

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05220

研究課題名(和文)肺高血圧進展におけるプロリン異性化酵素Pin1の役割解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Role of Pin1 in the development of pulmonary hypertension and therapeutic application

研究代表者

酒井 俊 (SAKAI, Satoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30282362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロリン異性化酵素(Pin1)のノックアウトマウス(KO)に対し低酸素誘発性肺高血圧モデルを作製した。低酸素により、野生型マウスでは肺高血圧症が誘発されるのに対しKOでは抑制されていた。Pin1が肺動脈血管内皮細胞(PAEC)傷害に関与すると仮定し、PAECを用いたin vitroの実験を行った。PAECにおいて、Pin1ノックダウンはリン酸化eNOS発現を増加させるのに対し、過剰発現は発現を変化させなかった。Pin1ノックダウンはアポトーシスを抑制するのに対し、過剰発現は促進した。Pin1は肺高血圧症の進展を促進する方向に働く分子であると推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患である肺動脈性肺高血圧症の病態をPin1というユニークな分子を通して解明しようとする研究であり、得られた結果は国内外を通して初めてのものである。Pin1は肺動脈血管内皮細胞の内皮機能抑制と細胞死促進を介して肺高血圧を促進していることが明らかになった。肺動脈性肺高血圧症の治療効果は限定的であることから、Pin1抑制が新たな治療法として今後追加される可能性を提示できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the pathophysiological roles of peptidyl prolyl isomerase 1 (Pin1) in the development of pulmonary hypertension (PH). We generated hypoxia-induced PH model in Pin1-knockout mice (KO). Although wild type mice developed PH by hypoxia, KO did not develop. We hypothesized that Pin1 contributes to the injury of pulmonary arterial endothelial cell (PAEC); we performed in vitro experiments. Phosphorylated eNOS molecule was significantly increased by knockdown of Pin1; however, it did not differ by overexpression of Pin1. Apoptosis of PAEC was significantly suppressed by Pin1 knockdown; however, it was augmented by Pin1 overexpression. These findings suggest that Pin1 plays a role in exaggerating PH, partly via endothelial cell dysfunction in pulmonary arteries.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 プロリン異性化酵素 肺動脈血管内皮細胞 内皮型一酸化窒素合成酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は血管平滑筋細胞 (PASMC) の著明な増殖による肺動脈壁肥厚・血管閉塞を本態とし、肺血管抵抗・肺動脈圧上昇を呈する難治性疾患である。PAH の病態にガン同様の細胞増殖機序が関与し、その分子を標的にすれば新規治療法の開発に結びつくのではないかとこの着想に至った。

プロリン異性化酵素 (peptidyl prolyl isomerase 1; Pin1) は、細胞内シグナル分子 (キナーゼ・転写因子等) 内の Phospho(p)-Ser/Thr-Pro 配列を認識し、その標的分子の cis ⇌ trans 構造を変換することにより標的分子活性を制御する。この配列を有する c-Fos, c-Jun, cdc2, p53, Bcl2, STAT3 等の細胞増殖シグナル・細胞周期・ストレス応答等の関連分子の活性化に対して Pin1 が関係することが明らかにされており、これらの機能分子の活性化を介して Pin1 は PAH の病態形成に関与していると考えられている。

その一方 PAH では、肺動脈における血管内皮機能低下があることが明らかにされている。血管内皮機能は内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) による一酸化窒素 (NO) の産生により制御される。eNOS 分子は上述の Ser/Thr-Pro 配列を有しており、活性化の際に同部位のリン酸化の修飾を受けていることが知られている。よって eNOS 分子の活性化において同部位が Pin1 による制御を受けている可能性がある。

しかしながら、Pin1 が PAH の病態にどのように関与しているかは不明であり、その際 eNOS が Pin1 の修飾を受けているかも不明である。

2. 研究の目的

PAH の病態形成において、Pin1 が関与する事を Pin1 遺伝子破壊マウスを用いて明らかにし、その際に細胞増殖に関連するキナーゼが Pin1 により活性化されていることを明らかにすること。

PAH で認められる肺血管内皮機能低下に関し、eNOS 分子の活性化が Pin1 により制御されることを明らかにし、Pin1 が肺血管内皮機能にどのような影響を与えているのかを明らかにすること。

3. 研究の方法

野生型マウス (WT [C57BL6/J]) および全身性 Pin1 ノックアウトマウス (KO) をそれぞれ室内気および低酸素チャンパー (酸素濃度 10%) 内で 3 週間飼育し、低酸素誘発性肺高血圧モデルを作製した。肺高血圧の有無は右室収縮期圧および右室重量増加にて評価した。

摘出肺組織において、細胞増殖関連キナーゼである Erk および Akt の活性化 (リン酸化) を Western blot にて評価した。

肺血管内皮機能における Pin1 の関与を調べるために、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (hPAEC) の培養系において、Pin1 遺伝子過剰発現およびノックダウンの系を、mRNA および siRNA のトランスフェクションにより確立した。また、実際に Pin1 が eNOS 分子に結合して機能しているかを免疫沈降法により検討した。Pin1 過剰発現及びノックダウンが eNOS 発現に与える影響を評価した。

hPAEC の細胞死に対し、Pin1 過剰発現及びノックダウンが与える影響を明らかにした。

4. 研究成果

WT では、低酸素負荷により右室収縮期圧と右室重量が室内気に比べ有意に増加し、肺高血圧を呈していた。一方、KO では同処置によりこれらの指標の変化はなく、肺高血圧の病態形成が抑制されていた。また、低酸素負荷による肺動脈血管中膜の肥厚は、WT では増加するのに対し、Pin1-KO では抑制されていた。

摘出肺組織におけるリン酸化 Erk およびリン酸化 Akt の発現は、低酸素負荷により WT において増加するのに対し、Pin1-KO では、発現増加は抑制されていた。以上より、低酸素誘発性肺高血圧モデルにおいて、Pin1 は病態形成を促進する方向に関与していることが明らかになった。

次に、Pin1 の eNOS に及ぼす影響を検討するため、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (hPAEC) の培養系における Pin1 の過剰発現とノックダウンの系を確立した。過剰発現については、in vitro 転写キットを用いて作製した Pin1 mRNA をリポフェクション法により遺伝子導入し (対照は LacZ)、ノックダウンについては、Pin1 遺伝子情報を基にデザインした siRNA をリポフェクション法により導入した (対照はスクランブル配列の 2 本鎖 RNA)。過剰発現・ノックダウンともに、Pin1 遺伝発現・タンパクレベルは対照と比べ著明に増加または減少していた。

Pin1 抗体で免疫沈降したタンパク複合体からリン酸化 eNOS 分子が検出され、リン酸化 eNOS 抗体で免疫沈降した複合体から Pin1 分子が検出されることが、免疫沈降法により明らかとなった。

リン酸化 eNOS の発現は、Pin1 過剰発現では対照と変化なかったが、Pin1 ノックダウンにより著明に増加した。

最後に、Pin1 発現変化による hPAEC のアポトーシスおよびアポトーシス感受性について検討した。Pin1 過剰発現はアポトーシスを増加させドキシソルピシンによるアポトーシス感受

性を上げることを Caspase-3/7 活性の測定により明らかとなった。一方、Pin1 ノックダウンはアポトーシスを抑制しアポトーシス感受性を低下させることが明らかとなった。また、アポトーシスの別指標である cleaved caspase-3 の発現においても同様のパターンであることが明らかとなった。

以上より Pin1 は、リン酸化 eNOS に結合してその活性を制御していることが明らかとなった。Pin1 の機能増強は、eNOS 活性を抑制し肺血管内皮細胞の細胞死を誘導することにより血管内皮機能を抑制するのに対し、Pin1 機能喪失は、eNOS 活性を増加させるとともに肺血管内皮細胞の細胞死を抑制することにより血管内皮機能を保つ方向に働いていることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- Kimura T, Tajiri K, Sato A, Sakai S, Wang Z, Yoshida T, Ueda T, Hiroe M, Aonuma K, Ieda M, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C accelerates adverse ventricular remodeling after myocardial infarction by modulating macrophage polarization. **Cardiovasc Res.** 115, 614-624, 2019. DOI: 10.1093/cvr/cvy244 査読有り
- Miyauchi T, Sakai S. Endothelin and the heart in health and diseases. **Peptides.** 111, 77-88, 2019. DOI: 10.1016/j.peptides.2018.10.002 査読有り
- Honda J, Kimura T, Sakai S, Maruyama H, Tajiri K, Murakoshi N, Homma S, Miyauchi T, Aonuma K. The glucagon-like peptide-1 receptor antagonist liraglutide improves hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice partly via normalization of reduced ETB receptor expression. **Physiol Res.** 67, S175-184, 2018. 査読有り
- Tagawa K, Ra SG, Kumagai H, Yoshikawa Y, Takekoshi K, Sakai S, Miyauchi T, Maeda S. Effects of resistance training on arterial compliance and plasma endothelin-1 levels in healthy men. **Physiol Res.** 67, S155-166, 2018. 査読有り
- Omori S, Uchida F, Oh S, So R, Tsujimoto T, Yanagawa T, Sakai S, Shoda J, Tanaka K, Bukawa H. Exercise habituation is effective for improvement of periodontal disease status: a prospective intervention study. **Ther Clin Risk Manag.** 14, 565-574, 2018. 査読有り
- Nagai H, Hasegawa S, Uchida F, Terabe T, Ishibashi-Kanno N, Kato K, Yamagata K, Sakai S, Kawashiri S, Sato H, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression. **Int J Oncol.** 52, 841-850, 2018. 査読有り
- Tanabe N, Ikeda S, Tahara N, Fukuda K, Hatano M, Ito H, Nakayama T, Anzai T, Hashimoto A, Inoue T, Kajinami K, Kihara Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Murohara T, Okazaki O, Sakai S, Satoh T, Takeda Y, Takeishi Y, Taniguchi M, Watanabe H, Yamamoto T, Yamauchi-Takahara K, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and Safety of an Orally Administered Selective Prostacyclin Receptor Agonist, Selexipag, in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Circ J.** 81, 1360-1367, 2017. 査読有り
- Abe S, Tsuboi H, Toko H, Honda F, Ohyama A, Takahashi H, Yokosawa M, Asashima H, Hagiwara S, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Sakai S, Aonuma K, Sumida T. The effectiveness of upfront pulmonary vasodilators combination therapy in addition to corticosteroids for pulmonary arterial hypertension associated with systemic lupus erythematosus: two successful cases utilising both corticosteroids and an upfront combination of vasodilators. **Mod Rheumatol Case Rep.** 1, 73-78, 2017. 査読有り
- Tahara N, Dobashi H, Fukuda K, Funauchi M, Hatano M, Ikeda S, Joho S, Kihara Y, Kimura T, Kondo T, Matsushita M, Minamino T, Nakanishi N, Ozaki Y, Saji T, Sakai S, Tanabe N, Watanabe H, Yamada H, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and Safety of a Novel Endothelin Receptor Antagonist, Macitentan, in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Circ J.** 80, 1478-1483, 2016. Sakai S, Maruyama H, Kimura T, Tajiri K, Honda J, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T. Antagonists to endothelin receptor type B promote apoptosis in human pulmonary arterial smooth muscle cells. **Life Sci.** 159, 116-120, 2016. 査読有り
- Maruyama H, Dewachter C, Sakai S, Belhaj A, Rondelet B, Rummelink M, Vachier JL, Naeije R, Dewachter L. Bosentan reverses the hypoxia-induced downregulation of the bone morphogenetic protein signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. **Life Sci.** 159, 111-115, 2016. 査読有り
- Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis. **J**

Dermatol Sci. 83, 226-233, 2016. 査読有り

Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. **J Oral Pathol Med.** 45, 248-255, 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

Sakai S, Maruyama H, Honda J, Ieda M. Peptidyl prolyl isomerase (Pin1) contributes to the development of pulmonary hypertension partly via pulmonary vascular endothelial cell dysfunction. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.

Sakai S, Maruyama H, Honda J, Ieda M. Metabolic analysis in the lung of mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.

Honda J, Kimura T, Sakai S, Maruyama H, Homma S, Miyauchi T, Aonuma K. The glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice partly via recovery of ETB receptor expression. Congress of the European Society of Cardiology (ESC2018) 2018.9.

Maruyama H, Sakai S, Aonuma K. Active selezipag-metabolite MRE-269 induces DUSP1 and inhibits PASM C proliferation. Congress of the European Society of Cardiology (ESC2018) 2018.9.

Yonebayashi N, Tajiri K, Murakoshi N, Ymagami F, Okabe Y, Feng D, Qin R, Sakai S, Shibuya A, Aonuma K, Ieda M. MAIR-II deficiency prevents excessive inflammation and fibrosis protecting against cardiac dysfunction post-myocardial infarction. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research. 2018.9.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内田 隆史

ローマ字氏名：(UCHIDA, takafumi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80312239

研究分担者氏名：柳川 徹
ローマ字氏名：(YANAGAWA, toru)
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：教授
研究者番号(8桁)：10312852

研究分担者氏名：正田純一
ローマ字氏名：(SHODA, junichi)
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：教授
研究者番号(8桁)：90241827

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。