

53. 血管伸展性消失の新規分子機構の解明

岡山理科大学獣医学部 講師 向田 昌司

概要

我々は、血管伸展性の消失（動脈ステイフネス）に関わる新たな病態生理を明らかにすることを目標としている。先行研究において、ホスホジエステラーゼ5阻害薬による血管拡張の促進が遺伝性動脈ステイフネスを改善することを確認しており、これに基づき、「血管収縮異常が血管伸展性の消失の本質的原因である」との仮説を立てた。

本研究では、動脈ステイフネスモデルにおける血管伸展性消失の新規分子メカニズムの解明を目的として、アンジオテンシンII長期曝露モデルを作製し、血管収縮の制御および動脈硬化性疾患の起点となるプロテインキナーゼC（PKC）に着目し検討した。その結果、PKC β がアンジオテンシンII長期曝露により誘導される過収縮反応において中心的な役割を果たすことが明らかになった。さらに、PKC β 活性化の下流における転写制御経路が血管の異常収縮に寄与している可能性が示唆された。このアンジオテンシンII-PKC β 経路は、動脈ステイフネスおよび高血圧における血管収縮異常の形成に深く関与するものと考えられる（*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2025）。加えて、活性酸素種（ROS）の蓄積が血管収縮および線維化の進展に関与しており、本研究では、アンジオテンシンII長期曝露に伴うROSの蓄積がPKC β を介して制御されていることを、動物モデルにより初めて明確に示した（APPW2025）。

本研究では、比較的若齢の動物を用いて、アンジオテンシンII長期曝露による血管収縮異常にPKC β が転写活性制御を介して関与することを明らかにしたが、その詳細な分子メカニズムについては今後の課題である。加えて、老齢モデルを用いた解析により、ヒトにおける動脈ステイフネス病態に近い条件下での検証が可能になると考えられる。

本研究は前臨床段階の実験研究であり、実験動物の購入・飼育費に加え、病態モデル作製に必要な機器および試薬、さらに血管過収縮反応の評価に不可欠な解析機器を要した。本助成により、これらの研究環境を整えることが可能となり、研究を着実に推進することができた。貴重なご支援を賜りましたことに、心より感謝申し上げます。

背景および目的

プロテインキナーゼC（PKC）ファミリーは、複数のセリン／スレオニンキナーゼで構成され、様々な細胞において多様な生理機能を制御することが知られている（1）。血管組織において、PKCの各アイソフォームは細胞種によって発現パターンが異なり、血管平滑筋細胞ではPKC α 、 β 、 δ などが高発現し（2）、これらは血管収縮をはじめ、細胞増殖や遊走などに関与している（3）。PKCの過剰な活性化は血管恒常性の破綻を引き起こし、動脈硬化症などの血管疾患の進展に寄与するとされる（4）。とりわけPKC β は、糖尿病性血管障害において注目されており、酸化ストレスの増幅などを介して、血管機能障害を助長する可能性が示唆されている（5）。高血糖環境においてPKC β が選択的に活性化されることが報告されている（6）。

本研究では、アンジオテンシン II 長期曝露モデルを用いて、PKC β の活性化が血管収縮異常および血管構造変化に与える影響を検討し、動脈ステイフネスの発症・進展におけるその病態生理学的意義を明らかにすることを主な目的とした。

方法

本研究では、7~20 週齢の Wistar 系ラット（オスおよびメス）を用い、岡山理科大学獣医学部実験動物施設にて適切な環境下で飼育・管理した。すべての実験は、岡山理科大学動物実験委員会の承認を受け、国内外のガイドラインに基づいて実施された。

一部の動物にはアンジオテンシン II を持続的に投与し、年齢を一致させた対照群と比較することで、アンジオテンシン II 慢性刺激が血管機能および活性酸素種（ROS）の蓄積に及ぼす影響を評価した。血管収縮反応性は胸部大動脈および上腸間膜動脈を用いて、等尺性張力測定法により解析した。一部の血管では内皮を除去し、内皮依存性の収縮反応との比較を行った。

血圧は非侵襲的手法により測定し、アンジオテンシン II 投与前後の変化を経時的に評価した。測定前には、ストレス軽減のために動物に事前の馴化処置を行った。

分子レベルでの変化を解析するため、血管組織からタンパク質および RNA を抽出し、それぞれの発現動態を評価した。タンパク質の発現およびリン酸化状態は Western blotting により評価され、血管平滑筋におけるキナーゼ関連分子の活性化を確認した。RNA レベルでの網羅的な遺伝子発現解析にはマイクロアレイを使用し、発現変動を正規化処理後に比較した。また、個別遺伝子の定量には定量的リアルタイム RT-PCR（qPCR）を用いて検証を行った。

また、一部の実験では、培養条件下における血管組織からの収縮関連因子の分泌量を酵素免疫測定法（ELISA）により定量した。これにより、刺激に応じた生理活性因子の産生動態を間接的に評価した。

すべてのデータは適切な統計解析手法により処理され、二群間の比較には t 検定、複数群の比較には一元配置分散分析（ANOVA）と事後検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果および考察

アンジオテンシン II の長期曝露により、血管平滑筋の収縮反応性が増強されることが *in vitro* および *in vivo* の双方で確認された。この収縮亢進は、特定の収縮刺激に対して顕著であり、短時間の刺激では認められなかったことから、新たなタンパク質の合成や転写活性の変化を伴う長期的なシグナル伝達が関与している可能性が示唆された。

遺伝子欠損モデルおよび選択的阻害薬を用いた検討により、これらの反応にはプロテインキナーゼ C の β アイソフォーム（PKC β ）が中心的役割を果たしていることが明らかとなった。PKC β の機能欠損により、アンジオテンシン II による収縮亢進および血圧上昇が抑制され、また、特定の収縮関連因子の発現誘導も大きく減弱した。これらの結果は、PKC β がアンジオテンシン II によって活性化され、下流の転写因子やシグナル伝達系を介して血管収縮性の変化を制御していることを示している。

さらに、血管反応性の変化において Rho キナーゼ経路が関与していることが示され、PKC β 活性化に続く下流シグナルとして、この経路が収縮感受性の亢進に寄与していると考えられる(7)。また、性差に関する解析からは、雌性ラットでは低濃度のアンジオテンシン II でも感受性の高い反応が引き起こされることが明らかとなり、受容体発現の違いや性ホルモンの関与が反応性の背景にある可能性が示唆された(8-10)。

加えて、PKC β の欠損により基礎的な血圧には大きな変化が認められなかったことから、生理的な循環制御には大きく影響を与えず、病的刺激に対する選択的な反応制御が可能であることが示された(11)。この点は、将来的な PKC β 阻害戦略の安全性の観点からも重要である。

また、アンジオテンシン II 短期および長期曝露による ROS の産生においても、血管組織の PKC β が重要である可能性を示唆する結果も得られた。

本研究の知見は、アンジオテンシン II による血管収縮異常および血圧上昇の背景に PKC β の活性化があることを明らかにし、高血圧や関連する血管疾患の新たな治療標的として、PKC β シグナル経路が有望であることを示唆している。今後は、加齢や免疫系との関連、さらにヒトへの応用可能性を視野に入れた研究の展開が期待される。

(完)

論文発表および学会発表

- 1) Hirotaka Tajima, Nayu Morikita, Masashi Mukohda*, Sho Nakamura, Mihiro Seki, Ryuya Imai, Fumiyo Saito, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki, "Enhanced vascular contraction induced by exposure to angiotensin II mediated by endothelin-1 biosynthesis following PKC β activation" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2025, 1;328(3):H484-H495.*: Corresponding Author.
- 2) 田嶋弘貴, 森北奈佑, 向田昌司, 中村翔, 関美宙, 水野理介, 尾崎博、「アンジオテンシン II 長期処置による血管収縮障害および血圧上昇にはプロテインキナーゼ C β の活性化が関与する」、第 6 回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会 (2024 年 3 月 16 日)
- 3) 田嶋弘貴, 永西紗那香, 向田昌司, 中村翔, 松井利康, 水野理介, 尾崎博、「アンジオテンシン II 誘発性酸化ストレスの機序の検討: PKC β 欠損ラットを用いた解析」、第 167 回日本獣医学会学術集会 (2024 年 9 月 12 日)
- 4) Hirotaka Tajima, Sayaka Naganishi, Masashi Mukohda, Sho Nakamura, Toshiyasu Matsui, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki, "Investigation of molecular therapeutic targets for angiotensin II-induced oxidative stress in vascular smooth muscle: Insight from PKC β -deficient rats", APPW2025 (March 17, 2025)

引用文献

- 1) Adv Pharmacol. 2017;78:203-301. doi: 10.1016/bs.apha.2016.06.002.
- 2) J Vasc Surg. 1998 May;27(5):919-26; discussion 926-7. doi: 10.1016/s0741-5214(98)70273-3.
- 3) Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Jul;281(1):H359-70. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.1.H359.
- 4) Circ Res. 2005 Sep 2;97(5):443-9. doi: 10.1161/01.RES.0000179767.37838.60.
- 5) Circ Res. 2010 Apr 30;106(8):1319-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.
- 6) Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15;89(22):11059-63. doi: 10.1073/pnas.89.22.11059.
- 7) Biochim Biophys Acta. 2010 Dec;1802(12):1276-84. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.05.002.
- 8) Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 May;288(5):H2177-84. doi: 10.1152/ajpheart.00969.2004.
- 9) Biol Sex Differ. 2014 Sep 16;5:13. doi: 10.1186/s13293-014-0013-7.
- 10) Hypertension. 2021 Jul;78(1):128-137. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17164.
- 11) Hypertension. 2015 Nov;66(5):1023-33. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05779.