

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460345

研究課題名(和文) 伸展負荷による血管平滑筋細胞死の分子機構の解明と全く新しい大動脈解離予防薬の開発

研究課題名(英文) Investigation of cyclic mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell death and the development of prevention strategies of aortic dissection

研究代表者

吉栖 正典 (Yoshizumi, Masanori)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60294667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：致死率の高い大動脈解離の発症には血圧急上昇が関与している可能性がある。我々は、「大動脈壁の中膜を構成する血管平滑筋細胞に対する急激な伸展負荷が、細胞死を招いて大動脈解離を引き起こすのではないか？」という新規仮説を立てて研究を行った。培養ラット血管平滑筋細胞に急激な伸展負荷をかけ、細胞内の遺伝子発現変化をcDNAマイクロアレイで解析した。その結果、ケモカイン Cxcl1とCx3cl1の発現上昇がみられた。これらケモカインを阻害すると血管平滑筋細胞死が増加したことから、ケモカインは大動脈解離発症に予防的に働いている可能性がある。今後、ケモカインは大動脈解離発症予防薬の開発標的になりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The pulsatile nature of blood flow exposes vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the vessel wall to cyclic mechanical stretch (CMS), which evokes vascular remodeling. We have revealed that CMS of rat aortic smooth muscle cells (RASMCs) caused JNK- and p38-dependent cell death and that a calcium channel blocker and angiotensin II receptor antagonist decreased cell death by CMS. We also showed that the expression of chemokines, Cxcl1 and Cx3cl1 was induced by CMS in a JNK-dependent manner. Expression of Cxcl1 was also induced in VSMCs by hypertension produced by abdominal aortic constriction. In addition, antagonists against the receptors for CXCL1 and CX3CL1 increased cell death, indicating that CXCL1 and CX3CL1 protect RASMCs from CMS-induced cell death. These results indicate that CMS of VSMCs induces inflammation-related gene expression, including that of CXCL1 and CX3CL1, which may play important roles in the stress response against CMS caused by hypertension.

研究分野：循環薬理学

キーワード：動脈解離 血管平滑筋細胞 細胞死 伸展負荷 分子機構 ケモカイン MAPキナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

急性大動脈解離の致死率は高く、多くは緊急手術以外に救命する手段はない。大動脈解離の発症に、血压急上昇が関与している可能性があるが、その詳細な分子機構は不明である。最近、血管平滑筋細胞への機械的刺激がアゴニストに依存しないアンジオテンシンII受容体の活性化を引き起こすことが報告された (Nat. Cell Biol. 6: 499-506, 2004)。このことは、機械的ストレスによって細胞内シグナルが変動することを示唆している。以前より我々は、培養血管平滑筋細胞を用いた実験で、酸化ストレスや低酸素負荷などが細胞内シグナルを変動させ、細胞増殖や細胞死をもたらすことを報告してきた (J. Biol. Chem. 275: 11706-12, 2000; Circ. Res. 90, 1222-30, 2002; Exp. Cell Res. 319, 3042-50, 2013)。これらの研究成果を背景に、「大動脈壁の中膜を構成する血管平滑筋細胞に対する急激な伸展負荷が、アポトーシスを含む細胞死を招いて大動脈解離を引き起こすのではないか?」という新規仮説を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では急激な伸展負荷による血管平滑筋細胞死の分子メカニズムを解明し、降圧に依存しない、全く新しい大動脈解離の発症予防薬を開発することを目標とした。予備的実験として、シリコンチャンバー上で培養した血管平滑筋細胞に、急激な血压上昇に相当する伸展負荷をかけたところ、時間依存的な細胞死が観察され、我々の仮説が正しいことが裏付けられた。本研究では、1) 急激な伸展負荷による血管平滑筋細胞死の細胞内分子メカニズムの解明による治療標的分子の同定と、2) 治療標的分子をターゲットとした、降圧に依存しない全く新しい大動脈解離の発症予防薬の開発を目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、急激な伸展負荷による血管平滑筋細胞死の分子機構を解明して治療標的分子を同定する。さらに、標的分子に対する全く新しい大動脈解離の発症予防薬を開発することを目標として、in vitro と in vivo の両面から研究を進めた。

具体的には、

- 1) 培養血管平滑筋細胞を用いて、血压急上昇に相当する伸展負荷による細胞死に関わる細胞内情報伝達分子を cDNA マイクロアレイ等により解析し、治療標的分子を同定した。
- 2) 同定した治療標的分子の特異的阻害薬や siRNA 導入遺伝子発現阻害によって、伸展負荷による血管平滑筋細胞死が抑制されるか否かを検討した。
- 3) 大動脈瘤発症モデルマウスを用いた in vivo での実験で、治療標的分子の遺伝子発現が変化するか否かを検討した。

### 4. 研究成果

(1) シリコンチャンバー上で培養した血管平滑筋細胞に、血压急上昇に相当する伸展負荷をかけたところ、細胞死に関わると思われる MAP キナーゼの JNK と p38 の活性化が観察された (図 1)。JNK と p38 の阻害薬を投与すると、伸展負荷による血管平滑筋細胞死が抑制されたことから JNK と p38 は細胞死に促進的に働いていることが示唆された。

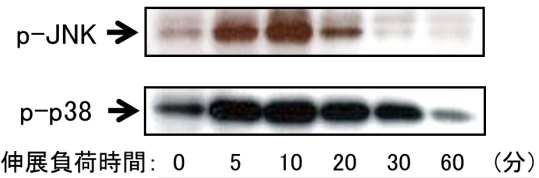


図1・培養血管平滑筋細胞への伸展負荷によるJNKとp38活性化の時間経過

(2) カルシウム拮抗薬のアゼルニジピンは伸展負荷による血管平滑筋細胞死を抑制した。アゼルニジピンは、伸展負荷による JNK と p38 の活性化を阻害したことから、細胞内メカニズムとして MAP キナーゼ阻害による細胞死抑制効果が示唆され、降圧に依存しない動脈解離発症予防薬の候補になりうることを示された (図 2)。

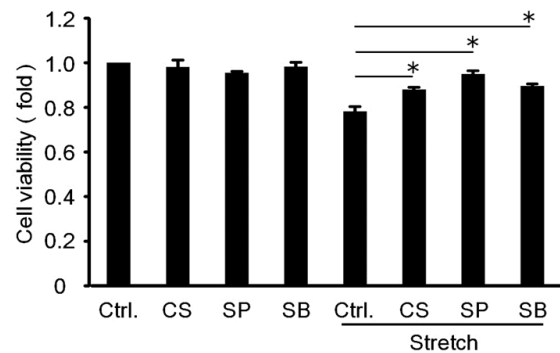


図2・アゼルニジピン(CS)、JNK阻害薬(SP)、p38阻害薬(SB)による、伸展負荷による血管平滑筋細胞の抑制効果

(3) アンジオテンシン II 受容体拮抗薬のオルメサルタンは伸展負荷による血管平滑筋細胞死を抑制した。オルメサルタンは、伸展負荷による JNK と p38 の活性化を阻害したことから、細胞内メカニズムとして MAP キナーゼ阻害による細胞死抑制効果が示唆され、降圧に依存しない動脈解離発症予防薬の候補になりうることを示された (図 3)。

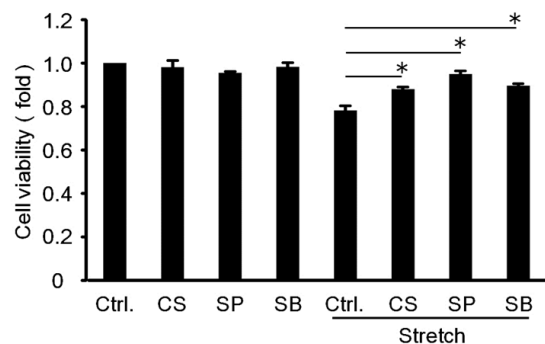


図3・JNK阻害薬(SP)、p38阻害薬(SB)、オルメサルタン(Olm)による、伸展負荷による血管平滑筋細胞の抑制効果

(4) 培養血管平滑筋細胞を用いて、血圧急上昇に相当する伸展負荷による細胞死に関わる細胞内情報伝達分子をcDNAマイクロアレイにより解析した結果、ケモカインのCxcl1とCx3cl1の発現上昇がみられ、RTPCRでも確認された(図4)。同じく大動脈縮窄による急性大動脈瘤モデルマウスでもこれらケモカインの発現上昇がみられた。

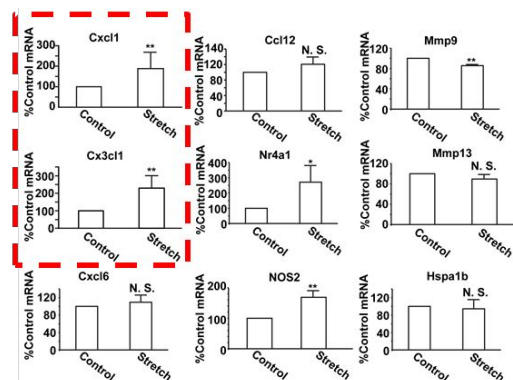


図4・伸展負荷による血管平滑筋細胞でのケモカイン、Cxcl1とCx3cl1の発現上昇

(5) ケモカインのCxcl1とCx3cl1の受容体阻害薬は伸展負荷による血管平滑筋細胞死を促進した。この結果からこれらケモカインは伸展負荷による血管平滑筋細胞死に対して抑制的に作用していることが示唆された(図5)。

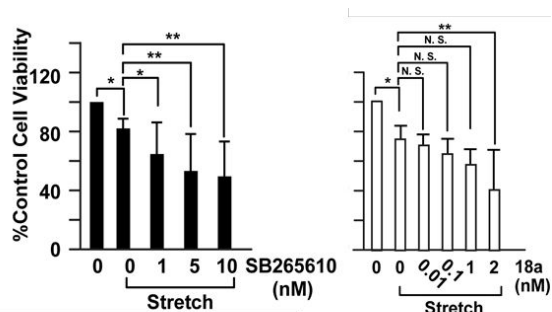


図5・伸展負荷による血管平滑筋細胞死はCxcl1、Cx3cl1受容体阻害によって促進された

以上の研究成果から、ケモカインのCxcl1とCx3cl1は、動脈解離発症予防のための治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

##### 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)

〔雑誌論文〕(計 6件)

Jing Zhao, Kentaro Ozawa, Yoji Kyotani, Kosuke Nagayama, Satoyasu Ito, Akira T Komatsubara, Yuichi Tsuji, Masanori Yoshizumi. Azelnidipine inhibits cultured rat vascular smooth muscle cell death induced by cyclic mechanical stretch. Plos One, 査読有, 9, 2014, e102813. DOI: 10.1371/journal.pone.0102813

Satoyasu Ito, Kentaro Ozawa, Jing Zhao, Yoji Kyotani, Kosuke Nagayama, Masanori Yoshizumi. Olmesartan inhibits cultured rat aortic smooth muscle cell death induced by cyclic mechanical stretch through the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and p38 signaling pathways. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 127, 2015, 69-74. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.11.002

Masao Yoshizumi, Masanori Yoshizumi. Angiotensin (1-7), small but complicated, needs more exercise. Circulation J., 査読有, 79, 2015, 1220-1221. DOI: 10.1253/circ.CJ-15-0448

Kosuke Nagayama, Yoji Kyotani, Jing Zhao, Satoyasu Ito, Kentaro Ozawa, Francesco A Bolstad, Masanori Yoshizumi. Exendin-4 prevents vascular smooth muscle cell proliferation and migration by angiotensin II via the inhibition of ERK1/2 and JNK signaling pathways. Plos One, 査読有, 10, 2015, e0137960. DOI: 10.1371/journal.pone.0137960

Yoji Kyotani, Jing Zhao, Kentaro Ozawa, Takahiro Nakagawa, Francesco A Bolstad, Masanori Yoshizumi. Endothelin-1(1-31) causes the migration of vascular smooth muscle cells through endothelin ETA receptor. Brit. J. Pharmaceut. Res., 査読有, 13, 2016, 1-7. DOI: 10.9734/BJPR/2016/29824

Yuichi Tsuji, Kentaro Ozawa, Akira T Komatsubara, Jing Zhao, Mayumi Nishi, Masanori Yoshizumi. Detection of nitric oxide induced by angiotensin II receptor type1 using soluble guanylate cyclase beta1 subunit fused to a yellow fluorescent protein, venous. J. Fluoresc. 査読有, 27, 2017, 399-405. DOI: 10.1007/s10895-016-1968-z

〔学会発表〕(計 16件)

伊藤都裕、趙晶、京谷陽司、長山功佑、辻 優一、小澤健太郎、吉栖正典。オルメサルタンはJNK、p38のリン酸化を阻害することにより伸展刺激による細胞死を抑制する。第125回日本薬理学会近畿部会、2014年6月20日、岡山

小澤健太郎、趙晶、京谷陽司、伊藤都裕、長山功佑、辻 優一、吉栖正典。一酸化窒素による脱分極ミトコンドリアの分解の制御機構。第37回日本神経科学大会、2014年9月11日~13日、横浜

Yoji Kyotani, Hiroko Ota, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Jing Zhao, Kosuke nagayama, Kentaro Ozawa, Shin Takasawa, Hiroshi Kimura, Masanori Yoshizumi. Sleep apnea Syndrome as an emerging risk factor for type 2 diabetes and atherosclerosis: evidence and underlying mechanism. 9th

Metabolic Syndrome, Type 2 diabetes and Atherosclerosis Congress, September 12-14, 2014, Kyoto, Japan

小澤健太郎、辻優一、趙晶、伊藤都裕、長山功佑、京谷陽司、吉栖正典 . A high signal-to-noise NO probe composed of a yellow fluorescent protein, Venus . 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日 ~ 20日、名古屋

伊藤都裕、小澤健太郎、趙晶、京谷陽司、長山功佑、吉栖正典 . Olmesartan inhibits cultured rat aortic smooth muscle cell death induced by cyclic mechanical stretch through the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and p38 signaling pathways . 第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日 ~ 20日、名古屋

長山功佑、京谷陽司、趙晶、伊藤都裕、小澤健太郎、吉栖正典 . GLP-1 analogueの Exendin-4はERK1/2とJNKの阻害を介してアンジオテンシンIIによる血管平滑筋細胞の増殖と遊走を抑制する . 第127回日本薬理学会近畿部会、2015年6月26日、岐阜

趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、長山功佑、吉栖正典 . 伸展負荷による血管平滑筋細胞死に対するケモカインの抑制作用 . 第25回日本循環薬理学会、2015年12月4日、奈良

小澤健太郎、辻優一、小松原晃、趙晶、吉栖正典 . 蛍光タンパク質をもとにした高感度一酸化窒素評価法の開発 . 第25回日本循環薬理学会、2015年12月4日、奈良

長山功佑、京谷陽司、趙晶、伊藤都裕、小澤健太郎、吉栖正典 . アンジオテンシンIIによる血管平滑筋細胞の増殖と遊走に対するGLP-1 analogueのExendin-4の抑制効果 . 第25回日本循環薬理学会、2015年12月4日、奈良

吉栖正典、長山功佑、京谷陽司、趙晶、伊藤都裕、小澤健太郎 . GLP-1 analogueであるExendin-4はアンジオテンシンIIによる血管平滑筋細胞の増殖と遊走を抑制する . 第45回日本心臓血管動物質学会、2016年2月5日 ~ 6日、徳島

京谷陽司、高澤伸、趙晶、小澤健太郎、吉栖正典 . Underlining mechanisms for arteriosclerosis in intermittent hypoxia or biomechanical stretch . 第89回日本薬理学会年会 (招待講演) 2016年3月9日 ~ 11日、横浜

趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、長山功佑、吉栖正典 . Chemokine inhibition of mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell death . 第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日 ~ 11日、横浜

小澤健太郎、趙晶、吉栖正典 . 遺伝子編集を用いた内因性 parkinへの一酸化窒素修飾のミトコンドリア機能への役割の検討 . 第129回日本薬理学会近畿部会、2016年6月24日、広島

小澤健太郎、趙晶、吉栖正典 . ケモカインによるストレッチ誘導性血管平滑筋細胞死の抑制 . 第23回大阪市大フォーラム、2016年8月4日、大阪

趙晶、小澤健太郎、京谷陽司、吉栖正典 . 伸展負荷によるラット血管平滑筋細胞死に対するケモカインの保護作用 . 第90回日本薬理学会年会、2017年3月15日 ~ 17日、長崎

吉栖正典、趙晶、小澤健太郎、京谷陽司 . 伸展刺激に対する血管平滑筋細胞応答と動脈硬化 . 第90回日本薬理学会年会 (招待講演) 2017年3月15日 ~ 17日、長崎

〔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  
<http://www.naramed-u.ac.jp/~pha/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉栖正典 (YOSHIZUMI, Masanori)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60294667

### (2) 研究分担者

小澤健太郎 (OZAWA, Kentaro)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80507393

京谷陽司 (KYOTANI, Yoji)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10706534

### (3) 研究協力者

趙晶 (ZHAO, Jing)  
奈良県立医科大学・医学部・博士研究員