

新規ペプチド Vasostatin-1 の動脈硬化抑制作用

Inhibitory Effects of Vasostatin-1 Against Atherosclerosis

東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 心血管医科学研究室
佐藤裕希, 内山のぞみ, 小澤奈菜, 白井玲美奈
佐藤健吾, 渡部琢也

世界の死因の第1位は虚血性心疾患（冠動脈疾患）であり、本邦においても主な死因の1つである。これまで様々な対症療法が開発・施行されてきたが、死亡者数を減少させるには至っていない。本疾患は心臓を養う冠動脈の動脈硬化に起因するため、動脈硬化の有効な予防・治療法が開発が強く望まれている。本研究では、血管壁細胞の遺伝子を直接的に標的とした新たな治療薬を開発するため、新規ペプチドである Vasostatin-1 の動脈硬化に対する抑制作用を我々のトランスレーショナルリサーチによって世界で初めて明らかにした。

キーワード：Vasostatin-1, 動脈硬化, マクロファージ, 血管平滑筋細胞, 血管内皮細胞

1. 緒言

世界保健機関(WHO)の最新の報告によると、世界の死因の第1位は虚血性心疾患であり、本邦においても虚血性心疾患による死亡が極めて多いのが現状である。虚血性心疾患は、心臓を養う冠動脈に動脈硬化が生じることに起因する。虚血性心疾患の危険因子である高コレステロール血症、肥満、糖尿病、高血圧等の対症療法が施行されてきたが、死亡数を減少させるには至っていない。

Vasostatin-1 は、神経内分泌細胞や心臓に発現している Chromograinin A の N 末端から 76 アミノ酸の分画ペプチドであり、血管収縮や血管新生を抑制する事が知られている。しかし、動脈硬化に対する作用は未だ明らかになっていない。

2. 目的

本研究では、動脈硬化の主要現象である血管内皮細胞やマクロファージの炎症、マクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走・増殖、細胞外マトリックスの産生に対する Vasostatin-1 の作用をヒト由来細胞を用いて *in vitro* で検討した。動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスへの Vasostatin-1 投与により大動脈における動脈硬化病変進展に対する作用を *in vivo* で検討した。更に、虚血性心疾患患者における動脈硬化病変で

の Vasostatin-1 発現を検討した。このようにトランスレーショナルリサーチを行い、Vasostatin-1 の動脈硬化抑制作用を明らかにしようとした。

3. 方法・結果

① ヒト動脈硬化病変における発現

免疫染色にて検討したところ、Vasostatin-1 は、ヒト橈骨動脈の中膜石灰化硬化（メンケベルグ硬化）病変に強発現していた。

② 培養ヒト血管細胞における発現

Western Blot で検討したところ、Vasostatin-1 は、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において発現が確認された。

③ 血管内皮細胞における炎症性サイトカイン・接着因子の発現に対する抑制作用

HUVEC において、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激による Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)、Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)、E-Selectin の mRNA 発現の増加に対する Vasostatin-1 の抑制作用を RT-PCR を用い検討した。LPS により上記全ての分子の発現が促進されたが、Vasostatin-1 により、MCP-1、VCAM-1、E-Selectin の発現は有意に抑制された。

④ マクロファージの炎症性フェノタイプ・サイトカイン分泌に対する抑制作用

マクロファージには炎症促進に働く M1 と炎症抑制に働く M2 の 2 種類のフェノタイプが存在し、この違いが動脈硬化病変形成の制御に関与すると考えられている。故に、Vasostatin-1 がどちらのフェノタイプへ分化誘導するかを Western Blot で解析した。ヒト単球 (THP-1) からマクロファージへの分化過程で Vasostatin-1 に暴露すると、M1 のみが抑制された。また、LPS 刺激による Interleukin-6 および Tumor Necrosis Factor- α の分泌を減少させた。

⑤ マクロファージの泡沫化に対する抑制作用

ヒト単球由来マクロファージにおける酸化 LDL による泡沫化を Cholesterol Esterification Assay で検討したところ、Vasostatin-1 はマクロファージの泡沫化を有意に抑制した。その分子メカニズムの解明のため、マクロファージにおける泡沫化関連分子のタンパク質発現を Western Blot で解析した。Vasostatin-1 は、酸化 LDL を取り込む受容体である CD36 及びコレステロールエステル化酵素である Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1 の発現を抑制し、コレステロール逆転送に関与する ATP-Binding Cassette Transporter A1 の発現を促進させていた。

⑥ 血管平滑筋細胞の遊走、増殖、アポトーシスに対する抑制作用

Vasostatin-1 は、Angiotensin II 刺激による HASMC の遊走を有意に抑制した。しかし、HASMC の増殖とアポトーシスに関しては、Vasostatin-1 は有意な作用を及ぼさなかった。

⑦ 血管平滑筋細胞における細胞外マトリックス産生に対する作用

動脈硬化病変 (プラーク) の進展や破裂において細胞外マトリックスの産生・減衰に関与する。HASMC における Collagen-1、Collagen-3、Elastin、Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-9、

Fibronectin のタンパク質発現に対する Vasostatin-1 の作用を Western Blot で解析した。更に、MMP-2 と MMP-9 の活性を Gelatin Zymography にて解析した。Vasostatin-1 は、Collagen-3 と Fibronectin の発現を有意に抑制し、Elastin 発現並びに MMP-2 と MMP-9 の活性を有意に促進させた。Vasostatin-1 は、それらに関わるシグナル伝達分子である c-Src 発現並びに Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 と p38 のリン酸化を抑制し、JNK と Akt のリン酸化を促進させた。

⑧ ApoE 欠損マウスにおける動脈硬化病変進展に対する作用

高コレステロール食を負荷した ApoE 欠損マウスに、浸透圧ポンプを用いて Vasostatin-1 (0、45、90 ng/kg/分) を 4 週間持続投与し、動脈硬化進展に対する Vasostatin-1 の作用を検討した。体重、食餌摂取量、収縮期・拡張期血圧、血中コレステロール濃度においては群間では有意な差は認められなかったが、Vasostatin-1 投与により、空腹時血糖値およびインスリン抵抗性指数の HOMA-IR は有意に改善していた。また、Vasostatin-1 投与により、大動脈全体における動脈硬化病変の総面積、大動脈弁輪部でのプラーク内のマクロファージ浸潤や炎症 (Pentraxin-3 発現)、血管平滑筋細胞の含有量、Collagen-3 発現の全てにおいて減少が認められた。

4. 結論

Vasostatin-1 は、動脈壁における血管内皮細胞とマクロファージにおいて炎症反応を抑制し、マクロファージの泡沫化、血管平滑筋細胞の遊走、Collagen-3 発現を抑制することで、Vasostatin-1 は動脈硬化性プラークの形成を予防した。また、Vasostatin-1 は Elastin の発現を増やし、血管の弾性維持にも貢献すると考えられた。故に、Vasostatin-1 は血管壁の分子を直接ターゲットにし、動脈硬化の予防のみならず、血管を健康に保つために有用であると大いに期待される (*Clinical Science* 2019, in press)。