

原 著

Sphingosylphosphorylcholine (SPC) によって引き起こされる
血管平滑筋異常収縮に対するノビレチンの抑制作用

宮成健司

山口大学大学院医学系研究科 分子細胞生理学 (生理学第一) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : ノビレチン, スフィンゴシルホスホリルコリン, 血管異常収縮, 血管平滑筋, Rhoキナーゼ

和文抄録

血管平滑筋のCa²⁺依存性収縮とは対照的に, スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) / Rhoキナーゼ (ROK) 経路を介したCa²⁺非依存性血管収縮は, 血管攣縮などの異常な血管過収縮の一因である. 血管攣縮を予防するため食品由来成分を中心に探索した結果, 柑橘由来成分であるノビレチンを見出した. ノビレチンはSPCによって引き起こされた血管異常収縮を強力に抑制し, 40mM K⁺溶液によって引き起こされたCa²⁺依存性血管収縮に対しては, 微弱な抑制効果を示した. さらに, 細胞質Ca²⁺濃度と張力の同時測定では, ノビレチンは細胞質Ca²⁺濃度に影響を与えることなくSPCによって引き起こされた血管異常収縮を抑制し, 40mM K⁺溶液によって引き起こされたCa²⁺依存性血管収縮に対してわずかな抑制効果を及ぼした. これまでに我々は, SPC刺激によるROKの活性化, 活性化したROK細胞質から細胞膜への移動, ミオシンホスファターゼ標的サブユニット1 (MYPT1) とミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化レベルの上昇を明らかにし, ROKの活性化が血管攣縮に重要な役割を果たすことを報告してきたが, 本研究において, ノビレチンは, SPC刺激によってもたらされるリン酸化MYPT1およびリン酸化MLCの発現レベルの上昇を有意に著しく抑制することが明らかになった. 以上の結果は, ノビレチンが血管攣縮につながる異常な血管収縮に対する新

規治療薬の標的候補として有望であることを示唆している.

緒 言

突然発症する血管攣縮は, 突然死の一因である. その本態はROKによる血管平滑筋のCa²⁺非依存性の異常収縮であるが, 我々はROK上流の病的シグナル分子としてSPCを同定した. 実際に脳血管攣縮患者の髄液中SPC濃度は, 対照群に比べ20~30倍にも増加しており, さらにイヌ髄腔内に投与されたSPCは重篤な脳血管攣縮を引き起こした¹⁻³⁾. この血管攣縮はROK阻害剤であるY27632で完全に抑制されたことから, 血管攣縮におけるSPC / ROK経路の重要性が示唆された^{4, 5)}. また, SPCによって引き起こされる血管異常収縮の程度は, ヒト血清総コレステロール値およびLDLコレステロール値と相関を示し, さらにHDLコレステロール値とは逆相関を示すことが確認されている⁶⁾.

我々は血圧維持を担う血管のCa²⁺依存性収縮を抑制せずに, SPCによる異常収縮のみを抑制する特効薬を探索し, 魚油の成分であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を見出した. EPAは*in vitro*において生理学的なCa²⁺依存性血管収縮に影響を与えることなく, SPCによる血管異常収縮のみを選択的に阻害し, *in vivo*において脳血管攣縮を予防することを発見した^{2, 4)}. しかしながら, EPAの原材料となる魚油は海洋汚染等の環境の影響を受け易く, 供給が不安定である. そこで我々は環境と供給が安定している

植物に着目し、食品である植物由来成分を中心に探索を試みたところ、柑橘由来成分であるノビレチンがSPCによって引き起こされる血管異常収縮に対する抑制効果を有していることを見出した。これらの報告は、ノビレチンが血管攣縮の特効薬として利用可能というだけでなく、日常的に摂取可能な予防薬としての可能性を示唆している。

試薬と実験方法

1. 試薬類

SPCはバイオモル (米国)、ブラジキニン (BK) はペプチド研究所 (大阪, 日本)、ノビレチンとケルセチンは和光純薬 (大阪, 日本)、ナリンゲニンはシグマアルドリッチ (米国) から購入した。ノビレチン、ケルセチンおよびナリンゲニンはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。DMSOは和光純薬から購入した。Indo1-AMは同仁化学研究所 (熊本, 日本) から入手し、他のすべての試薬は片山化学 (大阪, 日本) から購入した。また、使用した抗体を以下に示す: 抗リン酸化MYPT1 (Thr850) (アップステート, 米国)、抗MYPT1 (サンタクルズバイオテクノロジー, 米国)、抗リン酸化ミオシン軽鎖2 (Ser19) モノクローナル抗体 (セルシグナリング, 米国)、抗ミオシン軽鎖 (20kDa) モノクローナル抗体 (シグマアルドリッチ, 米国)。

2. 血管平滑筋条片の作成

ブタの冠状動脈 (左前下行枝の近位部分の起点から20~30mm) は、公共の食肉処理場 (北九州市食肉検査管理センター) から入手した。組織標本をあらかじめ混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) を通気した氷冷Krebs溶液 (123.0mM NaCl, 4.7mM KCl, 15.5mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgCl₂, 1.25mM CaCl₂, 11.5mM D-グルコース) で動脈内の血液を洗い流し、研究室に持ち帰った。その後、血管周辺の脂肪組織を取り除いた後、外膜を取り除き、Krebs溶液中にて4°Cで保存した。動脈をあらかじめ混合ガスで通気したKrebs溶液中にて、血管を長軸方向に切り開き、剃刀を用いて血管平滑筋条片1.0mm×4.0mmを作製した。内皮は血管を長軸方向に切り開いた時点で、綿棒を用い血管内腔を軽く一方向に擦り、除去した。内皮の除去はブラジキニ

ン (BK) による弛緩反応の消失により確認した。

3. 血管平滑筋条片を用いた張力測定

張力測定実験については過去の論文で記述した方法に従って行った^{1, 4, 7}。血管平滑筋条片はKrebs溶液で満たされたオーガンバスチャンパーにワイヤーを用いて垂直に取り付けた。等尺性収縮力の測定にはトランスデューサー (TB-612T, 日本光電, 日本) を使用した。血管平滑筋条片はオーガンバスチャンパー中のKrebs溶液に浸るよう調整し、Krebs溶液は常に混合ガスでバブリングした。マグヌス管外は恒温槽にて37°Cに保った水を循環させた。また、交換用の試験液についても、37°Cで保温し混合ガスを通気したものをを用いた。血管平滑筋条片を118mM K⁺溶液 (10.9mM NaCl, 116.8mM KCl, 15.5mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgCl₂, 1.25mM CaCl₂, 11.5mM D-glucose) を用いて一定時間毎に脱分極収縮を引き起こし、収縮の安定性と大きさを指標に静止張力を最適化した。静止張力を最適化した後、40mM K⁺溶液 (88.9mM NaCl, 38.8mM KCl, 15.5mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgCl₂, 1.25mM CaCl₂, 11.5mM D-glucose) を加え、その収縮が定常状態に達した後、BKを最終濃度1μMになるように加えて内皮の有無を確認した。その後、30μM SPCまたは40mM K⁺溶液によって誘発された収縮の最大および定常状態下で、ノビレチン、ナリンゲニン、ケルセチン (最終濃度は実験に準ずる) を添加し血管への影響を観察した。抑制率はノビレチン、ナリンゲニン、ケルセチン添加前の定常状態下での張力を100%として算出した。

4. 血管平滑筋条片を用いた張力-細胞質Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 同時測定

血管平滑筋条片をCa²⁺濃度測定試薬Indo1-AM (10μM) とKrebs溶液 (混合ガスでバブリングしpHを7.4に調整したもの) に37°Cで3~4時間浸透させた^{8, 9}。反応後の血管平滑筋条片を顕微2波長分光蛍光測定装置 (CAM-230, 日本分光) を用いて張力と[Ca²⁺]_iを測定した。330nm (F330) の励起光照射による510nmの蛍光強度を測定する事により、[Ca²⁺]_iの測定を行った^{1, 4, 5, 8, 9}。血管平滑筋条片を118mM K⁺溶液を用いて一定時間毎に脱分極収縮を引き起こし、収縮の安定性と大きさを指標に

静止張力を最適化し、Krebs溶液でもとの定常状態まで弛緩した後に、30 μ M SPCまたは40mM K⁺溶液を投与によって誘発された収縮の最大および定常状態下で10 μ M ノビレチンを添加し張力と[Ca²⁺]_iを測定した。

5. 血管平滑筋条片を用いたウエスタンブロット分析

MLC (p-MLC), MYPT1 (p-MYPT1) でのリン酸化レベルを計測するため、血管平滑筋条片を用いて以下のように調整した。血管平滑筋条片を用いて予めノビレチン (10 μ M, 37 $^{\circ}$ Cで30分) をKrebs溶液中で反応させた。次に血管平滑筋条片をノビレチンの非存在下 (コントロール) または存在下でSPC (30 μ M, 37 $^{\circ}$ Cで15分) 刺激を行った。次に血管平滑筋条片を5%トリクロロ酢酸 (TCA) にすばやく浸し、冷やした10mM DL-ジチオスレイトール (DTT) / アセトンで2回洗浄してTCAを除去した。血管平滑筋条片は液体窒素を使用して凍結し、SK-Mill Freeze - Crush Apparatus (ダイアグノシン, 米国) で粉砕した。100 μ LのRIPAバッファー (和光純薬) とプロテアーゼ阻害剤のロイペプチン (シグマアルドリッチ) およびアプロチニン (シグマアルドリッチ) を添加して、凍結した血管平滑筋条片からタンパク質を抽出した。ライセートを遠心分離した後、上清を回収し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ローディングバッファーを添加して95 $^{\circ}$ Cで5分間煮沸し、ウエスタンブロット分析を行った。血管平滑筋条片サンプルを電気泳動により9~13% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、Amersham Hybond-P PVDFメンブレン (ジーイーヘルスケアライフサイエンス) に転写した。PVDFメンブレンは予め5%無脂肪乳を加えた0.05% Tween-20トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) を用いて室温で1時間ブロッキングし使用した。メンブレンをp-MYPT1 (1:800希釈), MYPT1 (1:1000希釈), p-MLC (1:1000希釈), MLC (1:1000希釈) に特異的な一次抗体とともに4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、その後、洗浄し、HRP標識二次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。免疫反応性バンドは化学発光基質キット (サーモフィッシュャーサイエンティフィック, 米国) を使用して検出した。

6. 統計処理

本実験における統計量は、平均 \pm 標準誤差 (SE) として示した。統計分析はunpaired Student's t-test, 複数のサンプルについては最小有意差検定によって実施した。なお、5%未満の危険率を有意水準とした。

結 果

1. SPCによる血管異常収縮に対するノビレチン、ケルセチン、ナリンゲニンの効果

EPAに代わるものとして食品のうち植物由来成分を中心に探索を行い40mM K⁺溶液によって引き起こされるCa²⁺依存性血管収縮には影響を与えず、SPCによる血管異常収縮のみを抑制する物質の探索を試みた。食品成分を中心に探索を行ったところ、柑橘由来成分の一種であるノビレチンに強い血管異

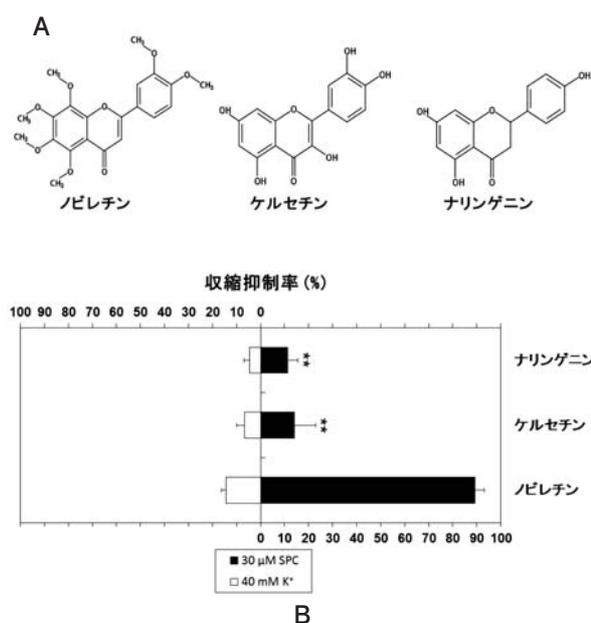


図1 血管平滑筋条片を用いたSPCによる血管異常収縮、40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮に対するノビレチン、ケルセチン、ナリンゲニンの抑制効果の検討。

(A) ノビレチン (フラボングループ), ケルセチン (フラボノールグループ), ナリンゲニン (フラバノングループ), それぞれの化学構造を示す。(B) 血管平滑筋条片におけるSPC (30 μ M) による血管異常収縮もしくは40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮に対するノビレチン (10 μ M), ケルセチン (10 μ M), ナリンゲニン (10 μ M) の収縮抑制率を示す (n=3)。データは平均 \pm 標準誤差にて表示した。抑制率はノビレチン, ナリンゲニン, ケルセチン添加前の定常状態下での張力を100%として算出した。**, P < 0.01 vs ノビレチン; SPC, スフィンゴシルホスホリコリン; BK, ブラジキニン; 40mM K⁺, 40mM K⁺溶液

常収縮抑制効果があることが確認できた。我々はさらにフラボノイドファミリーに属するケルセチン(フラボノールグループ)、ナリンゲニン(フラバノングループ)(図1A)を用いてSPCによる血管異常収縮および40mM K⁺溶液によって引き起こされるCa²⁺依存性血管収縮に対する影響を検討した。結果としてノビレチンは10μMでSPCによる血管異常収縮を強力に抑制し(89.3±3.9%, n=3)、40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮に対しては微弱な抑制効果を示した(14.3±1.9%, n=3)(図1B, 2A)。対照的にケルセチン、ナリンゲニンはそれぞれ10μMの最終濃度においてSPCによる血管異常収縮、40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮に対してほとんど抑制効果を示さなかった(図1B)。ノビレチン(1, 5, 10, 15, 20, 40μM)はSPCによる血管異常収縮と40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮に対して双方を濃度依存的に阻害したが、検討した濃度の中で最終濃度10μMにおいてはCa²⁺

依存性血管収縮に対して抑制効果が小さく、一方で血管異常収縮に対する強い抑制効果を示した(図2A, B)。これらの結果より、ノビレチンがCa²⁺依存性血管収縮にほとんど影響を与えず、SPCによる血管収縮のみ抑制する可能性が示唆された。

2. SPC, 40mM K⁺溶液刺激下における血管収縮および細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)に対するノビレチンの影響

ノビレチンの細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)への影響を確認するため、血管収縮および[Ca²⁺]_iの同時測定を実施した。ノビレチンはSPC依存性の血管異常収縮を抑制したが、[Ca²⁺]_iに影響しなかった(図2C)。一方で40mM K⁺溶液刺激によるCa²⁺依存性血管収縮に対しては微弱な影響を示した(図2D)。

3. SPC刺激後のリン酸化MLCの発現レベルに対するノビレチンの影響

異常収縮の経路としてSPC / ROK経路が確認されていることから、ROKの活性化の指標として

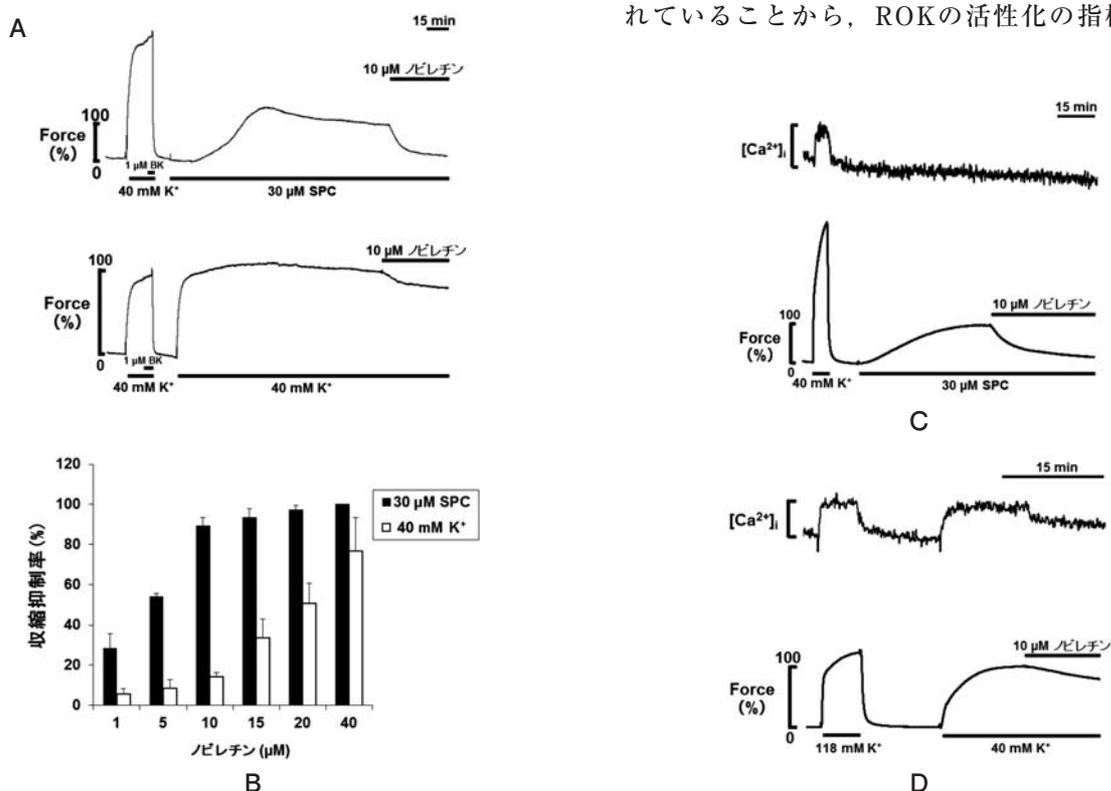


図2 血管平滑筋条片を用いたSPCによる血管異常収縮に対して特異的なノビレチンの抑制効果の検討。(A) ノビレチン(10μM)の代表的な張力測定トレースを示す。(B) 血管平滑筋条片におけるSPC(30μM)による血管異常収縮および40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮でのノビレチンの濃度依存的収縮抑制率を示した(n=3)。データは平均±標準誤差にて表示した。(C, D) Indo1-AMで処理した血管平滑筋条片を用いた[Ca²⁺]_iと張力の同時測定の代表的な張力測定トレースを示す。SPCまたは40mM K⁺溶液刺激による[Ca²⁺]_iの変化および張力に対するノビレチンの影響を検討した。

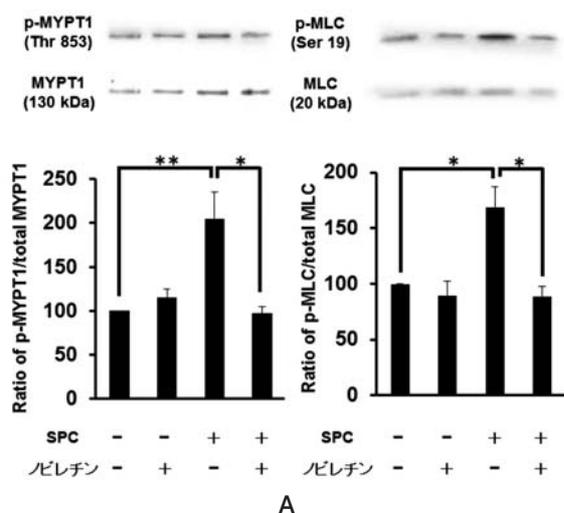


図3 血管平滑筋条片を用いたSPC誘導性のMLCのリン酸化に対するノビレチンの抑制効果の検討。

(A) ノビレチンの血管平滑筋条片におけるSPC刺激によるROKの活性化およびMLCのリン酸化レベルに対するウエスタンブロット解析結果を示す。血管平滑筋条片をノビレチン (10 μ M, 30分) またはコントロール (DMSO, 30分) でプレインキュベートし、SPC存在下あるいは非存在下で処置し (30 μ M, 15分)、比較定量化した (n=3)。データは平均 \pm 標準誤差にて表示した。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; p-MLC, リン酸化ミオシン軽鎖; p-MYPT1, リン酸化ミオシンリン酸標的サブユニット1

MYPT1とMLCのリン酸化レベルをウエスタンブロットティングにより測定した。血管平滑筋条片に対してSPC刺激を行ったところコントロールと比較してリン酸化MYPT1 (Thr853) とリン酸化MLC20 (Ser19) の発現レベルが有意に増加した。一方でノビレチンはSPC刺激によって引き起こされるMYPT1およびMLCのリン酸化レベルを有意に抑制した (図3 A)。

考 察

本研究ではSPCが引き起こす血管異常収縮に対する効果が確認できているEPAの代替としてCa²⁺依存性血管収縮に対して影響がなく、血管異常収縮のみを抑制する効果をもつ食品由来成分を見出すことを目的とし、探索を行った。その結果、柑橘由来成分の一種であるノビレチンを発見した。ノビレチン (10 μ M) はSPCによる血管異常収縮を抑制し、40mM K⁺溶液が引き起こすCa²⁺依存性血管収縮に対してはほとんど影響を示さなかった。これまでEPAの類似構造物質を検討してきたが、EPAに匹

敵するような血管異常収縮抑制作用を示すものは確認できていなかった。今回、EPAの代替としてノビレチンを見出したが、それぞれの構造は全く異なっているため、この結果を予測することはできなかった。フラボノイドの構造に関連する報告では、ケルセチンは構造上強い抗酸化活性を示すことが明らかとなっているが、SPCによる血管異常収縮に対する抑制効果はほとんど確認できなかったことから、抗酸化活性がSPCによる血管異常収縮への抑制作用にそれほど重要ではないと示唆された¹⁰⁾。ノビレチン、ケルセチン、ナリングニン間の構造のわずかな違いによりSPCによる血管異常収縮に対する抑制効果が有意に異なる (図1 A, B)。そこから推測すると残基もしくは基本骨格がSPCによる血管異常収縮に対する抑制効果に重要な役割を果たしていると考えられる。ノビレチンはポリメトキシフラボンに分類され、シークワサー (平実檸檬: Shiikuwasha / *Citrus depressa*) などの柑橘類の外皮のフラベド組織に多く含まれており、抗腫瘍作用、抗炎症性、抗糖尿病、抗認知症、抗動脈硬化作用など様々な作用が知られている¹¹⁻¹⁵⁾。また、他の報告ではノビレチンとその代謝物の血漿濃度は25 μ Mとなることから、本研究で血管異常収縮抑制効果が観察された10 μ Mという濃度は*in vivo*において実現可能性が高い¹⁶⁾。ノビレチンは日常的に摂取可能な食品に含まれることから、病気になる前、即ち血管攣縮に対する予防法としても活用できる可能性がある。また、後投与試験の結果から病気になった後、即ち治療薬としても有用であると考えられる (図2 A, B)。

SPCの血管異常収縮ではROKによるミオシンホスファターゼ (MLCP) の不活性化が深く関わっている。SPC刺激によって活性化されたROKはMLCPのサブユニットであるMYPT1をリン酸化し、MLCPは不活性化され、それによりMLCのリン酸化レベルが上昇し収縮を引き起こすことが知られている^{4, 7)}。ウエスタンブロットの分析では、ノビレチンは血管平滑筋条片を用いた分析においてSPC刺激によるMLC、MYPT1のリン酸化レベルの上昇を有意に抑制した。従ってノビレチンは、SPCによって誘発されるROK活性化を阻害することで血管異常収縮を抑制していると考えられた。

ノビレチンは日常的に摂取可能な食品にも含まれることから、医師の診断を仰ぐ必要はなく、毎日食

べることによって血管攣縮の予防薬としても役立つ可能性が示唆される。

結 語

柑橘類に含まれる食品成分ノビレチンはSPCによる血管の異常収縮に対して強力な抑制効果を持つ一方、40mM K⁺溶液によるCa²⁺依存性血管収縮にはわずかな抑制効果にとどまることが明らかになった。作用メカニズムについては今後のさらなる検証が必要であるが、ノビレチンが血管攣縮に対する予防薬だけでなく特効薬としても利用できる可能性が高い。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導下さいました、分子細胞生理学講座の小林 誠 教授、岸 博子 准教授、張 影 講師、森田知佳 助教の皆様へ深く感謝申し上げます。そして、いつもご支援頂いた同教室の大学院生 呂 博超さんに厚く御礼申し上げます。また、ブタ冠状動脈サンプルを譲渡頂きました北九州市食肉検査管理センターの皆様へ心から感謝致します。

引用文献

- 1) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction : possible involvement of rho-kinase. *FEBS Lett* 2000 ; **482** : 85-90.
- 2) Shirao S, Fujisawa H, Kudo A, Kurokawa T, et al. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage : possible involvement of a sphingosylphosphorylcholine-rho-kinase pathway. *Cerebrovasc Dis* 2008 ; **26** : 30-37.
- 3) Kurokawa T, Yumiya Y, Fujisawa H, Shirao S, et al. Elevated concentrations of sphingosylphosphorylcholine in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage : a possible role as a spasmogen. *J Clin Neurosci* 2009 ; **16** : 1064-1068.
- 4) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, et al. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca²⁺-sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circ Res* 2002 ; **91** : 953-960.
- 5) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, et al. Sphingosylphosphorylcholine Is a Novel Messenger for Rho-Kinase-Mediated Ca²⁺ Sensitization in the Bovine Cerebral Artery : Unimportant Role for Protein Kinase C. *Circ Res* 2002 ; **91** : 112-119.
- 6) Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, et al. Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce Ca²⁺-sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway : possible role for membrane raft. *Circ Res* 2006 ; **99** : 299-306.
- 7) Zhang Y, Zhang M, Lyu B, Kishi H, et al. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation. *Scientific Reports* 2017 ; **7** : 36368.
- 8) Hisaoka T, Yano M, Ohkusa T, Suetsugu M, et al. Enhancement of Rho/Rho-kinase system in regulation of vascular smooth muscle contraction in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovascular Research* 2001 ; **49** : 319-329.
- 9) Austin C, Wray S. The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Journal of Physiology* 1995 ; **488** : 281-291.
- 10) Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones : An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014 ; **84** : 206-239.
- 11) Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T,

- et al. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006 ; 70. (1) : 178-192.
- 12) Goh J, Tan L-T, Goh J-K, Chan K-G, et al. Nobiletin and Derivatives : Functional Compounds from Citrus Fruit Peel for Colon Cancer Chemoprevention. *Cancers* 2019 ; 11 : 867.
- 13) Nakajima A, Ohizumi Y. Potential Benefits of Nobiletin, A Citrus Flavonoid, against Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *J Mol Sci* 2019 ; 20 : 3380.
- 14) Huang H, Li L, Shi W, Liu H, et al. The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016 ; 2016 : 291879614.
- 15) Mulvihill E-E, Burke A-C, Huff M-W. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr* 2016 ; 36 : 275-299.
- 16) Wang M, Zheng J, Zhong Z, Song M, et al. Tissue distribution of nobiletin and its metabolites in mice after oral administration of nobiletin. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013 ; Volume 27 Issue S1 : 125.3-125.3.

Nobiletin, A Citrus Flavonoid, Suppresses SPC-induced Abnormal Vascular Contraction

Kenji MIYANARI

Department of Molecular and Cellular Physiology (Physiology I.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

In contrast to Ca^{2+} -dependent contraction of vascular smooth muscle (VSM), sphingosylphosphorylcholine (SPC) / Rho-kinase (ROK) pathway, which induces Ca^{2+} -independent VSM contraction, contributed to abnormal VSM hypercontraction such as vasospasm. After extensive screening of various food-derived components, we found that nobiletin, a citrus flavonoid, which suppressed the SPC-induced Ca^{2+} -sensitization of VSM contraction with little inhibitory effect on depolarization-induced Ca^{2+} -dependent contraction by 40 mM K^+ . Furthermore, in the simultaneous measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and force, nobiletin inhibited the SPC-induced Ca^{2+} -sensitization of VSM contraction without change of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, but had slight effects on 40 mM K^+ -induced Ca^{2+} -dependent contraction and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We previously reported that SPC induced ROK translocation from cytoplasm to cell membrane, and activation of ROK led to the increase in phosphorylation levels of myosin phosphatase target subunit1 (MYPT1) and myosin light chain (MLC), suggesting that activation of ROK plays an important role in vasospasm. Nobiletin significantly inhibited the SPC-induced phosphorylation levels of MYPT1 and MLC. These results suggest that nobiletin is a promising candidate for novel therapeutic drug target for abnormal VSM contraction leading to vasospasm.

