

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450171

研究課題名(和文)細胞膜マイクロドメインのダイナミクス制御による食品成分の血管攣縮予防メカニズム解明

研究課題名(英文)The elucidation of preventive mechanism of vasospasm using food factors via membrane microdomain dynamics

研究代表者

加治屋 勝子(KAJIYA, Katsuko)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・講師

研究者番号：00379942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞や脳梗塞などの突然死の主因となる致死的難病は、我が国の死因の上位を占めている。我々は、その主因である血管攣縮(痙攣したように突発する血管の異常収縮)の原因分子としてスフィンゴシルホスホリルコリンを世界で初めて同定し、病的シグナル伝達に細胞膜上マイクロドメインが必要であることを世界で初めて発見した。一方、突発する致死的難病に対しては、異常収縮そのものを予防する事が重要である。我々は、多種類の天然物の中から、血管攣縮を予防可能な食品由来新規成分を発見した。本研究では、病的シグナル伝達の反応の場である細胞膜マイクロドメインに焦点を当て、食品由来成分による血管攣縮の予防メカニズムについて検討した。

研究成果の概要(英文)：In addition to the westernization of our diet and the decrease in opportunities to exercise, we are steadily becoming a truly aging society, and the number of people who have contracted vascular disease, as well as the ones who are susceptible to it, is increasing. Thus, prevention of vascular diseases is an urgent issue in terms of national health. Abnormal vascular smooth muscle (VSM) contraction is one of the crucial phenomena which cause cardiac angina and myocardial infarction. We previously found that sphingosylphosphorylcholine (SPC) as an upstream mediator for the abnormal pathway and the essential roles of microdomain in abnormal contraction. Therefore, we investigated the relationship between microdomain and SPC-induced Ca²⁺-sensitization of VSM. In addition, we found prophylactic compounds that can markedly inhibit the Ca²⁺-sensitization. These results suggest that innovative natural ingredient may contain novel protective components active against abnormal VSM contraction.

研究分野：食品栄養科学、分子膜細胞学

キーワード：血管攣縮 ミクロドメイン 食品機能 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

血管攣縮は、痙攣したように突発する血管の異常収縮であり、例えば、冠動脈性狭心症は、欧米人よりも日本人に起こりやすく、また、安静時にも起こることから、突然死の主因となる致死的難病として恐れられている。また、脳血管攣縮は、くも膜下出血の後に、高頻度に脳血管で起こるため、くも膜下出血の症状が軽症で、止血手術も成功し、一旦、回復して術後の血管造影(血管内部の状態を可視化する医用画像処理技術)で異常が見られなかったとしても、7~10日目に、突然、脳の広範囲で異常収縮が起こり、残念なことに死に至るケースが後を絶たない。これまで、この血管攣縮の発症メカニズムの詳細が解明できていなかったため、適切な予防法や治療薬の開発が進んでいなかった。なぜなら、収縮という時間経過の非常に早い現象を扱うため、生化学的解析や分子生物学的手法では数時間以上を要してしまい、実際の収縮反応とは解離した結果になる事が、研究の最大の問題点であったからである。この問題を克服するために、我々は、血管の正常収縮と異常収縮を明確に区別しながら、異常収縮のシグナル経路を経時的に観察する方法を開発した(PNAS, 1996、特許取得)。これを応用して、血管異常収縮の原因分子であるスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)と、その下流のシグナル分子として Src family チロシンキナーゼの一種である Fyn を世界で初めて同定した(Circ Res, 2002)。

2. 研究の目的

血管攣縮は、我が国の死因の上位を占めており、突然死の主因にもなっている重篤な疾患である。通常、血管は、細胞質 Ca^{2+} 濃度依存性に収縮する事により、血圧や血流を一定に保っている(正常収縮)が、恐ろしい血管攣縮の本態である血管の異常収縮は、この Ca^{2+} では説明がつかない、Rho キナーゼを介した Ca^{2+} 非依存性の収縮によって引き起こされる。我々は、世界で初めて「SPC Fyn Rho キナーゼ 血管攣縮」の病的シグナル伝達経路を明らかにしたが、詳細な制御機構は不明なままである。そのため、適切な治療薬の開発ができず、原因の解っている正常収縮を抑制する薬物(Ca^{2+} 拮抗薬など)を用いた対症療法に留まっている。従って、食品由来の血管攣縮予防成分を日常的に摂取することにより、真の予防を実現することが必要であり、そのためには、血管攣縮の詳細な予防メカニズムを解明し、根本的な予防法を確立するこ

とにより、突然死を撲滅することが国民衛生上の緊急かつ最重要課題である。

我々は、SPC による血管の異常収縮を阻止する物質として魚油に多く含まれる多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸(EPA)を発見した(Circ Res, 2002)。実際に、EPA は、ヒトのくも膜下出血後の血管攣縮に対して著効を示し、特効薬の発見として多数のメディアで報道された。

一方、SPC による血管異常収縮が、血中コレステロール濃度が正常な動物やヒトでは起こらず、高コレステロール血症の場合のみ観察され、LDL コレステロール値とは正相関するが、HDL コレステロールとは逆相関する事を見出した(Circ Res, 2006)。つまり、SPC による血管異常収縮がコレステロール依存性であることを発見し、異常収縮の反応の場としてコレステロールが局限して蓄積した細胞膜上のマイクロドメイン(カベオラや膜ラフト)が必要である事を突き止めた。コレステロールは、心筋梗塞、脳梗塞等に代表される血管病のリスクファクターとして有名であるにもかかわらず、このコレステロールが蓄積するマイクロドメインに注目した血管の報告はない。

本研究の第一の目的として、血管異常収縮の反応の場と考えられるマイクロドメインの挙動や、マイクロドメインに局在するシグナル分子の動態について解明し、血管異常収縮におけるマイクロドメインの役割、さらには血管異常収縮の詳細な分子機構を解明する必要がある。そこで、独自に開発したハイブリッドリポソームを応用して、細胞膜マイクロドメインの動態変化を経時観察すると共に、血管異常収縮を引き起こす病的シグナル分子の多因子・同時可視化を行い、分子間相互作用を定量的・経時的に評価する。

さらに、我々は、血管病発症後に作用する治療薬ではなく、血管の異常収縮そのものの予防法を開発するため、多種多様な構造を有する数多くの天然物をスクリーニングし、*in vitro*系において血管の正常機能(血圧を維持する正常収縮)に影響を与えることなく、SPC による異常収縮のみを特異的に抑制する新規成分を見出している。天然成分、特に食品由来の機能性成分であれば、血管病が発症する「前」から、日常食として気軽に摂取することが可能であり、真の血管病予防効果が期待できる。そこで、本研究の第二の目的は、予防的治療法の開発を目指し、新規成分の機能評価を行う事である。

3. 研究の方法

- 1) 各種電子顕微鏡を用いて細胞膜マイクロドメインを直接的に視覚化し、血管攣縮に対して食品由来の血管攣縮予防成分が与える影響について、膜ダイナミクスを解析した。
- 2) 生きた血管平滑筋細胞を用いて、血管攣縮予防成分による、細胞膜マイクロドメイン局在分子の分布と動態を、多因子・同時可視化解析した。
- 3) 独自開発したハイブリッドリポソームを応用して、血管攣縮予防成分による、病的シグナル伝達活性化機構で重要な Fyn の膜移行への影響を検討した。



4. 研究成果

細胞膜上のマイクロドメインは、コレステロールやスフィンゴ脂質を豊富に含む、細胞膜における情報交換の中心的な部位である。その一つであるカベオラは、膜の裏打ち蛋白質であるカベオリンによって比較的安定な陥入構造を持つため、電子顕微鏡による形態観察が可能である。そこで、以下の4項目を実施した。

ヒト血管平滑筋培養細胞におけるカベオラの形態観察を行うため、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてナノスケールで3次元構造を再構築し、カベオラの立体構造を解析した。

試料を破壊せずに3次元で微細形状の鮮明観察を可能にした低真空用3D走査型電子顕微鏡(SEM)ならびに、膜の最表面像を原子オーダーという極めて高い分解能で観察可能な高感度原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、ヒト血管平滑筋細胞のカベオラ構造を観察し、陥入構造の大きさや深さから、膜動態制御機構を解析した。

平常状態及び血管攣縮状態のマイクロドメ

インの挙動比較のみならず、RNA干渉によるカベオリンの特異的ノックダウン実験、コレステロール除去剤によるカベオラ構造の破壊実験、各種血管攣縮予防成分の前/後投与実験など、様々な条件下での膜動態を観察することにより、カベオラ構造のダイナミクス制御機構を解析した。

病的シグナル分子(Fyn、Rhoキナーゼ等)のリコンビナント蛋白質を、昆虫細胞 Sf9 とバキュロウイルスを組み合わせた蛋白質発現系により高純度発現・精製し、ヒト血管平滑筋培養細胞に作用させ、血管攣縮予防成分による影響について免疫電子顕微鏡法により解析した。

以上の結果より、間接的かつ断続的な所見による従来の研究とは異なり、血管攣縮シグナル伝達の反応の場であるマイクロドメインを直接的に視覚化することによって、血管攣縮及びその予防メカニズムにおけるマイクロドメインの挙動を明らかにした。

更に、Srcファミリーチロシンキナーゼの一種である Fyn は、通常、細胞質に存在しているが、血管攣縮発症機構においては、病的シグナル伝達の反応の場である細胞膜上のマイクロドメインへ移動して活性化することを我々は明らかにした。この Fyn のマイクロドメインへの移動には、脂質による修飾が重要であると考えられた。このうち、2番目のグリシンへのミリスチル基の付加は不可逆的であるのに対し、3番目と6番目のシステインへのパルミトイル基の付加は可逆的であり、蛋白分子の細胞質からマイクロドメインへの移動を制御していると考えられる。即ち、マイクロドメインのダイナミクス制御により、血管攣縮シグナル分子の Fyn の活性化を阻止できる可能性がある。なお、通常用いられる培養細胞による実験系では、細胞内の他の多因子の影響を受けやすいため、マイクロドメインと病的シグナル分子である Fyn との相互作用を純粋な実験系で検討するために独自開発したハイブリッドリポソーム(世界初のカベオラ・ラフトの人工モデル膜)を用いた。

本研究成果は、血管の異常収縮における細胞膜上マイクロドメインの重要性を示すものであり、国内外の膜ドメイン研究において新たな学術的知見を提供する物である。将来的には、マイクロドメイン制御による血管異常収縮の改善・治療が期待される。

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8件)

- 1) A. Kawamura, K. Kajiya (2番目) 他6名, Effects of the DASH-JUMP dietary intervention in Japanese participants with high-normal blood pressure and stage I hypertension: an open-label single-arm trial, Hypertension Research, 査読有, 1-9, 2016
- 2) K. Nagata, K. Kajiya (3番目) 他4名, The analgesic effect of odorant-X is concentration-dependent, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 65, 162, 2015
- 3) R. Yamaguchi, K. Kajiya (4番目) 他5名, Odorant X-induced analgesia is not stress-induced analgesia in mice, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 65, 162, 2015
- 4) Y. Zhang, K. Kajiya (7番目) 他5名, N-terminus of paxillin regulates actin stress fiber formation by binding to the active Fyn, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 132, 2015
- 5) K. Miyanari, K. Kajiya (3番目) 他6名, Discovery of novel Salacia-derived components which specifically inhibit the ROK-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 65, 191, 2015
- 6) T. Kimura, K. Kajiya (3番目) 他5名, Novel fish-derived peptide fragments which induce endothelium-dependent and -independent vasorelaxation, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 65, 211, 2015

〔学会発表〕(計39件)

- 1) 黒田怜、南雄二、加治屋勝子、根菜類抽出成分による血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果、日本農芸化学会2016年度大会2016年3月27-30日(札幌)
- 2) Rei Kuroda, Natsuko Tsurudome, Yuji Minami, Katsuko Kajiya, Farm products from Kagoshima (original cultivar) improve the function of vascular endothelial cells, Food for Health International Conference, March 21-23, 2016 (Kagoshima, Japan)
- 3) Natsuko Tsurudome, Rei Kuroda, Yuji Minami, Katsuko Kajiya, Functional analysis of tropical fruits in reversing contraction and relaxation of vascular smooth muscle, Food for Health International Conference, March 21-23, 2016 (Kagoshima, Japan)
- 4) 加治屋勝子, 循環器疾患予防を目指した

血管機能保持に関する研究, 日本応用糖質科学会, 2016年3月9日, 鹿児島大学

- 5) Katsuko Kajiya, Atsuko Kawamura, Hiroko Kishi, Makoto Mitarai, Hiroshi Oda, Seiji Umemoto, Sei Kobayashi, Effects of the WASHOKU-modified DASH diet on blood pressure and cardiovascular risk factors among subjects with high normal blood pressure and stage 1 hypertension, The 6th International Conference on Food Factor, November 22-25, 2015 (Seoul, Korea)
 - 6) Natsuko Tsurudome, Rei Kuroda, Yuji Minami, Katsuko Kajiya, Novel plant-derived components effective in reversing contraction and relaxation of vascular smooth muscle, The 6th International Conference on Food Factor, November 22-25, 2015 (Seoul, Korea)
 - 7) Rei Kuroda, Natsuko Tsurudome, Yuji Minami, Katsuko Kajiya, Components from natural farm products improve nitric oxide production in human vascular endothelial cells, The 6th International Conference on Food Factor, November 22-25, 2015 (Seoul, Korea)
 - 8) Risako Tsuchiya, Natsuko Tsurudome, Rei Kuroda, Yuji Minami, Katsuko Kajiya, Anti-hypertensive effect of farm products from Kagoshima, The 6th International Conference on Food Factor, November 22-25, 2015 (Seoul, Korea)
 - 9) 大西真人、下川倫子、加治屋勝子、南雄二、八木史郎、アフリカパンノキレクチンの諸性質と結晶化、日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日愛媛大学(愛媛)
 - 10) 鶴留奈津子、南雄二、加治屋勝子, 血管を正常に収縮・弛緩させる機能性成分の探索, 日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日愛媛大学(愛媛)
 - 11) 黒田怜、南雄二、加治屋勝子, 天然物由来成分によるヒト血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果について, 日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会, 2015年9月17-18日愛媛大学(愛媛)
 - 12) 加治屋勝子, 第7回九州・沖縄アイランド女性研究者支援シンポジウム, 天然物による循環器疾患予防効果に関する研究, 2015年9月11日鹿児島大学(鹿児島)
- 〔図書〕(計2件)
- 1) Ying Zhang, Hiroko Kishi, Katsuko Kajiya, Tomoka Morita, Sei Kobayashi, The pivotal role of cholesterol and membrane lipid rafts in the Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction leading to vasospasm, Muscle Contraction and Cell Motility: Fundamentals and Developments, PAN STANFORD PUBLISHING, P329-338, 2016

2) 加治屋勝子、鹿兒島の食環境と健康食材、
南方新社、240 ページ、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1)名称：血管攣縮抑制剤

発明者：高松日出子、小林誠、宮成健司、岸博子、加治屋勝子、野地本和孝、高田雄一

種類：特許

番号：特開 2016-56138

出願年月日：2014 年 9 月 10 日

国内外の別： 国内

2)名称：血管攣縮抑制剤

発明者：小林誠、高柿了大、岸博子、張影、加治屋勝子、渡邊和晃

種類：特許

番号：特開 2016-79117

出願年月日：2014 年 10 月 14 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0028/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)

鹿兒島大学・農水産獣医学域農学系・講師

研究者番号：00379942

(2)研究分担者

岸 博子 (KISHI HIROKO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40359899

小林 誠 (KOBAYASHI SEI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80225515