

## 平成 25 年度 研究経過報告書

### 研究者名

竹森 久美子

### 研究課題名

魚類由来エラスチンペプチドの血管保護作用の解明

### 研究目的・内容

すでに我々は、高血圧自然発症ラットにカツオ動脈球由来エラスチンペプチドを経口投与したところ、内皮細胞傷害の程度が明らかに軽度であり、内皮細胞保護作用が有することを報告した。そこで、本研究では、魚類由来エラスチンペプチドによる内皮細胞保護作用のメカニズムの解明を試るため、ラット培養内皮細胞を用いて **Aging** モデルの作成と細胞障害の評価法の確立を試みるとともに、魚類由来エラスチンによる内皮細胞傷害の抑制および修復過程の観察を実施した。

### 研究の経過

#### 1. ラット培養内皮細胞の **Aging** モデルの作成と細胞障害の評価法の確立

##### 1. ) エラスチンペプチド添加による細胞増殖に及ぼす影響

104 cell /well の内皮細胞を 96 well plate に播種後、血清・増殖因子含有培地にエラスチンペプチド(林兼産業)、プロリルグリシン (PG) (国産化学)、Elastin derived peptide ( Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly. Elastin products Company)、ハマチ動脈球由来  $\alpha$  エラスチンを 10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml 添加し、細胞生存率(24hr、48hr、72hr)を MTT assay (Cayman Chemical) を用いて測定した。すべての添加群において経時的 Control と同程度の細胞増殖が認められ、エラスチンペプチド添加による影響は認められなかった。

##### 2. ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO donor 処置の決定および発現解析の条件設定

12 well plate で内皮細胞を semi confluent に培養後、増殖因子含有および非含有培地に置換したのち、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$  M (**Aging** モデル作成) および NO donor (NOC 18 : 半減期 21hr) 3.4nM (生理的 NO 濃度) と 1) の各エラスチンペプチドを同時に添加し添加 4 時間後、24 時間後に細胞を回収した。現在 ICAM-1 (接着分子) eNOS (NO 合成酵素)、claudin-5、VE カドヘリン、PECAM (tight junction)、 $\beta$ -galactosidase、CTSA、NEU1 (elastin binding protein ならびに関連遺伝子)、TNF- $\alpha$  (炎症性サイトカイン)、MMP9 (エラスチン分解系) Caveolin-1 (老化マーカー)、BCL-2 (アポトーシス制御・抑制)、18S rRNA (内部標準) の発現解析を実施中である。

#### 2. 魚類由来エラスチンによる内皮細胞傷害の抑制および修復過程の観察

生後 15 週齢雄性 SHR/Izm にエラスチンペプチド (3g/kg 体重) を船橋 SP 飼料に混じり 5 週間自由摂取させた。実験期間終了後、門脈より採血し、PG 濃度を測定し

た。内皮細胞の形態を、走査型電子顕微鏡を用いて観察するとともに、内皮細胞における eNOS ならびに ICAM-1 の発現を Realtime-PCR 法を用いて比較した。結合織関連因子 (Lysyl oxidase、Elastin、type I collagen、Type III collagen、MMP2、MMP9) の発現を比較した。血圧および体重にはエラスチン投与による影響は認められなかった。大動脈内皮細胞の走査型電子顕微鏡による観察では、エラスチンペプチドを投与したラットでは Control 群に比べ血管の内膜面は平滑で、内皮細胞の配列も整っており、血管内皮細胞障害は比較的軽度であった。内皮細胞における eNOS の発現に対する影響は認められなかったが、ICAM-1 は有意に低値を示した。血管内圧ならびに結合織関連分子の発現において差は認められなかった。以上の結果から、エラスチンペプチドには内皮細胞保護作用があることが推測された。その機序として、消化吸収により生じる PG により、内皮細胞接着因子である ICAM-1 の発現が抑制され、単球や好中球の接着に基づく内皮細胞傷害が防止されることが考えられた。

#### 本研究と関連した今後の研究計画

引き続き研究の経過 1. の実験を継続して遺伝子発現の解析を進めるとともに、同様の細胞培養条件下での細胞傷害の評価を実施する。細胞における Aging の評価は、Flow Cytometry を用い培地内 Microparticle(MP)の定量と細胞周期毎に分離した(細胞内 DNA 定量により評価)内皮細胞表面における老化および酸化ストレスバイオマーカータンパクの発現変化によって行う。さらに、電子顕微鏡による観察で確認するため、機能と形態の 2 つの方法を用いて Aging の客観的評価する。培地内の MP は、Annexin V 陽性粒子として Flow Cytometry で定量する。内皮細胞由来 MP は CD31 陽性/CD42 陰性であることから、これらの抗体で内皮細胞を 2 重染色し、その発現を Flow Cytometry で解析する。さらに、老化モデルの細胞を細胞周期毎に回収し、老化マーカーである  $\beta$ -galactosidase および酸化ストレスマーカーである p66She のタンパク発現を解析し、細胞傷害の程度を評価する。

研究の経過 2. に関しては培養細胞を用いて in vitro での確認を行う予定である。

(平成 26 年 3 月 31 日現在)