

令和元年9月3日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08350

研究課題名(和文) 多機能性タンパク質ヌクレオリンが介在するカドミウムと鉛による血管病変発症機構

研究課題名(英文) Mechanisms of vascular disease caused by cadmium and lead mediated by multifunctional protein nucleolin.

研究代表者

藤原 泰之 (Fujiwara, Yasuyuki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40247482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオリンは、血管内皮細胞やがん細胞の細胞表面に高く発現している多機能性のタンパク質であり、それらの細胞の機能調節に影響を及ぼすことが示されている。本研究では、細胞表面のヌクレオリンが血管内皮細胞の増殖促進に寄与していることを明らかにした。また、有害重金属であるカドミウム曝露による各種防御因子の発現にヌクレオリンが関与することも明らかにした。今後、血管内皮細胞のヌクレオリンの機能や役割についてさらに検討をすることでヌクレオリンの関わる増殖シグナル伝達経路やカドミウムによる血管毒性発症機構の解明につながることを期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化病変は、虚血性心疾患や脳血管疾患などの主要死因の上位を占める疾患に深く関与している。この病変の発症・進展の分子機構は極めて複雑であり、多くの研究者がその分子機構解明を目指して研究を行っている。本研究において、血管内皮細胞におけるヌクレオリンの新たな機能のいくつかを解明することができたことは、カドミウムなどの有害重金属による動脈硬化症などの血管病変発症機構の解明研究に新たな知見を提供するものであると考えられ、将来的には公衆衛生の向上にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Nucleolin is a multifunctional protein that is highly expressed on the cell surface of vascular endothelial cells and cancer cells, and has been shown to affect the function regulation of those cells. The present study, we found that nucleolin on the cell surface contributes to the growth promotion of vascular endothelial cells. In addition, it was also revealed that nucleolin is involved in the expression of various defense factors by exposure to cadmium, which is a harmful heavy metal. In the future, further studies on the function and role of nucleolin in vascular endothelial cells will be expected to lead to the elucidation of the proliferative signal transduction pathways in endothelial cells and the mechanism of vascular toxicity caused by cadmium.

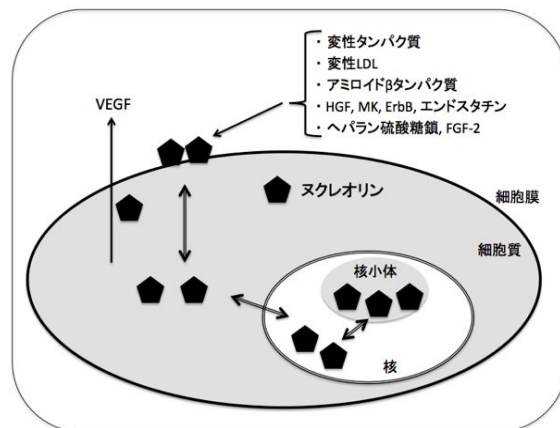
研究分野：血管毒性学

キーワード：ヌクレオリン 動脈硬化 血管内皮細胞 重金属 カドミウム

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変は、虚血性心疾患や脳血管疾患などの主要死因の上位を占める疾患に深く関与している。この病変の発症・進展の分子機構は極めて複雑ではあるが、病変形成過程において、血管内腔を一層で覆っている血管内皮細胞層の傷害後の修復遅延や血管内皮細胞層の機能障害による抗凝固活性の低下、血管中膜に存在する血管平滑筋細胞の血管内膜における増生とプロテオグリカンをはじめとする細胞外マトリクス成分の蓄積、マクロファージおよび血管平滑筋細胞の変性 LDL の取り込みによる血管内膜での泡沫化などが観察される。申請者はこれまでに、血管毒性を示す環境汚染重金属のカドミウムおよび鉛が血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に対して種々の機能異常を引き起こすこと、並びにそれらの機能異常には、細胞機能調節にも関与しているプロテオグリカンの合成異常が関与することを明らかにしてきた。例えば、血管内皮細胞においては、鉛がヘパラン硫酸糖鎖を結合したヘパラン硫酸プロテオグリカンの大型分子種であるパールカン分子の合成を選択的に阻害することを通じて、血管内皮細胞が産生する内因性の塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の応答性を低下させ、結果として傷害された内皮細胞層の修復遅延を引き起こすこと (Fujiwara and Kaji, J. Health Sci., 2000; Fujiwara, J. Health Sci., 2004) などを明らかにした。しかしながら、重金属による血管毒性発現機構解析については、未だ不明な点が多く残されていた。

ヌクレオリンは発見当初、核タンパク質として報告され、その主な機能としては、RNA 結合タンパク質や DNA 結合タンパク質として核内でリボソームの生合成やクロマチンの脱凝縮等に関与していることが知られている。また、細胞質成分の核への流入や核成分の核外輸送といった核—細胞質間のシャトルタンパク質として機能することが示されている。さらに、ヌクレオリンは、細胞表面においても存在しており、我々はこれまでにマクロファージ表面に発現しているヌクレオリンが、動脈硬化進展に関わる変性 LDL やアミロイドタンパク質等を細胞内に取り込むスカベンジャーレセプターの一つとして機能すること (Miki et al., Biol. Pharm. Bull., 2015a; 2015b) を見出した。また、ヌクレオリンは、各種のがん細胞や血管内皮細胞表面に高く発現していることが示されており、肝細胞増殖因子 (HGF)、ミッドカイン (MK)、上皮細胞増殖因子受容体 (ErbB) およびエンドスタチンなどの腫瘍増殖や血管新生に深く関与することが知られている因子と結合し、それらの因子の機能調節に関与していることが明らかにされている。さらに、ヌクレオリンは、ヘパリン糖鎖存在下で内皮増殖に関わる FGF-2 と結合すること (Take et al., J. Biochem., 1994) や内皮細胞層の修復過程において、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現誘導を介して血管新生誘導に関与すること (Liang et al., Biochim. Biophys. Acta, 2013) なども報告されている。これらの知見は、多機能性タンパク質ヌクレオリンが、動脈硬化病変の発症・進展過程において、マクロファージの泡沫化や、増殖因子等を介した血管組織の各種細胞の機能調節に関与し、影響を及ぼす可能性を示唆している。



2. 研究の目的

これまで重金属による血管構成細胞の機能障害に関する様々な研究報告があるものの、ヌクレオリン分子の発現分布並びに機能異常と重金属の関係について着目した研究は、血管構成細胞だけでなく他の細胞種についても皆無であった。我々はこれまでに、カドミウムに曝露したマクロファージにおいて、ヌクレオリンの発現分布が変化することをタンパク質レベルで見出している。従って、血管毒性を示す鉛やカドミウム、ヒ素などの有害金属が、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞のヌクレオリンの発現や細胞内分布、代謝調節などに影響を及ぼし、その結果としてヌクレオリンの機能異常を引き起こし、内皮増殖をはじめとする内皮機能障害を引き起こす可能性が考えられた。

そこで本研究では、動脈硬化病変の発症と進展に深く関わっていることが示唆されるヌクレオリン分子に着目し、動脈硬化症などの血管病変の危険因子とされる環境汚染重金属のカドミウムや鉛によって引き起こされる血管構成細胞の機能障害へのヌクレオリン分子の関与を明らかにし、ヌクレオリン分子の機能異常・代謝異常の観点から、カドミウム並びに鉛による新たな血管毒性発現機構の解明を目指すことを目的とした。

具体的には、(1)血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の培養系を用い、各細胞が発現しているヌクレオリン量や細胞内分布を確認し、その後 (2) ヌクレオリンの発現と細胞内分布に対するカドミウム並びに鉛曝露の影響を確認すると共に、それらの作用発現機構を解明する。次に、(3) 申請者らがこれまでに明らかにしてきた有害金属によって誘導される血管構成細胞の機能障害、

例えば、血管内皮細胞に対する増殖阻害作用などに対するヌクレオリンの関与を解明し、有用な成果を得ることを目指した。

3. 研究の方法

各種血管構成細胞のヌクレオリン発現量並びに細胞内分布に対するサイトカイン・増殖因子の影響

血管内皮細胞および血管平滑筋細胞などの各種血管構成細胞を用い、各細胞間でのヌクレオリンの発現量や細胞内分布についての比較を行うと共に、動脈硬化病変の進展形成に関わる各種サイトカイン・増殖因子による影響を検討し、ヌクレオリン発現調節に関する基礎的情報を得る。

[細胞と処理]

ヒト大動脈血管内皮細胞、ヒト脳微小血管内皮細胞、ヒト大動脈血管平滑筋細胞などを用いた。各細胞をスパーズ（低密度）な状態に播種し、その後コンフルエント（高密度）の状態になるまで経時的（細胞播種後 24, 48, 72 時間）にヌクレオリンの発現レベルと細胞内分布を確認・把握した。また、スパーズあるいはコンフルエントの状態の各種細胞を形質転換成長因子（TGF）や腫瘍壊死因子（TNF）などで 24 時間処理した。

[分析]

- 1) 細胞中ヌクレオリン mRNA 量の測定：各培養条件の各種細胞からトータル RNA を抽出し、ヌクレオリン mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。
- 2) 細胞中ヌクレオリンタンパク質量の測定：各培養条件の各種細胞を可溶化剤で溶解後に回収し、ウエスタンブロット分析でタンパク質量を測定した。
- 3) 細胞膜画分、細胞質画分および核画分をそれぞれ分取し、それらの各画分におけるヌクレオリンタンパク質量についても確認した。

各種血管構成細胞のヌクレオリン発現量並びに細胞内分布に対する重金属の影響

コンフルエントおよびスパーズな状態の各種血管構成細胞を非特異的な細胞毒性が認められないレベルのカドミウムあるいは鉛で 3, 6, 12 および 24 時間処理した後、上述の方法でヌクレオリンの mRNA 量、トータルのタンパク質量および細胞内分布について検討し、各種有害金属によって誘導されるヌクレオリンの発現変動並びに細胞内分布への影響を検討した。

4. 研究成果

(平成 28 年度)

平成 28 年度は、血管内皮細胞のヌクレオリン発現に対するサイトカイン・増殖因子の影響として、形質転換成長因子（TGF- β ）に着目し検討したが、TGF- β 処理によってヌクレオリンの mRNA レベルはわずかに低下したもののタンパク質レベルはほとんど影響を受けず、TGF- β はヌクレオリン発現にほとんど影響を与えないことが示唆された。次に、ヌクレオリン発現に対する重金属の影響として、鉛およびカドミウムについて検討を行った。コンフルエントの血管内皮細胞を鉛で処理したところ、ヌクレオリンの mRNA レベルおよびタンパク質レベルはほとんど変化しなかった。また、スパーズ（低密度）な血管内皮細胞を鉛で処理してもヌクレオリンのタンパク質レベルはほとんど変化しなかった。次に、血管内皮細胞をカドミウム存在下で培養し、ヌクレオリンの mRNA レベルおよびタンパク質レベルを調べたところ、カドミウムもヌクレオリンの mRNA レベルおよびタンパク質レベルにほとんど影響を与えなかった。そこで、siRNA によってヌクレオリンをノックダウンした血管内皮細胞を作成し、カドミウム毒性に対する影響を検討したところ、ヌクレオリンのノックダウンはカドミウムの細胞毒性を増強することが観察された。従って、ヌクレオリンは、カドミウムの毒性発現に対して防御的に関与している可能性が考えられた。

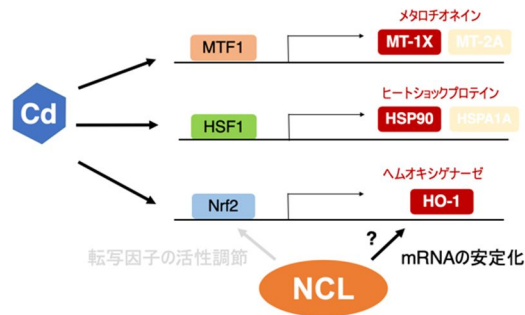
(平成 29 年度)

平成 29 年度は、血管内皮細胞におけるカドミウムに対する細胞防御因子の発現誘導機構におけるヌクレオリンの関与について検討した。カドミウムの毒性軽減に関わる転写因子として Nrf2 および MTF-1 が知られている。血管内皮細胞をカドミウム処理したところ、Nrf2 の下流遺伝子(HO-1, NQO-1) および MTF-1 の下流遺伝子(MT-1A, MT-2A)の発現上昇が確認されたことから、血管内皮細胞においてもカドミウム曝露に反応して MTF-1 および Nrf2 の活性化が引き起こされると考えられる。次に siRNA によってヌクレオリンをノックダウンした血管内皮細胞を作成し、カドミウムによる遺伝子発現レベルを確認したところ、ヌクレオリンのノックダウンはカドミウムによる HO-1 および NQO-1 の発現上昇を有意に低下させた。一方、ヌクレオリンのノックダウンはカドミウムによる MT-1A および MT-2A の発現上昇を低下させることはなかった。したがって、ヌクレオリンは血管内皮細胞におけるカドミウムによる Nrf2 の活性化機構を正に制御している可能性が考えられた。

(平成30年度)

平成30年度では、血管内皮細胞の細胞増殖並びに細胞防御応答機構へのヌクレオリンの役割について検討した。ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞にヌクレオリンに対する siRNA を導入し、ヌクレオリンノックダウン細胞を作製した。この細胞と対照細胞の細胞増殖能を比較したところ、細胞密度の低下と生細胞数の減少が認められた。また、抗ヌクレオリン抗体処理によっても同程度の増殖阻害効果が認められたことから、細胞表面のヌクレオリンが内皮細胞の増殖能に寄与していると考えられる。また、カドミウムにより発現誘導される各種防御因子の発現に及ぼすヌクレオリンノックダウンの影響について対照細胞との比較検討を行ったところ、カドミウム曝露によって誘導される生体防御因子であるメタロチオネイン(MT-1X)、ヒートショックプロテイン(HSP90)及びヘムオキシゲナーゼ(HO-1)の発現誘導にヌクレオリンが関与することが明らかとなった。

Cd曝露に対する細胞内防御応答におけるNCLの関与



ヌクレオリンは、血管内皮細胞やがん細胞の細胞表面に高く発現している多機能性のタンパク質であり、それらの細胞の機能調節に影響を及ぼすことが示されている。本研究では、細胞表面のヌクレオリンが血管内皮細胞の増殖促進に寄与していることを明らかにした。また、有害重金属であるカドミウム曝露による各種防御因子の発現にヌクレオリンが関与することも明らかにした。今後、血管内皮細胞のヌクレオリンの機能や役割についてさらに検討をすることでヌクレオリンの関わる細胞増殖シグナル伝達経路やカドミウムや鉛による血管毒性発現機構の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計8件)

1. 藤原泰之, 来栖花奈, 高橋勉, 三木雄一. マクロファージはヌクレオリンを介してアミロイドを貪食する. 第43回日本毒性学会学術年会. 名古屋. 2016年6月.
2. 高木由香, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之. 血管内皮細胞のヌクレオリン発現及び細胞内分布への鉛の影響. 第3回東京環境健康薬学研究会. 東邦大学. 2016年8月.
3. 本間雄太, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之. 血管内皮細胞のヌクレオリン発現におけるTGF- β の影響. 第3回東京環境健康薬学研究会. 東邦大学. 2016年8月.
4. 湯本藍, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之. 血管内皮細胞におけるカドミウムの細胞毒性発現におけるヌクレオリンの関与. 第3回東京環境健康薬学研究会. 東邦大学. 2016年8月.
5. 湯本藍, 高橋勉, 篠田陽, 鍛冶利幸, 藤原泰之. カドミウムの血管内皮細胞傷害作用におけるヌクレオリンの役割. 日本薬学会第137年会. 仙台. 2017年3月.
6. 高橋勉, 本間雄太, 篠田陽, 鍛冶利幸, 藤原泰之. TGF- β による血管内皮細胞の増殖抑制におけるヌクレオリンの役割. 日本薬学会第137年会. 仙台. 2017年3月.
7. 宮崎有紀, 湯本藍, 高橋勉, 篠田陽, 鍛冶利幸, 藤原泰之. カドミウムによる血管内皮細胞毒性発現におけるヌクレオリンの関与. 第44回日本毒性学会学術年会. 横浜. 2017年7月.
8. 藤原泰之, 佐野宏造, 小坂真澄, 篠田陽, 恒岡弥生, 高橋勉. ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞の増殖と防御応答におけるヌクレオリンの役割. 日本薬学会第139年会. 千葉. 2019年3月.

〔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：特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名：藤原泰之
ローマ字氏名：FUJIWARA YASUYUKI
所属研究機関名：東京薬科大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40247482

(2)連携研究者

連携研究者氏名：高橋 勉
ローマ字氏名：TAKAHASHI TSUTOMU
所属研究機関名：東京薬科大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：00400474

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。