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１３年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　堀　　正二

平成１４（２００２）年　４月

2001/0233

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

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

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表　・・・・・・・・・・・・・・　3

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷　・・・・・・・・・・・・・・　4

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 Epoxyeicosatrienoicacid (EET) は核内受容体である PPAR α を活性化化し、中性脂肪を代謝するリポ蛋白リパーゼの発現を増強させたことから、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・国立循環器病センター（部長）

A. 研究目的

動脈硬化機構の解明と予防—EDHF の作用機序に関する研究課題に関し、特に EET の核内受容体を介する生理学的意義, エストロゲン受容体との連関の検討と EET の虚血心血管保護作用の検討を行った。

B. 研究方法

①EET の APO-A1, APO-AII, に対する作用に関する検討：前年度まで EET の核内受容体である PPAR に対する作用を本研究助成により検討したが、14、15-EET や 11、12-EET が PPAR－α や PPAR-δ のリガンドとなり、活性化することを明らかにした。そこで、HepG2 細胞において PPAR-α 活性化により転写活性が増加するリポ蛋白リパーゼ (LPL)、APO-A I や APO-AII の遺伝子発現を検討した。②EET とアラキドン酸代謝径路や eNOS との連関：アラキドン酸代謝径路にはサイクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、チトクローム P450 エポキシゲナーゼ系の３つの径路があるが、その中での相互作用は不明である。また同じ内皮由来弛緩因子である NO との相互作用に関しては、NO がチトクローム P450 エポキシゲナーゼ活性を低下させることは Busse らにより報告されているが、逆の関係は検討されていない。そこで、チトクローム P450 エポキシゲナーゼの産物である EET と他のアラキドン酸代謝径路であるサイクロオキシゲナーゼ (COX) や NO 合成酵素 (NOS) との連関を検討した。③エストロゲン受容体と EDHF の連関：我々は以前、女性ホルモンである 17β-エストラジオールが EDHF を介して心血管保護作用を呈することを報告しているので、選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) のラロキシフェンが in vivo で EDHF を産生するか否かを検討した。④冠危険因子群での EDHF 活性の測定：虚血性心疾患患者、高血圧患者、高脂血症患者を対象にして、上腕動脈での阻血後の一過性拡張反応と P450 エポキシゲナーゼの阻害薬であるマイコナゾールに対する血流低下率を超音波エコードップラー法で測定した。⑤CYP2J2 の SNP (single nucleotide polymorphism) の解析：虚血性心疾患患者において、EET 産生酵素である CYP2J2 の遺伝子多型を検討した。

C. 研究結果、D. 考察

14, 15－DHET が LPL, APO-A1, APO-AII の遺伝子発現を増加させることを明らかにした。LPL は中性脂肪を分解し、APO-AI や APO-AII は HDL コレステロールの逆転写に関与しているので、EET は脂質代謝を改善して動脈硬化を抑制することが示唆された。11, 12－EET は 100 nM で TNF-α による cyclooxygenase—2 (COX-2) の誘導を抑制し、プロスタグランジン F2α の産生を低下させた。11, 12-EET は PI-3 kinase の活性化、Akt のリン酸化を介して、eNOS をリン酸化させることを明らかにした。また誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) に対しては COX-2 と同様にサイトカインによる iNOS の誘導を抑制した。このことから、EET は炎症惹起に作用する COX-2 や iNOS の発現を抑制し、抗炎症に作用する eNOS 活性を増加させることで、EET 自身の作用に加えて、抗炎症に作用することが明らかになった。麻酔開胸犬で、低冠潅流圧下でラロキシフェンを投与すると、冠血流量、局所心筋収縮力、乳酸摂取率は増加したが、一酸化窒素合成酵素阻害薬 (L-NAME) と、Ca 依存性 K チャネル阻害薬 (カリブドトキシン) で部分的に抑制されたことから、SERM の血管弛緩作用に NO と EDHF が関与していることが明らかになった。また SERM の血管弛緩作用はエストロゲン受容体阻害薬で完全に抑制されたことかた、EDHF の産生にエストロゲン受容体が関与していることが示唆された。またラロキシフェンは同じモデルで心筋梗塞サイズを縮小し、再還流時の不整脈を減少させたが、その効果も L-NAME とカリブドトキシンで抑制されたことから、SERM の虚血心筋保護作用に EDHF が関与していることが明らかになった。麻酔開胸犬において、11, 12-EET は心筋梗塞サイズを縮小させ、その効果は一部、カリブドトキシンで抑制されることがあきらかになった。また、チトクローム P450 エポキシゲナーゼ阻害薬であるマイコナゾールは定冠潅流圧下で冠血流量を低下させるので、内因性の EET が血管弛緩に作用していること、EET は虚血下で、冠血流量を増加させ、嫌気性代謝を改善することも示したことから、in vivo においても EET は心筋保護作用を呈することが明らかになった。冠危険因子群ではいずれも、最大血流増加率とともに、マイコナゾールに対する反応が低下していることから、これらの群では EDHF の活性や産生が低下していることが示唆された。転写開始点から 143 塩基のところが、G が C に変換している SNP が明らかになり、その変異を血管内皮細胞に導入すると、CYP2J２のプロモーター活性が低下することも確認した。さらに虚血性心疾患患者では健常群に比較して、その多型の発現頻度が高いことを明らかにした。このことから、EDHF の産生異常が動脈硬化の発症に関連している可能性が考えられた。EET 産生を増加させる薬剤として、血管内皮細胞で HMG-CoA 還元酵素阻害薬　(スタチン) が EET 産生酵素である CYP2J2 のmRNA と蛋白量を増加させることを competitive PCR 法を用いて明らかにした。また高脂血症患者においては、スタチン投与後、3 ヵ月後に上腕動脈の内皮依存性拡張のマイコナゾールに対する反応が増加しており、EDHF 産生を増加させることが示唆された。EET は虚血性心不全の病態を改善することを実験的に見出しているので、スタチンの慢性心不全患者に対する保護作用を検討したところ、スタチン投与後、3 ヵ月後に血管内皮機能と、心不全のマーカーである BMP 値が低下していることが明らかになった。

E. 結論

EET は脂質改善作用、心筋虚血軽減作用を有することが明らかになり, 臨床的に EET を増強する薬剤としてはエストロゲン、スタチンが示唆された。

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７回日本血管内治療学会　シンポジウム　動脈硬化の成因「EDHF の抗動脈硬化作用」
日本ＭＥ学会総会　オーガナイズドセッション「内皮由来過分極因子 (EDHF) と血管内皮機能」
第 49 回日本心臓病学会総会　シンポジウム　動脈硬化への挑戦：心血管イベント抑制のニューフロント「EDHF の抗動脈硬化作用」
シンポジウム　P450 研究の新展開－バイオジェネレーターとしての機能を考える「エポキシゲナーゼ由来エイコサイドと血管炎症」
第３８回日本臨床生理学会総会　シンポジウム　レニンアンジオテンシン系の新展開「レニンアンジオテンシン系と EDHF の連関」
第１８回国際心臓研究学会日本部会総会　サテライトシンポジウム “EDHF and vascular signaling”

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)　なし

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－

分担研究者　北風　政史　国立循環器病センター生理機能検査部心臓血管内科部長

研究要旨　血管内皮由来過分極因子（EDHF）の候補である Epoxyeicosatrienoicacid (EET) は核内受容体である PPARαを活性化化し、中性脂肪を代謝するリポ蛋白リパーゼの発現を増強させたことから、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

動脈硬化機構の解明と予防―EDHF の作用機序に関する研究課題に関し、特に EET の核内受容体を介する生理学的意義, エストロゲン受容体との連関の検討と EET の虚血心血管保護作用の検討を行った。

B. 研究方法

①EET の APO-A1, APO-AII, に対する作用に関する検討: 前年度まで EET の核内受容体である PPAR に対する作用を本研究助成により検討したが、14、15-EET や 11、12-EET が PPAR－αや PPAR-δのリガンドとなり、活性化することを明らかにした。そこで、HepG2 細胞において PPAR-α活性化により転写活性が増加するリポ蛋白リパーゼ (LPL)、APO-A I や APO-AII の遺伝子発現を検討した。②EET とアラキドン酸代謝径路や eNOS との連関: アラキドン酸代謝径路にはサイクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、チトクローム P450 エポキシゲナーゼ系の３つの径路があるが、その中での相互作用は不明である。また同じ内皮由来弛緩因子である NO との相互作用に関しては、NO がチトクローム P450 エポキシゲナーゼ活性を低下させることは Busse らにより報告されているが、逆の関係は検討されていない。そこで、チトクローム P450 エポキシゲナーゼの産物である EET と他のアラキドン酸代謝径路であるサイクロオキシゲナーゼ (COX) や NO 合成酵素 (NOS) との連関を検討した。③エストロゲン受容体と EDHF の連関: 我々は以前、女性ホルモンである 17β-エストラジオールが EDHF を介して心血管保護作用を呈することを報告しているので、選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) のラロキシフェンが in vivo で EDHF を産生するか否かを検討した。④冠危険因子群での EDHF 活性の測定: 虚血性心疾患患者、高血圧患者、高脂血症患者を対象にして、上腕動脈での阻血後の一過性拡張反応と P450 エポキシゲナーゼの阻害薬であるマイコナゾールに対する血流低下率を超音波エコードップラー法で測定した。⑤CYP2J2 の SNP (single nucleotide polymorphism) の解析: 虚血性心疾患患者において、EET 産生酵素である CYP2J2 の遺伝子多型を検討した。

C. 研究結果、D. 考察

14, 15－DHET が LPL, APO-A1, APO-AII の遺伝子発現を増加させることを明らかにした。LPL は中性脂肪を分解し、APO-AI や APO-AII は HDL コレステロールの逆転写に関与しているので、EET は脂質代謝を改善して動脈硬化を抑制することが示唆された。11, 12－EET は 100 nM で TNF-αによる cyclooxygenase―2 (COX-2) の誘導を抑制し、プロスタグランジン F2αの産生を低下させた。11, 12-EET は PI-3 kinase の活性化、Akt のリン酸化を介して、eNOS をリン酸化させることを明らかにした。また誘導型 NO 合成酵素（iNOS）に対しては COX-2 と同様にサイトカインによる iNOS の誘導を抑制した。このことから、EET は炎症惹起に作用する COX-2 や iNOS の発現を抑制し、抗炎症に作用する eNOS 活性を増加させることで、EET 自身の作用に加えて、抗炎症に作用することが明らかになった。麻酔開胸犬で、低冠灌流圧下でラロキシフェンを投与すると、冠血流量、局所心筋収縮力、乳酸摂取率は増加したが、一酸化窒素合成酵素阻害薬（L-NAME）と、Ca 依存性 K チャネル阻害薬(カリブドトキシン)で部分的に抑制されたことから、SERM の血管弛緩作用に NO と EDHF が関与していることが明らかになった。また SERM の血管弛緩作用はエストロゲン受容体阻害薬で完全に抑制されたことかた、EDHF の産生にエストロゲン受容体が関与していることが示唆された。またラロキシフェンは同じモデルで心筋梗塞サイズを縮小し、再還流時の不整脈を減少させたが、その効果も L-NAME とカリブドトキシンで抑制されたことから、SERM の虚血心筋保護作用に EDHF が関与していることが明らかになった。麻酔開胸犬において、11, 12-EET は心筋梗塞サイズを縮小させ、その効果は一部、カリブドトキシンで抑制されることがあきらかになった。また、チトクローム P450 エポキシゲナーゼ阻害薬であるマイコナゾールは定冠灌流圧下で冠血流量を低下させるので、内因性の EET が血管弛緩に作用していること、EET は虚血下で、冠血流量を増加させ、嫌気性代謝を改善することも示したことから、in vivo においても EET は心筋保護作用を呈することが明らかになった。冠危険因子群ではいずれも、最大血流増加率とともに、マイコナゾールに対する反応が低下していることから、これらの群では EDHF の活性や産生が低下していることが示唆された。転写開始点から 143 塩基のところが、G が C に変換している SNP が明らかになり、その変異を血管内皮細胞に導入すると、CYP2J２のプロモーター活性が低下することも確認した。さらに虚血性心疾患患者では健常群に比較して、その多型の発現頻度が高いことを明らかにした。このことから、EDHF の産生異常が動脈硬化の発症に関連している可能性が考えられた。EET 産生を増加させる薬剤として、血管内皮細胞で HMG-CoA 還元酵素阻害薬　(スタチン) が EET 産生酵素である CYP2J2 の mRNA と蛋白量を増加させることを competitive PCR 法を用いて明らかにした。また高脂血症患者においては、スタチン投与後、3 ヵ月後に上腕動脈の内皮依存性拡張のマイコナゾールに対する反応が増加しており、EDHF 産生を増加させることが示唆された。EET は虚血性心不全の病態を改善することを実験的に見出しているので、スタチンの慢性心不全患者に対する保護作用を検討したところ、スタチン投与後、3 ヵ月後に血管内皮機能と、心不全のマーカーである BMP 値が低下していることが明らかになった。

E. 結論

EET は脂質改善作用、心筋虚血軽減作用を有することが明らかになり、臨床的に EET を増強する薬剤としてはエストロゲン、スタチンが示唆された。

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７回日本血管内治療学会　シンポジウム　動脈硬化の成因「EDHF の抗動脈硬化作用」

日本ＭＥ学会総会　オーガナイズドセッション「内皮由来過分極因子 (EDHF) と血管内皮機能」

第 49 回日本心臓病学会総会　シンポジウム　動脈硬化への挑戦：心血管イベント抑制のニューフロント「EDHF の抗動脈硬化作用」

シンポジウム　P450 研究の新展開－バイオジェネレーターとしての機能を考える「エポキシゲナーゼ由来エイコサイドと血管炎症」

第３８回日本臨床生理学会総会　シンポジウム　レニンアンジオテンシン系の新展開「レニンアンジオテンシン系と EDHF の連関」

第１８回国際心臓研究学会日本部会総会　サテライトシンポジウム "EDHF and vascular signaling"

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
Hori M.	Nifedipine-induced coronary vasodilation in ischemic hearts is attributable to bradykinin- and NO-dependent mechanisms in dogs.	Circulation	101	311-7	2000
Hori M.	Protein Tyrosine Kinase Is Not Involved in the Infarct Size ~ Limiting Effect of Ischemic Preconditioning in Canine Hearts.	Circ Res.	87	303-8	2000
Hori M.	Role of the Mitochondrial and Sarcolemmal KATP Channels in Ischemic Preconditioning on the Canine Heart.	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	280	H256-63	2001
Hori M.	Role of Phasic Dynamism of P38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Ischemic Preconditioning on the Canine Heart.	Circ Res.	88	175-80	2001
Hori M.	Cardioprotective Effect Afforded by Transient Exposure to Phosphodiesterase-III Inhibitors. –The Role of Protein Kinase A and P38 Mitogen-activated Protein Kinase–	Circulation.	104	705-10	2001
Hori M.	Nifedipine Limits Infarct Size via NO-dependent Mechanisms In Dogs.	Basic Res Cardiol.	96	497-505	2001
Hori M.	cDNA Array Hybridization Reveals Cardiac Gene Expression in Acute Ischemic Murine Hearts.	Cardiovasc Drugs Ther.	15	125-30	2001
Hori M.	Benidipine, a Long-acting Ca Channel Blocker, Limits Infarct Size via NO-dependent Mechanisms In Dogs.	Cardiovasc Drugs Ther.	15	225-31	2001
Hori M.	Involvemwnt of Nuclear Factor-κB and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in G-Protein-Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy	Circulation.	105	509-515	2002
Hori M.	Involvement of Reactive Oxygen Species-mediated NF-κB Activation in TNF-α-induced Cardiomyocyte Hypertrophy	J Mol Cell Cardiol	34	233-240	2002

20010233

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。