

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に基づく脳血管性痴呆の病因解明と治療法の
開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 祖父江憲治

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に 基づく脳血管性痴呆の病因解明と治療法の開発 に関する研究 祖父江憲治	1
---	---

II. 分担研究報告

平滑筋細胞分子マーカーを用いたヒト脳血管硬 化病変と痴呆病状の解析および脳血管硬化進行 阻止を目的とした遺伝子治療の開発に関する研 究 荻原俊男	5
--	---

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
---------------------	---

IV. 研究成果の刊行物・別刷	9
-----------------	---

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化機転に基づく脳血管性痴呆の病因解明と治療法の開発に関する研究

主任研究者 祖父江憲治 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 脳血管性痴呆の発症原因を血管閉塞および梗塞性要因から解明し、予防・発症および進行阻止に向けた治療法の開発を目的とする。血管硬化誘導因子とそのレセプターの検索、脳血管性痴呆モデル動物の作製と阻害薬の開発を主目的として研究を行った。この結果、分化型血管平滑筋細胞培養系を用いてヒト血清、酸化LDL、および動脈硬化病巣中に存在する不飽和リゾホスファチジン酸(LPA)が強力かつ特異的脱分化能を有することと、不飽和LPAによる血管平滑筋細胞脱分化の細胞内シグナル伝達系を明らかにし、不飽和LPAによる血管内膜肥厚モデルラットの作製に成功した。さらに、脳血管硬化モデルラットの作製中である。本研究により、不飽和LPAが脳血管性痴呆の有力な発症因子であることが明らかになったことにより、不飽和LPA特異的レセプターの検索および阻害薬の開発に向けた研究を進行中である。シグナル伝達系異常による脳血管性痴呆モデルマウスの作製についても、F2レベルでの作製が終了しており、解析を行っている。本研究遂行中に見出した血管内膜肥厚増悪因子については、EGF様作用を示すことを明らかにしており、検索を行っている。脳血管性痴呆の最終病態である神経細胞傷害と細胞死の分子機構については、シナプス特異的蛋白質(PSD-Zip45)のシナプス局在化機構とグルタミン酸刺激に伴う電位差依存性Ca²⁺チャネルの活性化によるCa²⁺濃度依存性の局在変化を見出した。血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和LPA予備蓄積能の相関については、本学医学倫理委員会の承認を得次第開始予定である。

分担研究者・荻原俊男 大阪大学大学院
医学系研究科教授

止に向けた治療法の開発を目的としている。

A.研究目的

我が国における全痴呆患者数は、現在80万人を越えている。このままの状態が続けば、2020年には200万人に達すると予想される。中でも全痴呆患者中、脳血管性痴呆は半数以上を占めており、超高齢化時代への突入に伴い本疾患への対策は深刻かつ重大な課題となっている。本研究は、脳血管性痴呆の主因である大梗塞および多発性中・小梗塞、さらにはビンスワングー型痴呆などの発症原因を血管病変(大・中・小細動脈硬化および毛細血管閉塞と随伴する血小板活性化による血栓形成)の立場から究明し、発症前診断・予防さらに発症・進行阻

B.研究方法

○血管内膜肥厚因子(血管平滑筋細胞脱分化因子)の検索

分化型血管平滑筋細胞培養系を用いて、血管内膜肥厚因子を分離・精製した。分化型血管平滑筋細胞特有の形態・収縮能・血管平滑筋細胞特異的分子マーカーの発現を血管平滑筋細胞形質の指標とした。ヒト血清より血管内膜肥厚因子の分離・精製は、分画脂質抽出・二次元クロマトグラフィーにより行った。

飽和・不飽和各種LPAは、ヒト血清、酸化LDL(moxLDL)・動脈硬化病巣の脂質抽出分画を二次元クロマトグラフィーによりLPA分画を分離後、メチルエステル化してガスクロマトグラフ

イーにより分離・定量化を行った。

○細胞内シグナル伝達系の解析

細胞内シグナル伝達系は、各種 MAPK 系、PI3 キナーゼ/PKB(Akt)系などについて、酵素活性を測定した。

○血管内膜肥厚モデルラットの作製

短時間、不飽和 LPA 処理により血管内膜肥厚ラットの作製を行った。

○血管内膜肥厚増悪因子の特性と検索

培養血管平滑筋細胞に活性型 MEK1 と MKK6 を感染あるいは不飽和 LPA 刺激後、培養液をヘパリンアフィニティカラム・DEAE セファセルカラムなどにより分離し、分化型血管平滑筋細胞を用いて脱分化能・細胞内シグナル伝達系を解析した。

○シナプス機能の解析

培養海馬神経細胞に GFP:PSD-Zip45 プラスミドを感染させ、グルタミン酸（および各種グルタミン酸レセプターアゴニスト）刺激条件下で、発現した GFP:PSD-Zip45 のシナプスへのターゲティングを photobleach 法による time-lapse 測定により解析を行った。

C.研究成果

本研究は脳血管性痴呆の発症原因を、血管平滑筋細胞形質転換（脱分化後の細胞増殖・運動能獲得）と血小板活性化機転による血管閉塞性機転から解析し、脳血管性痴呆の発症および治療法の開発を目的としたものである。本年度は、3年計画の初年度に当たる。以下、研究成果について詳述する。

1) 血管内膜肥厚因子と脳血管内膜肥厚モデル動物

分化型血管平滑筋細胞培養系を用いて、ヒト血清に存在する血管内膜肥厚因子（脱分化因子）の分離・精製を行い、不飽和 LPA が主要かつ強力な因子であること、また血管平滑筋細胞のレ

セプターは不飽和 LPA 特異的であること（現在、この新規 LPA レセプターはクローニング中）を見出した。さらに、不飽和 LPA による脱分化は、ERK と p38MAPK 系の協調的活性化によることを明らかにした。

次いで、酸化 LDL および動脈硬化病巣中に、各々 1-2.4 μ M および 2 μ M の不飽和 LPA が存在することを明らかにした。また、LPA 群を無傷血管内に投与し、不飽和 LPA 特異的血管内膜肥厚形成による血管内膜肥厚モデルラットの作製に成功した。このモデルラット解析の結果、不飽和 LPA による血管内膜肥厚は ERK と p38MAPK の協調的活性化により誘導されること、血管内膜肥厚の主体は血管中膜平滑筋細胞に由来する脱分化細胞より構成されることを明らかにした。

2) 細胞内シグナル伝達系異常による脳血管性痴呆モデル動物

われわれはこれまでに血管平滑細胞（分化・脱分化）形質は、細胞内シグナル伝達系である PI3 キナーゼ/プロテインキナーゼ B(Akt)系と2つの MAP キナーゼ（ERK および p38MAPK）系の力のバランスにより決定されることを提唱してきた。本研究において、不飽和 LPA による血管平滑筋細胞脱分化誘導も ERK と p38MAPK の協調的活性化によることを明らかにした。そこで、ERK と p38MAPK の協調的活性化を脳血管のみで特異的にコンディショニングして発現させる脳血管性痴呆モデルマウスの作製を行っている。血管特異的発現 tTA については、F2 レベルで4系統の作製を終了した。活性化 ERK と p38MAPK の同時発現系も、4系統の作製を終了している。今後、各系統の mating と薬剤コンディショニング(doxycyclin 処理)により、脳血管性痴呆モデルマウスの解析を行う予定である。

3) 血管内膜肥厚増悪因子

本研究において新たに、不飽和 LPA により ERK と p38MAPK の協調的活性化で血管平滑筋

細胞の脱分化が起こり、この脱分化細胞は新たに蛋白質性因子を放出し、周辺の正常な血管平滑筋細胞の脱分化カスケードを増大することを見出した（血管内膜肥厚増悪因子）。この因子を精製し特性を検討した結果、EGF レセプターを介することを見い出している。現在、この血管内膜肥厚増悪因子の検索を進行中である。

4) シナプス機能と脳血管性痴呆

脳血管性痴呆における最終病態は、神経細胞の虚血・酸化ストレス・グルタミン酸過剰などによる傷害と細胞死である。そこで、本研究はシナプス機能を指標とし、各種刺激による神経細胞障害性を検討した。本年度は、主任研究者らが発見したシナプス特異的蛋白質 (PSD-Zip45) のシナプス局在化について検討を行った。PSD-Zip45 のシナプス特異的局在化は、グルタミン酸刺激に伴い電位差依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入により変化することを見出した。現在、一群のシナプス特異的蛋白質の機能と、上記各種ストレスによる神経細胞傷害性・神経細胞死との関連を解析中である。

D. 考察

以上の結果は、血小板活性化により形成・放出される不飽和 LPA と血管内に取り込まれた LDL の酸化ストレスにより生じた不飽和 LPA が、血管中膜平滑筋細胞の脱分化・増殖と運動能の亢進により血管内膜肥厚を形成すること、また不飽和 LPA による血管平滑筋細胞脱分化は ERK と p38MPAK により誘導されることを解明したものである。本研究で作製に成功した不飽和 LPA 特異的血管内膜肥厚モデルラットは、不飽和 LPA が血管内膜肥厚の病因因子であることを証明した最初の例である。今後、前記発症因子群と発症病理との対応をヒト病理および剖検脳で検討するとともに、脳血管性痴呆における血管平滑筋細胞形質転換に起因する脳血管梗塞

性機転の解明を目指す。また、不飽和 LPA 予備蓄積能についても、脳血管性痴呆をポストゲノムの立場から追求し、発症前診断への可能を検討している。これらの研究により脳血管性痴呆の主要な病因が解明されるのみならず、発症の分子機構の解明が期待される。また、病因因子の作用機構解明により、脳血管性痴呆の発症前診断・予防および発症・進行阻止に向けた治療法の開発に大きく寄与するものと期待している。

E. 結論

生きとし生ける人生をより充実したものにする事こそ QOL の本質であり、本疾患の発症ならび進行阻止は、この点でも重大な課題である。本研究における脳血管性痴呆発症因子の検索と血管平滑筋細胞形質転換に起因する脳血管梗塞モデル動物作製は、脳血管性痴呆の病態解析に有力な手段と情報を提供するものである。また、本研究で見い出した不飽和 LPA 特異的レセプターに関連する知見は、阻害剤開発に進展中であるが、これにより脳血管性痴呆発症予防と治療に発展することが期待される。また、不飽和 LPA 予備蓄積能についても検討中で、脳血管性痴呆のポストゲノム発症前診断が可能になると期待している。このように、本研究は 20 年後の超高齢化時代に向け、脳血管性痴呆の発症前診断・予防さらに治療という新戦略で対応するもので、我が国の老人保健・医療・福祉向上への有用性は大きい。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○ Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H. & Sobue K.

Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circulation Research*, 2001 (in press)

○ Hayashi K, Nishida W, Yoshida K, Ogawa A, Aoki J, Arai H. & Sobue K. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acids. *J. Clinical Investigation*, 2001 (in press)

○ Okabe S, Urushido T, Okado H, & Sobue K. Activity-dependent bidirectional translocation of a postsynaptic density protein PSD-Zip45 (homer1c) in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 2001 (in press)

○ Nakamura M, Nishida W, Mori S, Hiwada K, Hayashi K, & Sobue K. Transcriptional activation of beta-tropomyosin mediated by serum response factor and a novel Barx homologue, Barx1b, in smooth muscle cell. *J. Biol. Chem.* 2001 (in press)

○ Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, Morimoto S, Oghiharta T, & Sobue K. EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 373-377, 2001

2.学会発表

3rd Symposium of COE (Osaka)

○ Signal transduction and gene regulation determining the smooth muscle cell phenotype (Kenji Sobue)

第 32 回日本動脈硬化学会シンポジウム (千葉県)

○血管平滑筋細胞 (分化・脱分化型) 形質を決定するシグナル伝達と遺伝子発現機構 (祖父江憲治)

第 53 回日本細胞生物学会大会 2000 年 (福岡)

○血管平滑筋細胞における $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の転写調節機構 (西田互, 中村真子, 高橋正典, 林謙一郎, 大川恭行, 祖父江憲治)

○平滑筋細胞における Barx1b と Serum response factor による β -tropomyosin 遺伝子の協調的転写

調節機構 (中村真子, 西田互, 林謙一郎, 大川恭行, 高橋正典, 祖父江憲治)

○ヒト血清に存在する平滑筋細胞脱分化誘導因子の同定 (林謙一郎, 高橋正典, 大川恭行, 西田互, 祖父江憲治)

第 73 回日本生化学会大会 2000 年 (横浜)

○ヒト血清中の平滑筋細胞脱分化誘導因子の同定 (林謙一郎, 高橋正典, 大川恭行, 西田互, 祖父江憲治)

○ mGluR の集積機構を利用した 2 次元結晶化への試み (廣明洋子, 西川幸希, 入江克雅, 土井知子, 光岡薫, 立花太郎, 祖父江憲治, 藤吉好則)

○ホメオドメイン蛋白質 Barx1b と serum response factor (SRF) による β -tropomyosin 遺伝子の平滑筋細胞特異的転写調節機構の解析 (中村真子, 西田互, 大川恭行, 高橋正典, 林謙一郎, 祖父江憲治)

○ Nkx3.2, SRF および GATA-6 による $\alpha 1$ インテグリン遺伝子の血管平滑筋細胞特異的転写調節機構 (西田互, 中村真子, 高橋正典, 大川恭行, 林謙一郎, 祖父江憲治)

第 78 回日本生理学会大会シンポジウム 2001 年 (京都)

○シナプス後肥厚部の分子機構と機能解析 (祖父江憲治)

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

分化型血管平滑筋細胞培養系とこの培養系を用いた薬剤スクリーニングシステム (出願中)
不飽和リゾホスファチジン酸による血管内膜肥厚病態モデルラットの作製と薬剤評価システム (出願中)

2.実用新案登録

特記なし

3.その他

特記なし

平滑筋細胞分子マーカーを用いたヒト脳血管硬化病変と痴呆病状の解析および脳血管硬化進行阻止を目的とした遺伝子治療の開発に関する研究

分担研究者 荻原俊男 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 脳血管性痴呆の発症原因を血管閉塞と梗塞性要因から解明し、予防・発症および進行阻止に向けた治療法の開発を目的とする。不飽和リゾホスファチジン酸 (LPA) による血管内膜肥厚と脳血管性痴呆発疾病態との関連解明を目指し、本年度は不飽和 LPA 予備蓄積能の検討を開始した。この結果、健常者 LDL の酸化により形成される不飽和 LPA (不飽和 LPA 予備蓄積能) には、高値群と低値群の二群に大別されることが判明した。この結果は、血管硬化および脳血管性痴呆発症の発症前診断を可能性の示唆するものである。そこで、血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能の相関について、本学医学倫理委員会の承認を得次第検討を開始する予定である。また、血管内膜肥厚増悪因子について研究を行い、分離・精製を終了し EGF 様作用を示すことを明らかにしており、現在最終的同定を進めている。

A.研究目的

脳血管性痴呆の主因である大梗塞および多発性中・小梗塞、さらにはビンスワンガー型痴呆などの血管病変（大・中・小細動脈硬化および毛細血管閉塞と随伴する血管梗塞）を血管平滑筋細胞形質転換と血小板活性化の立場から究明し、発症前診断・予防さらに発症・進行阻止に向けた治療法の開発を、主任研究者との共同研究により解明することを目的としている。

B.研究方法

○不飽和 LPA の定量

不飽和 LPA の定量は、ヒト血清、酸化 LDL・動脈硬化病巣の極性脂質抽出分画から二次元クロマトグラフィーにより LPA 分画を分離し、メチルエステル化後ガスクロマトグラフィーで分離・定量した。

○細胞内シグナル伝達系の解析

細胞内シグナル伝達系は、各種 MAPK 系、PI3 キナーゼ PKB (Akt) 系などについて、酵素活性を測定した。

○血管内膜肥厚増悪因子の特性と検索

培養血管平滑筋細胞に活性型 MEK1 と MKK6 を感染あるいは LPA 処理後、培養液をヘパリンアフィニティカラム・DAEA セファセルカラムなどにより分離し、分化型血管平滑筋細胞を用いて、脱分化能・細胞内シグナル伝達系を解析した。

C.研究成果

本研究は脳血管性痴呆の発症原因を、血管平滑筋細胞形質転換（脱分化後の細胞増殖・運動能の獲得）と血小板活性化機転による血管閉塞性機転から解析し、脳血管性痴呆の発症および治療法の開発を目的としたものである。本年度は、3年計画の初年度に当たる。

1)血管硬化および脳血管性痴呆と不飽和 LPA 予備蓄積能

不飽和 LPA による血管内膜肥厚と脳血管性痴呆発症との関連解明を目指して、健常者 LDL の酸化 (oxLDL) により形成される不飽和 LPA 形成能 (不飽和 LPA 予備蓄積能) について主任研究者と共同して研究を行った。この結果、健常者の不飽和 LPA 予備蓄積能には、高値群を低値

群の二群に大別されることを見い出した。引き続き、血管硬化および脳血管性痴呆患者での不飽和 LPA 予備蓄積能を検討すべく、本学医学倫理委員会に申請中である。承認を得次第、検討を開始する予定である。

2) 血管内膜肥厚増悪因子

本研究において主任研究者が新たに見い出した血管内膜肥厚増悪因子（脱分化細胞から放出される蛋白質性因子で、同辺の正常な血管平滑筋細胞の脱分化カスケードを増大する）の、特性解析と分離・同定を検討した。ヘパリンアフィニティカラムと DEAE セファセルカラムで分離し特性を検討した所、EGF 様の作用（EGF 自体ではない）を有し、EGF レセプターを介して作用発現することを見い出した。現在、この血管内膜肥厚増悪因子の最終的同定を行っている。

D. 考察

本研究で健常者の不飽和 LPA 予備蓄積能には高値群と低値群の二群存在することから、健常者の長期フォローアップを行うとともに血管硬化および脳血管性痴呆患者での不飽和 LPA 予備蓄積能についても測定を行い、不飽和 LPA 予備蓄積能と発症との相関を検討する予定である。この研究により、血管硬化および脳血管性痴呆の発症前診断が可能になれば、臨床上意義が大きいものと期待している。

血管内膜肥厚増悪因子も脳血管硬化の進展に重要な因子であり、現在、最終的同定を急いでいる。これについても臨床症例との対応を検討する予定である。

平滑筋細胞分化マーカーを用いたヒト脳血管硬化病変の解析に向けて、免疫組織化学・in situ hybridization・immunoblotting・western blotting 系のヒト標品での検討を開始している。

分担研究者本来の研究領域である血管閉塞疾患の遺伝子治療法については、HGF による遺伝

子治療、リボザイムオリゴヌクレオチド法などの開発を行ってきた。主任研究者との共同研究により不飽和 LPA レセプターと細胞内シグナル伝達系に対する遺伝子治療さらに薬剤による治療法などを開発する予定である。

E. 結論

不飽和 LPA 特異的血管内膜肥厚に関する知見は、現在、阻害剤開発に進展中であるが、これにより脳血管性痴呆発症阻止が大いに期待される。また、不飽和 LPA 予備蓄積能についても現在検討中で、脳血管性痴呆のポストゲノム発症前診断が可能になるものと期待している。これら研究により、脳血管性痴呆の病因解明のみならず、発症前診断・予防および発症・進行阻止に向けた治療法の開発へと発展するものと期待している。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○ Hata S, Fukuo K, Morimoto S, Eguchi Y, Tujimoto Y, & Ogihara T. Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells. *Atherosclerosis* 154, 309-316, 2001

○ Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, Morimoto S, Oghihara T, & Sobue K. EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 373-377, 2001

2. 学会発表

第 42 回日本老年医学会学術集会 2000 年（仙台）

○ 動脈硬化薬および正常血管の培養平滑筋細胞

を用いた遺伝子発現の比較（安田修、前田信代、福尾恵介、荻原俊男）

○高齢自然発症高血圧ラット（SHR）におけるアンジオテンシン変換酵素阻害薬とアンジオテンシンタイプ I 受容体拮抗薬の臓器保護作用（柳谷良裕、大石充、織田博行、滝内伸、森口孝一、楽木宏実、勝谷友宏、森口篤、檜垣實男、荻原俊男）

H.知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1.特許取得

特記なし

2.実用新案登録

特記なし

3.その他

特記なし

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
Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H. & Sobue K.	Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids	Circulation Research	in press		2001
Hayashi K, Nishida W, Yoshida K, Ogawa A, Aoki J, Arai H. & Sobue K.	Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acids	J. Clinical Investigation	in press		2001
Okabe S, Urushido T, Okado H, & Sobue K.	Activity-dependent bidirectional translocation of a postsynaptic density protein PSD-95 (homer1c) in hippocampal neurons	J. Neurosci.	in press		2001
Nakamura M, Nishida W, Mori S, Hiwada K, Hayashi K, & Sobue K.	Transcriptional activation of beta-tropomyosin mediated by serum response factor and a novel Barx homologue, Barx1b, in smooth muscle cells	J. Biol. Chem.	276	in press	2001
Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, Morimoto S, Ogihara T. & Sobue K.	EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor	Biochem. Biophys. Res. Commun.	281	373-377	2001
Hata S, Fukuo K, Morimoto S, Eguchi Y, Tujimoto Y, & Ogihara T.	Vascular smooth muscle maintains the level of Bcl-2 in endothelial cells	Atherosclerosis	154	309-316	2001

20000437

以降のページは雑誌／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表」をご参照ください。