿動脈にワイヤー傷害を施すことで内膜肥厚を誘発し、処置 28 日後の血管内膜肥厚形成状況を対照マウス (C57BL/6) と比較した。内膜/中膜比は欠損群と対照群で有意な変化が認められなかった。

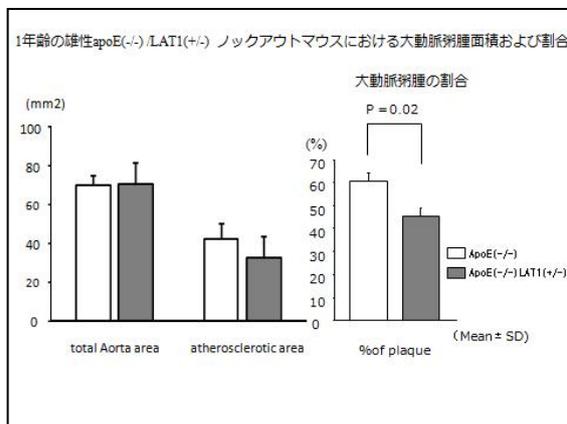


(4) LAT1欠損マウスを用いた、血管障害後内膜肥厚の検討 (カフ傷害モデル) : 11~14週齢の雄性LAT1ヘテロ欠損マウス大腿動脈周囲にポリエチレンカフ (PE90) を被覆装着した。装着後 28 日目に大腿動脈を取り出し新生内膜肥厚形成の程度を対照マウス (C57BL/6) と比較した結果、内膜/中膜比は欠損群と対照群との間で有意な変化を認めなかった。



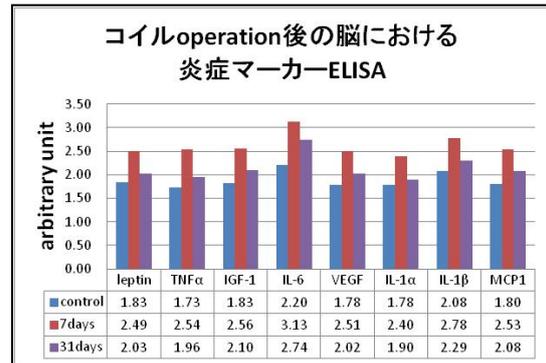
(5) ApoE欠損マウスの動脈硬化病変形成過程に対するLAT1の関与 : ApoE^{-/-} × LAT1^{+/-} のダブル欠損マウスを作成した。体重、血圧、脈拍数などの生理データはApoE欠損マウスと作成したダブル欠損マウスとの間で差は見られなかった。

続いて、加齢に伴い形成される大動脈粥状硬化病変の程度について、24週、32週、1年時での大動脈見開き標本作製後、oil red O染色を行って粥状硬化病変面積を定量し、大動脈面積に占める割合を求めた。24、32週齢時ではApoE欠損マウス、ダブル欠損マウスと粥状硬化病変の程度はほぼ同程度であったが、1年時で比較すると、ダブル欠損マウスにおいてApoE欠損マウスよりも粥状硬化病変の程度が有意に小さかった。すなわち、大動脈における粥状硬化病変形成にLAT1の存在が関与していることが示唆された。



(6) マウス大脳皮質下慢性虚血病変モデルの構築とその評価 : マウスの両側頸動脈の周囲に微小コイルを巻き狭小化することで、脳が低還流状態となり大脳白質が傷害される。頸動脈へのコイル装着による慢性低還流による脳の傷害を確認するため以下の実験を行った。

①脳ホモジネートを用いてELISAにて炎症マーカーの評価を行った。雄性C57BL/6マウスへのコイル装着術7日後には脳において炎症マーカーの発現が非傷害脳に比べて上昇していた。



②コイル装着術による慢性脳低還流の影響を調べるために、新奇物体認識テスト (Object Recognition Test:ORT) をコイル装着後 31 日後のマウスおよび対照としてコイル非装着マウスに対して施行した。

非装着マウスでの新奇物体探索嗜好性が60%程度であったのに比べ、コイル装着マウスでは50%程度であり、コイル装着による脳低還流マウスでは記憶能力および探索嗜好性が低下していることが確認された。今後さらに症例数を増やして検討する予定である。

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 2 件)

① Kumiko Nagai, Hitomi Koshiba, Shigeki Shibata, Koichi Kozaki: L-type amino acid transporter 1-mediated smooth muscle proliferation and viability, and evidence of its role in neointima formation. 第 20 回日本血管生物医学会総会, 徳島, 2012. 12. 6

② Koichi Kozaki, Kumiko Nagai, Hang Xi, Kenji Toba: L-type amino acid transporter 1-mediated smooth muscle proliferation and viability, and evidence of its role in neointima

formation. 第 42 回日本動脈硬化学会総
会, 岐阜, 2010.7.16

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 恒一 (KOZAKI KOICHI)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：80272540

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

永井 久美子 (NAGAI KUMIKO)
杏林大学・医学部・実験助手
研究者番号：60398592