

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590800
 研究課題名（和文） 新規昇圧物質カップリングファクター 6 の網羅的機能解析と
 心血管病態形成機序の解明
 研究課題名（英文） Functional analysis of novel vasoconstrictor coupling factor 6 and
 clarification of mechanism for the genesis of cardiovascular disorders
 研究代表者
 長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)
 弘前大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：00169278

研究成果の概要：CF6-TG マウスで軽度血圧の上昇が認められ、高食塩食負荷により早期に死亡した。蔗糖食負荷では、空腹時血糖値は CF6-TG マウスが WT マウスより高く、血中インスリン値も CF6-TG マウスが高値であった。糖負荷試験では血糖値の上昇反応は CF6-TG マウスが WT マウスに比較して有意に大であった。組織 IRS-1 蛋白は骨格筋で CF6-TG マウスが WT マウスに比較して減少していた。骨格筋膜分画に存在する GLUT-4 蛋白は CF6-TG マウスが WT マウスに比較して減少していた。CF6 は組織の酸性化を介して高血圧と糖尿病の共通の発症原因分子となりうることを示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

キーワード：Coupling factor 6, diabetes, salt, hypertension, prostacyclin, nitric oxide transgenic mouse

1. 研究開始当初の背景

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は低下

している。しかし、血液を除去した摘出標本（血管、臓器）での産生は内因性に反して著明に亢進している。この矛盾は SHR においてプロスタサイクリン産生を抑制する内因性物質が流血中に存在するという仮説によって説明可能と考えた。近年我々は coupling

factor 6 (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発見した(J Biol Chem 1998)。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する。COXとプロスタサイクリン合成酵素には影響しない(J Biol Chem 1998)。さらに、CF6は血管内皮細胞の表面に存在し、そこから放出され、ずり応力により分泌はさらに亢進する(Circulation, 2001)。ラットに recombinant CF6 を静注すると、昇圧活性を有し、その昇圧反応は SHR で正常血圧ラット(WKY)に比較して亢進していることも明らかにした(J Clin Invest, 2001)。また、CF6はSHRの血中で高値を呈し、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報告した(J Hypertens 2003)。さらに、最近我々は血液透析患者では血中CF6濃度は高値を示し、内因性 nitric oxide synthase (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を明らかにした(Kidney Int, 2003)。

CF6産生に関する基礎的検討では、tumor necrosis factor- α とずり応力によりCF6 mRNA発現と分泌は亢進し、その反応はNF- κ Bの dominant negativeにより阻害されることを明らかにした(Cardiovas Res, 2004 and 2005)。さらに、CF6のプロモーター解析では、ラットCF6プロモーター領域に1ヶ所のNF- κ B結合部位が存在し、NF- κ B結合部位のdeletion並びにdouble mutationにより、ずり応力によるルシフェラーゼ活性の亢進は完全に阻害された(Cardiovas Res, 2005)。

CF6の細胞内情報伝達機構に関しては、最近その受容体が血管内皮細胞表面に存在する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ATPase活性を亢進させ、Foを介して水素イオンを細胞内に流入させ、それに伴って細胞内酸性化を引き起こす。Efrapreptin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が消失する(Hypertension, 2005)。

CF6の生理作用に関しては、最近血管内皮細胞のNO産生と内皮依存性過分極因子(EDHF)産生も抑制することが明らかとなっ

た(J Hypertens, 2006)。血管内皮細胞にCF6を投与し、cDNA microarrayで増減する遺伝子を検討すると、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(DDAH-2)の低下が認められ、ADMAの分泌亢進も証明された。さらに、動脈硬化の促進因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、並びに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)。また、ラット冠細小動脈の収縮実験では、NOとプロスタサイクリンを阻害しても、CF6は強力な収縮を惹起させ、epoxyeicosatrienoic acid (EET)を初めとしたEDHFの産生を阻害して、血管収縮をきたすことも明らかとなった(AHA, 2005)。

以上、CF6の生理作用、心血管病との関連性は明らかになってきたが、CF6の心血管病の病態形成に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

CF6の血管系に対する作用は多彩であり、いずれも動脈硬化促進方向に働く。また、実際、心血管病並びにその促進因子で高値を示している。これらの現象は、CF6が心血管病の発症・進展と密接な関連を有することを示唆するものであるが、その因果関係は依然として不明である。

本研究の目的は、新規昇圧物質CF6の心血管病の病態形成における役割を解明することである。そのために、CF6過剰発現マウスを作製し、高蔗糖食ならびに高食塩食負荷を行い、心血管系に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

CF6過剰発現モデルに対する糖負荷の影響

CF6は通常ミトコンドリアにsortingされる。そこで血中CF6濃度が高値を呈するCF6過剰発現マウスを作製するために、CF6は直接mature formで産生され、直ちに細胞外に分泌されるように、ヒトカルシトニンのpromotorとmature CF6 cDNAを接続した発現ユニットを作製することにした。筑波大学生命科学動物資源センターに依頼し遺伝子導入マウス(ヘテロ)を3匹作製してもらった。(1)CF6過剰発現マウス(TG)の作製: Human elongation factor 1 promoter、カルシトニンN末端(Met1-Arg84)、ならびにヒトCF6からなるDNA断片をC57/BL6Jマウスembryoに導入し、CF6-TGマウスを作製した。導入遺伝子はほぼすべての組織で発現し、1.5-2.0倍の発現亢進が認められた。

(2) 血圧測定:無麻酔下にて tail-cuff 法で行った。

(3) 組織酸性化の測定:CF6-TG マウスと野生型(WT)マウスの腹腔に ^3H -水を投与し、10分後に骨格筋と肝臓を摘出し、 ^3H の組織含量を比較した。

(4) TG マウスの糖代謝:7週齢のCF6-TG マウスとWTマウスに20%高蔗糖食を8週間摂取させ、最終週に糖負荷試験を施行した。毎週尾部より少量採血し、血糖・血中インスリン濃度をキットを用いて測定し、インスリン抵抗性の原因を検討した。さらに、アディポネクチンをキットを用いて測定した。

(5) 脂肪組織・肝臓を摘出し、脂肪代謝・糖代謝に重要な役割を果たしている分子の遺伝子発現についてreal-time PCR法で、CF6過剰発現マウスとwildを比較した。測定分子は核内受容体である peroxisome proliferators activating receptor (PPAR)-gamma、glucose transporter (GLUT)4、インスリン受容体等である。さらに、インスリンシグナル関連分子、特にチロシンキナーゼ AKT、insulin substrate (IRS)、GLUT4に関しては、Western blot法により、蛋白発現の比較、リン酸化の比較、さらには細胞膜への局在化を明らかにし、インスリン抵抗性の原因を解明した。

CF6 過剰発現モデルに対する食塩負荷の影響

(1) 7週齢のCF6-TG マウスとWTマウスに8%食塩食を摂取させ、生存曲線を比較検討した。また、非観血的血圧並びに心拍測定、各種臓器重量の測定を行い、CF6 過剰発現マウスとWTマウスの動脈硬化の程度・心肥大の程度を比較検討した。

(2) CF6-TG マウスを代謝ゲージ内で飼育し、体重、尿量、Naバランス、尿蛋白の有無について検討し、腎機能と心機能の死亡率増加への関与を明らかにする。

4. 研究成果

CF6 過剰発現マウスの作製と高蔗糖食負荷の影響

結果:

(1) CF6-TG マウスで軽度血圧の上昇が認められた。

(2) 骨格筋と肝臓における ^3H の組織含量はいずれも、CF6-TG マウスがWTマウスに比較して有意に大であった。

(3) 糖代謝:空腹時血糖値はCF6-TG マウスがWTマウスより高く(133 ± 10 vs 108 ± 1 mg/dl, $p < 0.05$)、血中インスリン値もCF6-TG マウスがWTマウスより高値であった(698 ± 87 vs 295 ± 55 pg/ml, $p < 0.05$)。糖負荷試験による血糖値の上昇反応はCF6-TG マウスがWTマウスに比較して有意に大であった。組織IRS-1蛋白は骨格筋でCF6-TG マウスがWTマウスに比較して $64 \pm 9\%$ ($p < 0.05$)減少していたが、肝臓と脂肪では差がなかった。組織IRS-2蛋白はCF6-TG マウスとWTマウスで差はなかった。骨格筋膜分画に存在するGLUT-4蛋白はCF6-TG マウスがWTマウスに比較して $69 \pm 11\%$ ($p < 0.05$)減少していた。

結論:

CF6は組織の酸性化を介して高血圧と糖尿病の共通の発症原因分子となりうる。

CF6 過剰発現マウスにおける高食塩食負荷の影響

結果:

(1) 食塩負荷により血圧、心拍数は2群で差を認めなかったが、35週間の観察においてCF6-TG マウスで死亡率の有意な上昇が認められた(生存率:50% TG, 92% WT, $p < 0.05$, log-rank test)。

(2) 尿中蛋白量は2群間で差はなく、尿中Na/K比がCF6-TGで有意に高値を示した。

結論:

CF6-TG マウスは高食塩食負荷により、早期に死亡することが明らかとなった。

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 4件)

1. Osanai T, Tomita H, Kushibiki M, Yamada M, Tanaka M, Ashitate T, Echizen T, Katoh C, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. Cardiovasc Res. 2009;81:780-787. 査読有

2. Echizen T, Osanai T, Ashitate T, Yokoyama H, Shibutani S, Tanaka M, Tomita H, Koji Magota K, Okumura K. Upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor type 1 by endogenous prostacyclin inhibitor coupling factor 6

in the vascular endothelial cells: A role of acidosis-induced c-Src activation. Hypertens Res 2009;32:182-187. 査読有

3. Asitate T, Osanai T, Tanaka M, Magota K, Echizen T, Tomita T, Okumura K. Generation and characterization of coupling factor 6 overexpressing transgenic mice. Hirosaki Medical Journal 2009;60:18-26. 査読有

4. Kumagai A, Osanai T, Katoh C, Tanaka M, Tomita H, Morimoto T, Murakami R, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 downregulates platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via c-Src activation and acts as a proatherogenic molecule. Atherosclerosis. 2008;200:45-50. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Tomohiro Osanai, Makoto Tanaka, Takashi Echizen, Toshihiro Ashitate, Hirofumi Tomita, Ken Okumura. Overexpression of coupling factor 6 links hypertension to diabetes by c-Src-mediated signaling pathway in mice. Scientific Sessions 2008 (American Heart Association), New Orleans (USA), November 9-12, 2008.

2. 長内智宏、芦立俊宗、越前 崇、山田雅大、奥村謙：高血圧と糖尿病の病態形成における細胞内酸性化の意義：Coupling factor 6 過剰発現マウスを用いた解析、第 31 回日本高血圧学会総会、平成 20 年 10 月 9-11 日

3. Tomohiro Osanai, Makoto Tanaka, Hirofumi Tomita, Masahiro Yamada, Reiichi Murakami, Toshihiro Ashitate, Takashi Echizen, Chisato Katoh, Hiroaki Yokoyama, Ken Okumura. Coupling factor 6 activates c-src by intracellular acidosis and enhances calcium signaling in resistance arterioles vascular smooth muscle cells. Scientific Session 2007 (American Heart Association), Orland (USA), November 4-7, 2007.

4. 長内智宏、芦立俊宗、斎藤 新、奥村謙：新規の昇圧物質 coupling factor 6 の細胞内情報伝達機構とカルシウムシグナル、第 30 回日本高血圧学会総会、平成 19 年 10 月 25-27

日

〔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〕

特記すべきことなし。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長内智宏 (OSANAI TOMOHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00169278

(2) 研究分担者

奥村謙 (OKUMURA KEN)

弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20185549

(3) 連携研究者

なし