

内皮型一酸化窒素合成酵素制御における新規レジスチン様分子の役割の解明

東 幸仁

広島大学原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害医学研究センター

ゲノム障害病理研究分野 再生医科学部門

【研究の背景】

申請者は、これまで血管内皮細胞代謝や血管内皮機能と動脈硬化の関連を実験的、臨床的に明らかにしてきた(代表的論文 1,3-10)。マウス脂肪細胞より分泌される 3 種類のレジスチン様分子ファミリーの中で、RELM β のみがヒトに存在することが確認されており、動物実験モデルにおいてインスリン抵抗性に関連することも知られている。最近、申請者らは RELM β が、マクロファージにおいて飽和脂肪酸負荷や炎症刺激においてその発現が増加すること、脂肪細胞の泡沫細胞化、炎症惹起や血管増殖等によって動脈硬化を発症・進展させることを明らかにした(論文 2)。さらに、preliminary 研究において、健常マウスに RELM β を投与することで、あるいは RELM β 過剰発現マウスでは血管抵抗が上昇し、血管収縮性が強まることを確認した。RELM β は脂肪細胞やマクロファージにオートクライン、パラクラインに作用するだけでなく、血管内皮細胞に直接作用することが想定される。

【目 的】

新規レジスチン様分子(RELM β)が動脈硬化を惹起するメカニズムとして、動脈硬化の発症・維持・進展に重要な役割をはたしている血管内皮機能との関連は明らかでない。本研究では、RELM β が血管内皮細胞、特に eNOS/NO pathway に及ぼす影響に関して検討する。RELM β の役割を解明することで、動脈硬化発症の一端を明らかにする。合わせて、血中 RELM β 濃度測定が血管内皮機能のバイオマーカー、心血管イベントの予測因子となり得る可能性、さらに、RELM β に介入することで、新規血管内皮機能改善薬(抗動脈硬化薬)の創薬につながる可能性を検討する。

【方 法】

1) *in vitro* 細胞実験

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)およびマウス血管内皮由来細胞(EOMAC)を用いて、RELM β 投与による NO 産生量の測定、eNOS の発現およびリン酸化、eNOS 制御に関連する Akt、AMPK、ERK1/2、p38、JNK、PKC、HSP90 の発現ならびにリン酸化を Western blot 法を用いて検討する。さらに、mRNA を抽出して、eNOS 関連遺伝子の転写調節についても検討する。また、RELM β 投与による HUVEC ならびに EOMAC の細胞遊走能、増殖能や血管形成能を検討する。

2) *in vivo* マウス実験

RELM β 欠損マウスに脂肪食を負荷する群とコントロール群において、血圧、心拍数、心機能、尿中 NO 代謝産物排泄量等の測定を行う。RELM β 過剰発現マウスとコントロール群において、血圧、心拍数、心機能、尿中 NO 代謝産物排泄量等の測定を行う。その後、胸部大動脈をリング状に切り出し、血管内皮細胞無傷標本および血管内皮細胞除去標本を、混合ガスを通気した Krebs- Henseleit 液で満たした organ bath に懸垂し、その等尺性張力を測定する。内皮依存性血管弛緩物質アセチルコリン、内皮非依存性血管弛緩物質ソディウムニトロプルシド、eNOS 阻害物質 L-NMMA を投与して張力測定することで血管内皮機能を測定する。

3) RELM β の血中濃度測定

まず、ヒトに RELM β に対するウサギを用いたポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体を作製する。RELM β モノクローナル抗体を作製する。その後、測定用 ELISA キットを作製する。RELM β モノクローナル抗体にヒト血清を添加し、ウサギポリクローナル抗体を結合させるサンドイッチ法にて血中 RELM β 濃度を測定する。現在、申請者らは、flow-mediated vasodilation (FMD) を指標に血管内皮機能を測定した 5000 例余りのデータベース (FMD-Japan) を有している。また、同時に血液ストックを 2000 例あまり有している。研究プロトコルの倫理委員会承認後、ストック血清より測定する RELM β 濃度と FMD の相関を検討する。さらに、データベース中の 1000 例余りは FMD 測定後 3 年以上が経過しており、RELM β 濃度と心血管イベント発症との関連をレトロスペクティブに検討する。

【結 果】

1) *in vitro* 細胞実験

HUVEC および EOMAC を用いて、RELM β 投与による NO 産生量の測定、eNOS の発現およびリン酸化、eNOS 制御に関連する Akt、AMPK、ERK1/2、p38、JNK、PKC、HSP90 の発現ならびにリン酸化を Western blot 法を用いて検討した。RELM β 投与により、NO 産生量の低下、eNOS の発現およびリン酸化の低下、AMPK の発現ならびにリン酸化を認めた。また、RELM β 投与により、HUVEC ならびに EOMAC の細胞遊走能、増殖能や血管形成能の低下を認めた。

2) *in vivo* マウス実験

RELM β 欠損マウスに脂肪食を負荷することにより、コントロール群に比し、尿中 NO 代謝産物排泄量の低下を認めた。RELM β 欠損マウスにおいて、ソディウムニトロプルによる血管反応性は同等であるが、アセチルコリンによる血管反応性が増強していた。

3) RELM β の血中濃度測定

まず、ヒトに RELM β に対するウサギを用いたポリクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体を作製し、RELM β モノクローナル抗体を作製した。その後、測定用 ELISA キットを作製の準備を行った。

【考 察】

本研究は、新規分泌蛋白である RELM β の動脈硬化における役割を、血管代謝(血管内皮機能)の側面から、*in vitro*、*in vivo*、さらに臨床よりアプローチして明らかにするだけでなく、創薬を念頭に置いたトランスレーショナル研究である。RELM β は eNOS ならびにその関連遺伝子、転写因子の発現等を低下させることにより、血管内皮機能障害を惹起する可能性が示唆された。今後、ヒトにおける血清 RELM β 濃度の測定へのアプローチならびに RELM β 濃度と血管内皮機能の関連や予後因子としての役割を検討することで、RELM β の動脈硬化への関連が明らかになることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

血管内皮機能を改善することは、将来的な心血管イベントの発症予防が期待される。これまでも、薬物療法、生活習慣の改善や補充療法などの適切なインターベンションにより内皮機能が改善可能であることが確認されている。本研究により、血管内皮機能障害を惹起する新たなメカニズムとして RELM β の役割を解明することで、動脈硬化発症の一端を明らかにできるだけでなく、血中 RELM β 濃度測定が血管内皮機能のバイオマーカー、心血管イベントの予測因子となり得る可能性が期待される。さらに、RELM β に介入することで、新規血管内皮機能改善薬(抗動脈硬化薬)の創薬につながる可能性がある。

【参考・引用文献】

1. Matsumoto T, Oki K, Kajikawa M, Nakashima A, Maruhashi T, Iwamoto Y, Iwamono A, Oda N, Hidaka T, Kihara Y, Kohno N, Chayama K, Goto C, Aibara Y, Noma K, Liao JK, Higashi Y. Impact of aldosterone-producing adenoma on endothelial function and Rho-associated kinase activity in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. 65: 841-848; 2015.
2. Kushiyaama A, Sakoda H, Oue N, Okubo M, Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiyaama S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K, Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Katagiri H, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Asano T. Resistin-like molecule b in foam cells is involved in atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33: 1986-1993; 2013.
3. Maruhashi T, Soga J, Idei N, Fujimura N, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Tomiyama H, Takase B, Yamashina A, Higashi Y. Hyperbilirubinemia, augmentation of endothelial function and decrease in oxidative stress in Gilbert syndrome. *Circulation*. 126: 598-603; 2012.
4. Fujimura N, Jitsuiki D, Goto C, Soga J, Hidaka T, Umemura T, Nishioka K, Oshima T, Chayama K, Higashi Y. Geranylgeranylacetone, Hsp90/AMPK/eNOS/NO pathway, and endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32: 153-160; 2012
5. Idei N, Nishioka K, Soga J, Hidaka T, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Maruhashi T, Mikami S, Teragawa H, Kihara Y, Noma K, Chayama K, Higashi Y. Vascular function and circulating progenitor cell in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) and atherosclerosis obliterans. *Hypertension*. 57: 70-78; 2011
6. Noma K, Goto C, Nishioka K, Jitsuiki D, Umemura T, Ueda K, Kimura M, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Liao JK, Higashi Y. Roles of ROCK and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness. *J Am Coll Cardiol*. 49: 698-705; 2007.
7. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Goto C, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation*. 109: 1215-1218; 2004
8. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Goto C, Matsuura H, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M. Low body mass index is a risk factor for impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. *J Am Coll Cardiol*. 42: 256-263; 2003.
9. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 346: 1954-1962; 2002.
10. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Sasaki N, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*. 100: 1194-1202; 1999.