

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

動脈硬化機構の解明と予防－EDHFの作用機序に関する研究－

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堀 正二

平成13（2001）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
動脈硬化機構の解明と予防 . . . . .	1
－EDHF の作用機序に関する研究－	
堀 正二	
II. 分担研究報告	
1. 動脈硬化機構の解明と予防 . . . . .	2
－EDHF の作用機序に関する研究－	
北風政史	
2. 動脈硬化機構の解明と予防 . . . . .	3
－EDHF の作用機序に関する研究－	
葛谷恒彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	4
IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	5

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

動脈硬化機構の解明と予防－EDHFの作用機序に関する研究－

主任研究者 堀 正 二 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学教授

**研究要旨** 血管内皮由来過分極因子(EDHF)の候補である Epoxyeicosatrienoic acid(EET)は血管内皮由来細胞において tissue plasminogen activator(t-PA)産生を増加した。そのメカニズムに Gs 蛋白の活性化による cAMP の産生と回転写因子 CRE の活性化が関与していることを明らかにした。EDHF・EET は t-PA 産生を介し血液線溶系を亢進することから、抗動脈硬化作用の新たなメカニズムが解明された。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名  
北風政史・大阪大学(助手)  
葛谷恒彦・大阪大学(助教授)

**A. 研究目的**

内皮由来過分極因子(EDHF)は未同定であるが、アラキドン酸から cytochrome P450 epoxygenase(EOX)により産生される epoxyeicosatrienoic acid(EET)が EDHF の候補であると考えられている。ヒト血管内皮の EOX は未同定で、EET の血管弛緩以外の作用も不明であったが、最近、EET が核内転写因子 NF- $\kappa$ B を不活性化することにより血管内皮活性化を抑制することが報告され、EET・EDHF は血管弛緩作用以外に、抗炎症作用を有することが明らかになった。そこで本研究では特に血液線溶活性に対する EOX・EET の作用を検討し、EOX・EET・EDHF の血管弛緩、血管内皮活性化抑制以外の新たな動脈硬化作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

EET の血液線溶系に対する作用を検討するために、1) ヒト血管内皮細胞における tissue Plasminogen activator (TPA), plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 活性を ELISA 法にて測定し、EET の作用を検討した。2) TPA の上流域には cAMP 応答領域である CRE が存在し、cAMP による TPA の遺伝子発現が報告されているので、EET による cAMP 産生、CRE-Luc プロモーター活性を測定した。3) 血管平滑筋において、EET は G 蛋白である Gs を活性化することが示唆されており、GTP binding assay と GTPase assay にて血管内皮細胞における EET の Gs 蛋白の活性化を検討した。4) protein kinase A 阻害剤投与で、EET による CRE-Luc プロモーター活性増加が抑制するかどうかを検討し、EET、Gs 蛋白活性化、cAMP 増加、PKA 活性化、CRE 活性化という連関を検証した。

**C. 研究結果**

EET の血液線溶系に対する作用を検討した結果、1) EET はヒト血管内皮細胞において tissue Plasminogen activator(t-PA)活性を増加させた。2) t-PA の上流域には cAMP 応答領域である CRE が存在し、cAMP による t-PA の遺伝子発現が報告されているが、EET は cAMP 産生、CRE-Luc プロモーター活性を増加した。3) GTP binding assay と GTPase assay にて血管内皮細胞において EET は Gs 蛋白を活性化した。4) protein kinase A 阻害剤投与で、EET による CRE-Luc プロモーター活性増加が抑制した。

**D. 考察**

本研究で EDHF、EET の血液線溶系への作用を明らかにし、既に報告した抗炎症効果以外の新しい血管内皮保護作用のメカニズムを解明したことは、内皮機能が低下している病態における動脈硬化に対する新規の内因性防御因子の発見と虚血性心疾患の新しい治療薬の開発につながることを期待できる。

**E. 結論**

EET、Gs 蛋白活性化、cAMP 増加、PKA 活性化、CRE 活性化という連関を証明した。以上より、EET による t-PA 活性化のメカニズムが明らかになった。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第65回日本循環器学会総会

Japanese Circulation Journal Vol. 65, suppl 1-A:342 Epoxyeicosatrienoic Acids Increase the Gene Transcription of Tissue Plasminogen Activator

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**  
なし

動脈硬化機構の解明と予防－EDHFの作用機序に関する研究－

分担研究者 北風 政史 大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学助手

**研究要旨** 血管内皮由来過分極因子(EDHF)の候補である Epoxyeicosatrienoic acid(EET)は血管内皮由来細胞において tissue plasminogen activator(t-PA)産生を増加した。そのメカニズムにGs蛋白の活性化によるcAMPの産生と回転写因子CREの活性化が関与していることを明らかにした。EDHF・EETはt-PA産生を介し血液線溶系を亢進することから、抗動脈硬化作用の新たなメカニズムが解明された。

**A. 研究目的**

内皮由来過分極因子(EDHF)は未同定であるが、アラキドン酸から cytochrome P450 epoxygenase(EOX)により産生される epoxyeicosatrienoic acid(EET)がEDHFの候補であると考えられている。ヒト血管内皮のEOXは未同定で、EETの血管弛緩以外の作用も不明であったが、最近、EETが核内転写因子NF- $\kappa$ Bを不活性化することにより血管内皮活性化を抑制することが報告され、EET・EDHFは血管弛緩作用以外に、抗炎症作用を有することが明らかになった。そこで本研究では特に血液線溶活性に対するEOX・EETの作用を検討し、EOX・EET・EDHFの血管弛緩、血管内皮活性化抑制以外の新たな動脈硬化作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

EETの血液線溶系に対する作用を検討するために、1)ヒト血管内皮細胞における tissue Plasminogen activator (TPA), plasminogen activator inhibitor (PAI-I)活性をELISA法にて測定し、EETの作用を検討した。2)TPAの上流域にはcAMP応答領域であるCREが存在し、cAMPによるTPAの遺伝子発現が報告されているので、EETによるcAMP産生、CRE-Lucプロモーター活性を測定した。3)血管平滑筋において、EETはG蛋白であるGsを活性化することが示唆されており、GTP binding assayとGTPase assayにて血管内皮細胞におけるEETのGs蛋白の活性化を検討した。4)protein kinase A阻害剤投与で、EETによるCRE-Lucプロモーター活性増加が抑制するかどうかを検討し、EET、Gs蛋白活性化、cAMP増加、PKA活性化、CRE活性化という連関を検証した。

**C. 研究結果**

EETの血液線溶系に対する作用を検討した結果、1)EETはヒト血管内皮細胞において tissue Plasminogen activator(t-PA)活性を増加させた。2)t-PAの上流域にはcAMP応答領域であるCREが存在し、cAMPによるt-PAの遺伝子発現が報告されているが、EETはcAMP産生、CRE-Lucプロモーター活性を増加した。3)GTP binding assayとGTPase assayにて血管内皮細胞においてEETはGs蛋白を活性化した。4)protein kinase A阻害剤投与で、EETによるCRE-Lucプロモーター活性増加が抑制した。

**D. 考察**

本研究でEDHF、EETの血液線溶系への作用を明らかにし、既に報告した抗炎症効果以外の新しい血管内皮保護作用のメカニズムを解明したことは、内皮機能が低下している病態における動脈硬化に対する新規の内因性防御因子の発見と虚血性心疾患の新しい治療薬の開発につながることを期待できる。

**E. 結論**

EET、Gs蛋白活性化、cAMP増加、PKA活性化、CRE活性化という連関を証明した。以上より、EETによるt-PA活性化のメカニズムが明らかになった。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第65回日本循環器学会総会

Japanese Circulation Journal Vol. 65, suppl 1-A:342 Epoxyeicosatrienoic Acids Increase the Gene Transcription of Tissue Plasminogen Activator

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

なし

動脈硬化機構の解明と予防－EDHFの作用機序に関する研究－

分担研究者 葛谷 恒彦 大阪大学大学院医学系研究科修士病理病態学助教授

**研究要旨** 血管内皮由来過分極因子(EDHF)の候補である Epoxyeicosatrienoic acid(EET)は血管内皮由来細胞において tissue plasminogen activator(t-PA)産生を増加した。そのメカニズムにGs蛋白の活性化によるcAMPの産生と回転写因子CREの活性化が関与していることを明らかにした。EDHF・EETはt-PA産生を介し血液線溶系を亢進することから、抗動脈硬化作用の新たなメカニズムが解明された。

**A. 研究目的**

内皮由来過分極因子(EDHF)は未同定であるが、アラキドン酸から cytochrome P450 epoxygenase(EOX)により産生される epoxyeicosatrienoic acid(EET)がEDHFの候補であると考えられている。ヒト血管内皮のEOXは未同定で、EETの血管弛緩以外の作用も不明であったが、最近、EETが核内転写因子NF- $\kappa$ Bを不活性化することにより血管内皮活性化を抑制することが報告され、EET・EDHFは血管弛緩作用以外に、抗炎症作用を有することが明らかになった。そこで本研究では特に血液線溶活性に対するEOX・EETの作用を検討し、EOX・EET・EDHFの血管弛緩、血管内皮活性化抑制以外の新たな動脈硬化作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

EETの血液線溶系に対する作用を検討するために、1)ヒト血管内皮細胞における tissue Plasminogen activator (TPA), plasminogen activator inhibitor (PAI-1)活性をELISA法にて測定し、EETの作用を検討した。2)TPAの上流域にはcAMP応答領域であるCREが存在し、cAMPによるTPAの遺伝子発現が報告されているので、EETによるcAMP産生、CRE-Lucプロモーター活性を測定した。3)血管平滑筋において、EETはG蛋白であるGsを活性化することが示唆されており、GTP binding assayとGTPase assayにて血管内皮細胞におけるEETのGs蛋白の活性化を検討した。4)protein kinase A阻害剤投与で、EETによるCRE-Lucプロモーター活性増加が抑制するかどうかを検討し、EET、Gs蛋白活性化、cAMP増加、PKA活性化、CRE活性化という連関を検証した。

**C. 研究結果**

EETの血液線溶系に対する作用を検討した結果、1)EETはヒト血管内皮細胞において tissue Plasminogen activator(t-PA)活性を増加させた。2)t-PAの上流域にはcAMP応答領域であるCREが存在し、cAMPによるt-PAの遺伝子発現が報告されているが、EETはcAMP産生、CRE-Lucプロモーター活性を増加した。3)GTP binding assayとGTPase assayにて血管内皮細胞においてEETはGs蛋白を活性化した。4)protein kinase A阻害剤投与で、EETによるCRE-Lucプロモーター活性増加が抑制した。

**D. 考察**

本研究でEDHF、EETの血液線溶系への作用を明らかにし、既に報告した抗炎症効果以外の新しい血管内皮保護作用のメカニズムを解明したことは、内皮機能が低下している病態における動脈硬化に対する新規の内因性防御因子の発見と虚血性心疾患の新しい治療薬の開発につながることを期待できる。

**E. 結論**

EET、Gs蛋白活性化、cAMP増加、PKA活性化、CRE活性化という連関を証明した。以上より、EETによるt-PA活性化のメカニズムが明らかになった。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第65回日本循環器学会総会

Japanese Circulation Journal Vol. 65, suppl 1-A:342 Epoxyeicosatrienoic Acids Increase the Gene Transcription of Tissue Plasminogen Activator

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masafumi Kitakaze, Koichi Node Hiroshi Asanuma Seiji Takashima, Yasuhiko Sakata, Masanori Asakura, Shoji Sanada, Yoshiro Shinozaki, Hidezo Mori, Tsunehiko Kuzuya, Masatsugu Hori	Protein Tyrosine Kinase Is Not Involved in the Infarct Size-Limiting Effect of Ischemic Preconditioning in Canine Hearts	Circ Res.	87	303-308	2000
Koichi Node Masafumi Kitakaze Fumiki Yoshihara Tatsuya Sasaki Tsunehiko Kuzuya Masatsugu Hori	Increased Cardiac Levels of Nitric Oxide in Patients With Chronic Heart Failure	The American Journal of Cardiology	86	474-477	2000
Masafumi Kitakaze, Hiroshi Asanuma Seiji Takashima, Tetsuo Minamino Yasunori Ueda Yasuhiko Sakata, Masanori Asakura, Shoji Sanada, Tsunehiko Kuzuya, Masatsugu Hori	Nipidipine-Induced Coronary Vasodilation in Ischemic Hearts Is Attributable to Bradykinin- and NO-Dependent Mechanisms in Dogs	Circulation	101	311-317	2000
Tetsuo Minamino Masafumi Kitakaze, Yasunori Ueda Hiroshi Asanuma Philip J. Papst Tsunehiko Kuzuya, Naohiro Terada Masatsugu Hori	Chronic Treatment with FK506 Increases p70 S6 Kinase Activity Associated with Reduced Nitric Oxide Synthase Activity in Rabbit Hearts	Cardiovascular Drugs and Therapy	14	329-336	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masafumi Kitakaze Hiroshi Asanuma Seiji Takashima Tetsuo Minamino Yasunori Ueda Yasuhiko Sakata Masanori Asakura Shoji Sanada Tsunehiko Kuzuya Masatsugu Hori	Nipidipine-Induced Coronary Vasodilation in Ischemic Hearts Is Attributable to Bradykinin- and NO-Dependent Mechanisms in Dogs	Circulation	101	311-317	2000
Yasushi Sakata Tohru Masuyama Kazuhiro Yamamoto Nagahiro Nishikawa Hideyuki Yamamoto Hiroya Kondo Keiko Ono Kinya Otsu Tsunehiko Kuzuya Takeshi Miwa Hiroshi Takeda Eishichi Miyamoto Masatsugu Hori	Calcineurin Inhibitor Attenuates Left Ventricular Hypertrophy, Leading to Prevention of Heart Failure in Hypertensive Rats	Circulation	102	2269-2275	2000
Nobushige Yamashita Shiro Hoshida Kinya Otsu Naoyuki Taniguchi Tsunehiko Kuzuya Masatsugu Hori	Involvement of Cytokines in the Mechanism of Whole -Body Hyperthermia-Induced Cardioprotection	Circulation	102	452-457	2000
Toshihiko Toyofuku Zhang Hong Tsunehiko Kuzuya Michihiko Tada Masatsugu Hori	Wnt/Frizzled-2 Signaling Induces Aggregation and Adhesion among Cardiac Myocytes by Increased Cadherin- $\beta$ -Catenin Complex	The Journal of Cell Biology	150	225-241	2000
Shiro Hoshida Nobushige Yamashita Tsunehiko Kuzuya Masatsugu Hori	Differential effects of Long-term renin-angiotensin system Blockade on limitation of Infarct size in cholesterol-fed rabbits	Atherosclerosis	149	287-294	2000

20000236

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。